

一株能够利用血红素进行有氧呼吸的乳酸乳球菌

付良**, 刘飞**, 霍贵成*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】乳酸乳球菌在呼吸状态下, 生长速度快, 生物产量大, 是改善发酵剂生产效率的潜在途径之一, 本研究旨在观察由传统乳制品中分离得到的乳酸乳球菌在血红素存在状态下有氧呼吸情况以及代谢的变化。【方法】对本实验室保藏的 12 株乳酸乳球菌进行有氧培养实验, 比较其生物量和代谢产物的差异。观测在 4 下储藏 30 d 后的活菌数差异。【结果】筛选出一株在血红素存在条件下进行有氧呼吸的菌株 KLDS 4.0316, 与没有添加血红素的原菌株相比生物量增长了 50%, 在 4 储藏 30 d 后, 添加血红素并振荡的活菌数依然维持在 10^8 CFU/mL, 而未添加血红素未振荡检测不到活菌。在血红素存在下, KLDS 4.0316 代谢产物发生了变化, 与没有添加血红素的原菌株相比乳酸产量减少了 48%。【结论】KLDS 4.0316 在血红素存在条件下能够进行有氧呼吸, 乳酸产生减少, 生物量增加。

关键词: 乳酸乳球菌; 呼吸作用; 血红素; 存活率

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1256-04

乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*), 是一种革兰氏阳性兼性厌氧菌, 具有将不同的糖转化为 L-(+)-乳酸的发酵能力^[1], 最佳生长温度在 30℃ 左右, 具有相对较小的基因组^[2] (25000 kb)。被广泛应用于发酵乳制品的生产, 例如干酪和酪乳。因此, 乳酸乳球菌具有极高的经济价值^[3]。

分子氧能将细胞毒害和致死, 因此对乳酸乳球菌的生长和存活有负面效应, 这主要是由于活性氧簇攻击蛋白质、类脂、核酸造成的^[4]。有研究表明延长乳球菌与空气接触的时间会导致细胞死亡和 DNA 降解, 氧的毒害作用可以归咎于过氧化氢和羟基的生成, 这些中间产物具有高的氧化电势, 对细胞具有较高的毒性^[5]。氧化应激对细菌细胞引起不同形式的损伤, 包括代谢途径的改变、产生自发突变体和抑菌物质^[6]。

尽管乳酸乳球菌被归类为厌氧菌, 而且几乎所有

的研究都集中在发酵代谢上。但是 Sijpesteijn (1970) 发现如果在充气培养时加入血红素, 乳酸乳球菌可以在充气环境下生长, 此时氧的摄入量增加, 乙酸、3-羟基丁酮含量增加, 乳酸含量降低。当细菌在上述条件的培养基中生长时, 细菌体内会形成细胞色素。然而, 在乳酸乳球菌丁二酮亚种培养物中却没有检测到细胞色素类物质, 呼吸作用在这样的条件下不能进行。Sijpesteijn 推断, 当细菌在含有血红素的培养基中生长后, 主要是受血红素调节的细胞色素介导的呼吸作用导致了 NADH 的氧化, 而且在这种情况下 NADH 氧化酶仅仅起很小的作用^[7]。

由于国外知识产权的保密和专利技术保护, 有关乳酸菌有氧呼吸的参考资料有限, 所以本研究的目的是观察本实验室由传统乳制品中分离得到的乳酸乳球菌在血红素存在条件下的代谢状况, 为我国自主知识产权发酵剂的开发提供参考依据。

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA102344)

*通讯作者。Tel: +86-451-55191807; Fax: +86-451-55190340; E-mail: gchuo@vip.0451.com

**作者简介: 对本文有同等贡献。付良(1982-), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要研究方向为畜产品加工, E-mail: 47610736@qq.com;

刘飞(1980-), 男, 黑龙江人, 博士, 主要研究方向为食品微生物与生物技术

收稿日期: 2008-03-08; 修回日期: 2008-06-04

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基：乳酸乳球菌乳亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *L.lactis*) KLDS 4.0304、KLDS4.0305、KLDS4.0306、KLDS 4.0316、KLDS 4.0312、KLDS 4.0308、KLDS 4.0309、KLDS 4.0310、KLDS 4.0311、KLDS 4.0307、KLDS 4.0313、KLDS 4.0314 均来自乳品科学教育部重点实验室。

M17 培养基：酪蛋白胨 2.5 g、大豆胨 5.0 g、胰蛋白胨 2.5 g、牛肉膏 5.0 g、酵母膏 2.5 g、抗坏血酸 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.25 g、乳糖 5.0 g、β-甘油磷酸二钠 19.0 g，加蒸馏水至 1 L，调 pH 至 6.8，121℃ 高压灭菌 15 min。固体培养基加 1.6% 琼脂粉。

1.1.2 主要试剂和仪器：胰蛋白胨、酵母粉为 OXOID 公司产品，大豆蛋白胨、牛肉膏、抗坏血酸为北京奥博星公司产品，MgSO₄·7H₂O 为天津市海晶精细化工厂公司产品，乳糖为天津市东方卫生材料厂产品，酪蛋白胨、β-甘油磷酸二钠为上海卓康生物科技有限公司产品，琼脂粉为 Solarbio 公司产品。恒温培养箱 Spx150B 上海佳胜实验设备公司，紫外分光光度计 DU-800 Beckman，pH 计 METTLER TOLEDO 32，恒温振荡培养箱 ZHWY-100B 上海智诚分析仪器制造厂，超净工作台 VP-1320 哈东联，压力蒸汽灭菌器 HVE-50 HIRAYAMA，显微镜 BA200 MOTIC，HPLC Waters 2695 等。

1.2 菌种活化和血红素溶液的配制

将冻干菌种接种于 M17 液体培养基，30 条件下培养 24 h。称取适量氯化高铁血红素，溶于 0.05 mol/L NaOH 水溶液中，制得浓度为 0.5 mg/mL 的血红素母液，然后 115 高压灭菌 15 min 备用。

1.3 目标菌的筛选

将 M17 液体培养基倒入三角瓶中，培养基的量不得超过三角瓶容量的 1/10，灭菌后每毫升培养基中添加 20 μL 的血红素。3% 接菌后，250 r/min 振荡培养 24 h。测定 OD₆₀₀ 下菌液的吸光值（分别以添加血红素和未添加血红素的 M17 培养基作为对照）并且在室温下测定菌液的 pH^[10]。

1.4 生长曲线的测定

菌种活化扩培后，以 5% 接种量接种于 M17 培养基中，30 条件下恒温培养，此后每隔 2 h 取样测定吸光值、pH，直到 36 h 为止。以培养时间为横坐标，相应的吸光值为纵坐标，绘制生长曲线。

1.5 平板菌落计数

菌液采用 10 倍梯度稀释，选取适当稀释度倾注平板，使其均匀分布于培养基中，30 恒温培养 48 h 后计菌落数。

1.6 乳酸含量测定

色谱分离柱：Waters Park C18 柱；检测器：UV214 nm；流动相：流动相 A：0.02 mol/L NaH₂PO₄；流动相 B：乙腈；A 与 B 的比例是为 9：1 流速 1 mL/min；进样量：10 μL。取发酵液 50 mL，以 10000 × g，4 下离心 10 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后经适当稀释进行色谱分析。

1.7 统计分析

采用 SPSS11.5 软件对试验数据进行统计分析，其中每组试验有 3 个重复 (n=3)。

2 结果和分析

2.1 菌株筛选结果

表 1 列出了菌株在传统发酵（无氧无血红素，No Ox/No H），添加血红素（无氧有血红素，No Ox/H）

表 1 菌株培养 24 h 后的 OD₆₀₀ 和 pH
Table 1 The OD₆₀₀ and pH of strains cultivated after 24 h

Code of strain	No Ox/No H ($\bar{X} \pm SE$)		No Ox/H ($\bar{X} \pm SE$)		Ox/H ($\bar{X} \pm SE$)	
	OD ₆₀₀	pH	OD ₆₀₀	pH	OD ₆₀₀	pH
KLDS 4.0304	1.12±0.02	4.59±0.05	1.16±0.02	4.61±0.05	1.09±0.03	4.48±0.03
KLDS 4.0305	1.31±0.04	4.57±0.04	1.34±0.03	4.59±0.03	1.22±0.02	4.34±0.02
KLDS4.0306	1.37±0.02	4.55±0.03	1.32±0.02	4.57±0.02	1.35±0.04	4.51±0.02
KLDS4.0307	1.23±0.02	4.58±0.02	1.17±0.02	4.59±0.03	1.12±0.02	4.31±0.03
KLDS4.0308	1.56±0.05	4.53±0.02	1.51±0.03	4.58±0.04	1.52±0.02	4.34±0.04
KLDS4.0309	1.37±0.06	4.55±0.04	1.31±0.03	4.56±0.02	1.12±0.02	4.25±0.04
KLDS4.0310	1.12±0.02	4.59±0.03	1.04±0.03	4.63±0.02	0.95±0.02	4.20±0.02
KLDS4.0311	1.37±0.02	4.58±0.02	1.36±0.02	4.61±0.03	1.21±0.02	4.53±0.02
KLDS4.0312	1.31±0.02	4.65±0.04	1.29±0.03	4.68±0.02	1.30±0.02	4.51±0.04
KLDS4.0313	1.14±0.03	4.59±0.05	1.09±0.03	4.61±0.02	0.98±0.02	4.52±0.02
KLDS4.0314	1.33±0.02	4.53±0.02	1.28±0.02	4.55±0.04	1.24±0.03	4.51±0.05
KLDS4.0316	1.25±0.04	4.66±0.04	1.18±0.02	4.67±0.02	1.87±0.02	5.44±0.03

和添加血红素并振荡(有氧有血红素, Ox/H) 3 种培养条件下, 培养 24 h 后测定的培养液的 OD_{600} 和 pH。

从表 1 中可以看出, KLDS 4.0316 在 Ox/H 条件下培养 24 h 后, 生物量增加, pH 变化明显, 达到 5.44; 在 Ox/No H 培养条件下生物量和 pH 变化不显著。因为高速振荡的关系, 溶氧量增加引起生物量减少, pH 升高。将 KLDS 4.0316 与其他菌株对比不难发现, 添加了血红素后 KLDS 4.0316 的生物量没有像其它菌株那样受到振荡的影响, 反而有大幅的增加, 说明氧非但没有对 KLDS 4.0316 造成毒害作用, 还促进了菌株的生长。

2.2 生长曲线和 pH 变化曲线

KLDS 4.0316 在 No Ox/No H 和 Ox/H 两种培养条件下的生长曲线和 pH 变化曲线见图 1。前 6 h KLDS 4.0316 在两种培养条件下的生长情况基本上一致, 随后 KLDS 4.0316 在 No Ox/No H 培养条件下进入了稳定期, 生物量没有继续增加。与之相反的是, KLDS 4.0316 在 Ox/H 培养条件下, 生物量持续增加, 与常规发酵相比, 增加了近 1.5 倍。结果表明在 Ox/H 培养条件下 KLDS 4.0316 的代谢改变了, 在从指数期进入稳定期时有了明显的变化。从 pH 的变化趋势来看也验证了代谢途径的改变, 前 6 h KLDS 4.0316 在两种培养条件下, pH 的变化趋势基本上一致, 而后发生了显著的变化, KLDS 4.0316 在 No Ox/No H 条件下酸度继续下降直至稳定, 而 KLDS 4.0316 在 Ox/H 条件下则摆脱了下降的趋势, 开始上升。通过生长曲线和 pH 变化曲线可知, 细胞在指数生长后期代谢开始产生变化, 说明 KLDS 4.0316 并不是从一开始就进行呼吸作用, 而是在指数生长期进行的。

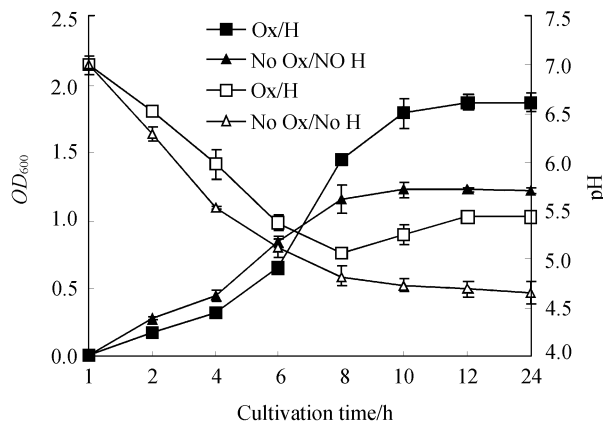


图 1 KLDS 4.0316 在 No Ox/No H 和 Ox/H 两种条件下 OD_{600} 和 pH 变化

Fig. 1 The changes of OD_{600} and pH of KLDS 4.0316 cultivated under conditions of No Ox/No H and Ox/H.

2.3 生长过程中乳酸的变化曲线

乳酸乳球菌乳亚种在传统发酵过程中, 葡萄糖大部分转化为乳酸, 而且最终的 pH 在 4.5 左右, 尽管 KLDS 4.0316 在 Ox/H 条件下一开始 pH 也是下降的, 但是生长后期的 pH 却显著提高了。图 2 中的乳酸变化曲线说明 KLDS 4.0316 在 Ox/H 条件下, 生长初期的乳酸代谢跟传统的发酵没有区别, 但是在 6 h 后, 乳酸的代谢开始减缓, 并且在生长末期乳酸的含量有所降低。乳酸乳球菌乳亚种的酸度主要来自发酵过程中代谢的乳酸和乙酸等酸性物质。这也解释了 KLDS 4.0316 在 Ox/H 条件下生长末期 pH 增高的原因。

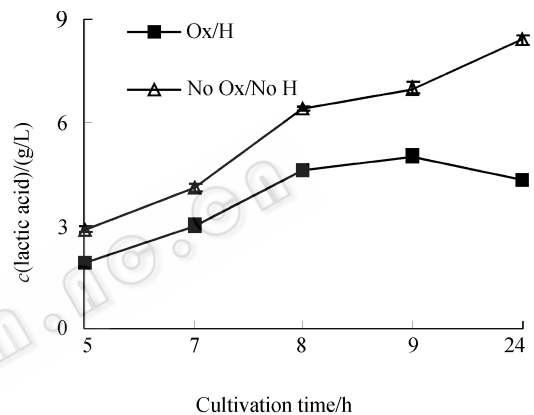


图 2 KLDS 4.0316 在 No Ox/No H 和 Ox/H 两种培养条件下乳酸产量变化

Fig. 2 The changes of lactic acid production of KLDS 4.0316 cultivated under condition of No Ox/No H and Ox/H.

2.4 菌存活率检测结果

KLDS 4.0316 在 Ox/H 和 No Ox/No H 条件下培养 24 h, 然后直接 4℃ 保藏, 定期在 M17 固体培养基

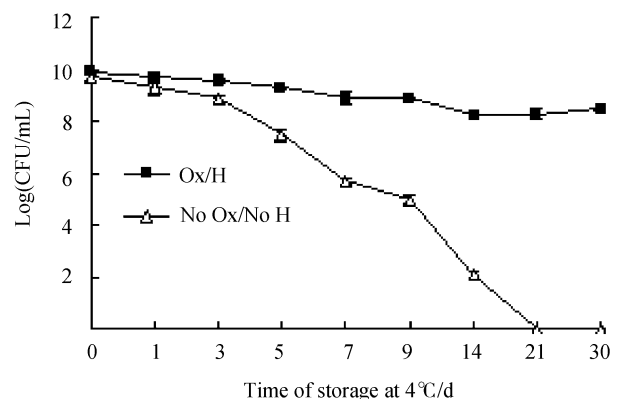


图 3 不同培养方式所得的 KLDS 4.0316 菌株在 4℃ 保藏的菌活力

Fig. 3 The viable cell count of KLDS 4.0316 cultivated under different condition when storage at 4℃.

上进行活菌计数, 所得结果见图 3。过夜培养后的活细胞数在 No Ox/No H 条件下为 2×10^9 CFU/mL, 而在 Ox/H 条件下达到 7×10^9 CFU/mL, 10 d 后在 No Ox/No H 条件下培养的活菌数已经下降到 10^5 CFU/mL, 而在 Ox/H 的活菌数仍维持在 10^8 CFU/mL, 经过 1 个月的保存, 在 Ox/H 条件下培养的 KLDS 4.0316 的活菌数仍然维持在 10^8 CFU/mL。

3 讨论

细胞色素氧化酶处在呼吸链末端起着将电子直接传递给氧, 使 O_2 还原成 H_2O 的功能。它是呼吸链中三个能量偶联位点之一, 是呼吸链的关键组成部分。乳酸乳球菌能够合成细胞色素氧化酶的前体脱血红素细胞色素, 但是缺乏合成血红素部分途径^[8], 因此, 必须添加外源性卟啉结构的血红素, 与脱血红素细胞色素结合生成细胞色素氧化酶, 才能够进行有氧呼吸。

分子氧自身不会对细胞引起任何的伤害, 但是在细胞的生长和代谢过程中, 氧作为电子的受体或者供体会合成一系列的活性氧簇, 如超氧化物阴离子、氢氧离子和过氧化氢, 它们对细胞具有较高的氧化毒性。细菌消除氧的毒害方式有 (1) 排除活性氧簇; (2) 修复损伤^[9]; (3) 诱导相应的酶来排除氧^[10]。在 Ox/H 培养条件下, KLDS 4.0316 不仅能抵抗氧的损伤, 还能利用氧进行呼吸作用, 我们推测: 有氧呼吸代谢产生的能量要远远高出发酵产能, 因此带来了生物量增长, 存活率提高。

参 考 文 献

- [1] Stackebrandt E, Teuber M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 1998, 70: 317–324.
- [2] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, *et al*. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. *Genome Re*, 2001, 11: 731–753.
- [3] Henriksen CM, Nilsson D, Hansen S, *et al*. Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. *Intern Dairy J*, 1999, 9: 17–23.
- [4] Berlett BS and Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem*, 1997, 72: 20313–20316.
- [5] Farr SB and Kogoma T. Oxidative stress responses in *E. coli* and *S. typhimurium*. *Microbiol Rev*, 1991, 55: 561–585.
- [6] Duwat P. Stress response pathways in *Lactococcus lactis*. *Recent Res Devel Microbiol*, 1999, 3: 335–348.
- [7] Sijpesteijn AK. Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by heme in *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1970, 36: 335–348.
- [8] Duwat P, Sourice S, Cesselin B, *et al*. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol*, 2001, 183: 4509–4516.
- [9] Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 188–194.
- [10] Nguyen PT, Abranches J, Phan TN, *et al*. Repressed respiration of oral streptococci grown in biofilms. *Curr Microbiol*, 2002, 44: 262–266.

Lactococcus lactis capable of respiring in the presence of heme

Liang Fu, Fei Liu, Guicheng Huo*

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

Abstract: [Objective] *Lactococcus lactis* undergoing respiration has fast growth rate and relatively high biomass, which is the one of the potential way of improving the production efficiency of starter. In this study, the respiration situation and metabolism changes of *Lactococcus lactis* strains in the presence of heme were investigated. [Methods] Twelve strains of *Lactococcus lactis* were examined with aerobic cultivating test. The difference of biomass and metabolites among strains were compared. Furthermore, the survival rate at storage at 4 °C for 30 days was also compared by testing their viable cell count. [Results] A strain of *Lactococcus lactis* coded as KLDS 4.0316 could respire in the presence of heme. The biomass of KLDS 4.0316 cultivated in the present of heme increased by 50%. After being stored at 4 °C for 30 days, the strain cultivated under the condition without oxygen and heme was totally dead, whereas the viable cell count of strain cultivated with oxygen and heme remained 10^8 CFU/ml. Production of lactic acid decreased by 48%, compared with the strain cultivated in the absent of heme. [Conclusion] KLDS 4.0316 can undergo respiration in the present of heme, and the production of lactic acid decreased while the biomass increased.

Keywords: *Lactococcus lactis*; respiration; heme; survival rate