

乳酸菌风味代谢物质的基因调控

韩希妍¹ 孙大庆¹ 相 丽¹ 霍贵成¹ 姜毓君^{1,2*}

(¹ 乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

(² 国家乳业工程技术研究中心 哈尔滨 150086)

摘 要 乳酸菌的主要风味代谢物质包括丁二酮、乙醛以及各种氨基酸。利用基因工程和代谢工程的相关技术提高乙醛和丁二酮产量,是当前乳酸菌研究的热点之一。乙醛的代谢调控主要是针对丝氨酸羟甲基转移酶的表达进行调控,或是针对丙酮酸脱羧酶和 NADH 氧化酶的表达采用联合调控策略;而丁二酮的代谢调控则主要集中于乳酸脱氢酶、NADH 氧化酶、 α -乙酰乳酸合成酶和 α -乙酰乳酸脱羧酶中任意两种关键酶基因间的联合调控,并且存在进行乳酸脱氢酶、 α -乙酰乳酸合成酶和 α -乙酰乳酸脱羧酶 3 种关键酶基因联合调控的可行性。

关键词 乳酸菌;基因调控;乙醛;丁二酮

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)06-1105-05

乳酸菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)是一群能利用可发酵性碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的通称^[1]。除了近年来用作口服疫苗载体之外,也是发酵食品中应用最为广泛的菌种之一^[2]。乳酸菌作为发酵菌种的几个重要指标是:产酸能力、产香能力、蛋白质水解能力、产生带有粘性的胞外多糖能力以及抑菌能力。而产香能力则主要是由风味代谢物质的产量来决定的。

乳酸菌代谢物中与风味有关的物质主要有乙醛、丁二酮、各种氨基酸特别是自然的芳香物质-丙氨酸等^[3]。其中乙醛是酸奶中的主要风味物质,但其不易作为最终产物被积累下来,常被还原为乙醇。能够产生乙醛这种风味物质的乳酸菌通常为嗜热菌,代表菌种为德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)。在产生乙醛的同时,也伴有丙酮和丁二酮的生成,但这两种物质的浓度是非常低的,而丁二酮与发酵稀奶油和发酵黄油等乳制品的风味形成有密切的关系。一些乳酸菌可以利用柠檬酸生成丁二酮,这些乳酸菌为嗜温菌,包括乳酸乳球菌丁二酮亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *biovar diacetylactis*)和明串珠菌肠膜亚种(*Leuconostoc mesenteroides*)。但这些菌种发酵柠檬酸的产物中丁二酮的产量很低^[4];游离氨基酸也可增强干酪的基本风味,其含量则取决于菌种蛋白酶的活性^[5]。

由于目前应用的乳酸菌基本上是野生菌株,其产生风味物质的水平远远达不到消费者的要求。所以,近年来许多学者希望利用遗传修饰等生物工程技术来改良现有的发酵菌种和挖掘新的发酵菌种,从而选育出产香能力强的菌种来满

足消费者的需要,也能带来更好的经济效益和社会效益。乳酸菌通常可以通过以下三种途径来增强乳制品的风味:一是通过提高酸度和降低氧化还原电位为乳中酶促和非酶促反应的发生提供适宜的条件,国外的一些学者曾利用这种策略对风味代谢物质进行了调控,如 Neves 等^[6]通过不同的氧气含量来调节 NADH 氧化酶的活性;二是通过乳糖代谢和柠檬酸代谢直接产生风味物质,目前大多数的外国学者是通过这种调控策略来实现风味代谢物质产量的增加,国内学者则涉猎不多;最后是通过分解乳蛋白质或乳脂肪产生肽、氨基酸和挥发性成分,此种途径是国内学者进行风味物质调控的主要手段。

1 乙醛的基因调控

乙醛是酸奶中主要的芳香物质。在酸奶发酵过程中,乙醛可由丙酮酸脱羧酶或丙酮酸氧化酶催化直接产生,也可先由丙酮酸脱氢酶催化生成中间产物乙酰辅酶 A 间接的产生^[7]。此外,乙醛还可由脱氧核糖醛缩酶催化胸腺嘧啶分解生成乙醛和 3-磷酸甘油醛,也有几种氨基酸可先转化成中间代谢产物丙酮酸而最终生成乙醛,其中苏氨酸就可直接分解生成甘氨酸和乙醛。研究发现上述多条乙醛合成代谢途径可同时发挥作用,但是目前尚不清楚哪一种合成乙醛的主要途径^[8]。保加利亚杆菌和嗜热链球菌都能够产生乙醛,以前学者认为保加利亚杆菌由于没有乙醛还原酶,从而可以使乙醛积累下来而不被还原为乙醇,故相较于嗜热链球菌具有更高的产乙醛能力,而现在一些学者则持有相反的观点^[9],并已开始对嗜热链球菌进行基因遗传修饰改造,使嗜热链球

基金项目:中国博士后科学基金项目(20060400803);黑龙江省科技攻关重大项目(GA06CI01-08);黑龙江省高校青年学术骨干项目(1151G006)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@neau.edu.cn

作者简介:韩希妍(1983-),女,黑龙江人,硕士研究生,主要研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: hanxian_0_0@163.com

收稿日期:2007-02-28;接受日期:2007-04-30;修回日期:2007-07-24

菌乙醛产量有了大幅的提高。

1.1 利用 *glyA* 基因对乙醛产量的调控

酸奶工业常用菌株—嗜热链球菌中含有 *glyA* 基因,它可编码丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT),因 SHMT 具有苏氨酸醛缩酶(TA)活性,故 SHMT 可催化苏氨酸分解为甘氨酸和乙醛。

Chaves 等^[10]先通过含有 L-苏氨酸的培养基筛选出能够产生乙醛的野生型嗜热链球菌,再利用此种菌株,通过基因敲除技术来构建 *glyA* 基因缺失的突变株;另一方面将 *glyA* 基因克隆到受强启动子控制的载体 pNZ276 中,再转入菌株中来获得 *glyA* 基因的过表达菌株。实验的结果表明 *glyA* 基因缺陷菌株的生长速度和产酸能力较其亲本均有大幅度的下降,而 TA 活性几乎完全丧失,乙醛的产量达不到检测限;而 *glyA* 基因过表达菌株的生长速率和产酸能力与其亲本基本相同,乙醛的产量和 TA 活性较其亲本却分别增加了 86% 和 65%。

由此可见,通过调节嗜热链球菌在发酵酸奶过程中产生乙醛的关键酶—苏氨酸醛缩酶的活性,可以大大提高风味物质乙醛的产量。同时发现通过这种调控手段还可增加叶酸的产量,而叶酸是保加利亚乳杆菌生长所必需的因子^[6]。

在前一实验的基础上,Chaves 等^[11]又对能够过表达 *glyA* 基因的嗜热链球菌的生长特性、乙醛产量做了进一步研究,同时就过表达 *glyA* 基因能够提高叶酸产量这一现象作了更为细致的分析。他们发现过表达 *glyA* 基因的嗜热链球菌必需有酪蛋白的增补才能和野生菌株有相同的生长速率和最终 pH 值,且酪蛋白的增补还可提高过表达 *glyA* 基因菌株的乙醛产量。

1.2 联合使用 *pdc* 和 *nox* 基因的过表达来调控乙醛的产量

pdc 基因编码丙酮酸脱羧酶(Pdc),该基因的过表达可以使大量的丙酮酸脱羧生成乙醛,这种基因常存在于可动性发酵单胞菌属(*Zymononas mobilis*)中,常用于构建产乙醇工程菌株^[12]。

Liu 等^[13]进行了 *pdc* 基因的单一调控,他们首先将 *Zymobacter palmae* 中的 *pdc* 基因克隆到一个穿梭质粒 pAK80 中,再将该质粒转入乳酸乳球菌中,由于 *pdc* 基因受强启动子控制,故可在乳酸乳球菌中过表达。其结果表明能够过表达 *pdc* 基因的乳酸乳球菌的乙醛产量为 1.37 ± 0.32 mmol/L,而乙醇产量却为 16.09 ± 0.00 mmol/L。由此可见 *pdc* 基因的单一调控无法大幅度提高乙醛的产量。

Bongers 等^[14]则进一步将来源于可动性发酵单胞菌属的丙酮酸脱羧酶基因和来源于乳酸乳球菌的 NADH 氧化酶基因在嗜热链球菌中由 *nisin* 控制进行过表达,来实现葡萄糖到乙醛的有效转化。由于 *nox* 基因编码的 NADH 氧化酶(Nox)可使 NADH 转化为 NAD⁺,过表达此基因可以消耗大量的 NADH,进而可有效地阻止乙醛向乙醇的转化,进而大大提高乙醛的产量。其具体操作是通过 PCR 扩增获得 *pdc* 基因和 *nox* 基因,然后再分别克隆到质粒 pNZ8048 和 pNZ8020 中得到了含有 *pdc* 基因的质粒 pNZ7300 和含有 *nox* 基因的质粒

pNZ7301,并利用限制性内切酶对 pNZ7300 和 pNZ7301 进行酶切,随后将来自 pNZ7301 的 *nox* 基因克隆到缺失一段基因的 pNZ7300 中,获得了既具有 *nox* 基因又含有 *pdc* 基因的质粒 pNZ7302。最后将上述 3 个质粒分别转入 NZ9000 乳球菌中,于 M17 肉汤培养基 30℃ 过夜培养。

结果表明,可以过表达 Pdc 和 Nox 的野生型菌株能够以很高的葡萄糖利用效率(大约为 50%),将葡萄糖转化为乙醛。由于发酵过程中产生的乙醛最高浓度已经达到了 21.3 mmol/L,远远高于嗜热链球菌对乙醛的最大耐受浓度(9 mmol/L),所以他们采用了两步发酵法,即将生长阶段和上述两种酶的过表达阶段相分离。

2 丁二酮的基因调控

风味物质丁二酮是特定乳酸菌(例如乳酸乳球菌丁二酮亚种)发酵柠檬酸盐的终产物之一。由于柠檬酸在牛乳中的含量很低,进而导致在乳制品中丁二酮产量也相应较低,故许多学者考虑利用基因工程的方法使菌种能够通过糖代谢途径来增加丁二酮产量。丁二酮是由代谢中间产物 α -乙酰乳酸经氧化脱羧产生的,同时 α -乙酰乳酸还可被 α -乙酰乳酸脱羧酶(Ald)催化或经非氧化脱羧生成乙偶姻。而 α -乙酰乳酸则是由两分子的丙酮酸在 α -乙酰乳酸合成酶(Als)的催化下生成的,也有人认为丁二酮是乙酰辅酶 A 和活性乙醛在丁二酮合成酶的催化作用下形成的产物,但此酶从未被检测到^[15]。

在丁二酮代谢途径中涉及到的关键酶有 α -乙酰乳酸合成酶(*als* 或 *ilvBN* 基因编码),乳酸脱氢酶(*ldh* 基因编码), α -乙酰乳酸脱羧酶(*ald* 基因编码)以及辅助酶 NADH 氧化酶(*nox* 基因编码)。已有很多学者就前 3 种酶进行了单一调控,其结果如表 1 所示。

表 1 产丁二酮菌株的单一基因调控

Table 1 Simple gene regulation of strains produced butanedione	
Ways of gene regulation	Production of butanedione
Construction the <i>Ldh</i> ⁻ strain	The production of butanedione has no apparent increase, but the production of α -acetolactate increases 50% ^[16]
Screening wild type <i>Ald</i> ⁻ strain by leucine selective culture	0.84 mmol/L ^[17]
Over-expression the gene of <i>ilvBN</i>	0.1 mmol/L ^[18] (aerobic condition)

由于野生型乳酸乳球菌丁二酮亚种的丁二酮产量在 0.04 mmol/L 左右,而以它作为评价标准则不难发现表中除了 *Ald*⁻ 菌株外,其他单一调控中的丁二酮产量均没有明显的提高,故现在已有许多外国研究者进行了上述几种基因的联合调控试验。

2.1 *ldh* 基因和 *ald* 基因的联合调控

由于 *ldh* 基因编码的乳酸脱氢酶(Ldh)与 *als* 基因编码的 α -乙酰乳酸合成酶(Als)都能利用丙酮酸,而 Als 对丙酮酸的亲和力与 Ldh 相比要小,故在没有过剩的丙酮酸积累时,大量的丙酮酸将会生成乳酸而非 α -乙酰乳酸^[19],故应失活

ldh 基因,可使丙酮酸更多的生成 α -乙酰乳酸。而 *ald* 基因的失活则可使大量的 α -乙酰乳酸生成有益风味物质丁二酮而不是乙偶姻。综上所述,此种调控策略既能增加 α -乙酰乳酸得生成量又能减小 α -乙酰乳酸转化为乙偶姻的损失,故其在理论上是最为有效的。

但近些年 Monnet 等^[20]的研究表明构建一个同时缺失 Ald 和 Ldh 活性的菌株是不太可能的。他们进而转向筛选具有较低 Ldh 活性的 Ald⁻ 菌株。首先利用 NTG 的诱变作用在琼脂平板上从乳酸乳球菌丁二酮亚种中筛选出一些 Ald⁻ 菌株,再将上述菌株接种于 LDHA-20 琼脂培养基中,30℃ 有氧条件下培养两天,再将筛选出的褐色菌落,于不含柠檬酸的 MRS 培养基中培养,并检测褐色菌落产 α -乙酰乳酸的能力,从中筛选出具有较低 Ldh 活性的菌株。这些菌株产丁二酮能力有所差异,最高产量为 0.6mmol/L。而与通过 NTG 诱变筛选 Ald⁻ 菌株的单一调控策略相比,丁二酮产量有了明显的增加,但 Ldh 活性的部分残留,使得丁二酮的产量仍不理想,需做进一步的改进和优化。

2.2 *nox* 基因和 *ald* 基因的联合调控

由 *nox* 基因编码的 NADH 氧化酶(Nox)在有氧条件下能够催化 NADH 向 NAD⁺ 的转化,从而可以有效的控制丙酮酸的代谢途径^[20],使其更多的流向不依赖 NADH 的代谢途径,进而生成大量的 α -乙酰乳酸,同时也可有效的抑制依赖 NADH 的丁二酮还原酶的活性,有利于丁二酮的积累。另有实验表明柠檬酸也可抑制丁二酮还原酶的形成,使丁二酮不能还原成乙偶姻^[21]。因为 Ldh 是一种依赖于 NADH 的酶,所以过表达 *nox* 基因和缺失 *ldh* 基因在提高丁二酮产量中的作用是相似的^[22],故通过过表达 *nox* 基因在理论上可以弥补上一策略存在的不足。

基于此种想法,Hughenoltz 等^[21]敲除菌株 MG1363 中的 *ald* 基因以获得 Ald⁻ 菌株;再同时用嗜热链球菌中严格受 nisA 控制的 *nox* 基因构建成质粒 pNZ2600,最后将质粒 pNZ2600 转入到 Ald⁻ 菌株中,得到目标菌株。将目标菌株接种到 2ng/L nisin 的 GM17 培养基中,有氧条件下过夜培养,结果显示丁二酮的产量为 1.6mmol/L,是目前通过各种基因调控策略所得到结果中最为理想的,且由于 NICE(the nisin controlled expression system)体系已经很成熟,应用性也比较好,故这种调控手段会比较容易推广应用。^[23]

2.3 *als* 基因和 *ald* 基因的联合调控

以上两种调控策略均是通过抑制丙酮酸其它代谢途径中关键酶的方式,使丙酮酸流入到 α -乙酰乳酸合成途径,来增加 α -乙酰乳酸的含量。此外,也可通过 *als* 基因的过表达来增加 α -乙酰乳酸的产量。*als* 基因编码 α -乙酰乳酸合成酶,可以增加丙酮酸向 α -乙酰乳酸的转化量,再通过 *ald* 基因的敲除来切断 α -乙酰乳酸向乙偶姻的转化途径,同时在有氧条件下培养,会有有效的增加丁二酮的产量。

按此调控策略 Swindell 等^[24]构建了一株既过表达 *als* 基因又缺失 *ald* 基因的菌株。他们采用正常条件下既不发酵柠檬酸,也不产生丁二酮的野生型乳酸乳球菌 MG1363,敲除

其 *ald* 基因。由于此 Ald⁻ 菌株不能在亮氨酸的变构激活作用下催化 α -乙酰乳酸生成乙偶姻,而是生成了亮氨酸和缬氨酸,从而使其在不含缬氨酸而只含有亮氨酸的培养基上也能生长。故可采用亮氨酸选择培养基来筛选 Ald⁻ 菌株,最后将能够过表达 *als* 基因的质粒转入筛选得到的 Ald⁻ 菌株中,获得目标菌株。经检测,其丁二酮的产量为 0.53mmol/L,这一结果相较于野生乳酸乳球菌丁二酮亚种丁二酮产量有了近十倍的提高,但过表达 *als* 基因仍不能从 Ldh 处竞争到大量的丙酮酸从而导致最终丁二酮产量的不理想,但若在此同时削弱 Ldh 的活性,相信可以有效的改变丙酮酸的流向,使丁二酮的产量有更为明显的增加。

2.4 *als* 基因、*ldh* 基因和 *ald* 基因的联合调控可行性探讨

上面论述中曾提到无法构造一株同时缺失 *ald* 基因和 *ldh* 基因的菌株,虽然 Monnet 等^[20]已成功筛选出一株有较低 *ldh* 活性的 Ald⁻ 菌株,但其丁二酮的产量并不理想,故可以通过过表达 *als* 基因的方法,来对抗残存的 Ldh 的活性。因为 Swindell 等^[24]已成功构建了一株过表达 *als* 基因的 Ald⁻ 菌株,证明这两种基因的联合调控是可以实现的;而 Platteuw 等从不能利用柠檬酸盐的乳酸菌 MG1363 中提取 *als* 基因,然后将含有 *als* 基因的质粒转入乳酸乳球菌中,并在不同的生理条件下进行该基因的诱导表达,再敲除 *ldh* 基因成功构建了一株过表达 *als* 基因的 Ldh⁻ 菌株。由此可见,联合上述 3 个基因同时调控的策略是可行的,并具有重要的研究意义和很大的实际应用价值。基于上述考虑,本实验室对三基因的联合调控进行探索。目前,正在根据此种调节策略,对丁二酮的代谢过程进行三基因联合调控,并取得了初步结果^[25]。希望以本实验室保存的可利用柠檬酸的菌株为基础,通过 NTG 琼脂平板来筛选 Ald⁻ 菌株,再通过随机诱变筛选具有较低 Ldh 活性菌株,最后将 *als* 基因的质粒转化到该菌株中,以此实现这 3 个基因联合调控的目标。其中克隆自大肠埃希杆菌(*Escherichia coli*) 的 *als* 基因的表达可有效抑制乙偶姻生成,使其产量处于很低的水平。

3 结束语

对乳酸菌发酵过程中产生风味物质的相关研究是当前美国和欧洲乳酸菌研究领域的一大热点。上述乙醛的基因调控表明嗜热链球菌经过遗传修饰后,可以具有与保加利亚乳杆菌相同的甚至更高的产乙醛能力,且调控后的乙醛产量能够赋予酸奶制品更好的风味,而在丁二酮的二基因联合调控策略中构建的高产菌株,其丁二酮产量相较于野生型产丁二酮菌株都有 10 倍以上的提高,并且它们的生长条件及其生长状态都没有发生变化。此外具有更大潜力的三基因联合调控策略的可行性在上文中已得到了充分论述。相信随着分子生物技术的飞速发展,在不久的将来,一定可以构建出具有更强产香能力的食品级乳酸菌菌株,给人类带来巨大的经济效益。

值得注意的是,有关转基因食品的安全性问题越来越受到人们的关注。在食品级基因修饰菌的定义中,对涉及食品

安全的标记基因、目的基因、表达载体和宿主菌均有明确的规定^[26]。因此我们在乳酸菌风味代谢物质的基因调控研究中,应该严格遵守有关规定,以确保遗传修饰菌株的安全性。相信随着科学技术的发展和人们观念的变化,通过基因调控得到的能够产生更多良好风味代谢物质的食品级乳酸菌,会被越来越多的人所认识和接受。

参 考 文 献

- [1] 凌代文,东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 第一版. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [2] 史 达,宋 岩,李一经. 乳酸乳球菌作为黏膜免疫活载体疫苗传递抗原的研究进展. 微生物学报,2006,4(46):680 – 683.
- [3] de Vos WM, Hugenholtz J. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other *Lactic acid bacteria*. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22:72 – 79.
- [4] Neves AR, Wietske AP, Kok J, et al. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*-The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29:531 – 554.
- [5] Smit G, Smit BA, Engel WJM. Flavour formation by *lactic acid bacteria* and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29:591 – 610.
- [6] Neves AR, Ramos A, Costa H, et al. Effect of different NADH oxidase levels on glucose metabolism by *Lactococcus lactis*: kinetics of intracellular metabolite pools determined by in vivo nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12):6332 – 6342.
- [7] Hugenholtz J, Sybesma W, Nierop-Groot M, et al. Metabolic engineering of *Lactic acid bacteria* for the production of nutraceuticals. *Antonie Leeuwenhoek*, 2002, 82:217 – 235.
- [8] Hols P, Hancy F, Fontaine L, et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29:435 – 463.
- [9] Ott A, Fay LB, Chaintreau A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *J Agric Food Chem*, 1997, 45:850 – 858.
- [10] Chaves ACS, Fernandez M, Lerayer ALS, et al. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 11:5656 – 5662.
- [11] Chaves ACS, Ruas-Madiedo P, Starrenburg M, et al. Impact of engineered *Streptococcus thermophilus* strains over expressing *glyA* gene on folic acid and acetaldehyde production in fermented Milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, 34:114 – 117.
- [12] 王凡强,许 平. 产乙醇工程菌研究进展. 微生物学报, 2006, 46(4):673 – 675.
- [13] Liu S, Dien BS, Cotta MA. Functional expression of bacterial *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis*. *Current Microbiology*, 2005, 50:324 – 328.
- [14] Bongers RS, Hoefnagel MHN, Kleerebezem M. High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 2:1109 – 1113.
- [15] 杨丽杰,王俊沪. 乳酸乳球菌中丁二酮代谢支路的调控. 中国乳品工业,2004,32(5):24 – 29.
- [16] Goupil N, Corthier G, Ehrlich SD, et al. Imbalance of Leucine Flux in *Lactococcus lactis* and Its Use for the Isolation of Diacetyl-Overproducing Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 7(62):2636 – 2640.
- [17] Benson KH, Godon JJ, Renault P, et al. Effect of *ilvBN*-encoded α -acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl microbial Biotechnol*, 1996, 45:107 – 111.
- [18] Goupil-Feuillat N, Corthier G, Godon JJ, et al. Transcriptional and translational regulation of α -acetolactate decarboxylase of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(9):5399 – 5408.
- [19] Monnet C, Aymes F, Corrieu G. Diacetyl and α -acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* Mutants that are deficient in α -acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12):5518 – 5520.
- [20] Neves AR, Ramos A, Costa H, et al. Effect of different NADH oxidase levels on glucose metabolism by *Lactococcus lactis*: kinetics of intracellular metabolite pools determined by in vivo nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12):6332 – 6342.
- [21] Hugenholtz J, Kleerebezem M, Starrenburg M, et al. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9):4112 – 4114.
- [22] Neves AR, Ventura R, Mansour N, et al. *Lactococcus lactis* primarily controlled by the redox charge? *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(31):28088 – 28098.
- [23] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68:705 – 717.
- [24] Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, et al. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7):2641 – 2643.
- [25] 相 丽,刘 伟,范丽平,等. 应用于乳酸菌的非抗生素抗性选择标记系统. 中国生物化学与分子生物学报,2007, 23(1):1 – 7.
- [26] 张振中,贾士芳,还连栋,等. 乳酸菌食品级基因表达系统. 生物工程学报,2002, 18(4):516 – 520.

Gene regulation to lactic acid bacteria for increasing production of flavor metabolite

HAN Xi-yan¹, SUN Da-qing¹, XIANG Li¹, HUO Gui-cheng¹, JIANG Yu-jun^{1,2*}

(¹ Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(² National Research Center of Dairy Engineering and Technology, Harbin 150086, China)

Abstract: The major flavor substances Lactic acid bacteria produced include the buttermilk aroma butanedione, the yoghurt flavor acetaldehyde and the amino acid. Metabolic engineering in LAB had focused primarily on rerouting of pyruvate metabolism towards butanedione or acetaldehyde to improve the flavor of fermented milk, which has considerable economic value. The typical yogurt flavor is caused by acetaldehyde produced through many different pathways. The attention was focused on one specific reaction for acetaldehyde formation catalyzed by serine hydroxymethyltransferase, which encoded by the glyA gene. In addition, the efficient conversion of glucose into acetaldehyde was achieved by over-expression of pyruvate decarboxylase and NADH oxidase in LAB. The concentration of acetaldehyde derived from this regulation is higher than the other strategy. As for the regulation of butanedione, it was focused on combining inactivation of α -acetolactate decarboxylase with low lactate dehydrogenase activity, or with overproduction of NADH-oxidase, or with overproduction of α -acetolactate synthase. Then the possibility of co-regulation with certain three kinds of enzyme above was recommended.

Keywords: lactic acid bacteria; gene regulation; acetaldehyde; butanedione

Foundation item: China Postdoctoral Science Foundation (20060400803); Major Program of Science and Technique Foundation of Heilongjiang Province (GA06C101-08); Young Academic Leader Project of Heilongjiang Province (1151G006)

* Corresponding author: Tel/Fax: 86-451-55191842; E-mail: yujun-jiang@neau.edu.cn

Received: 28 February 2007/Accepted: 30 April 2007/Revised: 24 July 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>