



研究报告

枯草芽孢杆菌氧化还原感应全局调控因子 Rex 对乙偶姻合成的影响

韩如梦 柳鑫燕 林文萱 李翔飞 杨套伟 徐美娟 邵明龙 张显* 饶志明*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】枯草芽孢杆菌体内含有一种可响应胞内氧化还原水平的因子,称之为氧化还原感应全局调控因子 Rex (由基因 *ydiH* 编码)。Rex 可通过感知辅酶 NADH/NAD⁺水平的变化来调节胞内氧化还原平衡。【目的】研究 Rex 对枯草芽孢杆菌乙偶姻合成和辅因子代谢的相关性。【方法】利用比较转录组挖掘乙偶姻和 2,3-丁二醇可逆转化过程中显著差异的基因,并通过 Cre/*lox* 基因敲除技术敲除 *ydiH*、*acuA* (乙酰 AcsA)和 *acoC* (二氢脂酰胺乙酰转移酶)。随后,利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析敲除菌株中乙偶姻相关基因的转录水平。【结果】通过发酵实验发现,敲除 *ydiH* 会在一定程度上抑制菌体的生长速率,但发酵前期乙偶姻单位细胞产量和底物转化率都得到了显著提高;敲除 *acuA* 和 *acoC* 后,对乙偶姻合成、菌体生长和糖耗速率均影响不大;敲除 *ydiH* 后,与乙偶姻合成相关基因 *alsR* (*alsSD* 的正转录调控因子)、*alsS* (α -乙酰乳酸合成酶)、*alsD* (α -乙酰乳酸脱羧酶)和 *bdhA* (2,3-丁二醇脱氢酶)的转录水平显著上调。【结论】枯草芽孢杆菌氧化还原感应全局调控因子 Rex 通过抑制与乙偶姻相关基因的转录水平影响乙偶姻合成。本研究首次报道了枯草芽孢杆菌中 Rex 和乙偶姻合成的相关性,为探索 Rex 如何通过调控相关基因的转录来影响胞内氧化还原稳态奠定了基础,也为提高枯草芽孢杆菌工业化生产强度和底物转化率提供了借鉴。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 乙偶姻, 氧化还原感应全局调控因子, 发酵调控

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31500065); Science and Technology Innovation Team Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (KJT2017001); Major Scientific and Technological Innovation Project of Shandong Province (2019JZZY020605); Foundation of State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking (KF201907)

*Corresponding authors: ZHANG Xian: E-mail: zx@jiangnan.edu.cn

RAO Zhi-Ming: Tel: 86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 16-12-2019; **Accepted:** 04-03-2020; **Published online:** 22-04-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31500065); 宁夏回族自治区科技创新团队项目(KJT2017001); 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY020605); 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室开放基金(KF201907)

*通信作者: 张显: E-mail: zx@jiangnan.edu.cn

饶志明: Tel: 0510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-12-16; **接受日期:** 2020-03-04; **网络首发日期:** 2020-04-22

Effect of global redox-sensing transcriptional regulator Rex on acetoin synthesis of *Bacillus subtilis*

HAN Ru-Meng LIU Xin-Yan LIN Wen-Xuan LI Xiang-Fei YANG Tao-Wei
XU Mei-Juan SHAO Ming-Long ZHANG Xian* RAO Zhi-Ming*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] The global redox-sensing transcriptional regulator Rex (encoded by the *ydiH* gene) of *Bacillus subtilis* can regulate intracellular redox balance by sensing NADH/NAD⁺ levels. [Objective] To study the effect of Rex on the synthesis of acetoin through regulation of cofactor pools in *B. subtilis*. [Methods] RNA-Seq was used to identify the transcriptional diversity of genes that were involved in the bioprocess of reversible transformation between acetoin and 2,3-butanediol, and *ydiH*, *acuA* (acetyl AcsA) and *acoC* (dihydrolipoamide acetyltransferase) were knocked out by Cre/*lox* gene knockout technology. Subsequently, the transcriptional levels of acetoin-related genes in the knockout strains was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). [Results] Fermentation results indicated that blocking of *ydiH* could inhibit biomass of *B. subtilis* to a certain extent, but acetoin yield of unit cell and substrate conversion rate were significantly increased in early stage of fermentation. However, knockout of *acuA* and *acoC* had little effect on acetoin synthesis, biomass and glucose consumption rate. After knocking out *ydiH*, the transcriptional levels of *alsR* (positive transcriptional regulator of *alsSD*), *alsS* (α -acetolactate synthase), *alsD* (α -acetolactate decarboxylase) and *bdhA* (2,3-butanediol dehydrogenase), involved in acetoin synthesis, were significantly up-regulated. [Conclusion] Global redox-sensing transcriptional regulator Rex in *B. subtilis* affect the synthesis of acetoin by down regulation of the transcription levels of acetoin synthesis related genes. This study first reported the correlation between Rex and the synthesis of acetoin in *B. subtilis*, laying the foundation for exploring how Rex affects intracellular redox balance by regulating the transcription of related genes, and providing reference for improving the industrial production intensity and substrate conversion rate of *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Acetoin, Global redox-sensing transcriptional regulator, Fermentation regulation

乙偶姻广泛存在于苹果、可可、草莓和玉米等物质中, 具有特殊的奶油香味。乙偶姻是我国明确规定的食品添加剂^[1], 通常被添加到烘焙食物、糖果、乳制品和饮料等食品中。同时, 乙偶姻也是多种微生物的次级代谢产物, 许多微生物可以利用葡萄糖合成乙偶姻或 2,3-丁二醇, 而乙偶姻和 2,3-丁二醇是中物质, 可调节胞内酸碱平衡^[2-3]。

枯草芽孢杆菌是被美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认可的 Generally recognized as safe (GRAS) 菌株, 遗传背景清晰, 具有良好的可操作性和安全性, 是一种重要的工业生产菌株。前期研究发现, 枯草芽孢杆菌中

乙偶姻和其下游产物 2,3-丁二醇存在着可逆转化的关系, 该可逆过程需要辅酶 NADH/NAD⁺ 的参与^[4-5]。研究表明, 枯草芽孢杆菌体内含有一种可响应胞内氧化还原水平的因子, 称之为氧化还原感应全局调控因子 Rex (由基因 *ydiH* 编码)^[6]。Rex 通过感知 NADH/NAD⁺ 比率的变化来调节胞内氧化还原平衡^[7], 并与许多基因的启动子区域结合, 抑制基因表达, 该过程可被 NADH 抑制并由过量的 NAD⁺ 解除抑制。这些可与 Rex 结合的基因大多参与碳和能量代谢, 包括 NADH 氧化、产氢、ATP 合成及乳酸和琥珀酸的形成^[8-9]。

研究发现, 基因簇 *acuABC* 和 *acoABCLR* 与乙偶姻的降解有关^[10]。王萌敲除 *B. subtilis* 168 中的

基因 *bdhA* 和 *acoA* 后, 弱化了 2,3-丁二醇的合成和乙偶姻的降解。*B. subtilis* 168 Δ *bdhA* Δ *acoA* 的乙偶姻得率较 *B. subtilis* 168 提高了 10%, *B. subtilis* 168 Δ *acoA* 中乙偶姻几乎不会降解^[11]。康艳方对 *B. licheniformis* WX-02 Δ *budC* 进一步敲除 *acoR*, 在一定程度上减弱了乙偶姻的分解代谢, *B. licheniformis* WX-02 Δ *budC* Δ *acoR* 的乙偶姻产量相对于 *B. licheniformis* WX-02 Δ *budC* 提高了 11.27%^[12]。

前期研究发现 Rex 通过调控胞内辅因子代谢来

影响胞内氧化还原平衡。本实验以 *Bacillus subtilis* 168 作为底盘细胞, 结合代谢工程手段和基因组编辑技术, 研究 Rex 的全局调控功能, 解析在不同发酵阶段 Rex 影响胞内氧化还原平衡的整体发生规律及其与乙偶姻合成的相关性(图 1)。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

研究用到的微生物菌株和载体质粒均列于表 1 中, 敲除菌株所用到的引物均列于表 2 中。

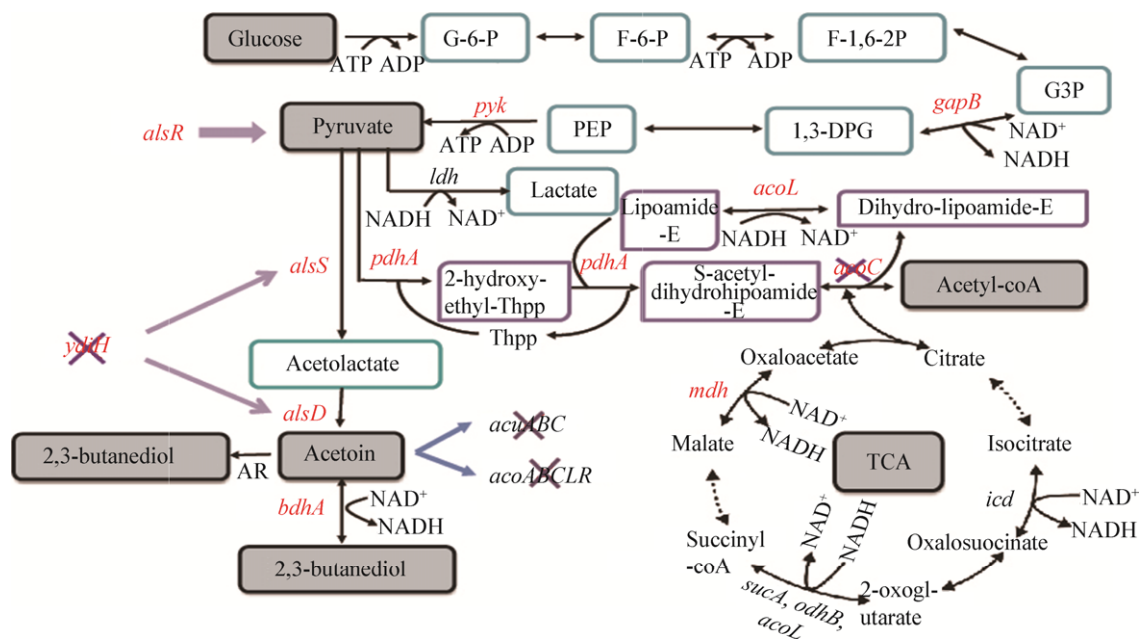


图 1 枯草芽孢杆菌中乙偶姻的生物合成途径

Figure 1 Acetoin biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*

注: “x”表示敲除; 红色基因为转录组差异较为显著的基因; 蓝色实线箭头所指基因为乙偶姻降解相关的基因。

Note: “x” means knock out; Red genes are genes with significant transcriptome differences; The genes indicated by the blue solid arrows are genes involved in the degradation of acetoin.

表 1 本研究用到的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	特征	来源
Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>B. subtilis</i> 168	trpC2	Our lab
<i>B. subtilis</i> 168/ Δ <i>ydiH</i>	<i>ydiH</i> knockout strain	This study
<i>B. subtilis</i> 168/ Δ <i>acuA</i>	<i>acuA</i> knockout strain	This study
<i>B. subtilis</i> 168/ Δ <i>acoC</i>	<i>acoC</i> knockout strain	This study
Plasmids		
p7Z6	pMD18-T containing <i>lox71-zeo-lox66</i> cassette	[13]
pTSC	pTS containing <i>Pspac-cre</i> expression cassette	[13]

表 2 本研究用到的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
P1(<i>ydiH</i> -L-F)	CATACGAAAGCTGGCCTGCGATAATTTAAGGAGCGTGGATTTC
P2(<i>ydiH</i> -L-R)	AATCATGGTCTTTTGGTCCTCCAAATTATACTCGGATAGTTCTCTTTTAAAGTCACCG
P3(<i>ydiH</i> -Z-F)	CCGAGTATAATTTGGAGGACCAAAAGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGG
P4(<i>ydiH</i> -Z-R)	GCATATTTGGGCTCCTCCTTTCCCTTGTAACGACGCGCCAGTGCCAAGCT
P5(<i>ydiH</i> -R-F)	GGCACTGGCCGTCGTTTTACAAGGGAAAGGAGGAGCCCAAATATGCCGAT
P6(<i>ydiH</i> -R-F)	AGCGTAAAAATACGCATACTTTCTGATTTTCGCCAAGAACATCGGT
P7(<i>acuA</i> -L-F)	TATAGTGAAGCAGAAAGCCGTCTT
P8(<i>acuA</i> -L-R)	CGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCTAATTCACCGTCCCATCAATTCTTATCA
P9(<i>acuA</i> -Z-F)	TAAGAATTGATGGGACGGTGAATTAGACCATGATTACGAATTCGAGCTC
P10(<i>acuA</i> -Z-R)	ATTTTTTCCCCTTTGTGTCAGTGTGTAACGACGCGCCAGTGC
P11(<i>acuA</i> -R-F)	GCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACTGACTGACAAAGGGGAAA
P12(<i>acuA</i> -R-F)	AAGGGATGCTCCTGATGAAACATATAGG
P13(<i>acoC</i> -L-F)	ATCAACCGGTTTGAGACCGATTG
P14(<i>acoC</i> -L-R)	CGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCTTGTGTCCTTAAATTCAATGC
P15(<i>acoC</i> -Z-F)	GCATTGAATTAAGGGGGGACACAAGACCATGATTACGAATTCGAGCTC
P16(<i>acoC</i> -Z-R)	GTCATGTCGTTTTACCTGCTTTTCTGTAAAACGACGCGCCAGTGC
P17(<i>acoC</i> -R-F)	GCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAGAAAAGCAGGTGAAAACGACATGAC
P18(<i>acoC</i> -R-F)	CACATAATCGGCCTTCGTTTTAAACTC

1.2 主要试剂和仪器及培养基

质粒小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; 2×Phanta Max Master Mix、FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit、HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 博来霉素(Zeo⁺), 北京索莱宝科技有限公司; 工具酶试剂, 宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成和核酸测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

液体 LB 培养基: 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的活化培养基及发酵所用的种子培养基; 固体培养基为添加 20 g/L 琼脂粉的液体 LB 培养基。

发酵培养基(g/L): 酵母浸膏 5.0, 尿素 2.0, 玉米浆 6.0, 葡萄糖 100.0。

1.3 感受态细胞的制备与转化

枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备和转化方法参照参考文献[14]。

1.4 转录组测序技术(RNA-seq)

挑取 *B. subtilis* 168 平板上的单菌落, 接种于 10 mL LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 10 h; 转接 6% 菌液于 50 mL 种子培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 10 h; 转接 6% 菌液于 50 mL 发酵培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 96 h。取 24 h (命名 BS24h) 和 96 h (命名 BS96h) 的发酵液, 8 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 收集菌体, 经液氮速冻 10 min, 送往南京诺唯赞生物科技有限公司进行转录组测序。

1.5 *ydiH*、*acuA* 和 *acoC* 的敲除

从 NCBI 网站公布的 *B. subtilis* 168 基因组序列中确定要敲除的目的基因的序列位置, 并下载目的基因前后各 800 bp 大小的一段 DNA 片段作为上、下游同源臂。以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, PCR 扩增获得目的基因的上、下游同源臂; 以 p7Z6 质

粒为模板, PCR 扩增获得抗性筛选标记表达盒 *lox71-zeo-lox66*^[13]。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 模板 DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 23 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。利用重叠延伸 PCR 技术将 3 条纯化回收后的 DNA 片段融合扩增得到一条 2.2 kb 左右的重组 DNA 片段。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix 25 μ L, 上游同源臂的上游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 下游同源臂的下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 上游同源臂片段(100 ng/ μ L) 2.5 μ L, *lox71-zeo-lox66* 片段(100 ng/ μ L) 2.5 μ L, 下游同源臂片段(100 ng/ μ L) 2.5 μ L, ddH₂O 15.5 μ L。PCR 反应条件除延伸时间改为 90 s, 其余设置和上一步相同。PCR 反应产物的纯化参照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的说明书。

按照 1.3 所述的转化方法将纯化回收后的重组 DNA 片段导入 *B. subtilis* 168 感受态细胞中, 涂布于含有 30 mg/L 博来霉素的 LB 抗性平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16 h, 获得敲除目的基因的 Zeo^r 转化子。将温敏型质粒 pTSC 转入 Zeo^r 转化子的感受态细胞中, 涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 抗性平板上, 可获得无博来霉素抗性的转化子; 再将所得到的转化子挑到无抗 LB 平板上, 51 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 除去质粒 pTSC, 获得无抗且不含 pTSC 的目的基因敲除菌株。

1.6 发酵参数分析方法

*OD*₆₀₀ 和葡萄糖的测定方法见参考文献[15]。乙偶姻含量的测定见参考文献[16]。

1.7 RNA 提取和 RT-qPCR 分析

收集不同发酵阶段的细胞, 根据 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit 的使用说明书提取 RNA。使用 HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR 试剂盒, 将 RNA (1 pg–1 μ g) 反转录成 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 仪对待测样品中特定 DNA 序列进行定量分析。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L,

上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 引物序列如表 3 所示, cDNA (0.1 g/L) 1 μ L, RNase-free ddH₂O 8.2 μ L。RT-PCR 反应条件参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书。以 RNase-free ddH₂O 作为阴性对照, 验证 Mix 和引物有无污染。以基因组 DNA 作为阳性对照, 验证反应体系、条件和过程的正确性。

2 结果与分析

2.1 转录组测序结果分析

通过对转录组学测序结果进行分析发现, *B. subtilis* 168 胞内与乙偶姻合成以及辅酶 NADH/NAD⁺和 ADP/ATP 合成相关的部分基因的转录水平在发酵前期和后期有比较明显的变化, 如图 2 所示。发酵后期基因的转录水平和发酵前期相比, EMP 途径中的 *gapB* 和 *pyk* 发生了明显的下调; TCA 循环相关的基因中, *mdh* 和 *pdhABCD* 发生了明显的上调; 乙偶姻合成相关的基因中, *alsR* 发生了下调, *alsS* 和 *alsD* 发生了显著上调; 乙偶姻降解相关的基因中, *acuABC* 和 *acoABCL* 发生了明显的下调, *bdhA* 和 *acoR* 发生了轻微上调。除此之外, 氧化还原感应全局的调控因子编码基因 *ydiH* 的转录水平发生了轻微下调现象。通过 NCBI 检索发现, *acuABC* 和 *acoABCLR* 分别为 2 个基因簇。研究表明其中的 AcuA 蛋白通过乙酰化残基 Lys549 控制枯草芽孢杆菌中乙酰辅酶 A 合成酶(AcsA)的活性^[17]。然而 *acoC* 直接参与乙酰 CoA 的合成, 与乙偶姻合

表 3 用于实时荧光定量 PCR 的引物

Table 3 Primers used for RT-qPCR

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>alsR</i> F	TATCGCAGTAGCCGAAGAGC
<i>alsR</i> R	CTTTTCAGAAGCGTAACTCCG
<i>alsS</i> F	ACAGCGAACACTGAAGGAGA
<i>alsS</i> R	TCCAAAGATTGATGTGTCCGT
<i>alsD</i> F	AGACCGTTCACCGTTCTGTT
<i>alsD</i> R	GCGTGTCAATTTTCGCATCAA
<i>bdhA</i> F	GTGTTACGACAAGCCATCCAG
<i>bdhA</i> R	ACCTTTTTCCCAAATGCTGACG

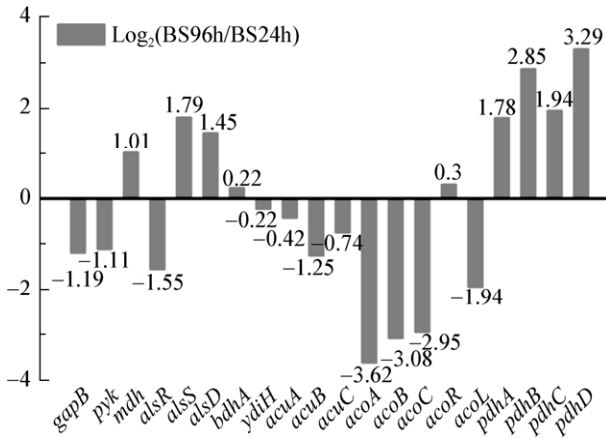


图2 乙偶姻代谢途径相关基因表达水平
Figure 2 Acetoin metabolic pathway related gene expression levels

注: BS24h: *B. subtilis* 168 发酵 24 h 基因的转录水平变化值; BS96h: *B. subtilis* 168 发酵 96 h 基因的转录水平变化值. $\text{Log}_2(\text{BS96h}/\text{BS24h}) > 0$ 表示 *B. subtilis* 168 发酵后期基因转录水平相较于发酵前期上调; $\text{Log}_2(\text{BS96h}/\text{BS24h}) < 0$ 表示 *B. subtilis* 168 发酵后期基因转录水平相较于发酵前期下调.

Note: BS24h: The transcription level change value of *B. subtilis* 168 fermentation 24 h gene; BS96h: The transcription level change value of *B. subtilis* 168 fermentation 96 h gene. $\text{Log}_2(\text{BS96h}/\text{BS24h}) > 0$ means that the gene transcription level of *B. subtilis* 168 during the late fermentation period is increased compared with the pre-fermentation period; $\text{Log}_2(\text{BS96h}/\text{BS24h}) < 0$ means that the gene transcription level of *B. subtilis* 168 during the late fermentation period is lower than the pre-fermentation period.

成途径竞争消耗丙酮酸, 如图 1 所示。结合以上的分析结果, 我们决定深入研究 *ydiH*、*acuA* 和 *acoC* 这 3 个基因与乙偶姻合成之间的关联性。

2.2 *ydiH*、*acuA* 和 *acoC* 敲除菌株的构建

以 *B. subtilis* 168 为出发菌, 按照 1.5 所述方法得到 *ydiH* 的敲除菌株(含有基因 *zeo*)。利用上游同源臂的上游引物 *ydiH*-L-F 和下游同源臂的下游引物 *ydiH*-R-R 进行菌落 PCR 验证。根据序列分析可知, *ydiH* 的敲除菌株(含有基因 *zeo*)经 PCR 扩增后可获得 2 197 bp 的 DNA 片段。将温敏型质粒 pTSC 导入该突变株后, 可扩增获得 1 768 bp 的 DNA 片段。PCR 验证结果如图 3A 所示, 表明基因 *ydiH* 已经敲除成功, 获得无抗转化子。提取该突变株的基因组, 经测序后进一步验证了 *ydiH* 敲除成功, 命名该突变株为 *B. subtilis* 168/ $\Delta ydiH$ 。*acuA* 和 *acoC* 敲除菌株的构建方法同上, 分别命名为 *B. subtilis* 168/ $\Delta acuA$ 和 *B. subtilis* 168/ $\Delta acoC$, 验证结果如图 3B 和图 3C 所示。

2.3 *ydiH*、*acuA* 和 *acoC* 敲除对菌株发酵产乙偶姻的影响

以往研究表明, Rex 可通过 NADH/NAD⁺比率的变化来感知胞内的氧化还原水平, 并能够在不同

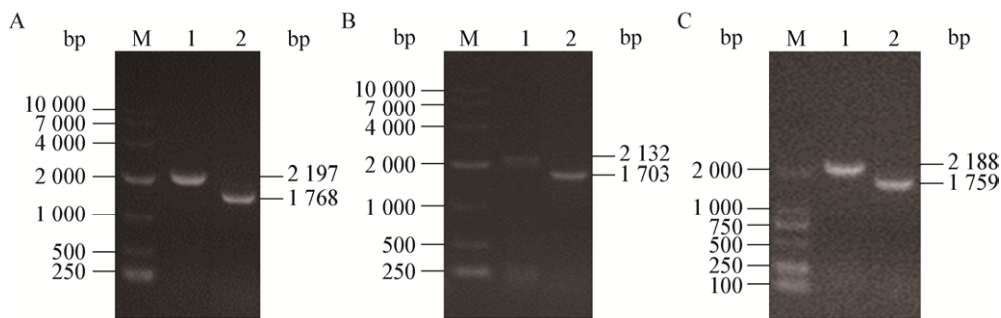


图3 *ydiH* (A)、*acuA* (B)和 *acoC* (C)敲除菌株 PCR 验证图
Figure 3 PCR verification of *ydiH* (A), *acuA* (B) and *acoC* (C) knockout strains

注: A: M: DL10000 DNA Marker; 1: 菌株 *B. subtilis* 168/ $\Delta ydiH$ (*Zeo*^r)的 PCR 产物; 2: 菌株 *B. subtilis* 168/ $\Delta ydiH$ 的 PCR 产物. B: M: DL10000 DNA Marker; 1: 菌株 *B. subtilis* 168/ $\Delta acuA$ (*Zeo*^r)的 PCR 产物; 2: 菌株 *B. subtilis* 168/ $\Delta acuA$ 的 PCR 产物. C: M: DL2000 DNA Marker; 1: 菌株 *B. subtilis* 168/ $\Delta acoC$ (*Zeo*^r)的 PCR 产物; 2: 菌株 *B. subtilis* 168/ $\Delta acoC$ 的 PCR 产物.

Note: A: M: DL10000 DNA Marker; 1: PCR product of *B. subtilis* 168/ $\Delta ydiH$ (*Zeo*^r); 2: PCR product of *B. subtilis* 168/ $\Delta ydiH$. B: M: DL10000 DNA Marker; 1: PCR product of *B. subtilis* 168/ $\Delta acuA$ (*Zeo*^r); 2: PCR product of *B. subtilis* 168/ $\Delta acuA$. C: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of *B. subtilis* 168/ $\Delta acoC$ (*Zeo*^r); 2: PCR product of *B. subtilis* 168/ $\Delta acoC$.

比例 NADH/NAD⁺条件下与 DNA 发生不同程度的结合,进而影响基因的表达^[7]。因此,有必要研究敲除 Rex 编码基因后枯草芽孢杆菌合成乙偶姻的变化水平。除此之外,本研究还分别探究了 *acuA* 和 *acoC* 基因的缺失对乙偶姻合成的影响。

敲除菌株构建成功后,摇瓶发酵 96 h,发酵参数分析结果如图 4 所示。*ydiH* 敲除菌耗糖速度明显降低,*acuA* 和 *acoC* 敲除菌株的耗糖速率与原始菌株 *B. subtilis* 168 相比变化不大。发酵 72 h, *B. subtilis* 168、*B. subtilis* 168/*ΔacuA* 和 *B. subtilis* 168/*ΔacoC* 菌株将发酵液中的葡萄糖完全耗尽,而 *B. subtilis* 168/*ΔydiH* 菌株发酵 96 h 才将葡萄糖完全耗尽。发酵前期, *B. subtilis* 168/*ΔydiH* 的菌体量增加缓慢,明显低于原始菌株,而 *acuA* 和 *acoC* 敲除菌株的菌体量与原始菌株相比变化不是很明显。由此可见,枯草芽孢杆菌中 *ydiH* 显著影响着菌体生长,而 *acuA* 和 *acoC* 并不是枯草芽孢杆菌生长所必需的。发酵 72 h 后, *B. subtilis* 168、*B. subtilis* 168/*ΔacuA* 和 *B. subtilis* 168/*ΔacoC* 的菌体量急剧下降,菌体衰亡明显;而 *B. subtilis* 168/*ΔydiH* 的菌体量下降缓慢,菌体衰亡不太明显。3 株敲除菌株与原始菌株相比,*acuA* 和 *acoC* 的敲除对乙偶姻产量影响不明显;*ydiH* 的敲除在发酵前期对乙偶姻产量影响较大,在发酵后期无明显优势。总而言之,*ydiH* 的敲除虽影响了菌体的生长速率,但乙偶姻的产量高于另外 3 株菌。

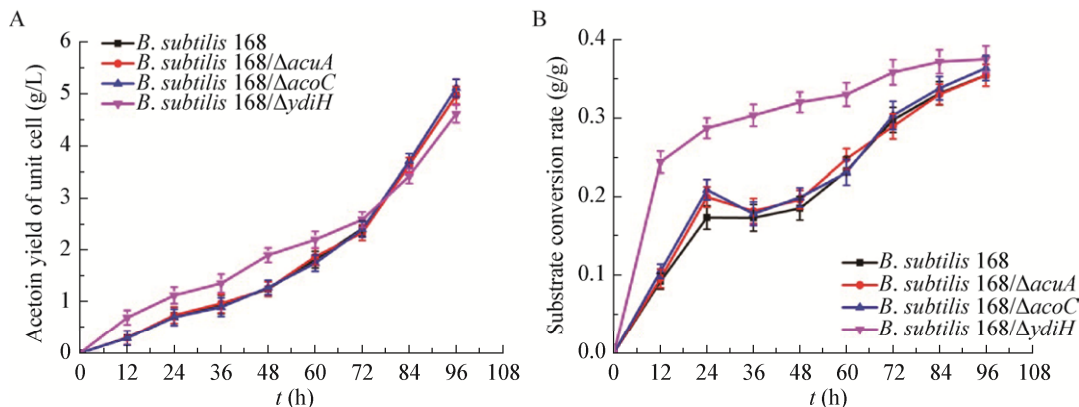


图 5 乙偶姻单位细胞产量和底物转化率的曲线图

Figure 5 Graph of acetoin yield of unit cell and substrate conversion rate

注: A: 乙偶姻单位细胞产量; B: 底物转化率。发酵结果显示为 3 次重复的平均值±标准差。

Note: A: Acetoin yield of unit cell; B: Substrate conversion rate. The results of the fermentation are shown as the mean of three replicates±standard deviation.

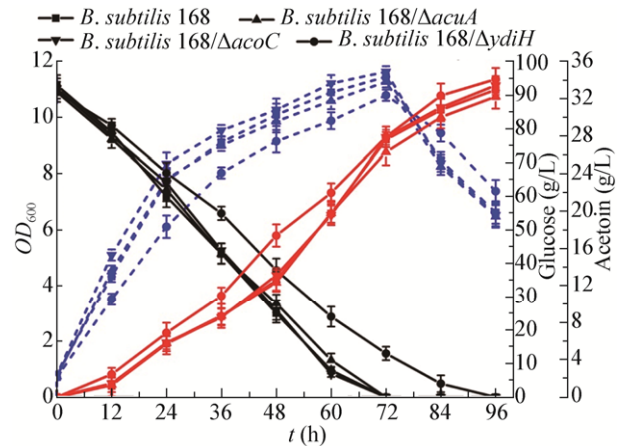


图 4 原始菌和敲除菌发酵过程曲线

Figure 4 Fermentation process curve of original and knockout strains

注: 黑色实线为发酵液中葡萄糖的剩余量; 蓝色虚线为 OD₆₀₀; 红色实线为乙偶姻的产量。发酵结果显示为 3 次重复的平均值±标准差。

Note: The black solid line is the remaining amount of glucose in the fermentation broth; The blue dotted line is OD₆₀₀; The red solid line is the yield of acetoin. The results of the fermentation are shown as the mean of three replicates±standard deviation.

除了以上发酵参数外,还对乙偶姻单位细胞产量(乙偶姻产量/OD₆₀₀)和底物转化率(乙偶姻产量/葡萄糖消耗量)进行了简要分析。如图 5A 所示,发酵前期, *B. subtilis* 168/*ΔydiH* 的乙偶姻单位细胞产量明显高于其他菌株。可见在发酵前期, *ydiH* 的敲除对乙偶姻的生成很有利。除此之外,相较于其他 3 株菌, *ydiH* 的敲除对底物转化率影响也很大(图 5B)。发酵前期, *B. subtilis* 168/*ΔydiH* 的底物转化率

增长较快, 72 h 后趋于平稳。可见, *ydiH* 敲除菌株可在耗糖速率较低的情况下产生较多的乙偶姻。

2.4 RT-qPCR 结果分析

由图 4 菌体量变化趋势可知, 菌体在发酵 72 h 后开始进入衰亡期。为了探究在不同生理状态条件下枯草芽孢杆菌胞内基因的转录水平差异, 选取 24 h 和 72 h 两个发酵点进行 RT-qPCR 分析。图 6A 和图 6B 分别为 *B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 发酵前期和发酵后期 *alsR*、*alsS*、*alsD*

和 *bdhA* 转录水平的对比图。分析图 6A 和图 6B 可知, 敲除 *ydiH* 不会影响枯草芽孢杆菌中 *alsR*、*alsS*、*alsD* 和 *bdhA* 发酵前后的转录趋势。不管枯草芽孢杆菌中是否含有 Rex, 发酵后期与发酵前期相比, *alsR*、*alsS* 和 *alsD* 的转录水平都是上调, *bdhA* 都是下调。发酵前期, *bdhA* 转录水平较强, 乙偶姻主要被用于合成 2,3-丁二醇。与发酵前期相比, 发酵后期的 *bdhA* 转录水平下调, *alsS* 和 *alsD* 的转录水平上调, 表观上呈现出乙偶姻逐渐被积

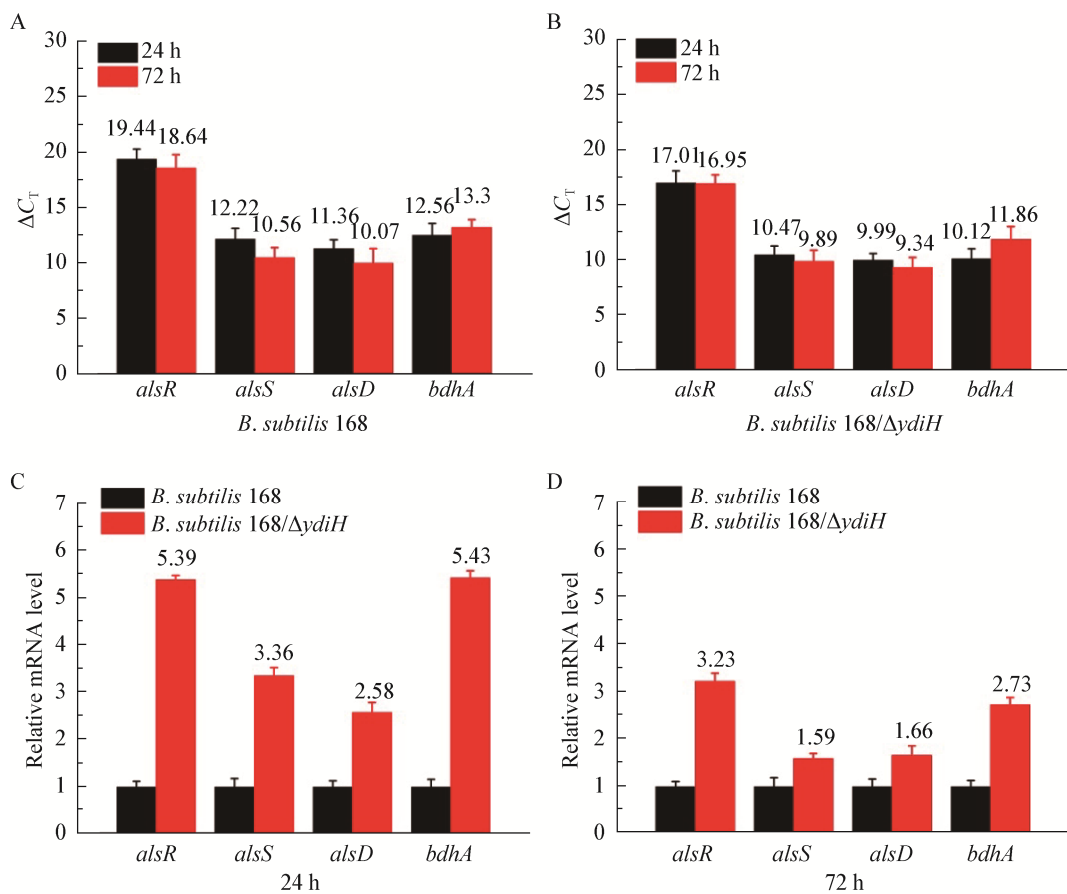


图 6 *B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 的转录水平分析

Figure 6 Transcriptional level analysis of *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH*

注: A: *B. subtilis* 168 发酵后期(72 h)和发酵前期(24 h)转录水平分析; B: *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 发酵后期(72 h)和发酵前期(24 h)转录水平分析; C: 发酵前期(24 h) *B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 的转录水平分析; D: 发酵后期(72 h) *B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 的转录水平分析。结果显示为 3 次重复的平均值 \pm 标准差。

Note: A: The transcriptional level analysis of *B. subtilis* 168 during the late fermentation (72 h) and pre-fermentation (24 h); B: The transcriptional level analysis of *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* during the late fermentation (72 h) and pre-fermentation (24 h); C: The transcriptional level analysis of *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* in the pre-fermentation period (24 h); D: The transcriptional level analysis of *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* at the late fermentation stage (72 h). Results are shown as the mean of three replicates \pm standard deviation.

累的趋势。结合图 6C 和图 6D 分析, *ydiH* 被敲除后, 与原始菌株相比, *alsR*、*alsS*、*alsD* 和 *bdhA* 的转录水平在发酵前后均发生不同程度的上调, 且发酵前期(24 h)转录水平上调程度明显高于发酵后期(72 h), 因此从发酵图 5 中可以看出在敲除 *ydiH* 后, 发酵前期乙偶姻单位细胞产量和底物转化率有明显的提高, 而发酵后期敲除菌株与原始菌株差异不大。

3 讨论与结论

研究表明, Rex 通过感知辅酶 NADH/NAD⁺ 比例变化来调节胞内氧化还原水平, 可与辅酶 NADH/NAD⁺ 合成相关基因启动子区域结合并抑制基因的表达, 如 *ldh* (乳酸脱氢酶基因)^[18] 和 *alsSD*^[7]。本实验通过转录组数据分析, 找到了一些与乙偶姻代谢相关且具有显著差异的基因(图 1 中红色标记基因)。这些基因大多与辅酶 NADH/NAD⁺ 或 ADP/ATP 合成有关, 可能会受到 Rex 调控。通过 Cre/lox 敲除技术, 实验敲除了 *B. subtilis* 168 中 *ydiH*、*acuA* 和 *acoC*。经摇瓶发酵显示, *ydiH* 的敲除可提高枯草芽孢杆菌中乙偶姻的合成和底物转化率; *acuA* 和 *acoC* 的敲除对枯草芽孢杆菌中乙偶姻的合成和底物转化率影响较小。除此之外, *ydiH* 的敲除还影响了枯草芽孢杆菌的生长速率。*B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 菌体的生长速率发生明显的降低, 可能与敲除 *ydiH* 破坏了胞内稳态环境有关。虽然敲除 Rex 在一定程度上影响了枯草芽孢杆菌的生长速率, 但与此同时改变了碳流的分配, 提高了乙偶姻的产量和底物转化率。

通过 RT-qPCR 分析可知, *ydiH* 被敲除虽然未影响枯草芽孢杆菌中 *alsR*、*alsS*、*alsD* 和 *bdhA* 在发酵前后的转录趋势, 但显著提高了基因的转录水平。可见枯草芽孢杆菌中的 Rex 显著影响着乙偶姻代谢相关基因的表达, 其中 *alsS* 和 *alsD* 转录水平的提高可能与 Rex 能结合 *alsSD* 启动子区域有关。敲除 *ydiH* 后, Rex 对 *alsS* 和 *alsD* 表达能力的阻遏作用得到解除, 使得 *alsS* 和 *alsD* 的转录能力得到

提高。通过 NCBI 检索发现, *alsR* 和 *alsSD* 的启动子区域有 158 bp 碱基重叠, 该重叠区域恰好包含 Rex 与 *alsSD* 启动子区域的结合位点^[7]。由此推测, Rex 能够与 *alsR* 启动子区域结合并抑制 *alsR* 表达, 敲除 Rex 可解除对 *alsR* 转录水平的抑制, 进而引起 *alsR* 转录水平大幅度的提高。有关 Rex 能够与 *alsR* 启动子区域结合的猜测, 还需进一步的实验验证。枯草芽孢杆菌中的 Rex 通过感知 NADH/NAD⁺ 比率的变化来调节胞内氧化还原平衡。敲除 Rex 后, 破坏了胞内氧化还原的稳定, 改变了胞内辅酶 NADH/NAD⁺ 的比例。为保持胞内 NADH/NAD⁺ 水平的稳定, *bdhA* 的转录水平发生了显著上调。可见枯草芽孢杆菌中 Rex 可通过感知胞内辅酶 NADH/NAD⁺ 水平的变化, 调控 *alsR*、*alsS*、*alsD* 和 *bdhA* 的转录, 进而影响乙偶姻的合成和转化。

敲除枯草芽孢杆菌中的 Rex 后显著影响了 *bdhA* 的转录, *bdhA* 转录水平的上调并不利于乙偶姻的积累, 反而会使乙偶姻更多地被转化成 2,3-丁二醇。课题组前期的研究已经证明敲除枯草芽孢杆菌中的 *bdhA* 并引入可调节 NADH/NAD⁺ 平衡的 NADH 氧化酶 YODC, 可显著提高乙偶姻的产量^[15], 我们可对 *B. subtilis* 168/ Δ *ydiH* 进一步实施代谢改造, 更好地完成胞内碳流的分配。本研究借助于枯草芽孢杆菌乙偶姻发酵这一过程, 探索 Rex 是如何通过调控相关基因的转录来影响胞内氧化还原稳态的, 以期在利用枯草芽孢杆菌作为工业生物底盘细胞进行代谢改造时, 为提高枯草芽孢杆菌工业化生产强度和底物转化率提供借鉴。

REFERENCES

- [1] Zhang XZ, Zeng CY, Ren XQ. Progress on synthesis of acetoin[J]. Jiangsu Chemical Industry, 2001, 29(2): 29-31 (in Chinese)
张小舟, 曾崇余, 任晓乾. 乙偶姻合成研究现状及展望[J]. 江苏化工, 2001, 29(2): 29-31
- [2] Speck EL, Freese E. Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of General Microbiology, 1973, 78(2): 261-275
- [3] Tsau JL, Guffanti AA, Montville TJ. Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in

- Lactobacillus plantarum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(3): 891-894
- [4] Bao T, Zhang X, Rao ZM, et al. Efficient whole-cell biocatalyst for acetoin production with NAD⁺ regeneration system through homologous co-expression of 2,3-butanediol dehydrogenase and NADH oxidase in engineered *Bacillus subtilis*[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102951
- [5] Bao T, Zhang X, Zhao XJ, et al. Regulation of the NADH pool and NADH/NADPH ratio redistributes acetoin and 2,3-butanediol proportion in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(8): 1298-1306
- [6] Pagels M, Fuchs S, Pané-Farré J, et al. Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(5): 1142-1161
- [7] Wang E, Bauer MC, Rogstam A, et al. Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex[J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(2): 466-478
- [8] Wietzke M, Bahl H. The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(3): 749-761
- [9] Hu LJ, Huang HY, Yuan HX, et al. Rex in *Clostridium kluyveri* is a global redox-sensing transcriptional regulator[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 233: 17-25
- [10] Huang M, Oppermann-Sanio FB, Steinbüchel A. Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(12): 3837-3841
- [11] Wang M. Preliminary study on metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for acetoin production[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2012 (in Chinese)
王萌. 产乙偶姻枯草芽孢杆菌代谢工程改造的初步研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2012
- [12] Kang YF. The function of *budC* gene of *Bacillus licheniformis* and construction of strains for enhanced production of acetoin[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
康艳方. 地衣芽孢杆菌 *budC* 基因的功能及高产乙偶姻菌株构建[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [13] Yan X, Yu HJ, Hong Q, et al. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5556-5562
- [14] Zhang X, Zhang RZ, Bao T, et al. Moderate expression of the transcriptional regulator ALsR enhances acetoin production by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(9): 1067-1076
- [15] Zhang X, Zhang RZ, Bao T, et al. The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 23: 34-41
- [16] Yang TW, Rao ZM, Zhang X, et al. Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17): 7651-7658
- [17] Gardner JG, Escalante-Semerena JC. Biochemical and mutational analyses of AcuA, the acetyltransferase enzyme that controls the activity of the acetyl coenzyme a synthetase (AcsA) in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(14): 5132-5136
- [18] Larsson JT, Rogstam A, von Wachenfeldt C. Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology, 2005, 151(10): 3323-3335