

乳酸乳球菌双组分系统调控有氧呼吸的研究

李子涵¹, 葛艳艳¹, 郭耀华¹, 王楠¹, 何红鹏¹, 罗学刚¹, 马文建¹, 郝力壮^{*2}, 齐威^{*1}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室 青海大学畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016

李子涵, 葛艳艳, 郭耀华, 王楠, 何红鹏, 罗学刚, 马文建, 郝力壮, 齐威. 乳酸乳球菌双组分系统调控有氧呼吸的研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3753-3769

Li Zihan, Ge Yanyan, Guo Yaohua, Wang Nan, He Hongpeng, Luo Xuegang, Ma Wenjian, Hao Lizhuang, Qi Wei. Preliminary study on the regulation of aerobic respiration by two-component system of *Lactococcus lactis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3753-3769

摘要:【背景】乳酸乳球菌作为食品行业的代表性菌株, 如何通过双组分系统响应环境因子与代谢调控的分子机制研究, 对发酵食品产业和益生菌制剂行业有着重要的意义。【目的】探究乳酸乳球菌双组分系统对有氧呼吸代谢调控的相关网络, 为乳酸菌适应性代谢研究提供新思路。【方法】采用生物信息学方法, 系统性地分析乳酸乳球菌双组分系统组氨酸激酶和反应调节因子的结构域组成及预测双组分系统功能, 筛选出与有氧呼吸有潜在联系的双组分, 并进一步通过基因转录表达和非靶向代谢组学验证。【结果】以乳酸乳球菌的代表菌株 NZ9000 为例构建相互作用蛋白网络, 显示双组分系统与丙酮酸代谢网络关键连接点为丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶(nifJ)。在不同的生长时期, *Lactococcus lactis* NZ9000 双组分转录表达在延滞期变化显著。与厌氧培养相比, 有氧培养和有氧呼吸培养的菌体双组分呈现下调趋势。双组分系统参与乳酸菌氧化应激和血红素胁迫过程。【结论】明确乳酸乳球菌参与有氧呼吸的双组分系统以及代谢通路, 有助于提高发酵剂、益生菌剂的存活率和竞争力。

关键词: 乳酸乳球菌; 双组分系统; 有氧呼吸; 适应性机制

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901700); 青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室(2022-ZJ-Y17); 青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”拔尖人才项目(2020); 中科院“西部之光”人才培养引进计划“西部青年学者”A类项目; 国家自然科学基金(U20A20400, 31501449)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901700); Key Laboratory of Plateau Grazing Animal Nutrition and Feed Science of Qinghai Province (2022-ZJ-Y17); Top Talent project of “Kunlun Talents–High-level Innovation and Entrepreneurship Talents” in Qinghai Province [grant numbers 2020]; The “Western Youth Light” Talents Training Program “Western Youth Scholars” Class A Project; National Natural Science Foundation of China (U20A20400, 31501449)

***Corresponding authors:** E-mail: HAO Lizhuang: lizhuanghao1122@foxmail.com; QI Wei: qiweiwei@tust.edu.cn

Received: 2022-01-23; **Accepted:** 2022-03-24; **Published online:** 2022-05-09

Preliminary study on the regulation of aerobic respiration by two-component system of *Lactococcus lactis*

LI Zihan¹, GE Yanyan¹, GUO Yaohua¹, WANG Nan¹, HE Hongpeng¹, LUO Xuegang¹, MA Wenjian¹, HAO Lizhuang^{*2}, QI Wei^{*1}

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Key Laboratory of Plateau Grazing Animal Nutrition and Feed Science of Qinghai Province, Qinghai Academy of Science and Veterinary Medicine of Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] *Lactococcus lactis* is a representative strain in the food industry. The molecular mechanism of *L. lactis* responding to environmental factors and the metabolic regulation through the two-component system is of great importance to the fermented food and the probiotics industries. [Objective] This study aimed to explore the effect of two-component system of *L. lactis* on aerobic respiration metabolism, and was expected to supply a new direction for adaptive metabolism in lactic acid bacteria. [Methods] The domain of sensor histidine kinases and response regulatory factor as well as the function of the two-component system in *L. lactis* was systematically analyzed using bioinformatics methods. The correlations between two-component system and aerobic respiration were calculated and further verified by transcriptional expression and untargeted metabolomics. [Results] The protein-protein interaction network of the representative *L. lactis* strain NZ9000 showed that the key connection point between the two-component system and pyruvate metabolism in the network was pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (nifJ). At different growth stages, the transcriptional expression of the two-component system in *L. lactis* NZ9000 changed significantly in the lag period. Compared with the anaerobic culture, the transcriptional expression of the two-component system in *L. lactis* NZ9000 cultivated under aerobic culture and aerobic respiratory culture was down-regulated. The two-component system participated in oxidative stress and heme stress in lactic acid bacteria. [Conclusion] To identify the two-component system and metabolic pathway of *Lactococcus lactis* involved in aerobic respiration. It can improve the survival rate and competitiveness of starters and probiotics.

Keywords: *Lactococcus lactis*; two-component system; aerobic respiration; adaptive mechanism

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是发酵乳制品生产中最常用的发酵剂菌种,作为公认安全的食品级微生物,其为乳酸菌属中重要的模式菌^[1]。乳酸乳球菌基因表达系统较成熟,可被用作基因克隆的宿主;其具有单层细胞壁和清晰的遗传学背景,因此可作为异源蛋白质分泌宿主;其表面有5种锚定蛋白,也可作为蛋白表面展示系统^[2]。乳酸乳球菌被广泛应用于食

品行业和基因工程等生物技术领域。

双组分系统(two-component system, TCS)由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和应答调控蛋白(response regulator, RR)组成,是细菌用来感知和传导外界信号的一种系统,能够帮助细菌适应各种环境。一种细菌可具有多个双组分系统,不同细菌双组分系统的数量不相同^[3]。细菌 TCS 数量与基因组大小之间一般呈正相

关^[4], 同时 TCS 数量还与所处的环境有关^[2]。因此, 细菌中双组分基因与代谢多样性之间有相关性^[5]。

当外界环境给予细胞刺激时, HK 的 N 端感应结构域检测到信号变化; HK 的结构域催化 ATP 依赖的自磷酸化反应, 随后磷酸基团被转移到同源 RR 的氨基末端结构域中的保守天冬氨酸残基上; RR 的磷酸化激活其输出域, 进而通过激活或抑制其靶基因的表达来执行特定的生化功能^[4-6](图 1)。有部分 RR 也可以直接结合 RNA 或者蛋白质。RR 还可以通过磷酸酶催化的去磷酸化和自身去磷酸化反应动态调节 RR 蛋白的基态水平^[7]。双组分系统与细菌的有氧呼吸、厌氧发酵、氧胁迫耐受和氧化还原等功能有关^[6,8]。因此, 双组分系统在乳酸菌适应性代谢方面起着重要作用。本文采用生物信息学手段分析乳酸乳球菌 HK、RR, 对这些 TCS 组

分进行系统分类、结构分析和功能预测, 并进一步通过转录表达和胞内代谢图谱验证, 以期建立双组分系统与乳酸菌代谢调控的相关网络, 从而为乳酸菌适应性代谢研究提供依据。

1 材料

乳酸乳球菌 *L. lactis* NZ9000 由本实验室保存。M17 培养基, 青岛海博生物技术有限公司; SYBR GREEN 染料, DBI 公司; N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺[N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA]和甲氧胺盐酸盐, Sigma 公司; RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成由生工生物工程股份(上海)有限公司完成。紫外可见分光光度计, 上海美普达公司; pH 计, Mettler Toledo 公司; 荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司。

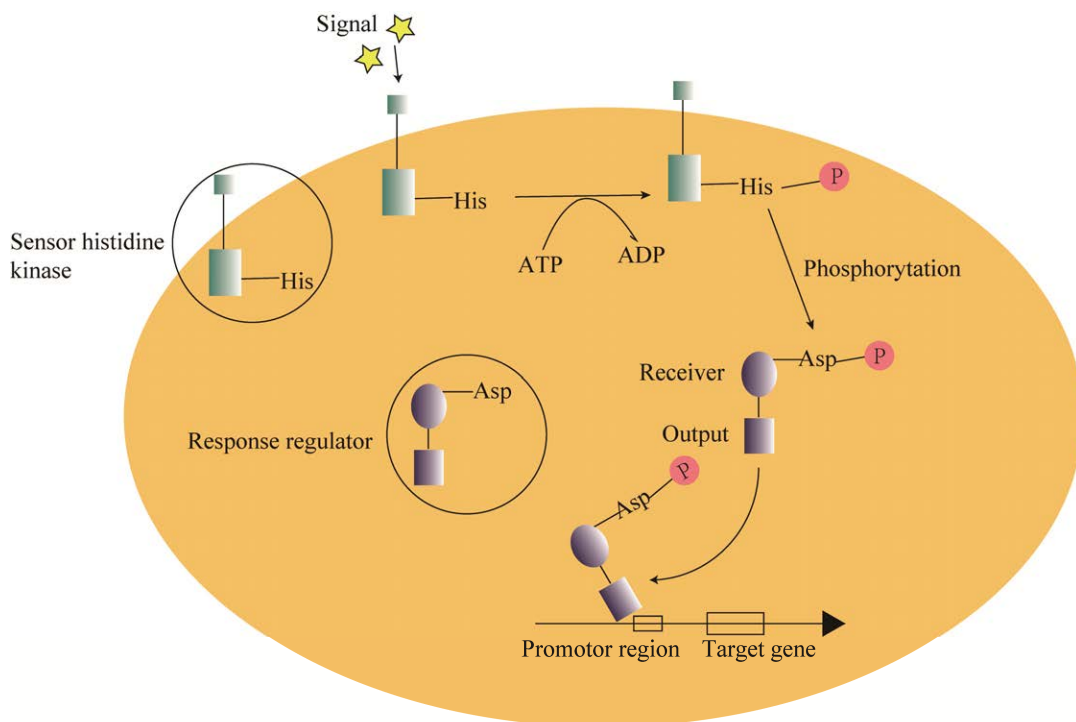


图 1 双组分系统作用机制示意图^[9]

Figure 1 Two-component system in bacteria^[9].

2 方法

本文生物信息学分析所用的 27 株乳酸乳球菌全基因组序列均来自 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1357>)。利用隐马尔科夫模型(hidden Markov model, HMM)筛选双组分系统,在 pfam (<http://pfam.xfam.org/>)中下载 HATPase_c (Pfam02518) 和 Response_reg (Pfam00072)保守结构域的隐马尔科夫模型。

2.1 HKs 和 RRs 的结构域分析与功能预测

使用蛋白质结构域数据库(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)搜查双组分 HKs 和 RRs 的结构域。双组分功能分析主要依据 3 个方面:(1) 其包含的结构域功能;(2) 参考与序列高度相似的已知功能的同源性 HKs 和 RRs 功能,利用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)查找对应蛋白的功能;(3) 已有文献报道。批量序列比对使用 Windows 下的 BLAST+2.12.0 程序包, Cygwin 3.3 作为调用程序软件, UniProtKB/Swiss-Prot 作为对比的数据库。通过序列比对,以相似度最高的对应蛋白作为预测的标准和双组分名称。

2.2 双组分系统蛋白相互作用网络构建

蛋白相互作用网络构建采用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库(<https://www.kegg.jp/>)、String 数据库(<https://string-db.org/>)与 Cytoscape 软件。

2.3 *L. lactis* NZ9000 生长情况和 pH 检测

L. lactis NZ9000 接种于含有 0.5%乳糖的 M17 培养基中,分别在厌氧(30 °C 厌氧培养箱静置培养)、有氧(30 °C、150 r/min 振荡培养)和有氧呼吸(添加 2.5 g/mL 血红素, 30 °C、150 r/min 振荡培养)这 3 种条件下培养,每隔

0.5 h 取样检测 OD_{600} , 绘制生长曲线。培养基的 pH 使用 pH 计检测。

2.4 双组分系统转录表达水平

将 *L. lactis* NZ9000 分别在厌氧、有氧和有氧呼吸 3 种条件下培养,为了避免不同生长期对结果的影响,分别在延滞期、对数期和稳定期取样。采用 RNA 试剂盒提取 RNA,逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成为 cDNA,双组分系统基因表达量采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒和荧光定量 PCR 仪检测。以 *GAPDH* 为内参基因,每组 3 个平行。反应体系: Bestar[®] SybrGreen qPCR Master Mix 10 μ L, 50 \times ROX Reference 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, ddH₂O 7.6 μ L。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C, 1 min, 共 40 个循环。依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。文章所用的引物序列见表 1。

2.5 胞内代谢组检测

乳酸菌胞内代谢组提取和检测按照 Qi 等^[10]的方法。乳酸菌样品于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 得到菌体沉淀,用液氮淬灭。使用 50% (体积分数)甲醇-水溶液,结合液氮反复冻融提取胞内代谢物。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 取上清,加入 20 μ L 核糖醇(内标),进行真空冷冻干燥。加入 20 mg/mL 50 μ L 甲氧胺盐酸盐吡啶溶液(现配现用),40 °C 水浴中反应 1.5 h,再加入 80 μ L 的 MSTFA,在 37 °C 水浴反应 0.5 h。样品经 0.22 μ m 有机微孔滤膜过滤后,使用 Agilent 7890B 气相色谱-5977B 质谱联用仪检测。利用 NIST05 谱库初步鉴定成分,结合化学成分的实际成分和保留时间等进行定性。采用面积归一化法进行相对定量。利用 SIMCA 14.1 软件和 MetaboAnalyst5.0 网站(<http://www.metaboanalyst.ca>)对数据进行统计分析和通路分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Primer name	Sequence (5'→3')
<i>GAPDH</i> -F	CAACTTTCTTAGCACCATTAGCG	59921-R	TCATAAAATGCCTGTAAATAGCCT
<i>GAPDH</i> -R	CAACGACTTGACAGATCCAGCA	60070-F	AACAATGGCGAGTCCTAATCCT
59338-F	ATTGAACGAAGCGTATGATT	60070-R	TGACAATGGTCTCTGGTTAAAGTG
59338-R	TACTTGTCTACTTATCCTGTTGTTAC	60071-F	ATTGTCCGTGTTTCTGCTGTATC
59339-F	AGTCATCCCCACCAATACCT	60071-R	CTCATTCGTAGAAATCAAATGTATAATC
59339-R	CATCAAAACATTTCACTTCCCT	60505-F	AGCAACGGGCGTCCTCAG
59431-F	ATTACCACGGCGATCTG	60505-R	CAATGATAAGGGCGATATTAGT
59431-R	GGTGAGGACATTGTTAGGAC	60707-F	CATTATCCCCTACATAGTCACG
59432-F	CAAGCGGCGGACTGTAAC	60707-R	ATGTTTTCTCGGCAGCAG
59432-R	TCGTATCAATGTGCGACCT	60634-F	TGGCATAAATAGTAGCCTGAG
59767-F	AGATTCCAATGGTTTGTCTTAT	60634-R	GGATTTGGTAATGGATAGACTT
59767-R	ATCATAACCCCAAATCCG	60635-F	TCTCAACAGTGGTTCCCG
59768-F	TCGGGCGATGTGGGTCAT	60635-R	GGTAAGAGTTTAGCAGAAGGC
59768-R	TGCCGTTGTGGGCTCTGGT	60905-F	CTACCGCTTCTCGCATTG
59920-F	AACAAATCGTACCGTTCACCGC	60905-R	TTGGCTTTGGCATTACC
59920-R	CGAGTGACAACATCCCCAACAT	60906-F	CTTGTCTTTCAGAAATTTGGGT
59921-F	AGAGGTATTAGAACAAGCGGATG	60906-R	TGCTGATGGATATCGGACTAC

2.6 数据统计学分析

使用 SPSS Statistics 26 计算皮尔森相关系数(Pearson correlation coefficient), 用 R 语言(V4.1.2)绘制热图。

3 结果与分析

3.1 乳酸乳球菌双组分系统的多样性

利用 HK 和 RR 的保守结构域 HATPase_c (Pfam02518) 和 Response_reg (Pfam00072) 对 NCBI 基因组序列已知的 27 株乳酸乳球菌的 TCS 进行了搜索比对, 搜寻可能的 HK 和 RR, 结果如表 2 所示。27 株乳酸菌总共含有 427 个 TCS 基因, HK 的数量分布为 4-10 个, RR 的数量分布为 6-11 个, 成对 TCS (HK-RR) 的数量分布为 2-8 个, 几乎无杂合 TCS, 孤儿 HKs 和 RRs 的数量为 1-3 个。总体来看, TCS 基因在乳酸乳球菌总基因组中占比较小, 但其在细菌适应性代谢过程中的作用不容忽视。

蛋白结构域是蛋白中具有特异空间结构和

独立功能的区域, 是蛋白质发挥生物学作用的关键功能单位^[11]。根据乳酸乳球菌双组分 RRs 输出结构域的不同, 可以分为 OmpR、NarL 和 CheY 等亚家族。RRs 的种类多样性也意味着转录调控在乳酸乳球菌对环境反应的重要地位^[12]。其中 OmpR 具有双结构域, 即一个含有 N 端的磷酸化结构域和一个 C 端翼状螺旋效应的结构域^[12], 占总 RRs 的 60% 以上, 是主要的应答调控蛋白^[13](表 2)。OmpR 在基因的表达调控方面发挥重要作用, 与丙酮酸代谢、糖酵解、信号转导和转运以及谷氨酸脱羧的相关基因调控相关^[14-15]。乳酸乳杆菌 LlrF 的 C 端含有 OmpR, 其对氧化应激反应敏感^[16]。

乳酸乳球菌组氨酸激酶 HKs 的结构域组成如图 2 所示, 一共有 11 种结构域。HKs 的信号接收结构域(input)种类有跨膜区 histidine kinases、adenylyl cyclases、methy binding proteins、Phosphatases (HAMP)、Per-Arnt-Sim (PAS)和质子激活的氯离子通道(proton-activated

chloride channel, PAC)等。其中 HAMP 结构域是存在广泛、研究较深入的一种信号接收结构域^[17], 存在于组氨酸激酶、腺苷酸环化酶和甲基受体趋化性蛋白和一些磷酸酶中^[18]。PAS 结构域可以感知电子传输系统中的氧化还原变化或整体细胞氧化还原状态, 还可以感知跨细胞

膜和/或影响细胞代谢的环境因子^[11]。PAS 域是重要的信号模块, 可结合黄素、多种亚铁血红素和嘌呤类等辅助因子来检测信号, 进而感知氧气或细胞内氧化还原变化、光和细胞整体能量水平的变化等^[19]。PAC 结构域存在于所有已知 PAS 基序的 C 端, 有助于 PAS 域的折叠^[11,20-22]。

表 2 27 株乳酸乳球菌双组分数量和应答调控蛋白主要结构域

Table 2 The number of two components and main domain of RRs in 27 *Lactococcus lactis* strains

Strains	Two-component number				The domain of RRs		
	HK-RR	Hypird	Orphans HK	Orphans RR	OmpR	NarL	CheY
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> A76	6	0	2	1	6	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> GE214	8	0	1	2	8	1	1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	5	0	1	3	6	1	1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IBB477	7	0	1	2	8	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> KW2	7	0	1	1	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	7	0	1	2	7	1	1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	7	0	2	1	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TIFN1	5	0	2	3	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TIFN3	4	0	1	3	6	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TIFN5	3	0	2	4	7	0	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TIFN6	2	0	5	5	4	2	1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TIFN7	2	0	2	4	5	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UC509.9	7	0	1	1	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1AA59	7	0	1	2	8	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> A12	7	0	1	1	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> str. LD61	6	0	1	1	1	6	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> str. TIFN2	6	0	1	1	6	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> str. TIFN4	5	0	1	2	6	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNCM I-1631	7	0	1	1	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CV56	8	0	1	1	8	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Dephy 1	8	0	1	1	8	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403	6	0	3	4	9	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IO-1	8	0	2	1	8	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147	8	0	1	3	9	2	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KLDS 4.0325	6	0	2	2	7	1	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 2118	8	0	1	2	8	2	0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>tractae</i>	5	0	2	2	6	1	0

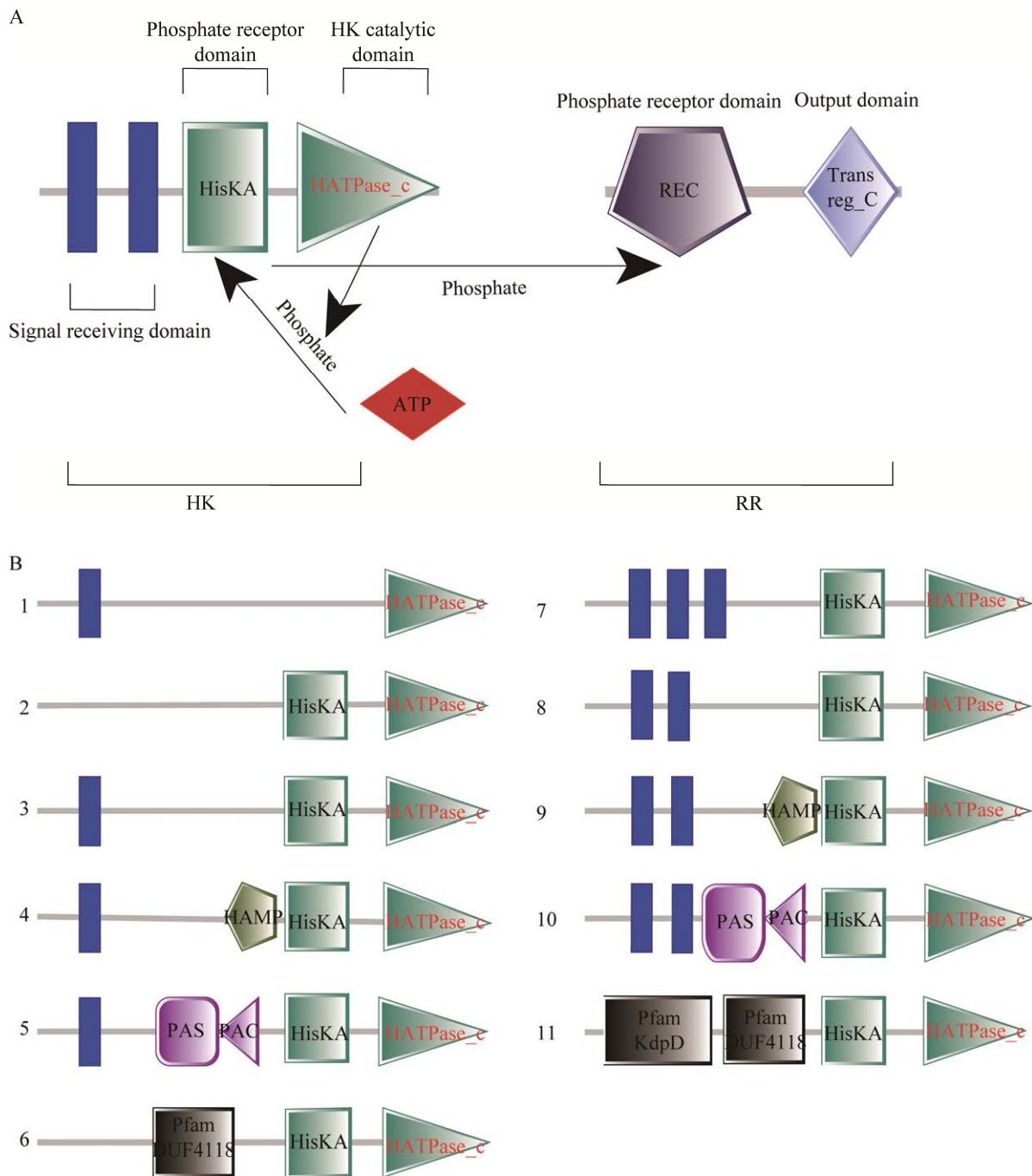


图 2 双组分系统图解 A: 双组分系统结构域分析图; B: 乳酸乳球菌含有的组氨酸激酶

Figure 2 Diagram of two-component system. A: Domain analysis of two-component system; B: Histidine kinase of *L. lactis*.

3.2 乳酸乳球菌 TCS 功能预测

根据乳酸乳球菌 TCS 在基因组中的相对位置和各组分的保守结构域, 共计有 15 对 TCS, *L. lactis* NZ9000 含有 8 对 TCS。根据序列相似

性分析、结构域分析和相关文献的报道^[23-29], 对乳酸乳球菌的 TCS 进行功能预测(表 3)。结果表明, TCS 涉及细菌的细胞壁生物合成、毒力调节、耐药性及生物素合成^[30]、生理调节、

胁迫耐受、代谢调控及氧化调节^[31-34]。

27株乳酸乳球菌中普遍存在的双组分系统是 ArlS/ArlR 和 WalK/WalR, 推测这可能是乳酸乳球菌满足正常生命活动必需的调节系统。在菌株中出现频率 50% 以上的双组分系统有 CiaH/CiaR、GraR/GraS、PhoP/PhoR 和 LiaS/LiaR。这表明双组分系统在乳酸乳球菌中的分布既有相似性, 也有差异性。

3.3 菌株 NZ9000 TCS 蛋白相互作用网络

L. lactis NZ9000 作为乳酸乳球菌代表性的模式菌种, 其 TCS 数量、孤儿 HK 和 RRs 为平均水平, 含有 ArlS/ArlR、CiaH/CiaR、WalK/WalR、LiaS/LiaR 和 NisK/NisR 等重要的双组分系统。因此以 *L. lactis* NZ9000 为例, 对乳酸乳球菌双组分系统的研究具有代表意义。

L. lactis NZ9000 的蛋白相互作用网络如图 3 所示, 共分为两大聚类: 左边聚类代表丙酮酸代谢相关蛋白, 右边聚类是双组分系统。

表 3 乳酸乳球菌双组分系统的功能预测

Table 3 Function prediction of the two-component system in *L. lactis*

Function prediction of two-component system					<i>L. lactis</i> NZ9000 TCS accession No.
TCS No.	Sequence alignment	Source of functional prediction	The number of bacteria occupied	Functional prediction	
1	ArlSR	<i>Staphylococcus aureus</i>	26	Adhesion, autolysis, drug resistance and virulence	ADJ59921.1/ADJ59920.1 ADJ60505.1/ADJ60707.1
2	CiaHR	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	14	Stress tolerance, penicillin sensitivity	ADJ59768.1/ADJ59767.1
3	GraRS	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	RNA and amino acid synthesis, glycolysis	ADJ60905.1/ADJ60906.1
4	KdpDE	<i>Escherichia coli</i>	6	Participate in the regulation of kdp operon and environmental osmotic stress	
5	LiaSR	<i>Bacillus subtilis</i>	19	Cell wall and antibiotic synthesis	ADJ60635.1/ADJ60634.1
6	NisKR	<i>Streptococcus lactis</i>	5	Nisin biosynthesis	ADJ59338.1/ADJ59339.1
7	PhoPR	<i>Bacillus subtilis</i>	22	Participate in the regulation of gene <i>phoA</i> and <i>phoB</i> and phosphodiesterase	ADJ60070.1/ADJ60071.1
8	ResDE	<i>Bacillus subtilis</i>	7	Regulation of aerobic and anaerobic respiration	
9	SrrAB	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	Virulence, biofilm formation	
10	VraSR	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	Cell wall peptidoglycan biosynthesis	
11	WalKR	<i>Staphylococcus aureus</i>	26	Cell wall, virulence, biofilm, antioxidation	ADJ59431.1/ADJ59432.1
12	YclKJ	<i>Bacillus subtilis</i>	4	Anaerobic growth	
13	YxdKJ	<i>Bacillus subtilis</i>	12	LL-37 regulation of antibacterial protein	
14	YkoHG	<i>Bacillus subtilis</i>	6	Unknown	
15	YvrGH	<i>Bacillus subtilis</i>	1	Participate in the regulation of cell membrane and cell wall synthesis	

蛋白间的线条从蓝到红表示蛋白之间相互作用越来越强；而圆圈大小代表蛋白在此系统地位的高低，圆圈越大，地位越高。磷酸烯醇丙酮酸-丙酮酸-草酰乙酸节点是新陈代谢在糖异生、氧化和发酵之间切换的关键点。因此，丙酮酸对于细菌的适应性至关重要，对双组分调控和代谢有重要影响^[35]。丙酮酸代谢途径相关蛋白和双组分系统链接关键点为 *nifJ* 蛋白，*nifJ* 是丙酮酸生成乙酰 CoA 的关键酶^[36]。此外，*llrA*(*ArIR*, *ADJ59920*)与乙偶姻脱氢酶(*dar*)和丁二醇脱氢酶(*butA*)二者之间相互作用较为强烈。乳酸菌在厌氧培养和有氧呼吸培养时，丙酮酸代谢途径是有差异的。无氧条件下，丙酮酸经乳酸脱氢酶作用生成乳酸。有氧呼吸培养时，丙酮酸在丙酮酸氧化酶作用氧化成乙酸，或者通过丙酮酸脱氢酶、磷酸转乙酰酶和乙酸激酶生成乙酸；还能够经过乙酰乳酸合成酶催化后生成双乙酰和乙偶姻等风味物质。

3.4 不同培养方式对乳酸乳球菌的生长及培养基 pH 的影响

与厌氧培养和有氧培养相比，有氧呼吸培养 *L. lactis* NZ9000 的延滞期延长，最终生物量明显升高(图 4A)，与之前的报道一致。三种培养方式下的培养基 pH 值从对数中期开始逐渐降低(图 4B)，这与乳酸菌适应环境后产生乳酸和乙酸等酸性物质相关。相较于厌氧培养和有氧培养，有氧呼吸培养 *L. lactis* NZ9000 的 pH 值下降缓慢，这是由于乳酸生成量降低，部分丙酮酸生成乙酸、双乙酰和乙偶姻等物质。

3.5 不同培养方式对乳酸乳球菌 NZ9000 双组分系统转录水平的影响

L. lactis NZ9000 双组分系统转录情况在延滞期差异显著(图 5)。相较于厌氧培养，有氧培养和有氧呼吸培养 *L. lactis* NZ9000 的双组分在延滞期呈现下调趋势，表明双组分系统参与乳酸菌对于环境的适应性调节过程。有氧培养条件下，

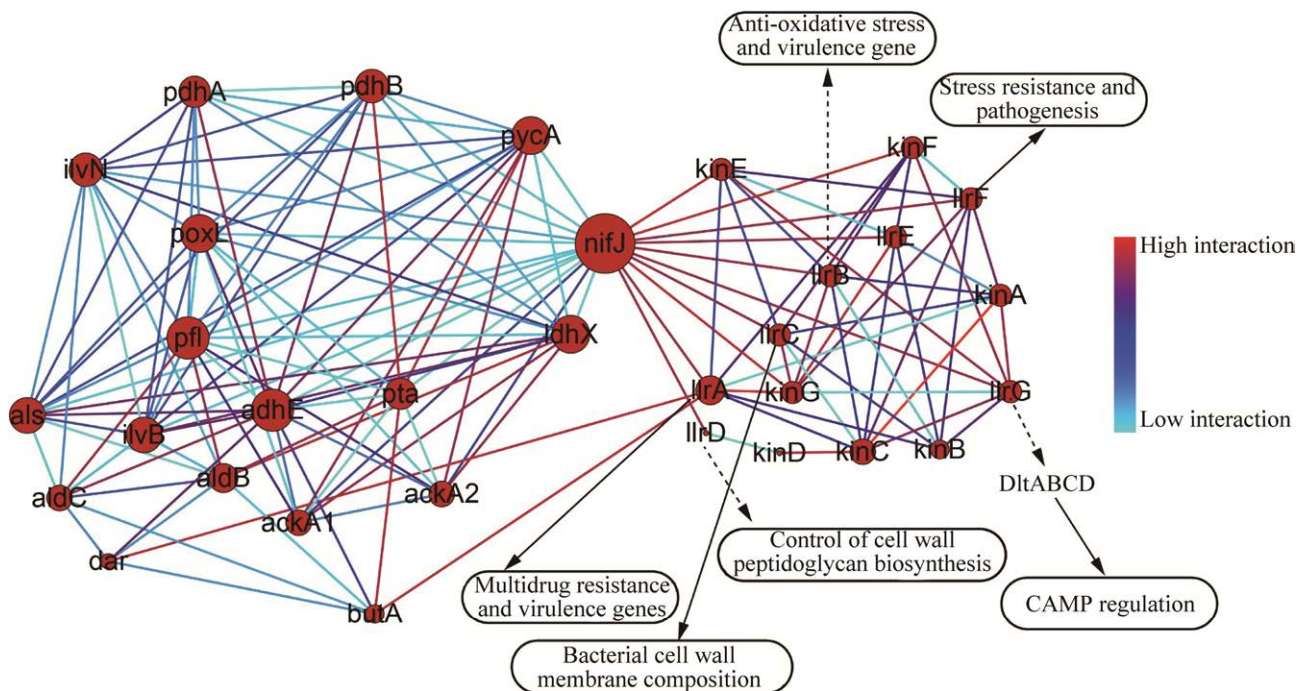


图 3 乳酸乳球菌蛋白相互作用网络
Figure 3 Protein interaction network in *L. lactis*.

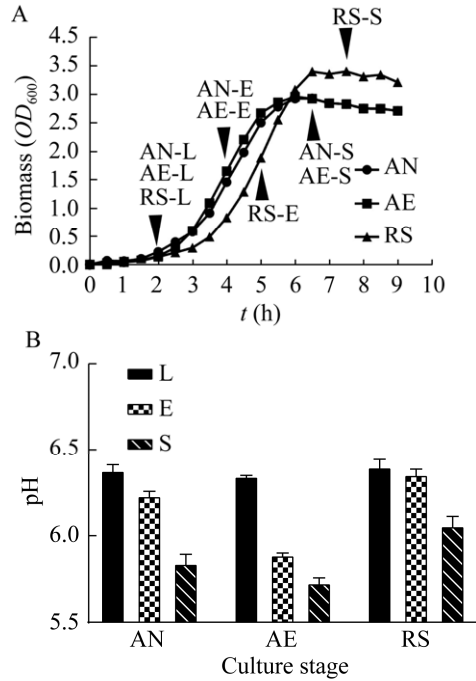


图 4 乳酸乳球菌 NZ9000 双组分系统的生长(A)和 pH 情况(B)

Figure 4 Growth (A) and pH (B) of *L. lactis* NZ9000 under different cultivation. AN: Anaerobic culture; AE: Aerobic culture; RS: Aerobic respiration; L: Lag phase; E: Exponential phase; S: Stationary period.

抗氧化应激功能的 ADJ59431.1/ADJ59432.1、胁迫耐受功能的 ADJ59768.1/ADJ59767.1、耐药性和毒力基因的 ADJ59921.1/ADJ59920.1、碱性磷酸酶基因 *phoA* 和 *phoB*、磷酸二酯酶调控功能的 ADJ60070.1/ADJ60071.1 和应答调控蛋白 ADJ59339.1、ADJ60707.1、ADJ60634.1 的基因转录表达水平全部下调。有氧培养条件下,电子“漏出”呼吸链导致菌体产生了大量活性氧,对乳酸菌造成损伤。此时抗氧化应激和胁迫耐受功能相关的双组分系统开始转录表达,发挥调控作用。

有氧呼吸条件下, *L. lactis* NZ9000 参与阳离子抗菌肽的 ADJ60905.1/ADJ60906.1、应答调

控蛋白 ADJ60634.1 转录表达水平下调。乳酸菌在有氧培养和有氧呼吸培养的双组分系统变化有所差异,或许是因为血红素存在条件下呼吸代谢迅速启动,激活了电子传递链,氢原子传递给氧生成 H₂O 从而消减了氧胁迫;但同时添加的血红素可能对细胞产生毒性作用^[37],因此,乳酸菌双组分系统 ADJ60905.1/ADJ60906.1 和 ADJ60634.1 发挥转录调节作用。另外,乳酸乳球菌在不同的培养条件下,双组分系统不是成对发生变化,推测双组分系统之间可能存在交叉调控。因此,继续对双组分系统进行 Pearson 相关性分析。ADJ59338.1 与 ADJ59432.1、ADJ59768.1、ADJ60070.1 可能存在负相关,与 ADJ60634.1 可能存在正相关;ADJ59768.1 与 ADJ60070.1、ADJ60634.1/ADJ60635.1 可能存在负相关;ADJ60070.1 与 ADJ60634.1 可能存在正相关;ADJ60634.1 与 ADJ60635.1 可能存在正相关;ADJ59339.1、ADJ59431.1、ADJ59767.1、ADJ59920.1/ADJ59921.1、ADJ60071.1、ADJ60505.1/ADJ60707.1、ADJ60635.1 和 ADJ60905.1/ADJ60906.1 相互之间可能存在正相关。

3.6 不同培养方式对乳酸乳球菌 NZ9000 胞内代谢谱的影响

L. lactis NZ9000 胞内代谢物的 PCA 整体得分如图 6 所示,组间差异大说明厌氧培养、有氧培养和有氧呼吸培养对菌体胞内代谢产生一定影响。与厌氧培养相比, *L. lactis* NZ9000 在有氧培养下的差异代谢物有磷酸甘油酯、D-焦谷氨酸、天门冬氨酸、L-谷氨酸、3-磷酸甘油酸、油酸酰胺、鸟嘌呤和单棕榈酸甘油酯。其中,3-磷酸甘油酸、磷酸甘油酯、丙酮酸、乙酸和酪氨酸含量下调;棕榈酸、D-焦谷氨酸、乳酸、天冬氨酸和谷氨酸含量上调。与厌氧培

养相比, *L. lactis* NZ9000 在有氧呼吸培养下的差异代谢物有鸟嘌呤、磷酸甘油酯、乙偶姻、乳酸、油酸酰胺、单棕榈酸甘油酯、天门冬氨酸、D-焦谷氨酸、甘油酸和棕榈酸。其中, 三磷酸甘油酸、丙酮酸、乳酸、天冬氨酸和 D-焦谷氨酸含量下调, 乙偶姻含量上调。

酸、D-焦谷氨酸、甘油酸和棕榈酸。其中, 三磷酸甘油酸、丙酮酸、乳酸、天冬氨酸和 D-焦谷氨酸含量下调, 乙偶姻含量上调。

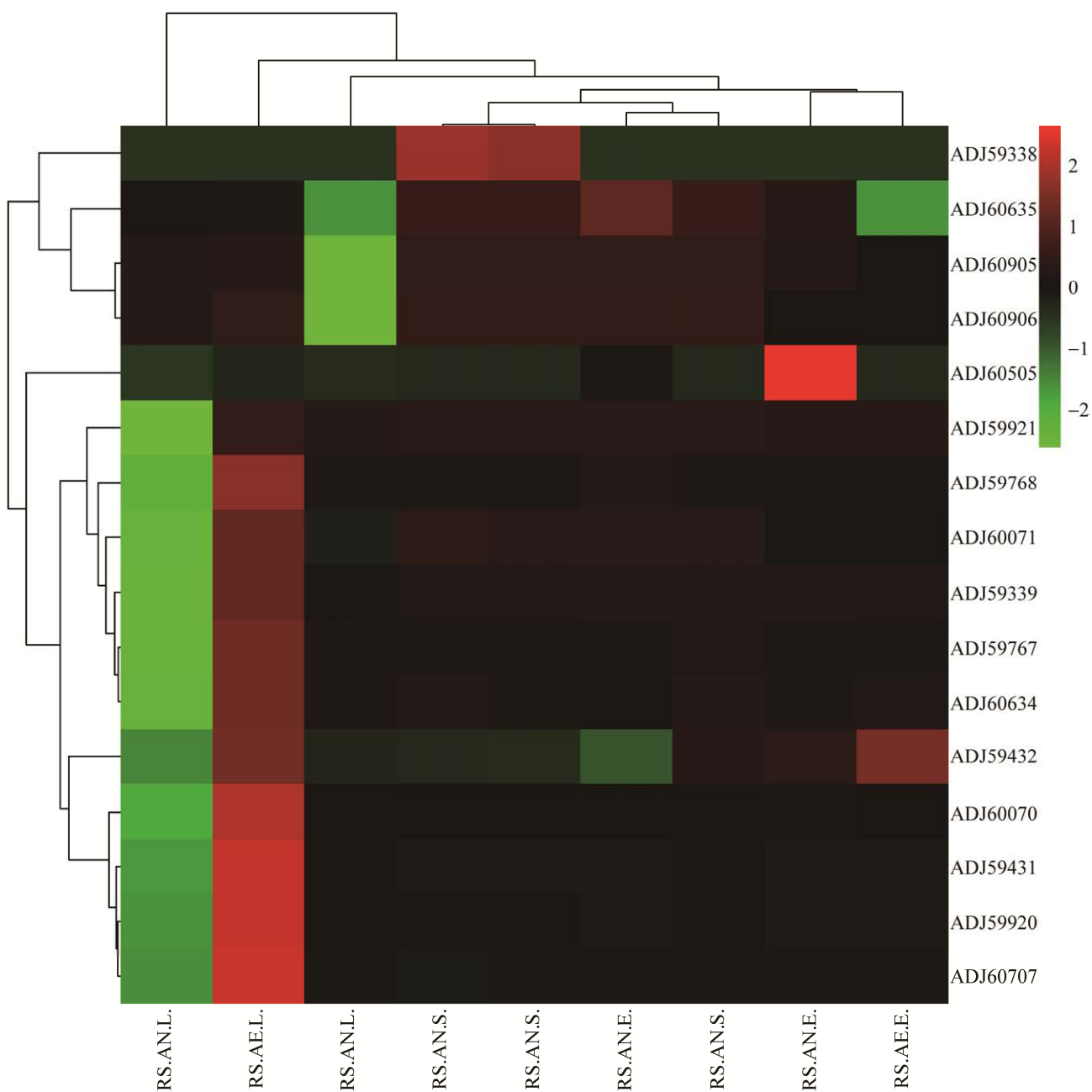


图 5 乳酸乳球菌 NZ9000 双组分系统的转录情况

Figure 5 Transcription of two-component system in *L. lactis* NZ9000.

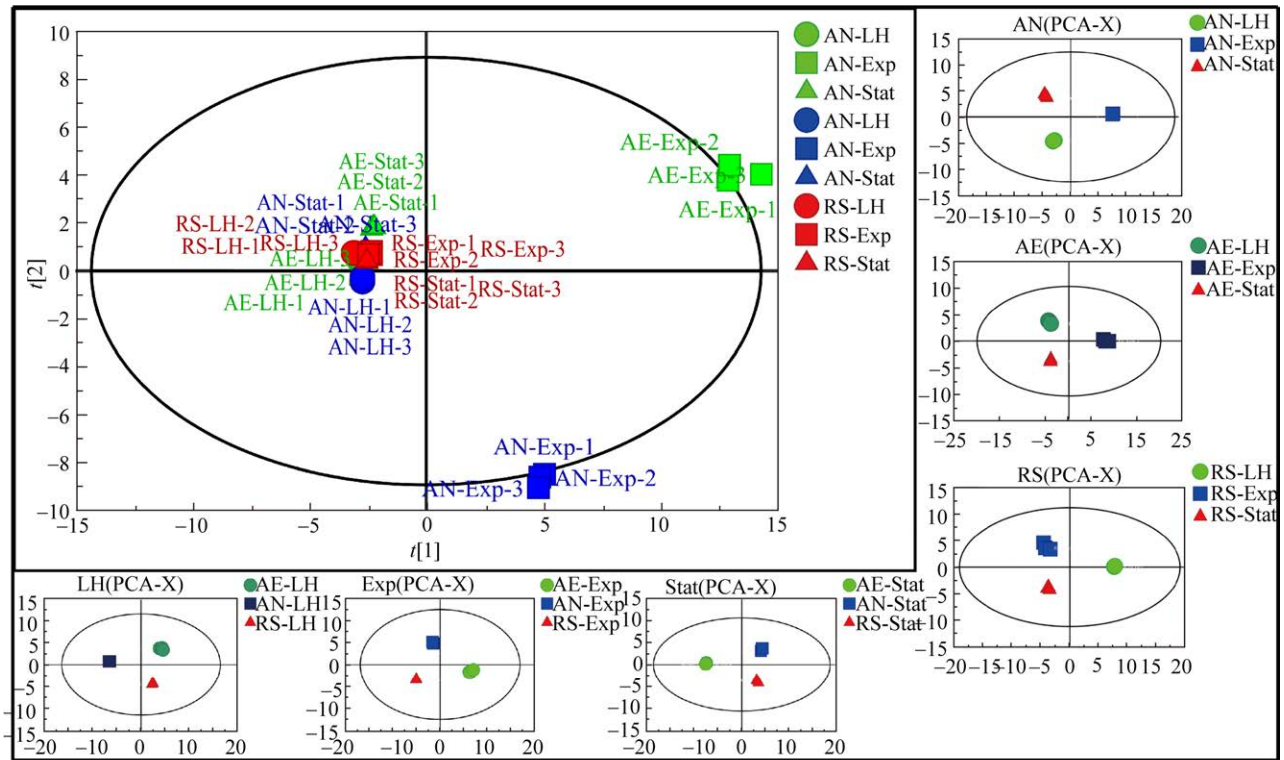


图 6 乳酸乳球菌 NZ9000 代谢组 PCA 分析

Figure 6 PCA plots of *L. lactis* NZ9000 under different culture.

3.7 双组分系统调控乳酸乳球菌 NZ9000 有氧呼吸代谢

将乳酸乳球菌 NZ9000 双组分系统转录与胞内代谢组进行联合分析(图 7)。乙偶姻、草酸、乙酰甘氨酸、尿嘧啶、乙酰胺、谷氨酸、L-苯丙氨酸、腺嘌呤、L-赖氨酸、棕榈酸、鸟嘌呤、半乳糖和蔗糖均与 ADJ59920.1、ADJ59431.1、ADJ59767.1 和 ADJ60707.1 呈正相关,与 ADJ59339.1、ADJ59921.1、ADJ60071.1、ADJ60505.1、ADJ60635.1、ADJ60905.1 和 ADJ60906.1 呈负相关。丙酮酸和磷酸甘油酯与 ADJ59338.1 呈正相关,与 ADJ59432.1 呈负相关。分析结果也证实 ArlR (llrA, ADJ59920)参与乙偶姻代谢途径。

4 讨论与结论

对 27 株乳酸乳球菌双组分系统进行生物

信息学分析发现,双组分系统通过聚类分析可以归为 ArlS/ArlR、CiaH/CiaR、YkoH/YkoG、WalK/WalR、PhoR/PhoP、LiaS/LiaR、NisK/NisR、KdpD/KdpE 和 GraS/GraR 这 9 个类群,其中 WalK/WalR 的抗氧化性能与有氧呼吸联系密切^[38]。氧既是氧化磷酸化的末端受体,具有较高的 ATP 产率,也是一种有毒物质,在部分被还原时形成有害的活性自由基。许多微生物在一定的氧浓度范围内才能适应生活。越来越多的证据表明,细胞能量的耗竭首先出现在电子传递和质子动力的下降过程中,这导致了 ATP 浓度的改变^[39]。PAS 域可以感知氧、光、氧化还原电位或质子动力,作为一种监测活细胞能量变化的方式^[11]。FixL 蛋白是一种氧受体,含有 PAS 域,其中氧直接结合到一个亚铁血红素,该亚铁血红素结合 PAS 结构域内的组氨酸残

基^[40]。其他 PAS 蛋白, 如 Aer 是间接感知氧的转导器, 通过感知氧化还原电位的变化来间接感知氧^[41]。Aer 中的 PAS 域有一个非共价约束的 FAD 作为辅因子^[42]。PAS 还可以作为一个蛋白-蛋白相互作用域, 蛋白-蛋白相互作用介导一些 PAS 蛋白的信号转导, 而 PAS 核心可能决定相互作用的特异性^[43], *L. lactis* NZ9000 菌株的

WalK (ADJ59431) 含有组氨酸结构域 PAS, 可以感应氧信号。ArlS (ADJ59921) 和 PhoP/PhoR 含有组氨酸结构域 HAMP, 此结构域广泛存在于传递信号的蛋白质中。乳酸乳球菌的有氧呼吸通过电子传递链产生 ATP, 提高了能量代谢。因此, ArlS 和 PhoP/PhoR 与能量代谢之间具有一定相关性。

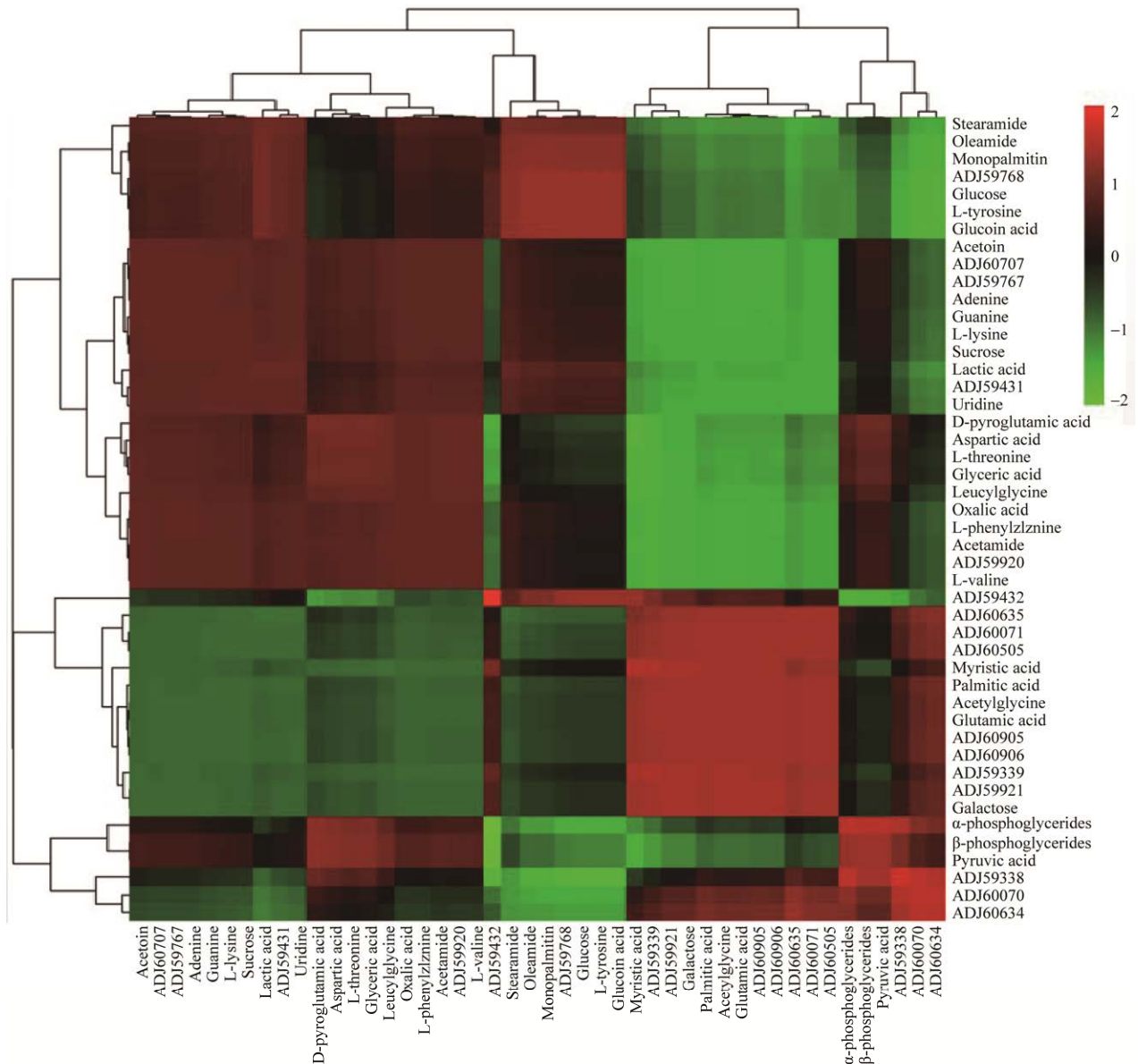


图 7 乳酸乳球菌 NZ9000 双组分系统转录与胞内代谢组相关性分析

Figure 7 Correlation analysis of TCS transcription and intracellular metabolome in *L. lactis* NZ9000.

3-磷酸甘油酸、丙酮酸是糖酵解代谢(glycolytic pathway, EMP)的中间产物,在有氧和无氧条件下分别生成乳酸和风味物质(双乙酰和乙偶姻)^[44]。有氧呼吸条件下,丙酮酸、3-磷酸甘油酸和乳酸含量下调,乙偶姻含量上调,说明EMP代谢流量由乳酸转向乙偶姻。*nifJ*是连接双组分与代谢酶相互作用的关键,其也是丙酮酸转化为乙酰-CoA的中间蛋白^[45],能够连接EMP和三羧酸循环。蛋白相互作用网络显示,*nifJ*与乙酸激酶、乳酸脱氢酶有强相互作用,因此推测乙酸和乳酸含量的变化或许与*nifJ*有一定的关系。此外,有氧呼吸培养组pH值的升高与乳酸的生成量减少有关。*ArlR* (*IlrA*, ADJ59920)与有氧呼吸乙偶姻代谢途径中的乙偶姻脱氢酶(*dar*)和丁二醇脱氢酶(*butA*)有较强的相互作用,这可能与乙偶姻产量上升有关。乳酸菌到达稳定期,培养基成分耗竭,胞内能量供应减少导致菌体代谢缓慢,*ArlR* (ADJ59921)转录水平上调,ADJ59921与乳酸菌自溶和毒力耐受功能相关,这可能是菌体的凋亡信号。推测双组分*WalK*、*ArlS/ArlR*和*PhoP/PhoR*通过感知环境中的氧分子,再通过电子传递链产生ATP,调节乙酸激酶、乳酸脱氢酶、乙偶姻脱氢酶(*dar*)和丁二醇脱氢酶(*butA*)的含量或者活性,进而参与了乳酸乳球菌有氧呼吸代谢。后续可以通过敲除/过表达双组分系统编码基因,进一步利用乳酸菌的基因表达图谱、代谢酶的蛋白表达图谱和代谢指纹图谱等技术,明确双组分系统的作用机制。

乳酸乳球菌是应用于食品工业的主要发酵菌株。有氧呼吸不会影响乳酸菌的生长速率,但是能够提升最终的生物量,同时增加乙偶姻和双乙酰等芳香化合物的生成量^[46]。有氧呼吸培养制备的乳酸菌发酵剂发酵的酸面团,能够增强小麦蛋白质的水解,显著增加抑制腐败风

味的代谢物及具有令人愉快的果味和甜味的芳香化合物,改善烘焙食品的质地和感官特性^[47]。有氧呼吸培养制备的乳酸菌发酵剂发酵奶酪能够提升芳香化合物(即双乙酰、乙偶姻和甲硫醇),减少几种不利于风味的脂质和蛋白质氧化产物(如壬醛、2-戊酮、2-庚酮和2-壬酮),改善切达奶酪的品质和口感^[48]。近年来,也有报道有氧呼吸培养能够提高乳酸菌的乳酸链球菌素、EP胞外多糖等产量^[49-51]。此外,有氧呼吸培养提高了乳酸菌对氧化应激等胁迫条件的耐受性和存活率^[52-54],比如提高植物乳杆菌和干酪乳杆菌在长期饥饿胁迫、冷冻和冷冻干燥过程中的存活率^[55]。因此,呼吸培养有助于乳酸菌发酵剂和益生菌的生产、储存和运输^[56]。

对乳酸菌有氧呼吸代谢途径的诱导、激活、调节因素和遗传进化的研究,有助于发现新的耐氧表型,进一步发展和提高发酵剂和益生菌剂的适应性和竞争力。探究双组分系统在有氧呼吸过程中的调节作用,有助于增加乳酸菌发酵剂的应激存活率和生物量,为乳酸菌的呼吸代谢研究提供依据,促进食品工业和益生菌剂制备工业的发展。

REFERENCES

- [1] Hu YY, Zhang L, Wen RX, Chen Q, Kong BH. Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(10): 2741-2755
- [2] Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 55
- [3] Galperin MY. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(12): 4169-4182
- [4] Monedero V, Revilla-Guarinos A, Zúñiga M. Physiological role of two-component signal transduction systems in food-associated lactic acid bacteria[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2017, 99: 1-51

- [5] Laub MT, Goulian M. Specificity in two-component signal transduction pathways[J]. *Annual Review of Genetics*, 2007, 41: 121-145
- [6] Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton JM, Antoine R. Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(10): 585-593
- [7] Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(19): 3752-3775
- [8] 付龙云. 乳酸菌抗氧胁迫及有氧生长的研究[D]. 山东大学博士学位论文, 2013
Fu LY. The oxidative stress resistance and aerobic growth of lactic acid bacteria[D]. Doctoral Dissertation of Shandong University, 2013 (in Chinese)
- [9] Mitrophanov AY, Groisman EA. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems[J]. *Genes & Development*, 2008, 22(19): 2601-2611
- [10] Qi W, Li XX, Guo YH, Bao YZ, Wang N, Luo XG, Yu CD, Zhang TC. Integrated metabolomic-proteomic analysis reveals the effect of glucose stress on metabolic adaptation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CICC23200[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(9): 7834-7850
- [11] Taylor BL, Zhulin IB. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1999, 63(2): 479-506
- [12] Gao R, Bouillet S, Stock AM. Structural basis of response regulator function[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 175-197
- [13] Kenney LJ, Anand GS. EnvZ/OmpR two-component signaling: an archetype system that can function noncanonically[J]. *EcoSal Plus*, 2020, 9(1): 10.1128/ecosalplus.ESP-10.1128/ecosalplus0001-2019
- [14] Ravikumar S, David Y, Park SJ, Choi JI. A chimeric two-component regulatory system-based *Escherichiacolibiosensor* engineered to detect glutamate[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(2): 335-349
- [15] Shimada T, Takada H, Yamamoto K, Ishihama A. Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets[J]. *Genes to Cells*, 2015, 20(11): 915-931
- [16] O'Connell-Motherway M, Van Sinderen D, Morel-Deville F, Fitzgerald GF, Ehrlich SD, Morel P. Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363[J]. *Microbiology*, 2000, 146(4): 935-947
- [17] Parkinson JS. Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 101-122
- [18] Williams SB, Stewart V. Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 33(6): 1093-1102
- [19] Stuffle EC, Johnson MS, Watts KJ. PAS domains in bacterial signal transduction[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2021, 61: 8-15
- [20] Amezcua CA, Harper SM, Rutter J, Gardner KH. Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain[J]. *Structure*, 2002, 10(10): 1349-1361
- [21] Hefti MH, François KJ, De Vries SC, Dixon R, Vervoort J. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(6): 1198-1208
- [22] 王文栋, 束梅影, 张达艳, 徐世清. 家蚕昼夜节律生物钟基因的生物信息学分析[J]. *四川动物*, 2016, 35(2): 275-282
Wang WD, Shu MY, Zhang DY, Xu SQ. Bioinformatics analysis of circadian rhythm biological clock genes in *Bombyx mori*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2016, 35(2): 275-282 (in Chinese)
- [23] Hu T, Zhang YS, Cui Y, Zhao C, Jiang X, Zhu X, Wang Y, Qu X. Technological properties assessment and two component systems distribution of *Streptococcusthermophilus* strains isolated from fermented milk[J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(4): 567-580
- [24] Thevenard B, Besset C, Choinard S, Fourcassié P, Boyaval P, Monnet V, Rul F. Response of *S. thermophilus* LMD-9 to bacitracin: involvement of a BceRS/AB-like module and of the rhamnose-glucose polysaccharide synthesis pathway[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 177(5): 89-97
- [25] Fontaine L, Boutry C, Guédon E, Guillot A, Ibrahim M, Grossiord B, Hols P.. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcusthermophilus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(20): 7195-7205
- [26] Zhang DF, Ye JZ, Dai HH, Lin XM, Li H, Peng XX. Identification of ethanol tolerant outer membrane proteome reveals OmpC-dependent mechanism in a manner of EnvZ/OmpR regulation in *Escherichiacoli*[J].

- Journal of Proteomics, 2018, 179: 92-99
- [27] Zhang CK, Li LZ, Ge HJ, Meng HM, Li Y, Bei WC, Zhou XH. Role of two-component regulatory systems in the virulence of *Streptococcus suis*[J]. Microbiological Research, 2018, 214: 123-128
- [28] Jing Y, Fan J, Glatter T, Sourjik V. Osmosensing by the bacterial PhoQ/PhoP two-component system[J]. PNAS, 2017, 114(50): E10792-E10798
- [29] Yu SJ, Peng YP, Chen WY, Deng YW, Guo YH. Comparative genomic analysis of two-component signal transduction systems in probiotic *Lactobacillus casei*[J]. Indian Journal of Microbiology, 2014, 54(3): 293-301
- [30] Shankar M, Mohapatra SS, Biswas S, Biswas I. Gene regulation by the LiaSR two-component system in *Streptococcus mutans*[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128083
- [31] Meehl M, Herbert S, Götz F, Cheung A. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(8): 2679-2689
- [32] Herbert S, Bera A, Nerz C, Kraus D, Peschel A, Goerke C, Meehl M, Cheung A, Götz F. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in *Staphylococci*[J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(7): e102
- [33] Sun G, Sharkova E, Chesnut R, Birkey S, Duggan MF, Sorokin A, Pujic P, Ehrlich SD, Hulett FM. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(5): 1374-1385
- [34] Kobayashi K, Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida K, Ogasawara N, Tanaka T, Fujita Y. Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(24): 7365-7370
- [35] Jung K, Fabiani F, Hoyer E, Lassak J. Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing[J]. Open Biology, 2018, 8(4): 180023
- [36] Hackmann TJ, Firkins JL. Electron transport phosphorylation in rumen butyrovibrios: unprecedented ATP yield for glucose fermentation to butyrate[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 622
- [37] 李柏良, 刘飞, 于上富, 杜金城, 靳姐, 蒙月月, 李娜, 闫芬芬, 霍贵成. 有氧呼吸对乳酸乳球菌代谢途径的影响及其潜在应用展望[J]. 食品工业科技, 2016, 37(19): 372-376
- Li BL, Liu F, Yu SF, Du JC, Jin D, Meng YY, Li N, Yan FF, Huo GC. Impact of aerobic respiration on metabolic pathway of *Lactococcus lactis* and the prospect of potential application[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(19): 372-376 (in Chinese)
- [38] Takada H, Yoshikawa H. Essentiality and function of WalK/WalR two-component system: the past, present, and future of research[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(5): 741-751
- [39] Nozadze E, Arutinova N, Tsakadze L, Shioshvili L, Leladze M, Dzneladze S, Chkadua G. Molecular mechanism of Mg-ATPase activity[J]. The Journal of Membrane Biology, 2015, 248(2): 295-300
- [40] Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G, Perutz MF, Kiger L, Marden MC, Poyart C. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation[J]. Biochemistry, 1994, 33(26): 8067-8073
- [41] Rebbapragada A, Johnson MS, Harding GP, Zuccarelli AJ, Fletcher HM, Zhulin IB, Taylor BL. The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior[J]. PNAS, 1997, 94(20): 10541-10546
- [42] Bibikov SI, Biran R, Rudd KE, Parkinson JS. A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(12): 4075-4079
- [43] Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors[J]. Nature, 1993, 364(6434): 259-262
- [44] Chen C, Zhao SS, Hao GF, Yu H, Tian HX, Zhao GZ. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: a review[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 201:S316-S330
- [45] McNeely K, Xu Y, Ananyev G, Bennette N, Bryant DA, Dismukes GC. *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 nifJ mutant lacking pyruvate: ferredoxin oxidoreductase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2435-2444
- [46] 谢翔, 公丕民, 刘奥, 张鸿伟, 仝令君, 易华西, 王亚威, 刘同杰, 张兰威. 商业发酵剂中乳酸乳球菌发酵风味特性及其化学表征的研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 152-162
- Xie X, Gong PM, Liu A, Zhang HW, Tong LJ, Yi HX, Wang YW, Liu TJ, Zhang LW. Fermentation flavor characteristics and chemical characterization of *Lactococcus lactis* in commercial starters[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 152-162 (in Chinese)
- [47] Reale A, Renzo TD, Zotta T, Preziuso M, Boscaino F,

- Ianniello R, Storti LV, Tremonte P, Coppola R. Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation[J]. LWT, 2016, 73: 622-629
- [48] Reale A, Ianniello RG, Ciocia F, Di Renzo T, Boscaino F, Ricciardi A, Coppola R, Parente E, Zotta T, McSweeney PLH. Effect of respirative and catalase-positive *Lactobacillus casei* adjuncts on the production and quality of Cheddar-type cheese[J]. International Dairy Journal, 2016, 63: 78-87
- [49] Li N, Huang Y, Liu Z, You C, Guo B. Regulation of EPS production in *Lactobacillus casei* LC2W through metabolic engineering[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(6): 555-561
- [50] Ge XY, Xu Y, Chen X, Zhang LY. Regulation of metabolic flux in *Lactobacillus casei* for lactic acid production by overexpressed *ldhL* gene with two-stage oxygen supply strategy[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(1): 81-88
- [51] Jiang LY, Liu Y, Yan GD, Cui YX, Cheng QY, Zhang ZX, Meng QF, Teng LR, Ren XD. Aeration and fermentation strategies on nisin production[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(10): 2039-2045
- [52] Ianniello RG, Zotta T, Matera A, Genovese F, Parente E, Ricciardi A. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0164065
- [53] Rochat T, Gratadoux JJ, Gruss A, Corthier G, Maguin E, Langella P, Van De Guchte M. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5143-5149
- [54] Wang GH, Yin S, An HR, Chen SW, Hao YL. Coexpression of bile salt hydrolase gene and catalase gene remarkably improves oxidative stress and bile salt resistance in *Lactobacillus casei*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(8): 985-990
- [55] 王芳, 张志军, 李会珍. 乳酸菌呼吸作用研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(2): 6
Wang F, Zhang ZJ, Li HZ. Respiration metabolism for lactic acid bacteria[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2014, 41(2): 6
- [56] Pedersen MB, Gaudu P, Lechardeur D, Petit MA, Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2012, 3: 37-58