

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (10) :1146 - 1154; 4 October 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.006

## 乳酸乳球菌 KLDS4.0325 的糖代谢过程及乳酸生物合成途径的比较

杨晓春, 王玉堂, 周颖, 高晓峰, 李柏良, 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:**【目的】为了探究乳酸乳球菌乳酸亚种 KLDS4.0325 的碳水化合物利用能力和乳酸形成潜力。【方法】本文对该菌株进行了全基因组鸟枪法测序, 并应用生物信息学方法对该菌株细胞外糖的转运、代谢及产酸途径涉及的一系列基因与其它 9 株参考菌株进行了比较分析。【结果】与参考菌株相比, 该菌株基因组中具有较多涉及整个途径糖代谢途径的关键酶编码基因。【结论】该菌株在基因水平上表现出能够利用多种糖类物质来产乳酸的优良性状, 是一株具有高产 L-乳酸工业潜能的乳酸菌。

**关键词:** 乳酸乳球菌 KLDS4.0325, 全基因组测序, 糖转运蛋白, 糖代谢, 乳酸合成, 比较分析

**中图分类号:** TS201.3; Q591.1 **文章编号:** 0001-6209(2014)10-1146-09

乳酸菌一直以来被应用于工业食品发酵的起始因子, 其主要的代谢产物乳酸可应用于食品保藏, 其中 L-乳酸的产生无论对于产品的防腐作用或者赋予产品的风味来说都是不可缺少的一种代谢产物。目前, 乳酸已经广泛的应用于食品, 化妆品, 制药和纺织工业等<sup>[1]</sup>。最近, 一种聚 L-乳酸的可再生和生物降解塑料吸引了越来越多的关注<sup>[2]</sup>。因此, 工业生产中对于 L-乳酸的需求正不断增加<sup>[3-4]</sup>。

乳酸菌的糖代谢过程可以分为 3 个步骤, (I) 乳酸菌经过自身的糖转运系统将糖类物质转运至细胞内, 包括磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(The phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase system, PTS)、透性酶(permease)和 ABC 转运蛋白(The ATP-binding cassette (ABC) transporters)<sup>[3-4]</sup>。

在这个过程中, PTS 转运蛋白会使相应的糖类物质磷酸化。然后 (II) 乳酸菌会利用自身的相应酶类将转运至细胞内的糖(经过修饰或未经修饰的糖)经过一步或多步催化反应形成糖酵解途径的中间产物, (III) 并最终经糖酵解途径中的酶类物质催化形成丙酮酸, 丙酮酸会在 L-乳酸脱氢酶或 D-乳酸脱氢酶的催化作用下生成 L-乳酸或 D-乳酸, 另外 L-乳酸和 D-乳酸之间也会通过乳酸消旋酶的作用下发生相互的转化反应。

目前对于乳酸菌碳水化合物的利用和产酸能力的研究主要集中于性能的测量上, 而对于相关机理的研究缺乏一定的理论依据<sup>[5-6]</sup>。乳酸乳球菌 KLDS4.0325 是由东北农业大学乳品科学教育部重点实验室从中国新疆地区牧民家庭自制的酸马奶中

基金项目: 国家自然科学基金(31171717); 国家“863 计划”(2012AA022108); 食品安全与营养协同创新中心中心项目

\* 通信作者。Tel: +86-451-55191807; E-mail: gchuo@vip.0451.com

作者简介: 杨晓春(1988-), 男, 吉林省人, 硕士研究生, 研究方向为乳酸菌生物技术。E-mail: xcyang0117@hotmail.com

收稿日期: 2014-01-03; 修回日期: 2014-04-03

分离的到的一株乳酸乳球菌。经常规实验发现,该菌株具有广泛的碳底物利用能力,且产酸性能良好。为了在基因水平上进一步的了解该菌株对多种碳水化合物化合物的利用和产酸的机理,本文对该菌株进行了全基因组鸟枪法测序,并利用生物信息学方法对其糖代谢的过程及产酸途径涉及的基因进行了挖掘,同时与公共数据库中其它乳酸乳球菌进行了比较分析。为乳酸菌碳水化合物化合物的利用和产酸能力的研究提供了新的研究方向和一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与培养基:** 乳酸乳球菌 KLDS4.0325 是从东北农业大学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)获得的。采用 M17 肉汤培养基对菌株进行培养<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** M17 肉汤培养基、细菌基因组提取试剂盒,北京天根生物技术有限公司;溶菌酶,Solabiro 公司;HVE-50 电热蒸汽自动灭菌锅,HIRAYAMA 公司;GL-20G-II 离心机,上海安亭科学仪器厂;DYY-10C 电泳仪,北京六一仪器厂。

### 1.2 菌株的培养及总 DNA 的提取

将冷冻干燥保藏的乳酸乳球菌 KLDS4.0325 以体积分数为 2% 的接种量转接至 M17 培养基中进行活化培养,使菌株活力得到充分恢复。

菌株总基因组 DNA 的提取参照细菌基因组提取试剂盒说明进行。DNA 提取完成后,取 4 $\mu$ L DNA 进行体积分数为 0.8% 的琼脂糖电泳。最后送至深圳华大基因科技服务有限公司进行全基因组序列的测定。

### 1.3 基因组的测序、组装及注释

乳酸乳球菌 KLDS4.0325 经鸟枪法进行全基因组测序后,利用 SOAodono 软件进行序列拼接<sup>[8-10]</sup>。将获得的全基因组序列利用 BLAST 工具扫描相应的蛋白数据库(例如非冗余数据库和全球通用蛋白数据等)进行序列的注释<sup>[11-12]</sup>。乳酸乳球菌 KLDS4.0325 的全基因组序列已经上传到了 GenBank 数据库中,登录号为:CP006766<sup>[13]</sup>。

### 1.4 生物信息学分析

实验中所需的蛋白序列都是从 Uniprot 蛋白数据库中获得的,对乳酸乳球菌 KLDS4.0325 全基因

组建立本地数据库。利用 BLASTP 本地比对工具将获得的蛋白序列分别针对乳酸乳球菌 KLDS4.0325 基因组数据库进行同源序列的搜索,设置的输出结果为 E 值小于  $1e-10$ , Identify 大于 40%。最后对同源性较高的序列进行收集。糖类物质转化为乳酸的代谢途径信息是从 KEGG 代谢通路数据库中获得的。另外,从 NCBI 数据库中获得了全部公开发表的其它 9 株乳酸乳球菌的全基因组序列,并且使用同样的方法获得了这些菌株基因组中各类相关蛋白编码基因的存在情况。这些菌株包括:乳酸乳球菌乳酸亚种 IL1403 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, 缩写为 LLA, 登录号为 AE005176), 乳酸乳球菌乳酸亚种 KF147 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, LLK, CP001834), 乳酸乳球菌乳酸亚种 CV56 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, LLT, CP002365), 乳酸乳球菌乳酸亚种 IO-1 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1, LLS, AP012281), 乳酸乳球菌乳脂亚种 SK11 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, LLC, CP000425), 乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, LLM, AM406671), 乳酸乳球菌乳脂亚种 A76 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* A76, LLR, CP003132), 乳酸乳球菌乳脂亚种 NZ9000 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000, LLN, CP002094), 乳酸乳球菌乳脂亚种 UC509.9 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UC509.9, LLI, CP003157)<sup>[14-15]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株 KLDS4.0325 的染色体基因组的一般特征

菌株 KLDS4.0325 的染色体基因组全长 2589261bp, G + C 为 35.4%。共预测出 2662 个 ORFs, 其中 1310 个 ORFs 具有潜在的生物学功能。菌株 KLDS4.0325 编码的 ORFs 在 COG 数据库中有同源序列,其功能分类如图 1 所示。菌株 KLDS4.0325 在转录, DNA 复制, 重组和修复方面优势较为明显。同时,代谢系统较为完整,特别是关于碳水化合物和氨基酸的转运和代谢方面有 234 个 ORFs,说明该菌株在这两方面所占的生物信息量较大,具有较好的糖类代谢及风味物质合成的潜能。

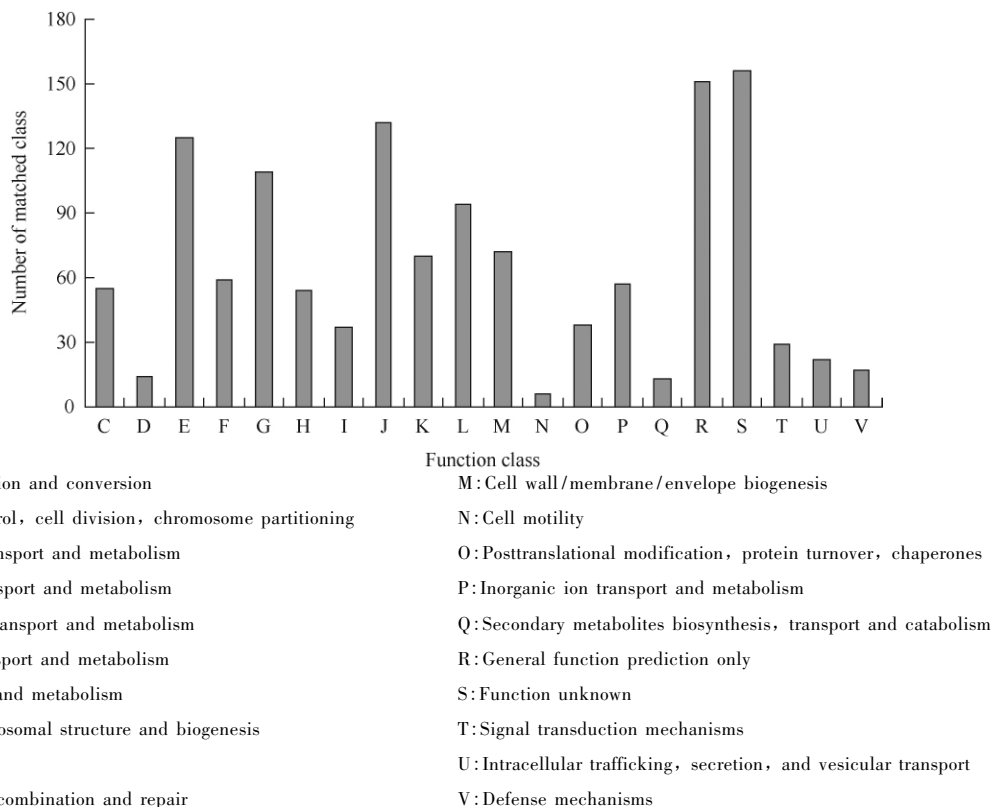


图 1. 乳酸乳球菌 KLDS4.0325 编码的 ORFs 在 COG 数据库中的功能分类

Figure 1. The functional classification of ORFs encoding by strain *L. lactis* KLDS4.0325 in COG database.

## 2.2 乳酸乳球菌 KLDS 4.0325 的糖转运蛋白的比较分析

**2.2.1 甘露醇、果糖、甘露糖和蔗糖:** 10 株乳酸乳球菌的糖转运系统的分布情况如表 1 所示,甘露醇,果糖,甘露糖和蔗糖可同时由 PTS 转运系统。在上述 4 种糖类的转运过程中,只有菌株 KLDS4.0325 具有完整的 5 种糖类物质的 PTS 转运系统基因复合体。在参考菌株中,由于编码相应糖类物质特异性 PTS 转运系统基因复合体的缺失以及拷贝数的不同,因此,上述 4 种糖类物质的转运能力差别较大。例如,对于蔗糖的 PTS 转运系统来讲,只在菌株 LLT 基因组中找到了与菌株 KLDS4.0325 拷贝数相同的 PTS 基因复合体。

**2.2.2 乳糖和麦芽糖:** 乳糖和麦芽糖可以通过 PTS 转运系统,ABC 转运蛋白以及透性酶 3 种方式进行转运。但是在参考菌株中,我们未在任何一株菌的基因组中发现一个完整的关于乳糖的 PTS 基因复合体。但是我们在菌株 KLDS4.0325 的质粒基因组中找到了一个完整的关于乳糖转运的 PTS 基因复合体。另外,在菌株 KLDS4.0325,LLK 和 LLT 的基因

组中发现了编码乳糖透性蛋白的基因。因此这些菌株还可以利用乳糖透蛋白而将乳糖转运至菌株细胞的。但是只有菌株 KLDS4.0325 可以通过 PTS 系统和透性蛋白两种方式对乳糖进行转运。对于麦芽糖的转运,我们仅在 KLDS4.0325 和 LLI 两株菌中各发现了 1 个编码麦芽糖透性蛋白的基因。也就是说,只有这两株菌才能对麦芽糖进行转运。

**2.2.3 半乳糖醇:** 半乳糖醇只能通过 PTS 转运系统进行转运。遗憾的是,在 10 株乳酸乳球菌基因组中均未发现有相关特异性 PTS 转运系统编码基因的存在,因此均不能对胞外半乳糖醇进行转运。

**2.2.4 葡萄糖酸盐和半乳糖:** 葡萄糖酸盐和半乳糖只利用相关透性蛋白进入细胞。参考菌株中编码关于这两种糖的透性蛋白的基因在基因组中的分布情况差异较大。例如,在菌株 LLA,LLS 和 LLC 基因组中未发现有任何一种该类蛋白编码基因的存在。而菌株 LLK 基因组中只发现了 1 个编码葡萄糖酸盐的特异性透性蛋白基因,另外在菌株 LLM,LLN,LLR 和 LLI 的基因组中只发现了 1 个编码半乳糖的特异性透性蛋白基因。而在菌株 KLDS4.0325 和 LLT 的

基因组中同时发现了编码这两种糖的透性蛋白基因 性蛋白转运至细胞内。  
的存在,表明这两株菌株可以同时将两种糖通过透

表 1. 糖转运系统在 10 株乳酸乳球菌基因组中的分布情况

Table 1. Distribution of sugar transporters in the genomes of 10 strains *Lactococcus lactis*

Sugar	Transporter	KLDS	LLA	LLK	LLT	LLS	LLM	LLN	LLC	LLR	LLI
mannitol		1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
fructose		1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
mannose	phosphotransferase system (PTS)	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
sucrose	gene complex	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
lactose		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
galactitol		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gluconate		1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
maltose		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
lactose	permease protein	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
galactose		1	0	0	1	0	1	1	0	1	1

Figures represents the copy number of coding gene of each enzyme.

## 2.3 乳酸乳球菌 KLDS4. 0325 将转运至细胞内的相关糖类物质转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析

### 2.3.1 D-4-磷酸甘露醇转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:

经 PTS 转运系统转运至细胞内的糖都会被磷酸化。甘露醇经 PTS 系统转运过程中发生磷酸化反应,最终进入细胞后形成了 D-4-磷酸甘露醇。后者一般会在 D-4-磷酸甘露醇-5-脱氢酶 (EC:1. 1. 1. 17) 的作用下最终转化为糖酵解中间产物  $\beta$ -D-6-磷酸果糖。由表 2 可知,10 株菌株的基因组中都编码了 1 个 D-4-磷酸甘露醇-5-脱氢酶。因此在基因水平上表现出的催化效率较为接近 (忽略基因表达、酶活等因素外,后同)。但由于菌株 LLA 和 LLC 不能对甘露醇进行转运外 (表 1),所以包括菌株 KLDS4. 0325 在内的 8 株菌株都可以将甘露醇转化为糖酵解途径中间产物  $\beta$ -D-6-磷酸果糖,且编码转运和催化作用的酶的基因拷贝数完全一致。

### 2.3.2 D-4-磷酸果糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:

果糖经 PTS 系统转运最终进入细胞后形成了 D-4-磷酸果糖。后者一般会经过 3 条途径转化为糖酵解的中间产物 D-3-磷酸甘油醛。途径 I、II 以及 III 分别是在 D-4-磷酸果糖在磷酸果糖激酶和 2-磷酸果糖醛缩酶, class I、二磷酸果糖醛缩酶, class I 和磷酸丙糖异构酶 (TIM) 以及 2-磷酸果糖醛缩酶, class I 和丙糖激酶 [EC 2. 7. 1. 28] 的作用下生成 D-3-磷酸甘油醛。

由表 2 可知,只有菌株 LLR 因基因组中不含有

途径 I 中的关键性酶磷酸果糖激酶而不能由该途径合成 D-3-磷酸甘油醛。结合表 1 可知,在果糖的 PTS 转运系统基因复合体中,只有菌株 KLDS4. 0325、LLC 和 LLI 基因组中各编码了 1 个完整的 PTS 基因复合体。所以在该过程中只有这 3 株菌可以将转运至细胞内的 D-4-磷酸果糖经途径 1 和 2 产生 D-3-磷酸甘油醛。另外,由于我们在 10 株乳酸乳球菌的基因组中均未发现编码丙糖激酶的基因,因此 10 株乳酸乳球菌都不能通过第 III 条途径合成 D-3-磷酸甘油醛。

### 2.3.3 D-6-磷酸甘露糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:

甘露糖经 PTS 系统转运至细胞后形成了 D-6-磷酸甘露糖,后者会在 D-6-磷酸甘露糖异构酶的催化下直接转变为糖酵解途径的中间产物  $\beta$ -D-6-磷酸果糖。结合表 1 和表 2 可知,有 5 株乳酸乳球菌 (KLDS4. 0325, LLA, LLS, LLR 和 LLI) 的基因组中同时编码了 1 个完整的 PTS 基因复合体和 1 个 6-磷酸甘露糖异构酶的基因。因此,5 株菌株都能将细胞外甘露糖转化为  $\beta$ -D-6-磷酸果糖,且相关基因的拷贝数完全一致。

### 2.3.4 6-磷酸蔗糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:

蔗糖经 PTS 系统转运至细胞后形成了 6-磷酸蔗糖。后者会在  $\beta$ -呋喃果糖苷酶/6-磷酸蔗糖水解酶的催化作用下形成  $\alpha$ -D-6-磷酸葡萄糖和  $\beta$ -D-果糖。结合表 1 和表 2 可知,只有菌株 KLDS4. 0325 和 LLT 的基因组中既编码了关于蔗糖的 PTS 转运系统基因复合体,同时又编码了 6-磷酸蔗糖水解酶的基因。因此,在 10 株乳酸乳球中,只

有菌株 KLDS4.0325 和 LLT 可以利用胞外蔗糖进行相关的代谢活动,且编码糖转运和代谢的基因拷贝数同为 2 和 1。

**2.3.5 6-磷酸乳糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:**乳糖经 PTS 系统转运至细胞内后形成的产物为 6-磷酸乳糖,后者会在  $\beta$ -6-磷酸半乳糖苷酶/ $\beta$ -6-磷酸半乳糖苷酶的催化作用下生成  $\beta$ -D-葡萄糖和 D-6-磷酸半乳糖。在 10 株乳酸乳球菌中,我们只在菌株 KLDS 4.0325 的质粒基因组中找了 1 个完整的乳糖 PTS 转运系统基因复合体(表 1)和 1 个  $\beta$ -6-磷酸半乳糖苷酶(表 2)基因。因此,只有菌株 KLDS4.0325 可以通过 PTS 系统将乳糖转运至细胞内,并进行糖的进一步代谢。

**2.3.6 葡萄糖酸盐转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:**由表 1 可知,在 10 株乳酸乳球菌中,可以通过葡萄糖酸盐透性蛋白的方式进行细胞外糖转运的菌株只有菌株 KLDS4.0325,LLK 和 LLA,且透性蛋白编码基因的拷贝数均为 1。转运至细胞内的葡萄糖酸盐需要经过葡糖酸激酶,6-磷酸葡萄糖酸盐脱氢酶,磷酸核酮糖-3-差向异构酶和转酮醇酶 4 种酶的催化作用下才能形成糖酵解途径的中间物质  $\beta$ -D-6-磷酸果糖。经研究发现,10 株乳酸菌的基因组中都含有这一途径中的 4 种关键酶的编码基因(表 2),其中菌株 KLDS4.0325,LLK 和 LLA 3 株菌株基因组中 4 种酶的编码基因拷贝数完全一致(1, 2, 1, 1)。因此,该 3 株乳酸菌在葡萄糖酸盐的转运和转化效率方面是较为接近的。

**2.3.7 麦芽糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:**麦芽糖经麦芽糖透性蛋白进入菌细胞后,一般可以在麦芽糖磷酸化酶的作用下转化为 D-葡萄糖而直接进入糖酵解途径。在菌株 KLDS4.0325 和 LLI 的基因组中各存在 1 个编码麦芽糖磷酸化酶的基因(表 2)。因此结合表 1 可知,10 株菌株中只有菌株 KLDS4.0325 和 LLI 可以完成胞外麦芽糖的转运及其相关代谢过程。

**2.3.8 乳糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:**3 株乳酸乳球菌 KLDS4.0325,LLK 和 LLT 可利用基因组中编码的相关透性酶(编码基因拷贝数都为 1)将乳糖转入进细胞内(表 1),并通过两条途径生成糖酵解中间产物(表 2)。途径 I 中,3 株菌株基因组中编码  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的拷贝数分别为 1,2 和 1;途径 II 中,3 株菌株基因组中编码  $\beta$ -半

乳糖苷酶/半乳糖激酶/UDP-葡萄糖-己糖-1-磷酸尿嘧基转化酶的基因拷贝数分别为 1、2、1,2、2、2 和 1、1、2。因此,菌株 KLDS4.0325,LLK 和 LLT 都通过途径 I 和 II 将转入胞内的乳糖酶解成  $\alpha$ -D-葡萄糖和 D-1-磷酸葡萄糖,且菌株 LLK 基因组中编码的上述糖代谢酶的基因拷贝数最多<sup>[16-17]</sup>。

**2.3.9 半乳糖转化为糖酵解途径中间产物过程的比较分析:**菌株 KLDS4.0325、LLT、LLM、LLN、LLR 和 LLI 利用基因组中编码的相关透性酶以相同的效率将半乳糖转入进细胞内以后(表 1),半乳糖可以在半乳糖激酶和 UDP 葡萄糖-己糖-1-磷酸尿嘧基转化酶的催化下生成 D-1-磷酸葡萄糖。6 株乳酸乳球菌的基因组中编码这两种酶基因的拷贝数均为 1 和 2。因此,6 株乳酸乳球菌都可以利用透性酶将胞外半乳糖转入细胞后进行酶解以获得 D-1-磷酸葡萄糖,且在基因水平上表现出较为接近的糖转运和酶催化速率<sup>[18]</sup>。

## 2.4 乳酸乳球菌 KLDS4.0325 利用产生的糖酵解中间产物进行乳酸合成途径的比较分析

乳酸菌利用相关转运机制将细胞外的各种糖类物质转运至细胞内后,再经各种相关酶的催化而转变为糖酵解途径的中间产物,这些物质进入糖酵解途径后经相关酶的催化作用最终生成丙酮酸,即乳酸的前体物质,丙酮酸可以利用 L-乳酸脱氢酶或 D-乳酸脱氢酶的催化最终产生 L-乳酸或 D-乳酸<sup>[19-20]</sup>。

**2.4.1 乳酸乳球菌 KLDS4.0325 利用产生的糖酵解中间产物进行 L-乳酸合成途径的比较分析:**如图 2 所示,菌株 KLDS4.0325 产生的糖酵解途径的中间产物进入糖酵解途径后经过一系列相关酶类的催化后生成了丙酮酸,后者在 L-乳酸脱氢酶的催化下生成 L-乳酸。在整个糖酵解途径中,包括参考菌株在内的 10 株菌株在糖代谢的性能上总体差异不大。但是与其它乳酸乳球菌相比,菌株 KLDS4.0325 在以下几个方面与其它参考乳酸乳球菌还是存在一定的差异。如表 3 所示,在  $\alpha$ -D-葡萄糖-1 磷酸转化为  $\alpha$ -D-1-磷酸葡萄糖的过程中,只有菌株 KLDS4.0325 的基因组存在相关的葡萄糖磷酸变位酶(二氧磷基 glucomutase),因此与参考菌株相比,菌株 KLDS4.0325 能够利用更多的底物来生成乳酸。另外,在 2,3-二磷酸甘油酸转化为 3-磷酸甘油酸的过程,菌株 KLDS4.0325 的基因组中不仅编码了可直

接催化 1, 3-二磷酸甘油酸生成 3-磷酸甘油酸的磷酸甘油酸激酶,同时编了 2-磷酸甘油酸变位酶和 2, 3-二磷酸甘油酸磷酸酶,这两种酶也可以催化 1, 3-磷酸甘油酸生成 3-磷酸甘油酸。最重要的是,在丙

酮酸转化为 L-乳酸的过程,菌株 KLDS4. 0325 的基因组中编码了 5 个 L-乳酸脱氢酶基因,是 10 株菌株中拷贝数最多的一株菌。因此,菌株 KLDS4. 0325 具有可以较快将丙酮酸转化为 L-乳酸的潜能。

表 2.10 株乳酸乳球菌基因组中参与将转运至细胞内的相关糖类物质转化为糖酵解途径中间产物过程的基因分布情况

Table 2. Genes distribution of enzyme involving in the process of converted sugars into intermediate products of glycolysis after they were transported into cell in the genomes of 10 strains *Lactococcus lactis*

Enzyme	KLDS	LLA	LLK	LLT	LLS	LLM	LLN	LLC	LLR	LLI
mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase [EC:1. 1. 1. 17]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-phosphofructokinase [EC:2. 7. 1. 56] /tagatose-6-phosphate kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
fructose-bisphosphate aldolase, class I [EC:4. 1. 2. 13]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
fructose-bisphosphate aldolase, class I [EC:4. 1. 2. 13]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5. 3. 1. 1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
triose kinase [EC 2. 7. 1. 28]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mannose-6-phosphate isomerase [EC:5. 3. 1. 8]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
beta-fructofuranosidase /sucrase-6-phosphate hydrolase [EC:3. 2. 1. 26]	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-
6-phospho-beta-galactosidase /phospho-beta-galactosidase [3. 2. 1. 85]	1	-	-	-	-	-	-	3	1	1
gluconokinase /gluconate kinase [EC:2. 7. 1. 12]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6-phosphogluconate dehydrogenase [EC:1. 1. 1. 44]	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
ribulose-phosphate 3-epimerase [EC:5. 1. 3. 1]	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1
transketolase [EC:2. 2. 1. 1]	1	1	1	1		1	1	1	1	1
maltose phosphorylase [EC:2. 4. 1. 8]	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
beta-galactosidase [EC:3. 2. 1. 23]	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0
galactokinase [EC:2. 7. 1. 6]	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
UDPglucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase [EC:2. 7. 7. 12]	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2

Figures represents the copy number of coding gene of each enzyme.

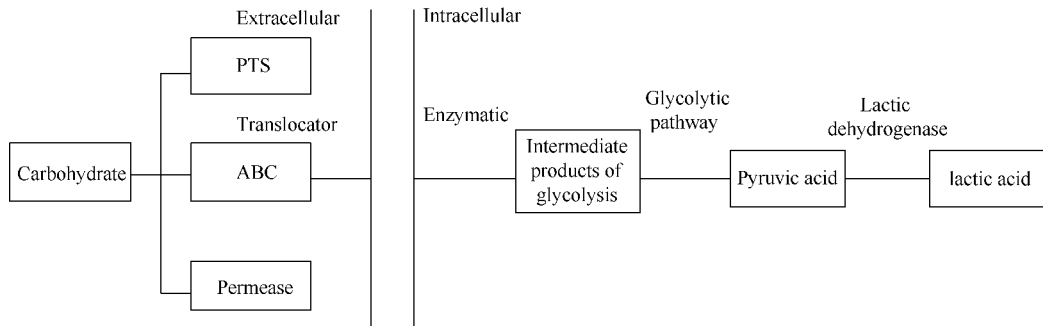


图 2. 乳酸菌将胞外糖类物质降解形成乳酸的过程

Figure 2. The process of LAB degrade extracellular sugar into lactic acid.

2.4.2 乳酸乳球菌 KLDS4. 0325 利用产生的糖酵解中间产物进行 D-乳酸合成途径的比较分析:菌株 KLDS4. 0325 的 D-乳酸生物合成途径与 L-乳酸生物合成途径在形成丙酮酸之前的过程是完全相同的。与 L-乳酸的合成不同的是,D-乳酸是丙酮酸在 D-乳酸脱氢酶的作用下生成的。经对比分析发现,在测试的 10 株乳酸乳球菌株中,只有菌株 LLT, LLC, LLR 和 LLI 中含有该关键性酶的编码基因。而其它

包括菌株 KLDS4. 0325 在内的 6 株菌株都因不含该种酶类的编码基因而不能通过该途径合成 D-乳酸。另外,L-乳酸和 D-乳酸之间还可以通过乳酸消旋酶的作用相互转化,但经过分析发现,这 10 株菌株的基因组中都因不含有该酶的编码基因而不能通过该途径合成 D-乳酸。因此,菌株 KLDS4. 0325 的 D-乳酸合成途径是不完整的,只能合成 L-乳酸。

表 3. 10 株乳酸乳球菌的糖酵解途径中关键酶的分布情况

Table 3. Distribution of enzymes involving in glycolytic pathway in the genomes of 10 strains *Lactococcus lactis*

Enzymes	KLDS	LLA	LLK	LLT	LLS	LLM	LLN	LLC	LLR	LLI
phosphoglucomutase [EC:5.4.2.2]	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glucose-1-phosphate phosphodismutase [EC:2.7.1.4]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
/glucose-1-phosphatase [EC:3.1.3.10] / hexokinase [EC:2.7.1.1] /glucokinase [EC:2.7.1.2]										
/polyphosphate glucokinase [EC:2.7.1.63]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
/ADP-dependent glucokinase [EC:2.7.1.147]										
Aldose1-epimerase [EC:5.1.3.3]	3	2	3	4	2	1	1	1	1	3
hexokinase [EC:2.7.1.1] /glucokinase [EC:2.7.1.2]										
/polyphosphate glucokinase [EC:2.7.1.63]	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
/ADP-dependent glucokinase [EC:2.7.1.147]										
glucose-6-phosphate 1-epimerase [EC:5.1.3.15]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
/glucose-6-phosphate isomerase [EC:5.3.1.9]										
fructose-1,6-bisphosphatase [EC:3.1.3.11]										
/6-phosphofruktokinase [EC:2.7.1.11]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
/ADP-dependent phosphofruktokinase [EC:2.7.1.146]										
fructose-bisphosphate aldolase [EC:4.1.2.13]	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5.3.1.1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]										
/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)) [EC:1.2.1.59]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
bisphosphoglycerate mutase [5.4.2.4]	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-diphosphoglycerate phosphatase [3.1.3.13]	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphoglycerate kinase [EC:2.7.2.3]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
aldehyde:ferredoxin oxidoreductase [EC:1.2.7.5] / glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (ferredoxin) [EC1.2.7.6] /	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) [EC:1.2.1.9]										
phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.11]	4	3	3	1	4	4	4	3	3	3
phosphopyruvate hydratase/enolase [4.2.1.11]	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
L-lactate dehydrogenase [EC:1.1.1.27]	5	3	3	3	3	3	1	4	4	1

Figures represents the copy number of coding gene of each enzyme.

### 3 结论

本文通过对菌株 KLDS4.0325 进行全基因组序列测定,并对其糖代谢相关基因进行了比较分析。结果发现,菌株 KLDS4.0325 基因组中关于糖转运以及代谢方面的基因所占生物信息的量较大。通过与数据库中其它已完成测序的乳酸乳球菌相比,菌株 KLDS4.0325 的基因组中包含较多关于细胞外糖类物质转运系统的编码基因,

且在催化糖酵解中间产物形成过程中所涉及的酶的编码基因是最全面的。另外,在糖酵解途径中的几个关键酶编码基因的拷贝数是最多的。因此,菌株 KLDS4.0325 在基因水平上一方面显示出可以将多种胞外糖类物质转化为糖酵解途径中间产物的潜力,另一方面又表现出较高的 L-乳酸合成效率。因此,菌株 KLDS4.0325 的这种可以利用多种糖类物质进行产酸的能力为其能够在多种培养条件下进行快速生长提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (1) : 333-335.
- [2] Yu B, Su F, Wang L, Zhao B, Qin J, Ma C, Xu P, Ma Y. Genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain CASL, an efficient L-lactic acid producer from cheap substrate cassava. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (24) : 7013-7014.
- [3] Poolman B. Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82 (1) : 147-164.
- [4] Aleksandrak-Piekarczyk T, Polak J, Jezierska B, Renault P, Bardowski J. Genetic characterization of the CcpA-dependent, cellobiose-specific PTS system comprising *CelB*, *PtcB* and *PtcA* that transports lactose in *Lactococcus lactis* IL1403. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145 (1) : 186-194.
- [5] Francl AL, Thongaram T, Miller MJ. The PTS transporters of *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323. *BMC Microbiology*, 2010, 10 (1) : 77-80.
- [6] Lorca GL, Barabote RD, Zlotopolski V, Tran C, Winnen B, Hvorup RN, Stonestrom, A J, Nguyen, E, Huang, L W, Kim, D S, Saier, MH Jr. Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768 (6) : 1342-1366.
- [7] Li J, Song D, Gu Q. Optimization of plantaricin production by *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008 (6) : 818-823. (in Chinese)  
李景良, 宋达峰, 顾青. 植物乳杆菌 ZJ316 生产细菌素. *微生物学报*, 2008 (6) : 818-823.
- [8] Broadbent JR, Hughes JE, Welker DL, Tompkins TA, Steele JL. Complete genome sequence for *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32, an industrial Cheese starter and cheese flavor adjunct. *Genome Announcements*, 2013, 1 (4) : e00590-13.
- [9] Aleksandrak-Piekarczyk T, Koryszewska-Baginska A, Bardowski J. Genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* (Formerly *Lactobacillus casei*) LOCK900. *Genome Announcements*, 2013, 1 (4) : e00640-13.
- [10] Crowley S, Bottacini F, Mahony J, van Sinderen, D. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* Strain 16, a broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacterium. *Genome Announcements*, 2013, 1 (4) : e00533-13.
- [11] Stahl B, Barrangou R. Complete genome sequence of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* La-14. *Genome Announcements*, 2013, 1 (3) : e00376-13.
- [12] Li X, Gu Q, Lou X, Zhang X, Song D, Shen L, Zhao Y. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* strain ZJ316. *Genome Announcements*, 2013, 1 (2) : e9413-13.
- [13] Yang XC, Wang Y, Huo GC. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KLDS4.0325. *Genome Announcements*, 2013, 1 (6) : e00962-13.
- [14] Liu M. Comparative genomics of dairy lactic acid bacteria: proto-cooperation, proteolysis and flavour formation. The doctoral dissertation of Radboud University Nijmegen, 2010.
- [15] 张文羿. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 全基因组序列的测定及比较分析. 内蒙古农业大学的博士学位论文, 2010.
- [16] Leong-Morgenthaler P, Zwahlen MC, Hottinger H. Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (6) : 1951-1957.
- [17] Kim OB, Richter H, Zaunmuller T, Graf S, Uden G. Role of secondary transporters and phosphotransferase systems in glucose transport by *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (24) : 6902-6911.
- [18] Djordjevic GM, Tchieu JH, Saier MJ. Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (10) : 3224-3236.
- [19] Wang L, Zhao B, Liu B, Yang C, Yu B, Li Q, Ma C, Xu P, Ma Y. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (20) : 7895-7901.
- [20] Kleerebezemab M, Hols P, Hugenholtz J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26 (9) : 840-848.



# Carbohydrate metabolism and lactic acid biosynthesis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KLDS4.0325

Xiaochun Yang, Yutang Wang, Ying Zhou, Xiaofeng Gao, Bailiang Li,  
Guicheng Huo\*

Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Heilongjiang Province, Harbin 150030, China

**Abstract:** [Objective] We aimed to study the carbohydrate metabolism and lactic acid biosynthesis of *Lactococcus lactis* KLDS4.0325. [Methods] Whole genome shot gun strategy was used for genome sequencing of strain *L. lactis* KLDS 4.0325. Then, using bioinformatics method, we compared a series of protein – coding genes involved in transporting extracellular carbohydrate, sugar metabolism and lactic acid biosynthesis of strain *L. lactis* KLDS4.0325 with other 9 reference strains. [Results] In *L. lactis* KLDS4.0325 genome, where possesses more key enzyme coding genes related to the whole pathway of sugar metabolism than reference strains. [Conclusion] In gene level, therefore, strain *L. lactis* KLDS4.0325 shows a remarkable characteristic by utilizing various sugar to produce lactic acid, is a lactic acid bacteria with industrial potential of high yield L – lactic acid.

**Keywords:** *Lactococcus lactis* KLDS4.0325, whole-genome sequencing, sugar transporters, sugar metabolism, lactic acid biosynthesis, comparative analysis

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171717), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA022108) and by the Synergy Innovation Center of Food Safety and Nutrition of China

\* Corresponding author. Tel: +86-451-55191807; E-mail: gehuo@vip.0451.com

Received: 3 January 2014 / Revised: 3 April 2014