



贾晨阳,张帆,刘兰茜,等.一株高耐受粗甘油枯草芽孢杆菌的分子机制研究[J].轻工学报,2025,40(5):44-54.
JIA C Y, ZHANG F, LIU L X, et al. Investigation into the molecular mechanism of a *Bacillus subtilis* strain exhibiting high tolerance to crude glycerol[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(5): 44-54.
DOI: 10.12187/2025.05.006

一株高耐受粗甘油枯草芽孢杆菌的分子机制研究

贾晨阳¹, 张帆¹, 刘兰茜², 王光路¹, 杨雪鹏¹

1. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 江西中烟工业有限责任公司 井冈山卷烟厂, 江西 吉安 343100

摘要:选取高耐受粗甘油的枯草芽孢杆菌为研究对象,利用全基因组和转录组测序技术解析其对高质量浓度粗甘油的耐受机制。结果表明:进化菌株中检测到 23 个突变基因,涉及 ABC 转运系统、烟酸与烟酰胺代谢、群体感应、芽孢生成等关键途径。相比出发菌株,进化菌株在甘油(酯)代谢、三羧酸循环、嘌呤代谢、ABC 转运系统、能量代谢等途径中的基因表达显著上调,脂肪酸和生物素合成代谢也明显增强;部分丧失芽孢生成能力,稳定中期和后期的芽孢生成率分别下降了 38.0% 和 52.3%;细胞膜新增 6 种成分,脂肪酸种类和质量浓度均显著增加,磷脂双分子层稳定性增强,这是其高粗甘油耐受性和快速生长的关键原因。

关键词:枯草芽孢杆菌;粗甘油耐受;分子机制解析;全基因组测序;转录组测序

中图分类号:TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2025)05-0044-11

0 引言

粗甘油是生物柴油、脂肪酸、脂肪酸酯等工业生产过程中的副产物,随着生物柴油产业规模的快速增长,粗甘油的应用开发成为研究热点^[1-3]。纯甘油由粗甘油精制提纯获得,在医药、高分子材料等领域应用广泛,但纯化工艺存在步骤繁琐、成本较高等问题。相比之下,直接应用粗甘油更具成本优势和潜力^[4-6]。粗甘油具有碳含量高(52.8%)和还原性强(还原力为葡萄糖的 2 倍)的特点,可作为微生物直接利用的廉价碳源^[7-9]。研究^[10-12]表明,

埃希氏菌属(*Escherichia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、葡萄杆菌属(*Gluconobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、假丝酵母菌属(*Candida*)、曲霉菌属(*Aspergillus*)等微生物菌株可利用粗甘油为底物生产 1,3-丙二醇、磷酸二羟丙酮、1,2-丙二醇、丙酸、2,3-丁二醇、乳酸等大宗化学品。然而,粗甘油含有的醇类(甲醇等)、脂肪酸类、酯类(甘油三酯、双甘酯等)、脂肪酸盐等副产物对微生物生长具有严重抑制作用,这限制了其生物转化潜力^[13-15]。

适应性实验室进化(Adaptive Laboratory

收稿日期:2025-01-02;修回日期:2025-05-12;出版日期:2025-10-15

基金项目:河南省自然科学基金重点项目(242300421202);河南省科技攻关重点研发与推广专项项目(232102311136)

作者简介:贾晨阳(2000—),男,山东省滨州市人,郑州轻工业大学硕士研究生,主要研究方向为生物技术与工程。E-mail:1765636995@qq.com

通信作者:杨雪鹏(1973—),男,河南省郑州市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为生物催化与转化。E-mail:yangxuepeng@zzuli.edu.cn

Evolution, ALE) 是指在实验室条件下模拟自然进化,筛选出具有优良性状的菌株,该技术已被应用于拓宽底物利用范围、提高产物合成性能及增强毒性产物耐受性^[16]。张瑗琿^[17]以高质量浓度的粗甘油为筛选压力,得到可耐受 110 g/L 粗甘油的进化菌株丁酸梭菌 Gen4,其发酵时间显著缩短,且 1,3-丙二醇生产能力提高了 114%。王世珍等^[18]以高质量浓度的粗甘油为筛选压力,得到可耐受 130 g/L 粗甘油的进化菌株,其生长速率提高,生物量是原始菌株的 1.23 倍。C. J. Zhang 等^[19]通过 ALE 技术获得了进化菌株巴氏梭菌 G8,其在 120 g/L 粗甘油培养基中快速生长且无滞后期。

微生物进化过程中会累积大量的突变基因,而基因突变具有随机性,除了与菌株进化性能提升相关的正向突变,还有众多中性和负向基因突变,这为阐明进化机理带来了困难^[20]。高通量测序技术可基于基因组尺度进行深度测序,分析进化过程中累积的突变基因及进化菌株同出发菌株的转录表达差异,进而有助于解析进化机理。全基因组测序是对未知基因组序列的物种进行个体基因组测序,而转录组测序能够快速、全面地获取某一物种特定器官或组织在某一状态下绝大多数的转录本。K. Kawai 等^[21]对酿酒酵母 W303-1B 的进化菌株进行转录组测序,发现与三羧酸循环和氧化磷酸化相关的基因均上调,这促进了该菌株在甘油培养基上的生长。J. H. Ju 等^[22]通过转录组测序发现,电子束辐射诱变获得的罗伊氏乳杆菌 JH83 能将粗甘油转化为 1,3-丙二醇的生产能力提高 34.6%,蔗糖磷酸化酶增加约 223.9 倍,主要促进剂超家族转运体增加 150.2 倍,参与细胞壁成分肽聚糖合成的 Muramyl 连接酶家族蛋白的表达水平增加 41.3 倍。D. Y. Zhou 等^[23]对贝莱斯芽孢杆菌 BS-37 进行转录组测序,发现参与甘油利用的基因,以及大多数参与糖酵解和 TCA 循环的基因高表达,这为下游代谢途径提供了足够的能量和碳骨架。

本研究团队前期通过 ALE 技术获得一株可耐受高质量浓度粗甘油的枯草芽孢杆菌 MutSL (*Bacillus subtilis* MutSL),其在 100 g/L 粗甘油培养基中表现出良好的生长特性,但其分子机制尚不明

确,目前也鲜见深入阐述枯草芽孢杆菌耐受粗甘油分子机制的相关报道。鉴于此,本文拟采用全基因组和转录组测序技术,结合菌株生长特性分析,解析枯草芽孢杆菌耐受高质量浓度粗甘油的分子机制,以期后续菌株代谢工程改造提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂与培养基

枯草芽孢杆菌 MutSL,保藏于郑州轻工业大学实验室;甲醇、氯仿、 H_2SO_4 、正戊烷、无水 Na_2SO_4 ,均为分析纯,天津市大茂化学试剂厂;DNA 提取试剂盒、RNA 提取试剂盒, BBI 生命科学有限公司;FastQuant RT 试剂盒、Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒,天根生化科技有限公司。

LB 培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值为 7.5。

M9G 粗甘油基本盐培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1 g/L;每 50 mL 培养基中加入 2 mL 1 mol/L 的 MgSO_4 , 1 mL 质量分数为 0.1% 的 CaCl_2 溶液,0.5 mL 质量分数为 0.5% 的色氨酸溶液,并按所需质量浓度添加粗甘油。

1.2 主要仪器与设备

LEICA DM750 型显微镜,徕卡仪器有限公司;UV-1800PC 型紫外-分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;ZQZY-CF9.9 型电热恒温摇床,上海知楚仪器有限公司;PX2 型聚合酶链式反应 (PCR) 仪,上海赛默生物科技有限公司;DYY-5C 型稳压电泳仪,北京六一仪器厂;Tanon-3500 型全自动数码凝胶图像分析系统,上海天能科技有限公司;Qubit[®] 3.0 型荧光定量仪、NanoDrop 型微量分光光度计,赛默飞世尔科技公司;SCIENTZ-II D 型超声波破碎仪,新芝生物科技股份有限公司;MiSeq 高通量测序平台、HiSeq[™] X TEN 测序平台,美国 Illumina 公司;Agilent 5400 型核酸片段分析仪、Agilent 2100 型生物分析仪、GCMS-QP2010 Ultra 型气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 设备,安捷伦科技仪器公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株适应性进化筛选及生长曲线绘制 将

活化的枯草芽孢杆菌 MutSL 接入新鲜 LB 培养基,于 37 ℃、200 r/min 条件下过夜培养,取 0.5 mL 接入 50 mL M9G 粗甘油基本盐培养基(30 g/L 粗甘油),于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 24 h,以相同方式接入 M9G 粗甘油基本盐培养基连续传代培养 7 d。取培养菌液接种于高质量浓度粗甘油培养基,经连续传代培养 35 d,最终获得可耐受 100 g/L 粗甘油的进化菌株枯草芽孢杆菌 Y100。

将进化菌株过夜培养,取菌液接种于 M9G 粗甘油基本盐培养基(100 g/L 粗甘油),使最大生物量(OD_{600})为 0.02,于 37 ℃、200 r/min 条件下培养,每隔 2 h 取样,测定 OD_{600} ,以绘制生长曲线^[24]。

1.3.2 进化菌株全基因组测序 使用 DNA 提取试剂盒提取菌株全基因组 DNA,采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和纯度,利用微量分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。使用超声波破碎仪将 DNA 片段化,经末端修复、接头连接、PCR 扩增、片段筛选和纯化,完成文库制备,采用核酸片段分析仪鉴定文库质量,在 MiSeq 高通量测序平台进行测序,将原始测序数据上传至 NCBI 数据库,获得 SRA BioProject Accession:PRJNA1248740^[25]。

过滤掉错误率高的原始测序片段,采用 Fast QC (v. 0.11.9) 软件分析测序质量,去除带接头、低质量(< 30)的原始测序片段后,使用 Bowtie2 (v. 2.5.4) 软件将高质量测序片段与枯草芽孢杆菌 MutSL 参考基因组进行比对,通过 Picard (v. 3.3.0) 软件对结果进行去重复和统计,利用 Samtools (v. 1.3.1) 软件进行 SNP 和 InDel 突变位点分析,运用 SnpEff (v. 3.0) 软件对突变位点进行注释,确定变异位点对应的基因信息、同义和非同义突变、对氨基酸的影响等。

1.3.3 进化菌株转录组测序 使用 RNA 提取试剂盒提取菌株总 RNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度,采用生物分析仪检测 RNA 样品完整性,通过荧光定量仪测定 RNA 浓度,样品检测合格后,取 3 μ g 总 RNA 作为起始原料构建转录组测序文库并验证文库质量,使用 HiSeq™ X TEN 测序平台进行转录组测序。

采用 Smtools (v. 1.3.1) 软件对原始测序数据

进行质量控制分析,使用 Hisat2 (v. 2.1.0) 软件将高质量测序片段与参考基因组进行比对,通过 edgeR (v. 3.16.5) 软件以 count 计数为起始数据,经 TMM 标准化后进行差异表达分析, $|\log_2(\text{倍数变化})| > 1.0$ 且错误发现率(FDR)< 0.05 的基因为差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs),使用 DAVID 数据库对 DEGs 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析^[26]。

1.3.4 基因表达变化比较 为了验证转录组测序结果,选择差异显著的基因进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)。RNA 提取同 1.3.3 方法,使用 FastQuant RT 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。在 Light Cycler® 480 II 上使用 Real Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR。反应体系为 20 μ L,其中 2 $\times$ SYBR Green 10 μ L,100 ng/ μ L 的 cDNA 1 μ L,10 μ mol/L 的引物 0.5 μ L,去离子水 8 μ L^[27]。每个样品一式三份,根据内参基因 *rnaA* 使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算相对基因表达值,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算每个基因 mRNA 水平的倍数变化^[28]。

1.3.5 菌株芽孢生成率测定 将菌株划线培养后,挑取单菌落接种到 LB 培养基中过夜活化,再接种到 M9G 粗甘油基本盐培养基(100 g/L 粗甘油)中,使初始 OD_{600} 为 0.02,培养至稳定期后,每 4 h 吸取少量菌液,于 80 ℃ 条件下处理 15 min,取 OD_{600} 为 0.1 的菌液 100 μ L,涂布于 LB 固体培养基平板上,37 ℃ 培养 12 ~ 16 h,统计菌落数量,计算芽孢生成率。

1.3.6 细胞膜脂肪酸含量测定 将菌株培养至对数后期并收集菌体细胞,将菌体细胞悬浮于 10 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.4)中并离心 2 次,取 300 mg 湿细胞,用 1.6 mL 磷酸钠缓冲液悬浮,加入 2 mL 甲醇和 4 mL 氯仿,室温静置 2 h,其间每 0.5 h 搅拌混合 1 次,再加入 2 mL 甲醇和 2 mL 氯仿,稀释提取液,于 9000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min,取下层溶液,加入 1 mL 甲醇-H₂SO₄ 溶液(甲醇与 H₂SO₄ 的体积比为 1 : 1),70 ℃ 甲基化 2 h,得到脂肪酸甲酯。将 1 mL 脂肪酸甲酯与 1 mL 正戊烷等体积混合,萃取 3 次后,加入无水 Na₂SO₄,离心取上

清液,用液氮将正戊烷吹干并蒸发,再溶于正己烷,过膜移入色谱瓶^[29]。

GC-MS 条件:进样口温度为 270 ℃;检测器温度为 280 ℃;载气为 N₂,流速为 1.0 mL/min,不分流;尾吹气为 H₂,流速为 25 mL/min;进样量为 1 μL;升温程序为初温 100 ℃,保持 13 min,以 10 ℃/min 的速率升温至 180 ℃,保持 6 min,再以 1 ℃/min 的速率升温至 200 ℃,保持 20 min^[30]。

2 结果与分析

2.1 粗甘油耐受菌株适应性进化分析

菌株细胞形态和生长曲线如图 1 所示。由图 1 可知,与出发菌株相比,进化菌株的细胞形态未发生明显变化,但具有更好的高质量浓度粗甘油耐受性,其生长延滞期缩短,能更快地进入对数生长期,且 OD₆₀₀ 由 1.210 提高至 1.416,比生长速率由 0.233 h⁻¹ 提高至 0.264 h⁻¹;在 LB 培养基中,进化菌株同样表现出更高的生物量及比生长速率,体现了其优良的生长特性。

2.2 全基因组测序结果分析

全基因组测序结果表明,进化菌株的基因组中共有 23 个突变基因,其分析结果见表 1;进化菌株突变基因在 KEGG 通路富集分析结果如图 2 所示。由表 1 可知,在这些突变基因中,有 10 个突变基因与编码酶有关,有 8 个突变基因与转录调节有关。结合图 2 可知,这些突变基因分布于转运系统(*nhaC*、*alaP*)、群体感应^[31](*cotN*、*yhjH*、*sqhC*、*mecB*、*mreBH*、*pftB*)、烟酸和烟酰胺代谢(*nadB*、*glcF*、*bscR*、

ymfC)、核酸代谢(*gyrA*、*parC*、*yqxK*、*comA*)等代谢途径,且这些突变基因可能与进化菌株粗甘油耐受性有关,比如粗甘油中甲醇、脂肪酸盐类成分可抑制菌株生长^[32-33],*nhaC* 基因参与细胞渗透压调节,减少培养基中高质量浓度的盐进入细胞^[34]。*cotN* 基因参与芽孢外壳蛋白形成^[35],*sqhC* 基因与芽孢烯合酶的表达相关^[36-37],二者的共同作用可影响进化菌株的芽孢形成,进而影响菌株的生长特性。尽管进化菌株中积累的突变基因具有随机性特征,但通过对突变类型及其所涉及的代谢途径进行系统汇总与分析,能够为后续转录组测序分析提供关键参考依据。

2.3 转录组测序结果分析

进化菌株差异表达基因的 KEGG 通路富集分析结果如图 3 所示。由图 3 可知,与出发菌株相比,共有 921 个差异表达基因,其中 655 个基因表达上调,266 个基因表达下调。在所有差异表达代谢途径中,重点选取了脂肪酸合成代谢途径中的 9 个关键酶编码基因进行 qRT-PCR 验证,结果如图 4 所示。由图 4 可知,该结果与转录组测序数据高度一致,进一步验证了转录组数据的可靠性。对进化菌株关键代谢途径的基因表达水平进行分析,结果如图 5 所示。由图 5 可知,甘油(酯)代谢途径、ABC 转运系统、脂肪酸合成途径、生物素合成途径、嘌呤代谢途径、能量代谢等代谢途径的基因表达同出发菌株有显著差异。

甘油(酯)代谢途径部分基因(如 *glpF*、*glpT*、*glpK*)表达上调,可加快甘油吸收和转运,促进甘油

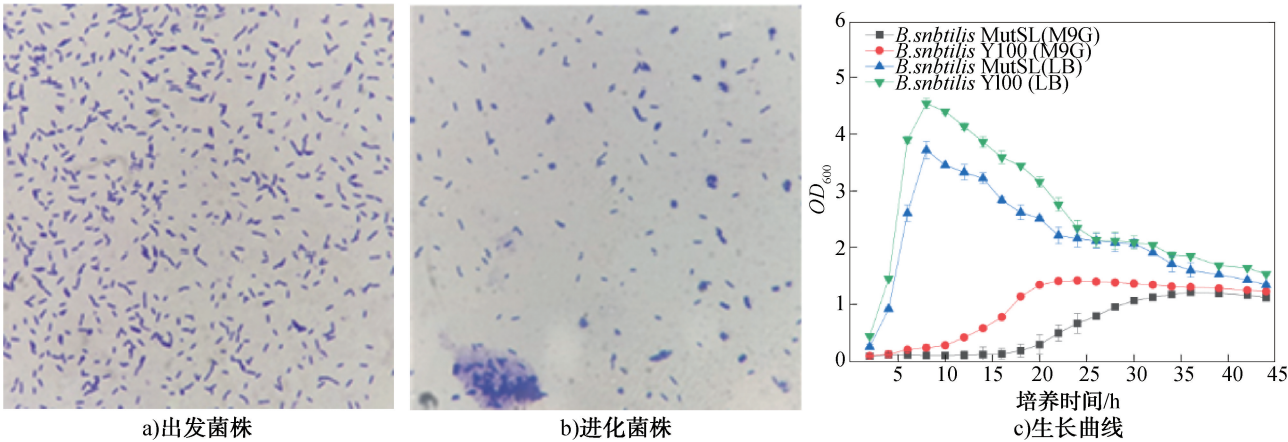


图 1 菌株细胞形态和生长曲线
Fig. 1 Cell morphology and growth curves of the strains

表 1 突变基因分析结果
Table 1 Comprehensive analysis of mutant genes

突变基因	氨基酸变化	功能预测	生理功能
<i>nhaC</i>	Leu7fs	Na ⁺ :H ⁺ 逆向转运蛋白,NhaC 家族	转运蛋白
<i>yhjH</i>	Leu170fs	MarR 家族转录调控因子	转录
<i>mreBH</i>	Ile60fs	杆状形态决定蛋白	Ⅱ 型毒素-抗毒素系统相关因子
<i>mecB</i>	Gly131fs	遗传感受态负调控因子 ClpC/MecB	ATP 依赖蛋白酶的 ATP 结合亚基 ClpC
<i>bscR</i>	Glu105fs	转录调控因子 CypB	转录
<i>nadB</i>	Ser35fs	L-天冬氨酸氧化酶	辅酶转运与代谢
<i>cotN</i>	Lys138fs	芽孢外壳蛋白	—
<i>galK</i>	Phe23fs	半乳糖激酶	碳水化合物转运与代谢
<i>gyrA</i>	Ala278Thr	DNA 解旋酶亚基 A	DNA 拓扑异构酶(ATP 水解型)
<i>gutR</i>	Asp526Asn	转录激活因子 GutR	转录
<i>yhdI</i>	His111Gln	推测的 PLP 依赖型转录调节因子	转录
<i>moeB</i>	Ala123Ser	钼喋呤合成酶腺苷酸转移酶	钼喋呤合成酶腺苷酸转移酶
<i>ymfC</i>	Pro141Leu	未表征的 HTH 型转录调控因子 YmfC	转录
<i>pksJ</i>	Ala2420Val	参与脂肽 bacillaene 非核糖体合成的 I 型聚酮合成酶	聚酮合酶 PksJ(PKS)
<i>parC</i>	Ser782Asn	拓扑异构酶Ⅳ亚基 A	DNA 复制和Ⅱ型毒素-抗毒素系统相关因子
<i>sqhC</i>	Arg252Gln	芽孢保护	孢二醇合酶
<i>yqxK</i>	Pro161Ser	单链 DNA 特异性外切核酸酶	单链 DNA 特异性外切核酸酶
<i>recJ</i>	Glu313Lys	推测的肌醇相关氧化还原酶	脱氢酶
<i>yrbE</i>	Thr2Ile	肌醇 2-脱氢酶/D-手性肌醇 1-脱氢酶	碳代谢
<i>alaP</i>	Ala380Thr	丙氨酸或甘氨酸:阳离子共转运蛋白,AGCS 家族	Na ⁺ /丙氨酸共转运蛋白
<i>glcF</i>	Phe359Ser	铁硫簇氧化还原酶	能量合成及转化
<i>pftB</i>	Ala134Thr	丙酮酸转运系统亚基 B 亚单位 B	推测的肽聚糖水解酶效应因子
<i>comA</i>	Ala130Thr	DNA 结合型反应调节因子	转录

注: - 表示未查询到。

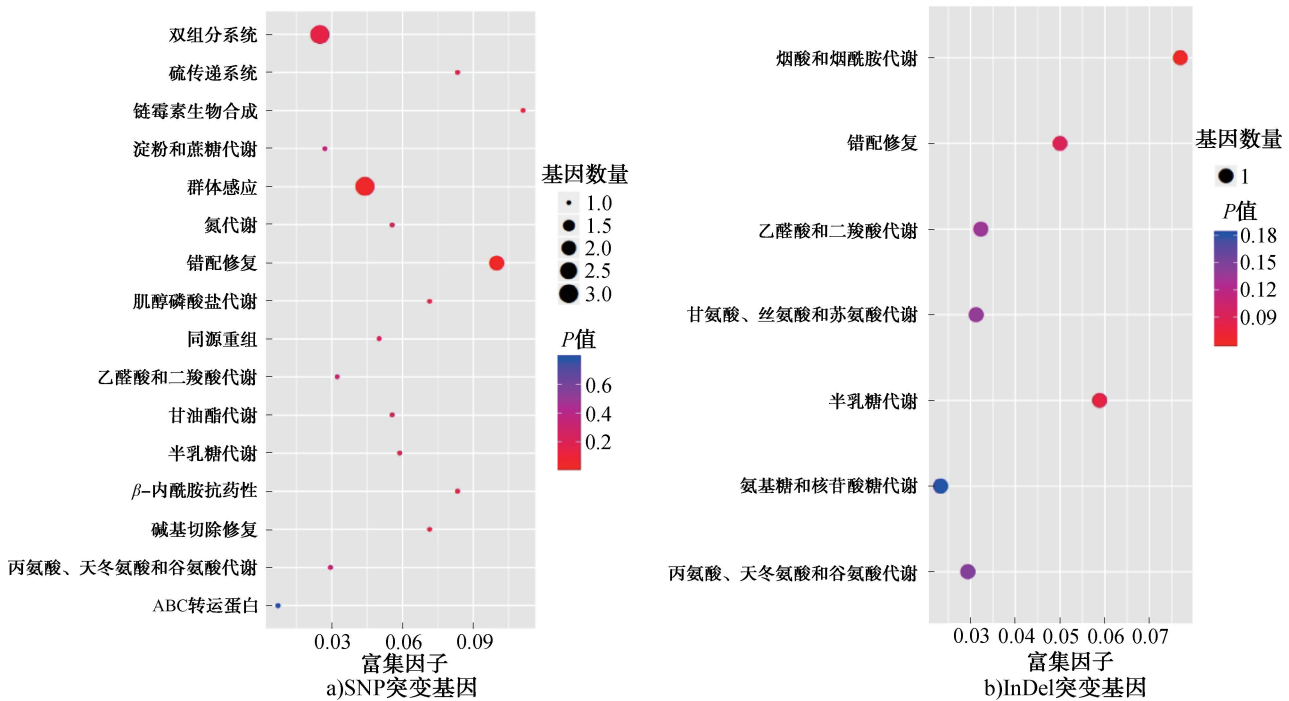


图 2 进化菌株突变基因在 KEGG 通路富集分析结果

Fig. 2 KEGG pathway enrichment analysis of mutant genes in evolutionary strains

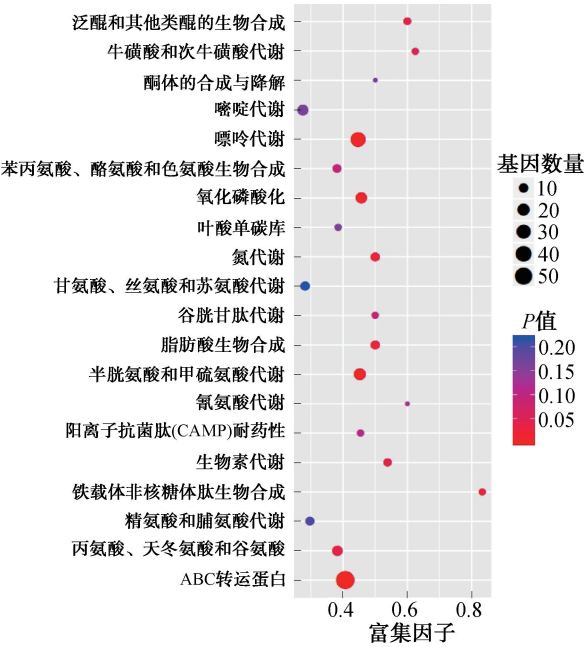


图3 进化菌株差异表达基因的KEGG通路富集分析结果

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis of differential expression gene in evolutionary strains

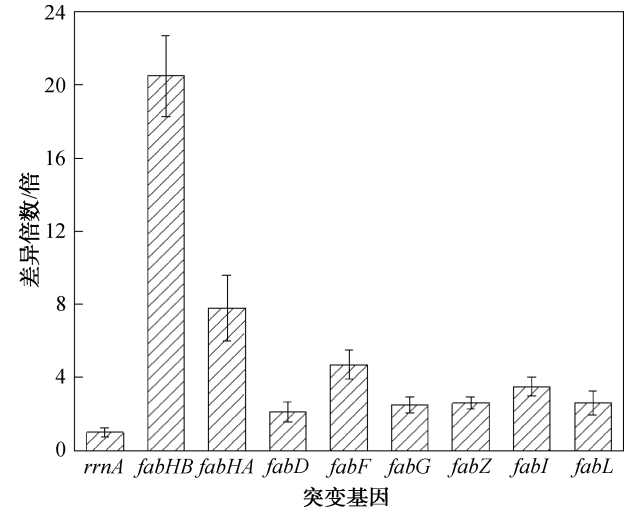


图4 脂肪酸合成代谢途径相关基因的qRT-PCR结果

Fig. 4 qRT-PCR results of genes related to fatty acid synthesis and metabolism pathways

利用^[38]。M. González-Villanueva 等^[39]对高耐受粗甘油突变体进行转录组测序,发现进化菌株甘油(酯)代谢途径的相关基因表达同样大幅上调;涉及长链酯酰 CoA 合成的基因大部分上调,脂肪酸合成途径显著增强;生物素合成相关基因 *bioI*、*bioF*、*bioA*、*bioD*、*bioB*、*birA* 均明显上调,而生物素是诸多

羧化酶辅酶,有利于脂肪酸合成和脂肪酸碳链延长;此外,*natA*、*natB* 基因表达增强(编码 Na^+ ABC 外排转运蛋白),可以有效提升 Na^+ 和 H^+ 转运,具有稳定细胞渗透压和 pH 值的作用,还与细胞对有机醇的毒性耐受有关^[40-41]。这表明进化菌株的甘油利用、甘油酯和脂肪酸合成增强,脂肪酸饱和度增加,有利于维持细胞膜的完整性和稳定性,且可降低粗甘油中脂肪酸盐、醇等成分对细胞渗透压的影响,维持细胞正常代谢和生长^[42-44]。

嘌呤和嘧啶代谢途径相关基因(*pur*、*guaB*、*guaA* 等)表达上调,这不仅能促进碱基合成,有利于细胞复制与生长,还为能量代谢提供了 FMN/FAD 等前体物^[45]; *ansZ*、*ansA*、*pyrB* 基因表达上调,可将天冬酰胺转化为天冬氨酸,进一步促进嘧啶代谢。氧化磷酸化通路(*ndh*、*yumB*、*yutJ*),细胞色素 c 还原酶(*qcrB*、*qcrC*)、氧化酶(*qoxB*、*qoxA*、*cta* 等)和 ATP 酶(*atpA*、*atpD* 等)均表达上调,表明进化菌株氧化磷酸化通路活跃,可以合成更多 ATP 用于细胞代谢;TCA 循环(*citA*、*citB*、*icd*、*SucCD*)表达上调,其中乙酰 CoA 合成大幅增加(*pdhC*、*pdhD*),可产生更多的 NADH、 FADH_2 和 GTP,为合成代谢提供足够碳骨架和能量;戊糖磷酸途径 *gntZ* 基因表达上调,能产生更多 NADPH,满足菌体因快速生长而对还原力的需求。K. Kawai^[21]对粗甘油耐受菌株进行转录组测序,同样发现 TCA 循环和氧化磷酸化相关基因表达上调,有利于菌株生长速率提高。

进化菌株氨基酸代谢活跃,有利于满足细胞快速生长对氨基酸的需求。氮代谢相关基因(*nas*、*glnA*、*gudB*、*rocG*)表达上调,能强化细胞对无机氮的吸收,满足氨基酸合成需求;半胱氨酸和甲硫氨酸代谢相关基因(*metK*、*yclM*、*dapG*、*lysC* 等)表达上调,其中甲硫氨酸不仅参与蛋白质合成,还参与 SAM 循环,为胞内生化反应提供甲基供体。谷氨酸脱氢酶表达上调,使谷氨酸合成能力增强,并进一步促进谷胱甘肽的合成;还可消除氧化应激产生的自由基,减少脂质过氧化,保护细胞膜完整性^[46]。

2.4 细胞膜脂肪酸质量浓度差异分析

转录组测序结果表明,进化菌株脂肪酸和生物素合成能力均显著增强,推测其脂肪酸质量浓度和

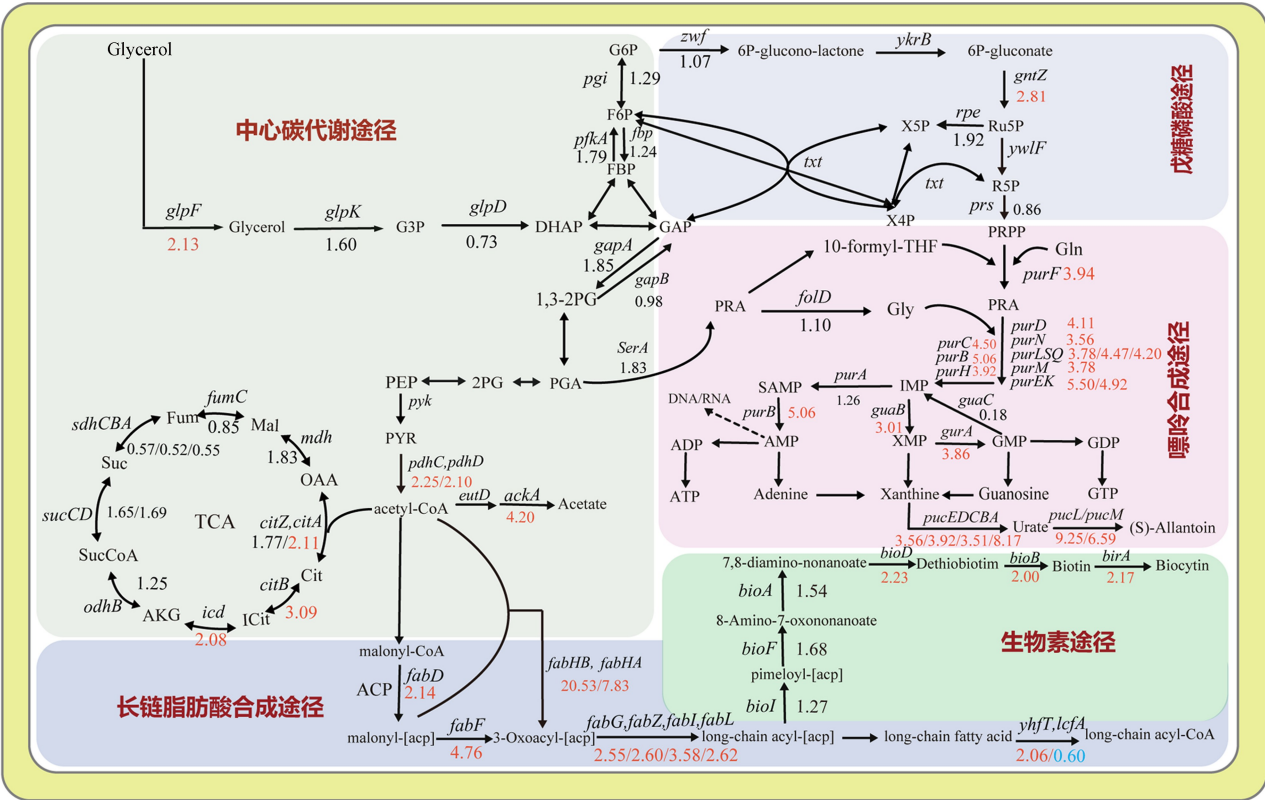


图 5 进化菌株关键代谢途径的基因表达水平分析结果

Fig. 5 Analysis results of the expression profiles of genes in key metabolic pathways

种类与出发菌株有显著差异。菌株细胞膜脂肪酸组成对比结果如图 6 所示,其中 1 为 12-甲基十三烷酸甲酯,2 为肉豆蔻酸甲酯,3 为 13-甲基十四烷酸甲酯,4 为 12-甲基肉豆蔻酸甲酯,5 为十五烷酸甲酯,6 为 14-甲基十五烷酸甲酯,7 为十六烷酸甲酯,8 为 17-十八碳烯酸甲酯,9 为硬脂酸甲酯;***表示差异极显著($P<0.001$),下同。由图 6 可知,进化菌株细胞膜中检测到 9 种组分,而出发菌株细胞膜中仅检测出 3 种组分,即进化菌株细胞膜的脂肪酸质量浓度和种类远高于出发菌株。这表明当细胞受到高浓度盐、醇类成分胁迫时,会合成更多脂肪酸来应对环境的不利影响。通过对细胞膜中脂肪酸的种类和质量浓度差异进行系统分析,推测粗甘油耐受的分子机制可能符合均质黏性适应机制(Homeoviscous Adaptation)^[47]。该机制认为细胞膜脂肪酸质量浓度增加,且长链饱和脂肪酸占多数,可以增加范德华相互作用力和疏水区表面积,降低膜疏水区极性,恢复细胞膜渗透功能;同时,长链脂肪酸还可增加疏水区厚度,减少粗甘油中的醇类(甲醇)、脂肪酸(酯)类化合物等毒性化合物的进

入。脂肪酸饱和度的增加能使磷脂双分子层更加稳固,细胞膜流动性更稳定,为细胞提供稳定内环境,使胞内生化反应有序进行,提升进化菌株对粗甘油的耐受能力^[48-49]。

2.5 芽孢生成率差异分析

进化菌株的 *cotN*、*sqhC* 基因均发生了基因突变,表达水平分别下调 1.155 和 1.173,推测进化菌株的芽孢形成与出发菌株存在一定差异。菌株芽

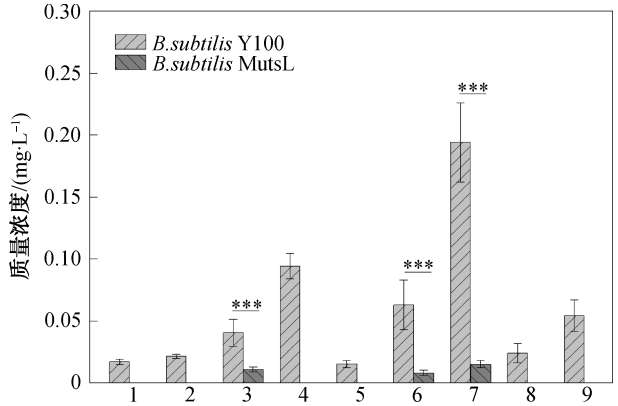


图 6 菌株细胞膜脂肪酸组成对比结果

Fig. 6 Comparative analysis of fatty acid composition in the cell membranes of the strains

孢生长情况及芽孢生成率如图 7 所示,其中 a 和 b 为出发菌株稳定前期和稳定中期菌落生长情况,d 和 e 为进化菌株稳定前期和稳定中期菌落生长情况,c 和 f 为出发菌株和进化菌株稳定前期芽孢染色镜检图;** 表示差异非常显著($P<0.01$)。由图 7 可知,进化菌株与出发菌株在芽孢生成上存在显著差异,进化菌株在稳定初期不能形成芽孢^[50];在稳定中期,进化菌株的芽孢生成率比出发菌株降低了 38.0%;而在稳定后期,进化菌株的芽孢生成率比出发菌株降低了 52.3%。芽孢生成能力部分丢失,磷酸化消耗 ATP 减少,利于节约能量用于细胞生长。此外,芽孢形成受 Spo0A 转录调节因子的磷酸化控制,磷酸化 Spo0A 达到一定阈值后芽孢才开始形成^[51],而胞内甘油浓度在一定程度上也会抑制磷酸化 Spo0A 的累积。因此,突变基因和表达水平差异,以及进化菌株胞内甘油质量浓度的增加,可能

共同导致了芽孢的延迟形成^[52],这表明进化菌株选择了耐受性增强的进化策略,而不是形成芽孢来消极应对不利的生长环境。

3 结论

本研究选取适应性进化枯草芽孢杆菌为研究对象,采用全基因组和转录组测序技术,初步解析了枯草芽孢杆菌对粗甘油的耐受机制,得到如下结论:进化菌株包含 23 个潜在突变基因,这些突变基因与 ABC 转运系统、烟酸和烟酰胺代谢、群体感应、芽孢生成等代谢途径高度相关。进化菌株在甘油(酯)代谢途径、TCA 循环、嘌呤代谢途径、ABC 转运系统、能量代谢等途径的基因表达大幅上调,特别是脂肪酸和生物素合成相关基因的表达水平显著增强。进化菌株细胞膜的脂肪酸种类和质量浓度均显著增加,磷脂双分子层更加稳固,耐受甲醇等毒性物质的能力增强。并且,进化菌株与出发菌株在芽孢生成上存在显著差异,进化菌株丢失了部分芽孢生成能力,减少了能量消耗,有利于菌体生长。尽管本文已对进化菌株的突变基因进行了初步分析,但后续研究仍需进一步筛选正向突变基因并深入分析基因型-表型关联。

参考文献:

[1] 姜莉莉,朱宝伟,李昌丽,等. 微生物转化粗甘油制备高附加值产品的研究进展[J]. 生物质化学工程, 2021,55(5):60-66.

[2] SAHOO S T,SINKU A,DAW P. A catalytic approach for the dehydrogenative upgradation of crude glycerol to lactate and hydrogen generation [J]. RSC Advances, 2024,14(50):37082-37086.

[3] GÓRSKA K, GARNCAREK Z. High-yield production of dihydroxyacetone from crude glycerol in fed-batch cultures of *Gluconobacter oxydans*[J]. Molecules,2024,29(12):2932.

[4] WANG H, LI H P, LEE C K, et al. Lipase-catalyzed solvent-free synthesis of monoglycerides from biodiesel-derived crude glycerol: Optimized using response surface methodology[J]. Heliyon,2024,10(10):e31292.

[5] KEOGH J,INRIRAI P,ARTIOLI N,et al. Nanostructured solid/liquid acid catalysts for glycerol esterification: The key to convert liability into assets [J]. Nanomaterials, 2024,14(7):615.

[6] MOKLIS M H,CHENG S,CROSS J S. Current and future

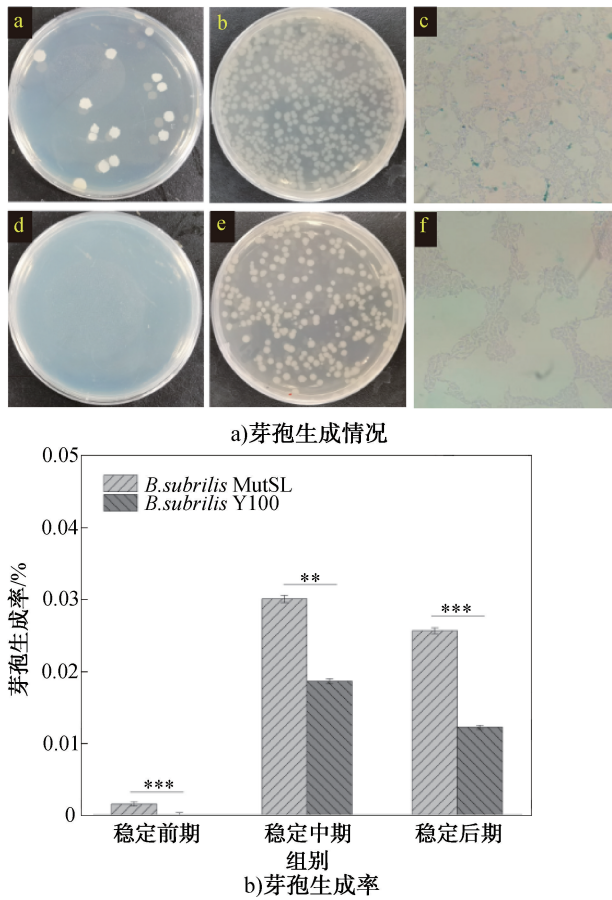


图 7 菌株芽孢生成情况及芽孢生成率
Fig. 7 Growth status of spores and spore formation rate for the strains

- trends for crude glycerol upgrading to high value-added products[J]. Sustainability, 2023, 15(4):2979.
- [7] HUR D H, LEE J, PARK S J, et al. Engineering of *Pseudomonas putida* to produce medium-chain-length polyhydroxyalkanoate from crude glycerol [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281:136411.
 - [8] JAIBOON K, CHOUWATAT P, NAPATHORN S C. Valorization of biodiesel-derived crude glycerol for simultaneous biosynthesis of biodegradable polyhydroxybutyrate and exopolysaccharide by the newly isolated *Burkholderia* sp. SCN-KJ [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281:136556.
 - [9] BIANCHI G, PESSINA A, AMI D, et al. Sustainable production of a biotechnologically relevant β -galactosidase in *Escherichia coli* cells using crude glycerol and cheese whey permeate [J]. Bioresource Technology, 2024, 406:1310630.
 - [10] DIKSHIT P K, KHARMAWLONG G J, MOHOLKAR V S. Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans* [J]. Bioresource Technology, 2018, 256:302–311.
 - [11] KAUR J, SARMA A K, JHA M K, et al. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues [J]. Biotechnology Reports, 2020, 27:e00487.
 - [12] ASOPA R P, BHOI R, SAHARAN V K. Valorization of glycerol into value-added products: A comprehensive review on biochemical route[J]. Bioresource Technology Reports, 2022, 20:101290.
 - [13] JO M H, JU J H, HEO S Y, et al. High production of enantiopure (R, R)-2, 3-butanediol from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* with an engineered oxidative pathway and a two-stage agitation strategy[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1):205.
 - [14] DISHISHA T, JAIN M, HATTI-KAUL R. High cell density sequential batch fermentation for enhanced propionic acid production from glucose and glycerol/glucose mixture using *Acidipropionibacterium acidipropionici* [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1):91.
 - [15] WANG X L, SUN Y Q, PAN D T, et al. Kinetics-based development of two-stage continuous fermentation of 1, 3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2024, 17(1):38.
 - [16] 李建, 孔婧, 李圣龙, 等. 适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(1):130–41.
 - [17] 张琰琨. 用于1,3-丙二醇生产的丁酸梭菌发酵代谢轮廓分析和适应性进化研究[D]. 厦门:厦门大学, 2019.
 - [18] 王世珍, 严正平, 邱隆辉, 等. 发酵粗甘油产乳酸的戊糖乳杆菌代谢进化[J]. 化工学报, 2015, 66(8):3195–3203.
 - [19] ZHANG C J, SHARMA S, MA C W, et al. Strain evolution and novel downstream processing with integrated catalysis enable highly efficient coproduction of 1, 3-propanediol and organic acid esters from crude glycerol [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(6):1450–1466.
 - [20] 孙大庆, 齐贺, 邱子清, 等. 嗜果聚糖 *Lactiplantibacillus plantarum* 19M03 的筛选及全基因组测序分析[J]. 食品科学, 2024, 45(23):113–122.
 - [21] KAWAI K, KANESAKI Y, YOSHIKAWA H, et al. Identification of metabolic engineering targets for improving glycerol assimilation ability of *Saccharomyces cerevisiae* based on adaptive laboratory evolution and transcriptome analysis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(2):162–169.
 - [22] JU J H, HEO S Y, CHOI S W, et al. Effective bioconversion of 1, 3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol using organic acid resistance-enhanced *Lactobacillus reuteri* JH83 [J]. Bioresource Technology, 2021, 337:125361.
 - [23] ZHOU D Y, HU F X, LIN J Z, et al. Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to D-/L-leucine[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(8):e00794.
 - [24] 黄申, 周利峰, 吕乔, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌的培养基优化及其在烟叶发酵中的初步应用研究[J]. 轻工学报, 2021, 36(3):36–44.
 - [25] 赵健淦, 付若晗, 王跃麟, 等. 不动杆菌 PSB-K 解磷促生能力研究及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1):199–218.
 - [26] WANG G L, SHI T, CHEN T, et al. Integrated whole-genome and transcriptome sequence analysis reveals the genetic characteristics of a riboflavin-overproducing *Bacillus subtilis* [J]. Metabolic Engineering, 2018, 48:138–149.
 - [27] 黄申, 闫茗熠, 陈梦月, 等. 基于转录组测序和 RT-qPCR 技术的烟草糖酯合成基因挖掘[J]. 轻工学报, 2023, 38(6):78–84, 117.
 - [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402–408.
 - [29] 张丽华, 刘世豪, 唐培鑫, 等. 杜仲叶多糖对植物乳杆菌 CICC 20022 胆盐耐受性的影响[J]. 轻工学报, 2024, 39(3):1–8.
 - [30] 张爱静, 李琳琼, 王鹏杰, 等. 热胁迫对大肠杆菌细胞膜和膜蛋白的影响[J]. 中国农业科学, 2020, 53(5):1046–1057.
 - [31] PADDER S A, PRASAD R, SHAH A H. Quorum sensing:

- A less known mode of communication among fungi[J]. Microbiological Research,2018,210:51–58.
- [32] LIN Z F, XIAO Y T, ZHANG L, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* 2e with high tolerance against crude glycerol impurities[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts,2023,16(1):175.
- [33] KIM B, OH S J, HWANG J H, et al. Polyhydroxybutyrate production from crude glycerol using a highly robust bacterial strain *Halomonas* sp. YLGW01[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2023,236:123997.
- [34] WADITEE-SIRISATTHA R, KAGEYAMA H. Novel NhaC Na⁺/H⁺ antiporter in *cyanobacteria* contributes to key molecular processes for salt tolerance[J]. Plant Molecular Biology,2024,114(6):111.
- [35] MONTES-BRAVO N, ROMERO-RODRÍGUEZ A, GARCÍA-YUNGE J, et al. Role of the spore coat proteins cotA and cotB, and the spore surface protein CDIF630_02480, on the surface distribution of exosporium proteins in *Clostridioides difficile* 630 Spores[J]. Microorganisms,2022,10(10):1918.
- [36] SMITA N, SASIKALA C, RAMANA C. New insights into peroxide toxicology: Sporulenes help *Bacillus subtilis* endospores from hydrogen peroxide[J]. Journal of Applied Microbiology,2023,134(11):lxad238.
- [37] 李雯静. 芽孢杆菌 SWB16 的 *yspP* 基因克隆及下游循环化酶基因 *sqhC* 缺失突变菌株的构建[D]. 重庆:西南大学,2013.
- [38] 王光路,张帆,周忆菲,等. 枯草芽孢杆菌甘油激酶编码基因定点突变提升甘油利用水平的研究[J]. 轻工学报,2020,35(6):1–8.
- [39] GONZÁLEZ-VILLANUEVA M, GALAIYA H, STANILAND P, et al. Adaptive laboratory evolution of *Cupriavidus necator* H16 for carbon co-utilization with glycerol[J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20(22):5737.
- [40] 曲俊泽,陈天华,姚明东,等. ABC 转运蛋白及其在合成生物学中的应用[J]. 生物工程学报,2020,36(9):1754–1766.
- [41] OGURA M, TSUKAHARA K, HAYASHI K, et al. The *Bacillus subtilis* NatK-NatR two-component system regulates expression of the *natAB* operon encoding an ABC transporter for sodium ion extrusion[J]. Microbiology,2007,153:667–675.
- [42] SAMUL D, LEJA K, GRAJEK W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production[J]. Annals of Microbiology,2014,64(3):891–898.
- [43] 蒋欢,马江山,曾柏全,等. 粗甘油发酵生产 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 生物技术通报,2022,38(10):45–53.
- [44] KUMAR L R, YELLAPU S K, TYAGI R D, et al. A review on variation in crude glycerol composition, biovalorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production[J]. Bioresource Technology,2019,293:122155.
- [45] 王永成,陈涛,石婷,等. 嘌呤核苷及其衍生物的代谢工程[J]. 中国生物工程杂志,2015,35(5):87–95.
- [46] HUANG D, WANG R, DU W J, et al. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol[J]. Bioresource Technology,2015,196:263–272.
- [47] ERNST R, EJSING S C, ANTONNY B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids[J]. Journal of Molecular Biology,2016,428(24):4776–4791.
- [48] 郑昀昀,陈茂娇,王敏,等. 甲苯胁迫下有机溶剂耐受菌 *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanesis* E13^T 膜脂脂肪酸的变化[J]. 微生物学报,2015,55(6):719–724.
- [49] 成永新. 基于细胞膜脂组成分析的简单节杆菌乙醇耐受机制研究[D]. 天津:天津科技大学,2013.
- [50] SMITA N, ANUSHA R, INDU B, et al. In silico analysis of sporulene biosynthesis pathway genes in the members of the class *Bacilli*[J]. Archives of Microbiology,2023,205(6):233.
- [51] 张东春,张雅娟,孙颖,等. 细菌芽孢的形成、萌发及控制手段研究进展[J]. 食品工业科技,2023,44(15):463–473.
- [52] UPDEGROVE T B, DELERUE T, ANANTHARAMAN V, et al. Altruistic feeding and cell-cell signaling during bacterial differentiation actively enhance phenotypic heterogeneity[J]. Science Advances,2024,10(42):eadq0791.

Investigation into the molecular mechanism of a *Bacillus subtilis* strain exhibiting high tolerance to crude glycerol

JIA Chenyang¹, ZHANG Fan¹, LIU Lanxi², WANG Guanglu¹, YANG Xuepeng¹

1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Jinggangshan Cigarette Factory, China Tobacco Jiangxi Industry Co., Ltd., Ji'an 343100, China

Abstract: The *Bacillus subtilis* strain with high tolerance to crude glycerol was selected as the research subject, and its tolerance mechanism to high-concentration crude glycerol was investigated using whole genome and transcriptome

sequencing technologies. The results showed that 23 mutantgenes were identified in the evolved strain, involving key pathways such as the ABC transport system, nicotinic acid and nicotinamide metabolism, quorum sensing, and spore formation. Compared to the parent strain, the evolved strain exhibited significantly upregulated gene expression in pathways related to glycerol (ester) metabolism, the tricarboxylic acid cycle, purine metabolism, the ABC transport system, and energy metabolism. The synthesis metabolism of fatty acids and biotin of the evolved strainwere markedly enhanced. Furthermore, the evolved strain partially lost its spore-forming capacity, with spore formation rates decreasing by 38.0% and 52.3% during the stable middle and late stages, respectively. Additionally, six new components were detected in the cell membrane, along with a significant increase in both the types and concentration of fatty acids, thereby enhancing the stability of the phospholipid bilayer. This enhancement was the critical factor contributing to the strain’s high tolerance to crude glycerol and its rapid growth.

Key words:*Bacillus subtilis*; crude glycerol tolerance; analysis of molecular mechanisms; whole genome sequencing; RNA-sequencing

[责任编辑:杨晓娟 申慧珊]

(上接第 43 页)

foodborne pathogenic bacteria. Their derivatives, lysin and holin, can degrade the peptidoglycan of bacteria, leading to bacterial cell lysis and the release of progeny bacteriophages. The combination of bacteriophages and antibiotics can produce a synergistic effect and improve the effect of prevention and control of biofilms formed by foodborne pathogenic bacteria. Future research will integrate the One Health concept, investigate the cross-transmission mechanism of biofilms in the “human-animal-environment” system from the fields of medicine, food, and environment, optimize the combination conditions of bacteriophages and antibiotics, and enhance the effect of multi-strategy synergistic prevention and control to better ensure food quality and safety.

Key words:foodborne pathogenic bacteria; biofilm; phage; biological control agent; antibiotic

[责任编辑:杨晓娟]