



## 酸胁迫下琥珀酸放线杆菌的生理及转录应答

张群<sup>1,2</sup>, 陈鹏程<sup>1,2</sup>, 郑璞<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

<sup>2</sup>江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】通过琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 对酸胁迫的生理应答和转录组学分析, 探究琥珀酸放线杆菌酸胁迫的机制。【方法】测定不同 pH 对细胞生长、H<sup>+</sup>-ATPase、细胞内 pH 的影响; 测定酸胁迫前后细胞膜和谷氨酸脱氢酶的变化、谷氨酸对琥珀酸放线杆菌生长的影响; 通过 RNA-seq 测序分析酸胁迫条件下的差异表达基因。【结果】随 pH 值的降低, 细胞生长受抑制, H<sup>+</sup>-ATPase 的活性下降。pH 4.7 酸胁迫后, 细胞膜受到严重损伤, 谷氨酸对酸胁迫后的细胞有保护作用, GDH 酶活响应酸胁迫后略有增加。酸胁迫后, 39 个基因差异表达较为显著, 其中 49% 基因属于应激蛋白、转运蛋白, 小部分基因与代谢相关。【结论】本文探究了琥珀酸放线杆菌酸胁迫下的生理及转录应答, 研究结果可为寻找增强琥珀酸放线杆菌耐酸性策略提供参考。

**关键词:** 琥珀酸放线杆菌, 酸胁迫, 细胞膜, 细胞内 pH, H<sup>+</sup>-ATPase, GDH, RNA-seq

琥珀酸, 又名丁二酸, 是一种重要的 C4 平台化合物, 被广泛地应用于食品、化工、医药行业。琥珀酸的更大市场是成为许多工业上有价值的化学品的前体, 包括己二酸、1,4-丁二醇、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮、2-吡咯烷酮、 $\gamma$ -丁内酯和其他绿色溶剂及化学品<sup>[1]</sup>。到 2020 年, 丁二酸需求量预计将在 2020 年达到每年超过 70 万 t 的市场规模<sup>[2]</sup>。近些年来, 发酵法作为化石燃料生产丁二酸的替代工艺正逐渐兴起, 与化学法相比, 发酵法

具有减少温室气体排放、绿色环保、节约化石能源等优点。

琥珀酸放线杆菌是最早从牛的瘤胃中分离而来产琥珀酸的天然菌株之一<sup>[3]</sup>, 它具有厌氧发酵过程简单、副产物产量低、无致病性等优点。但是在琥珀酸放线杆菌发酵产酸过程中, 培养基的 pH 不断降低, 抑制了细胞生长, 所以发酵产酸过程需要添加碳酸镁、碳酸钠等 pH 调节剂<sup>[4]</sup>。然而 pH 调节剂的添加会加大下游提取的难度和生产的成

基金项目: 国家自然科学基金(21604032); “十二五”农村领域国家科技计划课题(2015BAD15B04); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRPI16031); 江南大学工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF201501)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918156; E-mail: zhengpu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-08-15; 修回日期: 2017-10-18; 网络出版日期: 2017-10-25

本。研究琥珀酸放线杆菌细胞对酸胁迫的响应机制,提高细胞耐酸性,将有利于提高琥珀酸放线杆菌的工业应用价值。

本文以琥珀酸放线杆菌 CGMCC1593 为出发菌株,确定抑制细胞生长的 pH 值,分析酸胁迫下细胞内 pH、细胞  $H^+$ -ATPase、细胞膜、谷氨酸脱氢酶等的变化,并比较菌体受酸胁迫后相关基因表达的差异,为寻找增强琥珀酸放线杆菌耐酸性的策略提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、培养基以及培养条件

菌株:琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) SW0580, 保存号: CCGMC 1593, 由本实验室从牛的瘤胃中分离获得。胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基<sup>[5]</sup>。细胞在厌氧培养箱中 38 °C、CO<sub>2</sub> 环境条件下静置培养。

### 1.2 试剂和仪器

BCECF-AM 购自上海碧云天生物科技有限公司。SynergyH4 多功能酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司, TSQ8000 GC-MS 质谱仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司, 日立 H-7650 透射电子显微镜购自上海涌明自动化设备有限公司, 721 可见光分光光度计购自天津拓普仪器有限公司。

### 1.3 斑点测定实验

将细胞在 TSB 培养基中过夜培养, 吸 200  $\mu$ L 至 20 mL pH 4.7 的 TSB 培养基中胁迫 1、2 h 后稀释, 取 10  $\mu$ L 不同稀释梯度的样品在 TSB 平板上点样, 38 °C 二氧化碳气体环境下培养 24 h。

### 1.4 细胞内 pH 值的测定

将细胞在 TSB 培养基中过夜培养, 并转至新

鲜的 TSB 培养基中培养至对数后期(4–5 h,  $OD_{660}=1.6-1.8$ ), 将对数后期细胞分别在用琥珀酸调节的 pH 5.8、pH 5.2、pH 4.7、pH 4.5 的 TSB 培养基中胁迫 1 h。根据 Breeuwer 等<sup>[6]</sup>报道的方法利用荧光探针 BCECF-AM 测定细胞内 pH。pHin (细胞内 pH 值)标准曲线的测定方法:将 pHin 标准曲线缓冲液(50 mmol/L 甘氨酸、50 mmol/L 柠檬酸、50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、50 mmol/L KCl)分别调 pH 至 4、5、6、7、8。将收集的细胞重悬于等体积标准曲线用缓冲液, 并将细胞浓度调为  $OD_{660}=0.5$ , 添加 1  $\mu$ mol/L 的缬氨霉素和 1  $\mu$ mol/L 的尼日利亚菌素, 使细胞 pHin 与 pHex 达到平衡。离心收集细胞, 将其分别悬浮于不同 pH 值的 pHin 标准曲线用缓冲液中, 加入 0.25  $\mu$ mol/L BCECF-AM, 30 °C 下避光恒温水浴 20 min, 离心收集, 用相同的缓冲液洗涤 3 次并重悬。用荧光酶标仪分别测定激发波长 490 nm 及 440 nm、发射波长 535 nm、狭缝宽度为 9 nm 时菌悬液的荧光强度。荧光强度  $I=I_{490}/I_{440}$ , 以 pH 为横坐标,  $\lg I$  为纵坐标绘制标准曲线。

样品 pHin 的测定:收获胁迫后细胞, 用等体积的 50 mmol/L HEPES-K (pH 8.0)缓冲液洗涤并重悬, 细胞悬浮液浓度调为  $OD_{660}=0.5$ , 加入 0.25  $\mu$ mol/L BCECF-AM, 反应条件与标准曲线的测定方法中相同。用等体积的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤细胞并重悬, 根据 pH 标准曲线测定条件测定  $I_{total}$  和  $I_{filtrate}$ , 并根据标准曲线计算胞内 pH 值。

### 1.5 $H^+$ -ATPase 酶活测定

$H^+$ -ATPase 酶活按照 Belli 和 Marquis 等<sup>[7]</sup>报道的方法测定并稍作修改。按 1.4 细胞培养方法, 在对数后期收获细胞并将细胞重新悬浮在 1.25 mL 75 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0) (含 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>)中, 加入 125  $\mu$ L 甲苯到细胞悬浮液, 剧烈

混合,并在 37 °C 水浴摇床中 140 r/min 振荡 5 min。细胞悬浮液在-80 °C 和 37 °C 条件下 2 次冻融。将透化的细胞离心收集,并再悬浮于含有 1 mL 的 75 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)中。反应体系中加入 3 mL 的 50 mmol/L Tris-maleate 缓冲液(pH 6.0) (含 10 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ ), 80  $\mu\text{L}$  透化细胞悬浮液和 60  $\mu\text{L}$  0.25 mmol/L 的 ATP (pH 6.0), 37 °C 水浴摇床中振荡 20 min。采用钼蓝比色法测定无机磷含量。ATP 酶活性定义为每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  Pi 所用的酶量。

## 1.6 透射电镜

按 1.4 细胞培养方法,收获对数后期细胞,一部分用作对照,一部分在 pH 4.7 的 TSB 培养基中胁迫 1 h 后,取稀释到适当浓度的菌悬液滴到铜网膜上用透射电镜观察酸胁迫前后细胞形态变化。

## 1.7 GDH 酶活测定

按 1.4 细胞培养方法,收获对数后期细胞,并将其离心洗涤后转入琥珀酸调节的 pH 5.0 的 TSB 培养基中,38 °C 二氧化碳环境胁迫 2 h。然后离心、洗涤、重悬于 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、用超声破碎仪在 300 W 功率下,破碎 30 min 获得粗酶液。酶反应体系为  $\text{NADP}^+$  0.2 mmol/L、一水谷氨酸钠 10 mmol/L、Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)。用酶标仪测定酶活,反应温度设定为 30 °C。一个酶活单位定义为每分钟消耗 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NADP}^+$  所用的酶量。酶标仪摩尔消光系数为 6.22 L/(mmol·cm),酶标孔高度按 0.6 cm 来算。通过 Bradford 方法测定蛋白含量。

## 1.8 转录组测序

按 1.4 细胞培养方法,收获对数后期细胞并将其平分两等份,一份用琥珀酸调节的 pH 5.0 的 TSB 培养基胁迫 1.5 h,另一份用作对照。用 RNA 提取试剂盒分别提取胁迫组与对照组细胞总 RNA,

送苏州金唯智公司进行 RNA-seq 测序。差异基因选取条件为  $P < 0.05$ , 并且 fold change  $> 2$ 。

# 2 结果和分析

## 2.1 低 pH 对细胞生长的影响

为了观察低 pH 对 CGMCC1593 细胞生长的影响,将活化后细胞分别接种至用琥珀酸调节的不同 pH 的 TSB 培养基中,培养至 pH 不再下降为止,测最终的 OD 值和 pH 值。由表 1 可以看出,细胞 OD 随着初始 pH 的降低而降低,而终 pH 值略有升高,说明初始 pH 越低,对细胞生长抑制越明显。不同初始 pH 条件下培养的细胞最终 pH 都降到 4.7 左右,初始 pH 降到 4.7 时,细胞不再生长,推测 pH 4.7 是细胞自然生长的最大生长抑制 pH 值,故将酸胁迫条件的 pH 下限设为 4.7 左右。

## 2.2 不同 pH 胁迫对细胞 $\text{H}^+$ -ATPase 的影响

$\text{H}^+$ -ATPase 可以通过消耗 ATP 泵出胞内  $\text{H}^+$  来增加细胞内 pH,为了探索细胞膜  $\text{H}^+$ -ATPase 如何响应酸胁迫,收获对数后期细胞,用不同 pH 值的 TSB 培养基温育 1 h 后测定膜  $\text{H}^+$ -ATPase 活性。 $\text{H}^+$ -ATPase 随着胁迫 pH 的降低而降低,pH 4.5 时  $\text{H}^+$ -ATPase 酶活急剧下降,说明琥珀酸放线杆菌的  $\text{H}^+$ -ATPase 的活性不仅不能在抗酸过程中起重要作用,还会受到酸胁迫的抑制(图 1)。

表 1. 低 pH 下细胞生长状况

Table 1. The growth of cell at low pH values

Initial pH	Final OD	Final pH
6.6	0.634±0.010	4.68±0.01
6.2	0.560±0.014	4.70±0.01
5.8	0.502±0.020	4.72±0.02
5.4	0.388±0.022	4.76±0.03
5.0	0.228±0.019	4.87±0.03
4.7	0.030±0.003	4.72±0.02
4.5	0.028±0.001	4.51±0.01

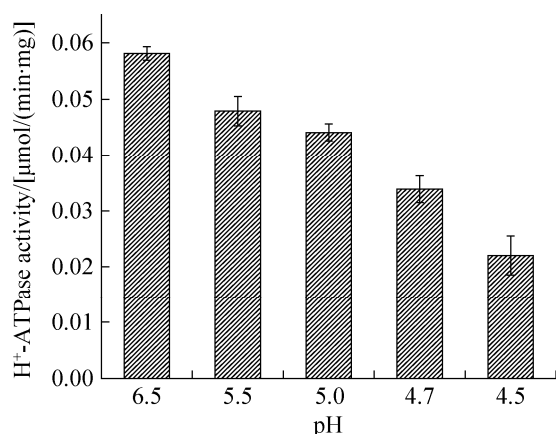


图 1. 酸胁迫后 H<sup>+</sup>-ATPase 的响应

Figure 1. The response of H<sup>+</sup>-ATPase after acid stress. Mean values from three independent experiments were shown. The error bar represents standard error.

### 2.3 不同 pH 胁迫处理后细胞内 pH 值的变化

测定细胞内 pH 可以让我们认识酸胁迫条件下细胞维持细胞内 pH 值的能力。在 pH 大于 5.2 时, 细胞内 pH 随着胁迫 pH 的降低而轻微降低。而 pH 4.7 和 pH 4.5 时, 细胞内 pH 突然升高, 分别为 6.825 和 6.872 (图 2)。这可能是细胞膜受到损伤、通透性增大、细胞内的 pH 值受到温育缓冲液 (HEPES, pH 8.0) 影响的结果。用 TEM 观察细胞膜, 间接证实了该想法。

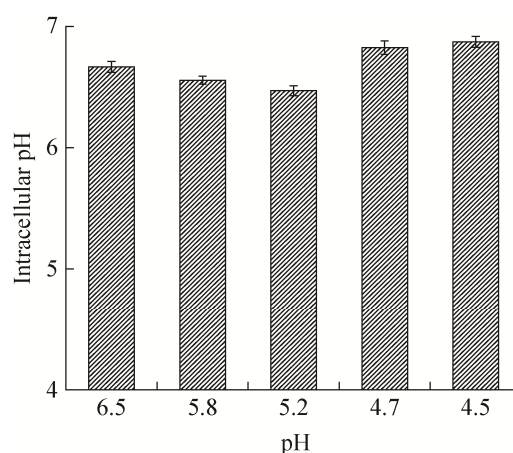


图 2. 酸胁迫后细胞内 pH 变化

Figure 2. The changes of intracellular pH values after acid stress. Mean values from three independent experiments were shown. The error bar represents standard error.

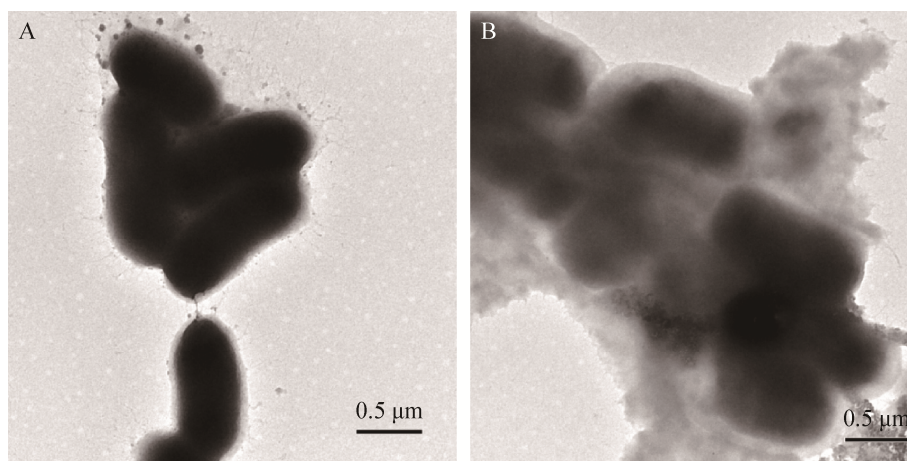


图 3. 酸胁迫后 CGMCC1593 细胞膜的变化

Figure 3. The damage to CGMCC1593 membrane after acid stress. A: control; B: acid adapted at pH 4.7 for 1 h.

2.4 谷氨酸对低 pH 条件下细胞的保护作用

酸胁迫条件下，细胞可能会通过增加氨基酸的摄取和利用以产生更多的氨来缓解细胞内 pH 的降低。我们考察了添加谷氨酸对 CGMCC1593 酸耐受性的影响。图 4 的斑点测定实验可以看出，在 pH 4.7 的 TSB 培养基中温育 1 h 后，细胞存活率显著低于对照组，温育 2 h 后没有发现活细胞，但添加 20 mmol/L 谷氨酸钠条件的细胞存活率明显高于没有添加谷氨酸钠的。表明谷氨酸有助于增强 CGMCC1593 抵抗酸胁迫能力。

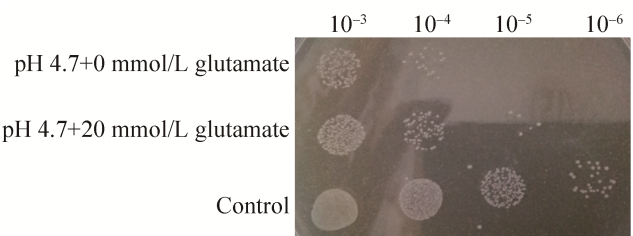
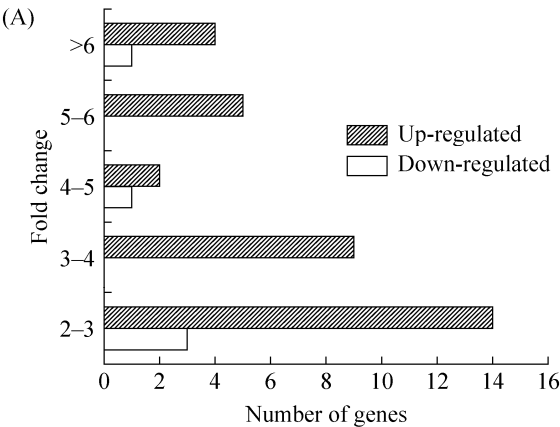


图 4 谷氨酸的保护作用

Figure 4. The protection of glutamate to CGMCC1593 under acid stress. pH 4.7+0 mmol/L glutamate means without the addition of glutamate, cells were treated at pH 4.7. pH 4.7+20 mmol/L glutamate means with addition of 20 mmol/L glutamate, cells were treated at pH 4.7.



进一步考察与谷氨酸代谢相关酶的情况。

Hersh<sup>[8]</sup>等报道了谷氨酸脱羧酶在大肠杆菌细胞酸胁迫过程中所起的重要作用，由于对公布的琥珀酸放线杆菌基因序列(NC\_009655.1)检索，发现其没有谷氨酸脱羧酶编码基因，故考察谷氨酸脱氢酶对酸胁迫的响应。从表 2 可以看出，酸胁迫后 GDH 酶活是对照组的 1.2 倍， $K_m$  (NADP<sup>+</sup>)值从 (0.890±0.022) mmol/L 下降到(0.619±0.017) mmol/L，推测 GDH 可能通过构象改变增加对谷氨酸的亲合力或通过增加转录水平来增加酶活。GDH酶活增加，可能通过增加谷氨酸的代谢产 NH<sub>3</sub> 来抵抗酸胁迫。

表 2. GDH 对酸胁迫的响应

Table 2. The response of GDH to acid stress		
Adaptation pH	GDH/(U/g)	$K_m$ /(mmol/L)
6.5 (Control)	35.36±0.90	0.890±0.022
5.0	42.48±0.75	0.619±0.017

2.5 酸诱导的差异表达基因

通过 RNA-seq 技术测定细胞酸胁迫前后分子水平基因表达的差异。根据“ $P<0.05$  ,fold change>2”筛选发现共有 39 个基因差异表达，其中有 34 个基因上调，5 个基因下调。其中，2–3 倍表达上调的基因有 14 个(41%)，3–4 倍上调的基因有 9 个(26%) (图 5-A)。对这些基因进行功能分类后发现，

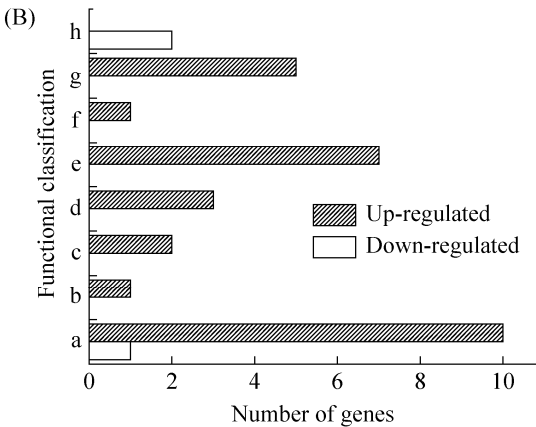


图 5. DEGs 差异倍数及功能分类总结

Figure 5. Summary of the fold change and the functional classification of DEGs. A: The distribution of genes according to fold changes in expression levels. B: DEGs in response to acid stress, classified into functional categories. a: Stress protein; b: Oxidative phosphorylation; c: C4 transporter; d: Amino acid transport and metabolism; e: Carbon transport and metabolism; f: HlyD family secretion protein; g: Hypothetical protein; h: Aminoacyl-tRNA biosynthesis.

49%的基因属于应激蛋白、转运蛋白,小部分基因与代谢相关,此外还有一些未知蛋白(图 5-B)。其中乌头酸水合酶基因与阴离子通透酶基因上调最显著,分别为 30.98 和 31.62 倍。

### 3 讨论

本文通过比较琥珀酸放线杆菌对低 pH 的响应情况,初步对琥珀酸放线杆菌的酸胁迫机理进行探索。

细胞膜完整的结构与正常的功能以及细胞内 pH 的维持是细胞能够抵御酸胁迫的必要条件。通过透射电镜细胞形态观察发现,细胞在 pH 4.7 条件下胁迫 1 h,细胞壁即瓦解,内容物损失,细胞膜表面出现溶孔,而干酪乳杆菌在 pH 3.5 胁迫 1 h 后,细胞膜才受到类似损伤<sup>[9]</sup>,大肠杆菌可以在 pH 2.5 酸性环境中存活数小时<sup>[10]</sup>,表明琥珀酸放线杆菌细胞膜对酸的敏感性大。许多报道  $H^+$ -ATPase 在微生物抵御酸胁迫过程中起重要作用<sup>[11-12]</sup>,其通过增加酶活力来增大对细胞内 pH 的调节能力。酸胁迫后  $H^+$ -ATPase 酶活逐渐降低,表明  $H^+$ -ATPase 并不能在琥珀酸放线杆菌对抗酸胁迫时起重要作用。虽然  $H^+$ -ATPase 作为质子泵没有在琥珀酸放线杆菌中起显著的积极作用,但转录组结果显示 NADH 脱氢酶基因上调 3.5 倍,NADH 脱氢酶具有传递电子和泵出质子功能,其表达上调不仅可以加快 NADH 的利用和电子传递,同时还可以泵出质子,调节细胞内 pH 值。

酸胁迫后,细胞会调动细胞内碱化机制如脲酶系统、精氨酸脱亚胺酶途径、谷氨酸脱羧酶系统等<sup>[12-13]</sup>,在 CGMCC1593 中,加入谷氨酸钠可以增加酸胁迫后细胞的存活率,我们猜测存在类似于谷氨酸脱羧酶的碱化系统,来调节细胞内

pH,增强抗酸能力。细胞在 pH 5.0 胁迫 2 h 后,GDH 酶活升高 1.2 倍,同时  $K_m$  值降低,但转录组分析并未显示 GDH 编码基因的表达差异,说明 GDH 可能是通过增加对底物的亲和力来增加催化活力。另外,转录组测序发现谷氨酰胺 ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白、极性氨基酸 ABC 转运蛋白底物结合蛋白编码基因分别上调 2.2 倍和 2.1 倍(表 3)。综上表明酸胁迫后细胞对谷氨酸及其他氨基酸的需求增加,并通过增加转运蛋白表达来加速氨基酸的摄取,同时也存在通过提高 GDH 酶活加速分解利用谷氨酸产氨来增强耐酸性。

酸胁迫后,热休克蛋白编码基因 *rpoH*、*dnaK*、*grpE*、*clpB*、*hspG* 分别上调 2.5、4.0、2.1、3.9、3.5 倍(表 3)。*rpoH* 是常见的热休克反应调节因子。Daniella 等<sup>[14]</sup>研究发现,*S. meliloti rpoH1* 缺失突变体在 pH 5.75 的生长条件下以及酸胁迫实验后生长受到严重影响。*DnaK* 是大肠杆菌中主要的 Hsp 70 分子伴侣,Abdullah-Al-Mahin 等<sup>[15]</sup>在乳酸球菌中异源表达大肠杆菌来源的 *DnaK*,发现 NZ-EdnaK 不仅增强了对 40 °C 环境的耐受力,对 3% NaCl、5%乙醇以及 0.5%乳酸(pH 5.47)的耐受力也显著提升。*GrpE* 能促进 *DnaK* 的 N 端结合位点结构域的 ADP 解离,从而诱导 *DnaK* 的 C 端底物结合结构域释放底物<sup>[16-17]</sup>。大肠杆菌 *ClpB* 蛋白是耐高温所需的分子伴侣,有助于聚集蛋白的解聚和重折叠<sup>[18]</sup>。土拉氏木霉 *clpB* 突变体高温(50 °C)胁迫在 30 min 后活菌数显著降低,而野生型菌株几乎不受影响<sup>[19]</sup>。*HtpG* 是一种常见的环境胁迫应激蛋白,Suo 等<sup>[20]</sup>发现酪丁酸梭菌 *htpG* 过表达菌株与野生菌相比其对丁酸的耐受力大大增强。因此这些热应激蛋白表达基因的上调,表明它们在琥珀酸放线杆菌细胞抵御酸胁迫过程中起了重要作用。

表 3. 酸诱导的差异表达基因

Table 3. Acid-induced DEGs

Gene ID	Gene name	Description	Fold change
<b>Stress protein</b>			
ASUC_RS05750	<i>dnaK</i>	Molecular chaperone DnaK	3.99
ASUC_RS10415	<i>clpB</i>	ATP-dependent chaperone ClpB	3.86
ASUC_RS04340	<i>htpG</i>	Molecular chaperone HtpG	3.46
ASUC_RS09625	<i>cdaR</i>	CdaR family transcriptional regulator	2.90
ASUC_RS04130	<i>merR</i>	MerR family transcriptional regulator	2.27
ASUC_RS00435	<i>lysR</i>	LysR family of transcriptional regulators	2.19
ASUC_RS00870	<i>dps</i>	DNA starvation/stationary phase protection protein	2.55
ASUC_RS02325	<i>rpoH</i>	RNA polymerase factor sigma-32	2.49
ASUC_RS07115	<i>qseB</i>	DNA-binding response regulator	2.08
ASUC_RS04605	<i>grpE</i>	The nucleotide exchange factor GrpE	2.07
ASUC_RS07535	<i>cspD</i>	Cold shock domain protein CspD	-2.54
<b>Transporter</b>			
ASUC_RS00975	<i>tC.DASS</i>	Anion permease	31.62
ASUC_RS10240	<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase	3.48
ASUC_RS04745	<i>scrA</i>	PTS sucrose transporter subunit IIBC	5.94
ASUC_RS09600	<i>tctA</i>	Tat pathway signal protein	2.89
ASUC_RS00765	<i>dcuB</i>	C4-dicarboxylate ABC transporter	3.14
ASUC_RS10085	<i>aBC.PA.A</i>	Glutamine ABC transporter ATP-binding protein	2.21
ASUC_RS10080	<i>aBC.PA.S</i>	Amino acid ABC transporter substrate binding protein	2.08
ASUC_RS09585	<i>gntP</i>	Gluconate permease	3.12
<b>Metabolism</b>			
ASUC_RS09620	<i>garD</i>	Galactate dehydratase	3.21
ASUC_RS09640	<i>garL</i>	5-keto-4-deoxy-D-glucarate aldolase	5.27
ASUC_RS09580	<i>gudD</i>	Glucarate dehydratase	4.61
ASUC_RS09630	<i>garK</i>	Glycerate kinase	6.58
ASUC_RS00985	<i>asnB</i>	Aconitine hydratase B	30.98
ASUC_RS00600	<i>wbpD</i>	Serine acetyltransferase	2.68
ASUC_RS09635	<i>garR</i>	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	5.85
ASUC_RS03700	<i>metE</i>	5-methyl tetrahydropropionyl triglutamate-homocysteine methyltransferase	2.49
<b>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</b>			
ASUC_RS03960	<i>tRNA-Pro</i>	tRNA-Pro	-7.62
ASUC_RS03540	<i>tRNA-Arg</i>	tRNA-Arg	-2.86
<b>Hypothetical protein</b>			
ASUC_RS00980		Hypothetical protein	5.12
ASUC_RS11025		Hypothetical protein	5.83
ASUC_RS06940		Hypothetical protein	-4.76
ASUC_RS09590		Hypothetical protein	4.15
ASUC_RS03635		Hypothetical protein	3.99
ASUC_RS00745		Hypothetical protein	-2.82
ASUC_RS11020		Hypothetical protein	7.04
<b>HlyD family secretion protein</b>			
ASUC_RS06005	<i>aBC-2.TX</i>	Hemolysin D	2.48
<b>Aminobenzoate degradation</b>			
ASUC_RS01120	<i>mdlA</i>	Mandelate racemase	3.03



其他应激蛋白及调节因子中,饥饿细胞的 DNA 结合蛋白 Dps 编码基因上调了 2.5 倍(表 3), Dps 在多种微生物中起保护和调节作用,已证实 Dps 在大肠杆菌对抗酸胁迫方面发挥关键作用<sup>[21]</sup>;群体感应调节器 QseB 编码基因上调 2.1 倍(表 3), QseBC 属于 OmpR 两组分系统,具有群体感应功能。在一定条件下,该系统与转录因子相互作用以调控基因表达<sup>[22]</sup>。Yin 等发现酸胁迫后 *E. coli* O157:H7 群体感应基因 *qseB* 上调了 2.96 倍<sup>[23]</sup>。MerR 与 LysR 家族转录调节因子的编码基因分别上调了 2.3 和 2.2 倍(表 3);碱性条件胁迫后, *Shewanella oneidensis* 的 LysR 家族转录调节因子与 MerR 家族转录调节因子编码基因分别上调了 5.0 倍和 4.5 倍<sup>[24]</sup>。酸胁迫后, Dps、QseB、MerR、LysR 等应激蛋白编码基因上调,表明它们在琥珀

酸放线杆菌抗环境胁迫过程中具有重要作用。

酸胁迫后,一些代谢途径中酶基因上调。葡萄糖酸代谢相关基因上调,并通过甘油酸与 EMP 途径紧密结合,如图 6 所示。葡萄糖酸通透酶负责葡萄糖酸的吸收, CdaR 家族转录调节因子负责葡萄糖酸、半乳糖酸及甘油酯代谢调节,葡萄糖酸和半乳糖酸经 *gudD*、*garD*、*garL* 生成丙酮酸和羧基丙二酸半醛,羧基丙二酸半醛又经 *garR* 生成甘油酸,甘油酸再经 *garK* 生成 2-P-甘油酸,进入 EMP 途径,形成一个回路,从而使葡萄糖酸和半乳糖酸快速流向丙酮酸。同时参与多个代谢途径的乌头酸水合酶表达上调 31 倍(表 3),更能加快丙酮酸进入乙醛酸循环或 TCA 循环等途径的速度。葡萄糖酸以及半乳糖酸相关基因的表达上调,可以增加产能和物质合成速度来弥补细胞的损伤。

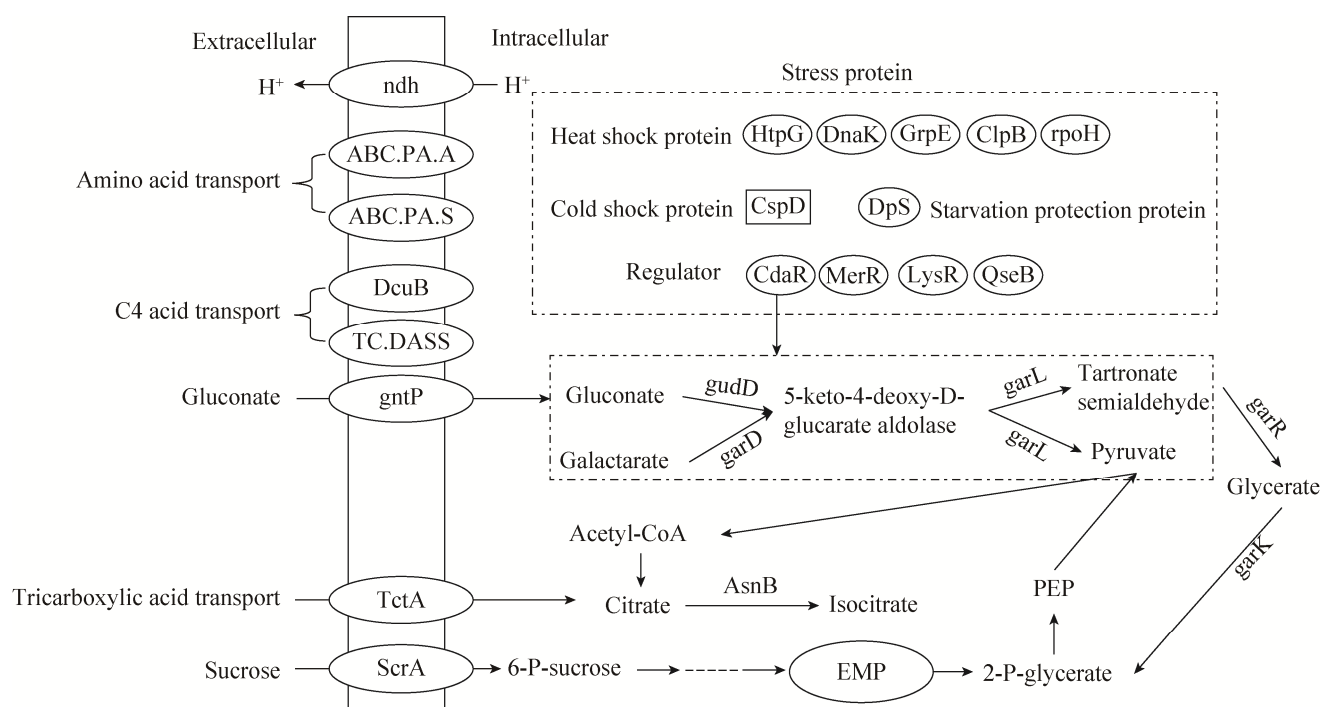


图 6. 差异表达基因间的关系模型

Figure 6. The relationship model between differentially expressed genes. All genes shown were up-regulated except for CspD which were shown in the form of square (Table 3).



有机酸通过扩散作用进入细胞,在细胞内解离成酸根阴离子和质子,造成细胞内酸化及阴离子积累<sup>[25]</sup>。酸胁迫后,有两种介导离子转运的转运蛋白上调。阴离子通透酶 TC.DASS 编码基因上调 31.6 倍,C4-二羧酸酯 ABC 转运蛋白 DcuB 编码基因上调 3.1 倍(表 3)。C4-二羧酸酯 ABC 转运蛋白 DcuB 可能介导丁二酸根阴离子的外排,因为 Chen 等<sup>[26]</sup>证实 DcuB 和 DcuC 是大肠杆菌琥珀酸盐外排的主要转运体。而阴离子通透酶作为 DASS 家族的一种二价阴离子,Na<sup>+</sup>同向转运蛋白,主要负责 C4 二羧酸吸收<sup>[27]</sup>,其表达上调可能是对胞外丁二酸根阴离子的应激响应,同时 C4 二羧酸吸收增加可能会增强延胡索酸呼吸途径。

综上所述,琥珀酸放线杆菌受酸胁迫后,细胞膜容易遭到破坏,质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 酶活下降,CGMCC1593 细胞可以通过增加谷氨酸等氨基酸的摄取和 GDH 活力来加速利用谷氨酸以调节细胞内 pH。转录组结果发现了一些在酸胁迫过程中起关键作用的应激蛋白、转运蛋白、代谢相关基因上调显著,如分子伴侣 DnaK、阴离子通透酶 TC.DASS、乌头酸水合酶 AsnB 以及葡萄糖酸和半乳糖酸代谢一系列相关基因等,这些差异基因有可能成为提高琥珀酸抗酸胁迫作用的研究靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Cok B, Tsiropoulos I, Roes AL, Patel MK. Succinic acid production derived from carbohydrates: an energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 2014, 8(1): 16–29.
- [2] Choi S, Song CW, Shin JH, Lee SY. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 223–239.
- [3] Guettler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1999, 49: 207–216.
- [4] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, Ni Y, Dong JJ, Wei P. Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, 83(5): 722–729.
- [5] Liu X, Zheng P, Ni Y, Dong JJ, Sun ZH. Breeding *Actinobacillus succinogenes* with acid-tolerance by genome shuffling. *Microbiology*, 2009, 36(11): 1676–1681. (in Chinese) 刘璇, 郑璞, 倪晔, 董晋军, 孙志浩. 基因组改组技术选育耐酸性琥珀酸放线杆菌. *微生物学通报*, 2009, 36(11): 1676–1681.
- [6] Breeuwer P, Drocourt J, Rombouts FM, Abee T. A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *Applied & Environmental Microbiology*, 1996, 62(1): 178–183.
- [7] Belli WA, Marquis RE. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(4): 1134–1138.
- [8] Hersh BM, Farooq FT, Barstad DN, Blankenhorn DL, Slonczewski JL. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(13): 3978–3981.
- [9] Wu CD, Zhang J, Wang M, Du GC, Chen J. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(7): 1031–1039.
- [10] Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(11): 3525–3535.
- [11] Martín-Galiano AJ, Ferrándiz MJ, de la Campa AG. The promoter of the operon encoding the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(6): 1327–1338.
- [12] Cusumano ZT, Caparon MG. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(7): 1288–1296.
- [13] Wilson CM, Loach D, Lawley B, Bell T, Sims IM, O'Toole PW, Zomer A, Tannock GW. *Lactobacillus reuteri* 100–23 modulates urea hydrolysis in the murine stomach. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6104–6113.
- [14] de Lucena DKC, Pühler A, Weidner S. The role of sigma factor RpoH1 in the pH stress response of *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1): 265.
- [15] Abdullah-Al-Mahin, Sugimoto S, Higashi C, Matsumoto S, Sonomoto K. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* DnaK. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4277–4285.
- [16] Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl FU, Kuriyan J. Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, 1997, 276(5311): 431–435.
- [17] Brehmer D, Rüdiger S, Gässler CS, Klostermeier D, Packschies L, Reinstein J, Mayer MP, Bukau B. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(5): 427–432.
- [18] Zolkiewski M. A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1094–1100.
- [19] Meibom KL, Dubail I, Dupuis M, Barel M, Lenco J, Stulik J, Golovliov I, Sjöstedt A, Charbit A. The heat-shock protein ClpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(6): 1384–1401.
- [20] Suo YK, Luo S, Zhang YN, Liao ZP, Wang JF. Enhanced butyric acid tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(8): 1145–1156.
- [21] Choi SH, Baumler DJ, Kaspar CW. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied & Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3911–3916.
- [22] Clarke MB, Sperandio V. Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *Molecular Microbiology*, 2005, 58(2): 441–455.
- [23] Yin X, Feng Y, Lu Y, Chambers JR, Gong J, Gyles CL. Adherence and associated virulence gene expression in acid-treated *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro* and in ligated pig intestine. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 4): 1084–1093.
- [24] Leapheart AB, Thompson DK, Huang K, Alm E, Wan XF, Arkin A, Brown SD, Wu LY, Yan TF, Liu XD, Wickham GS, Zhou JZ. Transcriptome profiling of *Shewanella oneidensis* gene expression following exposure to acidic and alkaline pH. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(4): 1633–1642.
- [25] Carpenter CE, Broadbent JR. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods. *Journal of Food Science*, 2009, 74(1): R12–R15.
- [26] Chen J, Zhu XN, Tan ZG, Xu HT, Tang JL, Xiao DG, Zhang XL. Activating C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporters DcuB and DcuC for improving succinate production. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2014, 98(5): 2197–2205.
- [27] Nie RX, Stark S, Symersky J, Kaplan RS, Lu M. Structure and function of the divalent anion/Na<sup>+</sup> symporter from *Vibrio cholerae* and a humanized variant. *Nature Communications*, 2017, 8: 15009.

# Physiological and transcriptional responses of *Actinobacillus succinogenes* to acid stress

Qun Zhang<sup>1,2</sup>, Pengcheng Chen<sup>1,2</sup>, Pu Zheng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] We explored by physiological and transcriptional responses of *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 to acid stress. [Methods] We studied the effects of different initial pH on cell growth, activity of H<sup>+</sup>-ATPase and intracellular pH before and after acid stress as well as the protection mechanism of glutamate on CGMCC1593. The transcriptomics technique was used to explore the differentially expressed genes under acid stress. [Results] Cell growth was inhibited and the activity of H<sup>+</sup>-ATPase decreased with the decrease of initial pH. After acid stress at pH 4.7, the cell membrane was severely damaged. Glutamate had a protective effect on the cells under acid stress. In total 39 genes were differently expressed altogether under acid stress, of which 49% were stress and transport proteins, and a small part was related to metabolism. [Conclusion] Understanding the physiological and transcriptional responses of *Actinobacillus succinogenes* to acid stress provides references for improving acid resistance of *Actinobacillus succinogenes*.

**Keywords:** *Actinobacillus succinogenes*, acid stress, cell membrane, intracellular pH, H<sup>+</sup>-ATPase, GDH, RNA-seq

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21604032), by the 12th Five-Year National Science and Technology Program in Rural Areas (2015BAD15B04), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP116031) and by the Open Topic of Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University (KLIB-KF201501)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918156; E-mail: zhengpu@jiangnan.edu.cn

Received: 15 August 2017; Revised: 18 October 2017; Published online: 25 October 2017