

## 在乳酸乳球菌中表达外源谷氨酰胺转胺酶 显著改善宿主菌好氧生长性能

傅瑞燕 陈 坚 李 寅\*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

**摘 要:**为改善乳酸乳球菌的生长性能,以轮枝链霉菌染色体 DNA 为模板,扩增得到编码谷氨酰胺转胺酶成熟酶的基因 *mtg*,将其克隆到质粒 pNZ8148 中,电转化乳酸乳球菌 NZ9000,获得乳酸乳球菌 NZ9000 (pFL001) (重组菌)。在不控制 pH 条件下,重组菌的胞外 pH 显著高于对照菌 NZ9000 (pNZ8148),前者的最高生物量可达 4.13g/L,而后者只有 0.34g/L。在控制 pH 为  $6.5 \pm 0.1$  的条件下,重组菌最高生物量为 4.73g/L,对葡萄糖的菌体最高平均得率为 71.1g/mol,而相同条件下对照菌最高生物量为 2.6g/L,对葡萄糖的菌体最高平均得率为 27.3g/mol。由此表明,重组菌与对照菌相比,好氧生长性能得到显著改善。可能的原因是 *mtg* 的活性表达升高了重组菌的胞内 pH,原先用于泵出胞内  $H^+$  所需的部分能量可能因此得到节省,这样相应增加了用于细胞生长的能量。

**关键词:**乳酸乳球菌,谷氨酰胺转胺酶,生长性能

中图分类号:Q756 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0510-06

乳酸菌是一类重要的工业微生物,被美国食品与药品监督管理局(FDA)认定为 GRASM (Generally-Regarded As Safe Microorganisms),是目前生产食品级代谢物最理想的细胞工厂,其模式种乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 已被广泛用于代谢工程的研究<sup>[1]</sup>。乳酸乳球菌生长时伴随着乳酸的产生。由产生乳酸而导致的低 pH 虽然是保存乳制品的一种重要机制,但同时也形成了酸胁迫 (Acid stress),从而对细胞生理产生多种影响,包括破坏细胞膜、抑制多种酶和转运系统的活性等<sup>[2]</sup>。降低胞质酸化程度可以减少酸胁迫<sup>[3]</sup>。

通过质子泵 ( $H^+$ -ATPase) 向胞外运输  $H^+$  是乳酸乳球菌最重要的胞内 pH (pHi) 调控机制。这是逆浓度梯度的运输,需要消耗由 ATP 水解提供的能量<sup>[4,5]</sup>。但是乳酸乳球菌不具备完整的 TCA 循环,其能量的产生主要来源于糖酵解途径,即 1 摩尔葡萄糖净生成 2 摩尔 ATP。能量的低产生和高消耗,使得乳酸乳球菌的生长性能不好。即使在培养基中添加缓冲剂 (如 M17 培养基中使用的  $\beta$ -甘油磷酸二钠),其生物量也只能达到 1g/L 左右 ( $OD_{600}$  在 2.0 ~ 3.0 之间),从而制约了其作为极好的原核细胞宿主在代谢工程和工业生产中的应用。

乳酸乳球菌中还存在另外一种抵抗酸胁迫的机

制,即通过合成碱性物质增加胞质的缓冲能力。已经发现,当乳酸乳球菌的胞外 pH (pHo) 从 5.2 降到 4.7 时,葡萄糖的消耗速率不再增加,但氨基酸代谢作用得到增强。通过脱氨基作用,消耗胞内的  $H^+$ ,从而升高 pH<sup>[6~8]</sup>。然而,这种抵抗酸胁迫的机制只有在质子泵运输  $H^+$  的速度低于胞内  $H^+$  的生成速度,使得 pHi 低于临界值的情况下才会启动。而此时,已经有大量的 ATP 消耗于质子泵的运转上。作者设想,是否有可能在胞内表达能够产生碱性物质的酶,将 pHi 保持在较高水平上,节约质子泵向胞外运输  $H^+$  所消耗的 ATP,使更多的 ATP 用于合成细胞物质,从而相应提高细胞量?

来源于轮枝链霉菌的谷氨酰胺转胺酶 (Microbial transglutaminase, 简称 MTG) 是一种重要的食品工业用酶。该酶能催化肽链中谷氨酰胺残基的  $\gamma$ -羧酰胺基酰基转移反应,同时伴随着氨气的生成。本文报道在乳酸乳球菌中表达来源于轮枝链霉菌的编码 MTG 成熟酶的基因 *mtg*,提高 pHi,以改善乳酸乳球菌生长性能的研究结果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株和质粒:轮枝链霉菌 (*Streptovercillum*)

基金项目:国家自然科学基金项目(30300009)

\* 通讯作者。Tel: 86-510-5885727; Fax: 86-510-5888301; E-mail: yinli@sytu.edu.cn

作者简介:傅瑞燕(1976-),女,安徽合肥人,博士研究生,从事微生物生理学研究。E-mail: furuiyan@126.com

收稿日期:2004-12-27,修回日期:2005-04-14

*mobaraense*) WSH-Z2 本实验室研究用菌株<sup>[9]</sup>; 乳酸乳球菌(*L. lactis* ssp. *cremoris*) NZ9000 和乳酸链球菌素(Nisin)诱导表达质粒 pNZ8148, 荷兰国家乳品研究所(NIZO Food Research) Jeroen Hugenholtz 博士惠赠。质粒 pNZ8148 上带有 Nisin(乳酸链球菌素)诱导的启动子 *nisA*。

**1.1.2 试剂和仪器:** 限制酶 *Nco* I、*Xba* I、T4 DNA 连接酶和 *Pyr*obest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 蛋白酶 K、溶菌酶、CTAB、饱和酚购自华美生物工程公司; M17 培养基购自 Fluka 公司; CBZ-Gln-Gly 和 L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟胺酸购自 Sigma 公司。KFT-5L 型自控发酵罐(KoBio Techco, Korea)。

**1.1.3 培养基和培养条件** 轮枝链霉菌培养基组成(g/L): 葡萄糖 10, 工业淀粉 15, 蛋白胨 20, 酵母膏 5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2, pH 6.8。乳酸乳球菌培养基(g/L): 酵母粉 5、大豆蛋白胨 15、葡萄糖 15、 $\text{Vc}$  0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5。培养条件: 轮枝链霉菌在 30℃ 下振荡培养 24h。乳酸乳球菌: -70℃ 甘油贮存液在 M17 培养基中 30℃ 振荡(200r/min) 12h 后, 作为活化种子, 以 1% 接种量转接乳酸乳球菌培养基, 30℃ 振荡(200r/min) 培养。在培养基中加入氯霉素(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作为选择标记。

## 1.2 DNA 操作

轮枝链霉菌染色体 DNA 提取和常规的重组 DNA 技术参照文献[10]进行。乳酸乳球菌的转化参照文献[11]进行。

## 1.3 菌株和质粒的构建

以轮枝链霉菌 WSH-Z2 染色体 DNA 为模板, 用 *Pyr*obest 聚合酶扩增 *mtg* 基因, 5' 端引物: 5'-CGGGCCATGGACTCCGACGACAGGGTCACCCCTC-3'; 3' 端引物 5'-CGCGTCTAGATCACGGCCAGCCCTGCTTTACCTTG-3'。引物由上海 Sangon 公司合成, 在 50 $\mu\text{L}$  反应体系中, 引物浓度皆为 2pmol/ $\mu\text{L}$ ; dNTP 各 100pmol/ $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 2min, 退火温度从 55℃ 开始, 每进行一个循环下降一度直至 51℃ 95℃ 30s, 55 ~ 51℃ 30s, 72℃ 2min; 随后进行 25 个循环: 95℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 2min; 72℃ 10min。将引入 *Nco* I 和 *Xba* I 位点识别序列(下划线)的长度为 993bp 的 PCR 产物, 克隆入 pNZ8148 相对应的多克隆位点, 得到 *mtg* 表达质粒 pFL001。用电转化法将质粒 pNZ8148 和 pFL001 分别导入乳酸乳球菌 NZ9000, 得到乳酸乳球菌 NZ9000(pNZ8148) (以下简称对照菌) 和 NZ9000(pFL001) (以下简称重组菌)。

## 1.4 无细胞抽提液的制备和蛋白质分析

分别离心收集 1L 控制 pH 的好氧条件下培养 10h 的重组菌和对照菌(10000g, 10min, 4℃), 收集的细胞用冰冷的生理盐水(0.85% NaCl, W/V) 洗涤两次, 重悬于 25mL 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 中。冰浴超声破壁后, 随即离心去除细胞碎片(10000g, 10min, 4℃), 得到无细胞抽提液(CFE)。蛋白质浓度用 Bradford 法测定, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

## 1.5 培养基中巯基乙醇的添加

以 1% 接种量将振荡培养的重组菌和对照菌的活化种子接入装有 15mL 乳酸乳球菌培养基的 250mL 三角瓶中(培养基中巯基乙醇的添加浓度分别为 0、30 和 60mmol/L), 30℃、200r/min 条件下培养 12h, 测定生物量(采用干重法)。

## 1.6 不控制 pH 及恒定 pH 的好氧培养

**1.6.1 不控制 pH 的好氧培养:** 以 1% 接种量将振荡培养的重组菌和对照菌的活化种子接入装有 15mL 乳酸乳球菌培养基的 250mL 三角瓶中, 30℃、200r/min 条件下培养 10h, 每隔 1h 取样, 测定生物量、pH、发酵液中残糖曲线。

**1.6.2 恒定 pH 的好氧培养:** 在 KFT-5L 型自控发酵罐中, 接种 200mL 活化种子(起始工作体积为 2L), 在 30℃、600r/min、通气量 2L/min 条件下培养。用 10mol/L NaOH 或 20%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  将 pH 控制在  $6.5 \pm 0.1$ 。共培养 10h, 每隔 1h 取样, 测定生物量、发酵液中残糖曲线和发酵 10h 时的乳酸和乙酸含量。

## 1.7 有机酸的测定

用 HPLC 法测定发酵液中乳酸和乙酸的含量。色谱分离柱:  $\text{C}_{18}$ ; 流动相: 0.1mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 用 1:1 磷酸调节 pH 至 2.5, 紫外检测波长 215nm, 进样量: 5 $\mu\text{L}$ , 流动相流速 0.5mL/min, 柱温 25℃。

## 1.8 酶活性测定

**1.8.1 谷氨酰胺转氨酶活性的测定:** 酶活测定按 Folk 等<sup>[12]</sup>所报道的方法进行, 以 CBZ-Gln-Gly 和羟胺为底物, 37℃ 每分钟形成 1 $\mu\text{mol}$  氧肟酸所需酶量定义为一个酶活单位。将 0.4mL CFE 和 1mL 含有底物的试剂混匀后, 在 37℃ 反应 10min 后, 加入显色剂, 即可进行酶活测定。

**1.8.2 乳酸脱氢酶活性的测定:** 反应液包括 100 $\mu\text{L}$  35mmol/L 丙酮酸钠溶液, 100 $\mu\text{L}$  6mmol/L NADH, 2.8mL 100mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 5.3、pH 5.8、pH 6.3、pH 6.8、pH 7.3)。加入 100 $\mu\text{L}$  重组菌的 CFE 启动反应, 于 25℃ 监测反应体系在 340nm 的吸光度变

化,计算每分钟吸光度的降低值 $\Delta A$ 。酶活单位定义为:25℃时每分钟氧化 $1\mu\text{mol}$  NADH所需的酶量。

**1.8.3 NADH 氧化酶活性的测定**:反应液总体积为 $1\text{mL}$ ,其中包括 $50\text{mmol/L}$ 磷酸钾缓冲液( $\text{pH } 5.3$ 、 $\text{pH } 5.8$ 、 $\text{pH } 6.3$ 、 $\text{pH } 6.8$ 、 $\text{pH } 7.3$ )、 $0.29\text{mmol/L}$  NADH 和  $0.3\text{mmol/L}$  EDTA。加入一定体积重组菌的 CFE( $0.5 \sim 5\mu\text{L}$ )启动反应,于 $25^\circ\text{C}$ 监测反应体系在 $340\text{nm}$ 的吸光度变化,计算出每分钟吸光度的降低值 $\Delta A$ 。酶活单位定义为:25℃时每分钟氧化 $1\mu\text{mol}$  NADH 所需的酶量。

## 2 结果

### 2.1 MTG 在乳酸乳球菌中的活性表达

在没有添加 Nisin 的条件下,用常规的 MTG 酶活测定方法在重组菌和对照菌 CFE 中没有测出 MTG 酶活。然而当延长催化反应的时间(由 $10\text{min}$ 延长至 $12\text{h}$ )和增加制备 CFE 的细胞量(增加 $12.5$ 倍)时,在重组菌 CFE 中测定出酶活为 $0.7\text{mU/mg}$ 蛋白,对照菌仍没有测出酶活,表明 MTG 在重组菌中有微弱的本底表达。由于 MTG 的本底表达很弱,不能在蛋白电泳图谱上显示出来(数据未给出)。

### 2.2 高浓度 Nisin 对重组菌生长的影响

近来发现,Nisin 诱导型表达质粒<sup>[13]</sup>在没有 Nisin 诱导时会有本底表达,但是这种表达很微弱,只有当表达的产物对细胞产生影响时,这种本底表达才会突显出来(Dr. Igor Mireau, NIZO food research 私人通信)。实验中发现增加培养基中 Nisin 的浓度(从 $2\text{ng/mL}$ 增加至 $100\text{ng/mL}$ )对重组菌表达 MTG 并无诱导作用。为解释这一现象,在重组菌和对照菌的培养基中添加高浓度 Nisin( $500\mu\text{g/mL}$ ),以不添加 Nisin 的培养基为各自的对照,好氧培养 $12\text{h}$ 。结果发现,在培养基中存在高浓度 Nisin 时,对照菌基本不生长,而重组菌生物量没有显著减少,表明高浓度 Nisin 对其生长基本没有影响。

### 2.3 巯基乙醇对重组菌和对照菌生长的影响

如果 MTG 在重组菌胞内实现活性表达,那么在培养基中添加二硫键还原剂 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -mercaptoethanol,  $\beta$ -ME)后,胞内酶蛋白中维持空间结构的二硫键会被还原,由此增加 MTG 对酶蛋白的催化活性,从而显著增加对细胞生长的抑制作用<sup>[14]</sup>。由图 1 可以看出,添加 $30\text{mmol/L}$   $\beta$ -ME 时,重组菌生物量下降 $42.9\%$ ,而对照菌则为 $13.8\%$ ;当添加 $60\text{mmol/L}$   $\beta$ -ME 时,重组菌基本不生长,而对照菌生物量仅下降 $24.6\%$ 。 $\beta$ -ME 显著抑制重组菌生长的

现象间接表明,重组菌中表达的外源 MTG 具有催化活性。

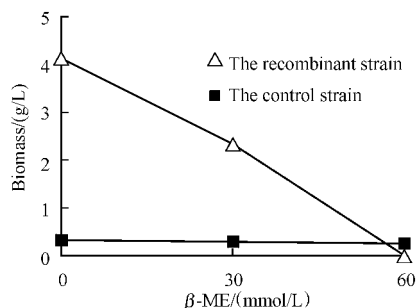


图 1  $\beta$ -ME 的添加对重组菌和对照菌生长的影响

Fig.1 Effect of the addition of  $\beta$ -ME on the growth of the recombinant strain and the control strain

### 2.4 MTG 在乳酸乳球菌胞内活性表达促进了细胞好氧生长

**2.4.1 控制 pH 为 6.5 时重组菌和对照菌的好氧生长比较**:从生长曲线(图 2-A)可以看出,与对照菌相比,重组菌不仅延滞期较短,而且生长速率明显提高,最高生物量为 $4.73\text{g/L}$ ,是对照菌的 $1.8$ 倍。而从葡萄糖消耗曲线来看,两者的葡萄糖消耗速率并无显著差别。分别计算重组菌与对照菌对葡萄糖的平均菌体得率( $Y_{X/S}$ )发现,重组菌的 $Y_{X/S}$ 明显高于对照菌:前者的最高 $Y_{X/S}$ 为 $71.1\text{g/mol}$ ,而后者仅为 $27.3\text{g/mol}$ ,表明对照菌将更多的碳源消耗于维持生存上。

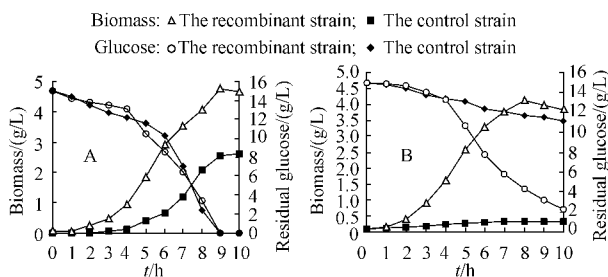


图 2 控制 pH (A) 和不控制 pH (B) 时的重组菌和对照菌生长曲线

Fig.2 The growth pattern of the recombinant strain and the control strain when the pH of the culture was controlled at 6.5 (A) and in the culture without pH control (B)

检测发酵 $10\text{h}$ 时对照菌和重组菌发酵液中乳酸和乙酸的浓度,结果表明对照菌发酵液中乳酸和乙酸浓度分别为 $2.02\text{mmol/L}$ 和 $0.92\text{mmol/L}$ ;而重组菌发酵液中乳酸浓度低于 HPLC 检测限,乙酸浓度为 $0.65\text{mmol/L}$ 。表明与对照菌相比,重组菌的丙酮酸的代谢流向发生了改变。

**2.4.2 不控制 pH 时重组菌和对照菌的好氧生长比较**:在不控制 pH 的条件下(图 2-B),对照菌生

长微弱,最高生物量只有 0.34g/L,而重组菌的最高生物量达到 4.13g/L,虽然略低于控制 pH 条件下的最高生物量(图 2-A),但比对照菌的最高生物量提高了近 10 倍。重组菌和对照菌的葡萄糖消耗情况也出现了显著差异。发酵结束时,前者消耗的葡萄糖是总量的 85%,而后者消耗的葡萄糖仅为总量的 25%。结合分析重组菌和对照菌培养过程中 pH<sub>o</sub> 的变化曲线可以发现,对照菌培养 4h 后,pH<sub>o</sub> 降至 5.47,葡萄糖消耗速率开始下降,表明开始面临酸胁迫;培养 7h 后,pH<sub>o</sub> 降至 4.8,生物量不再增加,表明已面临严重的酸胁迫。而重组菌培养 9h 时,pH<sub>o</sub> 仍高于 5.5。尽管重组菌消耗的葡萄糖是对照菌的 3.4 倍,但发酵终了时的 pH<sub>o</sub> 仍比对照菌高出 0.9 个 pH 单位(图 3),表明与对照菌相比,重组菌泵出胞外的 H<sup>+</sup> 显著减少。

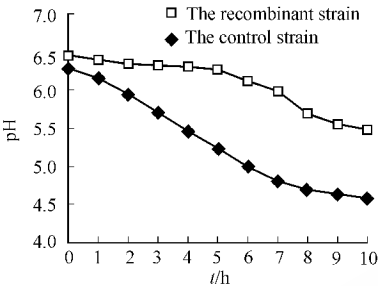


图 3 重组菌和对照菌发酵液 pH<sub>o</sub> 胞外 pH<sub>o</sub> 曲线  
Fig.3 Time course of extracellular pH (pH<sub>o</sub>) of the recombinant strain and the control strain

2.4.3 pH 对乳酸脱氢酶途径和 NADH 氧化酶活性的影响

在有氧情况下,乳酸乳球菌酵解产生的 NADH 可以通过乳酸脱氢酶( Lactate dehydrogenase ,LDH)途径和 NADH 氧化酶( NADH oxidase ,NOX)途径得到再生。这两条途径存在着对 NADH 的竞争,前者对 NADH 的  $K_m$  值为 100 $\mu$ mol/L,后者为 25 $\mu$ mol/L。近来的研究表明,生成 H<sub>2</sub>O 的 NOX 在乳酸乳球菌好氧代谢的 NAD<sup>+</sup> 再生过程中扮演重要的角色<sup>[15]</sup>。在控制 pH 的好氧生长条件下,与对照菌相比,重组菌的丙酮酸代谢流向发生了改变。这一变化是否会与 pH<sub>i</sub> 有关?为了验证我们的猜测,研究了 pH 对重组菌 LDH 途径和 NOX 活性的影响。由表 1 可以看出,LDH 酶活随着 pH 的升高而减小,而 NOX 的酶活则随着 pH 的升高而增加。因此,重组菌发酵液中乳酸含量低于检测限的原因可能与重组菌 pH<sub>i</sub> 的升高有关,因为与对照菌相比,重组菌 LDH 活性降低,而 NOX 活性升高,这样,在好氧条件下,完全有可能造

成胞内虽然存在 LDH 活性,但由于 NADH 的高效氧化而致使 LDH 途径丧失的结果。de Felipe 等<sup>[16]</sup>在乳酸乳球菌中过量表达生成 H<sub>2</sub>O 的 NOX 后,发现所构建的重组乳酸乳球菌虽然仍保留了 LDH 活性,但几乎不产乳酸,这与本研究的结果是一致的。

另一方面,重组菌发酵液中乳酸和乙酸总产量( 0.65mmol/L )明显低于对照菌( 2.94mmol/L ),对细胞生长的抑制作用也会减少<sup>[17]</sup>。

表 1 pH 对重组菌中 LDH 和 NOX 活性的影响

Table 1 Effect of pH on the activities of LDH and NOX of the recombinant strain		
PH	LDH activity( U/mg protein )	NOX activity( U/mg protein )
7.3	2.385	0.765
6.8	3.623	0.608
6.3	4.618	0.450
5.8	4.658	0.315
5.3	4.838	0.293

3 讨论

3.1 高浓度 Nisin 对重组菌生长无显著的抑制作用

Nisin 的杀菌机制表明<sup>[18]</sup>,Nisin 对细胞作用的初级靶是细胞质膜,因为加入 Nisin 增加了整个细胞中膜对离子和小分子化合物的通透性,使得质子动力( PMF )和跨膜电位(  $\Delta\psi$  )等主要组分下降,结果导致了细胞的失活和死亡,因此作者推测,Nisin 可能因为无法到达重组菌的细胞质膜,因而不能发挥其杀菌或诱导表达的作用,具体原因还有待于继续深入研究。

3.2 MTG 在重组菌胞内活性表达对宿主菌生理产生的影响

3.2.1 培养基中添加  $\beta$ -ME 对重组菌生长产生显著的抑制作用  $\beta$ -ME 是硫醇还原剂,可以还原二硫键,较高浓度的  $\beta$ -ME 对对照菌的生长存在一定的抑制作用,但并没有致死作用(图 1)。已经有研究者尝试在大肠杆菌中表达具有活性的 MTG<sup>[19]</sup>,结果发现,将编码 MTG 成熟肽的基因导入大肠杆菌会影响宿主菌的生长,甚至死亡<sup>[19]</sup>,推测原因可能与大肠杆菌胞内存在高水平的还原剂谷胱甘肽(简称 GSH,胞内浓度约为 5mmol/L),硫氧还蛋白系统和依赖于 GSH 的谷氧还蛋白系统<sup>[20]</sup>有关。在大肠杆菌中,由于胞内保持着高度还原环境,许多蛋白的二硫键难以形成<sup>[20]</sup>,这样,酶蛋白只能以疏水键为主要形式维持空间结构,使得一些亲水基团(如 Gln 和 Lys 残基)暴露于水相。这相对地降低了它们的表面疏水

性质,从而也就相对地提高了 MTG 对它们的催化活性<sup>[19]</sup>。如果 MTG 在大肠杆菌胞内表达,会使酶蛋白发生交联,从而丧失催化活性,导致细胞死亡。而乳酸乳球菌胞内不存在 GSH 和依赖于 GSH 的谷氧还蛋白系统<sup>[21]</sup>,可能胞内酶蛋白主要以二硫键为主要形式维持空间结构,MTG 对其催化活性很低,不会对细胞生长造成损害。但是,培养基中添加  $\beta$ -ME 后,改变了氧化还原电位,提高了 MTG 对它们的催化活性,从而对细胞生长产生显著的抑制或致死作用(图 1)。

**3.2.2 在不控制 pH 的好氧生长条件下,重组菌 pH<sub>0</sub> 显著高于对照菌** :MTG 是一种催化酰基转移反应的转移酶,催化反应伴随着氨气的生成,这样会部分中和重组菌酵解产生的有机酸解离出的  $H^+$ ,pHi 可能因此而升高,这样就会显著减少向胞外泵出的  $H^+$ ,使得在不控制 pH 的条件下,重组菌 pH<sub>0</sub> 下降速率远低于对照菌,且 pH<sub>0</sub> 最低点能保持在 5.5 以上,而对照菌在发酵 6 h 时 pH<sub>0</sub> 就低于 5.0(图 3)。

### 3.3 pH<sub>i</sub> 升高改善了乳酸乳球菌的好氧生长性能

乳酸乳球菌和大肠杆菌同属于嗜中性细菌,但两者的 pH<sub>i</sub> 调控机制却完全不同。大肠杆菌在 pH<sub>0</sub> 降低时,pHi 保持近中性,因而产生较大的质子梯度<sup>[22]</sup>。然而,过高的质子梯度对于发酵型乳酸菌是不利的,因为质子的转运需要消耗大量能量<sup>[23]</sup>。因此许多耐酸的发酵型细菌具有在生长过程中 pH<sub>i</sub> 随 pH<sub>0</sub> 下降的特性<sup>[24]</sup>,以保持细胞内外恒定的  $\Delta pH$ 。对于乳酸乳球菌来说,在 pH<sub>0</sub> 为 7.0 或 5.0 时, $\Delta pH$  约为 0.8 个单位<sup>[25]</sup>。由于过低的 pH<sub>i</sub> 会造成酸胁迫,一般的做法是通过升高 pH<sub>0</sub> 来相应地升高 pH<sub>i</sub><sup>[4,24]</sup>。通过将 pH<sub>0</sub> 控制在最适生长 pH 范围内,可以在一定程度上提高对照菌的生长性能(图 2-A 和图 2-B)。然而,在控制 pH<sub>0</sub> 恒定的条件下,对照菌仍需要消耗酵解产生的能量来泵出胞内  $H^+$ ,这样相应减少了用于细胞生长的能量,导致在控制 pH<sub>0</sub> 为  $6.5 \pm 0.1$  的条件下,对照菌的生长速率和最大生物量仍低于重组菌(图 2-A)。而在不控制 pH 的好氧生长条件下,重组菌 pH<sub>0</sub> 显著高于对照菌,表明其 pH<sub>i</sub> 可能也相应地高于对照菌,这样,重组菌不需要消耗与对照菌等量的能量来泵出胞内  $H^+$ ,用于细胞生长的能量相应增加,从而其好氧生长性能得到显著改善(图 2-A 和图 2-B)。

Gaudu 等<sup>[26]</sup>报道了在添加  $10 \mu\text{mol/L}$  亚铁血红素的条件下,乳酸乳球菌细胞内组成了完整的呼吸链,呼吸作用显著地增加了能量的生成,并且减少了有

机酸的生成,使生物量成倍增长,细胞浓度(cfu/mL)达到  $10^9$  数量级, $OD_{600}$  值接近 10。与其结果相似,本研究通过在乳酸乳球菌中表达 MTG,升高 pH<sub>0</sub>,有效减少了发酵产酸对乳酸乳球菌生长带来的不利影响,显著改善了乳酸乳球菌的好氧生长性能。不同之处是,在能量流的改变方面,前者是通过开源,而本研究则是节流。在不控制 pH 的条件下,重组菌的生物量能够达到  $4.13\text{g/L}$ ,细胞浓度可达  $7.7 \times 10^{10}/\text{mL}$ , $OD_{600}$  值为 10.84。本研究为实现乳酸乳球菌的低成本高密度细胞培养提供了可能,并有可能拓宽乳酸乳球菌在代谢工程领域中的用途。

## 参 考 文 献

- [1] de Vos W M, Hugenholtz J. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(2): 72–79.
- [2] Hutkins R W, Nannen N L. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 1993, **76**(8): 2354–2365.
- [3] O'sullivan E, Condon S. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(11): 4210–4215.
- [4] O'Sullivan E, Condon S. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and  $H^+$ -ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6): 2287–2293.
- [5] Even S, Lindley N D, Coccagn-Bousquet M. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology*, 2003, **149**(7): 1935–1944.
- [6] Poolman B, Driessen A J M, Konings W N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1987, **169**(12): 5597–5604.
- [7] Christensen J E, Dudley E G, Pederson J A, et al. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, **76**(1–4): 217–246.
- [8] Sanders J W, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **23**(4): 483–501.
- [9] Zheng M, Du G C, Chen J. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovorticillium mobaraense*. *Enzyme Microbial Technol*, 2002, **31**(4): 477–481.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- [11] de Vos W M, Vos P, de Haard H, et al. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine protease. *Gene*, 1989, **85**(1): 169–176.
- [12] Folk J E, Cole P W. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem*, 1966, **241**: 5518–5525.
- [13] Li Y, Hugenholtz J, Sybesma W, et al. Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**(1): 83–90.

- [14] 唐传核, 杨晓泉, 陈中, 等. 微生物转谷氨酰胺酶 (MTGase) 的蛋白质底物催化特性及其催化机理研究. 食品科学, 2003, **24**(5): 19–24.
- [15] Lopez de Felipe F, Starrenburg M J C, Hugenholtz J. The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **156**(1): 15–19.
- [16] de Felipe F L, Kleerebezem M, de Vos W M, et al. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J Bacteriol*, 1998, **180**(15): 3804–3808.
- [17] Loubière P, Coccagn-Bousquet M, Matos J, et al. Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Appl Microbiol*, 1997, **82**(1): 95–100.
- [18] 还连栋, 贾士芳, 庄增辉, 等. 乳链菌肽 (NISIN) 的杀菌作用机制. 中国食品添加剂, 1997, **4**: 20–23.
- [19] Takehana S, Washizu K, Ando K, et al. Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58**(1): 88–92.
- [20] Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, et al. The role of thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem*, 1997, **272**(25): 15661–15667.
- [21] Jordan A, Pontis E, Aslund F, et al. The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem*, 1996, **271**(15): 8779–8785.
- [22] Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1981, **650**(2–3): 151–166.
- [23] Kobayashi H, Suzuki T, Unemoto T. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J Biol Chem*, 1986, **261**(2): 627–630.
- [24] Cook G M, Russell J B. The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Curr Microbiol*, 1994, **28**(3): 165–168.
- [25] Siegmundfeldt H, Rechinger K B, Jakobsen M. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2330–2335.
- [26] Gaudu P, Vido K, Cesselin B, et al. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, **82**: 263–269.

## Influence of expression of transglutaminase on the growth of *Lactococcus lactis*

FU Rui-yan CHEN Jian LI Yin\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** To improve the aerobic growth performance of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000, the gene *mtg* encoding the mature microbial transglutaminase was amplified from the chromosomal DNA of *Streptovorticillium mobaraense* and then cloned into the nisin-inducible expression vector pNZ8148. The resulting plasmid pFL001 was transformed into strain NZ9000 by electroporation. Compared with strain NZ9000 harboring pNZ8148 (the control strain), strain NZ9000 harboring pFL001 (the recombinant strain) had a remarkably improved aerobic growth performance. When grown aerobically under non-pH-controlled conditions, the maximal biomass of the recombinant strain reached 4.13g/L, which was 11-fold higher than the growth of the control strain (0.34g/L). When grown aerobically with the pH controlled at  $6.5 \pm 0.1$ , the maximal biomass of the recombinant strain reached 4.73g/L, which was an 80% increase compared with the growth of the control strain. In addition, the efficiency of biomass synthesis relative to glucose consumption ( $Y_{x/s}$ ) of the recombinant strain, 71.7g of biomass per mol of glucose, was 1.6-fold higher than that of the control strain. The significantly improved growth performance of the recombinant strain might be attributed to the expression of *mtg* in the recombinant strain, which might increase intracellular pH and save part of the energy (ATP) that was originally used for pumping the cytoplasmic  $H^+$ , and as a consequence, the energy used for growth increased accordingly.

**Key words:** *Lactococcus lactis*, Transglutaminase, Growth

Foundation item: National Natural Sciences Foundations of China (30300009)

\* Corresponding author. Tel: 86-510-5885727, Fax: 86-510-5888301, E-mail: yinli@sytu.edu.cn

Received date: 12-27-2004