



## 研究报告

## 一株高产苯乳酸的古墓土壤葡糖醋杆菌 FBFS97 的全基因组测序与分析

李爽爽<sup>1</sup> 陈亨业<sup>1,2</sup> 吴仁蔚<sup>1</sup> 王如福<sup>3</sup> 陈福生<sup>\*1</sup>

1 华中农业大学食品科学技术学院 湖北省传统发酵食品国际科技合作基地 湖北 武汉 430070

2 中南民族大学药学院 湖北 武汉 430070

3 山西农业大学食品科学与工程学院 山西 太谷 030801

**摘要:**【背景】苯乳酸(phenyllactic acid, PLA)是一种应用潜力巨大的天然广谱抑菌物质。本课题组前期分离得到一株高产 PLA 的醋酸菌(acetic acid bacteria, AAB)——葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter* sp.) FBFS97, 但尚未鉴定到种, 而且其产 PLA 的分子机理尚不清楚。【目的】确定 FBFS97 的种属关系, 解析 FBFS97 的遗传信息, 特别是与 PLA 产生相关的基因。【方法】采用光学显微镜和扫描电镜对 FBFS97 的菌体形态进行表征, 通过 16S rRNA 基因序列分析对 FBFS97 进行分类鉴定, 并以高效液相色谱分析苯丙氨酸对其产 PLA 的影响。在此基础上, 对 FBFS97 进行全基因组测序、拼接和基因预测, 并进行 GO/COG 聚类、KEGG 代谢通路和 VFDB 毒力等分析, 以及 PLA 生物合成途径的预测。【结果】根据 16S rRNA 基因序列的比对结果, 结合形态学分析, 该菌被鉴定为古墓土壤葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter tumulisoli*)。将 1 000 mg/L 苯丙氨酸添加到 FBFS97 液体培养基中, 发酵液中 PLA 最高浓度可达 400 mg/L, 为对照组的 8 倍。该菌的基因组大小为 3 988 308 bp, (G+C)mol%含量为 66.62%, 编码基因 3 500 个; KEGG 代谢通路分析表明, 该菌基因组中存在经莽草酸途径合成 PLA 的所有基因; VFDB 毒力预测结果显示, 该菌基因组中不存在产生毒素的相关基因。【结论】首次报道了一株高产 PLA 的 AAB——古墓土壤葡糖醋杆菌 FBFS97 的全基因组序列信息, 并发现该菌株的基因组中含有合成 PLA 的所有相关基因, 为后续进一步研究 FBFS97 产生 PLA 的生物合成途径提供了理论依据。

**关键词:** 古墓土壤葡糖醋杆菌, 基因组, 基因组解析, 苯乳酸

**Foundation items:** Special Technology Innovation of Hubei Province (2018ABA075); National International Cooperation Special of China (2014DFG32380)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-27-87282111; E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

**Received:** 09-07-2019; **Accepted:** 05-12-2019; **Published online:** 06-01-2020

**基金项目:** 湖北省技术创新专项(2018ABA075); 国家国际合作专项(2014DFG32380)

**\*通信作者:** Tel: 027-87282111; E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

**收稿日期:** 2019-07-09; **接受日期:** 2019-12-05; **网络首发日期:** 2020-01-06

## Genome sequencing and analysis of *Gluconacetobacter tumulisoli* FBFS97, a high-yield strain of phenyllactic acid

LI Shuang-Shuang<sup>1</sup> CHEN Heng-Ye<sup>1,2</sup> WU Ren-Wei<sup>1</sup> WANG Ru-Fu<sup>3</sup>  
CHEN Fu-Sheng<sup>\*1</sup>

1 Hubei International Scientific and Technological Cooperation Base of Traditional Fermented Foods, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

2 College of Pharmaceutical Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430070, China

3 College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

**Abstract: [Background]** Phenyllactic acid (PLA) is a natural broad-spectrum antibacterial substance with a great application potential. In the previous work, *Gluconacetobacter* sp. FBFS97, an acetic acid bacterium (AAB) strain with high-yield PLA, was isolated, but the specific species of this strain and the molecular mechanism of PLA production is unclear. **[Objective]** To determine the species relationship of FBFS97, explore the genetic information of FBFS97, especially the genes related to PLA biosynthesis. **[Methods]** The morphology of FBFS97 was characterized by light microscopy and scanning electron microscopy, while the classification was identified by 16S rRNA gene sequence alignment. The effect of phenylalanine on FBFS97 producing PLA was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). On this basis, the complete genome was sequenced by Illumina MiSeq sequencers, and genome assembly, gene prediction, functional annotation, GO/COG cluster, metabolic pathway and virulence were analyzed using the relevant software, and the biosynthetic pathway of PLA is predicted. **[Results]** The strain was identified as *Gluconacetobacter tumulisoli* by 16S rRNA gene sequence alignment analysis and morphological analysis. When 1 000 mg/L phenylalanine was added to the liquid medium of FBFS97, the maximum concentration of PLA in the fermentation broth reached 400 mg/L, which was 8 times higher than that of control group. The genome size of FBFS97 is 3 988 308 bp with 66.62% (G+C)mol% and 3 500 encoding genes, and whole genes relative for biosynthetic PLA through shikimate pathway were found by KEGG metabolic pathway in the genome, and no toxin-related gene was predicted by VFDB database. **[Conclusion]** This is first attempt to describe the whole genome sequence of *Gluconacetobacter tumulisoli* sp. FBFS97, a high-yield strain of PLA. The genes related to PLA biosynthesis are found in the FBFS97 genome, which provides a basis for further investigation on the PLA biosynthetic pathway in FBFS97.

**Keywords:** *Gluconacetobacter tumulisoli* spp., Genome, Genomic analysis, Phenyllactic acid

醋酸菌(acetic acid bacteria, AAB)是一类革兰氏染色呈阴性,以氧为终端电子受体,氧化糖类、糖醇类或醇类物质,生成相应有机酸的专性好氧细菌的总称<sup>[1]</sup>。AAB广泛分布于土壤、花朵、发酵食品与昆虫肠道中<sup>[2]</sup>,不仅可产生醋酸用于食醋生产<sup>[3]</sup>,有些还能产生纤维素<sup>[4]</sup>、色素<sup>[5]</sup>、二羟基丙酮<sup>[6]</sup>和葡萄糖酸<sup>[7]</sup>,以及生物固氮<sup>[8-9]</sup>等,在食品、医药、生物、化工等领域应用前景广阔。

苯乳酸(phenyllactic acid, PLA)是一种广谱的

抑菌物质<sup>[10]</sup>,而且还是治疗冠心病常用药物丹参素(tanshinol, 3,4-二羟基苯乳酸)的结构类似物<sup>[11]</sup>,与丹参素具有相同的药理作用;PLA也是制备降血糖制剂恩格列酮的前体物<sup>[12]</sup>。目前已发现乳酸菌<sup>[13]</sup>、丙酸菌(*Propionibacteria* spp.)<sup>[14]</sup>以及白地霉(*Geotrichum* spp.)<sup>[15]</sup>等均可产生PLA。本课题组前期首次分离得到一株高产PLA的AAB——葡萄糖醋杆菌(*Gluconacetobacter* sp.) FBFS97<sup>[16]</sup>。

本研究将在FBFS97菌落的显微形态基础上,

结合基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 确定菌株 FBFS97 的分类地位, 并分析苯丙氨酸对其产 PLA 的影响。在此基础上, 对其全基因组进行测序和解析, 探究其基因组中是否存在 PLA 的生物合成途径, 相关研究结果可为进一步探明 FBFS97 产 PLA 的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、主要试剂和仪器及培养基

葡糖醋杆菌 FBFS97 由武汉华中农业大学食品生物技术与安全实验室保藏。

苯丙氨酸, 上海国药集团化学试剂有限公司; PLA, 上海梯希爱化成工业发展有限公司; GenElute™ 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Sigma-Aldrich 公司。发射扫描电子显微镜, Carl Zeiss AG 公司; 高效液相色谱仪, 岛津公司。

固体培养基(g/L): 葡萄糖 100.0, 酵母浸粉 10.0, 碳酸钙 30.0, 琼脂 15.0; 种子液培养基(g/L): 葡萄糖 1.0, 酵母浸粉 10.0; 液体培养基(g/L): 葡萄糖 100.0, 酵母浸粉 10.0。上述培养基用于葡糖醋杆菌 FBFS97 的活化和产 PLA 实验, 均于  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

### 1.2 菌株形态学分析

将斜面上活化 2 d 的 FBFS97 接种到固体培养基平板上, 30 °C 培养 3 d 后拍照; 将固体培养基平板上 FBFS97 的单菌落接种到液体培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 20 h, 于扫描电镜下观察、拍照, 同时经革兰氏染色后于光学显微镜下拍照。

### 1.3 系统发育分析

以 34 株 AAB 和生红酸球形菌(*Acidisphaera rubrifaciens*)、球形红球形菌(*Rhodopila globiformis*)、喜硫代硫酸盐玫瑰单胞菌(*Roseococcus thiosulfatophilus*)共 37 株细菌的 16S rRNA 基因序列作为参比(表 1)。采用 ClustalW 比对 FBFS97 与参比菌株的 16S rRNA 基因序列, 以 Neighbor-Joining 法进行系统发育学分析, 使用 MEGA 7.0 构建进化树, 并对进化树进行评估。

表 1 37 株细菌 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号  
Table 1 16S rRNA GenBank accession numbers of 37 bacterial strains

Strains	GenBank accession No.
<i>Acetobacter ascendens</i> LMG 1590	GU205099
<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMD 22.1	NR_026107
<i>Acetobacter peroxydans</i> NBRC 13755	AB032352
<i>Acidisphaera rubrifaciens</i> HS-AP3	D86512
<i>Acidomonas methanolica</i> NRIC 0498	AB110702
<i>Ameyamaea chiangmaiensis</i> BCC 15744	AB303366
<i>Asaia bogorensis</i> NBRC 16594	AB025928
<i>Asaia siamensis</i> S60-1	AB035416
<i>Gluconacetobacter aggeris</i> T6203-4-1a	AB778526
<i>Gluconacetobacter asukensis</i> K8617-1-1b	AB627120
<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i> CFN-Ca54	AF192761
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	NR_027591
<i>Gluconacetobacter johannae</i> CFN-Cf55	AF111841
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> IFO 12388	X75617
<i>Gluconacetobacter sacchari</i> SRI 1794	AF127407
<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i> T61213-20-1a	NR_114384
<i>Gluconacetobacter tumulicola</i> K5929-2-1b	AB627116
<i>Gluconacetobacter tumulisoli</i> T611xx-1-4a	AB778530
<i>Gluconobacter albidus</i> NBRC 3250	AB178392
<i>Gluconobacter cerinus</i> ATCC 19441	X80775
<i>Gluconobacter frateurii</i> IFO 3264	X82290
<i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 3503	X73820
<i>Granulibacter bethesdensis</i> CGDNIH1	NR_043197
<i>Komagataeibacter hansenii</i> NCIB 8746	X75620
<i>Komagataeibacter medellinensis</i> LMG 1693	NR_125626
<i>Komagataeibacter nataicola</i> LMG 1536	AB166743
<i>Komagataeibacter xylinus</i> NCIB 11664	X75619
<i>Kozakia baliensis</i> Yo-3	AB056321
<i>Neoasaia chiangmaiensis</i> BCC 15763	AB208549
<i>Neokomagataea tanensis</i> BCC 25711	AB513364
<i>Neokomagataea thailandica</i> BCC 25710	AB513363
<i>Rhodopila globiformis</i> DSM 161	D86513
<i>Roseococcus thiosulfatophilus</i> RB-3	X72908
<i>Saccharibacter floricola</i> S-877	AB110421
<i>Swaminathania salitolerans</i> PA 51	AF459454
<i>Swingsia samuiensis</i> AH83	AB786666
<i>Tanticharoenia sakaeratensis</i> NBRC 103193	AB304087

### 1.4 苯丙氨酸对 FBFS97 产 PLA 的影响

将活化好的 FBFS97 斜面培养物接种于种子培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 24 h, 取 0.5 mL 种子液接种于苯丙氨酸浓度为 1 000 mg/L 的 50 mL 液体培养基中, 于 30 °C、170 r/min 培养 20 d, 取样分析发酵液中 PLA 含量。以不加苯丙

氨酸的液体培养物为对照。

PLA 含量测定参照文献[17]报道的方法, 采用 HPLC 进行, 并略作修改。具体过程为: 培养液离心(2 000×g, 5 min)后过 0.22 μm 滤膜后直接进样, 以 PLA 标准品为对照。采用 Spursil C18-EP 色谱柱(5 μm, 4.6×250 mm), 二极管阵列检测器, 检测波长 210 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL; 流动相 A 为甲酸(0.1%)水溶液, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0–15 min 80% A, 15–20 min 10% A, 20–25 min 80% A, 流速为 1 mL/min。

### 1.5 FBFS97 的菌体培养与基因组 DNA 提取

FBFS97 于固态斜面培养基上活化 2 d 后接种于液体培养基, 30 °C、170 r/min 培养 22 h, 采用 GenElute™细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 采用 Qubit 荧光定量仪和 NanoDrop 超微量分光光度计分析 DNA 的质量和浓度。

### 1.6 FBFS97 全基因组的 Illumina HiSeq 测序与组装

采用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对 FBFS97 进行全基因组测序, 使用 Velvet 1.2.10 对 DNA 序列进行拼接, 优化参数 Kmer 值, 获得最好组装结果, 并以 GapCloser V1.12 对组装后的局部内洞(gap)进行填充和碱基校正。

### 1.7 FBFS97 的基因组注释

采用 Prodigal 2.6<sup>[18]</sup>软件对 1.6 中组装的基因组进行基因预测, 将预测基因的蛋白序列分别与非冗余蛋白库(nonredundant protein, NR)<sup>[19]</sup>、SwissProt 蛋白库<sup>[20]</sup>、直系同源基因数据库(cluster of orthologous groups, COG)<sup>[21]</sup>、保守结构域数据库(conserved domains database, CDD)<sup>[22]</sup>、基因本体论(gene ontology, GO)<sup>[23]</sup>、京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG)<sup>[24]</sup>进行 BLASTp 比对与功能注释和归类; 采用 RNAmmer-1.2<sup>[25]</sup>对 rRNA 进行预测。

### 1.8 FBFS97 基因组中毒力基因的分析

采用 BLASTp 将 FBFS97 基因组中所有基因

的蛋白序列与病原菌毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)<sup>[26]</sup>进行比对, 预测 FBFS97 的基因组中是否存在毒力因子基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态与亲缘关系分析

#### 2.1.1 菌株形态学分析

FBFS97 的菌落、显微和电镜形态如图 1 所示, 菌落呈圆形, 表面光滑, 边缘整齐, 中间凸起, 可产生水溶性棕色色素; 菌体呈杆状或短杆状, 大小为 (0.7–0.8) μm×(1.0–1.2) μm, 革兰氏阴性。

#### 2.1.2 系统发育分析

将 FBFS97 的 16S rRNA 基因序列与从 GenBank 数据库下载的 34 株 AAB 的 16S rRNA 基因序列(表 1)进行比对, 以与 AAB 亲缘关系较远的生红酸球形菌、球形红球形菌、喜硫代硫酸盐玫瑰单胞菌为簇外种(outgroup)(表 1), 绘制系统进化树(图 2)。

由图 2 可知, FBFS97 与古墓土壤葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter tumulisoli* T611xx-1-4a)形成独立的分支, 二者 16S rRNA 基因相似度达 100%。结合前面的形态学分析, FBFS97 被鉴定为古墓土壤葡糖醋杆菌。

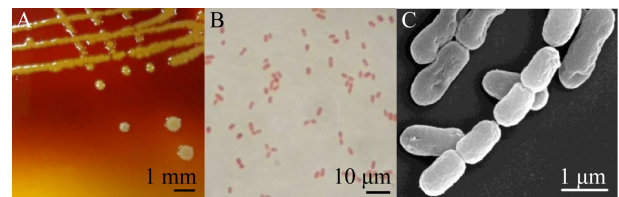


图 1 葡糖醋杆菌 FBFS97 的形态学分析

Figure 1 Morphological analyses of *Gluconacetobacter* sp. FBFS97

注: A: FBFS97 的菌落形态; B: FBFS97 的光学显微镜形态; C: FBFS97 的扫描电镜形态。

Note: A: Colony morphology of FBFS97; B: Morphology of FBFS97 under an optical microscope; C: Morphology of FBFS97 under a scanning electron microscope.

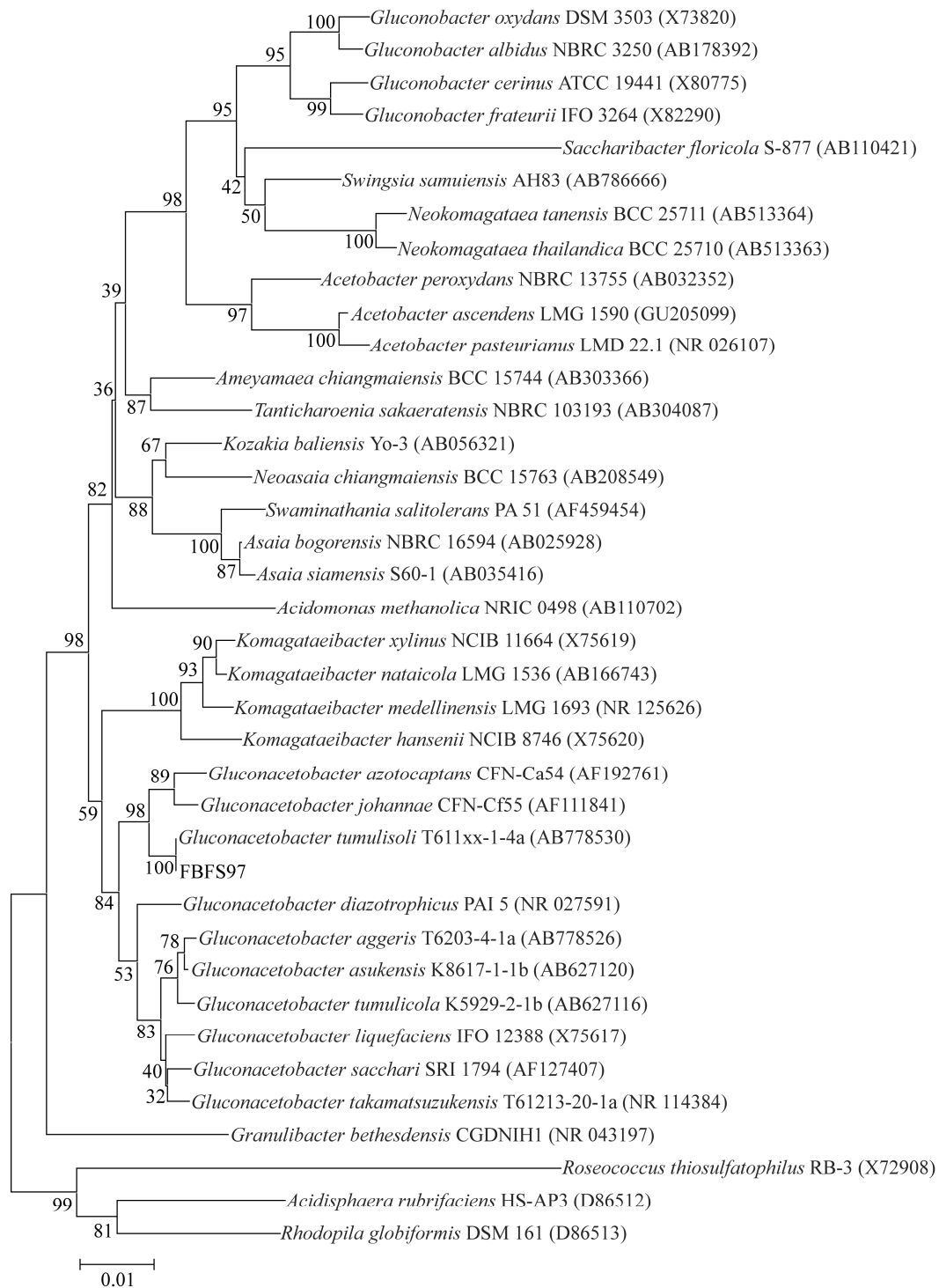


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

**Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences**

注：括号里的序号为菌株 GenBank 编号；分支上的数字为 Bootstrap 值；比例尺长度代表碱基替换数。

Notes: The number in parentheses is the accession number of 16S rRNA gene sequence in GenBank; The robustness of branching is indicated by bootstrap percentages calculated for 1 000 subsets; Bar indicates 1% estimated sequence divergence.

## 2.2 苯丙氨酸对古墓土壤葡萄糖醋杆菌 FBFS97 产 PLA 的影响

前人的研究表明, 苯丙氨酸可被乳酸菌等微生物转化为 PLA<sup>[27]</sup>。因此我们将苯丙氨酸添加到 FBFS97 的液体培养基中, 以不添加苯丙氨酸的处理为对照(CK), 采用 HPLC 分析了不同培养时间发酵液中 PLA 的含量, 结果如图 3 所示。

由图 3 结果可知, CK 发酵液中 PLA 的浓度于第 120 h 左右达到峰值, 约为 50 mg/L, 而添加苯丙氨酸(1 000 mg/L)的处理组于第 400 h 左右达到峰值, 约为 400 mg/L, 是 CK 的 8 倍。不管是否添加苯丙氨酸, 当 PLA 的浓度达到峰值后, 培养液中 PLA 的浓度基本保持不变。

## 2.3 基因组组装

基因组测序与分析显示, 古墓土壤葡萄糖醋杆菌 FBFS97 的基因组大小为 3 988 308 bp, (G+C)mol% 含量为 66.62%, 共编码 3 500 个基因, 基因组圈图见图 4。

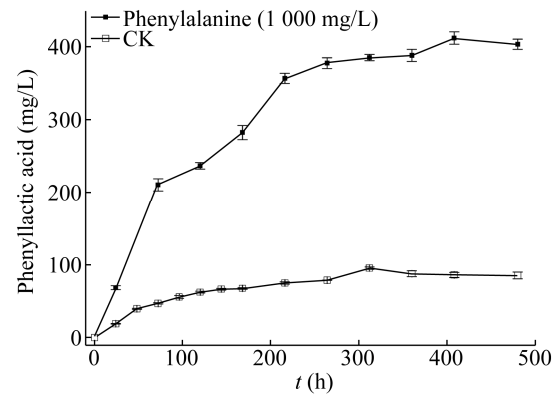


图 3 苯丙氨酸对古墓土壤葡萄糖醋杆菌 FBFS97 产 PLA 的影响

Figure 3 Effect of phenylalanine on the phenyllactic acid produced by *Gluconacetobacter tumulifoli* FBFS97

## 2.4 基因组注释

### 2.4.1 COG 功能分析

将 FBFS97 基因组中所有预测基因的蛋白序列与 COG 数据库进行 BLASTp 比对, 获得基因功能的注释结果(结果未显示)。根据注释结果, FBFS97 的基因功能分类(图 5)。

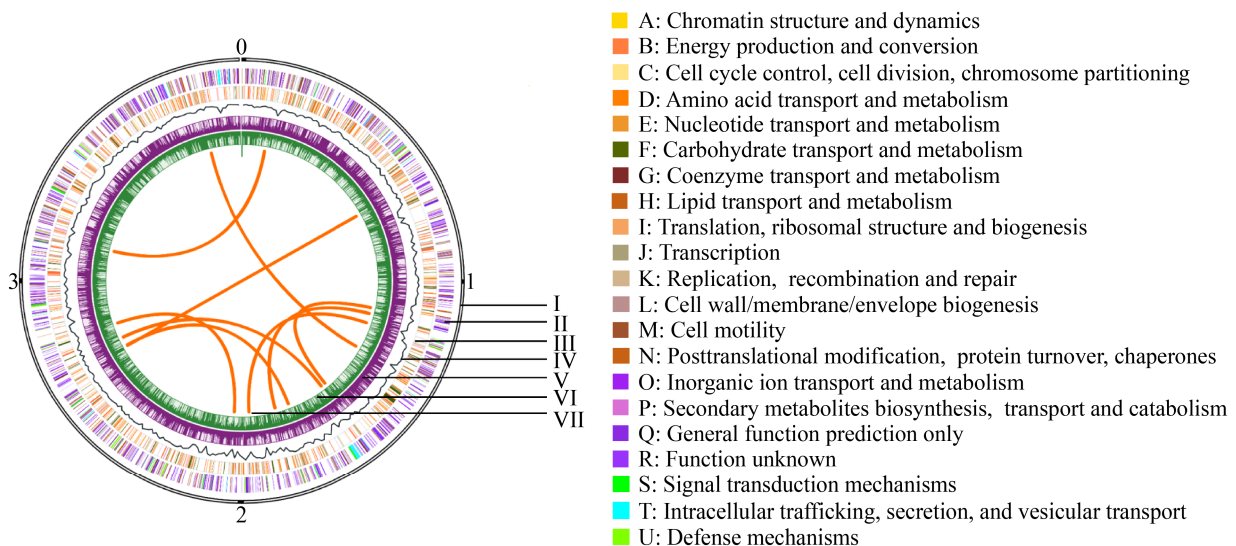


图 4 古墓土壤葡萄糖醋杆菌 FBFS97 基因组圈图

Figure 4 Circle map of the genome of *Gluconacetobacter tumulifoli* FBFS97

注: 基因组圈图由外向里分别为: I: 基因组大小(Mb); II、III: CDSs 在正负链上的功能预测; IV: (G+C)mol%含量; V、VI: CDSs 在正负链上的分布; VII: 基因组高相似性的内部链接。

Note: From the outside to the inside of the genome circle map: I: Complete genome size (Mb); II, III: The predicted functions of CDSs are in the positive and the negative strands of genomic DNA; IV: (G+C)mol% contents; V, VI: Distribution of CDSs is on positive and negative strands of genomic DNA; VII: Genomic internal links of high similarities.

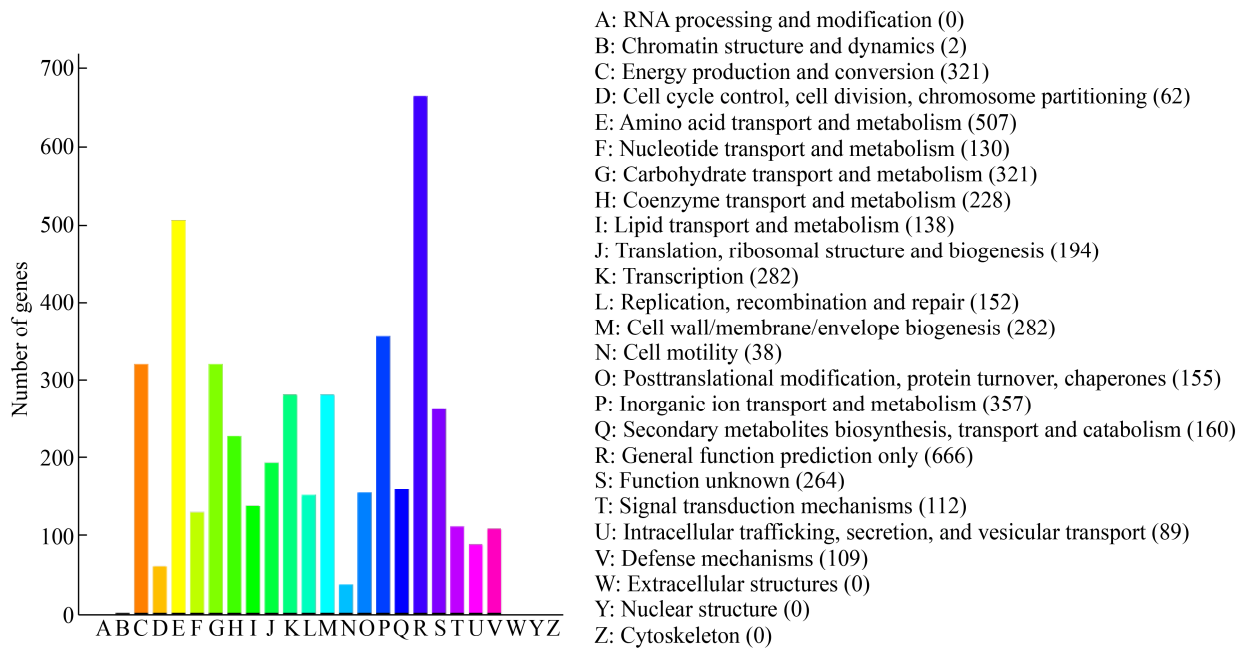


图 5 古墓土壤葡糖醋杆菌 FBFS97 的 COG 功能归类

Figure 5 Gene distribution based on COG classification of *Gluconacetobacter tumulifaciens* FBFS97

由图 5 可知, 在 FBFS97 菌株中, 与一般功能 (general function prediction only, R)、氨基酸转运和代谢 (amino acid transport and metabolism, E)、无机离子的运输和代谢 (inorganic ion transport and metabolism, P)、能量产生和传递 (energy production and conversion, C) 以及糖类转运和代谢 (carbohydrate transport and metabolism, G) 相关的基因数位于前 5 位。

#### 2.4.2 GO 功能分类

将 FBFS97 基因的预测蛋白序列与 GO 数据库 BLASTp 比对, 使用 Blast2go 进行 GO 富集分析, 结果如图 6 所示。

由图 6 可知, 与生物学过程 (biological process) 相关的代谢过程 (metabolic process)、细胞过程 (cellular process)、定位 (localization)、生物调节 (biological regulation) 和生物过程调控 (regulation of biological process) 功能相关的基因数位列前 5 位; 与细胞组分 (cellular component) 相关的膜 (membrane)、细胞 (cell)、细胞部分 (cell part)、膜部分 (membrane part) 和包含蛋白复合物

(protein-containing complex) 功能相关的基因数位列前 5 位; 而与分子功能 (molecular function) 相关的催化 (catalytic activity)、结合 (binding)、转运 (transporter activity)、转录调节因子 (transcription regulator activity) 和结构分子 (structural molecule activity) 功能相关的基因数位列前 5 位。

#### 2.4.3 KEGG 代谢通路分析

通过对 FBFS97 菌株的 KEGG 代谢途径分析发现, 该菌 3 500 个基因中的 1 816 个基因分布在包括完整莽草酸途径 (shikimate pathway) (图 7A) 在内的 238 个代谢通路中。由分析结果可知, 以葡萄糖为底物时, 经莽草酸途径产生的中间产物——苯丙酮酸 (phenylpyruvate) 在脱氢酶作用下生成 PLA; 当苯丙氨酸存在时, 在转氨酶催化下生成苯丙酮酸再在脱氢酶的作用下生成 PLA<sup>[28-29]</sup>。由此推导出 FBFS97 中 PLA 的生物合成途径见图 7B。

#### 2.4.4 毒力基因分析

将 FBFS97 的基因组与 VFDB 数据库进行比对分析表明, 在 FBFS97 的基因组没有发现任何毒力因子基因, 所以预测该菌株不产生毒素。

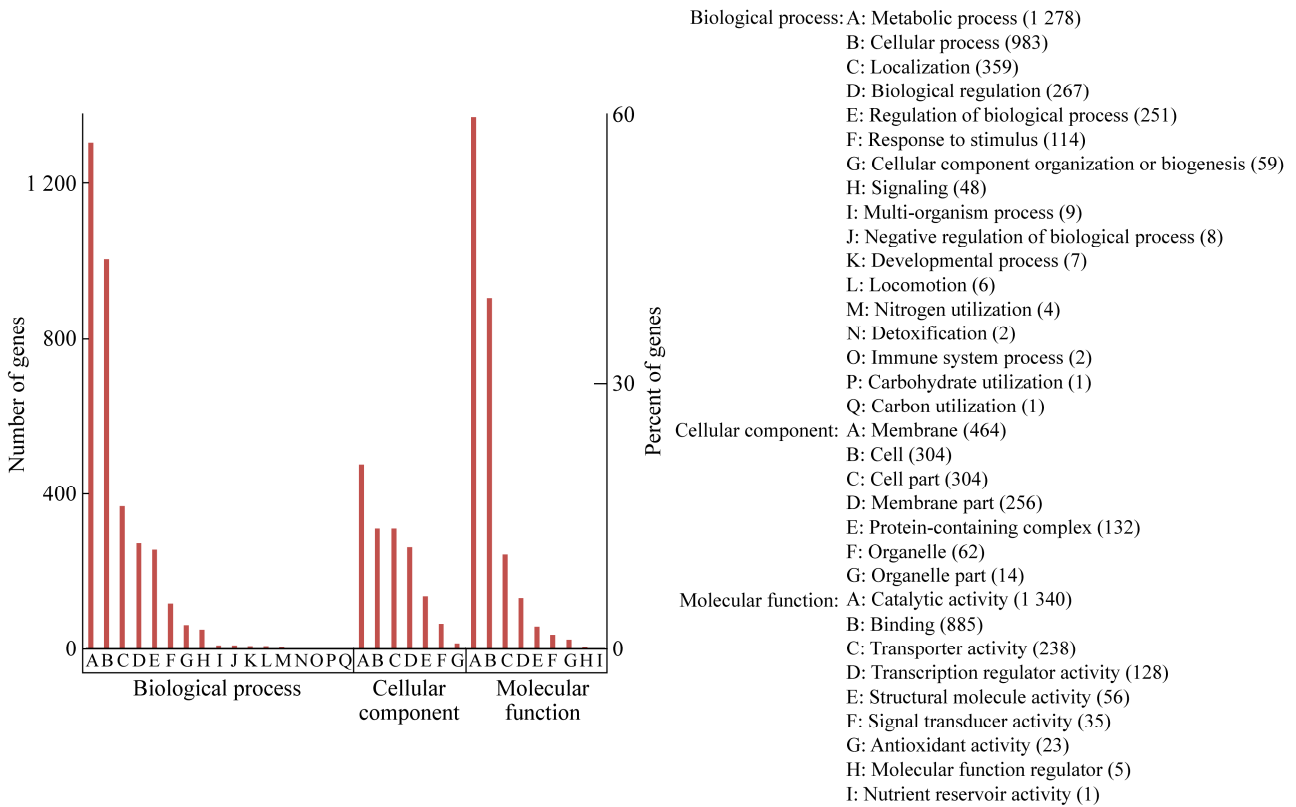


图 6 古墓土壤葡萄糖醋杆菌 FBFS97 的 GO 功能聚类

Figure 6 Gene distribution based on gene ontology of *Gluconacetobacter tumulifolia* FBFS97

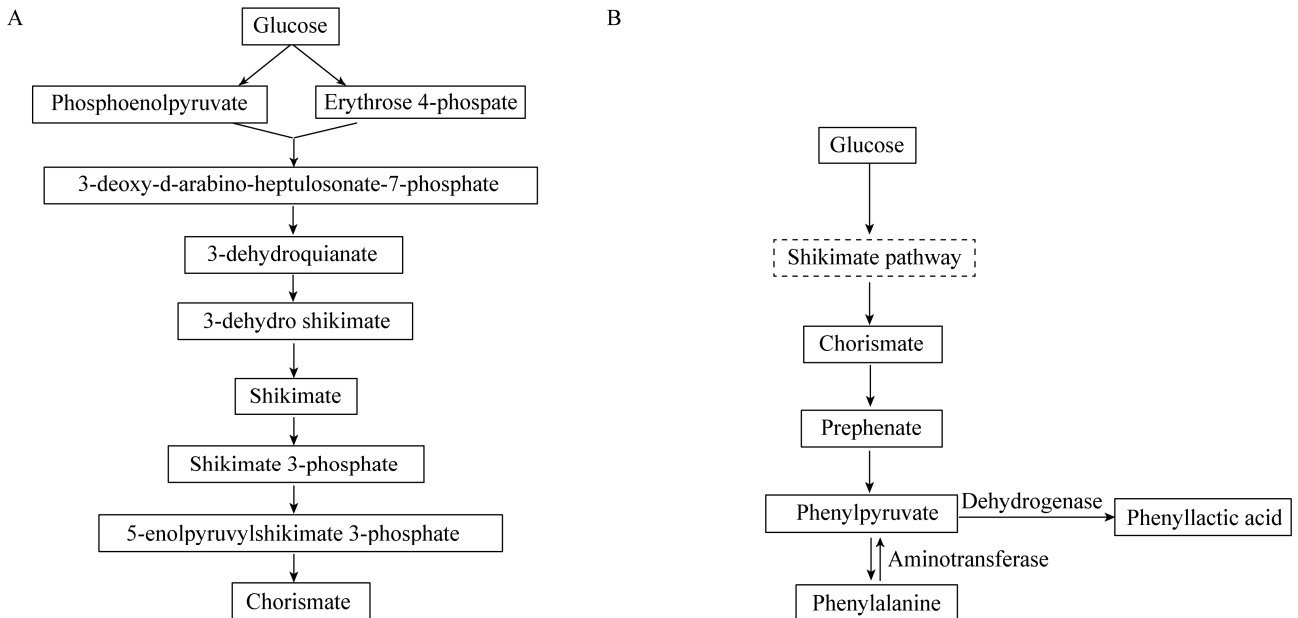


图 7 古墓土壤葡萄糖醋杆菌 FBFS97 中莽草酸途径(A)和 PLA 合成途径(B)的预测

Figure 7 Prediction of shikimate pathway (A) and PLA synthesis pathway (B) in *Gluconacetobacter tumulifolia* FBFS97



### 3 讨论与结论

PLA 作为一种新型的抑菌物质、治疗冠心病常用药物丹参素的结构类似物、制备降血糖制剂恩格列酮的前体物,在食品、医药等领域具有广阔应用前景。PLA 的制备包括化学合成法和微生物转化法。其中化学方法存在技术路线复杂、环境污染大、副产物多、不易分离纯化等缺点<sup>[30]</sup>。因此,生物转化法生产 PLA 一直是研究热点。目前报道能够产 PLA 的微生物包括乳酸菌、丙酸菌、白地霉等,FBFS97 是本研究发现的第一株可产 PLA 的醋酸菌,通过系统发育分析鉴定为古墓土壤葡糖醋杆菌。据文献报道,微生物可以苯丙氨酸和苯丙酮酸为原料提高 PLA 产量,其中乳酸菌的相关研究报道较多。例如,乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)以苯丙氨酸为底物时,可产生 50–300 mg/L 浓度不等的 PLA<sup>[31–33]</sup>,其最高 PLA 产生水平低于本研究中的 400 mg/L。

本研究采用全基因组测序方法获得了古墓土壤葡糖醋杆菌 FBFS97 的基因组序列和注释信息,预测到 3 500 个编码基因,发现经莽草酸合成 PLA 的所有基因,并预测得到 PLA 的生物合成途径。另外,通过与 VFDB 库比对,在 FBFS97 的基因组中未发现任何与毒力因子相关的基因,所以预测该菌株不产生毒素,但该菌株的安全性还需后续通过分析测试实验进一步证实。

菌株 FBFS97 具有较大的进一步改造潜力,基于本研究中 PLA 生物合成途径以及相关基因的发现,采用基因工程技术,通过消除反馈抑制,切断其他支路等方法,有望获得高产 PLA 的改良菌株。近年有研究报道采用全细胞转化法提高 PLA 产量,将活性较高的乳酸脱氢酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达,并以苯丙酮酸为原料,其 PLA 产量高达 17.23 g/L,摩尔转化率为 55.8%<sup>[34]</sup>。然而苯丙酮酸的价格非常昂贵<sup>[26,35]</sup>,以其为底物经微生物转化产生 PLA 的成本偏高,难以应用于工业化生产。目前,本课题组正采用分子生物学技术对 PLA 合

成途径进行改造与优化,拟构建以葡萄糖等相对廉价的物质为原料高效生产 PLA 的 AAB 菌株。

古墓土壤葡糖醋杆菌 FBFS97 是首次发现高产 PLA 的醋酸菌,FBFS97 全基因组测序及分析为该菌株基因工程改造提供依据,也为深入研究该菌株产 PLA 的分子机理奠定基础。

### REFERENCES

- [1] Matsushita K, Inoue T, Adachi O, et al. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4346-4352
- [2] Trček J, Barja F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 196: 137-144
- [3] Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(1): 46-53
- [4] Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, et al. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha[J]. *Current Microbiology*, 2008, 57(5): 449-453
- [5] Yamada Y, Yukphan P, Vu HTL, et al. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 62(2): 849-859
- [6] Hekmat D, Bauer R, Neff V. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(1): 71-76
- [7] Sainz F, Navarro D, Mateo E, et al. Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 222: 40-47
- [8] Cavalcante VA, Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane[J]. *Plant and Soil*, 1988, 108(1): 23-31
- [9] Mus F, Crook MB, Garcia K, et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3698-3710
- [10] Mu WM, Yu SH, Zhu LJ, et al. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(5): 1155-1163

- [11] Mu WM, Chen C, Li XF, et al. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1366-1370
- [12] Urban FJ, Moore BS. Synthesis of optically active 2-benzylidihydrobenzopyrans for the hypoglycemic agent englitazone[J]. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1992, 29(2): 431-438
- [13] Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16(1/3): 70-78
- [14] Lind H, Jonsson H, Schnürer J. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 98(2): 157-165
- [15] Dieuleveux V, van der Pyl D, Chataud J, et al. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 800-803
- [16] Chen FS, Chen HY. A high-yield phenyllactic acid producing *Gluconacetobacter* sp. and method for preparing phenyllactic acid: China, 201610853578.0[P]. 2017-03-15 (in Chinese)  
陈福生, 陈亨业. 一株高产苯乳酸的葡萄糖醋杆菌及其苯乳酸的制备方法: 中国, 201610853578.0[P]. 2017-03-15
- [17] Armaforte E, Carri S, Ferri G, et al. High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1131(1/2): 281-284
- [18] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119
- [19] Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (S1): D501-D504
- [20] Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(1): 365-370
- [21] Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33-36
- [22] Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, et al. CDD: NCBI's conserved domain database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D222-D226
- [23] Consortium GO. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(S1): D258-D261
- [24] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30
- [25] Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 3100-3108
- [26] Chen LH, Yang J, Yu J, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(S1): D325-D328
- [27] Dallagnol AM, Catalán CAN, Mercado MI, et al. Effect of biosynthetic intermediates and citrate on the phenyllactic and hydroxyphenyllactic acids production by *Lactobacillus plantarum* CRL 778[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(6): 1447-1455
- [28] Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, 50(2): 105-113
- [29] Singh S, Malhotra AG, Pandey A, et al. Computational model for pathway reconstruction to unravel the evolutionary significance of melanin synthesis[J]. *Bioinformatics*, 2013, 9(2): 94-100
- [30] Kim KW, Woo SI. Synthesis of high-molecular-weight poly (L-lactic acid) by direct polycondensation[J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2002, 203(15): 2245-2250
- [31] Li XF, Jiang B, Pan B. Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(4): 593-597
- [32] Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, et al. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(2): 289-295
- [33] Rodríguez N, Salgado JM, Cortés S, et al. Antimicrobial activity of D-3-phenyllactic acid produced by fed-batch process against *Salmonella enterica*[J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 274-284
- [34] Zhu YB, Wang Y, Xu J, et al. Enantioselective biosynthesis of L-phenyllactic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1966
- [35] Zheng ZJ, Ma CQ, Gao C, et al. Efficient conversion of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by using whole cells of *Bacillus coagulans* SDM[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19030