

谷胱甘肽在乳酸乳球菌抵抗氧胁迫中的保护作用

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:为研究谷胱甘肽(GSH)在乳酸乳球菌 NZ9000 抗氧胁迫中的生理作用,以能够生物合成 GSH 的重组菌 NZ9000(pNZ3203)为实验菌株进行了研究。结果表明,在较高 H₂O₂ 胁迫剂量(150mmol/L H₂O₂, 15min)下,前培养 3h、5h 和 7h(即乳酸链球菌素诱导 1h、3h 和 5h)时的重组菌细胞的存活率分别是处于相应生长时期对照菌 NZ9000(pNZ8148)的 1.8±0.1 倍、2.6±0.1 倍和 2.9±0.3 倍。表明 GSH 可以提高宿主菌 NZ9000 对 H₂O₂ 所引发氧胁迫的抗性。GSH 还可以提高宿主菌 NZ9000 对其它化学物质(如超氧阴离子自由基生成剂——甲萘醌)所引发氧胁迫的抗性。这表现在经 20mmol/L 甲萘醌处理 60min 后,前培养 5h(即乳酸链球菌素诱导 3h)时重组菌细胞的存活率是对照菌的 6.2±0.1 倍。由此表明,通过代谢工程手段在菌株 NZ9000 中引入 GSH 合成能力,可以提高宿主菌对氧胁迫的抗性。

关键词: GSH; 乳酸乳球菌; 氧胁迫

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0379-06

乳酸菌是一类重要的工业微生物,在食品发酵中应用的历史非常悠久。由于乳酸菌的代谢相对简单,不产孢子,也不产生任何毒素,被美国食品与药品监督管理局(FDA)认为是安全的微生物,因而成为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已被广泛用作生产外源蛋白的宿主菌^[1-3]。

乳酸乳球菌是兼性厌氧菌,在糖酵解中产生的 NADH 的再生主要依赖丙酮酸还原生成乳酸的过程,因而不需要氧的参与。虽然工业发酵中培养乳酸乳球菌都在不通气条件下进行,但在操作过程中不可避免地会遇到氧。氧在还原的过程中会生成活性氧,如超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)、羟自由基(OH \cdot)和过氧化氢(H₂O₂)。目前认为,乳酸乳球菌在接触活性氧时通常会启动的抗氧胁迫机制是:NADH 氧化酶/超氧化物歧化酶(SOD)/NADH 过氧化物酶系统^[4]。由于乳酸乳球菌并不具备冗余的抗氧胁迫系统,如过氧化氢酶,因而相对于酿酒酵母和大肠杆菌来说,它对于氧胁迫的抗性较弱。过量的活性氧会攻击蛋白质、脂肪和核酸,形成氧胁迫,从而加速细胞的老化和死亡^[5]。因而,对氧胁迫的抵抗机制就成为乳酸乳球菌研究学者关注的重要问题之一。

目前,相关研究大多集中在与氧胁迫相关的内

源性结构基因和调控基因的功能方面^[6,7],那么能否通过添加某种外源性物质达到增强乳酸乳球菌对氧胁迫抗性的目的呢?研究者把目光投向谷胱甘肽(γ -GLU-CYS-GLY,简称 GSH),它是生物体内最主要的非蛋白巯基化合物,是以酿酒酵母为代表的真核微生物的正常代谢中一种非常重要的还原剂^[8,9]。在微生物中,GSH 主要存在于真核微生物和革兰氏阴性细菌中。仅在少数低 GC 含量的革兰氏阳性菌中发现 GSH 的存在^[10-12]。目前尚未发现具有 GSH 合成能力的乳酸乳球菌^[13]。乳酸乳球菌 SK11 菌株是生产奶酪的发酵剂^[14]。在前期研究中发现,菌株 SK11 能够从胞外吸收 GSH。并且,吸收 GSH 后,菌株 SK11 对 H₂O₂ 所引发氧胁迫的抗性比对照提高了 4 倍^[13]。菌株 NZ9000 菌株由泛素缺陷型菌株 MG1363 衍生而来,其染色体上整合有 *nisRK* 基因^[15]。该菌是乳酸乳球菌中较为常用的诱导表达型宿主菌^[1,2],但是它不能够吸收外源 GSH。我们感兴趣的问题是:能否通过代谢工程手段,在菌株 NZ9000 中导入 GSH 的合成能力,以提高宿主菌对氧胁迫的抗性?本文以前期研究获得的具有 GSH 合成能力的重组菌 NZ9000(pNZ3203)为实验菌株^[16],研究了 GSH 在菌株 NZ9000 抵抗氧胁迫中的生理作用。

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: furiyan2002@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-07-07;接受日期:2005-09-26;修回日期:2005-09-20

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) NZ9000^[15]和 nisir(乳酸链球菌素)诱导表达质粒 pNZ8148^[17], 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 诱导的启动子 *nisA*。NZ9000 (pNZ8148) the control strain, 以下简称对照菌)和 NZ9000 (pNZ3203) the recombinant strain, 以下简称重组菌^[16]为本研究工作菌株。质粒 pNZ3203 是由 pNZ8148 衍生来的, 带有大肠杆菌(*Escherichia coli*) 编码 GSH 生物合成所需的两个酶的基因, 即编码 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的基因 *gshA* 和谷胱甘肽合成酶的基因 *gshB*^[16]。

1.1.2 试剂和仪器:M17 培养基购自 Oxoid 公司。谷胱甘肽还原酶, DTNB, NADPH 均购自 Sigma 公司。

1.1.3 培养基和培养条件:乳酸乳球菌 NZ9000 培养基:补充终浓度为 5g/L 葡萄糖的 M17 培养基(GM17)。培养条件:取 0.4mL - 70℃ 乳酸乳球菌甘油贮存液接种于 15mL 的 GM17 培养基中, 30℃ 振荡(200r/min)过夜培养后, 作为活化种子, 以 3% 接种量转接新鲜 GM17 培养基, 30℃ 振荡(200r/min)培养。在培养基中加入氯霉素(10 μ g/mL)作为选择标记。在培养 2 h 时在培养基中添加终浓度为 2ng/mL 的乳酸链球菌素和 5mmol/L 的半胱氨酸。

1.2 生长实验

将活化种子培养液以 3% 的接种量接入 GM17 培养基中, 在 30℃ 条件下, 好氧培养(200r/min) 2h, 加入终浓度为 2ng/mL 的乳酸链球菌素诱导基因表达, 同时添加终浓度为 5mmol/L 的半胱氨酸, 继续好氧培养细胞。每隔 1 h 取样一次, 在 600 nm 处测定细胞浊度, 每个生长实验设 3 个重复。

1.3 H₂O₂ 胁迫

将活化种子培养液以 3% 的接种量接入 GM17 培养基中, 在 30℃ 条件下, 好氧培养(200r/min) 2h, 加入终浓度为 2ng/mL 的乳酸链球菌素诱导基因表达, 同时添加终浓度为 5mmol/L 的半胱氨酸, 继续好氧培养细胞(以下简称前培养)。当细胞生长至 3h、5h 和 7h 时, 收集 400 μ L 的培养物, 用生理盐水(0.85% NaCl)洗涤细胞两次, 重悬于 400 μ L 的一定浓度的 H₂O₂ 溶液中(对照为将细胞重悬于 400 μ L 的生理盐水中)。胁迫 15min 后, 立即离心(10000 \times g, 1min), 将沉淀物用生理盐水洗涤细胞两次, 以去除

残余的 H₂O₂。随后, 将细胞重悬于 400 μ L 的生理盐水中, 取 10 μ L 以不同的稀释度点种于 GM17 培养基平板上测定单位体积菌落数(colony forming per unit, CFU/mL)。将平板放置在 30℃ 下培养 48h, 对平板上的菌落进行计数。设 3 个平行样。用 Excel 软件计算平均值和标准偏差。计算存活率时, 考虑了误差的传递。

$$\text{误差传递公式: } \Delta C = C \times \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2} = \frac{A}{B} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$$

A: 胁迫后的菌落数; ΔA : 胁迫后的误差; B: 对照的菌落数; ΔB : 对照的误差; C: 存活率; ΔC : 存活率误差。

1.4 甲萘醌(维生素 K3)胁迫

当前培养(培养条件如前所述)至 5h 时, 收集 400 μ L 的培养物, 用冷生理盐水(0.85% NaCl)洗涤细胞两次, 重悬于 400 μ L 的一定浓度的甲萘醌溶液中(对照为将细胞重悬于 400 μ L 的生理盐水中)。胁迫一定时间后, 立即离心(10000 \times g, 1min), 将沉淀物用生理盐水洗涤细胞两次, 以去除残余的甲萘醌。随后, 将细胞重悬于 400 μ L 的生理盐水中。按 1.3 所述方法测定存活率。

1.5 无细胞抽提液的制备和蛋白质分析

从 12mL 培养液中离心收集乳酸乳球菌细胞(10000 \times g, 10min, 4℃), 用冰冷的生理盐水洗涤两次, 重悬于 3mL 去离子水中。在冰浴中用超声波破碎细胞(工作时间: 间歇时间 = 1:3), 随即离心去除细胞碎片, 得到无细胞抽提液。蛋白质浓度测定: 采用 Lowry 改良的 Folin-酚法, 以小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为对照品。

1.8 GSH 的测定

DTNB-GSH 还原酶循环法^[18]。

2 结果

2.1 半胱氨酸对重组菌生长的影响

基因工程菌在表达外源蛋白时, 由于增加了细胞的代谢负荷, 所以生长量一般都会降低。实验中发现, 和对照菌相比, 重组菌的生长速率有所降低(图 1)。由于不同生长时期细胞对氧胁迫的抗性是不同的, 为了使重组菌和对照菌细胞处于相同的生长时期, 需要将它们的细胞生长速率控制在大致相同的水平。前期研究发现, 培养基中添加半胱氨酸, 可以显著提高重组菌胞内 GSH 含量^[16]。是否半胱氨酸也可以减轻外源蛋白的表达对宿主细胞生长产

生的抑制作用?为此,研究了添加 5mmol/L 和 10mmol/L 半胱氨酸时,重组菌和对照菌的生长情况。测定前培养 5 h(即 nisin 诱导 3 h)时重组菌胞内 GSH 含量。不添加半胱氨酸时 GSH 含量为 $1.62 \pm 0.08 \text{ nmol/mg 蛋白}$,添加 5mmol/L 和 10mmol/L 半胱氨酸时 GSH 含量为 $9.87 \pm 0.04 \text{ nmol/mg 蛋白}$ 、 $11.55 \pm 0.09 \text{ nmol/mg 蛋白}$ 。表明半胱氨酸的添加可以显著提高 GSH 含量。添加 5mmol/L 和 10mmol/L 半胱氨酸对对照菌的生长没有显著影响(数据未给出),但可将重组菌的生长速率恢复到和对照菌基本相同的水平(图 1)。重组菌在添加 10mmol/L 半胱氨酸条件下的生长速率比添加 5mmol/L 半胱氨酸时略有降低(图 1),故选择添加 5mmol/L 半胱氨酸的 M17 培养基培养重组菌和对照菌,然后进行氧化胁迫研究。

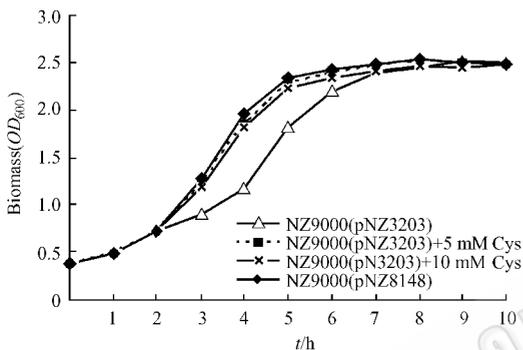


图 1 重组菌和对照菌的生长曲线

Fig.1 Growth curves of the recombinant strain and the control strain.

2.2 GSH 对菌株 NZ9000 抵抗 H_2O_2 引发氧化胁迫作用的影响

2.2.1 高剂量 H_2O_2 胁迫条件下 GSH 对菌株 NZ9000 抵抗氧化胁迫作用的影响

H_2O_2 是研究氧化胁迫的常用介质。前期研究发现,在较低剂量 H_2O_2 胁迫条件(10mmol/L H_2O_2 ,胁迫 5min)下,重组菌和对照菌的抗性无显著差异^[16],而在相同的胁迫条件下,GSH 能将 SK11 细胞对氧化胁迫的抗性增加 4 倍^[13]。可能的原因是菌株 NZ9000 本身对氧化胁迫的抗性远远高于菌株 SK11,所以在面临较低胁迫剂量时,GSH 对于菌株 NZ9000 抗性的影响显现不出来。在较高剂量 H_2O_2 胁迫条件下,胞内 GSH 是否可以提高菌株 NZ9000 细胞对氧化胁迫的抗性?为回答这一问题,在重组菌和对照菌前培养 5h(即 nisin 诱导 3h)后,离心收获细胞,用 50mmol/L 和 150mmol/L 剂量分别处理细胞 15min。

由图 2 可知,在较高的 H_2O_2 剂量下,重组菌表现出对氧化胁迫更强的抗性,并且 H_2O_2 剂量越高,重

组菌中的 GSH 所起的保护作用就越明显。经 50mmol/L H_2O_2 胁迫后,重组菌的存活率是对照菌的 1.2 ± 0.1 倍;而经 150 mmol/L H_2O_2 胁迫后,重组菌的存活率是对照菌的 2.6 ± 0.1 倍。以上结果表明,在不能够生物合成或吸收 GSH 的菌株 NZ9000 中导入 GSH 生物合成能力,能够增强宿主菌对高剂量 H_2O_2 的抗性。

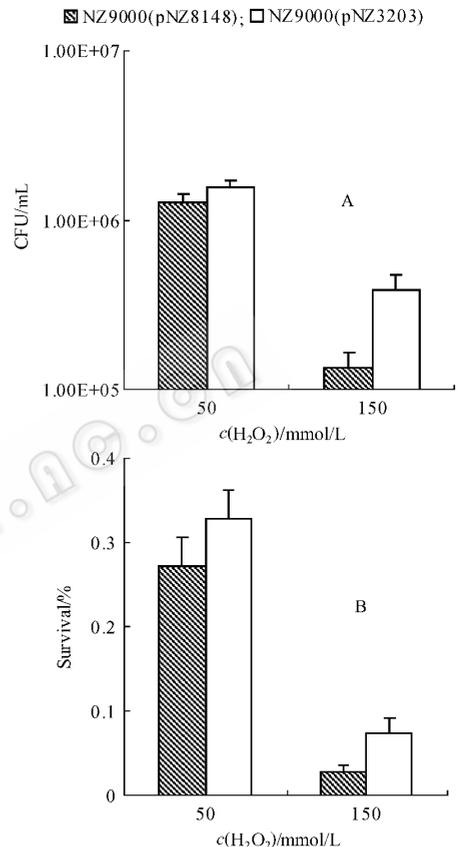


图 2 重组菌和对照菌细胞经 50mmol/L 和 150mmol/L H_2O_2 胁迫后的 CFU (A) 和存活率 (B)

Fig.2 Effect of 50mmol/L and 150mmol/L H_2O_2 treatment on the cell numbers (A) and the survival (B) of cells of the recombinant strain and the control strain. The initial cell number of the recombinant strain and the control strain were $(7.2 \pm 0.5) \times 10^8/\text{mL}$ and $(7.5 \pm 0.8) \times 10^8/\text{mL}$, respectively. The ratio of the CFU of cells with and without stress treatment was defined as survival. Error bars represent the standard deviations from triplicate experiments. Data are representative of the date from triplicate experiments.

2.2.2 不同生长时期的 NZ9000 细胞对 H_2O_2 引发的氧化胁迫的抗性

为研究不同生长时期,重组菌和对照菌细胞对 150mmol/L H_2O_2 胁迫抗性的差异,本研究选取了前培养 3h、5 h 和 7h(即 nisin 诱导 1h、3h 和 5h)的细胞进行胁迫研究。由图 1 可以看出,这 3 个

时刻分别对应着对数前期,对数中期和稳定前期。从重组菌和对照菌的存活率(图3)可以看出,随着生长时间的延长,重组菌和对照菌的抗性逐渐增加。前培养3h、5h和7h的重组菌的存活率分别是对照

菌的 1.8 ± 0.1 、 2.6 ± 0.1 和 2.9 ± 0.3 倍。与之相对应,随着生长时间的增加,胞内 GSH 含量也不断增加(表1)。表明菌株 NZ9000 中 GSH 含量与 GSH 的保护作用之间存在一定的量效关系。

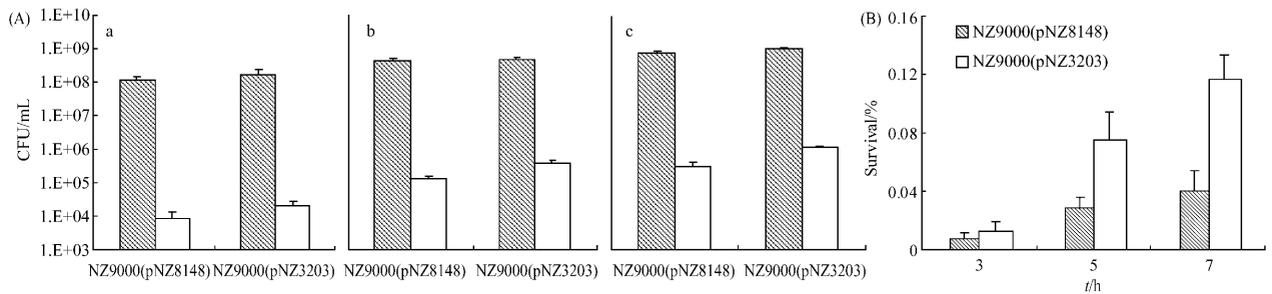


图3 不同生长时期重组菌和对照菌细胞经 150mmol/L H₂O₂ 胁迫后的 CFU (A) 和存活率 (B)

Fig.3 Effect of 150mmol/L H₂O₂ treatment on the cell numbers (A) and the survival (B) of cells of the recombinant strain and the control strain grown in different phases. A: The recombinant strain and the control strain upon H₂O₂ treatment. a, b, and c represents broth withdrawn after 3 h, 5 h, and 7 h of incubation, respectively. Grid bar: cell numbers in control (using saline instead of H₂O₂); open bar: cell numbers after H₂O₂ treatment. B: The corresponding survival. Error bars represent the standard deviations from triplicate experiments. Data are representative of the date from triplicate experiments.

表1 重组菌不同生长时间胞内 GSH 含量

Table 1 The glutathione contents of the recombinant strain grown in different phases

Cultivation time /h	Intracellular GSH concentration (nmol/mg of protein)
0	0.00 ± 0.01
3	3.92 ± 0.06
5	9.87 ± 0.04
7	15.94 ± 0.07

2.3 GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗甲萘醌引发的氧胁迫作用的影响

除了 H₂O₂, 超氧阴离子也是好氧代谢的一种副产物,能够形成氧胁迫。GSH 在酿酒酵母抵抗超氧阴离子引发的氧胁迫中,是一种重要的抗氧化剂^[9]。那么,GSH 是否也可以提高菌株 NZ9000 对超氧阴离子引发的氧胁迫的抗性呢?甲萘醌能通过氧化还原循环生成超氧阴离子^[19],是一种常用的研究超氧阴离子引发的氧胁迫的氧化剂^[20]。图3表明,前培养5h(即乳酸链球菌素诱导3h)的重组菌细胞对 H₂O₂ 的抗性明显增强,故我们选择这个时期的细胞进行甲萘醌胁迫研究,以观察 GSH 是否有保护作用。

在终浓度为 20mmol/L 和 40mmol/L 甲萘醌溶液中将重组菌和对照菌细胞胁迫 1h,结果发现经 40mmol/L 甲萘醌胁迫后重组菌和对照菌均不生长,因而将甲萘醌的胁迫剂量定为 20mmol/L。将重组菌和对照菌细胞胁迫不同的时间后,由图4可以看出,胁迫 20 min 时两者的存活率没有显著差异,胁迫 40min 和 60min 时重组菌存活率分别是对照菌的 5.2 ± 0.1 和 6.2 ± 0.1 倍。以上结果表明,GSH 能够

增强宿主菌 NZ9000 对甲萘醌所引发氧胁迫的抗性。

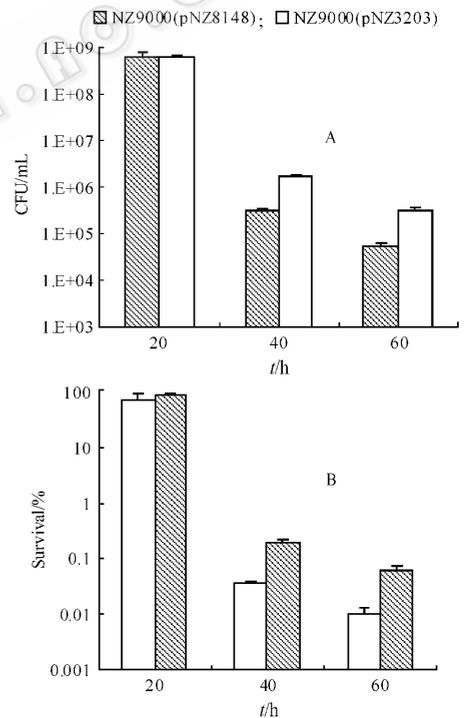


图4 重组菌和对照菌经甲萘醌所引发的氧胁迫后的 CFU (A) 和存活率 (B)

Fig.4 Effect of menadione treatment on the cell numbers (A) and the survival (B) of cells of the recombinant strain and the control strain. The initial cell number of the recombinant strain and the control strain were $(8.3 \pm 0.4) \times 10^8$ /mL and $(8.5 \pm 0.7) \times 10^8$ /mL, respectively. Error bars represent the standard deviations from triplicate experiments. Data are representative of the date from triplicate experiments.

3 讨论

本研究的结果表明,GSH可以提高菌株 NZ9000 细胞对 H_2O_2 和甲萘醌所引发氧胁迫的抗性,这可能与 GSH 本身是一种有效的还原剂有关。有趣的是,进入稳定期后,重组菌胞内 GSH 仍在继续积累(数据未给出),但是,重组菌对 H_2O_2 所引发氧胁迫的抗性不再继续增加,仍保持在对照菌的 3.0 ± 0.3 倍,因而 GSH 的保护作用不能完全由其胞内 GSH 积累量的不同来解释。含有 GSH 的细胞可能有不同的抗氧胁迫机制,即 GSH-谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)-谷胱甘肽还原酶(GR)系统,来保护它们自身免受 H_2O_2 胁迫所产生的破坏作用。这一系统已经在较高等的真核细胞^[21]和酵母^[8,9]中得到证实。以大肠杆菌为代表的革兰氏阴性菌中不存在谷胱甘肽过氧化物酶基因,因而不存在该还原系统。过氧化物酶是大肠杆菌清除 H_2O_2 的主要酶类^[22],乳酸乳球菌中没有过氧化物酶,清除 H_2O_2 的抗氧化酶只有 NADH 过氧化物酶,那么,对于基因组中存在 GR 和 GPx 编码基因的乳酸乳球菌来说^[23],导入的 GSH 是否有可能激活 GSH-GPx-GR 系统呢?前期研究发现,好氧生长下 NZ9000 中的 GR 酶活升高 2 倍,这表明菌株 NZ9000(pNZ3203)中具有存在 GSH-GPx-GR 系统的可能性。与菌株 SK11 不同的是,只有在较高 H_2O_2 剂量下,GSH 对菌株 NZ9000 的保护作用才显现出来。可能的原因是菌株 NZ9000 自身的抗氧胁迫能力较强,因为菌株 NZ9000 对 H_2O_2 引发氧胁迫的抗性至少是菌株 SK11 的 100 倍(数据未给出)。

重组菌对 H_2O_2 和甲萘醌引发的超氧阴离子胁迫的抗性分别为对照的 2.9 倍和 6.2 倍。可能的原因是菌株 NZ9000 胞内的 SOD 还原超氧阴离子的速率不及甲萘醌生成超氧阴离子的速率。同时,超氧阴离子会被 SOD 还原为 H_2O_2 ^[9],也就意味着甲萘醌会引发超氧阴离子和 H_2O_2 双重胁迫。GSH 除具有清除 H_2O_2 的功能外^[8],已有研究表明它还可以还原超氧阴离子,自身被氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG)^[24]。菌株 NZ9000 具有 GR 酶活^[13],因而,在面临甲萘醌引发的氧胁迫时,GSH 起了更大的作用。

乳酸乳球菌对于代谢工程研究来说,是一个极好的原核细胞宿主^[25]。但是,其抗氧胁迫系统并不完备,所以,虽然工业发酵中培养乳酸乳球菌大都在厌氧条件下进行,但在操作过程中不可避免地会受

到氧胁迫的损伤。因而,对氧耐受力强的菌株有利于简化生产工艺、改良生产性能^[26]。在本研究中发现,通过代谢工程手段在乳酸乳球菌 NZ9000 中导入一种“全新”化合物——GSH,可以改善其抗氧胁迫的功能。由于乳酸乳球菌是革兰氏阳性菌中的一种重要模式种,我们的研究结果对深入研究 GSH 在革兰氏阳性菌中的生理作用,也具有一定的参考价值。

致谢 江南大学生物工程学院发酵工程专业 2005 级博士研究生张娟和生物工程专业 2005 届毕业生龙海燕参与部分研究工作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 张 晶,刘敬忠,谭淑珍,等. 苯丙氨酸脱氨酶在乳酸乳球菌 NICE 系统的高效表达及其实验动物研究. 生物工程学报,2002,18(6):713-717.
- [2] Hugenholtz J, Kleerebezem M, Starrenburg M, et al. Lactococcus lactis as a cell factory for high-level diacetel production. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9):4112-4114.
- [3] Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezem M, et al. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. Trends Biotechnol, 1997, 15:135-140.
- [4] van Niel EW, Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B. Formation and conversion of oxygen metabolites by Lactococcus lactis subsp. lactis ATCC 19435 under different growth conditions. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:4350-4356.
- [5] Marty-Teysset C, Dela Torre F, Garel JR. Increased production of hydrogen peroxide by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1):262-267.
- [6] Gaudy P, Lamberet G, Poncet S, et al. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in Lactococcus lactis. Mol Microbiol, 2003, 50(1):183-192.
- [7] Gostick DO, Griffin HG, Shearman CA, et al. Two operons that encode FNR-like proteins in Lactococcus lactis. Mol Microbiol, 1999, 31:1523-1535.
- [8] Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet, 1996, 29(6):511-515.
- [9] Penninckx M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental and oxidative stresses. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(9-10):737-742.
- [10] Fahey RC, Brown WC, Adams WB, et al. Occurrence of glutathione in bacteria. J Bacteriol, 1978, 133:1126-1129.
- [11] Fernandes L, Steele JL. Glutathione content of lactic-acid bacteria. J Dairy Sci, 1993, 76:1233-1242.
- [12] Newton G, Arnold K, Price M, et al. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. J Bacteriol, 1996, 178:1990-1995.

- [13] Li Y , Hugenholtz J , Abee T , *et al.* Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 5739 – 5745 .
- [14] Meijer W , van de Bunt B , Twigt M , *et al.* Lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and its nisin-immune transconjugant in relation to flavor development in cheese. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (5) : 1950 – 1953 .
- [15] Kuipers OP , de Ruyter PGGA , Kleerebezem M , *et al.* Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol* , 1998 , **64** : 15 – 21 .
- [16] Li Y , Hugenholtz J , Sybesma W , *et al.* Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2005 , **67** : 83 – 90 .
- [17] de Ruyter PGGA , Kuipers OP , de Vos WM . Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 3662 – 3667 .
- [18] Tietze F . Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione application to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* , 1969 , **27** : 502 – 522 .
- [19] Golovlev EL . An introduction to the biology of the stationary phase of bacteria : the mechanism of the common response to stresses. *Microbiology* , 1999 , **68** : 543 – 550 .
- [20] Luikenhuis S , Perrone G , Dawes LW , *et al.* The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* , 1998 , **9** : 1081 – 1091 .
- [21] Mezzetti A , Ilio CD , Calafiore AM , *et al.* Glutathione peroxidase , glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery , vein and heart. *J Mol Cell Cardiol* , 1990 , **22** : 935 – 938 .
- [22] Mongkolsuk S , Whangsuk W , Vattanaviboon P , *et al.* A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (ahpC) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *J Bacteriol* , 2000 , **182** : 6845 – 6849 .
- [23] Bolotin A , Wincker P , Mauger S , *et al.* The complete genome sequence of lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* H1403. *Genome* , 2001 , **11** : 731 – 753 .
- [24] Winterbourn CC , Metodiewa D . The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* , 1994 , **314** (2) : 284 – 290 .
- [25] Kleerebezem M , Hugenholtz J . Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* , 2003 , **14** : 232 – 237 .
- [26] van de Guchte M , Serror P , Chervaux C , *et al.* Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* , 2002 , **82** : 187 – 216 .

Glutathione plays an anti-oxidant role in *Lactococcus lactis*

FU Rui-yan , CHEN Jian , LI Yin *

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

Abstract : To assess the physiological function of GSH in resistance to oxidative stress in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NZ9000 , the recombinant strain NZ9000 (pNZ3203) capable of producing GSH was used as the experiment materials. The anti-oxidant role of glutathione was observed under higher H₂O₂ dosage , i. e. , 150 mmol/L H₂O₂ treatment for 15 min. The resistance of NZ9000 (pNZ3203) cells grown for 3 h , 5 h , and 7 h (nisin-induced for 1 h , 3 h and 5 h) were 1.8-fold , 2.6-fold , and 2.9-fold that of NZ9000 (pNZ8148) cells , respectively. In addition , the survival of NZ9000 (pNZ3203) cells grown for 5 h (nisin-induced for 3 h) , upon treatment of 20 mmol/L menadione for 60 min , was 6.2-fold that of NZ9000 (pNZ8148) cells. Therefore , introduction a new biosynthetic pathway of glutathione could confer higher resistance to oxidative stress on *L. lactis* NZ9000.

Keywords : Glutathione ; *Lactococcus lactis* ; Oxidative stress