

· 工业生物技术 ·

转运蛋白提高凝结芽孢杆菌酸耐受性

李静^{1,2}, 王玉^{1,2}, 于波², 王丽敏^{2*}, 鞠建松^{1,3*}

1 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050024

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

3 河北省生态环境协同创新中心, 河北 石家庄 050024

李静, 王玉, 于波, 王丽敏, 鞠建松. 转运蛋白提高凝结芽孢杆菌酸耐受性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3394-3405.

LI Jing, WANG Yu, YU Bo, WANG Limin, JU Jiansong. Using transporter to enhance the acid tolerance of *Bacillus coagulans* DSM1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3394-3405.

摘要: 光学纯乳酸作为可降解生物材料——聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)的前体物质, 正在受到广泛关注。乳酸发酵过程中酸性产物的积累会影响菌株的生长, 提高菌株酸耐受性具有重要意义。本研究以乳酸生产菌株凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) DSM1 为出发菌株, 通过对凝结芽孢杆菌 DSM1 及其乳酸脱氢酶双敲除菌株($\Delta ldhL1\Delta ldhL2$)进行比较转录分析, 筛选酸耐受相关的转运蛋白基因。对关键基因 *RS16330*、*RS06895*、*RS16325*、*RS10595*、*RS00500*、*RS07275*、*RS10635* 及 *RS01930* 进行实时定量 PCR 分析, 发现基因 *RS06895*、*RS10595*、*RS00500* 和 *RS10635* 在发酵 12 h 和 24 h 转录水平显著增强。过表达 *RS10595* 基因的菌株, 在中性(pH 6.0)条件下生长状况和发酵性能均受到抑制, 但在酸性条件下(pH 4.6), 其乳酸生成相比对照组显著提高。上述结果表明, *RS10595* 基因与菌株 DSM1 的酸耐受性密切相关。本研究有助于进一步探究凝结芽孢杆菌酸耐受的机制, 也为构建耐酸菌株提供了基础。

关键词: 凝结芽孢杆菌 DSM1; 乳酸; 转运蛋白; 比较转录; 基因表达

资助项目: 国家自然科学基金(32070026, 31971204); 河北省自然科学基金(C2020205004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070026, 31971204) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2020205004).

*Corresponding authors. E-mail: JU Jiansong, jujs521@hebtu.edu.cn; WANG Limin, wanglimin@im.ac.cn

Received: 2022-12-07; Accepted: 2023-04-06; Published online: 2023-04-07

Using transporter to enhance the acid tolerance of *Bacillus coagulans* DSM1

LI Jing^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, YU Bo², WANG Limin^{2*}, JU Jiansong^{1,3*}

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Hebei Collaborative Innovation Center for Eco-Environment, Shijiazhuang 050024, Hebei, China

Abstract: As the precursor of polylactic acid (PLA), optically pure L-lactic acid production is attracting increasing attention. The accumulation of lactic acid during fermentation inhibits strain growth. Therefore, it is necessary to improve the acid tolerance of lactic acid producers. In this study, comparative transcriptomic analysis was performed to investigate the effects of transporters on lactic acid tolerance of *Bacillus coagulans* DSM1, which is an L-lactic acid producer. The genes with more than two-fold up-regulation in transcriptional profile were further verified using real-time PCR. The transcriptional levels of *RS06895*, *RS10595*, *RS10595*, *RS00500*, *RS00500*, *RS10635* and *RS10635* were enhanced during lactic acid fermentation. Strain overexpressing *RS10595* exhibited a retarded cell growth and low lactic acid production at pH 6.0, but an improved lactic acid production at pH 4.6. This study may facilitate the investigation of the acid tolerance mechanism in *B. coagulans* DSM1, as well as the construction of efficient lactic acid producers.

Keywords: *Bacillus coagulans* DSM1; lactic acid; transporter; comparative transcription; gene expression

乳酸是最广泛的羟基羧酸，同时也是一种重要的工业产品，具有巨大的经济应用价值，同时，随着生物可降解塑料聚乳酸产业的兴起和发展，乳酸作为其前体物质备受关注^[1-3]。目前，绝大多数的乳酸以微生物发酵法合成，该方法获得的乳酸具有很高的光学纯度^[4]。乳酸通过不同的微生物发酵生成，如细菌、霉菌、酵母菌和藻类等，主要以细菌为主^[5]。常用的乳酸发酵细菌有传统乳酸菌(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 4类^[5]。多数传统乳酸菌代谢途径存在缺陷，需要复杂的营养物质^[6-9]；大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌乳酸产率低[≤ 1.0 g/(L·h)]，乳酸耐受性差^[10-11]；与上述

菌株相比，芽孢杆菌具有明显的优势，如培养基不必灭菌、微氧发酵能耗低等^[12-13]。

乳酸发酵过程中，酸性条件是菌株面临的极重要也是最严峻的生存挑战之一^[14]。酸性产物的积累会造成细胞生存环境酸化从而导致细胞生长的停滞甚至细胞死亡^[15]，以及影响产物乳酸的生产。因此提高菌株的酸耐受性对菌株生长和产物乳酸的生成具有不容忽视的意义。酸性物质积累条件下，乳酸菌可以进行一系列复杂的自我调控和应激反应来维持细胞的稳态和正常的生理代谢活动。大量研究表明，酸性条件下，菌株可通过碱性物质的生成、脱羧反应等 pH 的调节来应对酸物质积累对菌株生长的影响^[14]。细胞膜作为隔离细胞内外环境的屏

障,可以通过改变细胞膜的结构及组成成分的构象等来抵御酸性条件对细胞生长代谢的影响^[16], Montanari 等^[17]的研究表明,乳酸菌常见的应对酸性条件的方式之一是改变细胞膜组成中脂肪酸的含量和种类;酸性条件下,耐酸乳杆菌的细胞膜和细胞壁的厚度明显增加,可有效阻止乳酸进入胞内,抵御胞外的酸物质积累对菌株生长和产物生成的影响,而细胞壁中肽聚糖含量的增加也可以抵御酸性条件对菌株生长的影响^[18]。随着酸性处理时间的延长,细胞内部的生物大分子会出现蛋白质折叠错误等现象,从而抑制菌株正常的生理活动。应激蛋白,如热休克蛋白,可以对生物大分子进行保护及修复,此外,分子伴侣蛋白和应激蛋白表达的增强也有利于提高细胞对酸物质的抗性^[19]。尽管大量研究已经阐明了乳酸菌在酸性条件下细胞存活机制,但是凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)酸耐受关键因子尚缺乏研究。

本研究以凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*) DSM1 为乳酸生产的出发菌株,利用比较转录组学方法对比分析了 *B. coagulans* DSM1 乳酸积累前后差异表达的转运蛋白编码基因。基于文献报道和 *B. coagulans* DSM1 基因组信息,对差异显著的基因进行了功能分析。分别在乳酸发酵 6、12 和 24 h 取样进行实时定量 PCR 验证,筛选与酸响应相关的关键因子,为进一步提高菌株酸耐受性提供了理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

E. coli DH5 α 购自擎科生物科技(北京)有限公司;*B. coagulans* DSM1 (GenBank: CP009709.1)、*B. coagulans* DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 (L-乳酸脱氢酶双敲菌株)、*B. coagulans* DSM1- Δ lutP (乳酸转运蛋白敲除菌株)由本实验室保藏;表达载体

pNW33n 由本实验室保藏。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10,琼脂粉 15 (配制固体培养基时添加);BC 培养基(g/L):酵母粉 10,磷酸氢二铵 2,硫酸铵 3.50, Bis-Tris 10,蔗糖 50,氯化钙 3,氯化镁 5,六水合氯化钴 1,二水合氯化铜 0.05,硼酸 1.50,二水合钼酸钠 0.15,六水合硫酸镍 0.10,四水合氯化锰 0.15,氯化锌 0.25,琼脂粉 15 (配制固体培养基时添加),氯化镁 1 (配制固体培养基时,灭菌后添加) (pH 6.6–6.7);电转缓冲液(g/L):蔗糖 171.15,甘油 100,氯化镁 0.38 (pH 4.0–5.0);复苏培养基(g/L):BC 培养基+葡萄糖 10;发酵培养基(513 培养基) (g/L):葡萄糖 50,酵母粉 10,轻质碳酸钙 30。

1.3 RNA-seq 数据分析

样本 D-5 为 *B. coagulans* DSM1 在 513 液体培养基培养 5 h 得到的样本,样本 Q-2 为 L-乳酸脱氢酶双敲菌株 *B. coagulans* DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 在 513 液体培养基培养 4 h 得到的样本。

北京诺禾致源科技股份有限公司完成了样本 D-5 和 Q-2 的 RNA 文库构建,文库构建完成后通过 CASAVA 碱基识别(base calling)分析将高通量测序(如 Illumina HiSeqTM2500/MiSeqTM)得到的原始图像数据文件转化为原始序列,将原始序列通过去除带接头(adapter)的 reads,去除低质量 reads (质量值 $Q_{\text{pred}} \leq 20$ 的碱基数占整个 read 长度的 50%以上的 reads)等进行过滤得到 clean reads,即参考序列。采用 Bowtie2 将参考序列进行基因组定位分析并输出比对结果。采用 HTSeq 软件对各样品进行基因表达水平分析,使用的模型为 union,通过所有基因的 FPKM (fragments per kb per million reads)值比较基因表达水平。基于基因表达水平分析中得到的 readcount 数据判断差异表达基因。使用 R 包中

的 GSeq 对差异表达的基因进行基因本体论 (gene ontology, GO)富集分析, 展示富集最显著的 30 个 GO term; 使用 KOBAS (2.0)进行途径 (pathway)显著性富集分析, 确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径, 展示富集最显著的 20 条 pathway 条目。

1.4 目的基因的克隆及表达

使用 Primer Premier 5 软件设计引物。使用 PrimeSTAR DNA 高保真聚合酶分别扩增目的基因片段, 根据基因组信息设计引物(表 1), 以 *B. coagulans* DSM1 基因组 DNA 为模板, 分别用引物对 RS00500-E-F/RS00500-E-R、RS06895-E-F/RS06895-E-R、RS10595-E-F/RS10595-E-R 和 RS10635-E-F/RS10635-E-R 扩增 4 个转运关键基因 *RS00500*、*RS06895*、*RS10595* 和 *RS10635* 用于构建过表达质粒。表达载体 pNW33n 经 *EcoR* I、*Hind* III 酶切形成线性载体, Gibson 连接方式^[20]将目的基因与线性表达载体连接, 化学转化方式进入 *E. coli* DH5 α , 利用 100 μ g/mL 的氨苄青霉素筛选转化子, 利用载体上目的基因外侧的引物 pNW33n-repB-r 和 RS00500-E-F/R、RS06895-E-F/R、RS10595-E-F/R 和 RS10635-E-F 分别对 pNW33n-*RS00500*、pNW33n-*RS06895*、pNW33n-*RS10595* 和 pNW33n-*RS10635* 进行菌落 PCR 验证, 经过验证的单菌落进行质粒提取并送测序, 验证正确的转化子通过电转化的方式进入 *B. coagulans* DSM1- Δ lutP。

1.5 菌株活化、菌株生长状况的检测、乳酸发酵及测定

1.5.1 菌株活化

含有重组质粒的 *E. coli* DH5 α 接种于 LB 液体培养基(含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素), 恒温 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h; *B. coagulans* DSM1 和 *B. coagulans* DSM1- Δ lutP 接种于 BC 无抗液体培养基中, 45 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 12 h; 含有

表 1 本文使用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
RS00500-F	ATTCGCTGCAATCACAAA
RS00500-R	GCTTACCGGCATCCTTC
RS06895-F	AATAAGCGCCACCACTC
RS06895-R	AAACATCTGCTCCCTAATACA
RS10595-F	CATAAGCACGGCCATAAAG
RS10595-R	ATCAATCGGCTGGGTCA
RS10635-F	AGGCGGAAACAGCACG
RS10635-R	TGAGCCGCTTTACAACAA
RS01930-F	CCGCCGTTATTTGTCGC
RS01930-R	GCATTGAAATGGTCCAGCA
RS16330-F	CACTGGCGGAAAGGGAA
RS16330-R	ACCCGAAGCCGAGAT
RS07275-F	AAGCACGACCTGGAGCG
RS07275-R	CCGAAACGAAAGAACAAAGA
RS16325-F	GCTGTCGGCGGTGATT
RS16325-R	GCCGCTTGTCGGAAAC
16S-F	ACGCGAAGAACCTTACCA
16S-R	CCTTAGAGTGCCCAACTGAAT
RS00500-E-F	GTTCTCTCTGATTGTGAAATTGAAT TCTCAACAGGGGAGTCCGTT
RS00500-E-R	TGACCATGATTACGCCAAGCTTTTA ATCCCTCCGTCTGATGCGT
RS06895-E-F	GTTCTCTCTGATTGTGAAATTGAAT TCTCACCTCCTCAGCTTCGGATCG
RS06895-E-R	TGACCATGATTACGCCAAGCTTGC ACTGGTCCGAAAAGAAGC
RS10595-E-F	GTTCTCTCTGATTGTGAAATTGAAT TCTCAGACAACCTGAAACAAAGCC CG
RS10595-E-R	TGACCATGATTACGCCAAGCTTAG GGCGCAGGGTGAAC
RS10635-E-F	GTTCTCTCTGATTGTGAAATTGAAT TCTTATGATTCCGTTACAGGTTTTA CCTGCC
RS10635-E-R	TGACCATGATTACGCCAAGCTTAA AACTTTAG AATTTTATCCTTGACAGTTCATT GC
pNW33n-repB-r	ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AG

重组质粒的 *B. coagulans* DSM1 和 *B. coagulans* DSM1- Δ lutP 接种于 BC 液体培养基(含有 7 μ g/mL 氯霉素), 45 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 12 h。

1.5.2 菌株生长状况的检测

发酵液添加 6 mol/L 盐酸去除轻质碳酸钙; 再加无菌蒸馏水稀释至 OD_{600} 为 0.2–0.8, 得到的读数乘以稀释倍数即为菌液的实际 OD_{600} 的值。

1.5.3 乳酸发酵

为了排除乳酸转运蛋白的影响, 以 *B. coagulans* DSM1- Δ lutP 为底盘菌株开展目的基因的过表达实验。将 *B. coagulans* DSM1 和 *B. coagulans* DSM1- Δ lutP 接至无抗 BC 液体培养基中, 45 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 12 h 让菌体生长, 10%接种量转接至 513 培养基, 50 $^{\circ}$ C、120 r/min 发酵培养; *B. coagulans* DSM1- Δ lutP-pNW33n-RS00500、*B. coagulans* DSM1- Δ lutP-pNW33n-RS06895、*B. coagulans* DSM1- Δ lutP-pNW33n-RS10595、*B. coagulans* DSM1- Δ lutP-pNW33n-RS10635 和 *B. coagulans* DSM1-pNW33n-RS10595 接种于 BC 液体培养基(含有 7 μ g/mL 氯霉素), 45 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 12 h 让菌体生长, 10%接种量转接至 513 培养基, 50 $^{\circ}$ C、120 r/min 发酵培养。发酵液离心取上清, 稀释 100 倍后使用 SBA-40D 生物传感分析仪测定乳酸含量和葡萄糖含量; 按照 1.5.2 的方法测定菌株生长结果, 每批实验每个菌株均设置 3 个平行重复。

1.6 RNA 的提取, cDNA 生成和 qRT-PCR

B. coagulans DSM1 在发酵培养基(513 液体培养基)发酵, 分别在 6、12 h 和 24 h 收集细胞。使用 E.Z.N.A. 细菌 RNA 试剂盒(Omega)提取总 RNA。总 RNA 浓度通过 260 nm 处的吸光度测定(NanoVue 分光光度计; GE)。参考 Fast Quant RT Kit (with gDNase) (Tiangen)试剂盒的方法合成 cDNA 拷贝, 使用 SYBR Cyclor 96

RT-PCR 检测系统(SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa)扩增。将 2 μ L cDNA 作为模板, 加入 20 μ L 实时 PCR 混合物, 加入 10 pmol 的基因特异性引物。测定不同 cDNA 浓度的每个 PCR 的阈值周期(C_t), 并与同时分析的标准 DNA (16S rRNA 基因)的阈值周期进行比较。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法测定 mRNA 水平。每组数据重复 4 次, 结果为不同 cDNA 样品的相对表达量。本文使用以下 9 个引物对进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析: RS00500-F/RS00500-R、RS06895-F/RS06895-R、RS10595-F/RS10595-R、RS10635-F/RS10635-R、RS01930-F/RS01930-R、RS16330-F/RS16330-R、RS07275-F/RS07275-R、RS16325-F/RS16325-R 和 16S-F/16S-R。

2 结果与分析

2.1 乳酸积累条件下基因表达分析

在 OD_{600} 相同的条件下提取样本 D-5 和样本 Q-2 的 RNA, 进行比较转录组分析。样本 D-5 为在 513 液体培养基中培养 5 h 的 *B. coagulans* DSM1, 具有乳酸生成能力, 样本 Q-2 为在 513 液体培养基中培养 4 h 的 *B. coagulans* DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 (敲除了 2 个 L-乳酸脱氢酶基因), 不具备乳酸生成能力, 因此, 样本 D-5 为乳酸响应样本。由图 1A 可知, D-5 和 Q-2 共有 817 个差异表达的基因, 其中 450 个上调, 367 个下调; 分析图 1B 可知, 图中横坐标(rich factor)代表富集程度, 即该代谢路径下差异基因数目与所有注释到该路径基因数目的比值, 数值越大表示富集程度越大; 纵坐标是富集程度较高的通路名称^[21]。2 个样本基因表达 KEGG 富集分析结果显示, 富集到 ABC transporters 达 50 个。GO 富集是功能富集, 即基因集(多个基因)可能显著的集中

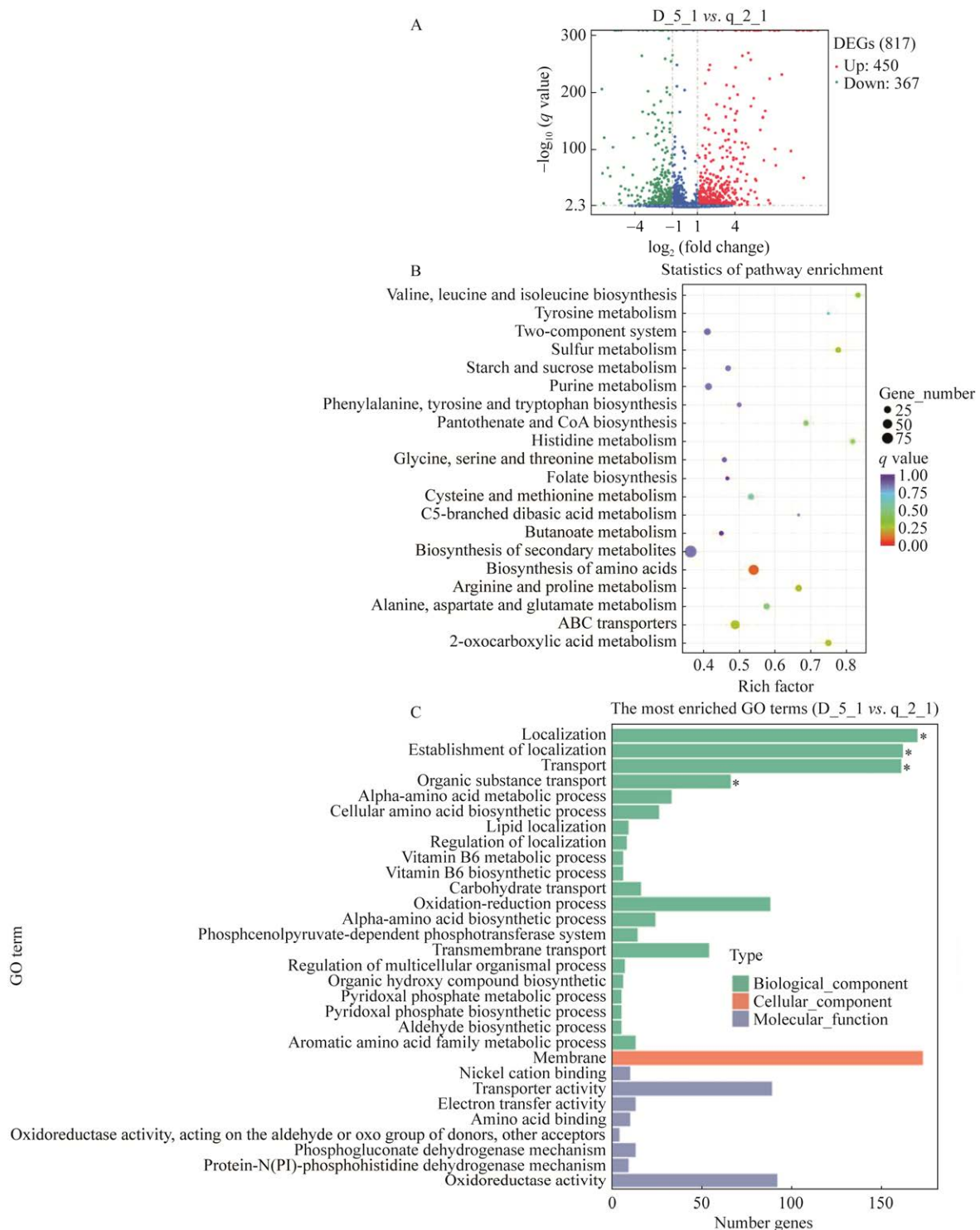


图1 D-5和Q-2在相同 OD_{600} 条件下比较转录分析基因差异表达情况(A)、基因表达KEGG富集结果(B)、差异基因GO富集结果(C) D-5-1为*B. coagulans* DSM1; Q-2-1为*B. coagulans* DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2

Figure 1 Comparative transcription analysis of D-5 and Q-2 under the same OD_{600} conditions. Gene differential expression (A). Gene expression KEGG enrichment results (B). Differential gene GO enrichment results (C). D-5-1 was *B. coagulans* DSM1, Q-2-1 was *B. coagulans* DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2.

在哪些功能, GO 数据库分别从生物学过程 (biological process, BP)、细胞定位 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 对基因产物进行了标准化描述, 即对基因产物进行简单注释^[21]。分析图 1C 可知, 图中横坐标为基因数目, 纵坐标为 GO term (即 GO 功能), GO 富集结果显示, 2 个样本在生物学过程方面具有显著性的功能簇包含有转运相关基因, 包括 ABC 转运蛋白 (ABC transporter)、ATP 结合蛋白 (ATP-binding protein)、ABC 转运体渗透酶 (ABC transporter permease)、胆汁酸-钠转运体家族蛋白 (bile acid: sodium symporter family protein)、钠-溶质转运体 (sodium: solute symporter)、APC 家族渗透酶 (APC family permease)、PTS 糖转运体亚基 (PTS sugar transporter subunit) IIC、MFS 转运蛋白 (MFS transporter)、PTS 糖转运体亚基 (PTS sugar transporter subunit) IIA、PTS 甘露糖/果糖/山梨糖转运体亚基 (PTS mannose/fructose/sorbose transporter subunit) IIB、D-丙氨酸/D-丝氨酸/D-甘氨酸渗透酶 (D-alanine/D-serine/D-glycine permease)、铵转运体 (ammonium transporter)、海藻糖渗透酶 (trehalose permease) IIC, 而在细胞定位方面和分子功能方面无显著性基因。

2.2 酸耐受关键基因实时定量分析

经文献调研, MFS 家族 (major facilitator superfamily) 和 ABC 转运蛋白家族的转运元件都可以行使羧酸转运功能, 与酸耐受具有相关性, 结合比较转录组分析结果, 初步选定以下 8 个转录水平较高的基因进行研究 (表 2): *RS16330*、*RS06895*、*RS16325*、*RS10595*、*RS00500*、*RS07275*、*RS10635* 和 *RS01930*。*B. coagulans* DSM1 在 513 培养基中发酵, 分别取发酵 6、12、24 h 的发酵液提取 RNA 进行

qPCR 分析, 以 6 h 为对照, 分析 12 h 和 24 h 以上 8 个基因的相对表达量, 分析图 2 结果可知, *RS06895*、*RS10595*、*RS00500*、*RS10635* 这 4 个基因的相对表达量明显上调, 其中, 相对于发酵 6 h, *RS06895* 基因发酵 12 h 相对表达量上调 47 倍, 发酵 24 h 上调 277 倍; *RS10595*

表 2 酸性物质积累后转录水平上调的重要基因
Table 2 Important genes with up-regulated transcription levels after acid accumulation

Gene name	Gene annotation	log ₂ (fold_change)
<i>RS16330</i>	ABC transporter permease	5.94
<i>RS06895</i>	ABC transporter permease	5.69
<i>RS16325</i>	ABC transporter permease	5.64
<i>RS10595</i>	ABC transporter ATP-binding protein	2.88
<i>RS00500</i>	MFS transporter	3.99
<i>RS07275</i>	permease	1.70
<i>RS10635</i>	MFS transporter	1.76
<i>RS01930</i>	MFS transporter	1.60

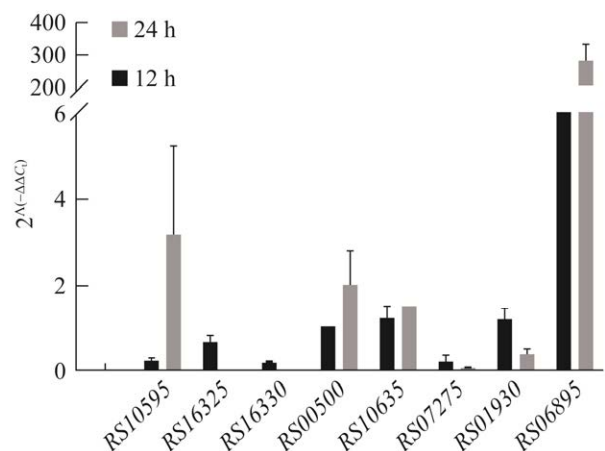


图 2 中性条件下 (pH 6.0) 8 个基因 (*RS10595*、*RS16325*、*RS16330*、*RS00500*、*RS10635*、*RS07275*、*RS01930*、*RS06895*) 在生长 12 h 和 24 h 的转录水平与 6 h 的比较

Figure 2 The transcription levels of 8 genes (*RS10595*, *RS16325*, *RS16330*, *RS00500*, *RS10635*, *RS07275*, *RS01930*, *RS06895*) at 12 h and 24 h of growth compared with 6 h, at pH 6.0.

基因发酵 12 h 相对表达量上调 0.2 倍, 发酵 24 h 相对表达量上调 3.2 倍; *RS00500* 基因发酵 12 h 相对表达量上调 1 倍, 发酵 24 h 相对表达量上调 1.9 倍; *RS10635* 基因发酵 12 h 相对表达量上调 1.2 倍, 发酵 24 h 相对表达量上调 1.5 倍。

2.3 酸响应关键基因过表达分析

将 *RS06895*、*RS10595*、*RS00500*、*RS10635* 4 个基因进行过表达, 分别在 pH 4.6 和 pH 6.0 的条件下发酵 24 h, 如图 3 所示, 在 pH 6.0 条件下, *B. coagulans* DSM1- Δ *lutP* 对照菌株发酵

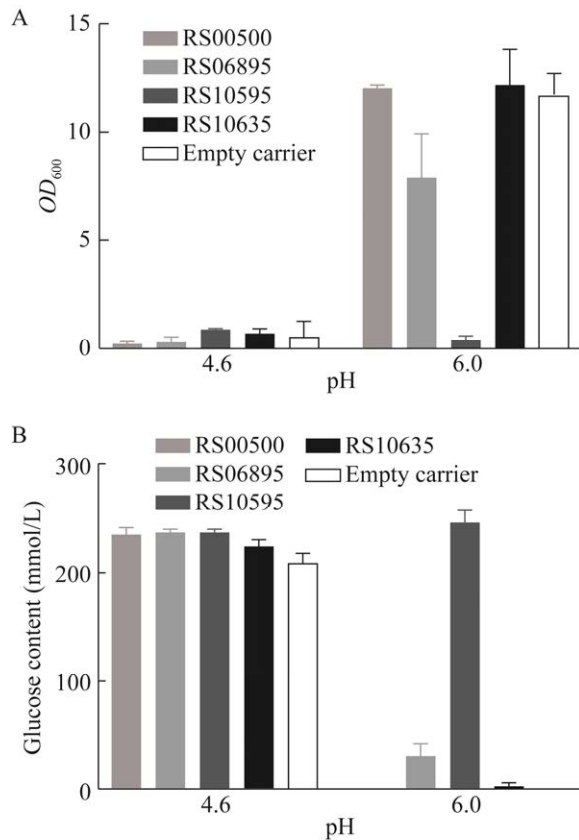


图 3 在 pH 为 4.6 和 6.0 条件下基因过表达对菌株的生长(A)及葡萄糖残留(B)的影响

Figure 3 Effect of individually overexpressing each of the 4 genes (*RS06895*, *RS10595*, *RS00500*, *RS10635*) on growth (A) and residual glucose (B) at pH 4.6 and 6.0, respectively.

24 h, OD_{600} 达到 12, 葡萄糖残余量为 0 mmol/L; *RS10595* 基因过表达之后, 菌体生长受到影响, 培养至 24 h 时 OD_{600} 仅达到 0.4, 底物葡萄糖不消耗, 24 h 时葡萄糖残余量为 250 mmol/L (513 培养基灭菌后葡萄糖含量), 猜测 *RS10595* 基因可能是酸耐受的关键因子。过表达 *RS06895* 基因, 培养至 24 h 时 OD_{600} 达到 7.7, 葡萄糖残余量为 31 mmol/L; 过表达 *RS00500* 基因, 培养至 24 h 时 OD_{600} 达到 12.0, 葡萄糖残余量为 0 mmol/L; 过表达 *RS10635* 基因, 培养至 24 h 时 OD_{600} 达到 12, 葡萄糖残余量为 0 mmol/L; 过表达 *RS06895*、*RS00500* 基因和 *RS10635* 基因的菌株生长情况与 *B. coagulans* DSM1- Δ *lutP* 对照菌株的生长情况大致相同。在 pH 4.6 条件下, 与 *B. coagulans* DSM1- Δ *lutP* 对照菌株相比, *RS10595* 基因过表达之后, 菌体生长有优势, 培养至 24 h 时 OD_{600} 达到 0.8, 对照菌株培养至 24 h 时 OD_{600} 仅达到 0.3, 该结果说明酸性条件下过表达 *RS10595* 基因能够提高菌株生长性能。

2.4 在酸性条件下关键因子的乳酸发酵性能

由实验 2.3 结果可知, 酸性条件下(pH 4.6)过表达酸耐受关键基因 *RS10595* 可改善菌株的生长。为了研究酸性条件下过表达基因 *RS10595* 对 *B. coagulans* DSM1 乳酸发酵性能的影响, 将构建的重组菌株 *B. coagulans* DSM1-pNW33n-*RS10595* 在 pH 为 4.6 的条件下发酵 24 h, 由图 4 可知, 对照菌株 *B. coagulans* DSM1 发酵 24 h, 其乳酸生成量为 9 mmol/L, 而过表达 *RS10595* 基因发酵 24 h, 乳酸生成量为 45 mmol/L, 是对照菌株乳酸生成量的 5 倍。这个结果充分证实了酸耐受基因 *RS10595* 过表达能够提高乳酸发酵性能。

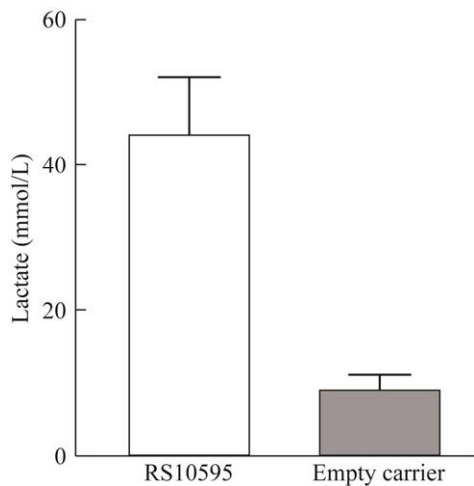


图4 pH 4.6条件下过表达RS10595基因的乳酸产量

Figure 4 The production of lactate with overexpression of gene RS10595 at pH 4.6.

3 讨论与结论

乳酸是一种弱有机酸，是重要的三碳平台化合物，工业上主要的生产方法是微生物发酵法。工业化菌株微生物发酵产酸性产物过程，胞内有机酸以解离的质子和酸根离子形式存在，破坏胞内pH的稳态。为了维持胞内pH的稳态，微生物细胞自身进化了多种自我调控机制来维持pHi(胞内pH)的动态平衡，如H⁺-ATPase、酸转运系统等^[15,22]。微生物发酵法生产乳酸的过程中，酸性产物的积累严重影响了菌株的生长和主要产物乳酸的合成。目前工业上主要通过添加碱性物质的方法来中和酸性产物，改善细胞生长的环境，但这种方法会造成副产物的生成，提高下游提取成本且造成环境污染^[23-24]。因此，提高菌株耐酸性具有重要意义。

菌株对酸的耐受能力会直接影响菌株的生存生长状况。酸性条件下，菌株可以通过以下几种机制应对酸性条件对菌株的影响：苹果酸-乳酸

发酵(malolactic fermentation, MLF)、H⁺-ATP泵等维持pHi的稳定；分子伴侣、应激蛋白等发挥保护和修复作用，从蛋白层面维持胞内动态平衡；一些转录调控因子可通过调控基因的表达水平来提高菌株对酸性条件的耐受性，研究已知，σ因子可以感应细胞内部的变化来调节靶基因的表达来抵御酸物质积累，在原核生物中，双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCS)也是菌株应对酸物质积累的重要机制之一^[14]。在革兰氏阳性菌中，Clp家族的ClpXP、ArsC家族的Spx等均参与菌株在酸物质积累条件下的自我调控^[25-27]。细胞壁在细胞应对环境压力的过程中也发挥着重要作用^[14]。目前的研究已经从细胞结构、细胞生理等方面阐释了菌株在酸物质积累条件下的生存方式。

为了探究*B. coagulans* DSM1酸耐受机制，将在513液体培养基中培养5h的*B. coagulans* DSM1(样本D-5)与在513液体培养基中培养4h的*B. coagulans* DSM1Δ*ldhL1*Δ*ldhL2*(样本Q-2)在OD₆₀₀相同的条件下进行比较转录组分析。根据转录组结果分析，2个样本共有450个表达上调的差异基因。GO富集分析表示基因集(多个基因)可能显著地集中在哪些功能，如生物学过程、细胞定位和分子功能。本研究将2个样本进行GO富集分析，发现其在生物学过程方面具有显著性的功能簇包含转运相关基因。KEGG富集分析是观察样本的差异基因在哪些通路上具有富集，KEGG富集分析过程中rich factor代表富集程度，其数值越大表示富集程度越大，通过对2个样本差异表达基因进行KEGG富集分析，得到50个ABC transporters基因。基于比较转录组的分析结果，本文选择RS16330、RS06895、RS16325、RS10595、RS00500、RS07275、RS10635、RS01930这8个

转运基因,进行实时定量 PCR,相比于发酵 6 h,发酵 12 h 和 24 h 相对表达量有不同程度的上调,验证结果与比较转录分析结果一致。上述 8 个基因中, *RS06895*、*RS10595*、*RS00500*、*RS10635* 这 4 个基因的相对表达量上调明显。

实验室前期试验发现, *B. coagulans* DSM1 中存在乳酸转运蛋白基因 *lutP*, 但该基因编码的乳酸转运蛋白只有胞内运输乳酸的能力, 没有胞外运输乳酸的能力^[28]。为排除乳酸转运蛋白对过表达转运基因结果的影响, 将 *RS06895*、*RS10595*、*RS00500*、*RS10635* 这 4 个基因在 *B. coagulans* DSM1- Δ *lutP* 中过表达, 结果显示, 在 pH 6.0 条件下, 过表达 *RS10595* 基因使菌体生长受到抑制。通过比对 *B. coagulans* DSM1 基因组信息并检索文献报道, 发现基因 *RS10595* 编码蛋白是 ATP 转运家族蛋白。本研究使用 AlphaFold 软件预测基因 *RS10595* 编码蛋白的结构, 通过在 PDB 数据库进行蛋白序列比对(<https://www.rcsb.org/>), 发现该蛋白与蛋氨酸转运蛋白 ATP 结合区域相似度较高, 推测该蛋白行使 ATP 结合功能, 该基因的过表达可能导致菌体内部 ATP 紊乱, 从而导致菌体生长受到抑制^[29]。在酸性条件下(pH 4.6), 含过表达基因 *RS10595* 的重组菌株 *B. coagulans* DSM1-pNW33n-*RS10595* 的生长状况较对照菌株 *B. coagulans* DSM1 得到了改善, 其乳酸生成量为对照菌株的 5 倍, 说明关键基因 *RS10595* 可以改善菌株的乳酸发酵性能。

本文通过比较转录组分析及实时定量 PCR 技术确定了耐受酸性条件的转运相关基因, 通过过表达酸耐受关键基因, 监测生长数据, 确定了 *RS10595* 基因为 *B. coagulans* DSM1 酸耐受的关键因子。进一步的实验表明, 过表达基因 *RS10595* 在酸性条件下可以明显提高重组菌株的乳酸发酵性能。

为了对 *RS10595* 基因进行更深入的研究, 本实验正在对 *RS10595* 基因进行同源建模和分子对接^[30], 计划通过对蛋白结构的分析解析 *RS10595* 基因的功能并进行功能验证。本文的研究成果为解析酸耐受基因的表达调控对乳酸生产菌株抗逆性的影响奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] GAO C, MA C, XU P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 930-939.
- [2] ABDEL-RAHMAN MA, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(4): 286-301.
- [3] SINGHVI MS, ZINJARDE SS, GOKHALE DV. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(6): 1612-1626.
- [4] JOHN RP, NAMPOOTHIRI KM, PANDEY A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(3): 524-534.
- [5] 胡金龙. 凝结芽孢杆菌 LA204 高得率高浓度玉米秸秆同步糖化乳酸发酵研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2015.
HU JL. High-efficient and titer lactic acid production from corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using simultaneous saccharification and fermentation[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [6] HOFVENDAHL K, HAHN-HÄGERDAL B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(2/3/4): 87-107.
- [7] LITCHFIELD JH. Lactic acid, microbially produced[M]//*Encyclopedia of Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2009: 362-372.
- [8] REDDY G, ALTAF M, NAVEENA BJ, VENKATESHWAR M, KUMAR EV. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation—a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(1): 22-34.

- [9] SINGH SK, AHMED SU, PANDEY A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(5): 991-1000.
- [10] 张桦宇. 重组大肠杆菌利用蔗糖生产 L-乳酸[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG HY. Production of L-lactic acid from sucrose by engineered *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2020 (in Chinese).
- [11] JIA XQ, LIU P, LI S, LI SS, WEN JP. D-lactic acid production by a genetically engineered strain *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(9): 2117-2124.
- [12] QIN JY, ZHAO B, WANG XW, WANG LM, YU B, MA YH, MA CQ, TANG HZ, SUN JB, XU P. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2-6[J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4359.
- [13] ZHAO B, WANG LM, MA CQ, YANG CY, XU P, MA YH. Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus* sp. strain[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(16): 6494-6498.
- [14] 张阳玲. 酸胁迫下乳酸乳球菌细胞壁相关基因调控机制研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG YL. Research on regulation mechanism of genes related cell wall in *Lactococcus lactis* under acid stress[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2020 (in Chinese).
- [15] SERRAZANETTI DI, GUERZONI ME, CORSETTI A, VOGEL R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(7): 700-711.
- [16] YANG YS, KADIM MI, KHOO WJ, ZHENG QW, SETYAWATI MI, SHIN YJ, LEE SC, YUK HG. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella enteritidis* cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 191: 24-31.
- [17] MONTANARI C, SADO KAMDEM SL, SERRAZANETTI DI, ETOA FX, ELISABETTA GUERZONI M. Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(4): 493-502.
- [18] 赵皓静. 耐酸乳杆菌产酸特性及酸胁迫应答机制[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2022.
ZHAO HJ. Acid production characteristics of *Lactobacillus acetotolerans* and its response mechanism to acid stress[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2022 (in Chinese).
- [19] 杨佩珊. 基于跨膜蛋白研究提高 *Lactococcus lactis* NZ9000 酸胁迫抗性[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019.
YANG PS. Based on research of transmembrane protein to improve *Lactococcus lactis* NZ9000 acid stress resistance[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [20] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA III, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [21] LI TH, ZHANG TT, GAO HM, WANG HH, YAN HH, WAN ZH, LIU RX, YIN CH. Tempol modulates lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA networks in ovaries of DHEA induced PCOS rats[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2023, 226: 106175.
- [22] MIRA NP, TEIXEIRA MC, SÁ-CORREIA I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view[J]. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2010, 14(5): 525-540.
- [23] ZHU ZM, YANG JH, YANG PS, WU ZM, ZHANG J, DU GC. Enhanced acid-stress tolerance in *Lactococcus lactis* NZ9000 by overexpression of ABC transporters[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 1-14.
- [24] SUGIYAMA M, AKASE SP, NAKANISHI R, KANEKO Y, HARASHIMA S. Overexpression of ESBP6 improves lactic acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(4): 415-420.
- [25] GUAN NZ, LI JH, SHIN HD, DU GC, CHEN J, LIU L. Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 3991-4008.
- [26] NAKANO S, ZHENG GL, NAKANO MM, ZUBER P. Multiple pathways of Spx (YjbD) proteolysis in

- Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(13): 3664-3670.
- [27] KAJFASZ JK, MARTINEZ AR, RIVERA-RAMOS I, ABRANCHES J, KOO H, QUIVEY RG, LEMOS JA. Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(7): 2060-2068.
- [28] WANG Y, ZHANG CL, LIU GX, JU JS, YU B, WANG LM. Elucidating the role and regulation of a lactate permease as lactate transporter in *Bacillus coagulans* DSM1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(14): e00672-e00619.
- [29] TIAN WZ, QIN JY, LIAN CC, YAO QS, WANG XW. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH[J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 310.
- [30] 焦凌霞, 徐茜茜, 刘媛, 张霄, 刘贝贝, 梁颖, 刘贤金. 基于同源建模与分子对接技术构建抗 Bt Cry1 类毒素单链抗体定点饱和突变库[J]. 现代食品科技, 2016, 32(3): 12-17.
- JIAO LX, XU XX, LIU Y, ZHANG X, LIU BB, LIANG Y, LIU XJ. Site-directed saturation mutagenesis library of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin-specific single-chain antibody fragment by homology modeling and molecular docking[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(3): 12-17 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)