

乳酸对地衣芽孢杆菌HK高密度发酵的影响

赵艳梅, 鲁佳康, 史玥珩, 王彦婷, 黄亚男, 陈雄, 王志

Influences of Lactate on the High-density Fermentation by *Bacillus licheniformis* HK

ZHAO Yanmei, LU Jiakang, SHI Yueya, WANG Yanting, HUANG Yanan, CHEN Xiong, and WANG Zhi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024050140>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

pH耦合柠檬酸补料策略促进地衣芽孢杆菌产芽孢

pH Coupled Citric Acid Feeding Strategy to Promote Spore Production of *Bacillus licheniformis*

食品工业科技. 2023, 44(2): 152-158 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030261>

NaCl胁迫对植物乳植杆菌IMAUJP3抗氧化能力的影响及转录组分析

Effect of NaCl Stress on Antioxidant Capacity of *Lactiplantibacillus plantarum* IMAUJP3 and Transcriptome Analysis

食品工业科技. 2024, 45(24): 167-177 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020203>

凝结芽孢杆菌13002产芽孢条件优化

Optimizing Spore-Forming Conditions of *Bacillus coagulans* 13002

食品工业科技. 2021, 42(6): 88-96,102 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050331>

凝结芽孢杆菌混合碳源乳酸发酵研究

Lactic Acid Fermentation by *Bacillus coagulans* with Mixed Carbon Sources

食品工业科技. 2023, 44(6): 155-161 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050186>

蜡样芽孢杆菌GW-01全基因组测序及生物学特性分析

Whole Genome Sequencing and Biological Characterization of *Bacillus cereus* GW-01

食品工业科技. 2024, 45(7): 167-176 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060031>

不同凝结芽孢杆菌在单一及混合碳源下的发酵特性

Fermentation Characteristics of Different Strains of *Bacillus coagulans* with Single and Mixed Carbon Sources

食品工业科技. 2020, 41(16): 74-80 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.013>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

赵艳梅, 鲁佳康, 史玥珩, 等. 乳酸对地衣芽孢杆菌 HK 高密度发酵的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(7): 151–160. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050140

ZHAO Yanmei, LU Jiakang, SHI Yueya, et al. Influences of Lactate on the High-density Fermentation by *Bacillus licheniformis* HK[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(7): 151–160. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050140

· 生物工程 ·

乳酸对地衣芽孢杆菌 HK 高密度发酵的影响

赵艳梅¹, 鲁佳康¹, 史玥珩¹, 王彦婷¹, 黄亚男², 陈 雄¹, 王 志^{1,*}

(1. 发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵省部共建协同创新中心, 湖北工业大学, 湖北武汉 430068;
2. 河南省南街村(集团)有限公司, 河南临颍 462600)

摘 要: 为了提高地衣芽孢杆菌 HK (*Bacillus licheniformis* HK) 的生物量和芽孢率, 在 20 L 罐水平考察了发酵 16~32 h 耦合 pH7.0 流加乳酸 (终浓度 2.0%) 对其生长代谢及产孢的影响, 并基于转录组与代谢组差异分析了乳酸的代谢调控机制。结果表明: 乳酸补料组的峰值生物量 (30 h) 为 5.43×10^{10} CFU/mL, 较对照 (基础发酵组) 提高 54.3%; 芽孢数为 5.36×10^{10} CFU/mL, 较对照提高 60.0%。乳酸补料组的糖异生和磷酸戊糖途径关键基因 *ldh*、*pckA*、*gapB*、*zwf*、*tkt* 较对照上调 2.8~9.3 倍; 同时, 其标志代谢物丙酮酸、6-磷酸果糖、1,3-二磷酸甘油酸、6-磷酸葡萄糖酸、5-磷酸-核酮糖、7-磷酸景天庚酮糖的丰度较对照增加 1.55~12.6 倍。TCA 循环和氧化磷酸化关键基因 *citZ*、*icd*、*citB*、*odhB*、*atpAB*、*ndh*、*yumB*、*qcrABC*、*ctaODC*、*ythA*、*sdhAB* 表达较对照下调 34.2%~96.8%, 而硝酸盐呼吸代谢基因 *nasBCD* 较对照上调 107.4~287.3 倍。与之相应的胞内关键代谢物顺乌头酸、异柠檬酸和柠檬酸丰度较对照降低 52.6%~62.5%, 而 NAD^+ 、 NADH 丰度较对照增加 1.6 和 2.7 倍。同时, 磷脂酸的前体 3-磷酸甘油、肽聚糖的前体 UDP-N-乙酰胞壁酸和 UDP-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-谷氨酸的丰度较对照提高了 1.5~14 倍; 而且, 芽孢生成相关基因 *phrAC*、*cotP*、*cotA*、*yeeK*、*yheD*、*tasA*、*gerQ*、*yuzJ* 的表达较对照上调 1.4~5.7 倍, 而 *rapAB*、*abrB*、*yisI*、*ynzD* 和 *spo0E* 较对照下调 60.7%~96.7%。说明乳酸增强了糖异生、磷酸戊糖途径、硝酸盐呼吸、细胞壁合成, 从而促进了细胞生长及芽孢的生成效率。本文结果为地衣芽孢杆菌高密度发酵生产提供了理论支撑。

关键词: 地衣芽孢杆菌, 乳酸, 细胞生长, 芽孢, 转录组分析, 代谢组分析

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)07-0151-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050140

本文网刊:



Influences of Lactate on the High-density Fermentation by *Bacillus licheniformis* HK

ZHAO Yanmei¹, LU Jiakang¹, SHI Yueya¹, WANG Yanting¹, HUANG Yanan², CHEN Xiong¹, WANG Zhi^{1,*}

(1. Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;
2. Henan Province Nanjiecun Group Co., Ltd., Linying 462600, China)

Abstract: To improve the biomass and spore rate of *Bacillus licheniformis* HK, influences of lactate on cell growth and metabolism and spore production were investigated at a 20 L bioreactor, and lactate addition was conducted by coupling with pH7.0 from 16 h to 32 h. Basing on the data differences in transcriptome and metabolome, the metabolic regulation mechanism of lactate was analyzed. The results showed that a peak biomass (30 h) of 5.43×10^{10} CFU/mL was obtained in lactate supplement group, which was 54.3% higher than that of basic fermentation group (control). Meanwhile, the spore number was 5.36×10^{10} CFU/mL, which was 60.0% higher than the control. Compared with the control, expressions of key genes in gluconeogenesis and pentose phosphate pathway (*ldh*, *pckA*, *gapB*, *zwf*, and *tkt*) were up-regulated by 2.8~9.3 fold

收稿日期: 2024-05-15

基金项目: 湖北省教育厅优秀中青年科技创新团队项目 (T2022011)。

作者简介: 赵艳梅 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程, E-mail: 2033998390@qq.com。

* 通信作者: 王志 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, E-mail: wangzhi@hbut.edu.cn。

in the lactate supplement group, the abundance of marker metabolites (pyruvate, fructose-6-phosphate, glyceric acid-1,3-diphosphate, 6-phosphate-gluconate, 5-phosphate-ribulose, and sedoheptulose 7-phosphate) in the pathways were increased by 1.55~12.6 fold compared with the control. Additionally, expressions of key genes in TCA cycle and oxidative phosphorylation system (*citZ*, *icd*, *citB*, *odhB*, *atpAB*, *ndh*, *yumB*, *qcrABC*, *ctaODC*, *ythA*, and *sdhAB*) were down-regulated by 34.2%~96.8%, while nitrate respiration metabolism gene (*nasBCD*) was up-regulated by 107.4~287.3 fold compared with the control. Abundances of corresponding key metabolites, such as aconitate, isocitrate and citrate, were decreased by 52.6%~62.5%, while the abundances of NAD^+ and NADH were increased by 1.6~2.7 fold. Meanwhile, the precursors abundances of teichoic acid (glycerol-3-phosphate) and peptidoglycan (UDP-N-acetylmuramic acid, UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine-D-glutamate) were increased by 1.5~14 fold compared with the control. Moreover, gene expressions involved in sporogenesis, such as *phrAC*, *cotP*, *cotA*, *yeeK*, *yheD*, *tasA*, *gerQ*, *yuzJ*, were up-regulated by 1.4~5.7 fold, while *rapAB*, *abrB*, *yisI*, *ynzD*, and *spo0E* were down-regulated by 60.7%~96.7% compared with the control. The results suggested that lactate promoted gluconeogenesis, pentose phosphate pathway, nitrate respiration, and cell wall synthesis, thus promoting cell growth and spore formation efficiency. The results provided theoretical supports for high-density fermentation production of *Bacillus licheniformis*.

Key words: *Bacillus licheniformis*; lactate; cell growth; spore; transcriptome analysis; metabolome analysis

地衣芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌在亲缘关系和发酵特性上十分接近,其生长代谢过程中分泌淀粉酶^[1]、蛋白酶^[2]、维生素、氨基酸、促生长因子等有益物质,具有耐高温^[3]、抗胁迫^[4]、安全性高^[5]的特点,被广泛应用于医药、发酵食品、微生态等领域^[6-9],如:作为益生菌制剂维持动物肠道菌群平衡,保护肠道健康。而地衣芽孢杆菌的高密度培养技术是实现工业化应用的重要步骤,目前,选择和优化发酵培养基、控制发酵过程、调控代谢途径及补料策略是高密度培养的常用方法。杨旭等^[10]使用优化发酵培养基(3% 玉米淀粉、2.5% 酵母粉等)摇瓶发酵 48 h,细胞数达到 1.62×10^{10} CFU/mL,芽孢率为 70%。魏强等^[11]采用正交优化的发酵培养基及条件培养地衣芽孢杆菌,22 h 芽孢数达 2.02×10^{10} CFU/mL。丁跃等^[12]耦合 pH 流加柠檬酸培养地衣芽孢杆菌 M52(3.5% 玉米淀粉,4% 豆粕),36 h 芽孢数达到 4.1×10^{10} CFU/mL。提高芽孢杆菌生长效率和芽孢率,降低生产成本是工业生产的核心问题,因而研究地衣芽孢杆菌 HK 生长及产孢特征、确认过程瓶颈、建立补料新技术对生产芽孢杆菌益生菌制剂具有积极意义和价值。

能量的有效供应是芽孢杆菌高密度发酵过程中生长的必要条件。发酵中后期细胞通过系列复杂的代谢调控来维持生长,如:碳分解代谢物阻遏蛋白 CcpA 的靶基因脱阻遏表达,如: TCA 循环 *citZ*^[13]、氧化磷酸化途径 *cydA*^[14]、溢流代谢分子利用基因 *ackA*^[15]、乙偶姻利用基因 *acuAB*^[16]。同时,糖异生途径被激活,如:丙酮酸由 PycA-PckA 次序催化^[17]代谢进入糖异生途径和 HMP 途径。另外,溶氧不足引发的兼性厌氧状态激活硝酸盐呼吸操纵子 *narGHIIJ*、亚硝酸盐还原酶操纵子 *nasBCD*,使细胞通过厌氧呼吸维持产能和细胞生长^[18-19]。就产孢而言,Spa0A 的含量及其磷酸化水平发挥着重要作用,其中涉及到磷酸酶 *yisI*、*ynzD* 和 *spo0E*(水解 Spa0A~P 的磷酸根)^[20];此外,调控子 AbrB 间接阻遏 *spo0A* 的转录,

abrB 表达受到阻遏后,*spo0A* 转录增强进而促进芽孢生成^[21]。

菌株 HK 摇瓶发酵显示存在乳酸利用现象(文献中未显示),乳酸作为储备能源可经丙酮酸进入糖异生途径参与细胞代谢^[22-23],但其在地衣芽孢杆菌高密度发酵中的调控作用尚未见报道。因此,本文在 20 L 罐水平研究了耦合 pH7.0 流加乳酸对地衣芽孢杆菌 HK 生长和芽孢生成的影响,并基于转录组与代谢组分析了乳酸代谢在糖异生、能量代谢、细胞壁组分合成、芽孢生成等关键生物学过程中的潜在作用及其机制,为地衣芽孢杆菌高芽孢密度发酵提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

地衣芽孢杆菌 HK(*Bacillus licheniformis* HK)

实验室保藏;玉米淀粉、豆粕、玉米浆、乳酸 国药集团化学试剂有限公司;泡敌 佛山南海大田化学有限公司;甲醇、乙腈、甲酸、丙醇 色谱纯, Fisher 公司;其他实验试剂均为国产分析纯。

BIOTECH-20JS 发酵罐 上海保兴生物公司; SPX-150D 型恒温生化培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司; CJ-2D 型无菌操作台 天津市泰斯特仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; S-10 生物传感分析仪 上海惠诚生物科技有限公司; Vanquish Horizon system 型 UHPLC 液相色谱系统、Q-Exactive HF-X 型质谱仪、LSTAR1116 型 pH 计 赛默飞世尔科技有限公司; VORTEX2 型漩涡振荡器 艾卡生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 种子培养基、CFU 计数培养基(g/L): Tryptone 10, 酵母浸粉 5, NaCl 10, 琼脂粉 20, 调 pH7.0, 121 °C, 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 玉米淀粉 40、豆粕 60、葡

葡萄糖 15、玉米浆 10、 CaCO_3 2.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.7、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2、泡敌 6, 121 °C, 灭菌 30 min。

乳酸母液: 20% 的乳酸溶液, 115 °C, 20 min 灭菌。

1.2.2 地衣芽孢杆菌摇瓶种子液培养方法 地衣芽孢杆菌 HK 从 -80 °C 甘油管吸取 20 μL 转接到 LB 琼脂培养基平板, 37 °C 培养 12 h。挑适量菌苔转接至 PA 瓶(装量 5 mL 的 LB 培养基), 37 °C、230 r/min 培养 12 h。吸取 3 mL 接种至 100 mL 的 LB 培养基(250 mL 摇瓶), 37 °C、230 r/min 培养 8 h, 后合瓶获得种子液备用。

1.2.3 地衣芽孢杆菌 HK 发酵过程 20 L 发酵罐培养基灭菌后体积为 10 L, 按 10% 的接种量将液体种子接种罐内。搅拌转速 500 r/min、通气量 1.6 m^3/h 、罐压 0.035 MPa, 温度 37 °C, 发酵 12 h 后转速 700 r/min, 通气量 2.0 m^3/h 。

基础发酵(对照组, ck 组): 发酵培养过程的 pH 自然。16~32 h 流加 1.0 L 无菌水, 发酵液中的溶解氧(DO)变化基本特征为: 发酵 8 h 时 DO 降为 0, 13 h 后 DO 回升, 至发酵结束为 80%(19 h 的 DO 为 40%)。

乳酸补料发酵(实验组, Lac 组): 16~32 h 耦合 pH7.0 流加乳酸(pH 大于 7.0 自动补料启动, 补入 1.0 L 乳酸母液, 终浓度为 2%)。补料过程 DO 变化特征为: 发酵 7 h 的 DO 降至 0, 12 h 后 DO 回升, 至 19 h 达到 20.5% 后下降, 21 h 至发酵结束(32 h) DO 维持 0。

1.2.4 pH 的测定 梅特勒 pH 电极连接于发酵罐 pH 信号线, 采用 pH6.86 和 pH4.01 标准缓冲液标定 pH 电极。发酵控制程序控制 pH 电极在线测定 pH。

1.2.5 DO 值的测定 梅特勒溶解氧电极(DO 电极)连接于发酵罐 DO 电极信号线, 121 °C、30 min 保压过程中标定培养基的溶氧为 0; 发酵 0 h 时(转速 500 r/min、通气量 1.6 m^3/h 、罐压 0.035 MPa 的条件)培养基的溶氧标定为 100%。发酵控制程序控制 DO 电极在线测定 DO 值。

1.2.6 生物量和芽孢数的测定 生物量(CFU/mL): 采用稀释涂布平板法^[24]测定。

芽孢数: 适当稀释后的菌液 80 °C 水浴 10 min, 后进行平板涂布, 37 °C 培养 24 h 计数。芽孢率按公式(1)计算:

$$\text{芽孢率}(\%) = \frac{\text{芽孢数}}{\text{细胞数}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.7 葡萄糖、乳酸检测方法 发酵样品(-20 °C 保存)经 12000 r/min 离心 5 min, 上清液适当稀释后, 准确吸取 25 μL 稀释液进样。测定样品前用标准品溶液进行三次标定^[25]。

1.2.8 转录组数据分析 对照组 19 h 生物量达到峰

值后自溶, 此时葡萄糖浓度为 1.2 g/L。乳酸补料组 19 h 细胞数与对照接近, 但对数生长期维持到 30 h。因而发酵 21 h 时的细胞代谢差异可以反映乳酸代谢的影响, 取对照组(ck 组, 补同体积无菌)和乳酸补料发酵(Lac 组)21 h 的发酵样进行转录组分析。

取样具体流程如下: 取 20~30 mL 发酵液至无菌的 50 mL 离心管中, 全程放置在冰盒上操作, 另配制相同重量 50 mL 离心管配平放置冷冻离心机中 4 °C、1500 r/min 离心 5 min, 转移至超净工作台中, 取上清转移至新的 50 mL 无菌离心管中, 目的为初步除去浊液培养基里的不溶物质(豆粕等), 配平后 4 °C、2500 r/min 离心 5 min, 再次离去除不溶性杂质。吸取上层发酵液 1 mL, 转移至 1.5 mL 的 EP 管中(制备 15 个), 配平 4 °C、12000 r/min 离心 2 min。此时 EP 管内分三层, 上层清液弃置, 中层杂质用 200 μL 枪头吸取 4 °C 无菌生理盐水轻柔吹打后弃置, 留最下层菌体沉淀。将收集到的菌体沉淀放入液氮中速冻后, 菌体保存于 -80 °C 冰箱中待转录组测定, 每个样品三个生物学重复。

测序数据的质控、转录组测序、基因注释与表达量差异分析均由美吉生物科技有限公司完成。流程如下: Illumina Hiseq 二代高通量测序平台测序得到原始图像经处理得到 FASTQ 格式的原始数据; 对原始测序数据质控得到高质量序列; 通过软件 Bowtie 与指定参考基因组进行比对, 基于 Burrows-Wheeler 方法获得用于后续分析的 Mapped data; 对提供的参考基因组进行功能注释, 基于蛋白序列与五大数据库(NR 库、swiss-prot 库、Pfam 库、COG 数据库、GO 数据库)进行比对, 得到功能注释信息, 综合五大数据库的注释结果, 选择最佳的基因数据库进行分析。

转录表达定量分析 TPM 值按照公式(2)^[26]计算; 差异倍数按公式(3)计算:

$$\text{TPM} = \frac{R \times 10^6}{\left(\frac{R_1}{L_1} + \frac{R_2}{L_2} + \dots + \frac{R_n}{L_n}\right) \times L} \quad \text{式(2)}$$

$$\text{FC} = \frac{\text{TPM}(\text{Lactate})}{\text{TPM}(\text{ck})} \quad \text{式(3)}$$

式中: R 和 L, 需计算基因的 read counts 和基因长度, R_i 和 L_i ($i=1, 2, \dots, n$), 样品中第 i 个基因的 read counts 和基因长度。

最后对差异表达基因使用 KOBAS 进行 KEGG 富集分析, 以确定差异基因行使的生物学功能。

1.2.9 代谢组数据分析 进行代谢组分析的样品及其制备方法同上述转录组。LC-MS/MS 对试验样品的检测, 代谢物的鉴定与差异分析均由美吉生物科技有限公司完成。

具体流程如下: 样品上机完成后, 采用 Progenesis QI 软件对色谱峰进行分析, 同时将一级与二级的质谱信息与代谢公共数据库进行匹配, 得到代谢

物信息。其次,以正交偏最小二乘法的 VIP>1.0、差异倍数 FC>1.5 且 $P<0.05$ 为条件筛选出差异代谢物。最后使用 KEGG 数据库对差异代谢物进行代谢通路注释及分析。

色谱条件:2 μL 样本经 HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm i.d., 1.8 μm)分离后进入质谱检测。流动相 A 为 95% 水+5% 乙腈(含 0.1% 甲酸),流动相 B 为 47.5% 乙腈+47.5% 异丙醇+5% 水(含 0.1% 甲酸)。分离梯度:0~0.1 min,流动相 B 从线性 0 升至 5%;0.1~2 min,流动相 B 从线性 5% 升至 25%;2~9 min,流动相 B 线性从 25% 升至 100%;9~13 min,流动相 B 维持 100%;13.0~13.1 min,流动相 B 线性从 100% 降至 0;13.1~16 min,流动相 B 维持 0。流速为 0.40 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件:样品质谱信号采集采用正负离子扫描模式,质量扫描范围 m/z : 70~1050。离子喷雾电压,正离子电压 3500 V,负离子电压 2800 V,鞘气 40 psi,辅助加热气 10 psi,离子源加热温度 400 $^{\circ}\text{C}$,20-40-60 V 循环碰撞能,MS1 分辨率 70000,MS2 分辨率 17500。

1.3 数据处理

每组实验都进行 3 次平行实验,数据以平均值 \pm 标准差表示。通过 Origin 9.0 和 SPSS 23.0 进行作图以及数据处理分析,* $P<0.05$;** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 20 L 罐水平地衣芽孢杆菌 HK 发酵生长过程曲线

地衣芽孢杆菌 HK 发酵生长和芽孢形成特征如图 1(对照组)所示:15 h 时 pH 为 6.97,后持续回升,至 27 h 为 8.41,后发酵结束。对数期生物量由 17 h 的 2.01×10^{10} CFU/mL 对数生长至 19 h 达到峰值(3.52×10^{10} CFU/mL);同时芽孢数由 17 h 的 1.87×10^{10} CFU/mL 提高至 19 h 的 3.35×10^{10} CFU/mL,芽孢率高达 95.2%,达到高密度发酵水平。19~22 h,生

物量及芽孢数分别由各自峰值快速下降至 2.14×10^{10} CFU/mL 和 1.85×10^{10} CFU/mL,分别下降了 39.2% 和 44.8%,而且 19 h 后葡萄糖、乳酸等碳源基本耗尽,这也会限制细胞的生长或芽孢形成的效率。22 h 后细胞二次生长至 27 h 的 2.83×10^{10} CFU/mL,芽孢数为 2.79×10^{10} CFU/mL,此时葡萄糖和乳酸浓度为 1.8 g/L 和 0.1 g/L。说明细胞在碳限制状态利用培养基中丰富的氮源来二次生长。

基础料的玉米浆含有乳酸等物质^[27],可由乳酸脱氢酶(LDH)催化生成丙酮酸(伴随 NADH 生成)进入糖异生或 TCA 途径^[22]。因此对发酵过程中的乳酸含量进行检测,发现乳酸和葡萄糖含量由 0 h 的 0.73 g/L 和 12.20 g/L 持续降至 6 h 的最低值(0.10 g/L 和 1.40 g/L,图 1),说明 6 h 后迟效性碳源玉米淀粉的分解与利用处于平衡状态,并维持细胞对数生长到峰值。研究结果显示菌株 HK 具备葡萄糖和乳酸的共代谢能力,乳酸可作为储备碳源被细胞吸收并经呼吸代谢二次利用,这与 Hui 等^[23]的报道一致。

2.2 耦合 pH7.0 流加乳酸对菌株 HK 生长和芽孢形成的影响

芽孢杆菌利用葡萄糖进行对数生长存在 CcpA 的调控^[28],随着碳源的消耗,细胞可利用溢流分子经呼吸代谢产能和糖异生作用进行二次生长^[22-23]。菌株 HK 发酵 19 h 后的能量供应矛盾在于碳源不足,虽然期间氨基酸脱氨基作碳源代谢促进了二次生长,但在一、二次生长之间存在强烈的细胞自溶现象,因而氨基酸参与碳代谢存在效能不足的缺陷。如图 1 所示,菌株 HK 具有葡萄糖和乳酸的共代谢能力,而且乳酸也能参与糖异生代谢^[22],因而,考察了耦合 pH7.0 补料乳酸(16~32 h)对地衣芽孢杆菌 HK 生长的影响,如图 2 所示。

pH 变化趋势与对照(ck 组,图 1)基本一致,17 h 回升至 7.0,开始耦合 pH7.0 乳酸补料(16~32 h)过程维持在 6.86~7.18 左右。生物量和芽孢数在 19 h 达

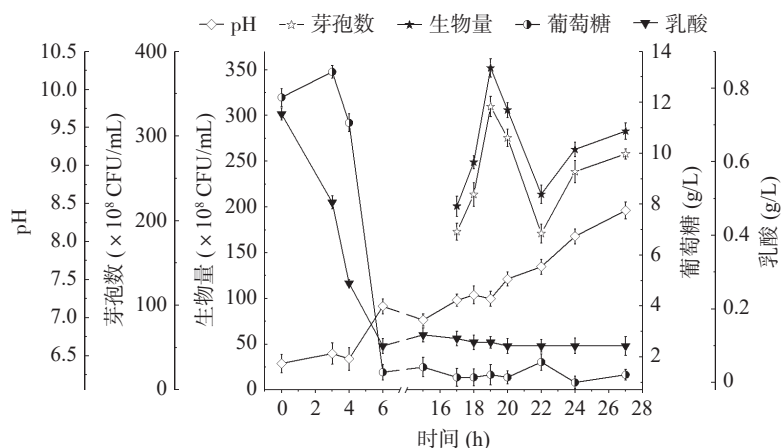


图 1 菌株 HK 发酵生长特征

Fig.1 Fermentation growth characteristics of strain HK

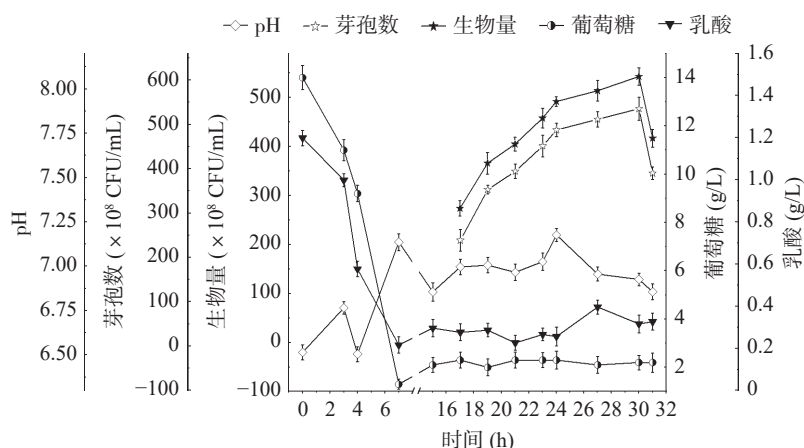


图 2 乳酸对地衣芽孢杆菌 HK 生长的影响

Fig.2 Effects of lactate on the growth of *Bacillus licheniformis* HK

到 3.66×10^{10} CFU/mL 和 3.55×10^{10} CFU/mL, 与对照 (ck 组, 图 1) 接近; 30 h 生物量达到峰值 5.43×10^{10} CFU/mL, 较对照峰值 (19 h, 3.52×10^{10} CFU/mL, 图 1) 提高了 54.3%。30 h 芽孢数达到 5.36×10^{10} CFU/mL, 较对照 (19 h, 3.35×10^{10} CFU/mL, 图 1) 提高了 60.0%, 芽孢率为 98.7%; 而且 24~30 h 细胞继续生长, 至 30 h 芽孢数达到峰值, 芽孢率维持在 98% 以上。

发酵 7 h 的 DO 降至 0, 12 h 后 DO 开始回升, 至 19 h 达到 20.5% 后下降, 21 h 至发酵结束维持 0, 而对照组为 40%~80% (材料与方法 1.2.3), 由于芽孢杆菌具备利用乳酸进行呼吸代谢的途径^[22-23], 因而这种对氧消耗的显著改变可能由乳酸代谢引起。0~17 h 乳酸和葡萄糖含量变化趋势与对照 (图 1) 接近, 17~31 h 浓度均在 0.3 g/L 和 2.0 g/L 左右, 说明此时细胞依然处于碳限制状态, 虽然 16~32 h 流加了终浓度 2% 的乳酸, 但其浓度依然处于较低水平。结果说明乳酸代谢效率高, 而且增强了糖异生途径和能量供应效率, 并有效促进菌株 HK 生长和芽孢形成。

对照组 19 h 生物量达到峰值后自溶 (图 1), 而且 21 h 已处于自溶状态; 而补料组发酵 21 h 时仍处于对数生长期 (图 2)。因而两者在发酵 21 h 的细胞转录组和代谢组差异可能会反映出乳酸补料对菌株 HK 生长和芽孢生成的调控细节。

2.3 基因表达差异整体分析

以差异倍数 FC>1.5, 显著性 $P<0.05$ 为条件筛选出差异表达基因。差异表达的基因经 KEGG 功能富集分析 (图 3), 乳酸补料组 (Lac 组) 上调基因主要集中在糖异生 (Gluconeogenesis)、磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway)、芽孢形成代谢 (Spore formation)、硝酸盐呼吸 (Nitrate respiration) 等过程 (图 3a)。下调基因主要集中在 TCA 循环 (TCA cycle)、氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation) 等生物过程 (图 3b)。

被注释到的主要差异基因如表 1 所示: 糖异生途径相关基因如: *ldh* (乳酸脱氢酶)、*pckA* (磷酸烯醇

式丙酮酸 (PEP) 羧激酶)、*gapB* (3-磷酸甘油醛脱氢酶) 显著上调 ($P<0.05$), 磷酸戊糖途径 (HMP) 相关基因如: *zwf* (6-磷酸葡萄糖脱氢酶)、*tkt* (转酮醇酶) 等显著上调 ($P<0.05$), 说明乳酸增强了糖异生代谢及 HMP 途径。

TCA 循环相关基因如: *citZ* (柠檬酸合成酶)、*icd* (异柠檬酸脱氢酶)、*citB* (乌头酸酶)、*odhB* (α -酮戊二酸脱氢酶) 等下调, 氧化磷酸化相关基因如: *atpAB* (ATP 合酶)、*ndh*、*yumB* (NADH 脱氢酶)、*qcrABC* (细胞色素 C 还原酶)、*ctaODC* (细胞色素 C 氧化酶)、*ythA* (细胞色素 bd 氧化酶)、*sdhAB* (琥珀酸脱氢酶) 等下调, 而硝酸盐呼吸相关基因如: *nasBCD* (硝酸盐还原酶系统) 极显著上调 ($P<0.0001$), 说明菌株 HK 通过硝酸盐呼吸获得能量, 这与乳酸流加期间 DO 一直维持为 0 (资料未显示) 的现象一致。

另外, 芽孢形成相关基因如: *phrAC* (磷酸酶)、*cotP*、*cotA*、*yeeK*、*yheD*、*tasA*、*gerQ*、*yuzJ* (芽孢衣蛋白合成) 等显著上调 ($P<0.05$), 说明乳酸促进了芽孢的生成效率。

2.4 差异代谢物整体分析

Lac 和 ck 组样品中共检测到 3222 种代谢物, 以正交偏最小二乘法的 VIP>1.0、差异倍数 FC>1.5 且 $P<0.05$ 为条件筛选出差异代谢物 795 种, 显著上调的有 598 种, 显著下调的有 197 种。被注释到的主要差异代谢物如表 2 所示。

糖异生途径相关代谢产物如: 丙酮酸、6-磷酸果糖、1,3-二磷酸甘油酸显著上调 ($P<0.05$), 说明乳酸增强了糖异生代谢。

TCA 循环中间产物异柠檬酸、顺乌头酸显著下调 ($P<0.05$), 而辅因子 NAD^+ 显著上调 ($P<0.05$), 说明 $NADH$ 的生成及氧化所生成的 NAD^+ 不是分别通过 TCA、氧化磷酸化 (ETC) 实现的, 这与乳酸流加期间 DO 一直维持为 0 的现象一致。

另外, 磷酸戊糖途径 (HMP) 标志代谢物 5-磷酸核酮糖、7-磷酸景天庚酮糖、6-磷酸葡萄糖酸等显著

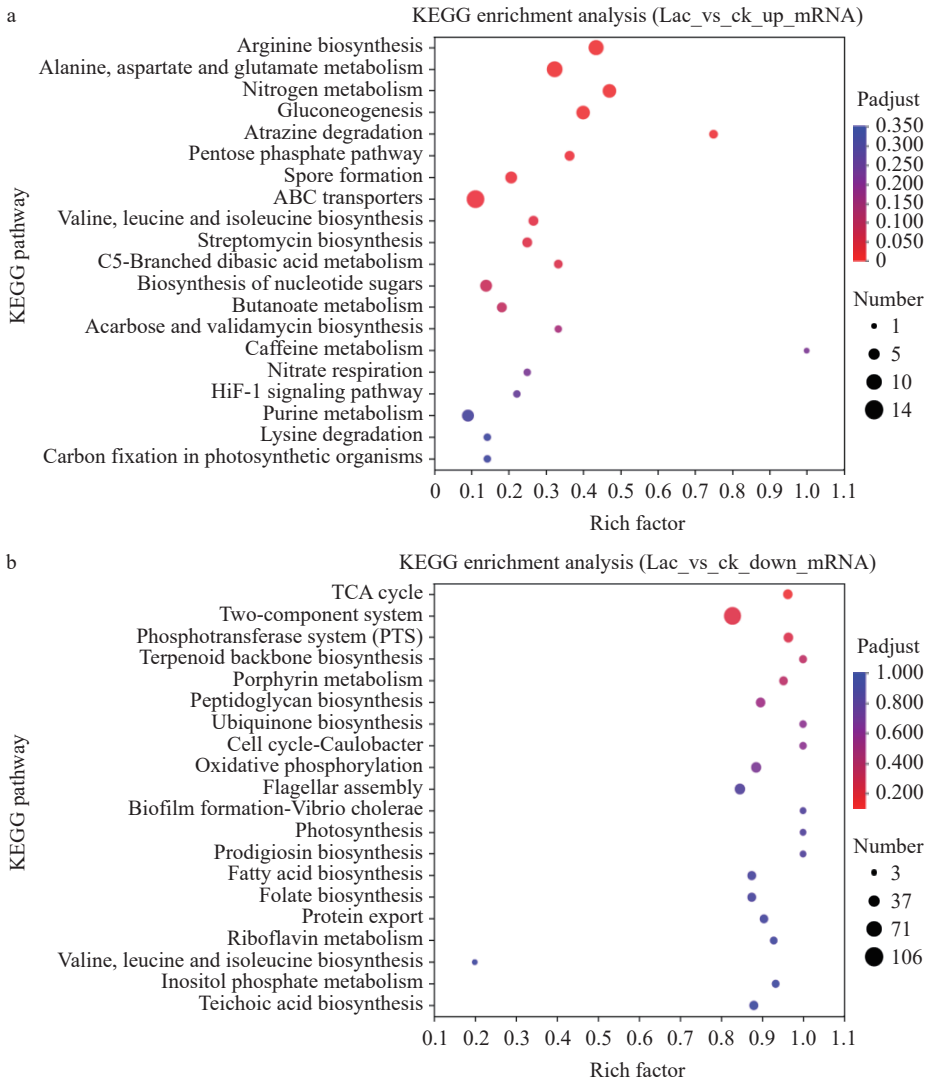


图 3 差异表达基因 KEGG 富集散点图

Fig.3 Scatter plot of KEGG enrichment of differentially expressed genes
注: a 上调基因; b 下调基因。

表 1 KEGG 通路差异基因及 FC 值

Table 1 KEGG pathway differential genes and FC values

通路	主要差异基因及显著性	差异倍数(FC值)
糖异生途径	<i>ldh</i> [*] , <i>pckA</i> ^{**} , <i>gapB</i> ^{**}	上调4~7倍
磷酸戊糖途径	<i>zwf</i> ^{**} , <i>tkt</i> [*]	上调2.8~9.3倍
TCA循环	<i>citZ</i> [*] , <i>icd</i> , <i>citB</i> [*] , <i>odhB</i> [*]	下调34.2%~76.6%
氧化磷酸化	<i>atpA</i> [*] , <i>atpB</i> ^{**} , <i>ndh</i> [*] , <i>yumB</i> [*] , <i>qcrABC</i> [*] , <i>ctaO</i> ^{**} , <i>ctaDC</i> [*] , <i>ythA</i> [*] , <i>sdhAB</i> [*]	下调55.4%~96.8%
硝酸盐呼吸	<i>nasBCD</i> ^{***}	上调107.4~287.3倍
芽孢生成	<i>phrAC</i> [*] , <i>cotP</i> [*] , <i>cotA</i> [*] , <i>yeeK</i> [*] , <i>yheD</i> [*] , <i>tasA</i> ^{**} , <i>gerQ</i> [*] , <i>yuzJ</i> ^{**}	上调1.4~5.7倍

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; 表2、表3同。

表 2 KEGG 通路差异代谢物及丰度差异倍数

Table 2 Differential metabolites and abundance differences of KEGG Pathway

通路	主要差异代谢物及显著性	Lac/ck丰度差异倍数
糖异生途径	丙酮酸 [*] 、6-磷酸果糖 [*] 、1,3-二磷酸甘油酸 [*]	上调1.6~3.7倍
TCA循环	异柠檬酸 [*] 、顺乌头酸 [*] 、柠檬酸 [*]	下调52.6%~62.5%
辅因子代谢	NAD^{+} 、 $NADH$	上调1.6~2.7倍
磷酸戊糖途径	5-磷酸核酮糖 ^{***} 、7-磷酸景天庚酮糖 [*] 、6-磷酸葡萄糖酸 [*]	上调1.55~12.6倍
肽聚糖、磷壁酸合成	UDP-N-乙酰胞壁酸 ^{***} 、UDP-N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸-D-谷氨酸 ^{**} 、D-丙氨酸-D-丙氨酸 [*] 、磷壁酸 [*] 、3-磷酸甘油 [*]	上调1.5~14倍

上调($P<0.05$), 肽聚糖合成代谢中间产物 UDP-N-乙酰胞壁酸、UDP-N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸-D-谷氨酸、D-丙氨酸-D-丙氨酸等和细胞壁组分-磷壁酸显著上调($P<0.05$), 说明乳酸提高糖异生运转效率的同时, 促进了 HMP 途径和细胞壁组分(肽聚糖和磷壁酸)的合成效率。

2.5 乳酸对糖异生、糖酵解、HMP 途径代谢相关基因表达及代谢物生成的影响

对照发酵 16~19 h 处于对数生长后期, 葡萄糖浓度已消耗到较低水平(图 1), 22 h 后出现二次生长现象, 说明发酵后期存在氨基酸作碳源的代谢特征。而流加乳酸可经乳酸脱氢酶(LDH)催化生成丙酮酸, 进而在丙酮酸羧化酶(PycA)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧激酶(*pckA* 编码)催化下生成草酰乙酸(OAA)和 PEP, 经 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*gapB* 编码)等催化进入糖异生途径, 生成 1,3-二磷酸甘油酸、6-磷酸果糖、6-磷酸葡萄糖等, 并在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(*zwf* 编码, 产物为 6-磷酸葡萄糖酸、NADPH)、转酮醇酶(*tkl* 编码, 生成 7-磷酸景天庚酮糖等)等催化下进入磷酸戊糖(HMP)途径。因而, 对糖异生、糖酵解、磷酸戊糖途径代谢相关基因表达差异进行了分析, 如图 4 所示。

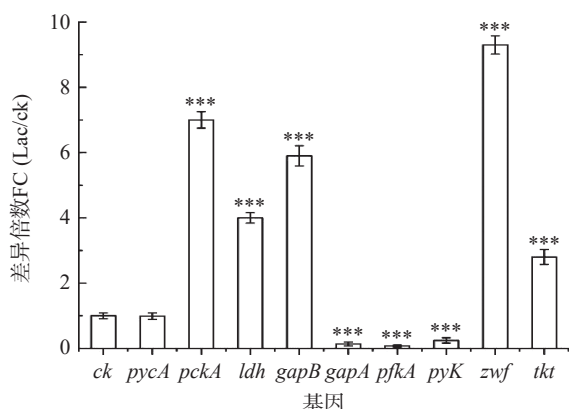


图 4 乳酸对糖异生、糖酵解和磷酸戊糖途径代谢基因表达的影响

Fig.4 Effects of lactate on gene expression of gluconeogenesis, glycolysis, and HMP pathway metabolism

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 图 5~图 8 同。

与对照组相比, 乳酸补料组糖酵解途径的 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*gapA*)、磷酸果糖激酶(*pfkA*)以及丙酮酸激酶(*pyK*)的表达分别下调了 86.3%、92.5% 和 75.6%, 这与其 21 h 葡萄糖低于 2.5 g/L 一致, 说明细胞处于碳限制状态, 糖酵解途径的关键酶基因基本上不表达。

乳酸补料组 *ldh* 上调了 4 倍, 促进了乳酸向丙酮酸的转化和 NADH 的有效供应。而 *pycA* 与对照接近, 无显著差异。乳酸补料组 *pckA* 和 *gapB*(3-磷酸甘油醛脱氢酶)表达分别上调了 7 倍和 5.9 倍, 说明 LDH 催化反应是 NADH 的主要供应途径之一。而且增强了 OAA 向 PEP 转化(*pckA* 催化)、1,3-二磷

酸甘油酸向 3-磷酸甘油醛的转化(*gapB* 催化)效率, 糖异生途径得到加强, 此时糖异生途径成为代谢主流。同时, HMP 途径关键酶基因 *zwf*、转酮醇酶基因 *tkl* 分别上调 9.3 倍和 2.8 倍。表明乳酸还增强了 HMP 途径的关键酶基因表达效率。

基于此, 分析了代谢组关键代谢物的丰度差异, 如图 5 所示: 乳酸组胞内丙酮酸、6-磷酸果糖、1,3-二磷酸甘油酸的丰度(以峰面积表示, 其余同), 比对照提高了 1.6~3.7 倍。而乳酸丰度与对照接近, 说明乳酸的转运和转化效率极高, 细胞处于严重的碳饥饿状态。糖异生代谢增强后, 其代谢中间产物(丙酮酸, 6-磷酸果糖、1,3-二磷酸甘油酸)丰度高于对照 1.6~3.7 倍, 而且 HMP 途径标志代谢产物 7-磷酸景天庚酮糖、5-磷酸核酮糖、6-磷酸葡萄糖酸的丰度分别比对照提高了 1.59 倍、12.6 倍和 1.55 倍。这与关键酶基因的表达差异一致(图 4)。即乳酸促进了糖异生、HMP 途径的代谢效率, 支撑了细胞的继续生长(图 2)。

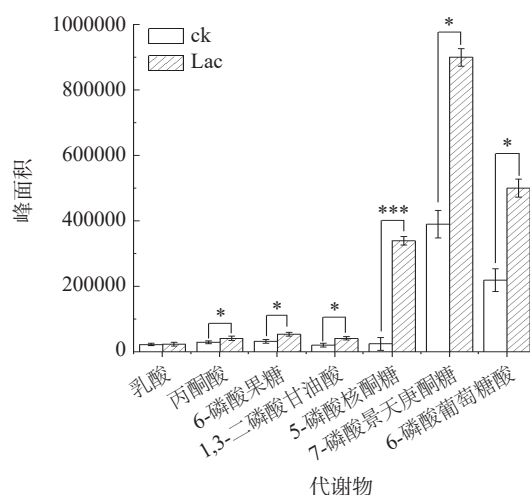


图 5 糖异生、糖酵解和磷酸戊糖途径代谢物丰度
Fig.5 Metabolite abundances in the gluconeogenesis, glycolysis, and HMP pathways

2.6 乳酸对 TCA 循环、NADH 及硝酸盐代谢基因表达及代谢物生成的影响

乳酸补料(图 2)发酵中, 地衣芽孢杆菌 HK 发酵 30 h 达到峰值生物量(5.43×10^{10} CFU/mL), 较对照(图 1)峰值提高了 54.3%。由于能量供应效率是高密度发酵的前提条件, 因而分析了 TCA 循环、氧化磷酸化、硝酸盐代谢关键基因的表达差异, 如表 3 所示。

乳酸补料期间细胞生长迅速, 耗氧量很大, 因而 DO 维持为 0, 而这将对三羧酸循环及有氧呼吸代谢产生影响。TCA 循环关键酶柠檬酸合成酶(*citZ*)、异柠檬酸脱氢酶(*icd*)、乌头酸酶(*citB*)、 α -酮戊二酸脱氢酶(*odhB*)表达量分别下调 55.4%、34.2%、76.6% 和 51.1%。氧化磷酸化(ETC)ATP 合酶(*atpAB*)、NADH 脱氢酶(*ndh*、*yumB*)、细胞色素 C 还原酶(*qcrABC*)、细胞色素 C 氧化酶(*ctaODC*)、细胞色

表 3 TCA 循环、氧化磷酸化、硝酸代谢关键基因表达差异

Table 3 Differences in gene expression related to TCA cycle, oxidative phosphorylation, and nitrate metabolism

基因ID号	基因	基因描述	FC(Lac/ck)
B4U62_19870	<i>atpB</i>	ATP合酶亚基A	0.042**
B4U62_19850	<i>atpA</i>	ATP合酶亚基 α	0.156*
B4U62_06810	<i>ndh</i>	NADH脱氢酶1	0.201*
B4U62_17340	<i>yumB</i>	NADH脱氢酶2	0.329*
B4U62_12250	<i>qcrA</i>	甲基萘醌-细胞色素c还原酶铁硫亚基	0.443*
B4U62_12245	<i>qcrB</i>	甲基萘醌-细胞色素c还原酶细胞色素b亚基	0.241*
B4U62_12240	<i>qcrC</i>	甲基萘醌-细胞色素c还原酶细胞色素b/c亚基	0.249*
B4U62_06700	<i>ctaO</i>	血红素IX基转移酶	0.032**
B4U62_08195	<i>ctaC</i>	细胞色素c氧化酶亚基2	0.174*
B4U62_08200	<i>ctaD</i>	血红素泛醌氧化酶亚基I	0.387*
B4U62_16490	<i>ythA</i>	细胞色素泛醌氧化酶亚基I	0.446*
B4U62_15340	<i>sdhA</i>	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基	0.328*
B4U62_15335	<i>sdhB</i>	琥珀酸脱氢酶铁硫亚基	0.242*
B4U62_15695	<i>citZ</i>	柠檬酸合酶2	0.446*
B4U62_15690	<i>icd</i>	异柠檬酸脱氢酶(NADP ⁺)	0.658
B4U62_09790	<i>citB</i>	乌头酸水合酶	0.234*
B4U62_01945	<i>nasB</i>	亚硝酸盐还原酶大亚基	287.340***
B4U62_01935	<i>nasD</i>	亚硝酸盐还原酶大亚基	284.973***
B4U62_01940	<i>nasC</i>	同化硝酸还原酶催化亚基	107.402***
B4U62_10555	<i>odhB</i>	2-酮戊二酸脱氢酶复合体的二氢脂酰氨基酸残基琥珀酰转移酶组分	0.489*
B4U62_05285	<i>nsrR</i>	转录调控因子	0.054**
B4U62_20075	<i>narH</i>	硝酸还原酶亚基 β	0.658
B4U62_20080	<i>narG</i>	硝酸还原酶 α 链	0.563
B4U62_20070	<i>narJ</i>	硝酸还原酶钼辅因子组装伴侣NarJ	0.516

素 bd 氧化酶(*ythA*)以及琥珀酸脱氢酶(*sdhAB*)表达量下调了 55.4%~96.8%。同时, TCA 循环代谢中间产物顺乌头酸、异柠檬酸和柠檬酸峰丰度比对照降低 58.8%、62.5% 和 52.6%($P<0.05$, 图 6), 说明乳酸转化为丙酮酸后进入糖异生途径是代谢主流, 这与丙酮酸, 6-磷酸果糖、1,3-二磷酸甘油酸代谢物丰度显著增强一致($P<0.05$, 图 5)。TCA 循环碳通量不是主流, TCA-ETC 也不是细胞 NADH 合成和氧化及 ATP 合成主要途径。而 LDH 催化乳酸向丙酮酸转化是 NADH 的主要生成途径(图 4)。

兼性厌氧条件下 ATP 的生成和 NADH 的氧化

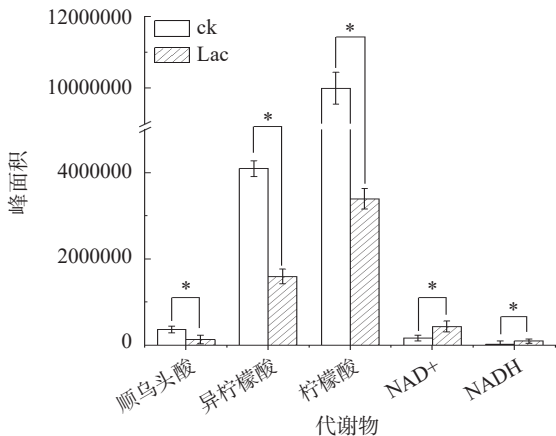


图 6 TCA 循环和氧化磷酸化途径代谢物丰度

Fig.6 Metabolite abundance in TCA cycle and ETC pathway

还与无氧呼吸有关^[29], 因而对硝酸盐还原酶系统(*narGHJ*、*nsrR*、*nasBCD* 编码)的表达特征进行了分析, 乳酸流加组和对照组的 *narGHJ* 表达量差异不显著, 说明 NADH 的氧化不是限制因素。但是, *nsrR* 表达量(阻遏亚硝酸盐还原酶 *nasBCD* 表达)显著下调 94.6%($P<0.001$), 使得 *nasBCD* 强烈脱阻遏而表达, 其表达量分别极显著上调了 107.4~287.3 倍($P<0.0001$)。这极大地促进了 NADH 的氧化和 NO₂⁻ 向 NH₃ 的转化效率, 促进了兼性厌氧条件下 NADH/NAD⁺ 平衡、降低了的 NO₂⁻ 毒性, 这与 NAD⁺ 和 NADH 的丰度比对照高 1.6 倍和 2.7 倍(图 6)一致。

总之, 乳酸补料促进细胞生长的同时, 不仅使得发酵体系溶氧长期维持为 0(21~32 h), 且乳酸向丙酮酸的转化产生大量 NADH(图 6), 进而引起细胞进行硝酸盐呼吸获得能量。

2.7 乳酸对细胞壁合成相关代谢物生成的影响

乳酸补料促进了细胞生长, 这需要细胞组分(细胞壁等)的有效合成, 肽聚糖和磷壁酸生物合成中间产物的丰度差异如图 7 所示。菌株 HK 作为革兰氏阳性菌, 其细胞壁组分之一肽聚糖合成前体 D-丙氨酰-D-丙氨酸、UDP-N-乙酰胞壁酸和 UDP-N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸-D-谷氨酸丰度分别比对照高 1.5 倍、14 倍和 5.25 倍。另一组分磷壁酸及其前体 3-磷酸甘油丰度比对照高 2.2 倍和 1.9 倍。说明菌株 HK 利用乳酸代谢, 促进了糖异生途径的代谢效

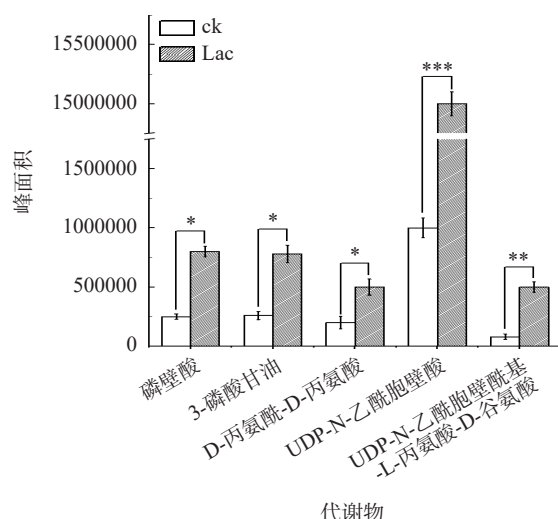


图 7 细胞壁组分合成中间代谢物丰度

Fig.7 Metabolite abundances of intermediate metabolites in cell wall synthesis

率(图 4), 保证了 6-磷酸果糖/葡萄糖的供应(图 5), 进而促进了肽聚糖和磷酸酯前体/中间产物的合成(图 7), 保证了细胞壁的合成效能, 为细胞快速生长提供了有力支撑。

2.8 乳酸对芽孢形成相关基因表达的影响

芽孢杆菌芽孢生成程序启动的决定性转录因子为 Spo0A, 当其表达丰度和磷酸化程度达到一定阈值时, 芽孢形成才能启动^[30]。而芽孢形成的外部因素则与发酵培养基中细胞密度以及细胞自身的营养状态有关。当发酵罐内细胞密度过大时, Phr(磷酸酶调节蛋白)会被寡肽通透酶运回胞内并活化, 活化后的 Phr 蛋白可以专一性地抑制磷酸酶 Rap 的活性^[31], 进而 Spo0F 的磷酸化水平升高, 使 Spo0A~P 高于阈值而促进芽孢生成启动^[32]。因而, 对芽孢形成关键基因的表达差异进行了分析, 如图 8 所示。

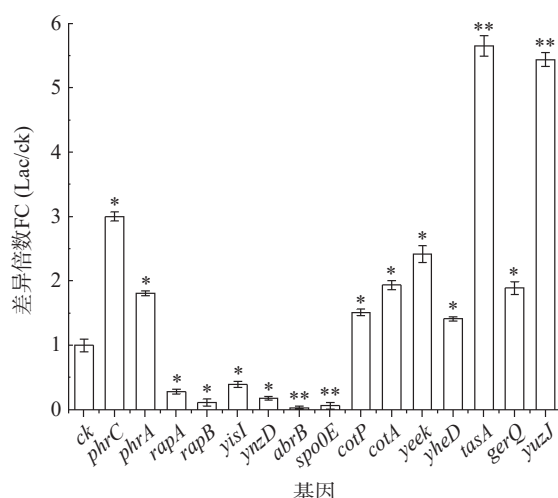


图 8 乳酸对芽孢形成基因表达的影响

Fig.8 Effects of lactate on the expression of sporulation genes

乳酸补料组发酵后期(30 h)芽孢峰值达 5.36×10^{10} CFU/mL, 较对照峰值显著提高(60.0%)。高细胞密度使得磷酸酶调节蛋白 PhrAC 在胞内发挥作

用, 抑制磷酸酶 Rap 的活性, 进而促进芽孢形成。磷酸酶调节蛋白编码基因 *phrA*、*phrC* 分别上调了 1.8 和 3.0 倍, 抑制了磷酸酶基因 *rapA*、*rapB* 的表达(两者分别下调了 71.7%、88.8%), 从而增强了 Spo0F、Spo0B 和 Spo0A 的磷酸传递效率, 进而激活芽孢的生成。另外, 全局调控子 *abrB* 间接阻遏 *spo0A* 表达, 其编码基因 *abrB* 下调 96.7%, 使得 *spo0A* 脱阻遏而表达; 磷酸酶编码基因 *yisI*、*ynzD* 和 *spo0E* 分别下调 60.7%、82.1%、93.9%, 也提高了 Spo0A 的磷酸化效率。

另外, 芽孢衣是芽孢的重要组成部分^[33-37], 主要由蛋白质组成, 因而分析了芽孢外壳蛋白合成效率对芽孢生成的影响。编码芽孢衣蛋白合成相关基因 *cotP*、*cotA*、*yeeK*、*yheD*、*tasA*、*gerQ*、*yuzJ* 分别上调 1.5 倍、1.9 倍、2.4 倍、1.4 倍、5.7 倍、1.9 倍和 5.4 倍。说明乳酸提高了菌株 HK 芽孢生成效率, 这与发酵过程中产孢率显著提高的现象一致。

3 结论

地衣芽孢杆菌 HK 发酵 16~32 h 耦合 pH7.0 进行乳酸补料增强了细胞糖异生途径和磷酸戊糖途径的代谢强度、促进了细胞壁组分(肽聚糖和磷酸酯)的合成效率、强化了硝酸盐呼吸代谢、减弱了有氧呼吸代谢(三羧酸循环及氧化磷酸化过程)、提高了芽孢生成系统基因的表达强度, 显著提升了菌株 HK 生长和芽孢生成效率, 发酵 30 h 生物量峰值达 5.43×10^{10} CFU/mL, 较对照(未补乳酸)峰值提高了 54.3%, 芽孢数达到 5.36×10^{10} CFU/mL, 较对照提高 60.0%。研究结果首次揭示了发酵中后期厌氧呼吸条件下乳酸代谢在调控芽孢形成中的作用, 为地衣芽孢杆菌高密度、高芽孢率发酵提供理论和技术支撑, 而乳酸补料组发酵 30 h 后细胞仍然自溶的现象有待进一步研究。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] ZHANG G Q, CHEN Y K, LI Q H, et al. Growth-coupled evolution and high-throughput screening assisted rapid enhancement for amylase-producing *Bacillus licheniformis* [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 337: 125467–125467.
- [2] AGUILAR J G D S, de CASTRO R J S, SATO H H. Production of antioxidant peptides from pea protein using protease from *Bacillus licheniformis* LBA 46 [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(1): 435–443.
- [3] DONG Z X, CHEN X L, CAI K, et al. Exploring the metabolomic responses of *Bacillus licheniformis* to temperature stress by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(3): 473–481.
- [4] ZHAN Y Y, XU H X, TAN HWEEN T, et al. Systematic adaptation of *Bacillus licheniformis* to 2-phenylethanol stress [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(2): e0156822–

e0156822.

- [5] SHLEEVA M O, KONDRATIEVA D A, KAPRELYANTS A S. *Bacillus licheniformis*: A producer of antimicrobial substances, including antimycobacterials, which are feasible for medical applications[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(7): 1893–1899.
- [6] de BOER A S, PRIEST F, DIDERICHSEN B. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: A review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 40: 595–598.
- [7] CUTTING S M. *Bacillus* probiotics[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(2): 214–220.
- [8] LEE N K, KIM W S, PAIK H D. *Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(5): 1297–1305.
- [9] HE H, YU Q, DING Z, et al. Biotechnological and food synthetic biology potential of platform strain: *Bacillus licheniformis*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(2): 281–291.
- [10] 杨旭, 武天宁, 荀明强, 等. 1株地衣芽孢杆菌发酵条件研究及其微生物制剂的制备[J]. *饲料研究*, 2022, 45(24): 91–96.
- [11] YANG X, WU T N, XUN M Q, et al. Study on fermentation conditions of *Bacillus licheniformis* and preparation of microbial preparation[J]. *Feed Research*, 2022, 45(24): 91–96.
- [12] 魏强, 张薇, 石黑虎, 等. 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)10236发酵条件的优化[J]. *河北农业科学*, 2019, 23(5): 65–70.
- [13] WEI Q, ZHANG W, SHI H H, et al. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus licheniformis* 10236[J]. *Hebei Agricultural Science*, 2019, 23(5): 65–70.
- [14] 丁跃, 何俊峰, 龚若飞, 等. pH耦合柠檬酸补料策略促进地衣芽孢杆菌产芽孢[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(2): 152–158.
- [15] DING Y, HE J F, GONG R F, et al. pH Coupled citrate supplementation strategy promotes sporulation in *Bacillus licheniformis*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(2): 152–158.
- [16] KIM H J, ROUX A, SONENSHEIN A L. Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* krebs cycle genes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(1): 179–190.
- [17] FUJITA Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2009, 73(2): 245–259.
- [18] ZHANG Y P, XIAO F X, ZHANG L, et al. A new mechanism of carbon metabolism and acetic acid balance regulated by CcpA[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(9): 2303–2303.
- [19] GRUNDY F J, TURINSKY A J, HENKIN T M. Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(15): 4527–4533.
- [20] BARWELL S A E, DUMAN R, WAGNER A, et al. Directional regulation of cytosolic PEPCK catalysis is mediated by competitive binding of anions[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 637: 218–223.
- [21] NAKANO M M, HULETT F M. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 157(1): 1–7.
- [22] KOMMINENI S, LAMA A, POPESCU B, et al. Global transcriptional control by NsrR in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(7): 1679–1688.
- [23] PEREGO M. A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(1): 133–143.
- [24] ROBERTSON J B, GOCHT M, MARAHIEL M A, et al. AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(21): 8457–8461.
- [25] BROOKS G A. The science and translation of lactate shuttle theory[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 27(4): 757–785.
- [26] HUI S, GHERGUROVICH J M, MORSCHER R J, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate[J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 115–118.
- [27] 黄雪松, 丁跃, 宋昭, 等. *ccpN* 敲除对地衣芽孢杆菌 DW2 杆菌肽合成代谢的调控效应[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(19): 23–29.
- [28] HUANG X S, DING Y, SONG Z, et al. Regulatory effects of *ccpN* knockdown on mycopeptide anabolism in *Bacillus licheniformis* DW2[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(19): 23–29.
- [29] 任石苒, 李奠础, 许志芳. 生物传感分析仪在乳酸发酵中的应用研究[J]. *食品工程*, 2011(3): 47–51.
- [30] REN S G, LI D C, XU Z F. Application of biosensing analyzer in lactic acid fermentation[J]. *Food Engineering*, 2011(3): 47–51.
- [31] LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323–324.
- [32] 李红宇, 许丽. 玉米浆的营养特点及应用[J]. *饲料研究*, 2017(19): 5–9.
- [33] LI H Y, XU L. Nutritional characteristics and application of corn syrup[J]. *Feed Research*, 2017(19): 5–9.
- [34] TOBISCH S, ZÜHLKE D, BERNHARDT J, et al. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(22): 6996–7004.
- [35] NAKANO M M, ZUBER P. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*)[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1998, 52: 165–190.
- [36] PIGGOT P J, HILBERT D W. Sporulation of *Bacillus subtilis*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(6): 579–586.
- [37] POTTATHIL M, LAZAZZERA B A. The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*[J]. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 2003, 8: d32–d45.
- [38] KOETJE E J, HAJDO-MILASINOVIC A, KIEWIET R, et al. A plasmid-borne Rap-Phr system of *Bacillus subtilis* can mediate cell-density controlled production of extracellular proteases[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2003, 149(Pt 1): 19–28.
- [39] ENGUITA F J, MATIAS P M, MARTINS L O, et al. Spore-coat laccase CotA from *Bacillus subtilis*: Crystallization and preliminary X-ray characterization by the MAD method[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2002, 58(Pt 9): 1490–1493.
- [40] TAKAMATSU H, IMAMURA D, KUWANA R, et al. Expression of *yeeK* during *Bacillus subtilis* sporulation and localization of YeeK to the inner spore coat using fluorescence microscopy[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(4): 1220–1229.
- [41] van OOIJ C, EICHENBERGER P, LOSICK R. Dynamic patterns of subcellular protein localization during spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4441–4448.
- [42] STÖVER A G, DRIKS A. Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(5): 1664–1672.
- [43] RAGKOUSI K, SETLOW P. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(17): 5567–5575.