

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(8):940-947; 4 August 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

巨大芽胞杆菌与普通生酮基古龙酸菌共培养过程中相互作用分子机制研究进展

朱益波^{1,2,3}, 周景文^{1,2*}, 陈坚^{1,2}

江南大学,¹ 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室,² 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

³常熟理工学院生物与食品工程学院, 常熟 215500

摘要: 混菌发酵法广泛应用于维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸的生产。为进一步改善工艺, 多年来, 科研人员一直致力于研究发酵过程中两菌相互作用的科学本质。目前, 随着组学技术、高通量技术、生物信息学和生理学等多种技术与学科的迅速发展, 为深入研究相互作用分子机制提供了新的方法和工具。通过蛋白质组学、代谢组学、比较基因组学、转录组学等多种组学数据的挖掘和分析, 提供了系统中各层次之间的相互作用关系网络。在此基础上结合高通量的生理学验证分析, 为诠释两菌相互作用分子机制和开发代谢工程改造策略奠定了基础。本文就近些年来在该研究方向的进展及其应用进行了简要归纳, 并提出进一步研究的方向。

关键词: 巨大芽胞杆菌, 普通生酮基古龙酸菌, 2-酮基-L-古龙酸, 相互作用分子机制

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-0940-08

2-酮基-L-古龙酸 (2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG) 是二步微生物发酵法生产维生素 C (VC) 的重要中间产物。我国自主研发的 VC 二步发酵法包括两个主要发酵过程: 即第一步将 D-山梨醇由弱氧化葡萄糖酸杆菌或生黑醋酸杆菌转化为 L-山梨糖; 第二步由伴生菌巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和产酸菌普通生酮基古龙酸菌 (*Ketogulonigenium vulgare*) 混合培养转化 L-山梨糖为 2-KLG。因该工艺具有高糖酸转化率的优势, 经过几十年的发展, 我国 VC 生产技术与规模均处于世界领先水平, 国际市场占有率约 85%, 多年来为国家提供了大量外汇和就业岗位。但是随着生产规模的扩大以及国际能源、资源价格的不断变化使得一些问题逐渐变得突

出, 如: (1) 能耗物耗较高、成本居高不下; (2) 废气、废水和废渣三废排放量大; (3) 混菌发酵工艺复杂、稳定性差。为解决上述问题, 国内外众多生产及研究机构从多个方面开展研究, 如优化发酵培养基^[1-2]、筛选新型生产菌株^[3-4], 发酵工艺优化^[5-6]、生产菌株代谢工程改造^[7-8]、伴生菌与产酸菌的生理及相互作用机制研究^[9-13]等。

迄今为止, 由于存在酶热稳定性差、转化率低、底物抑制作用等问题, 新的工程菌及发酵工艺仍然未能在经济效益方面超越传统二步发酵法。在今后相当长的时间内, 现有的二步法工艺仍将是主要的生产方式。近些年来, 研究人员对于传统二步法菌株组合产生的工业奇迹中存在的科学问题产生了浓

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973 项目) (2012CB720806); 江苏省产学研前瞻性项目 (BY2009112)

* 通信作者。Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

作者简介: 朱益波 (1980-), 男, 江苏靖江人, 博士研究生, 主要从事混菌相互作用机制方面的研究。E-mail: centuryrain@126.com

收稿日期: 2012-02-25; **修回日期:** 2012-03-22

厚兴趣, 纷纷利用创新的研究手段对伴生菌与产酸菌互相作用的分子机制进行深入研究。本文就近年来国内外在该方面研究的进展做简要介绍和总结, 并提出今后可能的研究和方向以供借鉴。

1 基于组学方法的研究

生物体本身具有高度的复杂性, 而不同微生物形成的生态系统则进一步加剧了生物过程研究的复杂性。利用传统的微生物研究方法可以解释生物系统的微观或局部现象, 但是容易忽略系统中各模块或层次之间的相互作用而无法全面揭示其潜在的本质。基因组学、转录组学和代谢组学等组学研究平台和方法可以从微生物整体水平上研究功能各异的生物组成元件及其相互作用。下面简要介绍利用这些组学技术研究混合培养过程两菌相互作用机制的进展。

1.1 基于基因组学的研究

新一代高通量测序技术的成熟和普及为获得生产菌株的全基因组信息提供了机遇。近些年来, 国内几大维生素 C 生产商纷纷与科研院所合作, 对其生产菌株进行全基因组序列分析, 为进一步了解产酸菌的遗传背景, 研究混合培养过程中相互作用机制、重要的代谢途径功能基因、优化生产工艺、构建高性能产酸工程菌提供了重要依据。目前公开报道的三株 *Ketogulonigenium vulgare* 和一株重要伴生菌 *Bacillus megaterium* WSH-002 的全基因组简要信息见表 1 所示。三株产酸菌的基因组组成结构、大小、G + C 百分比都非常接近, 但是预测的 ORF 有一定的差异。WB0104, Y25 和 WSH-001 分别预测出 3196、3290 和 3065 个 ORF。基因组信息表明, 三株菌均编码有多个与转化山梨糖生成 2-KLG 相关的脱氢酶基因, *K. vulgare* 较强的山梨糖转化能力可能与此有关。

表 1 主要生产菌株全基因组简要信息

Table 1 Concise genomic information of main strains for 2-KLG production

Items	<i>K. vulgare</i> WB0104	<i>K. vulgare</i> Y25	<i>K. vulgare</i> WSH-001	<i>B. megaterium</i> WSH-002
Genome scale (Mb)	3. 276	3. 288	3. 277	4. 13
Plasmid	2	2	2	3
G + C % ^a	61. 69 / 61. 32 / 62. 58	61. 72 / 61. 35 / 62. 63	61. 69 / 61. 33 / 62. 58	39. 10 / 36. 00 / 32. 20 / 33. 20
ORF	2727 / 244 / 225	2807 / 256 / 227	2604 / 246 / 215	5186 / 69 / 11 / 14
rRNA	5	5	3	10
tRNA	58	59	51	99
sdh ^b	No details	5	5	0
Accession number	None	CP002224 / CP002225 / CP002226	CP002018 / CP002019 / CP002020	CP003017 / CP003018 / CP003019 / CP003020
Company	State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering. North China pharmaceutical Group Corporation.	Beijing Institute of Biotechnology. Shijiazhuang Pharma Group.	State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University. Jiangshan Pharmaceutical Co., LTD.	
Reference	[14]	[15]	[16]	[17]

a: G + C percentage of the chromosome and plasmids, respectively; b: The number of genes related with sorbose dehydrogenase.

在获取基因组信息后, 我们对基因组信息的比较和代谢途径重构分析表明, 伴生菌 *B. megaterium* WSH-002 的 DNA 复制系统和修复系统较为完善, 含有 20 种基本氨基酸的转运 RNA 合成酶编码基因; 主要的碳水化合物代谢途径如糖酵解途径、TCA 循环、磷酸戊糖途径、丙酮酸代谢途径等都完全具备; 与 *K. vulgare* WSH-001 相比, WSH-002 具有更为完善的氨基酸代谢途径, 辅因子的合成代谢能力更加完备; WSH-002 基因组中不存在 2-KLG 合成相关

酶编码基因, 因此不具备合成 2-KLG 的能力。WSH-001 碳水化合物代谢途径不够完善, 除了 TCA 循环和磷酸戊糖途径外, 其它碳水化合物代谢途径或多或少存在关键基因的缺失, 甚至缺乏整个代谢途径; WSH-001 的组氨酸、赖氨酸、甘氨酸、脯氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成途径都存在缺陷^[18]。但是 WSH-001 基因组中编码氨基酸转运和代谢相关的基因非常丰富, 占总基因数的 15.2%。在 WB0104 基因组中, 有 640 个左右的

ORF 编码转运蛋白, 占预测总基因数的 25% 左右^[14]。这些信息暗示在共培养过程中, *K. vulgare* 可能通过主动转运这些营养因子促进了自身的繁殖和代谢。

1.2 基于蛋白质组学和代谢组学的研究

天津大学 Zhou 等^[12] 利用气相色谱-飞行时间质谱分析软琼脂平板上的 *B. megaterium* 和 *K. vulgare* 的培养物及培养基成分, 结合主成分分析和分层聚类等多变量数据挖掘方法研究了两菌的代谢互作分子机制。研究表明, *B. megaterium* 与 *K. vulgare* 之间存在互生以及拮抗的复杂相互作用。伴生菌细胞周围积累的赤藓糖、赤藓糖醇、果糖、鸟嘌呤、肌醇有可能促进了 *K. vulgare* 生长; *K. vulgare* 细胞外氨基酸等其它营养物质浓度高于胞内和培养基对照中相应浓度, 推测可能是由于 *K. vulgare* 具有较强的蛋白水解活力导致的。这些营养物质作为化学趋向物引导 *B. megaterium* 向 *K. vulgare* 细胞迁移, 并在迁移过程中迅速消耗这些营养物质; 伴生菌芽胞形成的标记物吡啶二羧酸含量变化趋势与 2-KLG 变化趋势相似, 推测芽胞形成过程物质的释放可能有助于强化 *K. vulgare* 氧化山梨糖形成 2-KLG。在以上工作的基础上, Ma^[11] 等整合了蛋白质组学和代谢物组学数据, 鉴定了混合培养过程中约 100 种代谢物和 258 种蛋白, 并对它们的时序变化进行定量研究。研究结果表明伴生菌芽胞的形成及细胞裂解与 2-KLG 合成相关联, 据此推测芽胞形成过程可能是 *B. megaterium* 与 *K. vulgare* 相互作用的重要因素之一; 蛋白质组学分析进一步表明 *K. vulgare* 细胞内与消除活性氧 (ROS) 胁迫相关蛋白, 如超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽-S-转移酶、NADPH: 醌氧化还原酶在伴生菌芽胞生成期间上调; 此外 *K. vulgare* 细胞戊糖磷酸途径的 6-磷酸葡萄糖内酯酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、醛酸转移酶在伴生菌形成芽胞的高峰时都显著上调。

江南大学张静从单独培养与混合培养差异分析的角度, 对两种培养方式产酸稳定期细胞内蛋白进行蛋白质组学研究, 并用 MALDI-TOF 对全部蛋白点进行鉴定^[9]。结果表明在鉴定出的 419 个属于 *K. vulgare* 的蛋白中有约 20% 的蛋白质属于氨基酸转运与代谢相关蛋白; 在混合培养中表达量显著增加的 188 个蛋白中鉴定出 151 个属于 *K. vulgare* 的蛋白。对 151 个蛋白的功能注释分析表明氨基酸代

谢、蛋白质翻译、能量代谢三类占据了 41%。氨基酸代谢途径中丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和谷氨酰胺等代谢途径中多种酶蛋白水平显著上调。戊糖磷酸途径中的 6-磷酸异构酶、转酮酶, TCA 循环中的异柠檬酸脱氢酶、琥珀酰辅因子 A 合成酶和延胡索酸水合酶, 细胞壁合成、辅因子代谢、无机离子代谢、核苷的合成途径中多种蛋白也因伴生菌的存在而显著上调。

结合以上蛋白质组学和代谢组学的研究结果, 我们推测 *B. megaterium* 与 *K. vulgare* 之间的相互作用机制可能在于但不限于以下几点: (1) 两菌之间存在代谢协同关系, 即伴生菌的代谢产物提供了 *K. vulgare* 所需的生长因子, *K. vulgare* 的蛋白水解活力促进了伴生菌的生长; (2) 伴生菌形成芽胞并自溶的特性强化了代谢产物的释放; (3) 伴生菌强化了 *K. vulgare* 氨基酸代谢与转运、蛋白质翻译和能量代谢等众多与细胞生长活力相关的蛋白生成; (4) 伴生菌增强了 *K. vulgare* 应对活性氧胁迫的能力。

1.3 基于基因芯片的转录组学研究

代谢物组学和蛋白质组学分别从代谢物水平和蛋白质水平总体上揭示了相互作用的机制。随之提出的问题是两菌的相互作用在基因表达水平上有什么差异, 对于差异表达基因的分析能否进一步支持上述研究结果, 或者揭示新的机理? Sander Sieuwerts 等^[20] 曾利用转录组学分析了嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌混合培养时相互作用的分子机制, 这一研究手段同样应该适用于类似的 *B. megaterium* 与 *K. vulgare* 相互作用分子机制的研究。与纯培养相比, *K. vulgare* 在 *B. megaterium* 的伴生下生长迅速、代谢活力强、2-KLG 合成能力显著增强, 这些表象暗示 *K. vulgare* 在伴生菌作用下, 大量基因表达存在显著差异。对于这些差异表达基因的研究分析将有助于从基因表达水平角度揭示潜在的相互作用机制。

我们在获取 *K. vulgare* WSH-001 的全基因组序列后, 设计并合成了其全基因组表达谱芯片, 并对 *K. vulgare* WSH-001 在混合培养及纯培养条件下, 对数生长期细胞进行全基因组表达谱研究。结果表明: 混合培养条件下, *K. vulgare* 中总计有 95 个基因 (fold > 2, $p < 0.01$) 表达水平显著上调。根据基因编码蛋白的 COG 分类, 其中有 31 (占 33%) 例属于氨基酸转运与代谢功能簇, 主要包括寡肽的结合、

转运、透性酶、氨基酸转运; 31 例 (占 33%) 功能未知; 碳水化合物转运与代谢相关的基因有 3 个上调, 分别是木酮糖激酶、6-磷酸甘露糖异构酶和丙酮酸激酶; 能量产生与转化相关基因有 3 个上调, 分别是荧光素酶家族蛋白、D-2 羟基酸脱氢酶蛋白、单加氧酶蛋白编码基因; 无机离子转运与代谢相关基因有 8 个上调, 主要包括 ABC 型金属离子转运系统蛋白、硫酸盐-ABC 型转运蛋白; 信号转导机制上调基因包括二鸟苷酸环化酶 (含 GGDEF 域蛋白)、CheY-like 响应调节受体蛋白、CrtK/TspO 感受器蛋白编码基因; 转录相关基因涉及 LysR、AsnC、LacI、CueR-like 家族重金属响应转录调节子上调。WSH-001 基因组数据分析表明该菌多种氨基酸合成途径存在缺陷, 而氨基酸转运与代谢相关基因占基因组的 15.2%。混合培养时, 上调基因中约三分之一涉及氨基酸的转运与代谢, 这一结果证明伴生菌促进了 *K. vulgare* 对于氨基酸的转运以及代谢。6-磷酸甘露糖异构酶参与果糖和甘露糖代谢、氨基糖和核糖代谢, 该酶的上调有助于增强 6 磷酸果糖的生成, 从而强化糖酵解途径。丙酮酸激酶在糖酵解途径中将磷酸烯醇式丙酮酸脱磷酸基团后转化为丙酮酸, 后者是包括氨基酸、脂肪酸、碳水化合物合成等主要代谢途径的重要前体。

相对混合培养条件, *K. vulgare* 纯培养条件下显著上调基因 (fold > 2.0, $p < 0.01$) 总计有 81 个。在这些上调基因中, 除 23 个未知功能基因外, 无机离子转运与代谢相关基因多达 14 个, 而这 14 个相关基因全部都与铁的转运和代谢功能相关。与氨基酸转运和代谢相关基因有 6 个, 分别是固氮酶辅因子合成蛋白、谷氨酸合成酶、二肽转运透性酶、胺氧化酶、胆碱脱氢酶、氨基转移酶 class V 编码基因。碳水化合物转运与代谢主要上调基因产物是 2-磷酸果糖醛缩酶、二羧酸转运 DctP 亚基、山梨糖脱氢酶; 能量产生与转化相关基因主要是铁氧还蛋白、NADH 脱氢酶四个亚基、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶; 与转录相关的是推定的 Fe-S 簇组装转录因子 IscR、RNA 聚合酶 sigma-70 因子、TetR/AcrR 家族和 MarR 家族转录调节子。与混合培养相比, 纯培养条件基因表达差异最显著的差别是大量与铁转运及代谢基因的上调。其中主要包括铁载体蛋白转运系统及辅助蛋白、肠菌素转运系统、亚铁血红素获得蛋白相关基因上调。因铁参与多个代谢过

程, 包括呼吸 (含 Fe-S 簇的铁氧化还原蛋白, 含血红素的细胞色素) 和关键酶促反应 (比如 TCA 循环中的延胡索酸酶和顺乌头酸酶), 另外一些降解活性氧 (ROS) 的酶包括超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶, 过氧化物酶中一部分以铁作为辅因子^[21]。但是在细胞内, Fe^{2+} 同时也会通过 Fenton 反应产生 ROS。ROS 如不能及时去除将导致 Fe-S 簇的破坏, 蛋白质羰基化, 半胱氨酸残基的氧化, 膜脂质氧化和 DNA 损伤^[22]。Fe-S 簇组装转录调节子 IscR 是一个含有 Fe-S 簇的抑制子, 属于 *iscRSUA* 操纵子的一部分。该抑制子的上调理论上应该抑制 Fe-S 簇的合成, 但是通过对 *K. vulgare* WSH-001 基因组注释分析, 发现上调的所谓推定 IscR 调节子属于 *suf* 操纵子, *K. vulgare* WSH-001 基因组中不存在 *iscRSUA* 操纵子。并且, *suf* 操纵子中 *suS* 编码固氮酶辅因子合成蛋白上调 3.19 倍, 该蛋白具有半胱氨酸脱硫酶活力, 可以作为 Fe-S 簇合成的硫供体^[23]。有研究表明, 细胞在 H_2O_2 产生的氧化胁迫下, *suf* 操纵子受 OxyR 的诱导而上调, 弥补由氧化胁迫失活的 *isc* 操纵子功能^[24]。根据差异表达基因的分析, 我们进一步推测纯培养 *K. vulgare* 时, 菌体的代谢及转化山梨糖生成 2-KLG 由于电子漏 (electron-leak)^[25] 产生了 ROS, 而本身的 ROS 清除能力缺陷导致氧化胁迫的形成。在混合培养时, 伴生菌的存在可以有效消除代谢产生的 ROS, 细胞得以正常生长和积累 2-KLG。

以上研究表明通过高通量的组学技术和数据挖掘方法, 可以用于混合培养过程中复杂的相互作用过程进行定性和定量的研究, 有助于发现两菌相互作用可能的机制, 为后续实验验证提供重要依据。

2 基于微生物生理学的研究及验证

2.1 *B. megaterium* 和 *K. vulgare* 生理研究及应用策略

微生物生理学的研究有助于加深对产酸菌的认识和发展生产工艺优化策略。Urbance 等^[26] 对四株不同来源的产酸菌表型和基因型分析后, 将产酸菌归类为一个新的 *Ketogulonigenium* 属, *vulgare* 种。Leduc 等^[27] 对 *K. vulgare* LMP P-20356 生长因子研究发现与叶酸合成代谢途径相关的嘌呤和胸腺嘧啶添加有助于强化细胞生长, 外源添加叶酸不能显著

促进细胞生长,但是添加谷氨酸二氢叶酸盐和四氢叶酸盐对细胞生长速率和浓度促进则非常显著,因而推测 *K. vulgare* LMP P-20356 叶酸合成途径存在缺陷。近些年来,重要生产菌的全基因组测序和注释工作进一步推动了生理学的研究。我们对 WSH-001 基因组的代谢重构分析发现其叶酸合成途径中缺乏叶酸还原酶(EC:1.5.1.3),故无法将叶酸还原成二氢叶酸和四氢叶酸,进而影响一碳单位的转移。清华大学 Cai 等^[8] 将来源于 *Lactococcus lactis* MG1363 的叶酸基因簇在 *K. vulgare* DSM4025 中外源表达,成功提高了胞内叶酸含量,在 6 升发酵罐中细胞密度和 2-KLG 的生产率分别提高 25% 和 35%。

以上基于生理学、代谢组重构分析以及基因重组实验结果进一步解释并证实了 Leduc 的推论。对于氨基酸代谢途径的重构分析表明 WSH-001 存在八种氨基酸合成途径的缺陷^[18]。进一步我们对纯培养和混合培养期间发酵液中氨基酸成分分析,发现有六种合成途径缺陷的氨基酸浓度在伴生菌生成芽胞后显著高于纯培养模式(数据未发表)。在此基础上,我们采用添加廉价明胶提供部分氨基酸的策略,1 m³ 和 200 m³ 发酵罐放大结果表明生产强度分别提高 25% 和 9%。郑巧双^[28] 研究了稀土离子配合物对 *K. vulgare* WSH-001 细胞生长及 2-KLG 合成的影响,结果表明 5 mM La³⁺ 对于发酵中后期的细胞生长有显著促进作用,使得 3.6L 发酵罐中 2-KLG 产量提高 12%。对 2-KLG 还原酶活力分析发现,La³⁺ 添加抑制了部分酶活力,减少了 2-KLG 的还原,从而提高了糖酸转化率 7.7%。陈克杰^[29] 分析了补料分批发酵体系渗透压的变化,发现随着 2-KLG 的生成和中和剂流加,渗透压持续上升继而影响伴生菌和产酸菌的菌体生长和产物合成。通过添加适量蔗糖的碳源调整策略可以有效提高高渗条件下伴生菌的生长和生物活性物质分泌。该策略在 3L 发酵罐上可以分别提高转化率和生产强度 3% 和 10%。大量研究^[9, 10] 表明,巨大芽胞杆菌促进了产酸菌的增殖,由此提高了 2-KLG 的产量。巨大芽胞杆菌在混合培养前期阶段迅速生长,然后逐渐形成芽胞并引起细胞裂解。张静^[30] 通过在混合培养体系中加入适量溶菌酶,定向裂解伴生菌细胞壁,加速胞内活性物质的释放,使 *K. vulgare* WSH-001 最大细胞浓度和 2-KLG 的生产强度分别提高 27% 和 28%。

以上研究表明,通过对细胞生理学的研究结合大量组学数据的挖掘组合,可以进一步加深对发酵过程的了解,提出针对性的发酵优化和菌体构建策略。

2.2 伴生菌生理共性对 *K. vulgare* 生长及产酸的影响

混合培养生产 2-KLG 工艺经过近几十年的发展,发现了多种微生物具有促进 *K. vulgare* 生长的能力^[31]。有趣的是其中效果最好、种类最多、应用最广的伴生菌全部属于芽胞杆菌属的细菌。这些细菌在混合培养中都伴随着形成大量芽胞,对于这一类伴生菌的生理共性研究将有助于揭示伴生菌促进产酸的机理。我们对 *B. megaterium* WSH-002 中负责调控芽胞生成的关键调控因子 *spo0A* 以及影响芽胞稳定性的 *spoVFA* 基因敲除后,研究了芽胞生成及芽胞的稳定性对促进 *K. vulgare* WSH-001 增殖和生产 2-KLG 的影响^[13]。结果表明两个突变体系的山梨糖转化率与对照相比分别下降了 33% 和 70%,对应体系中 *K. vulgare* 细胞数最大值分别下降了 15% 和 49%。山梨糖的转化率与体系中 *K. vulgare* 细胞数量、山梨糖脱氢酶活力正相关($R^2 = 0.98$)。两种突变体系的结果说明以下两点:(1) 芽胞的生成过程以及稳定的芽胞对于促进细胞生长有重要影响;(2) 芽胞稳定存在对于促进细胞生长更为重要。根据结果我们推测芽胞形成缺陷的伴生菌因不能裂解而迅速释放出活性物质,导致产酸菌的生长受到影响;芽胞皮层有缺陷的芽胞迅速裂解使得混合体系中芽胞数量和稳定性急剧下降;芽胞内存在的孢子烯^[32-33](多环萜类化合物)可以有效抵御环境的氧化胁迫,芽胞的稳定存在可能有利于解除 *K. vulgare* 生长和代谢产生的氧化胁迫。以上结果和推论与 Qian Ma 等^[11] 的代谢物组学和蛋白质组学研究结果较为一致。为进一步证实该推论,我们对培养不同阶段细胞内外总 SOD 酶活、脂肪过氧化程度、蛋白巯基比例、总抗氧化能力、总 ROS 含量等指标进行分析,结果证明各阶段纯培养体系受到的氧化胁迫均高于混合培养指标,而抗氧化能力均低于混合培养指标(结果未发表)。由此可以证明伴生菌不仅为产酸菌提供了生长因子,而且也解除了代谢过程中产生的氧化胁迫。

2.3 基于转座子突变及高通量筛选方法的研究

基于生理学研究虽然能在某个细节方面揭示两

菌相互作用的机理^[27, 13], 但是却不能显示全局; 基于组学实验和数据挖掘能够从整体的角度解释相互作用机理, 但是所获得的推论需要进一步实验验证, 进而才能准确提供局部的具体信息^[11-12]。如何能够“鱼与熊掌”兼得, 我们在这个方面做了初步的探索。我们首先通过转座子随机插入突变技术, 成功利用 mini-Tn10 转座子构建了 *B. megaterium* WSH-002 随机插入突变库。随之, 我们试图利用突变株与产酸菌的混合培养, 筛选出有效突变株, 进而根据全基因组序列及测序结果鉴定其插入突变位点, 分析突变位点基因功能以及其对细胞的生理和两菌相互作用可能带来的影响。最后, 试图从全基因组规模上揭示相互作用的关键基因网络。因此, 该研究策略需要建立适用于混合培养体系的高通量筛选方法。在前期研究中我们发现混合培养体系 *K. vulgare* 产生的水溶性色素与 2-KLG 积累高度线性相关, 得益于这个规律, 我们开发了基于 24 孔板和比色测定法筛选目的伴生突变株的高通量筛选方法。经过 *spo0A*、*spoVFA* 基因敲除突变株及 450 株插入突变株的筛选验证, 聚类分析结果表明该方法可以将不同混合体系准确地分类, 从而为以上研究的开展奠定了初步的基础。另外该筛选方法也许适用于筛选新型伴生菌和发酵条件的优化研究。

3 展望

由我国科技人员开发的“二步法”混合发酵生产 2-KLG 工艺经过几十年的发展和推广, 逐步取代了“莱氏”化学合成法, 并使我国成为全球 VC 市场的主要生产国和供应商。然而原有的工艺并非完美无缺, 科学技术的发展也正促进各国研究人员开发全新的生产工艺。虽然目前已有报道的新工艺在产量、转化率方面离工业化生产有一定差距, 但是一旦获得重大突变将会改变目前 VC 行业的竞争格局。我们认为在探索新型工艺的同时, 更应该注重对经典“二步法”中的科学问题深入研究, 加深对其科学本质的理解, 提出新的理论, 开发创新型发酵工艺。就此而言, 我们认为可以从以下几个方面进一步研究: (1) 在全基因组范围内筛选并鉴定相互作用关键基因, 构建关键基因相互作用网络; (2) 利用新一代高通量测序技术和生物信息学技术研究差异表达基因和关键基因调控网络; (3) 利用基因组数据和

代谢途径分析, 构建全细胞代谢网络模型; (4) 对两菌之间可能存在的群体感应现象进行分析, 寻找潜在的信号分子, 并分析其调控机理和网络; (5) 工程菌株构建策略和技术的研究; (6) 基于菌体生理关系调控发酵优化策略研究。

参考文献

- [1] Gao Y, Yuan Y. Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-Keto-L-gulonic acid fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (18): 9845-9853.
- [2] Zhang J, Zhou J, Liu J, Chen K, Liu L, Chen J. Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonigenium vulgare* and *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (7): 4807-4814.
- [3] Xu A, Yao J, Yu L, Lv S, Wang J, Yan B, Yu Z. Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96 (6): 1317-1323.
- [4] Zhao SG, Tang ML, Wang J, Wang T, Wang SC, Wu YJ, Yu ZL. Mutagenic effects of BM302: GO112 induced by low-energy ion beam implantation. *Plasma Science and Technology*, 2007, 9 (4): 508-512.
- [5] 张静, 周景文, 刘立明, 刘杰, 陈克杰, 堵国成, 陈坚. 分阶段 pH 调控提高 2-酮基-L-古龙酸生产. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2010, 26 (9): 1263-1268.
- [6] Cui L, Xie P, Sun JW, Yu T, Yuan JQ. Data-driven prediction of the product formation in industrial 2-keto-L-gulonic acid fermentation. *Computers & Chemical Engineering*, 2012, 36: 386-391.
- [7] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, Yoshikawa K, Noguchi Y, Yoshida S, Soeda S, Yoshida M. Direct fermentation of 2-keto-L-gulonic acid in recombinant *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58 (2-3): 309-315.
- [8] Cai L, Yuan MQ, Li ZJ, Chen JC, Chen GQ. Genetic engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for enhanced production of 2-keto-L-gulonic acid. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157 (2): 320-325.
- [9] 吕淑霞, 冯树, 张忠泽, 刘阳, 谢占武, 安海英. Vc 二步发酵中伴生菌的作用机制. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2001, 28 (5): 10-13.

- [10] 王静, 冯文亮, 王丽丽, 仪宏. 一株芽孢杆菌在维生素 C 二步发酵中对小菌的促进作用. *生物加工过程 (Chinese Journal of Bioprocess Engineering)*, 2009, 7 (1):24-28.
- [11] Ma Q, Zhou J, Zhang W, Meng X, Sun J, Yuan YJ. Integrated proteomic and metabolomic analysis of an artificial microbial community for two-step production of vitamin C. *PLoS One*, 2011, 6 (10):e26108.
- [12] Zhou J, Ma Q, Yi H, Wang L, Song H, Yuan YJ. Metabolome profiling reveals metabolic cooperation between *Bacillus megaterium* and *Ketogulonigenium vulgare* during induced swarm motility. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (19):7023-7030.
- [13] Zhu Y, Liu J, Du G, Zhou J, Chen J. Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis. *Bioresource Technology*, 2012, 107:399-404.
- [14] 杨帆, 贾茜, 熊朝晖, 张笑冰, 吴洪涛, 赵颖, 杨剑, 朱俊萍, 董杰, 薛颖, 孙立连, 沈岩, 金奇. 酮古龙酸菌 WB0104 的全基因组分析. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 2006, 51 (8):923-927.
- [15] Xiong XH, Han SA, Wang JH, Jiang ZH, Chen W, Jia N, Wei HL, Cheng H, Yang YX, Zhu B, You S, He JY, Hou W, Chen MX, Yu CJ, Jiao YH, Zhang WC. Complete genome sequence of the bacterium *Ketogulonigenium vulgare* Y25. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (1):315-316.
- [16] Liu L, Li Y, Zhang J, Zhou Z, Liu J, Li X, Zhou J, Du G, Wang L, Chen J. Complete genome sequence of the industrial strain *Ketogulonigenium vulgare* WSH-001. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (21):6108-6109.
- [17] Liu L, Li Y, Zhang J, Zou W, Zhou Z, Liu J, Li X, Wang L, Chen J. Complete genome sequence of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH-002. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (22):6389-6390.
- [18] Liu L, Chen K, Zhang J, Liu J, Chen J. Gelatin enhances 2-keto-L-gulonic acid production based on *Ketogulonigenium vulgare* genome annotation. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156 (3):182-187.
- [19] 张静. 基于生化策略与组学技术的维生素 C 生产菌株间生理关系解析. 江南大学博士学位论文, 2010.
- [20] Sieuwerts S, Molenaar D, Sacha AFT, van Hijum, Beerthuyzen M, Marc JA Stevens, Patrick WM Janssen, Ingham CJ, Frank AM de Bok, Willem M de Vos, Vlieg JETvH. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (23):7775-7784.
- [21] Miethke M, Pierik AJ, Peuckert F, Seubert A, Marahiel MA. Identification and characterization of a novel-type ferric siderophore reductase from a gram-positive extremophile. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (3):2245-2260.
- [22] Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, 2011, 3 (6):540-549.
- [23] Sendra M, Ollagnier de Choudens S, Lascoux D, Sanakis Y, Fontecave M. The SUF iron-sulfur cluster biosynthetic machinery: sulfur transfer from the SUFS-SUFE complex to SUFA. *Febs Letters*, 2007, 581 (7):1362-1368.
- [24] Jang SJ, Imlay JA. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular Microbiology*, 2010, 78 (6):1448-1467.
- [25] 徐建兴. 呼吸链的电子漏路径和线粒体的超氧自由基代谢及其生物学意义. *基础医学与临床 (Basic Medical Sciences and Clinics)*, 2001, 21 (5):389-394.
- [26] Urbance JW, Bratina BJ, Stoddard SF, Schmidt TM. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp nov and *Ketogulonigenium robustum* sp nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51 (Pt 3):1059-1070.
- [27] Leduc S, de Troostembergh JC, Lebeault JM. Folate requirements of the 2-keto-L-gulonic acid-producing strain *Ketogulonigenium vulgare* LMP P-20356 in L-sorbose/CSL medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65 (2):163-167.
- [28] 郑巧双, 周景文, 陈孚江, 刘杰, 刘立明, 陈坚. 稀土元素对 2-酮基-L-古龙酸发酵过程的影响. *过程工程学报 (The Chinese Journal of Process Engineering)*, 2010, 10 (4):750-755.
- [29] 陈克杰, 周景文, 刘立明, 刘杰, 堵国成, 陈坚. 高渗条件下利用蔗糖提升 2-酮基-L-古龙酸生产效率. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2010, 26 (11):1507-1513.
- [30] Zhang J, Liu J, Shi Z, Liu L, Chen J. Manipulation of *B. megaterium* growth for efficient 2-KLG production by *K. vulgare*. *Process Biochemistry*, 2010, 45 (4):602-606.

- [31] 吕淑霞, 赵朔, 杨宇, 张忠泽, 陈宏权. 混合菌发酵 L-山梨糖生产 Vc 前体 2-酮基-L-古龙酸研究进展. 生物技术通报 (*Biotechnology Bulletin*), 2011, (5): 50-54.
- [32] Bosak T, Kontnik R, Butcher RA, Brocks JJ, Losick R, Clardy J, Pearson A. Sporulenes, heptaprenyl metabolites from *Bacillus subtilis* spores. *Organic Letters*, 2008, 10 (16): 3551-3554.
- [33] Bosak T, Losick RM, Pearson A. A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (18): 6725-6729.

Molecular mechanism of co-culturing *Bacillus megaterium* and *Ketogulonigenium vulgare*—A review

Yibo Zhu^{1,2,3}, Jingwen Zhou^{1,2*}, Jian Chen^{1,2}

¹School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, ²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

³School of Biotechnology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China

Abstract: Co-culturing *Bacillus megaterium* and *Ketogulonigenium vulgare* is widely applied to 2-keto-gulonic acid production. For optimizing the process, numerous researchers studied on the symbiotic molecular mechanism of the co-culture process. The research was promoted greatly owing to omics technologies, bioinformatics, high throughput technologies and physiology. Recently, the proteomic, metabolomic, comparative genomics and transcriptomics were performed to the research. These omics data provided us the interaction network of the artificial ecosystem in multilevel. Combining with the physiological validation based on the high throughput method, we can elucidate the molecular mechanism in detail, which will facilitate us to develop strategies for metabolic engineering. The paper reviewed the recent developments of symbiotic molecular mechanism research in this co-culture process and its applications. In addition, we proposed the future research needs.

Keywords: *Bacillus megaterium*, *Ketogulonigenium vulgare*, 2-keto-gulonic acid, interaction mechanism

(本文责编:王晋芳)