

基于基因水平研究乳酸乳球菌的有氧呼吸代谢

刘飞, 李柏良, 杜金城, 于上富, 丁秀云, 徐敏, 霍贵成

(东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本研究旨在对能和不能进行有氧呼吸代谢的乳酸乳球菌呼吸链基因同源性和细胞色素氧化酶活力进行分析, 为确定乳酸乳球菌的有氧呼吸必要条件奠定基础。首先, 分别测定已筛选到的菌株 KLDS4.0325 和 KLDS4.1102 在发酵和有氧呼吸代谢时的生长曲线; 其次, 提取 KLDS4.1102 的基因组 DNA, 随后利用 PCR 扩增其呼吸链编码基因并进行 DNA 测序; 最后, 从 GenBank 数据库下载 KLDS4.0325 的呼吸链编码基因序列, 利用 DNAMAN 软件比较这两株菌呼吸链编码基因的同源性, 并测定这两株菌的细胞色素氧化酶活性。结果表明在有氧呼吸条件下 KLDS4.0325 的生物量和 pH 都显著增大, 而 KLDS4.1102 在两种条件下呈现一致的生长趋势, 呼吸链编码基因的同源性分析显示 KLDS4.1102 具备完整的呼吸链, 而酶活测定结果却显示 KLDS4.1102 无细胞色素氧化酶活性, 这表明 KLDS4.1102 不能进行有氧呼吸代谢不是由于编码基因缺陷造成的, 可能是某些编码基因不能正常表达, 导致其细胞色素氧化酶不能正常发挥作用。

关键词: 乳酸乳球菌; 血红素; 有氧呼吸链; 同源性; 细胞色素氧化酶

文章编号: 1673-9078(2016)9-56-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.009

Aerobic Respiration in *Lactococcus lactis* based on Gene Expression

LIU Fei, LI Bai-liang, DU Jin-cheng, YU Shang-fu, DING Xiu-yun, XU Min, HUO Gui-cheng

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The homology of genes coding for respiratory chain and cytochrome oxidase activity of *Lactococcus lactis* strains that can or cannot undergo aerobic respiration were compared to provide a foundation for determining the necessary conditions for aerobic respiration in *Lactococcus lactis*. Firstly, growth curves of the two selected strains, KLDS4.0325 and KLDS4.1102, were determined under fermentation and aerobic respiration conditions. Secondly, the genomic DNA of strain KLDS4.1102 was extracted, and its respiratory chain-encoding genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), followed by DNA sequencing. Finally, the sequences of genes coding for the respiratory chain of KLDS4.0325 were downloaded from the GenBank database, the homology of genes coding for the respiratory chain in the two *Lactococcus lactis* strains was compared by DNAMAN software, and the cytochrome oxidase activities of these two strains were determined. The biomass and pH of KLDS4.0325 undergoing aerobic respiration increased significantly, but KLDS4.1102 presented a consistent growth trend between the two physiological conditions. The homology analysis of the genes coding for respiratory chain of two strains showed that KLDS4.1102 possessed a complete respiratory chain, while cytochrome oxidase activity could not be detected in KLDS4.1102. This finding suggests that KLDS4.1102 cannot undergo respiratory metabolism normally, possibly because some gene cannot be expressed normally, leading to abnormal cytochrome oxidase function.

Key words: *Lactococcus lactis*; heme; aerobic respiratory chain; homology; cytochrome oxidase

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)属于兼性厌氧菌, 氧气在其细胞内会形成超氧阴离子、羟自由基和臭氧等活性氧簇。活性氧簇可以攻击蛋白质和核酸等细胞物质, 进而造成细胞的老化及衰亡^[1]。乳酸乳球菌的

收稿日期: 2015-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401512); 国家 863 项目(2012AA022108, 2011AA100902)

作者简介: 刘飞(1980-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品微生物与生物技术

通讯作者: 霍贵成(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 营养与食品安全

核心应用是制作生产干酪的发酵剂, 其中乳脂亚种主要用来生产硬质干酪, 而乳酸亚种被用来生产软质干酪^[2]。在生产过程中, 难免会接触到氧气, 导致活菌数量不足。然而, 当乳酸乳球菌在进行有氧呼吸代谢时可以消耗氧气, 更少的氧气可以降低活性氧簇引起的细胞损伤。因此, 深入研究乳酸乳球菌的有氧呼吸代谢的机制, 提高乳酸乳球菌的活菌数及耐氧能力具有非常重要的意义。

1970 年, Sijpesteijn 首次发现在振荡培养并加入血红素时, 乳酸乳球菌能够生长^[3]。2002 年, Gaudu 等以大肠杆菌的电子传递链为蓝本总结出了乳酸乳球

菌的完整有氧呼吸链模型^[4]。乳酸乳球菌进行有氧呼吸需要三个主要的跨膜元件：(1)作为电子供体的NADH脱氢酶，由 *noxA* 和 *noxB* 基因编码；(2)作为电子传递体的甲基萘醌，由 *menA* 和 *menFDXBEC* 基因簇编码的酶合成；(3)作为电子受体同时发挥完整酶活性需要依赖血红素的细胞色素氧化酶，该酶由 *cydA*、*cydB*、*cydC* 和 *cydD* 基因编码。2009年，Brooijmans等^[5]分析了不同属乳酸菌的有氧呼吸链组成的异同，研究表明几乎所有的乳酸菌进行有氧呼吸代谢的前提都是需要存在一个能够发挥作用的完整呼吸链。

作为同型发酵的乳酸菌，乳酸乳球菌具有有限的生物合成能力和较为简单的代谢途径，最终发酵产物以乳酸为主。乳酸乳球菌在进行有氧呼吸代谢时，乳酸脱氢酶活性降低，乳酸的产量下降，环境酸化变慢，使乳酸乳球菌可以更高效率的利用碳源。乳酸乳球菌进入有氧呼吸代谢后期时，丙酮酸脱氢酶和乙酰乳酸合成酶的活性增加，导致双乙酰和乙偶姻的大量积累，使得生物量显著增加^[6]。F₀F₁-ATP合成酶的“角色”发生反转，可以重新收回进出的质子并合成ATP，使能量得到提高^[7]。另外，进行有氧呼吸代谢的乳酸乳球菌的长期存活率也明显高于发酵培养物^[8]。

然而，研究发现大部分乳酸乳球菌在血红素和氧气都存在的情况下，并不能进行有氧呼吸^[9]。针对这一问题，本实验利用前期筛选出来的能进行有氧呼吸的 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.0325 和不能进行有氧呼吸的 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 作为对象进行研究，通过基因组提取、PCR扩增和DNA测序技术对 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 的呼吸链基因进行扩增及测序，随后从 GenBank 数据库下载 KLDS4.0325 的呼吸链相关编码基因序列并对这2株乳酸乳球菌呼吸链编码基因的同源性进行分析，同时测定这2株菌的细胞色素氧化酶活性，为进一步研究乳酸乳球菌有氧呼吸代谢的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌种编号分别为 KLDS4.1102（不能进行有氧呼吸代谢）、KLDS4.0325（能进行有氧呼吸代谢）的乳酸乳球菌乳酸亚种菌株，均来自乳品科学教育部重点实验室菌种库。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂

M17培养基，青岛海博生物技术有限公司；血红

素阿拉丁公司；葡萄糖天津天利化学试剂公司；琼脂粉，Solarbio公司；溶菌酶 Amersco 公司；无水乙醇，德州康泰消毒制品有限公司；细菌基因组DNA提取试剂盒，天根生物试剂有限公司；PCR Master Mix (2×)，天根生物试剂有限公司；D15000，天根生物试剂有限公司。

1.2.2 仪器

Delta 320 pH计，梅特勒-托利多仪器有限公司；HVE-50全自动高压灭菌锅，日本日立；DHP-9272型电热恒温培养箱，上海智诚分析仪器制造厂；Sectrumlab54紫外分光光度计，上海棱光技术有限公司；Veriti[®]PCR仪，美国 Applied Biosystems 公司；DYY-10C电泳仪，北京六一仪器厂；全系列 Eppendorf 移液器，德国 Eppendorf 有限公司；UVP凝胶成像系统，美国 Upland 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的活化

将甘油冷冻保藏的菌液1%接种到灭菌后的M17液体培养基中，30℃恒温培养24h，并连续活化至菌株具有较高的活力。

1.3.2 筛选菌株生长曲线的测定

将活化后的菌种，以1%的接种量分别接种于盛50mL的含有血红素或氢氧化钠的GM17（M17培养基添加1%的葡萄糖）液体培养基的三角瓶（500mL）中，在30℃条件下，分别进行振荡培养（Ox/H）和静置培养（No Ox/No H）24h，期间每隔2h取样测定菌液的pH和OD₆₀₀。以培养的时间为横坐标，相应的pH和吸光值为纵坐标，分别绘制2株菌的pH曲线和生长曲线。

1.3.3 基因组DNA的提取和电泳鉴定

取培养至18h的菌液1mL进行离心，离心后弃上清，加入20mg/mL的溶菌酶180μL，用200μL的移液枪混匀，放在37℃恒温水浴锅中处理30min。随后按照细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书对 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 的基因组DNA进行提取。提取后，取5μL DNA溶液进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测，用UVP凝胶成像系统记录电泳结果并观察基因组条带的纯度。

1.3.4 有氧呼吸链基因的同源性分析

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 已经完成全基因组测序，GenBank 登录号为 CP006766^[10]。其所有基因均可从 GenBank 数据库获得，可以直接下载其有氧呼吸链的所有相关编码基因；另外采用1.3.3提取的KLDS4.1102基因组DNA作为模板进行PCR扩增，扩增其有

氧呼吸链的所有相关编码基因, PCR 扩增的引物经 Primer 5.0 设计, 由上海生工合成, 具体见表 1。反应体系均为灭菌 ddH₂O, 9.5 μL; PCR Master Mix, 12.5 μL; 基因组 DNA, 1 μL; 上游引物, 1 μL; 下游引物,

1 μL。PCR 反应条件均如下: 94 °C 9 min; 94 °C 30 s, 退火温度见表 1, 退火时间均为 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保温。

表 1 有氧呼吸链相关基因的 PCR 引物

Table 1 Primers for aerobic respiratory chain genes

基因名称	核苷酸序列 (5'→3')	T _m 值/°C	产物大小/bp
<i>cydA</i>	ATGTTTACCATTGAACTCTCGC	58.00	1476
	TTATTTATCCACCCCTTTCTCA		
<i>cydB</i>	ATGACTGGATTACAACCTTTTTTGG	54.90	996
	TTATTTTTTAATTCCTTTTCTGAAAATGA		
<i>cydC</i>	ATGATTGATAAATCTCTTTTTGAACTG	55.10	1890
	TTACCGAACAAAATATTTTTAATTTC		
<i>cydD</i>	ATGAAATTAATAAATATTTGTTCCGGT	54.10	1722
	TTATTCATTTCCTAAATCAAGTTGATAA		
<i>menE</i>	ATGAAATGGTTAAAAAACAGGC	56.00	1356
	TCATCCTTTAAGCTCTTTCTCAA		
<i>menB</i>	ATGTCAAAATTTAACTGGGTTGC	56.10	843
	TTATGGGAATTTTGAAAATTGG		
<i>menX</i>	ATGAAAATTGATAAAAAATAATTACTATTGA	56.60	816
	CTAAGGTAATAATTCCTCTAGTATTTTTTGA		
<i>menD</i>	ATGACCAATGAATATTTAGCTCCCT	58.30	1683
	TCAATTTTCATAAGTTGTATATTTTTGATGT		
<i>menF</i>	ATGAAGATTTGTAATTTTAGGGCTC	56.40	1215
	TTACAAAGCTTCTAAAATGGTTTTTAA		
<i>menC</i>	ATGATAATTGAAAAAATFACAATGTTTCA	55.00	1104
	TCATTGGAAAAATCTCCTTATTTACA		
<i>menA</i>	ATGAATTTTAAAATATTTGCTGAACTAA	55.40	906
	TTAAAATTTAATTAACAAAGAATAGTAGGA		
<i>noxA</i>	ATGGCTAAGAAAAAATCGTTATTG	55.70	1260
	TTAAATTTGCCCTTTGTGGA		
<i>noxB</i>	ATGACTAAGAAACAAATCGTAGTCATC	58.40	2004
	CTATTGACGTCCTTTGTAAATTGAA		

取 5 μL 的 PCR 扩增产物, 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳并在 UV 下检测电泳结果, 随后交由北京华大基因公司测序, 并从 Genbank 数据库下载 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.0325 的有氧呼吸链相关基因序列, 用 DNAMAN 软件对 2 株乳酸乳球菌的有氧呼吸链基因同源性进行分析。

1.4 细胞色素氧化酶活力检测

将 KLDS4.0325 和 KLDS4.1102 以 1% 的接种量分别接种于装有 50 mL 的含血红素或氢氧化钠的 GM17 (M17 培养基添加 1% 的葡萄糖) 液体培养基的三角瓶 (500 mL) 中, 在 30 °C 条件下, 分别在 Ox/H 和 No

Ox/No H 条件下培养 24 h, 随后划线接种于 GM17 琼脂平板培养基上, 在 30 °C 下培养 24 h 后进行细胞色素氧化酶活性的检测。用 1% 盐酸对氨基二甲基苯胺溶液湿润滤纸, 再滴加约等量的 1% α-萘酚乙醇溶液, 用牙签取待鉴定菌菌苔涂抹在上述滤纸上, 进行观察。10 s 内涂抹的菌苔呈现蓝色者为阳性; 10~60 s 呈现蓝色者延迟反应, 也为阳性; 60 s 以上呈现蓝色者计为阴性, 按阴性处理^[1]。细胞色素氧化酶在分子氧和细胞色素 c 存在时, 可氧化氨基二甲基苯胺, 使之呈现玫瑰红到暗红色, 反应生成的产物能够进一步和 α-萘酚结合生成吲哚酚蓝, 而呈现蓝色。

1.5 统计分析

采用SPSS 18.5软件对实验数据进行误差分析,其中每组试验均做3个技术重复。

2 结果与讨论

2.1 菌株 KLDS4.0325 和 KLDS4.1102 生长曲线的测定结果

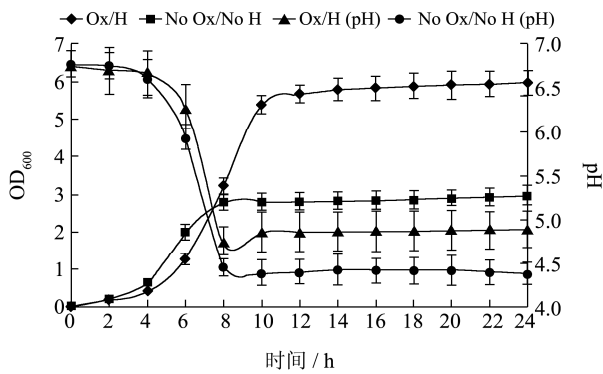


图1 菌株 KLDS4.0325 的生长曲线和 pH 曲线

Fig.1 Growth curve and pH curve of the strain KLDS4.0325

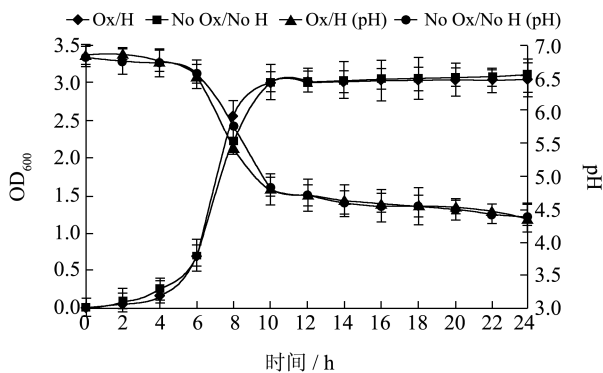


图2 菌株 KLDS4.1102 的生长曲线和 pH 曲线

Fig.2 Growth curve and pH curve of the strain KLDS4.1102

从图1可以看出, KLDS4.0325 在 No Ox/No H 和 Ox/H 培养条件下, 0~3 h 期间的生长趋势毫无差异, 此阶段主要是菌株对环境的适应阶段; 3~8 h 期间 KLDS4.0325 在 Ox/H 培养条件下的生物量略低于在 No Ox/No H 培养条件下的生物量, 这种现象可能是由于血红素的提前摄入产生的毒性并激起氧分压而引起的, 有研究表明当有氧气和血红素存在时, 乳酸乳球菌的最初生长是通过发酵代谢方式实现的, 当进入到对数期中期时, 它才将代谢方式转换成有氧呼吸代谢, 生物量继续增加^[12], 在某种程度上讲, 发酵代谢是进行有氧呼吸的前提, 这一点与大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有很大的不同^[9]; 8 h 时, KLDS4.0325 开始进行有氧呼吸代谢, 生物量迅速持续增加, 最终的生

物量比正常的发酵的生物量有明显的增加, 说明 Ox/H 培养条件对 KLDS4.0325 的生长非但没有迫害作用, 反而有促进作用。从 pH 的变化来看, 0~4 h 期间两种培养条件下, pH 的趋势基本上一致; 8 h 时, KLDS4.0325 在 Ox/H 培养条件下的 pH 降至最低, 而后出现上升趋势, 说明 KLDS4.0325 进入有氧呼吸代谢后, 酸代谢途径发生了变化, 开始消耗乳酸, 最终的 pH 明显高于 No Ox/No H 条件下的 pH。从图2可以看出 KLDS4.1102 在 No Ox/No H 和 Ox/H 培养条件下的生长趋势和 pH 变化趋势较为一致, 说明 KLDS4.1102 不能利用血红素消耗氧气进行有氧呼吸代谢。

2.2 菌株 KLDS4.1102 基因组的提取

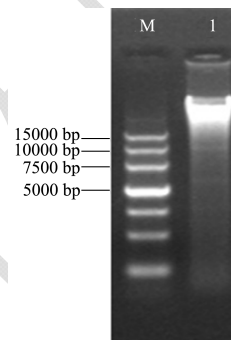


图3 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 基因组 DNA 电泳图
Fig.3 Electrophoresis pattern of genomic DNA of *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102

注: Lane M, Maker D15000, Lane 1 为 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 基因组。

按照试剂盒说明书提取 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 的基因组 DNA, 由 1% 琼脂糖凝胶电泳图 (见图3) 可知, 泳道条带清晰, 说明本实验所提取的 *L. lactis* subsp. *lactis* KLDS4.1102 的基因组 DNA 纯度很高, 没有蛋白质、糖类物质和 RNA 等污染, 且与乳酸乳球菌模式菌株 *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 的基因组大小相符^[13], 可以用于 PCR 扩增有氧呼吸链的相关编码基因。

2.3 有氧呼吸链基因的 PCR 扩增结果

由图4、图5和图6可知, KLDS4.1102 具备乳酸乳球菌进行有氧呼吸的所有必需基因即 *noxA*、*noxB*、*menA*、*menB*、*menC*、*mendD*、*menE*、*menF*、*menX*、*cydA*、*cydB*、*cydC* 和 *cydD*, 而且片段的大小与目的片段均相符 (见表1), 经过 PAGE 纯化后进行测序, 测序的起始部分由于电压、信号等原因, 起始的 20 bp~30 bp 不太准确, 通过设置碱基可信度, 利用自动拼接软件进行拼接, 对于两端不可信区域去除, 最终

碱基质量符合 Q20 标准。

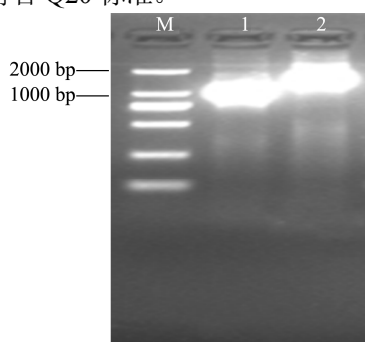


图4 菌株 KLDS4. 1102 NADH 脱氢酶的编码基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis pattern of PCR products of KLDS4.1102 NADH dehydrogenase genes

注: Lane M, Maker DL2000; Lane 1-2 分别为 KLDS4.1102 的 *noxA* 和 *noxB* 基因。

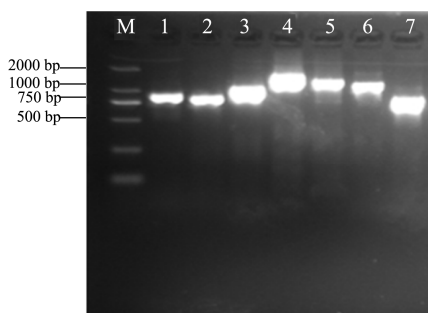


图5 菌株 KLDS4. 1102 甲基萘醌的编码基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig.5 Electrophoresis pattern of PCR products of KLDS4.1102 menaquinone genes

注: Lane M, Maker DL2000; Lane 1- 7 分别为 KLDS4.1102 的 *menA*、*menB*、*menC*、*mendD*、*menE*、*menF* 和 *menX* 基因。

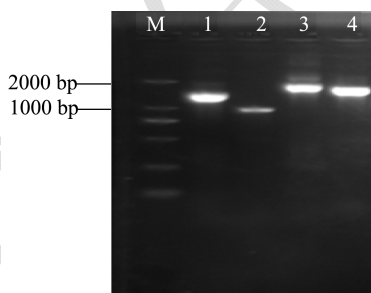


图6 菌株 KLDS4. 1102 细胞色素氧化酶的编码基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig.6 Electrophoresis pattern of PCR products of KLDS4.1102 cytochrome oxidase genes

注: Lane M, Maker DL2000; Lane 1~4 分别为 KLDS4.1102 的 *cydA*、*cydB*、*cydC* 和 *cydD* 基因。

2.4 有氧呼吸链编码基因的同源性分析

目前, KLDS4.0325 全基因组数据已经上传到

GenBank 数据库, 其 *noxA*、*noxB*、*menA*、*menB*、*menC*、*mendD*、*menE*、*menF*、*menX*、*cydA*、*cydB*、*cydC* 和 *cydD* 基因的序列号分别为 P6P620_0449020_04485、P620_04030、P620_04015、P620_04005、P620_04025、P620_04010、P620_04030、P620_04020、P620_03855、P620_03860、P620_03865 和 P620_03870, 通过 DNAMAN 软件对 KLDS4.1102 和 KLDS4.0325 的有氧呼吸链基因进行同源性分析, 结果显示编码 KLDS4.1102 的脱氢酶的编码基因与 KLDS4.0325 的相应基因的同源性分别为 99.49%和 99.66%; 编码 KLDS4.1102 和 KLDS4.0325 的参与甲基萘醌合成的酶的编码基因同源性分别为 98.34%、98.67%、97.91%、98.76%、98.92%、98.23%和 98.62%; 关于编码细胞色素氧化酶的基因, KLDS4.1102 和 KLDS4.0325 的相应基因的同源性分别为 97.93%、99.16%、97.61%和 98.04%; 13 个有氧呼吸链基因的同源性均到达 95% 以上, 足以判断 KLDS4.1102 具备完整的有氧呼吸链, 这说明 KLDS4.1102 不能进行有氧呼吸代谢并不是由于有氧呼吸链编码基因的缺陷造成的。

2.5 细胞色素氧化酶活力测定

细胞色素氧化酶也称为细胞色素 c 氧化酶, 是含血红素/铜末端氧化酶大家族的成员之一。它是一个复合的膜蛋白, 由多个亚基组成, 原核生物含有的亚基数量相对较少, 一般含有四个亚基, 在乳酸乳球菌中分别由 *cydA*、*cydB*、*cydC* 和 *cydD* 基因编码^[4]。细胞色素 c 氧化酶的电子传递途径如下: 细胞色素 c→血红素 a→CuA 中心→血红素 a₃-CuB 中心→O₂。它在电子传递的同时耦合质子的传递, 并且产生维持正常生命活动所需的 ATP^[14]。

表 2 No O₂/No H 和 O₂/H 培养条件下细胞色素氧化酶活性检测结果

Table 2 Cytochrome oxidase activity under No O₂/No H and O₂/H culture conditions

实验菌株	O ₂ /H culture conditions	
	No O ₂ /No H 条件下 检测结果	O ₂ /H 条件下 检测结果
KLDS4.0325	-	+
KLDS4.1102	-	-

注: “-”表示不具有细胞色素氧化酶活性; “+”表示具有细胞色素氧化酶活性。

由表 2 可知, 在 No O₂/No H 培养条件下, KLDS4.0325 和 KLDS4.1102 的细胞色素氧化酶活力均是阴性, 而在 O₂/H 培养条件下, KLDS4.0325 的细胞色素氧化酶活力为阳性, 而 KLDS4.1102 则为阴性, 这说明 KLDS4.0325 在 O₂/H 培养条件下, 能够形成

具有活力的细胞色素氧化酶,而 KLDS4.1102 则不具备能够发挥作用的细胞色素氧化酶。细胞色素氧化酶是乳酸乳球菌进行有氧呼吸代谢时呼吸链的重要组成部分,是乳酸乳球菌进行呼吸代谢的必要条件^[5], KLDS4.0325 和 KLDS4.1102 的生长曲线分析结果也表明 KLDS4.0325 能够进行有氧呼吸代谢而 KLDS4.1102 则不能够进行有氧呼吸代谢,而且,只有在溶氧且添加血红素条件下培养时,乳酸乳球菌的细胞色素氧化酶才能检测到,这表明血红素和氧气的存在是细胞色素氧化酶发挥酶活性的必要条件。然而,呼吸链相关编码基因的同源性分析却表明, KLDS4.1102 和 KLDS 4.0325 的编码细胞色素氧化酶的相应基因 *cydA*、*cydB*、*cydC* 和 *cydD* 的同源性分别为 97.93%、99.16%、97.61% 和 98.04%,这说明 KLDS4.1102 也具有完整的细胞色素氧化酶编码基因。它不具有细胞色素氧化酶活性不是由于编码基因缺陷导致的,可能是某些基因的不正常表达,导致其细胞色素氧化酶不能正常发挥作用。因此,后续实验将针对 KLDS4.0325 和 KLDS4.1102 进行转录组测序分析,找到差异表达基因,探寻乳酸乳球菌能够进行有氧呼吸代谢的机制,进而实现对乳酸乳球菌有氧呼吸代谢的调控,消除氧气带来的不良影响,提高乳酸乳球菌的发酵速率和发酵剂的活力,为乳酸乳球菌有氧呼吸代谢的工业化应用提供理论依据。

3 结论

KLDS4.0325和KLDS4.1102在发酵和有氧呼吸两种培养条件下的生长曲线测定结果表明,KLDS4.0325在有氧呼吸条件下在迟滞期仍然以发酵生长为主,在进入对数期后才会进行有氧呼吸代谢,最终生物量显著提高,pH也明显增大,而KLDS4.1102在两种培养条件下呈现出一致的生长趋势,说明了KLDS4.1102不能利用血红素在通氧的情况下进行有氧呼吸代谢。呼吸链相关编码基因的同源性分析显示KLDS4.1102具备完整的呼吸链,而酶活的测定结果显示KLDS4.0325具有细胞色素氧化酶活性而KLDS4.1102则没有。这表明KLDS4.1102不能进行有氧呼吸代谢的原因不是由于呼吸链相关编码基因缺陷造成的,可能是某些编码基因不能正常表达引起的,导致其细胞色素氧化酶不能够正常发挥作用,后续将利用转录组测序分析来进一步的研究乳酸乳球菌的有氧呼吸代谢机制。

参考文献

[1] Watanabe M, Van der Veen S, Nakajima H, et al. Effect of

- respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 293-300
- [2] Smit G, Smit B A, Engels W J. Flavour formation by *Lactic acid bacteria* and biochemical flavour profiling of cheese products [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 591-610
- [3] Sijpesteijn A K. Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by heme in *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1970, 36(3): 335-348
- [4] Gaudu P, Vido K, Cesselin B, et al. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis* [M]. Netherlands: Springer, 2002
- [5] Brooijmans R, Smit B, Santos F, et al. Heme and menaquinone induced electron transport in *Lactic acid bacteria* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8: 28
- [6] Bron P A, Kleerebezem M. Engineering *Lactic acid bacteria* for increased industrial functionality [J]. *Bioengineered bugs*, 2011, 2(2): 80-87
- [7] Lechardeur D, Cesselin B, Fernandez A, et al. Using heme as an energy boost for *Lactic acid bacteria* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 143-149
- [8] Zhao R, Zheng S, Duan C, et al. NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by *Lactococcus lactis* [J]. *FEBS Open Bio.*, 2013, 3: 379-386
- [9] Pedersen M B, Gaudu P, Lechardeur D, et al. Aerobic respiration metabolism in *Lactic acid bacteria* and uses in biotechnology [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2012, 3(1): 37-58
- [10] Yang X, Wang Y, Huo G. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KLDS4.0325 [J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(6): e913-e962
- [11] 付良. 乳酸乳球菌的有氧呼吸研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008
- FU Liang. Study on the respiration of *Lactococcus lactis* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008
- [12] Arioli S, Zambelli D, Guglielmetti S, et al. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 79(1): 376-380
- [13] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the *Lactic acid bacterium Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 [J]. *Genome Research*, 2000, 11(5): 731-753

[14] 覃芳.细胞色素c氧化酶的表达、纯化及其活性测定[D].长沙:湖南大学,2011
TAN Fang. Expression, purification and measuring the

activity of cytochrome oxidase C from *A.ferrooxidans* [D].
Changsha: Hunan University, 2011

