

保加利亚乳杆菌 H^+ -ATPase 缺陷型菌株的筛选

刘飞, 杜鹏, 王玉堂, 刘芳, 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】从传统乳制品中筛选具有新霉素抗性的 H^+ -ATPase 缺陷的德氏乳杆菌保加利亚亚种自发突变株, 为最终开发弱后酸化的酸奶发酵剂奠定基础。【方法】利用 API 50 CH 细菌鉴定系统和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定。新霉素作为筛选压力, 筛选具有新霉素抗性自发突变菌株, 比较亲本和突变菌株的 H^+ -ATPase 活力及其代谢情况。【结果】从内蒙古地区的传统发酵酸奶中分离鉴定出一株德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 并命名为 KLDS 1.9201。以此为出发菌株, 筛选出两株 H^+ -ATPase 缺陷的自发突变株, 分别命名为 KLDS 1.9201-1、KLDS 1.9201-4, 它们的 H^+ -ATPase 活力分别比亲本 KLDS 1.9201 降低了 46% 和 60%。在 MRS 培养基中生长 24 h 后, KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 对初始葡萄糖的代谢率分别为 65%、41% 和 31%, 终产物中乳酸的浓度分别为 26、18 和 15 g/L, 突变菌株的生物量均低于亲本。【结论】 H^+ -ATPase 活力降低的德氏乳杆菌保加利亚亚种的自发突变株具有较低的生长速率和弱产酸能力, 它们可被用于制作弱后酸化的酸奶发酵剂。

关键词: 德氏乳杆菌保加利亚亚种; H^+ -ATPase; 突变株; 后酸化

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0038-06

酸奶作为一种具有益生作用的乳制品, 已经普遍被消费者认可。但是由于酸奶正常发酵结束后, 在产品贮存、运输、销售、食用前这一过程会发生后酸化, 出现消费者不可接受的过酸味及感官质量下降, 影响酸奶的保质期^[1]。因此, 酸奶后酸化的问题迫切需要解决。德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 在发酵结束后的酸奶中继续生长代谢乳糖产酸是导致酸奶发生后酸化的主要原因。德氏乳杆菌保加利亚亚种具有非常强的产酸能力和耐酸性, 当外界环境中 pH 降低时, 其质膜 H^+ -ATPase (F_1F_0 -ATPase) 能通过水解 ATP 提供的能量将细胞内的质子泵出胞外, 形成的膜 pH 梯度差, 使细胞内 pH 维持在中性附近, 代谢酶的活力不受影响。直至环境中 pH 达到 3.5 时, 跨膜 pH 梯度差才不存在, 细胞内呈酸性, 新陈代谢

活动开始受到抑制^[2]。然而, 理想酸奶产品的 pH 在 4.2 左右。因此, 针对酸奶“后酸化”这一乳品加工行业的关键技术瓶颈, 利用基因工程以及分子生物学技术来对德氏乳杆菌保加利亚亚种的 H^+ -ATPase 进行改造不失为一个明智的选择, 但是转基因食品的安全性问题仍在争议当中。因此在本研究中选择传统的诱变育种来选育 H^+ -ATPase 缺陷的德氏乳杆菌保加利亚亚种菌株, 为最终得到性状优良的弱后酸化的酸奶发酵剂菌株奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: ①质粒 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。②干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* ATCC7469) 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)

基金项目: 国家“863”计划 (2006AA102344), 黑龙江省教育厅科研项目 11531027, 国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21204-08)

* 通信作者。Tel: +86-451-55191807; Fax: +86-451-55190340; Email: gchuo@vip.0451.com

作者简介: 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: 2008-07-23; 修回日期: 2008-09-03

ATCC4356)为本实验室保藏菌种。③培养基:MRS培养基^[3]、脱脂乳培养基。

1.1.2 样品来源:乳品科学教育部重点实验室保藏的采自内蒙古地区的传统发酵酸奶。

1.1.3 主要试剂和仪器:API 50 CH 试条和 API 50 CHL 培养基均为法国生物梅里埃公司产品;DCCD(二环己基碳二亚胺)为 Sigma 公司产品;硫酸新霉素为 Amresco 公司产品;LA Taq 为 TaKaRa 公司产品;BCA 蛋白质浓度测定试剂盒为碧云天产品。其余试剂均为国产或进口分析纯。ATB 细菌鉴定仪法国生物梅里埃公司。PCR 扩增仪 9700 ABI 公司;紫外分光光度计 DU-800 Beckman 公司;HPLC Waters 2695 等。

1.2 乳酸菌的分离、纯化和鉴定

将样品在脱脂乳培养基中活化两代,然后取 1 mL 样品,用灭菌生理盐水经适当梯度稀释后涂布于含有 5% $CaCO_3$ 的 MRS 平板上,在 37℃ 培养 24 h,挑选出周围形成透明圈的菌落,革兰氏染色后镜检,将 G^+ 菌株继续划线于 MRS 平板,直至确定为纯菌,纯化后的菌株接种到 MRS 斜面培养基培养后,置 4℃ 冰箱中保存。

按照文献[3-4],凡是革兰氏染色阳性,过氧化氢酶试验阴性的菌株初步确定为乳酸菌。在初步鉴定的基础上,使用 API 50 CH 试条和 API 50 CHL 培养基对分纯的乳酸菌进行鉴定,严格按照试条和培养基的使用说明书进行操作,使用 *L. casei* ATCC7469 和 *L. acidophilus* ATCC4356 作为质控菌株。

1.3 16S rDNA 序列的扩增和测序

乳酸菌基因组 DNA 的提取参照 Giorgio Giraffa 的方法^[5]。16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增引物分别是 16SF(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 16SR(5'-CTACGGCTAC CTTGTTACGA-3')^[6]。PCR 扩增条件:94℃ 4 min;94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 2 min,共 30 个循环,72℃ 10 min。PCR 扩增产物连入克隆载体 pMD18-T 后,由上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 同源性分析及系统发育树的构建

利用 BLAST,寻找与目的基因序列同源性最高的已知分类地位的菌种。然后从 GenBank 中提取乳酸杆菌属内代表菌株的 16S rRNA 基因序列,与测定的序列共同用 ClustalX1.83 校准排齐进行多序列比较后,用 MEGA4 软件以 Neighbor-Joining 法构建系统发生树,1000 次随机抽样,计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发生树的置信度^[7]。

1.5 H^+ -ATPase 缺陷突变菌株的诱变

将菌株接种于 MRS 液体培养基中,在 37℃ 下培养至对数期。然后在 4℃ 下离心收集菌体,弃上清,将沉淀溶于灭菌生理盐水中。取 0.1 mL 菌悬液涂布于含有 100 $\mu g/mL$ 新霉素的 MRS 平板,在 37℃ 下培养 72 h。挑取单个菌落接种于 MRS 液体培养基中,在 37℃ 下培养 48 h 后测定菌液的 pH 和 OD_{600} 。将 $OD_{600} < 0.8$ 和 $pH > 4.2$ 的突变菌株置于 10% 的灭菌甘油溶液中,在 -80℃ 下保存。

1.6 质膜 H^+ -ATPase 活性的测定

采用 Ongol 等的方法制备含有 H^+ -ATPase 的膜粗提取物^[8]。采用 Nannen 的方法测定质膜 H^+ -ATPase 的活性^[9],为了确定质膜粗提取物中 H^+ -ATPase 的类型,分别测定其对 F-型 ATPase 抑制剂 DCCD、P-型 ATPase 抑制剂正钒酸钠、V-型 ATPase 抑制剂 KNO_3 的敏感性^[10]。细胞膜粗提取物中蛋白质的定量采用碧云天的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒,按照试剂盒的说明书进行操作。 H^+ -ATPase 酶的活性用 U/mg 蛋白质来表示,其中每个活力单位定义为 1 mg H^+ -ATPase 粗提取物在 1 min 内分解 ATP 形成 1 μmol 的无机磷酸盐。

1.7 突变菌株生长代谢情况

将 KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 以 3% 接种量接种于 MRS broth 中,在 37℃ 下培养,每隔 2 h 测定发酵液的 pH 和 OD_{600} 以及葡萄糖和乳酸含量的变化,KLDS 1.9201 作为对照。

1.8 乳酸含量测定

色谱分离柱:Waters Park C18 柱;检测器:UV 214 nm;流动相:①流动相 A 0.02 mol/L NaH_2PO_4 ;②流动相 B:乙腈;③A 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,10000 $\times g$ 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。

1.9 葡萄糖含量测定

色谱分离条件:色谱柱:氨基柱;柱温:30℃;流动相:乙腈:水 = 70:30;流速:0.8 mL/min;进样体积:20 μL ;检测器:折光。取发酵液 50 mL,以 10000 $\times g$,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。

1.10 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。

2 结果

2.1 乳酸菌的分离结果

从样品中分离到一株乳杆菌,在 MRS 平板上培

养 24 h 后,菌落呈乳白色半透明,边缘不整齐;革兰氏染色后镜检发现该菌呈革兰氏阳性,细长杆状,单生,将其命名为 KLDS1.9201。

2.2 ATB 的鉴定结果

目测 API 试条的检测结果,然后将检测结果输入电脑,使用 ATB 软件对实验结果进行判定。结果表明 KLDS1.9201 为德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*),其中 id% = 98.9%, T = 0.95。

2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果与系统发育分析

通过 PCR 扩增得到的 KLDS 1.9201 菌株的 16S rRNA 基因序列为 1529 bp,该基因序列已在 GenBank 注册(EU676001)。将 KLDS 1.9201 的 16S rRNA 基因序列 BLAST 后发现,该菌与乳杆菌属内种的同源性最高。然后将该菌的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中已知的乳杆菌属内标准菌株进行多序列比较后用 MEGA4 以 NJ 法绘制系统发育树

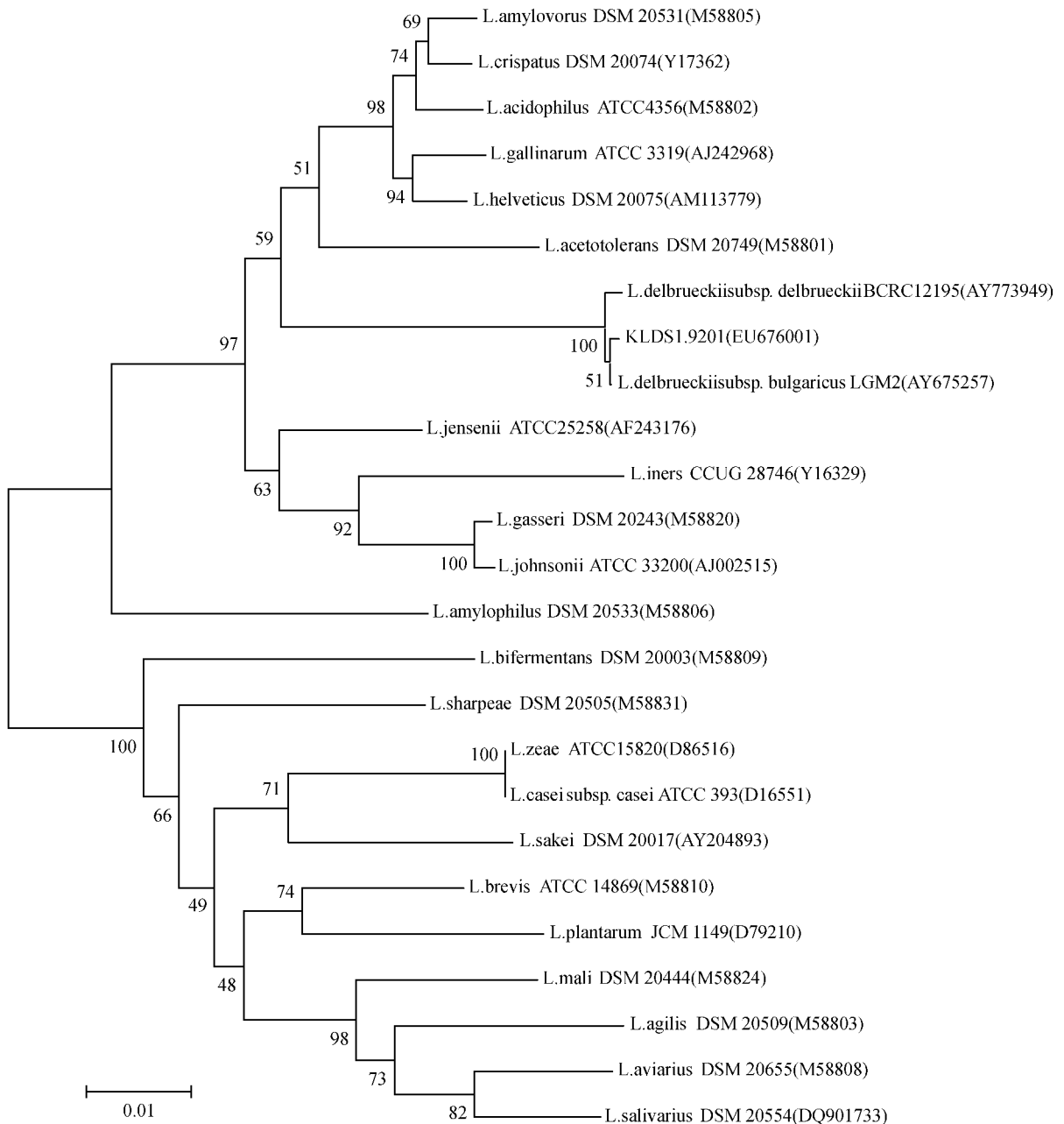


图 1 基于 16S rRNA 基因序列建立的乳杆菌属系统发育树

Fig.1 *Lactobacilli* phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of representative isolates. The serial numbers in brackets indicate accession number of strains. The numbers at nodes indicate the level of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets, only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

(图1)。由图可知, KLDS 1.9201 同 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LGM2 的亲缘关系最近, 序列相似性为 99%。

2.4 H^+ -ATPase 缺陷突变菌株的筛选结果

从德氏乳杆菌保加利亚亚种 KLDS 1.9201 筛选得到 2 株 H^+ -ATPase 酶缺陷突变菌株。将这两株菌分别命名为 KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4, 在 MRS 液体培养基中培养 48 h 后, 它们的 OD_{660} 和 pH 分别为 0.746 和 4.32、0.657 和 4.45。

2.5 质膜 H^+ -ATPase 活性的测定结果

质膜 H^+ -ATPase 活力的测定结果见图 2。当反应体系的 pH 为 6.5 时, KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的质膜 H^+ -ATPase 活力分别为 1.43、0.76 和 0.57 U/mg 蛋白, 同出发菌株相比, 突变菌株的质膜 H^+ -ATPase 活力显著降低 ($P < 0.05$)。

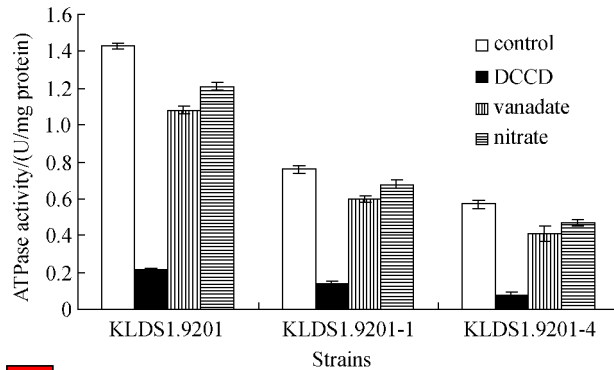


Fig.2 抑制剂对 H^+ -ATPase 活性的影响

Fig.2 Effects of inhibitors on the H^+ -ATPase activity.

此外, 在本研究中无论亲本还是突变菌株的质膜 H^+ -ATPase 活性都受到 DCCD 的显著抑制 ($P < 0.05$), 其中 KLDS 1.9201 和 KLDS 1.9201-1 的质膜 H^+ -ATPase 活力大约有 85% 被抑制, 而 KLDS 1.9201-4 则有 81% 被抑制。正钒酸钠和 KNO_3 对 KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的质膜 H^+ -ATPase 活力的抑制作用并不明显。

2.6 突变菌株的生长曲线

将 KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 接种于 MRS broth 中, 在 37°C 下培养, 每隔 2 h 测定发酵液 OD_{660} 和 pH, 直至 24 h 为止, 试验测得各菌株的生长曲线如图 3 所示。

同 KLDS 1.9201 相比, KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的生长速率明显降低。在 MRS 液体培养基中生长 24 h 后, 亲本的细胞密度 (OD_{660}) 大约是突变菌株的 3 倍。突变菌株的产酸速率也明显降低, 在 MRS 液体培养基中培养 24 h 后, 亲本培养物的

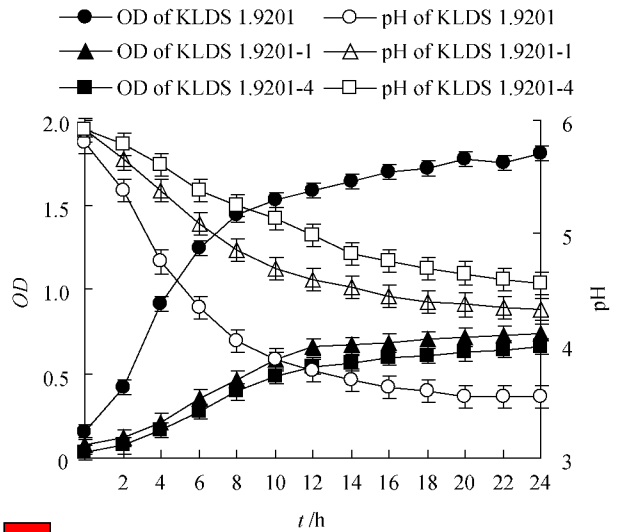


Fig.3 KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的生长曲线

Fig.3 Growth curve of KLDS 1.9201, KLDS 1.9201-1 and KLDS 1.9201-4.

pH 能够达到 3.55, 然而突变菌株则分别为 4.32 和 4.55。

2.7 突变菌株代谢动力学

将亲本和突变菌株接种于 MRS broth 中, 在 37°C 下培养, 每隔 2 h 测定发酵液中葡萄糖和乳酸的含量, 直至 24 h 后为止, 试验测得各菌株的发酵曲线如图 4 所示。

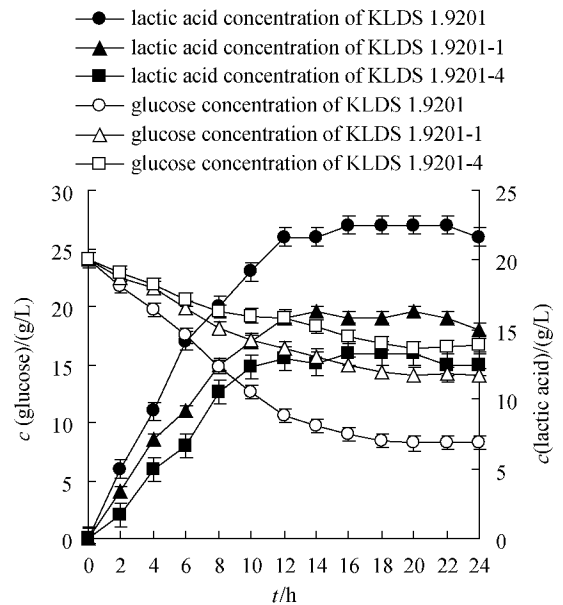


图 4 KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的发酵曲线

Fig.4 Fermentative curve of KLDS 1.9201, KLDS 1.9201-1 and KLDS 1.9201-4.

发酵 24 h 后, KLDS 1.9201 对葡萄糖转化率在 65% 以上。而 KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 对葡萄糖转化率则分别为 41% 和 31%。KLDS

1.9201 培养物上清液中乳酸浓度能够达到 26 g/L。而 KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 代谢所产生的乳酸浓度则分别仅为 18 g/L 和 15 g/L。

3 讨论

3.1 乳酸菌的鉴定

ATB 细菌鉴定仪对判定出的结果具有专家系统功能,对于该仪器鉴定细菌的结果,如 $id\% > 90\%$,且 $T > 0.60$,则鉴定结果准确,可直接报告。本研究中 ATB 细菌鉴定仪对 KLDS 1.9201 的判定结果为德氏乳杆菌保加利亚亚种,其中 $id\% = 98.9\%$,且 $T = 0.95$,因此,本实验的鉴定结果非常准确。此外,16S rRNA 基因序列 BLAST 结果和系统发育树都表明 KLDS 1.9201 同 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LGM2 的亲缘关系最近,它们之间的序列相似性为 99%,因此结合 ATB 的鉴定结果,将 KLDS 1.9201 鉴定为 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*。

3.2 H^+ -ATPase 缺陷突变菌株的筛选

在本研究中,硫酸新霉素被作为诱变压力来筛选质膜 H^+ -ATPase 缺陷的德氏乳杆菌保加利亚亚种突变菌株。新霉素作为一种抗生素能够与细菌的 30S 核糖体亚基结合,抑制细菌蛋白质的合成,从而抑制细菌的生长。细菌摄入新霉素是一个耗能的过程^[11],质膜 H^+ -ATPase 活力降低的突变菌株不能产生足够的能量来摄入新霉素,从而具有了对新霉素的抗性。人们已经利用新霉素从以下菌种中筛选到了质膜 H^+ -ATPase 缺陷的突变菌株,包括乳酸乳球菌^[12]、瑞士乳杆菌^[13]、酒类酒球菌^[14]等。本实验中筛选得到两株 H^+ -ATPase 活力降低的德氏乳杆菌保加利亚亚种菌株,同亲本相比,突变菌株的产酸能力显著降低。

3.3 不同抑制剂对质膜 H^+ -ATPase 活性的影响

由于 H^+ -ATPase 可分为 F-型、P-型和 V-型 ATPase^[10],因此分别测定 F-型、P-型和 V-型 ATPase 抑制剂对 KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的质膜 H^+ -ATPase 活力的影响。由于, DCCD 能同 F_0 亚基中 c 亚基的谷氨酸或天冬氨酸残基的羧基发生共价结合,阻断质子转运,因此如果 F_1F_0 -ATPase 是完整的,那么 DCCD 就应该能抑制 ATP 的水解和合成^[15]。在本研究中发现, KLDS 1.9201、KLDS 1.9201-1 和 KLDS 1.9201-4 的质膜 H^+ -ATPase 活性都受到 DCCD 的显著抑制,正钒酸钠和 KNO_3 的抑制作用并不明显。许多研究

者^[8-10,16]在测定 F_1F_0 -ATPase 活性的时候也发现了同样的现象,因此可以认定在本实验中测定的 ATPase 活性,主要代表的是 F_1F_0 -ATPase 的活性。

3.4 H^+ -ATPase 缺陷突变菌株的生长代谢情况

本研究发现,同 KLDS1.9201 相比突变菌株 KLDS1.9201-1 和 KLDS1.9201-4 的生长速率和产酸能力显著降低,Ongol 等也在研究中发现了同样现象^[8]。由于德氏乳杆菌保加利亚亚种不能进行有氧呼吸作用,也就不能进行氧化磷酸化,因此生成 ATP 所需要的高能磷酸键主要由底物磷酸化提供。在本实验中,突变菌株降低的葡萄糖代谢率和乳酸产量一致表明它们的底物磷酸化水平的确降低了,从而导致了 ATP 产量的降低,因此正是突变菌株低水平的底物磷酸化导致了它们的低生长速率和弱产酸能力。产酸能力的降低表明 H^+ -ATPase 酶缺陷的突变菌株对酸性环境更敏感,而这一特性有助于减小酸奶在储存过程中的后酸化。当利用突变菌株用于制作酸奶时,pH 降低到 4.2 后突变菌株就不能再继续生长代谢乳糖产酸降低 pH,从而使酸奶产品中的酸度维持在理想水平。因此,突变菌株 KLDS1.9201-1 和 KLDS1.9201-4 可用来制作弱后酸化酸奶发酵剂。

参考文献

- [1] 徐成勇,吴昊,郑思聪,等. 酸乳后酸化影响因子的初步研究. 食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*) 2006, 32(12):10-14.
- [2] Robert WH, Nancy LN. pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(8):2354-2365.
- [3] 凌代文等. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京:中国轻工业出版社, 1999.
- [4] Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组译. 北京:科学出版社, 1984.
- [5] Giorgio G. An evaluation of chelex based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 2000, 42:175-184.
- [6] Mauro S, Diego M, Silvia C, et al. Development of Genus/Species-Specific PCR Analysis for Identification of *Carnobacterium* Strains. *Current Microbiology*, 2002, 45:24-29.
- [7] Du Plessis HW, Dicks LMT, Pretorius IS. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 91:19-29.

- [8] Ongol MP ,Sawatari Y ,Ebina Y ,et al. Yoghurt Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus H⁺-ATPase-Defective Mutants Exhibits Enhanced Viability of *Bifidobacterium breve* During Storage. *International Journal of Microbiology* 2007 ,116 :358 – 366.
- [9] Nannen NL ,Hutkins RW. Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase Activity in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* ,1991 ,74 :47 – 751.
- [10] Sakamoto K ,Van Veen HW ,Saito H ,et al. Membrane-Bound ATPase Contributes to Hop Resistance of *Lactobacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002 68(11) :5374 – 5378.
- [11] Kanner BI ,Gutnick DL. Use of Neomycin in the Isolation of Mutants Blocked Energy Conservation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* ,1971 ,111 :287 – 289.
- [12] Yokota A ,Amachi S ,Ishii S ,et al. Acid Sensitivity of a Mutant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 with Reduced Membrane-Bound ATPase Activity. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* ,1995 59(10) :2004 – 2007.
- [13] Yamamoto N , Masujima Y , Takano T. Reduction of Membrane-Bound ATPase Activity in a *Lactobacillus helveticus* strain with Slower Growth at Low pH. *FEMS Microbiology Letters* ,1996 ,138 :179 – 184.
- [14] Tourdot-Marechal R , Fortier LC , Guzzo J , et al. Acid Sensitivity of Neomycin-Resistant Mutants of *Oenococcus oeni* : a Relationship Between Reduction of ATPase Activity and Lack of Malolactic Activity. *FEMS Microbiology Letters* ,1999 ,178 :319 – 326.
- [15] Ueno YK ,Hayakawa S ,Takahashi ,et al. Purification and Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* ,1997 61 :1168 – 1171.
- [16] Lana S ,Tom M ,Birgitte BB ,et al. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Employ Different Strategies to Cope with Acid Stress. *International Journal of Food Microbiology* 2006 ,110 :1 – 7.

Screening of H⁺-ATPase deficient mutant of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Fei Liu ,Peng Du ,Yutang Wang ,Fang Liu ,Guicheng Huo *

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

Abstract [Objective] We identified a neomycin-resistant mutant with reduced membrane-bound H⁺-ATPase activity from *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* originated from the traditional dairy product to develop a yoghurt starter culture with low post-acidification capacity. **[Methods]** API 50 CH identification system and 16s rDNA sequence analysis were applied to identify the strain isolated from the indigenous yoghurt. Neomycin was used to screen spontaneous neomycin-resistant mutants. H⁺-ATPase activity and metabolic dynamics were evaluated between the parent strain and mutants. **[Results]** One strain was identified as *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by API 50 CH identification system and 16s rDNA sequence analysis ,coded as KLDS 1.9201. Two mutant strains were mutated from KLDS 1.9201 and coded as KLDS 1.9201-1 ,KLDS 1.9201-4. Compared with the parent strain ,the H⁺-ATPase activity of the mutants KLDS 1.9201-1 and KLDS 1.9201-4 decreased by 46% and 60% respectively. After cultured in MRS broth for 24 h ,metabolic efficiency of the initial glucose for the parent strain was 65% ,the mutants were 41% and 31% ,the lactic acid concentration in the culture for the parent strain was 26 g/L ,the mutants were 18 g/L and 15 g/L respectively. The cell density of the mutants was lower than that of the parent strain. **[Conclusion]** The mutants of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with reduced membrane-bound H⁺-ATPase activity had low growth and acid production ,which could be applied to develop yoghurt starter culture with lower post-acidification.

Keywords : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ; H⁺-ATPase ; mutant ; post-acidification

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China(2006AA102344) ,the Scientific Research Fund of Heilongjiang Provincial Education Department (11531027) and the R&D Infrastructure and Facility Development of the Ministry of Science and Technology of China (2005DKA21204-08)

* Corresponding author. Tel : + 86-451-55191807 ; Fax : + 86-451-55190340 ; E-mail : gchuo@vip.0451.com

Received 23 July 2008/Revised 3 September 2008