

苹果酸补料策略提高枯草芽孢杆菌DF生长和产孢效率

丁跃¹, 陈琛¹, 鲁佳康¹, 陈雄¹, 黄亚男², 王志^{1,*}

(1.湖北工业大学 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 武汉 430068;

2.河南省南街村(集团)有限公司, 河南 漯河 462600)

摘要: 为了提高枯草芽孢杆菌生长和产孢效率, 在30 L发酵罐水平考察了苹果酸对菌株DF生长代谢的影响。发酵16~27 h耦合pH 8.0流加苹果酸(终质量分数1.5%)使得生物量(22 h)达到 3.68×10^{10} CFU/mL, 较对照提高71.9%; 同时, 芽孢数为 3.63×10^{10} CFU/mL, 较对照提高92.1%。转录组差异分析表明: 苹果酸强化了菌株DF糖异生途径、磷酸戊糖途径(*pckA*、*fbaA*、*zwf*上调0.38~1.51倍)、三羧酸循环(*citZ*上调2.10倍)的代谢效率; 降低了细胞氧化胁迫强度(丙酮酸氧化酶编码基因*poxL*下调72.9%、硫氧还蛋白还原酶编码基因*trxA*上调2.88倍, 19~24 h的H₂O₂浓度下降了45.9%~51.3%); 增强了Spo0A的磷酸化效率(*kipL*、*rapAD*、*abrB*下调57.5%~75.9%; *clpX*、*phrCF*、*spo0B*、*sigA*上调0.73~12.76倍), 显著提高菌株DF的生长及芽孢形成效率。本研究可为枯草芽孢杆菌工业化高效发酵生产提供理论支撑。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 苹果酸; 细胞生长; 芽孢形成; 转录组分析

Malate Supplementation Enhances the Growth and Sporulation Efficiency of *Bacillus subtilis* DF

DING Yue¹, CHEN Chen¹, LU Jiakang¹, CHEN Xiong¹, HUANG Yanan², 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., Luohe 462600, China)

Abstract: To improve the growth and sporulation efficiency of *Bacillus subtilis*, the effect of malate on the cell growth and metabolism of *B. subtilis* DF was investigated in a 30 L bioreactor. At 22 h of fermentation, a biomass of 3.68×10^{10} CFU/mL was obtained by malate addition to a final concentration of 1.5% during 16–27 h after the pH reached 8.0 at 16 h, which was 71.9% higher than that of the control group. Meanwhile, the number of spores was 3.63×10^{10} CFU/mL, which was 92.1% higher than that of the control group. Differential transcriptomic analysis showed that malate increased the metabolic efficiency of the gluconeogenesis and pentose phosphate pathways with 1.38 to 2.51-fold up-regulation of the *zwf*, *pckA* and *fbaA* genes, respectively and the metabolic efficiency of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with 3.10-fold up-regulation of the *citZ* gene, reduced cellular oxidative stress with a 72.9% down-regulation of the *poxL* gene, a 3.88-fold up-regulation of the *trxA* gene, and thus a 45.9%–51.3% reduction in H₂O₂ concentration during 19–24 h, and enhanced the phosphorylation efficiency of Spo0A with down-regulation of the *kipL*, *rapAD* and *abrB* genes by 57.5%–75.9%, and up-regulation of the *clpX*, *phrCF*, *spo0B* and *sigA* genes by 1.73–13.76 folds, significantly improving the growth and sporulation efficiency of *B. subtilis* DF. These findings provide theoretical supports for the industrial application of *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*; malate; cell growth; sporulation; transcriptome analysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230424-231

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)02-0172-06

引文格式:

丁跃, 陈琛, 鲁佳康, 等. 苹果酸补料策略提高枯草芽孢杆菌DF生长和产孢效率[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 172-177.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230424-231. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-24

基金项目: 湖北省教育厅优秀中青年科技创新团队项目(T2022011)

第一作者简介: 丁跃(1998—)(ORCID: 0009-0008-8916-1375), 男, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。

E-mail: 1504398656@qq.com

*通信作者简介: 王志(1971—)(ORCID: 0000-0002-6903-778X), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物发酵过程调控优化。

E-mail: wangzhi@hbut.edu.cn

DING Yue, CHEN Chen, LU Jiakang, et al. Malate supplementation enhances the growth and sporulation efficiency of *Bacillus subtilis* DF[J]. Food Science, 2024, 45(2): 172-177. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20230424-231. <http://www.spkx.net.cn>

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 生长代谢过程中能产生丰富的淀粉酶、蛋白酶等酶类, 分泌活性物质抑制致病菌生长、调节肠道菌群^[1]、增强机体免疫力, 具有安全性能高、抗逆性强的特点, 广泛应用于微生态制品和食品领域^[2]。

枯草芽孢杆菌的高密度发酵是微生态制品生产的关键环节, 赵达等^[3]通过优化枯草芽孢杆菌B03的发酵培养基 (3.0%玉米淀粉、6.0%豆粕等), 摇瓶发酵66 h生物量达到 1.06×10^{10} CFU/mL; 高同国等^[4]在葡萄糖连续补料 (维持在1%)、补氨水 (维持pH 7.5~8.5) 条件下培养枯草芽孢杆菌16 h后, 热击 (50~80 °C) 15~60 min, 生物量达到 2.00×10^{10} CFU/mL、芽孢数达到 1.96×10^{10} CFU/mL。Abuhena等^[5]运用响应面优化的发酵条件通过3 m³发酵罐培养枯草芽孢杆菌, 生物量达 2.01×10^9 CFU/mL。咸漠等^[6]采用次序提高温度 (34~37 °C) 和通风量 (0.3~1.0 vvm) 策略培养枯草芽孢杆菌, 发酵24 h生物量达到 1.60×10^{10} CFU/mL, 芽孢率为96.0%。

芽孢杆菌生长过程存在的氧化胁迫^[7]与细胞氧化磷酸化、芬顿反应以及NADPH氧化酶催化等代谢过程有关^[8-10], 产生如超氧阴离子、H₂O₂等活性氧 (reactive oxygen species, ROS) ^[11]。ROS大量积累引起细胞蛋白变性、脂质过氧化及DNA断裂等损伤^[12], 而细胞通过氧化应激^[13]抵御氧化胁迫, 如通过转录因子PerR调控ROS清除酶 (硫氧还蛋白还原酶TrxA、超氧化物歧化酶、H₂O₂酶KatA等) 的表达。

磷酸化的Spo0A调控芽孢生成相关基因的表达效率, 而KinA、KinB、Spo0F、Spo0B等组成的磷酸传递系统调控Spo0A的磷酸化水平^[14]; 另外, KipL (抑制KinA活性)、Sda (抑制KinB激酶活性)、RapA (抑制磷酸酶活性) 等^[15]抑制磷酸传递效率, 降低Spo0A的磷酸化; KipA (抑制KipL活性) 和ClpX (与Sda结合后能解除Sda对KinB的抑制作用) 能促使KinA、KinB高效表达。而Phr (磷酸酶抑制蛋白) 通过与Rap蛋白结合, 提高Spo0F的磷酸化作用。因此, Spo0A的磷酸化是激酶、激酶抑制剂、磷酸传递蛋白及其调控蛋白共同作用的结果^[16]。

AbrB蛋白也能调控芽孢的形成。对数生长期, AbrB通过抑制 σ^H (SigH) 的合成降低RNA聚合酶核心酶与 σ^H 的组装效率, 进而阻遏*spo0A*基因的转录效率, 使芽孢启动受到抑制; 发酵环境不适合生长时, *abrB*表达受阻遏, *sigH*转录水平增加, *spo0A*转录及Spo0A~P合成增强, 进而激活SpoIIE调控细胞的不对称分裂^[17]、促进芽孢生成。

苹果酸脱氢代谢生成草酰乙酸和NADH, 后者作为氢载体参与能量代谢^[18], 而草酰乙酸回补效率提高可以促进三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环或糖异生途径的运转^[19]。另外, L-苹果酸能够捕获自由基, 具有抗氧化活性^[20]。而苹果酸应用于枯草芽孢杆菌高密度发酵并调控产孢效率的研究鲜见报道。

在30 L发酵罐水平研究耦合pH 8.0流加苹果酸对枯草芽孢杆菌DF生长和芽孢生成的调控作用, 旨在使苹果酸增强糖异生和TCA循环等的运转效率、缓解氧化胁迫、提高芽孢组分的表达水平, 促进细胞生长和芽孢生成效率, 为枯草芽孢杆菌高密度、高芽孢率发酵提供理论和技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

菌株: 枯草芽孢杆菌DF, 发酵工程教育部重点实验室筛选、保藏的野生型菌株。

过氧化氢检测试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; RNA检测试剂盒 美国安捷伦科技有限公司; 甲醇赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。其余所有用于发酵培养的试剂均为国产分析纯; 所有用于气相色谱分析的试剂均为色谱级试剂。

1.2 仪器与设备

BIOTECH-30JS发酵罐 上海保兴生物公司; ZXMP-A1230恒温恒湿箱 上海智城分析仪器制造有限公司; 高速冷冻离心机 艾本德中国有限公司; 高压蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; JY02S紫外分析仪 北京君意东方电泳设备有限公司; 7890B型气相色谱仪 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基配制

种子培养基、CFU计数培养基: 酵母浸膏20 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂粉20 g/L, 调pH 7.5, 121 °C灭菌20 min。

发酵培养基: 淀粉30 g/L、豆粕50 g/L、葡萄糖5 g/L、酵母浸膏3 g/L、蛋白胨8 g/L、轻CaCO₃ 3 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 2 g/L、MnSO₄·H₂O 0.3 g/L、30 mL泡敌, 121 °C灭菌30 min。

苹果酸母液: 270 g苹果酸加水定容至600 mL, 115 °C灭菌20 min。

1.3.2 枯草芽孢杆菌培养

枯草芽孢杆菌DF从-80 °C甘油管平板划线转接到

平板琼脂培养基中, 37 °C培养24 h。挑单菌落转接至新鲜茄子瓶斜面(60 mL培养基/250 mL茄子瓶), 37 °C培养24 h, 再向茄子瓶中加入50 mL无菌水, 制备菌悬液接种至30 L发酵罐(18 L计料)发酵培养基中。

发酵条件: 转速500 r/min、通气量1 m³/h、罐压0.045 MPa、温度37 °C。发酵13 h后溶氧量降至0, 提高供氧强度(转速由500 r/min提高到700 r/min, 通气量由1 m³/h提高到2 m³/h)。

补料方式: 发酵16 h, pH值回升至8.0左右, 16~27 h耦合pH 8.0补加苹果酸母液。对照为不补苹果酸的发酵培养液。

1.3.3 细胞数和芽孢数的测定

细胞数: 发酵液中细胞数(CFU/mL)采用稀释涂布平板法^[21]测定。

芽孢数: 将经过适当稀释后的菌液80 °C水浴15 min, 后进行平板涂布对芽孢进行计数。产芽孢率计算如式(1)所示:

$$\text{产芽孢率}/\% = \frac{\text{芽孢数}}{\text{活菌数}} \times 100 \quad (1)$$

比生长速率^[22]计算如式(2)所示:

$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

式中: μ 为比生长速率/h⁻¹; x 为生物量/(CFU/mL); t 为发酵时间/h。

1.3.4 H₂O₂浓度检测

测定过程放置冰盒, 按试剂盒说明书操作^[23], 现取现测。

1.3.5 乙酸质量浓度检测

发酵样品(-20 °C保存)经12 000 r/min离心5 min, 取上清液。采用内标法, 进行气相色谱测定^[21]。

1.3.6 转录组数据分析

取对照(未补苹果酸)和补料发酵(补苹果酸)22 h(对数中后期)发酵液20 mL于50 mL离心管中, 4 °C、12 000 r/min离心5 min, 无菌操作留取菌体沉淀并-80 °C保存。转录组测序由美吉生物科技有限公司完成。转录表达定量分析TPM(transcripts per million)值按照式(3)^[24]计算, 差异倍数按(4)计算:

$$\text{TPM} = \frac{R \times 10^6}{\left(\frac{R_1}{L_1} + \frac{R_2}{L_2} + \dots + \frac{R_n}{L_n}\right) \times L} \quad (3)$$

$$\text{FC} = \frac{\text{TPM}(\text{补苹果酸})}{\text{TPM}(\text{对照})} \quad (4)$$

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

1.4 数据分析

每组实验都进行3次平行, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过Origin 9.0和SPSS 23.0软件进行作图以及数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 30 L发酵罐水平枯草芽孢杆菌DF的发酵生长特征

如图1所示, pH值在发酵8 h降至最低值5.32(数据未显示), 后持续回升至16 h的8.0。22 h的pH值回升至8.79并维持至发酵结束。

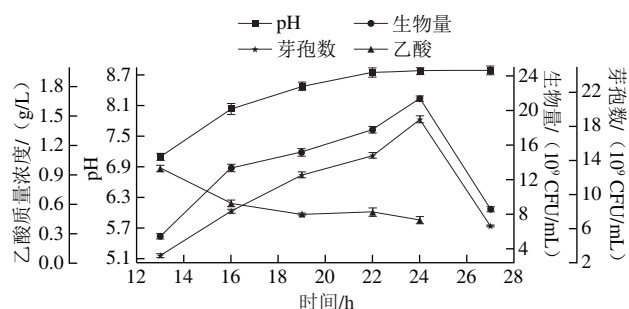


图1 30 L发酵罐水平菌株DF发酵生长特征

Fig. 1 Growth characteristics of strain DF in a 30 L bioreactor

13~24 h菌体生长进入对数期, 生物量由13 h的 5.47×10^9 CFU/mL对数生长至24 h达到峰值(2.14×10^{10} CFU/mL); 同时芽孢数由13 h的 2.77×10^9 CFU/mL提高至24 h的 1.89×10^{10} CFU/mL, 并在24 h达到最大芽孢率88.3%, 发酵基本实现高密度水平。24~27 h, 生物量及芽孢数分别由各自峰值快速下降至 8.61×10^9 、 6.20×10^9 CFU/mL, 分别下降了59.7%、67.2%。说明24 h后存在细胞生长或芽孢形成的限制因素。

乙酸是芽孢杆菌典型的溢流代谢产物^[25], 可由乙酰磷酸经丙酮酸氧化酶(PoxL)、乙酸激酶/酰基磷酸酶(YfiL)的次序催化生成(伴随H₂O₂生成)。乙酸质量浓度由13 h的0.96 g/L持续降至24 h的最低值(0.43 g/L), 说明发酵13 h时, 葡萄糖代谢引起的“碳溢流”已停滞, 乙酸作为储备碳源被细胞吸收, 并经氧化呼吸代谢二次利用, 这与马文龙^[26]的报道一致。另外, 13~16 h比生长速率(μ)为0.30 h⁻¹, 16~24 h的 μ 为0.06 h⁻¹, 比前者下降了80.0%, 说明乙酸16 h降至0.61 g/L时, 已不足以维持细胞保持高生长速率($\mu=0.30$ h⁻¹)。

2.2 耦合pH 8.0流加苹果酸对菌株DF生长和芽孢形成的影响

芽孢杆菌对数生长阶段发生“碳溢流”合成乙酸等有机酸, 当对数生长后期碳源不足时溢流代谢产物(乙酸等)被利用, 经氧化呼吸代谢产能和糖异生作用进行二次生长^[26]。因而, 菌株DF发酵13 h后的能量供应矛盾

在于碳源（如乙酸等）的不足，这影响了细胞的二次生长和芽孢生成效率。而苹果酸能促进TCA循环，同时提高糖异生途径效率^[19]，因而，考察耦合pH 8.0补料苹果酸（16~27 h）对枯草芽孢杆菌DF生长的影响（图2）。

pH值变化趋势与对照基本一致，16 h回升至8.0（数据未显示），耦合pH 8.0苹果酸补料（16~27 h）过程维持在8.0左右。13~24 h菌体处于对数生长期，生物量在13 h达到 5.81×10^9 CFU/mL，与对照（图1）持平；22 h达到峰值 3.68×10^{10} CFU/mL，较对照（24 h， 2.14×10^{10} CFU/mL，图1）提高了71.9%。芽孢数在13 h达到 2.61×10^9 CFU/mL（与对照接近）。而22 h芽孢数达到 3.63×10^{10} CFU/mL，较对照（22 h， 1.89×10^{10} CFU/mL，图1）提高了92.1%，芽孢率为98.6%，较对照（图1，芽孢率88.3%）提高了10.3%；而且19~22 h芽孢率维持在98%以上，芽孢率显著提升。说明耦合pH 8.0流加苹果酸能有效促进菌株DF生长和芽孢形成。

16~27 h开始流加苹果酸（16~22 h补加390 mL、22~24 h补加90 mL、24~27 h补加120 mL）。13~16 h乙酸质量浓度由1.08 g/L降低至0.71 g/L，其变化趋势与对照一致。16~22、22~24 h和24~27 h苹果酸流加速率分别为65、45 mL/h和40 mL/h（数据未显示），乙酸积累至19 h的峰值（2.77 g/L），质量浓度提高到16 h的3.90倍，并于3 h后（22 h）降至最低值0.41 g/L。16~22 h细胞生长速率几乎未受影响，其 μ 为 0.18 h^{-1} ，比对照16~24 h的 μ （ 0.06 h^{-1} ）提高2倍。说明苹果酸引起了“碳溢流”使乙酸合成效率增强，并作为储备碳源支撑了16 h后细胞的生长（图2）。

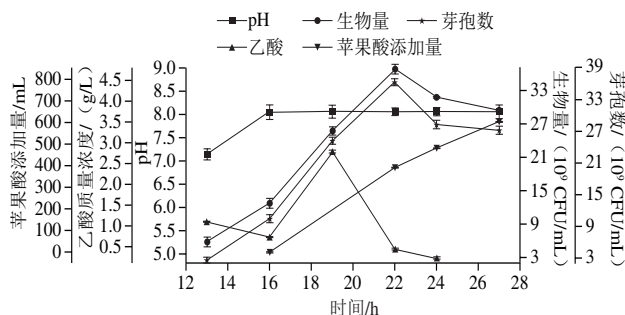
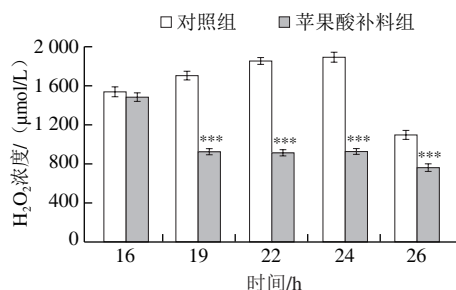


图2 苹果酸对枯草芽孢杆菌DF生长的影响
Fig. 2 Effect of malate on the growth of *B. subtilis* DF

氧化磷酸化过程会产生超氧阴离子，并经超氧化物歧化酶催化生成 H_2O_2 ^[10]。考虑到苹果酸具有抗氧化作用^[20]，其显著促进了芽孢杆菌DF的生长（图2），研究其是否会对其氧化应激过程产生影响，测定了发酵过程 H_2O_2 的浓度（图3）。

对照发酵的 H_2O_2 浓度由16 h的 $1534 \mu\text{mol/L}$ 快速积累，24 h达峰值（ $1890 \mu\text{mol/L}$ ），26 h降至 $1091 \mu\text{mol/L}$ 。而苹果酸补料使 H_2O_2 浓度由16 h的 $1477 \mu\text{mol/L}$ ，下降至19 h的 $919 \mu\text{mol/L}$ ，下降了37.78%，且在19~24 h维持稳定，后下降至26 h的 $756 \mu\text{mol/L}$ 。结果说明，耦合pH 8.0补加苹果酸可有效降低发酵过程 H_2O_2 浓度，16 h开始流加苹果酸后， H_2O_2 浓度较对照（发酵19~24 h）下降45.9%~51.3%，有效降低了 H_2O_2 的生成。



与对照组相比，*. $P < 0.05$ ；**. $P < 0.01$ ；***. $P < 0.001$ 。下同。

图3 苹果酸对 H_2O_2 浓度的影响

Fig. 3 Effect of malate on the production of hydrogen peroxide

2.3 苹果酸对糖异生、磷酸戊糖途径代谢的影响

对照组发酵16~24 h已处于对数生长中后期，乙酸含量在13~24 h呈明显消耗状态（图1），说明22 h细胞处于利用溢流分子-乙酸进行氧化呼吸代谢的生理状态，而Barwell^[19]和黄雪松^[21]等报道该状态与发酵体系快速利用碳源不足和糖异生途径有关。

CcpN是芽孢杆菌糖异生代谢调控蛋白，*ccpN*的高效表达将阻遏*pckA*（编码磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶）及*gapB*（编码3-磷酸甘油醛脱氢酶）的转录，进而限制糖异生代谢。而苹果酸经TCA循环代谢可对草酰乙酸进行回补，进而增强糖异生途径^[19]、TCA循环和NADH供应。因而对糖异生和磷酸戊糖途径关键基因的表达差异进行了分析，如图4所示。

苹果酸补料发酵的*ccpN*表达下调了33.5%、*pckA*上调了38.0%、*fbxA*（编码1,6-二磷酸果糖缩酶）上调了1.51倍，说明草酰乙酸向磷酸烯醇式丙酮酸的转化效率提高，糖异生途径加强。同时，*zwf*（编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）表达量提高了1.23倍。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等催化葡萄糖-6-磷酸生成5-磷酸核酮糖和NADPH生成。而NADPH是ROS清除酶系最终的电子供体^[10]，因而苹果酸可通过糖异生及磷酸戊糖途径代谢产生大量NADPH，加强了菌体氧化应激的适应性，从而提高生长效率。这与发酵过程细胞生长和芽孢生成效率显著提高（图2）的现象一致。

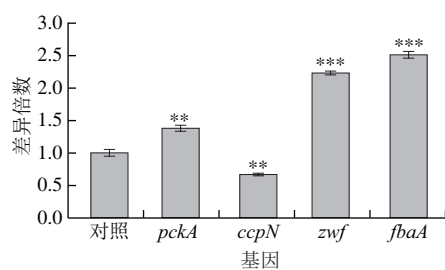


图4 苹果酸对糖异生、磷酸戊糖途径代谢的影响

Fig. 4 Effect of malate on the gluconeogenesis and pentose phosphate pathways

2.4 苹果酸对TCA循环、溢流代谢的影响

TCA循环和丙酮酸节点溢流代谢的通路竞争决定碳流的去向。TCA循环能够提供大量的NADH和中间底物，而溢流代谢则生成乙酸等^[27-28]。苹果酸补料对菌株DF的TCA循环、溢流代谢基因表达的影响如图5所示。

citZ (编码柠檬酸合酶) 表达上调了2.10倍，*ppaC* (编码锰依赖型焦磷酸酶) 催化ADP的合成，其表达水平上调了1.46倍，说明TCA循环碳流量通路增加，电子传递链末端磷酸化底物 (ADP) 供应加强，促进了能量代谢。

此外，22 h的*poxL* (编码丙酮酸氧化酶) 下调了72.9%，说明经由丙酮酸氧化酶生成H₂O₂的效率下降，降低了H₂O₂积累，这与发酵过程H₂O₂浓度显著下降 (图3) 的现象一致。而*yfjL* (编码酰基磷酸酶) 下调了68.8%，这与22 h乙酸处于被二次利用的现象一致 (图2)。同时，*acuB* (编码乙偶姻利用蛋白) 转录水平上调了3.53倍，也证实了溢流分子总体处于被二次利用的状态。

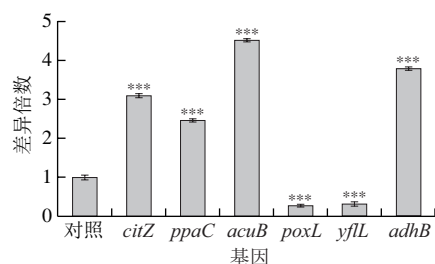


图5 苹果酸对TCA循环、溢流代谢的影响

Fig. 5 Effect of malate on the TCA cycle and overflow metabolism

值得注意的是，催化乙酰CoA生成乙醛的谷胱甘肽依赖型醛脱氢酶*adhB*上调了3.79倍，减少了乙酰CoA的竞争消耗、间接促进了TCA循环对乙酰CoA的供应，同时降低了乙醛积累对菌体生长的毒性^[29]，并缓解了其对生长的抑制作用。

2.5 苹果酸对氧化应激系统的影响

苹果酸使得发酵中后期H₂O₂浓度下降45.9%~51.3%

(图3)，因而分析了ROS清除系统关键酶的表达差异，如图6所示。

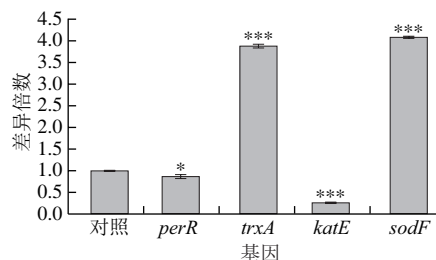


图6 苹果酸对细胞氧化应激体系基因表达的影响

Fig. 6 Effect of malate on gene expression in the oxidative stress system

sodF (编码超氧化物歧化酶) 清除超氧阴离子^[30]，其表达量上调了3.08倍，降低了超氧阴离子的积累。*PerR*是氧化应激阻遏蛋白^[31]，*perR*表达下调，缓解了超氧化物歧化酶的阻遏、促进了超氧阴离子的清除。

过氧化物酶PRDX在清除H₂O₂的过程中需要硫氧还原蛋白还原酶TRXR (由*trxA*编码) 的动态还原以恢复活性^[32]，*trxA*上调了2.88倍 ($P < 0.001$)。同时，H₂O₂酶*katE*表达量较对照下调了74.5%。说明H₂O₂的清除主要由PRDX-TRXR系统完成。苹果酸使PRDX-TRXR组成的H₂O₂清除系统效率更高，有效降低了H₂O₂的生成效率、缓解了胁迫强度 (图3)，进而促进了细胞生长 (图2)，这也与苹果酸补料使发酵过程H₂O₂浓度显著下降 (图3) 的结果一致。

2.6 苹果酸对芽孢生成效率的影响

Spo0A作为决定产孢启动的转录因子，其自身的磷酸化水平是否达到一定阈值决定了芽孢形成过程是否开始^[16]。当*abrB*的表达受抑制，*sigH*过表达，Spo0A自身表达量上调^[33]。磷酸化的Spo0A激活*spoIIE*的表达调控细胞不对称分裂，芽孢过程启动。

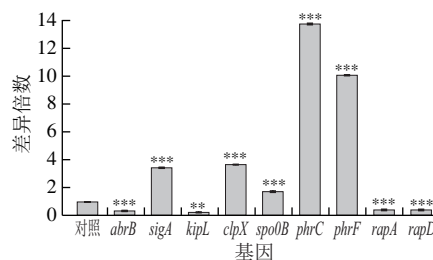


图7 苹果酸对芽孢生成效率的影响

Fig. 7 Effect of malate on the sporulation efficiency

苹果酸对菌株DF芽孢生成相关基因表达的影响如图7所示，*kipL* (激酶KinA的抑制剂) 下调了75.9%、*clpX*上调了2.67倍 (ClpX与Sda结合，解除Sda对KinB激酶的抑制作用)；*phrC*、*phrF*高效表达 (分别上调了12.76、9.09倍) 使得*rapA*、*rapD* (Spo0F去磷酸化) 分

别下调了58.2%、57.5%，共同增强了KinA和KinB参与的磷酸传递效率（Spo0F是磷酸根受体）。另外，磷酸传递系统的 $spo0B$ （编码Spo0B）表达量上调了73.0%，也有利于磷酸基团向Spo0A的传递。

菌体快速生长时，转录调控因子AbrB阻遏 $sigH$ 的表达，使Spo0A的磷酸化处于较低水平。相反Spo0A的磷酸化增强，可抑制 $abrB$ 的表达，使 $sigA$ （编码SigA，能与RNA核心酶结合）脱阻遏，促进 $spo0A$ 基因表达。苹果酸补料时， $abrB$ 表达下调了65.9%、 $sigA$ 表达上调了2.45倍，间接提高了Spo0A的磷酸化水平。

结果说明，苹果酸增强了菌株DF芽孢程序启动的效率，促进了Spo0A~P的生成和积累。这与苹果酸促进菌体芽孢生成效率的结果（图2）一致。

3 结论

高芽孢率是枯草芽孢杆菌应用于食品发酵工业和微生物生态领域的基础条件，耦合pH 8.0流加苹果酸补料增强了芽孢杆菌DF细胞 $sodF$ 、 $trxA$ 等抗氧化酶基因的表达强度，降低了发酵过程 H_2O_2 浓度，缓解了细胞氧化损伤。同时，通过强化糖异生途径和TCA循环促进了NADH、NADPH的合成，提高了能量供应效率，使菌株DF生物量达到 3.7×10^{10} CFU/mL，较对照（未补苹果酸）提高71.9%；芽孢数达到 3.6×10^{10} CFU/mL，较对照提高92.1%，显著提高了生长和芽孢生成效率。研究结果可为枯草芽孢杆菌高密度、高芽孢率发酵提供理论和技术支撑。

参考文献：

- ZOU X Y, ZHANG M, TU W J, et al. *Bacillus subtilis* inhibits intestinal inflammation and oxidative stress by regulating gut flora and related metabolites in laying hens[J]. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 2022, 16(3): 100474. DOI:10.1016/j.animal.2022.100474.
- KRUSE S, SCHENK M, PIRRE F, et al. *Bacillus subtilis* spores in probiotic feed quantified via bacterial metabolite using planar chromatography[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 15: 340124. DOI:10.1016/j.aca.2022.340124.
- 赵达, 刘伟成, 裘季燕, 等. 枯草芽孢杆菌B03液体发酵条件的优化[J]. *华北农学报*, 2008(2): 205-209.
- 高同国, 杨静, 朱宝成, 等. 枯草芽孢杆菌及高产吡啶乙酸、高芽孢形成率的发酵方法: CN 202110077226.1[P]. 2021-05-25.
- ABUHENA M, AL-RASHID J, AZIM M F, et al. Optimization of industrial (3 000 L) production of *Bacillus subtilis* CW-S and its novel application for minituber and industrial-grade potato cultivation[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 11153. DOI:10.1038/s41598-022-15366-5.
- 咸漠, 孙超, 赵广, 等. 一种高活菌数、高芽孢形成率的枯草芽孢杆菌的发酵方法: CN201710178865.0[P]. 2017-07-14.
- ZHAI Z Y, YANG Y, WANG G H, et al. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress[J]. *Food Microbiology*, 2020, 87: 103389. DOI:10.1016/j.fm.2019.103389.
- YANG S S, LIAN G J. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2020, 467(1/2): 1-12. DOI:10.1007/s11010-019-03667-9.
- FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Cross-talk between NADPH oxidase and mitochondria: role in ROS signaling and angiogenesis[J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1849. DOI:10.3390/cells9081849.
- 曾昕. 小白链霉菌同步代谢葡萄糖和甘油合成 α -聚赖氨酸的生理机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- KNAUS U G. Oxidants in physiological processes[J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2021, 264: 27-47. DOI:10.1007/164_2020_380.
- JAKUBCZYK K, DEC K, KALDUNSKA J, et al. Reactive oxygen species: sources, functions, oxidative damage[J]. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 2020, 48: 124-127.
- WU Y P, WANG B K, TANG L, et al. Probiotic *Bacillus* alleviates oxidative stress-induced liver injury by modulating gut-liver axis in a rat model[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 291. DOI:10.3390/antiox11020291.
- UL H I, BRANTL S, MULLER P. A new role for SR1 from *Bacillus subtilis*: regulation of sporulation by inhibition of *kinA* translation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(18): 10589-10603. DOI:10.1093/nar/gkab747.
- PARASHAR V, MIROUZE N, DUBNAU D A, et al. Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases[J]. *PLoS Biology*, 2011, 9(2): e1000589. DOI:10.1371/journal.pbio.1000589.
- HIGGINS D, DWORKIN J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(1): 131-148. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.
- FUJITA M, SADAIE Y. Feedback loops involving Spo0A and AbrB in *in vitro* transcription of the genes involved in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1998, 124(1): 98-104. DOI:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022103.
- 吴军林, 吴清平, 张菊梅, 等. *L*-苹果酸的生物学功能研究新进展[J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 225-228.
- BARWELL S, 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. DOI:10.1016/j.bbrc.2022.11.025.
- QIU K, HE W Z, ZHANG H J, et al. Bio-fermented malic acid facilitates the production of high-quality chicken via enhancing muscle antioxidant capacity of broilers[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2309. DOI:10.3390/antiox11122309.
- 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. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030477.
- MAFFEI M E. 5-Hydroxytryptophan (5-HTP): natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology[J]. *International Journal Molecular Science*, 2020, 22(1): 181. DOI:10.3390/ijms22010181.
- SATTERFIELD C N, BONNELL A H. Interferences in titanium sulfate method for hydrogen peroxide[J]. *Analytical Chemistry*, 1955, 27(7): 1174-1175.
- 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. DOI:10.1186/1471-2105-12-323.
- MA W, LIU Y, SHIN H D, et al. Metabolic engineering of carbon overflow metabolism of *Bacillus subtilis* for improved *N*-acetylglucosamine production[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 642-649. DOI:10.1016/j.biortech.2017.10.007.
- 马文龙. 中心代谢优化促进枯草芽孢杆菌积累 N -乙酰氨基葡萄糖[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- MARTINEZ C, GOUZE J L. Global dynamics of the chemostat with overflow metabolism[J]. *Journal of Mathematical Biology*, 2021, 82(3): 13. DOI:10.1007/s00285-021-01566-6.
- BODEGA G, ALIQUÉ M, PUEBLA L, et al. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2019, 8(1): 1626654. DOI:10.1080/20013078.2019.1626654.
- BUCKNER C M, MORAN C P J. A region in *Bacillus subtilis* sigmaH required for Spo0A-dependent promoter activity[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(18): 4987-4990. DOI:10.1128/JB.180.18.4987-4990.1998.
- CHEN X M, ZHANG E, FANG L, et al. Repair effects of exogenous SOD on *Bacillus subtilis* against gamma radiation exposure[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2013, 126: 259-263. DOI:10.1016/j.jenvrad.2013.09.005.
- FAULKNER M J, MA Z, FUANGTHONG M, et al. Derepression of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide stress response leads to iron deficiency[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(5): 1226-1235. DOI:10.1128/JB.06566-11.
- 胡开. 硫氧还蛋白还原酶小分子抑制剂的设计、合成与活性评价[D]. 成都: 电子科技大学, 2020. DOI:10.27005/d.cnki.gdzku.2020.000746.
- SAGGESE A, DI G B G, VITTORIA M, et al. CotG mediates spore surface permeability in *Bacillus subtilis*[J]. *mBio*, 2022, 13(6): e0276022. DOI:10.1128/mbio.02760-22.