

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :440 - 447; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140401

Pfk 基因过表达对乳酸乳球菌 N8 产 nisin 速率的影响

朱多龙, 赵凯, 徐海津, 白艳玲, 张秀明, 乔明强*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 【目的】通过基因工程手段增加糖酵解途径中编码限速酶 6-磷酸果糖激酶基因 *Pfk* 在乳酸链球菌素 (nisin) 产生菌 *Lactococcus lactis* N8 中的表达, 增快 nisin 的产生, 从而提高单位时间内 nisin 的产量, 缩短发酵周期。【方法】将 *pfk* 基因及编码以 cAMP 为依赖的蛋白激酶催化亚基基因 *pkaC* 克隆到表达质粒 pMG36e 上, 将共表达重组质粒转入 *L. lactis* N8 中, 使 *Pfk-pkaC* 基因过量表达, 得到重组菌株 *L. lactis* N8-pMG36e-pfk-pkaC, 并比较该重组菌株与野生菌的生长曲线、胞内 6-磷酸果糖激酶活性、发酵上清液的抑菌活性及效价, 并从转录水平分析两株菌 *nisA* 及 *pfk-pkaC* 的转录差异, 比较野生菌与重组菌在不同葡萄糖含量下培养产 nisin 的变化。【结果】*Pfk* 基因与 *pkaC* 基因的过表达对重组菌的生长速度没有明显的影响, 却能提高重组菌产 nisin 的速度, 在发酵 10 h 时 nisin 的产量比野生菌提高了 20%, 使得发酵周期缩短近 2 h。野生菌及重组菌在不同葡萄糖含量下培养发酵上清液的 nisin 效价没有明显的变化。【结论】糖酵解途径中 6-磷酸果糖激酶基因 *Pfk* 的过表达可以加快乳酸乳球菌 N8 产 nisin 的速率, 缩短发酵周期。

关键词: 乳酸乳球菌, 乳酸链球菌素 (nisin), 6-磷酸果糖激酶, 抑菌活性, 效价

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0440-08

乳酸链球菌素 (简称 nisin) 是一种主要由乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 和乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) 等一些菌株产生的一种具有抗菌活性的细菌素。鉴于其对革兰氏阳性菌, 包括易造成食品严重腐败的多种菌类具有强烈的抑制作用, 并且食用后对人体完全无害的特性, nisin 已成为当前应用最为广泛的生物类食品防腐剂^[1]。

随着全球对 nisin 需求量的日益增加, 关于 nisin 产量及发酵周期的研究已引起人们越来越多的关注^[2-3]。目前人们主要研究的对象都集中在如何提高不同菌株 nisin 的最终发酵产量, 大多并未考虑在

发酵产量相同的条件下缩短发酵时间。本实验室目前的一部份工作着重于以 nisin Z 产生菌 *Lactococcus lactis* N8 为出发菌株, 提高其单位时间内 nisin 的产出。在 *L. lactis* N8 中与 nisin Z 生物合成及调控相关的基因共有 11 个, 这些基因成簇排列在一个约 70 kb 的转座子上即 *nisA/ZBTCIPRKFE*G。在这些基因的产物中, NisBC 负责 nisin 的翻译后修饰, NisT 负责前体 nisin 的转运, NisP 负责前导肽的切割和成熟 nisin 的释放, NisI 和 NisFEG 负责生产菌株的自身免疫耐受性。同时, 由于 nisin 是自体诱导表达产生, 其成熟的 nisin 分子作为信号分子刺激双组分系统 NisRK 中的传感激酶 NisK, 进一步使得应答调节

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970095)

* 通信作者。Tel: +86-22-23503340; E-mail: mingqiangqiao@alipay.com

作者简介: 朱多龙 (1989 -), 男 (回), 安徽六安人, 博士研究生, 主要从事乳酸菌抗菌肽相关研究。E-mail: zhuduolong@163.com

收稿日期: 2014-08-13; 修回日期: 2014-11-11

子 NisR 自体磷酸化并激活 *nisA* 和 *nisF* 启动子启动转录, 整个基因簇转录表达最终大量产生 nisin 分子^[4-5]。

在糖酵解途径中 *Pfk* 基因^[6] 编码 6-磷酸果糖激酶, 该酶是糖酵解中的一个限速酶。已有文献报道 *pfk* 基因对糖酵解的速度有很大的影响, 过表达 *pfk* 基因可以使 6-磷酸果糖激酶活力提高两倍 (从 7.1 U/OD₆₀₀ 增到 14.5 U/OD₆₀₀), 细胞对葡萄糖的摄取也相应成比例的得到了提高 (从 0.8 μmol/L·s⁻¹·g·CDW⁻¹ 增到 1.7 μmol/L·s⁻¹·g·CDW⁻¹)^[7]。通过提高该酶的表达水平能够加快糖酵解的速度, 从而提高蛋白的合成速度。*pkaC* 基因^[6-7] 编码以 cAMP 为依赖的蛋白激酶的催化亚基, 其可以辅助 *pfk* 基因更好的行使功能。我们研究了在 N8 菌株中共表达 *pfk* 与 *pkaC* 基因后其生长的状况, 比较了不同时间段 nisin 产量及胞内 6-磷酸果糖激酶活性的变化, 并在转录水平上分析了其 *nisA* 转录量与野生菌株的区别。同时我们比较了不同葡萄糖浓度下野生菌及重组菌产 nisin 的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) N8、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) A1 NCIMB86166、质粒 pMG36e 由本实验室保存。

1.1.2 培养基及培养条件: (1) *L. lactis*: SGM17 培养基, 30℃ 静置培养^[8]; (2) *E. coli*: LB 培养基, 37℃ 震荡培养^[9]; (3) *M. luteus* A1 NCIMB86166: S 培养基, 30℃ 静置培养^[10]。(4) 乳酸菌电转化复苏液: GM17MC (GM17 + 20 mmol/L MgCl₂ + 2 mmol/L CaCl₂)。(5) 在 *E. coli* 中红霉素的使用浓度 150 μg/mL, 在 *L. lactis* 中的使用浓度 5 μg/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器: 实验中所用抗生素购自鼎国科技生物有限公司; 限制性内切酶, DNA marker, 反转录试剂盒及 PCR 荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司; PCR 产物回收试剂盒, T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 质粒快速小提试剂盒, 细菌基因组提取试剂盒及 RNA 快速提取试剂盒购自天根生物科技公司; PFK 测定试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司; Nisin 标准品为 Sigma 公司产品。上海分

析仪器厂的 752 型分光光度计, BioRad MicroPulser (25uF, 200Ω) 电转化仪。NanoDrop 核酸蛋白分析仪, BioRad PCR 仪, BioRAD 荧光定量 PCR 仪。

1.1.4 引物: 本研究所用引物由上海生工生物工程股份有限公司合成 (表 1)。

表 1. 基因克隆及 qRT-PCR 引物

Table 1. The primers of gene cloning and qRT-PCR

Primer	Sequence (5' → 3')
<i>pfk</i> -F	CCCGAGCTCGTATTTTGTATGTATCTCAATT
<i>pfk</i> -R	CCCGTCGACTTAGTAAAGGTTAAGATTGTTGAGT
<i>pkaC</i> -F	CCCCTGCAGATTTCACTGTCCGAAATG
<i>pkaC</i> -R	CCCGGTACCAAAGTTATTTAGAAGCTTAAATT
Q-16S-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
Q-16S-R	TAGGTTACCTGTTACGACTT
Q- <i>nisA</i> -F	CGGCTCTGATTAATTTCTGA
Q- <i>nisA</i> -R	TTGTAATCGCTGGTGATG
Q- <i>pkaC</i> -F	CAAGTACCGTAACTGGAA
Q- <i>pkaC</i> -R	GAAATAGGTGCTGTTGGA

1.2 DNA 操作

1.2.1 DNA 的提取、酶切连接及感受态细胞制备: 大肠杆菌质粒 DNA 的提取按天根公司说明书进行。DNA 纯化及连接反应按 Fermentas 公司的说明书进行。DNA 酶切反应条件按 TaKaRa 公司说明书进行。乳酸菌质粒提取所用方法参照文献 [11]。*E. coli* 感受态细胞的制备及转化采用 CaCl₂ 介导的方法^[12], 乳酸菌感受态细胞制备和电击转化参照文献 [13]。

1.2.2 pMG36e-pfk, pMG36e-pkaC, pMG36e-pfk-pkaC 重组质粒的构建及转化: 以 *L. lactis* N8 基因组为模板, 分别用 *pfk*-F/R 和 *pkaC*-F/R 扩增 *pfk* 及 *pkaC* 基因。反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。使用 *Sac*I 及 *Sal*I 分别酶切质粒 pMG36e 与 *pfk* 基因片段, 使用 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5α 感受态, 并提质粒验证。将 pMG36e 及构建正确的 pMG36e-pfk 质粒和 *pkaC* 基因分别用 *Pst*I 和 *Kpn*I 双酶切, 后分别连接转化 DH5α 感受态, 提质粒验证获得正确的目的质粒 pMG36e-pkaC 和 pMG36e-pfk-pkaC。将构建好的 pMG36e-pfk, pMG36e-pkaC, pMG36e-pfk-pkaC 质粒及空质粒 pMG36e 转入 N8 感受态。2.0 μL (80 ng) 质粒加入 50 μL N8 感受态细胞混匀后加入 0.2 cm 电转化杯, 在 2.4 kV 下电击转化。电击后立即加入 800 μL 电转化复苏液 SGM17MC, 混匀后吸出冰浴 10 min, 然后置于 30℃ 培养箱复苏 1 h, 涂布于含红霉素 5 μg/mL 的 SGM17 培养平板, 得到重组菌 N8-pMG36e-pfk, N8-pMG36e-

pkaC, N8-pMG36e-pfk-pkaC 及 N8-pMG36e。

1.3 重组菌及对照菌株生长曲线的测定

将过夜培养的 N8, N8-pMG36e-pfk, N8-pMG36e-pkaC, N8-pMG36e 和 N8-pMG36e-pfk-pkaC 分别以 1% 的比例转接至新鲜的 SGM17 培养基中, 培养 2 h 后开始取培养液原液测定 OD_{600} , 每隔 2 h 测定 1 次吸光度, 每次重复 3 个平行^[14-15]。

1.4 Nisin 效价标准曲线的制作及发酵液上清效价的测定

1.4.1 检测平板的制作: 在 50 mL 三角瓶中装入 20 mL S 培养基, 灭菌后放入 55℃ 水浴锅中, 加入 400 μ L 50% 的吐温-20 溶液(终浓度为 1%), 并混合均匀, 然后加入 500 μ L 藤黄指示菌($OD_{600} = 0.4$), 倒入外径 90 mm 的塑料培养皿中, 培养皿中事先放入无菌牛津杯, 培养皿需放在已调为水平的玻璃平面上, 待平皿冷却后放入 4℃ 冰箱中静置 2 h, 将平板中的牛津杯取出, 平板备用。

1.4.2 Nisin 标准液的配制和标准曲线的制作: 用万分之一电子天平(AB104-N 电子天平)称取 20 mg 左右的标准品, 溶于酸水中, 配制成终浓度为 1000 IU/mL 标准液, Nisin 效价浓度在 5 - 100 IU/mL, 其对数值与抑菌圈直径呈线性关系^[16], 用无菌的 0.02 mol/L HCl 依次稀释成 10、25、50、75 和 100 IU/mL。在已经打孔的 S 平板的孔内分别加入 5 种浓度的标准溶液 150 μ L(每个浓度分别点 3 个平行孔), 将点样后的平板在超净台中吹干, 然后倒置于 37℃ 温箱中培养 20 h。

1.4.3 重组菌 N8-pMG36e-pfk-pkaC 及野生菌株 N8 不同时间段发酵液上清 nisin 效价的测定: 分别取培养 4、6、8、10、12 和 14 h 的菌液, 用 0.02 mol/L HCl 将菌液分别稀释 100 倍, 12400 \times g 离心 4 min, 取上清液。80℃ 水浴处理 10 min, 在已经打孔的 S 平板的孔内分别加待测样品各 150 μ L(每个浓度分别点 3 个平行孔), 将点样后的平板在超净台中吹干, 然后倒置于 37℃ 温箱中培养 20 h。

1.4.4 测量和计算: 将培养好的平板取出, 用 0.02 mm 的游标卡尺测量抑菌圈直径大小。先以标准样品作出“lg^{效价} - 抑菌圈直径”的标准曲线, 再利用标准曲线分别计算出待测样品的效价。

1.5 实时定量 PCR 检测 nisA 与 pfk-pkaC 基因转录水平

以 16SrRNA 为内参基因(引物 Q-16S-F/R), 检

测 nisA(引物 Q-nisA-F/R) 及 pkaC(引物 Q-pkaC-F/R) 基因的转录。提取 N8 及 N8-pMG36e-pfk-pkaC 总 RNA, 用 NanoDrop 对 RNA 定量, 按照反转录试剂盒说明进行反转, 反转后立即进行荧光定量 PCR。每个基因每个时间段的检测分别设置 3 个平行, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析实验数据。

1.6 野生菌 N8 与重组菌 N8-pMG36e-pfk-pkaC 胞内 6-磷酸果糖激酶酶活的比较

胞内 6-磷酸果糖激酶的测定按照 PFK 测定试剂盒说明书操作。酶活单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1 nmol 6-磷酸果糖和 1 nmol ATP 转化为 1 nmol 1,6-二磷酸果糖和 1 nmol ADP 定义为 1 个酶活单位。

1.7 野生菌 N8 及重组菌 N8-pMG36e-pfk-pkaC 在不同葡萄糖含量下培养产 nisin 的变化

改变 SGM17 培养基中葡萄糖的含量, 分别在 M17 中添加 0.5%, 1.0%, 1.5% 的葡萄糖培养 N8-pMG36e-pfk-pkaC 及 N8, 取培养 10 h 的发酵上清液分别做抑菌实验, 检测抑菌圈的大小, 每组实验做 3 个平行。

2 结果和分析

2.1 重组菌与野生菌 N8 生长曲线的比较

实验结果表明(图 1), 在 12 h 内野生菌 N8 的生长速度快于含有质粒的 4 株重组菌, 其原因可能是由于质粒的引入和外源基因的表达增加了细胞的负担, 从而导致生长速度稍有减慢^[14]。然而与 N8-pMG36e 相比, N8-pMG36e-pfk, N8-pMG36e-pkaC, N8-pMG36e-pfk-pkaC 的生长速度并没有很明显的差异, 说明 pfk, pkaC 及 pfk-pkaC 基因的过表达对 N8 的生长并没有明显的影响。

2.2 野生菌与重组菌发酵液上清抑菌实验的比较

2.2.1 4 株重组菌株与野生菌培养相同时间发酵液上清抑菌效果的比较: 为了排除 pMG36e, pMG36e-pfk 和 pMG36e-pkaC 质粒对 nisin 产生的影响, 分别取培养 10 h 的 4 株重组菌及 N8 发酵上清液做抑菌试验(图 2), 每组实验做 3 个平行(只列出 1 组实验图)。实验结果表明在培养到 10 h 时, 转入 pMG36e 和 pMG36e-pkaC 质粒的菌株与 N8 相比抑菌圈没有明显的区别, 重组菌株 N8-pMG36e-pfk 的抑菌圈略大于野生菌 N8, 而 N8-pMG36e-pfk-pkaC

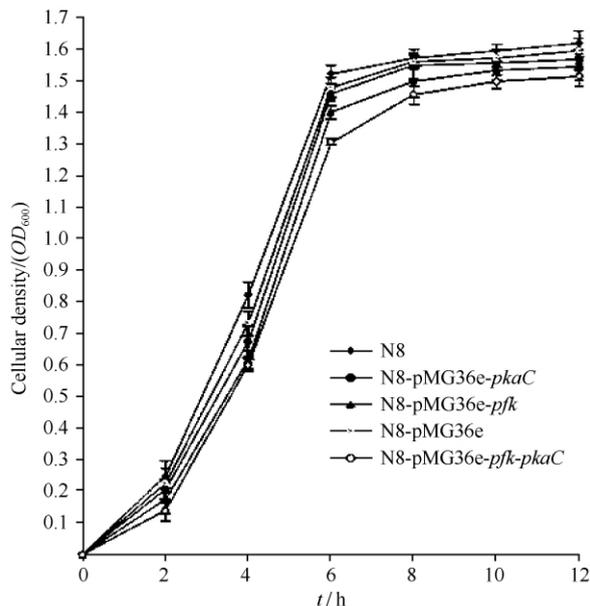


图 1. 野生菌 N8 与重组菌株的生长曲线

Figure 1. Growth curve of wild strain N8 and recombinant strains.

的抑菌圈明显大于野生菌,从而排除了 *pfk* 基因, *pkaC* 基因及空质粒 *pMG36e* 对 N8 产 nisin 的影响。为后续的实验提供基础。

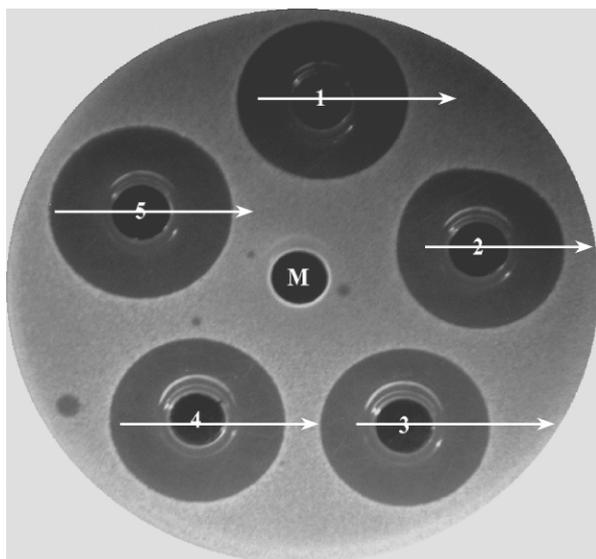


图 2. 重组菌与野生菌培养 10 h 时发酵上清液对藤黄微球菌 A1 NCIMB86166 的抑菌效果

Figure 2. Antibacterial activity of supernatants of wild strain and four recombinant strains against *Micrococcus luteus* A1 NCIMB86166 after fermentation 10 h. M, 0.02 mol/L HCl; 1, N8; 2, N8-pMG36e; 3, N8-pMG36e-pkaC; 4, N8-pMG36e-pfk; 5, N8-pMG36e-pfk-pkaC.

2.2.2 N8 与 N8-pMG36e-pfk-pkaC 不同生长时间

发酵液上清抑菌效果的比较:由 2.2.1 的实验结果知道只有在 *pfk-pkaC* 基因共表达时才会对 N8 的抑菌效果产生明显的影响,在以下的研究中只对野生型菌株 N8 及重组菌株 N8-pMG36e-pfk-pkaC 不同时间段发酵液上清的抑菌活性做比较(图 3)。N8 及 N8-pMG36e-pfk-pkaC 的抑菌圈直径随着培养时间的增加在增大,在 10h 时两者的抑菌圈直径差别达到最大,重组菌大约是野生型菌株的 1.1 倍。随着培养时间的继续增加,两者抑菌圈的差别在逐渐缩小,在菌株生长的中后期重组菌与野生菌的抑菌圈几乎一致。由此可见在 N8 中过表达 *pfk-pkaC* 基因可以加快 nisin 的产生,但并不能增加 nisin 的终产量。

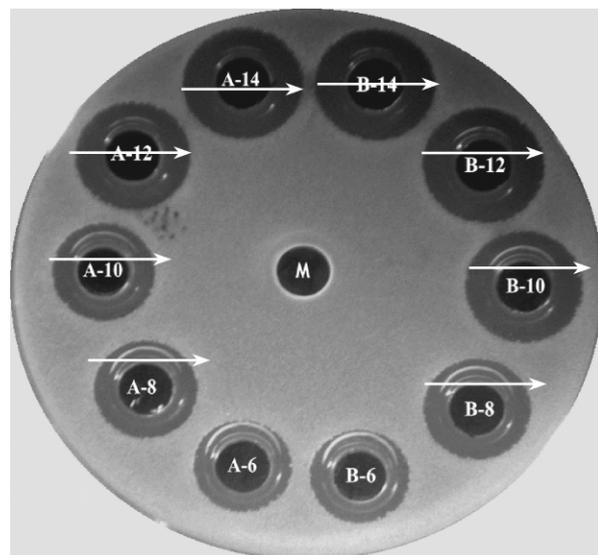


图 3. *png* 重组菌与野生菌培养不同时间发酵上清液稀释 100 倍后的抑菌活性

Figure 3. Antibacterial activity of diluted 100 times supernatants after fermentation for different time. M, 0.02 mol/L HCl; A, N8; B, N8-pMG36e-pfk-pkaC; 6, 8, 10, 12 and 14 are different fermentation time.

2.3 N8-pMG36e-pfk-pkaC 与 N8 不同时间发酵上清液 nisin 效价的比较

用 0.02 mm 的游标卡尺测量抑菌圈直径大小(表 2),通过 nisin 标准曲线(图 4),分别计算出待测样品不同时间段发酵上清液 nisin 的效价(图 5)。由效价图可见随着培养时间的增加,重组菌与野生菌的效价差值越来越大,在 10h 左右达到最大($P = 7.01E-07 < 0.01$, 差异极显著),到 14 h 两者的效价几乎相等($P = 0.05124 > 0.05$, 差异不显著)。这与 2.2.2 的实验结果一致。

表 2. 野生菌及重组菌抑菌圈直径的测定及效价的计算 (N = 3, X ± SD)

Table 2. Inhibition zone and titer of *L. lactis* N8 and *L. lactis* N8-pMG36e-pfk-pkaC

t/h	Wild strain inhibition zone/mm	Titer/(IU/mL)	Recombinant strain inhibition zone (mm)	Titer/(IU/mL)
2	6.68 ± 0.06	124 ± 1.8	6.78 ± 0.08	127 ± 2.9
4	9.76 ± 0.04	260 ± 3.1	10.36 ± 0.10	300 ± 5.5
6	14.44 ± 0.11	800 ± 21.3	15.36 ± 0.08	1000 ± 17.2*
8	16.86 ± 0.12	1430 ± 41.3	17.6 ± 0.06	1710 ± 24.4**
10	19.14 ± 0.12	2480 ± 61.5	20.08 ± 0.05	3100 ± 39.7**
12	19.88 ± 0.10	2960 ± 48.2	20.18 ± 0.07	3178 ± 53.5*
14	20.2 ± 0.08	3200 ± 54.1	20.26 ± 0.04	3243 ± 27.3

* indicates the difference is significant at the 0.05 level between wild strain and recombinant strain; ** indicates the difference is significant at the 0.01 level between wild strain and recombinant strain.

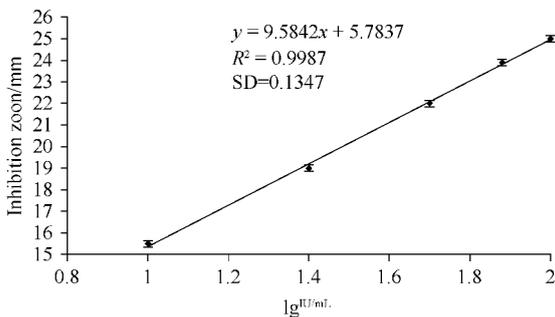


图 4. Nisin 效价检测标准曲线

Figure 4. Standard curve of Nisin titer.

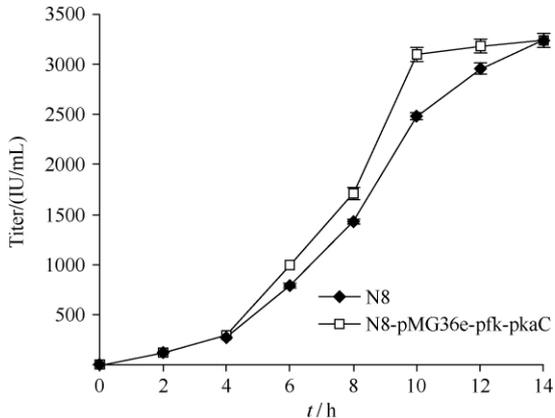


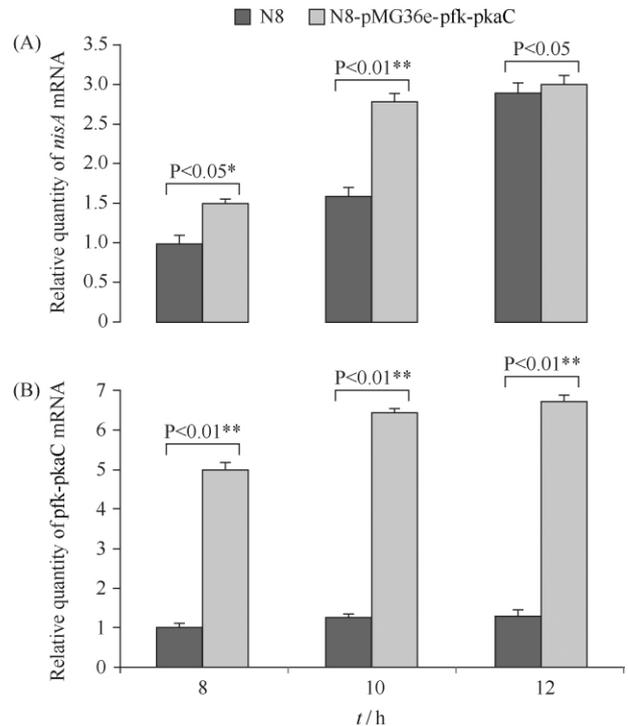
图 5. 野生菌和重组菌在 SGM17 培养基中培养的效价曲线

Figure 5. Titer curve of *L. lactis* N8 and *L. lactis* N8-pMG36e-pfk-pkaC in SGM17 medium.

2.4 N8 与 N8-pMG36e-pfk-pkaC *nisa* 及 *pfk-pkaC* 基因转录水平的比较

通过 qPCR 实验,从分子水平上揭示重组菌与野生菌 *nisa* 及 *pfk-pkaC* 转录水平的区别^[17]。由实验结果可见,在 10 h 时,重组菌 *nisa* 的转录量约是

野生菌的 1.5 倍,在 12 h 时两者的差异变得非常小,*nisa* 的转录水平几乎一致(图 6-A)。野生菌和重组菌在培养 8、10 和 12 h 时,*pfk-pkaC* 基因的转录维持在一个稳定的水平,而重组菌 *pfk-pkaC* 的转录量是野生菌的 6 倍(图 6-B)。

图 6. N8 与 N8-pMG36e-pfk-pkaC 在 8h, 10h, 12 h *nisa* (A) 和 *pfk-pkaC* (B) 转录水平的比较Figure 6. Real-time qPCR analysis of the expression of *nisa* (A) and *pfk-pkaC* (B) at 8h, 10h and 12 h. * indicates the difference is significant at the 0.05 level between wild strain and recombinant strain; ** indicates the difference is significant at the 0.01 level between wild strain and recombinant strain.

2.5 N8 与 N8-pMG36e-pfk-pkaC 胞内 6-磷酸果糖激酶活性的比较

由实验结果(表3),可见 N8 及 N8-pMG36e-pfk-pkaC 在培养到 10 h 时胞内 6-磷酸果糖激酶酶活达到最高,随后维持在一个稳定的水平,而重组菌在 3 个不同时间点的酶活都要显著高于野生菌 N8,说明 *pfk-pkaC* 基因的过表达确实提高了重组菌胞内 6-磷酸果糖激酶酶活。这与 2.4 *pfk* 基因转录水平的分

析一致。

2.6 N8 与 N8-pMG36e-pfk-pkaC 在不同葡萄糖浓度下培养下产 nisin 的比较

由实验结果(表4),我们发现 N8 及 N8-pMG36e-pfk-pkaC 在 3 种不同葡萄糖浓度培养下的效价分别一致,同时重组菌的效价要高于野生菌,与 2.3 实验结果一致。

表 3. 野生菌及重组菌胞内 6-磷酸果糖激酶酶活的比较 (N = 3, X ± SD)

Table 3. The difference of 6-phosphofructokinase activity in wild strain and the recombinant strain

t/h	PFK activity of wild strain (U/10 ⁴ cell)	PFK activity of recombinant strain (U/10 ⁴ cell)	Relative increase of PFK activity /%
8	0.00102 ± 0.00013	0.00201 ± 0.00008*	97.10
10	0.00159 ± 0.00017	0.00258 ± 0.00015*	62.30
12	0.00154 ± 0.00007	0.00247 ± 0.00018*	60.10

* indicates the difference is significant at the 0.05 level between wild strain and recombinant strain; ** indicates the difference is significant at the 0.01 level between wild strain and recombinant strain.

表 4. 不同葡萄糖浓度培养基对野生菌及重组菌产 nisin 的影响 (N = 3, X ± SD)

Table 4. The effects of different concentrations of glucose on production of nisin

c (Glucose) /%	Wild strain inhibition zone / mm	Titer / (IU/mL)	Recombinant strain inhibition zone / mm	Titer / (IU/mL)
0.5	19.08 ± 0.04	2439 ± 24.2	20.08 ± 0.02	3100 ± 10.4
1.0	19.1 ± 0.02	2451 ± 11.1	20.04 ± 0.05	3071 ± 19.3
1.5	19.1 ± 0.03	2451 ± 16.620.06 ± 0.04	3087 ± 30.7	
	P > 0.05		P > 0.05	

P > 0.05 indicates the difference is not significant; P < 0.05 indicates the difference is significant.

3 讨论

本研究通过过表达糖酵解途径中限速酶 6-磷酸果糖激酶提高了 *L. lactis* N8 单位时间内 nisin 的产量。尽管随着菌株中 nisin 量的积累,造成发酵后期重组菌与野生菌发酵水平的差异并不显著,但通过抑菌实验及 *nisA* 的荧光定量 PCR 分析,重组菌 nisin 的产量在菌体生长的稳定期初期(10h)就得以提高并基本达到最大值,比同时间段野生菌提高了 20%,可缩短发酵周期,提高生产效率。由于 *pfk* 基因是糖异生途径中的 1 个限速酶基因,*pfk* 基因的过表达可以提高胞内 6-磷酸果糖激酶酶活,加快乳酸乳球菌 N8 能量的产生,利于蛋白质的快速合成。然而 *pfk* 基因只是 3 个关键酶基因中的 1 个,其过表达并不能完全改变糖异生途径的限速步骤大大提高

nisin 的产生速度。本研究中重组菌并没有明显提高 nisin 的终产量,为了研究是否葡萄糖的含量限制了最终的 nisin 产量,我们分别在 M17 中添加了 0.5%、1.0% 和 1.5% 的葡萄糖去培养 N8-pMG36e-pfk-pkaC 及 N8,实验结果显示野生型菌株及重组菌株在 3 种不同糖含量的 SGM17 培养基中生长,它们的 nisin 终产量维持在相等的水平,这表明 *pfk-pkaC* 基因的共表达并没有提高菌株对葡萄糖的利用。这可能由于乳酸乳球菌是兼性厌氧菌,其对底物葡萄糖的利用率本身就不高,自身对底物利用的限制引起的。我们研究室也正致力于改变 N8 的相关代谢通路,提高其对相关底物的利用率,从而提高 nisin 的终产量。

近年来,随着食品化学添加剂及医用抗生素的大量使用^[18],带来的一些诸如食品安全及临床超级耐药细菌的问题已经引起了人们的广泛关注^[19]。

用高效、无毒的天然抗菌肽取代传统的化学合成防腐剂及相关抗生素的使用是保障人类健康的迫切需要,也是世界潮流发展的大势所趋。为了更好地推动 nisin 的广泛应用,如何进一步提高 nisin 产生菌的发酵效价及产量、降低生产成本等方法措施成为乳链菌肽研究者和生产者面临的重要课题。而本研究通过对 *pfk* 基因的过表达从而增快 nisin 的产出,为发酵周期的优化及生产效率的提高提供了一些新的思路。

参考文献

- [1] Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action, and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65 (3) : 455-476.
- [2] Ma S, An C. Research Progress of Fermentation and Purification Technique of Nisin. *Storage&Process*, 2011, 11 (2) : 45-48. (in Chinese)
马赛箭,安超.乳链菌肽的发酵及分离纯化工艺研究进展.保鲜与加工,2011,11(2):45-48.
- [3] Li R, Xuanyuan Z, Jiang D, Su J, Xu H, Zhang X, Qiao M. Optimization of Fermentation Conditions for Nisin Production by *Lactococcus lactis* N302. *Acta Scientiarum Naturallum* (Universitatis Nakaiensis), 2012, 44 (5) : 101-108. (in Chinese)
李瑞青,轩辕铮铮,姜德洲,苏俊杰,徐海津,张秀明,乔明强. Nisin 生产菌株 *Lactococcus lactis* N302 的发酵优化.南开大学学报(自然科学版),2012,44(5):101-108.
- [4] Papadelli M, Karsioti A, Anastasiou R. Characterization of the gene cluster involved in the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus*. *Fems Microbiology Letters*, 2007, 272 (1) : 75-82.
- [5] Wu ZZ, Xuanyuan ZZ, Li RQ, Jiang DZ, Li C, Xu HJ, Bai YL, Zhang XM, Saris PE, Savilahti H, Qiao MQ. Mu transposition complex mutagenesis in *Lactococcus lactis*-identification of genes affecting nisin production. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (1) : 41-48.
- [6] Papagianni M, Avramidis N. Engineering the central pathways in *Lactococcus lactis*: Functional expression of the phosphofructokinase (*pfk*) and alternative oxidase (*aox1*) genes from *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* facilitates improved carbon conversion rates under oxidizing conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51 (3) : 125-130.
- [7] Papagianni M, Avramidis N, Nicholaos Avramidis. *Lactococcus lactis* as a cell factory: A twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49 (2) : 197-202.
- [8] Van Den Hooven HW, Doel CCM, Van De Kamp M, Konings RNH, Hilbers CW, Van De Ven FJM. Threedimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235 (1-2) : 382-393.
- [9] Huan L, Chen X, Cai Y, Xue Y. Directional screening of nisin-production *Lactococcus lactis* and identification of its product. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37 (4) : 292-300. (in Chinese)
还连栋,陈秀珠,才迎,薛禹谷.乳链菌肽产生菌的定向筛选及发酵产物的鉴定.微生物学报,1997,37(4):292-300.
- [10] Chen X, He S, Long L, Huan L, Xue Y. Studies on fermentation conditions of *Lactococcus lactis* AL2 with high yield of Nisin. *Microbiology China*, 1995, 22 (4) : 215-218. (in Chinese)
陈秀珠,何松,龙力红,还连栋,薛禹谷.乳链菌肽高产菌株 AL2 的发酵条件研究.微生物学通报,1995,22(4):215-218.
- [11] O' Sullivan D J, Klaenhammer TR. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (8) : 2730-2733.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:14-19.
- [13] Wells JM, Wilson PW, Page RWF. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 74 (6) : 629-636.
- [14] Takala TM, Saris PE. C terminus of NisI provides specificity to nisin. *Microbiology*, 2006, 152 (12) : 3543-3549.
- [15] Lubelski J, Khusainov R, Kuipers OP. Directionality and coordination of dehydration and ring formation during biosynthesis of the lantibiotic nisin. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (38) : 25962-25972.

- [16] Tramer J, Fowler JJ. Estimation of nisin in food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1964, 15 (8) : 522.
- [17] Kim WS, Hall RJ, Dunn NW. Improving nisin production by increasing nisin immunity / resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50 (4) : 429-433.
- [18] Roberts JA, Kruger P, Paterson DL, Lipman J. Antibiotic resistance—What's dosing got to do with it?. *Critical Care Medicine*, 2008, 36 (8) : 2433-2440.
- [19] Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6 (5) : 452-456.

Effect of 6-phosphofructokinase gene-*pfk* overexpression on nisin production in *Lactococcus lactis* N8

Duolong Zhu, Kai Zhao, Haijin Xu, Yanling Bai, Xiuming Zhang, Mingqiang Qiao^{*}
College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [Objective] To accelerate the formation of nisin through overexpressing 6-phosphofructokinase gene *pfk* in nisin-producer *Lactococcus lactis* N8. [Methods] The genes of *pfk* and *pkaC* encoding the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase were cloned into the vector pMG36e and transformed into *L. lactis* N8, resulting in the recombinant strain *L. lactis* N8-pMG36e-*pfk*-*pkaC*. Several biochemical and physiological factors, including growth profiles, activity of 6-phosphofructokinase, expression of *nisA*, antibacterial activity of supernatants and nisin titer, were monitored to investigate the differences between the recombinant strain and the parental strain. [Results] No significant difference was observed with respect to the growth patterns of the recombinant strain and the wild type. As expected, the biological activity of PFK in recombinant strain was increased for all examined samples. Correspondingly, the yield of nisin was increased by 20% in the recombinant strain after fermentation for 10 hours, which could be attributed to the accelerated biosynthesis of nisin. As a result, the fermentation cycle was reduced about 2 hours. Meanwhile, different concentration of glucose did not affect the formation of nisin. [Conclusion] The overexpression of *pfk* and *pkaC* genes in the nisin-producer strain can effectively accelerate nisin biosynthesis.

Keywords: *Lactococcus lactis*, nisin, 6-phosphofructokinase gene *pfk*, antimicrobial activity, titer

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (30970095)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-22-23503340; E-mail: mingqiangqiao@alicyun.com

Received: 13 August 2014 / Revised: 11 November 2014