

基于代谢组学和转录组学探究不同通风比对地衣芽孢杆菌发酵产 γ -聚谷氨酸的影响

贾巧帅¹, 王彬旭¹, 王慧超¹, 乔长晟^{1,2,3,4,*}, 赵廷彬⁴, 郑国保⁵

(1.天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2.天津科技大学 生物基纤维材料全国重点实验室, 天津 300457; 3.天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心, 天津 300457; 4.天津慧智百川生物工程有限公司, 天津 300457; 5.宁夏农林科学院农业生物技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘要:为探究不同通风比对微生物发酵产 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)的影响,以地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) BYBC1.21056为出发菌株,结合代谢组学与转录组学分析不同通风比(1.0:0.7、1.0:1.0、1.0:1.3、1.0:1.6、1.0:1.9)对菌株C1.21056胞内代谢与基因表达的影响。结果表明,高通风比(1.0:1.9)最利于 γ -PGA合成,产量可达105.54 g/L,表明通风是影响发酵的关键因素。代谢组分析结果表明,实验组和对照组在发酵24、48、72 h共鉴定出共有显著差异代谢物分别为916、1 164、1 081种,其中特有显著差异代谢物分别为293、563、412种。京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析结果表明,相比于对照组,实验组在发酵24、48、72 h时显著差异代谢物上调显著富集代谢通路为色氨酸代谢、核苷酸代谢、甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、烟酸和烟酰胺代谢等。转录组分析结果表明,24 h上调基因882个,下调基因1 025个;48 h上调基因373个,下调基因506个;72 h上调基因461个,下调基因394个。综上,提高通风比改变了地衣芽孢杆菌的基因表达,进而调控其代谢并影响 γ -PGA合成。

关键词: γ -聚谷氨酸;地衣芽孢杆菌;通风比;代谢组学;转录组学

Effects of Different Ventilation Ratios on γ -Polyglutamic Acid Production by *Bacillus licheniformis* Fermentation Based on Metabolomics and Transcriptomics

JIA Qiaoshuai¹, WANG Binxu¹, WANG Huichao¹, QIAO Changsheng^{1,2,3,4,*}, ZHAO Tingbin⁴, ZHENG Guobao⁵

(1. School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. State Key Laboratory of Bio-based Fiber Materials, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 3. Tianjin Engineering Center of Microbial Metabolism and Fermentation Process Control, Tianjin 300457 China; 4. Tianjin Huizhi Baichuan Bioengineering Co. Ltd., Tianjin 300457, China; 5. Agricultural Biotechnology Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China)

Abstract: To investigate the effects of different ventilation ratios on γ -polyglutamic acid (PGA) production by microbial fermentation, using *Bacillus licheniformis* BYBC1.21056 as the starting strain, the effects of different ventilation ratios (1.0:0.7, 1.0:1.0, 1.0:1.3, 1.0:1.6, 1.0:1.9) on intracellular metabolism and gene expression of strain BYBC1.21056 were analyzed by combining metabolomics and transcriptomics. The results showed that the high ventilation ratio (1.0:1.9) most favored γ -PGA synthesis, achieving a yield of 105.54 g/L, demonstrating that ventilation was a key factor influencing fermentation. Metabolomic analysis results showed that a total of 916, 1 164, and 1 081 significantly different metabolites were identified between the experimental group and the control group, respectively, after fermentation 24, 48 and 72 h. Among them, the unique significantly different metabolites were 293, 563 and 412, respectively. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis results indicated that, compared with the control group, the significantly upregulated metabolic pathways for significantly different metabolites were tryptophan metabolism, nucleotide metabolism, glycerophospholipid metabolism, purine metabolism, nicotinic acid and nicotinamide metabolism, etc. in the experimental group after fermentation 24, 48, and 72 h. Transcriptome analysis results revealed that there were 882 upregulated genes and

收稿日期: 2025-11-21

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2022BEG02006); 吉林省科技发展计划项目(20250204039YY)

第一作者简介: 贾巧帅(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: jqsxz66@163.com

*通信作者简介: 乔长晟(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: qiaochangsheng@163.com

1 025 downregulated genes at 24 h, 373 upregulated genes and 506 downregulated genes at 48 h, and 461 upregulated genes and 394 downregulated genes at 72 h. The results showed that increasing the ventilation ratio altered gene expression in *B. licheniformis*, thereby regulating its metabolism and affecting γ -PGA synthesis.

Keywords: γ -polyglutamic acid; *Bacillus licheniformis*; ventilation ratio; metabolomics; transcriptomics

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.04.007

中图分类号: TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 0254-5071 (2026) 04-0046-08

引文格式:

贾巧帅, 王彬旭, 王慧超, 等. 基于代谢组学和转录组学探究不同通风比对地衣芽孢杆菌发酵产 γ -聚谷氨酸的影响[J].

中国酿造, 2026, 45(4): 46-53. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.04.007. <https://www.chinabrewing.net.cn>

JIA Qiaoshuai, WANG Binxu, WANG Huichao, et al. Effects of different ventilation ratios on γ -polyglutamic acid production by *Bacillus licheniformis* fermentation based on metabolomics and transcriptomics[J]. China Brewing, 2026, 45(4): 46-53. (in Chinese with English abstract) DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.04.007. <https://www.chinabrewing.net.cn>

γ -聚谷氨酸 (γ -polyglutamic acid, γ -PGA) 是由 L-谷氨酸和 D-谷氨酸单体通过 γ -羧基与相邻谷氨酸单体的 α -氨基缩合而成的高分子聚合物^[1], 作为一种生物基高分子材料, γ -PGA 具有良好的生物相容性、生物可降解性、非免疫原性等特点, 且对各种生物均没有毒副作用^[2-3]。 γ -PGA 的分子质量一般在 10~1 000 kDa 之间, 一般由 500~5 000 个谷氨酸单体组成^[4-5]。 γ -PGA 最早在炭疽芽孢杆菌荚膜中发现^[6], 目前, γ -PGA 的生产方法主要包括提取法、化学合成法、酶合成法和微生物发酵法。其中, 微生物发酵法因其条件温和、底物来源广泛且适用于规模化生产, 已成为工业上合成 γ -PGA 主流策略。该方法通常利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 等芽孢杆菌属的菌株, 以简单的原材料为底物, 高效合成 γ -PGA^[7]。因其卓越的吸水与螯合能力、生物降解性及生物相容性等功能特性, 在食品、农业、废水处理、化妆品和生物医学等领域有着广泛的应用^[8-10]。

常见的 γ -PGA 高产菌株多为好氧菌。溶氧对菌种发酵有着重要的影响, 它直接影响微生物的菌体形态、酶的活性、代谢途径及产物产量^[11]。在好氧菌发酵过程中提高溶氧浓度可有助于菌体生长和目标产物的合成^[12]。杨华等^[13]采用间歇-溶氧耦合策略成功提高杆菌肽补料发酵的效率, 糖对杆菌肽的转化率比间歇-罐压控制策略提高 22.70%。冯玉枚等^[14]通过添加氧载体增加溶氧以提高 γ -PGA 发酵产量, γ -PGA 产量达到最高值, 为 (18.62 ± 0.84) mg/mL, 相比对照组提高了 30.00% 以上。万玉军等^[12]研究发现, 在发酵过程中对转速、风量进行联动控制, γ -PGA 产量由未优化控制条件前的 8.90 g/L 提高至 21.60 g/L。

γ -PGA 在发酵过程中的积累会引起发酵液黏度增加与传质效率降低, 在发酵中常通过调节搅拌转速与通风比以控制溶氧^[15], 以寻找 γ -PGA 发酵的最佳工艺条件。在一定范围内, 转速越高, 发酵液中的溶氧越高, γ -PGA 产量越高, 但同时剪切力也越高, 造成 γ -PGA 大分子链的断裂^[16], 影响产品质量。这一矛盾凸显了优化通风策略的重要性。因此, 研究通风比调控对 γ -PGA 发酵过程的影响, 对于优化发酵工艺、提高 γ -PGA 产量具有重要意义。

本研究以地衣芽孢杆菌 BYBC1.21056 为出发菌株, 结合代谢组学与转录组学, 分析不同通风比 (1.0:0.7、1.0:1.0、1.0:1.3、1.0:1.6、1.0:1.9) 对菌株 C1.21056 胞内代谢与基因表达的影响。旨在通过对比发酵参数并结合多组学技术分析胞内代谢物差异, 阐明通风比影响 γ -PGA 合成的代谢调控机制, 从而为高效、可控的 γ -PGA 发酵提供理论参考与实践指导。

1 材料与方法

1.1 菌株、材料与试剂

地衣芽孢杆菌 BYBC1.21056 天津慧智百川生物工程有限公司。

葡萄糖 (分析纯)、酵母浸膏、酵母浸粉、胰蛋白胍、琼脂粉、蛋白胍 (均为生化试剂) 北京奥博星生物技术有限责任公司; 磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸铵、无水硫酸钠、氯化钠、硫酸镁、硫酸亚铁、无水乙醇 (均为分析纯) 天津盛腾达化学试剂有限公司; 浓缩玉米浆 (生化试剂) 山东新谱生物科技有限公司。

LB 固体斜面培养基: NaCl 10 g/L, 胰蛋白胍 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, 琼脂 2%。调初始 pH 7.2~7.3。121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基: 葡萄糖30 g/L (单独灭菌), 酵母膏7 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, 初始pH 7.2 ± 0.1 。121 °C 灭菌20 min。

发酵培养基^[17]: 玉米浆30 g/L, 酵母膏4 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.78 g/L, 味精80 g/L (单独灭菌), 初始pH 7.2 ± 0.1 。121 °C 灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

SKY-2102恒温摇床 上海苏坤实业有限公司; 20A 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪 日本岛津公司; 1290-6470液相色谱-质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 仪 安捷伦科技 (中国) 有限公司; TDL-5-A高速离心机 上海安亭科学仪器厂; GRJB-5D 5 L发酵罐 镇江格瑞生物工程有限公司; SBA-40E生物传感仪 山东省科学院生物研究所; P4 紫外-可见分光光度计 上海美普达仪器有限公司; NDJ-8S黏度计 上海衡平仪器仪表厂。

1.3 方法

1.3.1 种子液及发酵液制备

在无菌环境中, 将一环斜面培养基上的地衣芽孢杆菌BYBC1.21056菌种接种到种子培养基中, 于初始pH 7.2 ± 0.1 , 装液量100 mL/250 mL, 转速220 r/min, 37 °C 条件下恒温培养10~12 h, 即得种子液。

摇瓶发酵培养: 取5 mL种子液至发酵培养基中, 于初始pH 6.8 ± 0.1 , 装液量50 mL/250 mL, 转速220 r/min, 37 °C 条件下恒温培养72 h, 即得摇瓶培养发酵液。

5 L发酵罐发酵培养: 设置装液量60%, 接种量10%, 搅拌转速700 r/min, 初始pH值为 6.8 ± 0.1 (初始pH值通过6 mol/L NaOH调控, 发酵过程中pH值通过6 mol/L H_2SO_4 调控), 发酵罐压力0.02~0.03 MPa, 37 °C恒温培养96 h, 即得发酵罐培养发酵液。

1.3.2 不同通风比对菌株BYBC1.21056发酵产 γ -PGA的影响

发酵生产中, 一般以通风比表示空气流量, 通常以1 min内通过单位体积培养液的气体体积表示。在5 L发酵罐发酵培养条件下, 考察不同通风比 (1.0:0.7、1.0:1.0、1.0:1.3、1.0:1.6、1.0:1.9) 对地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵产 γ -PGA的影响。

1.3.3 分析检测

γ -PGA产量: 采用HPLC法^[17]测定。首先取1 mL样品溶液至50 mL容量瓶中, 纯净水定容, 然后经0.22 μ m微孔滤膜过滤, 进行HPLC检测 γ -PGA含量; HPLC条件: Shodx SB-800 HQ凝胶渗透色谱柱 (8.0 mm $\times$ 300 mm, 13 μ m), 0.05 mol/L无水硫酸钠缓冲液洗脱, 流速0.5 mL/min, 检测波长210 nm, 柱温30 °C, 进样体积20 μ L。

菌体生物量测定^[17]: 取1 mL发酵液至25 mL容量瓶, 定容后以蒸馏水作为空白对照, 于660 nm波长处测定光密度值 ($OD_{660\text{ nm}}$ 值), 稀释倍数为25, 用 $OD_{660\text{ nm}}$ 值表示菌体生物量。

pH值: 采用pH计测定; 黏度: 采用黏度计测定。

1.3.4 代谢组学分析

菌体胞内代谢物: 采用LC-MS法^[18]测定。

样品预处理: 以通风比1.0:1.0为对照, 1.0:1.9为实验组, 分别取对照组和实验组发酵前期 (24 h)、中期 (48 h)、后期 (72 h) 3个不同时间点发酵液20 mL, 将其分装到50 mL离心管中并用等量灭菌的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 稀释。4 °C、12 000 r/min 条件下离心30 min, 弃去上清液, 在离心管中加入4 mL PBS, 重悬菌体, 重复2~3次, 液氮猝灭30 min后放入-80 °C冰箱保存。

LC条件: ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相A 5%乙腈+95%水 (含0.1%甲酸), 流动相B 47.5%异丙醇+47.5%乙腈+5%水 (含0.1%甲酸), 柱温40 °C, 进样量3 μ L。

MS条件: 电喷雾电离, 电子能量70 eV, 分别采用正离子和负离子扫描模式获取MS信号。扫描范围: m/z 70~1 050; 加热温度425 °C; 柱温325 °C; 鞘气压力 (N_2) 50 arb; 辅助气压力 (N_2) 13 arb。

定性定量分析: 采用全扫描结合数据依赖二级扫描采集代谢物一级精确质量与二级碎片信息, 结合保留时间进行代谢物定性分析; 采用峰面积积分法进行相对定量分析。

1.3.5 显著差异代谢物筛选

在差异代谢物筛选中, 倍数变化 (fold change, FC) > 1 或 $FC < -1$ 表明代谢物在实验组与对照组间存在明显差异 (包括显著上调与显著下调)。变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 用于表征代谢物的组间差异对模型样本分类判别的影响强度, 通常以 $VIP \geq 1$ 作为差异显著的判定标准。 P 值为代谢物在两组间差异的显著性水平, 一般认为 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。本研究依据 $FC > 1$ 、 $VIP \geq 1$ 及 $P < 0.05$ 筛选显著差异代谢物。

1.3.6 转录组学分析

将样品解冻, 使用TRIzol试剂盒从菌体中提取总RNA, 进行RNA-Seq转录组测序分析。提取总RNA, 对其进行质量检测, 通过Oligo (dT) 磁珠富集mRNA, 通过离子打断的方式将mRNA片段化, 以片段化的mRNA为模板, 合成cDNA, 采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增进行文库片段富集, 纯化PCR产物, 最终获得文库, 使用Agilent 2100生物分析仪

对文库质量进行检测,最后利用Illumina测序平台进行测序。

以 $P < 0.05$ 、 $|\text{FC}| > 2$ 为条件筛选差异表达基因。通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库对差异表达基因进行富集分析。

1.3.7 样本相关性分析

基于所有检测到的胞内代谢物标准化丰度数据计算各组内及组间样本的Pearson相关系数,并绘制相关性热图,以评估实验重复性与组间代谢差异程度。

1.4 数据统计分析

使用RSEM 1.3.3软件分别对实验组和对照组基因的表达水平进行定量分析,根据表达矩阵确定样本基因表达量并分析样本间的相关性,在此基础上进行差异表达基因分析,筛选不同样品间的差异基因并完成基因功能注释。利用KEGG数据库对差异基因的代谢通路及相关功能信息进行分类富集分析。

2 结果与分析

2.1 不同通风比对菌株BYBC1.21056发酵产 γ -PGA的影响

由图1a可知, γ -PGA的产量并非随通风比线性变化,而是呈现显著的先降后升的趋势。当通风比为1.0:1.0时,产量极低,仅为2.56 g/L;当提高通风比至1.0:1.9时,产量达到峰值(105.54 g/L),说明该最优通风比可能在保证充足溶氧的同时,最有效地促进了 γ -PGA的合成积累。相比之下,中间比例的通风比(1.0:0.7、1.0:1.3、1.0:1.6)虽能维持一定产量,但均未达到最佳状态。从 γ -PGA产量结果来看,最适通风比为1.0:1.9。由图1b可知,当通风比为1.0:1.0时,菌体在0~30 h的生长期生长最快、生物量积累最高;当通风比为1.0:1.9时,虽然前期生长较缓,但能持续积累生物量至后期,最终生物量与1.0:1.0组持平。通风比1.0:1.9通过充足供氧实现了代谢更稳健、生长更持久的发酵过程。从生物量结果来看,最适通风比为1.0:1.9。由图1c可知,在0~6 h,所有组别初始pH值因菌体快速生长产酸而普遍下降;24 h后pH值开始逐渐上升,其中通风比为1.0:1.9时pH值上升最快。从pH值结果来看,最适通风比为1.0:1.9。由图1d可知, γ -PGA的黏度随发酵时间延长呈现先上升后下降的趋势。其中通风比为1.0:1.0的黏度基本趋于平稳,结合图1a~c来看,在此条件下产量、生物量和pH值也出现异常,猜测是由于pH值异常导致菌体过度生长,产量异常。从黏度结果来看,最适通风比为1.0:1.9。

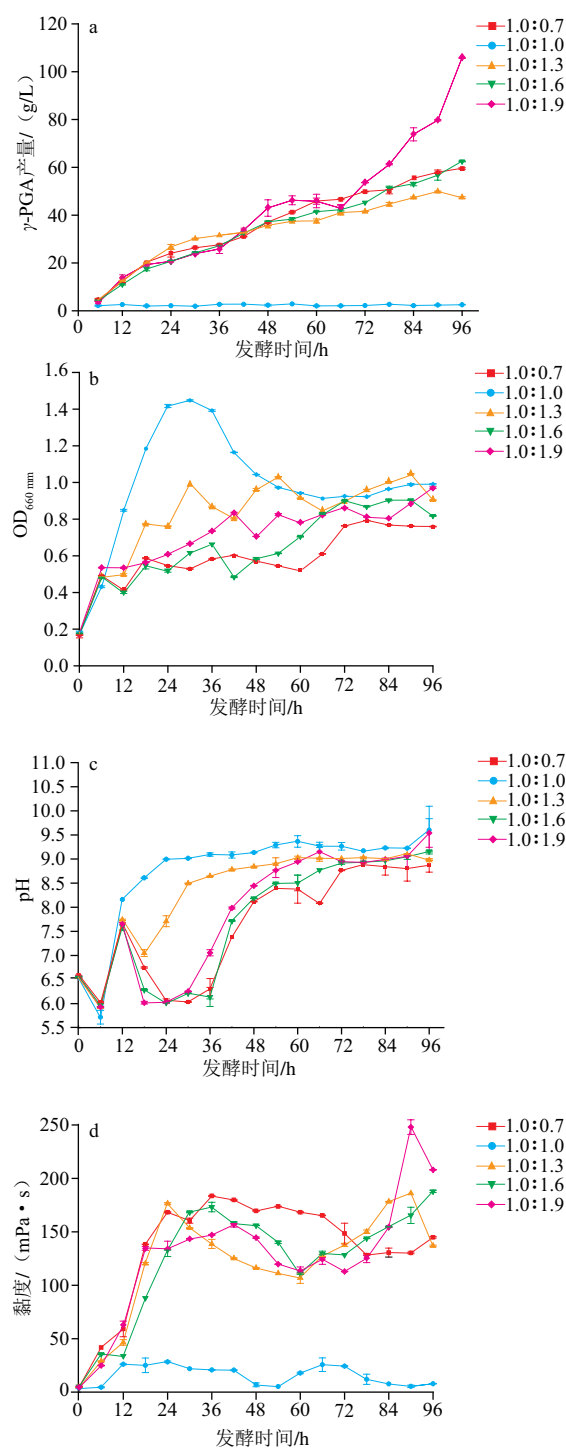


图1 不同通风比对地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵过程中 γ -PGA产量(a)、生物量(b)、初始pH值(c)及黏度(d)的影响

Fig. 1 Effects of different ventilation ratios on γ -polyglutamic acid yield (a), biomass (b), initial pH values (c), and viscosity (d) during fermentation process of *B. licheniformis* production

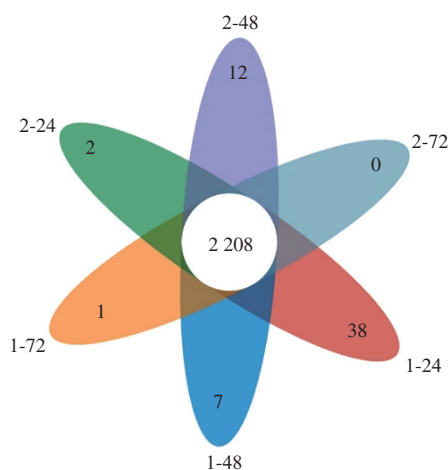
综上所述,精确控制通风比对于优化地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵过程的 γ -PGA产率至关重要。在5 L发酵罐阶段研究通风比对 γ -PGA发酵的影响时,低通风比

(1.0:0.7) 和高通风比 (1.0:1.9) 发酵结束时 γ -PGA产量差异明显, 相差102.98 g/L, 猜测通风比的改变导致 γ -PGA合成相关基因和代谢通路发生改变。

2.2 基于代谢组学探究不同通风比对菌株BYBC1.21056发酵产 γ -PGA的影响

2.2.1 不同通风比胞内代谢物差异分析

由图2可知, 在地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵合成 γ -PGA过程中, 对照组和实验组共检出2 208种共有胞内代谢物, 对照组发酵24、48、72 h样品中特有代谢物分别为38、7、1种, 共46种; 实验组发酵24、48、72 h样品中特有代谢物分别为2、12、0种, 共14种。说明改变通风比后, 地衣芽孢杆菌BYBC1.21056胞内代谢物发生改变。



1-24、1-48、1-72.分别表示对照组发酵24、48、72 h样品; 2-24、2-48、2-72.分别表示实验组发酵24、48、72 h样品。图3同。

图2 对照组和实验组菌株胞内代谢物数量LC-MS分析Venn图

Fig. 2 Venn diagram of numbers of intracellular metabolites in the bacterial cells of the control group and the experimental group by LC-MS analysis

对照组和实验组地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵24、48、72 h样品菌株胞内代谢物主成分分析结果 (principal component analysis, PCA) 见图3。

由图3a可知, 发酵24 h时, PCA模型PC1、PC2累计方差贡献率为91.70%; 由图3b可知, 发酵48 h时, PCA模型PC1、PC2累计方差贡献率为93.34%; 由图3c可知, 发酵72 h时, PCA模型PC1、PC2累计方差贡献率为90.80%。3个时间点的PCA模型累计方差贡献率均超过90%, 可有效代表样本的整体代谢变异信息, 模型拟合效果良好。另外, 重复实验样本之间相对靠拢, 而对照组和实验组样本明显较为分散, 说明组内差异较小, 平行度较好; 组间差异明显, 说明通风比的改变导致了胞内代谢物改变, 通过PCA可以有效区分不同发酵时间的对照组和实验组样品。

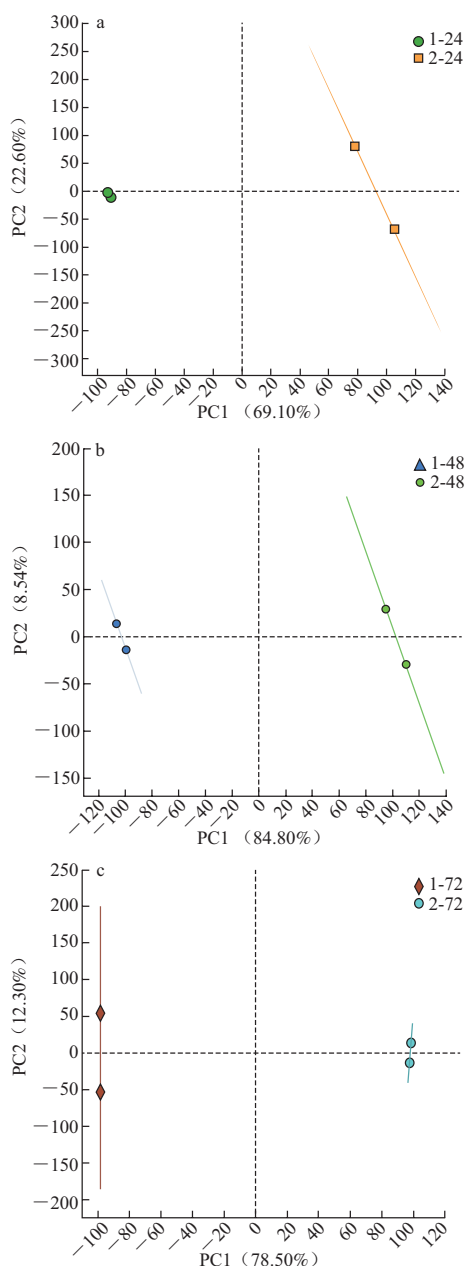


图3 对照组和实验组发酵24 (a)、48 (b)、72 h (c) 样品菌株胞内代谢物PCA得分图

Fig. 3 Principal component analysis score plots of intracellular metabolites in the bacterial cells of the control group and the experimental group samples after fermentation 24 (a), 48 (b), 72 h (c)

2.2.2 胞内主要显著差异代谢物变化

发酵24 h共有显著差异代谢物916种, 其中特有显著差异代谢物293种; 发酵48 h共有显著差异代谢物1 164种, 其中特有显著差异代谢物563种; 发酵72 h共有显著差异代谢物1 081种, 其中特有显著差异代谢物412种。

对照组和实验组地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵24、48、72 h菌株主要差异代谢物见表1。

表1 对照组和实验组发酵24、48、72 h样品中主要显著差异代谢物变化
Table 1 Changes of main significantly differential metabolites in the control group and the experimental group samples after fermentation 24、48、72 h

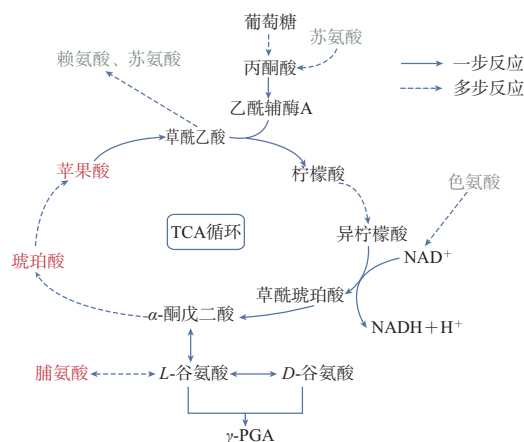
发酵时间/h	上升显著差异代谢物	下降显著差异代谢物
24	苯丙氨酸、棕榈酸、脯氨酸、琥珀酸、精氨酸琥珀酸、苹果酸、VB ₅ 、VB ₈ 、生物素	L-亮氨酸、L-色氨酸、苏氨酸
48	黄原酸、琥珀酸、VB ₈	VB ₅ 、生物素
72	棕榈酸、黄原酸、琥珀酸、苹果酸、精氨酸琥珀酸、肌苷、VB ₅	L-亮氨酸、L-色氨酸、苏氨酸、葡萄糖醛酸

由表1可知,在地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵前期(24 h)是菌体快速生长时期:苯丙氨酸、脯氨酸等氨基酸及棕榈酸的上升,有利于蛋白质与细胞膜的合成;而三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环中间物(琥珀酸、苹果酸)与辅酶(泛酸、生物素)的同步增加,代表中心碳代谢和能量代谢启动^[19],高效生成ATP与前体物质,为 γ -PGA的后续合成储备了充足的前体与能量^[20]。L-亮氨酸、L-色氨酸等必需氨基酸的下降,表明从菌体生长转向产物合成。在地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵中期(48 h),黄原酸、琥珀酸与肌醇含量上升,说明TCA仍在持续运作,以维持代谢稳态;肌醇作为生长因子促进细胞生长代谢^[21],有利于提高 γ -PGA产量。生物素,可以作为各种羧化酶和脱羧酶的辅因子,促进脂肪酸合成、葡萄糖分解等代谢途径,在菌体生长和代谢中发挥至关重要的作用^[22-23],同时也可同VB₅、VB₈一样作为生长因子促进菌体的生长代谢。在TCA循环中,生物素作为丙酮酸羧化酶的辅酶,生物素浓度低于亚适量浓度之前增加生物素含量有利于丙酮酸羧化产生草酰乙酸^[24],进而促进谷氨酸的合成。实验组生物素在发酵24 h时显著升高,在发酵48 h时显著下降,说明高通风比的实验组前期菌体快速生长,生物素也快速积累;在发酵48 h时下降,说明生物素被大量利用,用于促进TCA和产物合成。在地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵后期(72 h),琥珀酸、苹果酸、精氨酸琥珀酸再次呈现上升趋势,肌苷(参与ATP再生)的积累,为 γ -PGA合成提供动力。而L-亮氨酸、L-色氨酸等氨基酸的降低,与葡萄糖醛酸(作为多糖副产物前体)的显著下降,形成了鲜明对比。优化了碳源的利用效率,关闭或减弱了与 γ -PGA竞争前体的副代谢途径,促进了 γ -PGA的合成。

2.2.3 KEGG富集分析

由图4可知,相比于对照组,实验组在发酵24、48、72 h显著差异代谢物上调显著富集通路为色氨酸代谢、核苷酸代谢、甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、烟酸和烟酰胺代谢等。嘌呤是生物体内核苷酸合成的必需物质;核苷酸主要作为核酸和一些辅酶的合成原料,核苷酸代谢通路显著富集,说明实验组胞内基因表达和细胞生命活动更

为活跃;甘油磷脂在细胞中主要作为细胞膜骨架和储能物质^[25];烟酸是NAD和NADP的前体物质,这2种辅酶参与细胞能量代谢、DNA修复等多个生化反应,其次烟酸和烟酰胺是与VB₃密切相关的化合物,烟酸和烟酰胺代谢通路显著富集说明实验组NAD和NADP合成更多。这几种代谢通路的富集互相验证了实验组代谢活动相较于对照组更为活跃,同时也验证了实验组TCA中间产物的上升。



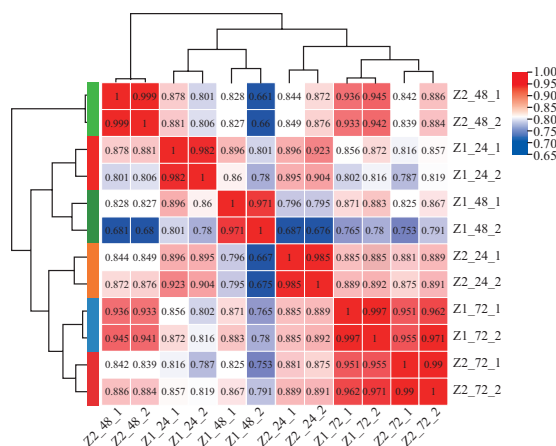
红色:上调;绿色:下调,图7同; NAD⁺:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide); NADH:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide)。

图4 显著差异代谢物对地衣芽孢杆菌BYBC1.21056代谢通路的影响

Fig. 4 Effects of significantly differential metabolites on metabolic pathways of *B. licheniformis* BYBC1.21056

2.3 基于转录组学探究不同通风比对菌株BYBC1.21056发酵产 γ -PGA的影响

2.3.1 相关性分析



Z1:对照组,通风比1.0:0.7; Z2:实验组,通风比1.0:1.9。

图5 对照组和实验组样本相关性分析热图

Fig. 5 Heatmap of correlation analysis of the control group and the experimental group samples

由图5可知,每组生物学重复样本间相关系数均大于0.98,说明实验平行性良好,实验设计较为合理。而同一时间点实验组和对照组之间相关系数均小于0.90,说明提

高通风比改变了地衣芽孢杆菌BYBC1.21056的基因表达情况,使实验组和对照组出现明显差异。

2.3.2 基因表达量差异统计

由图6可知,地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵24 h上调基因882个,下调基因1 025个;地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵48 h上调基因373个,下调基因506个;地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵72 h上调基因461个,下调基因394个,表明提高通风比对地衣芽孢杆菌BYBC1.21056基因表达有明显影响。

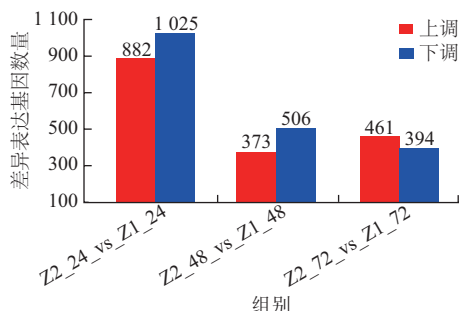


图6 发酵24、48、72 h对照组和实验组样品差异表达基因数量

Fig. 6 Number of differentially expressed genes in the control group and the experimental group samples after fermentation 24, 48, 72 h

由表2可知,通过KEGG富集分析地衣芽孢杆菌BYBC1.21056代谢途径,地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵24 h时,上调的差异表达基因代谢通路有吡啶代谢(*hemA*),苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸合成(*pheA*)、TCA(*pdhB*);下调的差异表达基因代谢通路有脂肪酸降解(*fadN*),缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸降解(*acdA_1*)。地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵48 h时上调的差异表达基因代谢通路有氧化磷酸化(*petC*)、色氨酸代谢(*amnC*);下调的差异基因代谢通路有丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢(*aspA_1*),硫代谢(*cysH_2*)。地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵72 h时上调的差异表达基因代谢通路有丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢(*aspA_2*),ABC转运蛋白(*lipO_3*),精氨酸、脯氨酸代谢(*speA_2*);下调的差异表达基因代谢通路有赖氨酸合成(*lysC*),半胱氨酸、蛋氨酸代谢(*yyrT*)。地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵24 h和48 h上调的差异表达基因代谢通路都有TCA,在发酵前期丙酮酸作为糖代谢的中间产物,进入线粒体氧化脱羧生成乙酰辅酶A,乙酰辅酶A进入TCA,从而实现糖酵解和TCA的整合^[26],并经过TCA产生ATP,TCA在前中期活跃,主要为细胞生长和产物合成积蓄能量。地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵48 h时,氧化磷酸化水平上调,色氨酸在一系列酶的作用下转化成NAD⁺,而TCA中异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶的作用下被氧化生成草酰琥珀酸,并生成H⁺,NAD⁺与此时生成的H⁺反应生成NADH,而

NADH又可以进一步氧化磷酸化生成ATP,除此之外,NADH⁺还可以作为苹果酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的辅酶进一步参与到TCA中。ABC转运蛋白相关基因表达量的提升有利于提高细胞膜的通透性^[27],加速 γ -PGA从胞内运往胞外,减少底物抑制带来的负面影响,从而促进 γ -PGA的合成。实验组ABC转运蛋白相关基因表达量从24 h时显著低于对照组($P<0.05$),发酵48 h时与对照组无显著差异($P>0.05$),发酵72 h时显著高于对照组($P<0.05$),说明实验组ABC转运蛋白相关基因表达量升高,表明实验组 γ -PGA的合成水平相对较高,需要不断合成ABC转运蛋白将 γ -PGA运往胞外。

表2 主要差异表达基因分析及其功能描述
Table 2 Analysis of major differentially expressed genes and their functional descriptions

发酵时间/h	基因	log ₂ FC	表达趋势	基因功能描述
24	<i>pheA</i>	1.67	上调	P-蛋白
	<i>hemC</i>	3.88	上调	吡啶原脱氢酶
	<i>hemA</i>	3.33	上调	谷氨酰-tRNA还原酶
	<i>pckA</i>	5.81	上调	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶
	<i>pdhB</i>	2.85	上调	丙酮酸脱氢酶E1组分 β 亚基
	<i>fadN</i>	-8.79	下调	3-羟酰辅酶A脱氢酶
	<i>acdA_1</i>	-6.65	下调	酰基-辅酶A脱氢酶
48	<i>petC</i>	2.16	上调	细胞色素b6-f复合体铁硫亚基
	<i>amnC</i>	1.47	上调	2-氨基戊二醛-6-半醛脱氢酶
	<i>pdhB</i>	1.94	上调	丙酮酸脱氢酶E1组分 β 亚基
	<i>cysH_2</i>	-1.73	下调	磷酸腺苷磷酸硫酸还原酶
	<i>aspA_1</i>	-2.16	下调	天冬氨酸氨裂解酶
72	<i>aspA_2</i>	1.99	上调	天冬氨酸氨裂解酶
	<i>lipO_3</i>	1.20	上调	脂蛋白LipO前体
	<i>speA2</i>	1.07	上调	精氨酸脱羧酶
	<i>lysC</i>	-1.48	下调	天冬氨酸激酶3
	<i>yyrT</i>	-3.07	下调	拟甲基转移酶YrrT

综上,实验组通风比的增加改变了地衣芽孢杆菌BYBC1.21056的基因表达水平,进而影响了菌种的代谢和 γ -PGA的合成。

2.4 代谢组学与转录组学关联分析

通过将代谢组学和转录组学进行整合分析,表明高通风比(1.0:1.9)通过多层次协同调控促进 γ -PGA的合成。在转录层面,由图7可知,高通风比(1.0:1.9)上调了TCA(*pdhB*)、氧化磷酸化(*petC*)及谷氨酸前体合成(*aspA_2*)等关键基因的表达,这一调控在代谢层面得到了相对应的表现,即琥珀酸、苹果酸等TCA循环中间产物和肌苷的积累,说明相比于对照组,实验组更多丙酮酸流向了TCA循环,同时TCA循环中间产物增多,TCA循环加强,可以为细胞生长代谢提供更多能量,有利于菌体生长和产物合成相关代谢水平的提升。同时,基因表达中与生长相关的氨基酸降解途径下调及代谢物中亮氨酸、色氨酸的持续消耗,共同证明了菌体细胞生长转向产物合成积累;发酵后期在转录组学中检测到实验

组ABC转运蛋白基因 (*lipO_3*) 表达提高, 而代谢组学也检测到ABC转运蛋白代谢水平提高, 有利于加速 γ -PGA从胞内运往胞外, 减少底物抑制带来的负面影响, 从而促进 γ -PGA的合成。

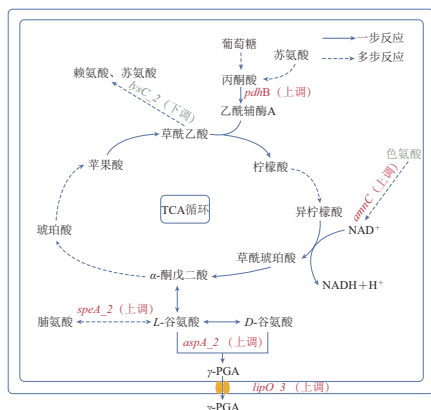


图7 主要差异表达基因对地衣芽孢杆菌 BYBC1.21056代谢通路的影响

Fig. 7 Effects of major differentially expressed genes on metabolic pathways of *B. licheniformis*

3 结论

本研究在5 L发酵罐体系中系统考察了不同通风比对地衣芽孢杆菌BYBC1.21056发酵产 γ -PGA的影响, 并结合代谢组学与转录组学联合分析, 从代谢与基因表达层面解析通风调控 γ -PGA合成的分子机制。发酵结果表明, 通风比为1.0:1.9时菌体生长稳定、代谢状态良好, γ -PGA产量最高, 为105.54 g/L, 证实通风比是调控菌株代谢流向与 γ -PGA合成效率的关键环境因素。胞内代谢组学分析显示, 高通风比(1.0:1.9)可显著改变菌株胞内代谢, 显著增强TCA循环、嘌呤代谢、烟酸与烟酰胺代谢、甘油磷脂代谢等关键通路, 促进TCA中间产物、能量辅因子及氨基酸前体物的积累, 为 γ -PGA合成提供充足的碳骨架与能量供给。转录组学分析表明, 高通风比(1.0:1.9)显著调控菌体基因表达, 差异基因主要富集于TCA、氧化磷酸化、氨基酸代谢及ABC转运蛋白及辅酶生物合成等通路。发酵前中期高通风比上调能量代谢相关基因, 提升菌体供能效率; 发酵后期增强ABC转运蛋白基因表达, 促进 γ -PGA胞外分泌, 减轻底物反馈抑制。本研究从多组学层面揭示了通风比调控地衣芽孢杆菌 BYBC1.21056合成 γ -PGA的分子作用机制, 为 γ -PGA发酵过程的工艺进一步放大与精准调控提供了坚实的理论依据和数据支持。

参考文献:

[1] ZHANG C, ZHONG C Q, WU D J. Study on the reuse process of hydrolysate from γ -polyglutamic acid fermentation residues[J]. Arabian J Chem, 2021, 14(5): 103145.

[2] WANG L M, CHEN S B, YU B. Poly- γ -glutamic acid: recent achievements, diverse applications and future perspectives[J]. Trends Food Sci Technol, 2022, 119: 1-12.

[3] LI M, ZHANG Z L, LI S W, et al. Study on the mechanism of production of γ -PGA and nattokinase in *Bacillus subtilis natto* based on RNA-seq analysis[J]. Microb Cell Fact, 2021, 20(1): 83.

[4] WANG G L, LIU Q, YANG Y M, et al. Applications and functions of γ -poly-glutamic acid and its derivatives in medicine[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2021, 22(11): 1404-1411.

[5] LI M, HE Y, MAX. Separation and quantitative detection of fermentation γ -polyglutamic acid[J]. J Future Foods, 2022, 2(1): 42-48.

[6] THAPA P, THAPA A, KHADKA S, et al. Screening and characterization of potent poly glutamic acid producing *Bacillus* sp. isolated from Kinema, water and soil samples[J]. Heliyon, 2021, 7(8): 7715.

[7] MOHANRAJ R, GNANAMANGAI B M, RAMESHK, et al. Optimized production of γ -poly glutamic acid (γ -PGA) using sago[J]. Biocatal Agr Biotechnol, 2019, 22: 101413.

[8] LI D F, HOU L Z, GAO Y X, et al. Recent advances in microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: a review[J]. Foods, 2022, 5(11): 739.

[9] 王慧, 何宜能, 张伟杰, 等. γ -聚谷氨酸在冷冻食品中的应用及其抗冻机理的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(5): 266-274.

[10] PARK S B, SUNG M H, UYAMA H, et al. Poly(glutamic acid): production, composites, and medical applications of the next-generation biopolymer[J]. Prog Polym Sci, 2021, 113: 101341.

[11] 张智, 滕婷婷, 王淼. 溶氧对发酵的影响及控制[J]. 科学咨询(决策管理), 2008(11): 63-64.

[12] 万玉军, 王刚, 李南臻, 等. 联动过程控制技术提高10 L发酵罐 γ -聚谷氨酸产量[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(5): 2191-2196.

[13] 杨华, 宋昭, 戴航, 等. 基于细胞碳-氮-氧需求的补料批发酵策略促进杆菌肽合成[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 30-36.

[14] 冯玉枚, 肖玲玲, 郭金玲, 等. 溶氧控制对木聚糖酶发酵过程影响的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 198-200; 215.

[15] 冯文心, 袁志怡, 常忠义, 等. 添加氧载体对 γ -多聚谷氨酸发酵的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 127-130; 142.

[16] 袁凯凯. 地衣芽孢杆菌CGMCC 3336产聚谷氨酸发酵工艺优化研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2021.

[17] 郭建敏, 郭利飞, 赵廷彬, 等. 地衣芽孢杆菌分批补料发酵 γ -聚谷氨酸[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(18): 191-198.

[18] 郭利飞. 谷氨酸非依赖型菌株生产聚谷氨酸工艺优化[D]. 天津: 天津科技大学, 2023.

[19] 胡梦蝶. 谷氨酸棒杆菌耐受吡喃酮和弱酸类抑制物质的分子机制[D]. 济宁: 曲阜师范大学, 2025.

[20] 顾子蕴, 唐永圣, 陈修来. 代谢工程改造酵母生产琥珀酸的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 467-488.

[21] 左方雨, 赵运英, 邓禹. 酿酒酵母肌醇转运蛋白突变体的构建及其在葡萄糖二酸合成中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 51(11): 4429-4450.

[22] 何红梅. 用于生物素标记蛋白富集与纯化的一种链霉菌亲和素突变体的制备与应用[D]. 重庆: 西南大学, 2023.

[23] 张皓博. 肠外致病性大肠杆菌毒力基因的筛选及*MprA*与*NhaA*对毒力的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.

[24] WILLIAM C S. Literature review of both classic and novel roles of biotin (vitamin B₇) in cellular processes[J]. J Nat Sci, 2020, 1(1): 45-51.

[25] 狄佳, 刘莎, 毛莎莎, 等. 高氧对幽门螺杆菌的清除作用及基于脂质组学的机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(2): 112-120.

[26] 李晓蝶, 潘诗琴, 闵婷玉, 等. 基于代谢组学的中兽药抗炎作用机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2025, 46(6): 110-118.

[27] 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.