

共培养体系中伴生菌(*Priestia endophytica*)促进普通产酮古洛糖酸菌生长和 2-酮基-L-古龙酸转化的作用机制

李娜¹, 徐慧², 杨伟超², 陈忠军¹, 孙子羽¹, 满都拉^{1*}

1 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特

2 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳

李娜, 徐慧, 杨伟超, 陈忠军, 孙子羽, 满都拉. 共培养体系中伴生菌(*Priestia endophytica*)促进普通产酮古洛糖酸菌生长和 2-酮基-L-古龙酸转化的作用机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2444-2461.

LI Na, XU Hui, YANG Weichao, CHEN Zhongjun, SUN Ziyu, Mandlaa. Mechanisms of *Priestia endophytica* promoting the growth and 2-keto-L-gulonic acid biotransformation of *Ketogulonicigenium vulgare* in the co-culture system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2444-2461.

摘要: 【目的】植物内生芽孢杆菌(*Priestia endophytica*, 伴生菌) 1-112 对普通产酮古洛糖酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare*, 产酸菌)生长及促进 2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG)生物转化的作用尚不明确。本研究采用不同培养基培养该辅助菌株, 旨在探究其对普通产酮古洛糖酸菌的作用机制。【方法】采用不同培养基(基本培养基、混合培养基及发酵培养基)培养 1-112, 探究其对普通产酮古洛糖酸菌生长及 2-KLG 生物转化的影响。运用转录组学技术, 分析经不同培养基培养的辅助菌株中差异表达基因(differently expressed genes, DEGs)及相关代谢通路, 筛选共培养体系中的关键因素。评估关键因素对普通产酮古洛糖酸菌生长及 2-KLG 生物转化的影响, 以明确其在共培养体系中的作用。【结果】与发酵培养基培养伴生菌相比, 基本培养基培养伴生菌丧失了促进 *K. vulgare* 转化 2-KLG 的能力, 但仍能促进其生长, 这提示伴生菌对 *K. vulgare* 的影响可分为促进生长与促进 2-KLG 转化 2 个相对独立的功能模块。转录组分析表明, 与基本培养基培养相比, 发酵培养基培养的伴生菌共有 1 859 个差异表达基因, 这些基因显著富集在烟酸与烟酰胺代谢、碳代谢、精氨酸与脯氨酸代谢以及氨基酸的生物合成等关键代谢通路。进一步向基本培养基中添加关键因子(丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、烟酸和生物素)进行验证发现, 甘氨酸、脯氨酸、生物素和烟酸是伴生菌促进 *K. vulgare* 生长的关键因子, 而甘氨酸、苏氨酸、生物素和烟酸则是促进 *K. vulgare* 转化 2-KLG 的关键因子。【结论】通过比较不同培养基培养伴生菌对 *K. vulgare* 生长及 2-KLG 转化的影响发现, 伴生菌通过不同机制分别促进 *K. vulgare* 的生

资助项目: 中央引导地方科技发展资金(2022ZY0104)

This work was supported by the Central Guidance for Local Scientific and Technological Development (2022ZY0104).

*Corresponding author. E-mail: Mandlaa@foxmail.com

Received: 2025-12-01; Accepted: 2026-01-15; Published online: 2026-01-28

长与 2-KLG 的转化。

关键词: 2-酮基-L-古龙酸; 普通产酮古洛糖酸菌; 共培养体系; 植物内生芽孢杆菌; 转录组学分析

Mechanisms of *Priestia endophytica* promoting the growth and 2-keto-L-gulonic acid biotransformation of *Ketogulonicigenium vulgare* in the co-culture system

LI Na¹, XU Hui², YANG Weichao², CHEN Zhongjun¹, SUN Ziyu¹, Mandlaa^{1*}

¹ College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia, China

² Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning, China

Abstract: [Objective] The effects of the helper strain (*Priestia endophytica*) 1-112 on the growth of *Ketogulonicigenium vulgare* and the biotransformation of 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG) remain unclear. In this study, we cultured the helper strain in different media to study the mechanisms of the growth- and 2-KLG biotransformation-promoting effects of the helper strain on *K. vulgare*. **[Methods]** We used different media (minimal, mixed, and fermentation media) to culture the helper strain and investigated the effects of the strain on the growth and 2-KLG biotransformation of *K. vulgare*. The differently expressed genes (DEGs) and associated metabolic pathways in the helper strain cultured in different media were analyzed by transcriptomics to screen the key factors in the co-culture system. The effects of key factors on the growth and 2-KLG biotransformation of *K. vulgare* were evaluated to explore their roles in the co-culture system. **[Results]** Strain 1-112 cultured in the minimal medium lost or reduced the ability to promote 2-KLG production, while it retained the ability to promote the growth of *K. vulgare*. This result indicated that the helper strain promoted 2-KLG biotransformation through two distinct mechanisms. There were 1 859 DEGs in strain 1-112 cultured in fermentation medium in comparison with the minimal medium, and the DEGs were significantly enriched in the pathways such as nicotinate and nicotinamide metabolism, carbon metabolism, arginine and proline metabolism, and amino acid biosynthesis. In addition, the helper strain cultured in the minimal medium containing some key factors could restore the ability to promote 2-KLG production. Glycine, proline, biotin, and nicotinic acid were found to be essential for promoting *K. vulgare* growth, whereas glycine, threonine, biotin, and nicotinic acid played critical roles in enhancing 2-KLG biotransformation. **[Conclusion]** The helper strain promoted the growth and 2-KLG biotransformation of *K. vulgare* through different mechanisms.

Keywords: 2-keto-L-gulonic acid; *Ketogulonicigenium vulgare*; co-culture system; *Priestia endophytica*; transcriptomic analysis

在一些微生物转化过程中, 共培养(或混合培养、混合发酵)相较于纯培养具有显著优势, 其中维生素 C 的第二步发酵过程作为典型的混合发酵模式受到广泛关注^[1-2]。在该混合培养体系中, 维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG)由 L-山梨糖经普通产酮古洛糖酸菌(*Ketogulonicigenium vulgare*, 又称产酸菌)和伴生菌共同发酵转化生成^[3]。尽管 *K. vulgare* 具备将 L-山梨糖转化为 2-KLG 的能力, 但其在纯培养条件下生长缓慢且转化效率极低。因此, 工业规模上 2-KLG 的高效生产必须依赖 *K. vulgare* 和伴生菌组成的混合发酵体系^[4]。

研究表明, *K. vulgare* 在氨基酸、维生素、叶酸、碳水化合物和嘌呤等代谢方面存在缺陷^[5-8]。通过基因工程手段构建 *K. vulgare* 缺失氨基酸生物合成途径的菌株, 或基于 *K. vulgare* 生理特性利用合成生物学技术构建的伴生菌, 均可在一定程度上促进 *K. vulgare* 的生长^[9-10]。上述研究虽阐明了 *K. vulgare* 在单独培养时生长受限的内在原因, 但相较于共培养体系, 外源添加代谢物或基因改造对其生长与转化能力的提升效果仍较为有限。这表明伴生菌在促进 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 转化过程中可能涉及更为复杂的调控机制, 仍有待深入揭示^[11]。有研究人员以不同伴生菌之间的功能差异为切入点, 开展伴生机理的探索^[12]。然而, 由于选取的 2 株伴生菌苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和内生芽孢杆菌(*Bacillus endophyticus*)分属不同种, 其固有的遗传与代谢差异为伴生机理的精确解析带来了干扰和挑战。尽管如此, 该研究为后续机制研究提供了新思路: 通过调控伴生菌的培养条件, 使其基因表达发生变化, 从而构建具有不同伴生能力的菌体状态, 再结合转录组学方法筛选差异表达基因, 进而系统解析伴生菌促进 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 转化的作用机制。

本研究采用一种透析培养装置, 在不同培养基中培养伴生菌, 构建具有差异伴生能力的培养条件, 进而分析伴生菌植物内生芽孢杆菌(*Priestia endophytica*)在不同培养条件下转录水平的差异表达特征, 以探究其促进 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 转化的分子机制。

1 材料与方法

1.1 菌株

普通产酮古洛糖酸菌(*K. vulgare*) 418 和植物内生芽孢杆菌(*P. endophytica*) 1-112, 均保存于内蒙古农业大学食品科学与工程学院。

1.2 培养基与培养条件

发酵培养基(g/L): L-山梨糖 80.0, 玉米浆 15.0, 尿素 12.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCO_3 5.0, 10 ppm FeSO_4 0.1 mL, pH 6.7-7.0 (L-山梨糖和尿素分开灭菌, 其他培养基成分在溶解并调节 pH 后加入碳酸钙)。分离培养基(g/L): L-山梨糖 20.0, 酵母膏 3.0, 牛肉膏 3.0, 玉米浆 3.0, 蛋白胨 10.0, 尿素 1.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 1.0, 10 ppm FeSO_4 0.1 mL, 琼脂 23.0, pH 6.7-7.0。在 120 °C 下灭菌 20 min 前, 用 40% NaOH 溶液调节 pH 值。基本培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, 柠檬酸钠 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, K_2HPO_4 6.0, KH_2PO_4 4.0, 120 °C 下灭菌 20 min。混合培养基: 将灭菌后的基本培养基和发酵培养基按体积比 3:5 的比例混合配制。关键因子培养基(g/L): 丝氨酸 0.28, 甘氨酸 0.36, 苏氨酸 0.18, 脯氨酸 0.28, 烟酸 0.19, 生物素 0.062, 并用 0.22 μm 过滤器灭菌^[13]。

将 1 mL 含伴生菌的基本培养基菌液分别接种至含有 20 mL 发酵培养基、基本培养基和混合培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 29 °C、180 r/min 下振荡培养 24 h, 得到在不同培养基中生长的伴生菌培养液。从分离培养基上收集 *K. vulgare* 的菌落, 将其全部用接种环移到 3 mL

无菌水中, 充分振荡混匀, 即得到 *K. vulgare* 菌液。

1.3 不同培养基中培养的伴生菌对 *K. vulgare* 的影响

本研究所用实验装置参照满都拉等^[14]设计的装置。向装置的内管中分别加入 3 mL 在 3 种不同培养基中培养的伴生菌发酵液, 对照组为在装置内管中不接种伴生菌的各培养基(3 mL)。装置的外管中各加入 5 mL 发酵培养基和 1 mL *K. vulgare* 菌液。整个装置置于 29 °C、180 r/min 的摇床中培养 72 h 后, 测定各处理中 2-KLG 含量和 *K. vulgare* 的 OD_{650} 值。

1.4 转录组测序

将保藏的 *P. endophytica* 1-112 菌株活化后分别接种于基本培养基和发酵培养基中, 29 °C、180 r/min 振荡培养至对数期(OD_{650} 为 0.8–1.0), 于 4 °C、10 000 r/min 下离心 18 h 收集菌体并立即用液氮速冻后, 用于转录组测序。

采用 TRIzol[®] 试剂盒(Invitrogen 公司)分别提取基本培养基和发酵培养基中培养的伴生菌总 RNA, 随后使用 DNase I (TaKaRa 公司)去除残留的基因组 DNA。利用生物分析仪(Agilent 公司)检测 RNA 完整性。合格的 RNA 样本使用 Next[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit (New England Biolabs 公司)构建文库。通过磁珠法去除 rRNA (Ribo-Zero Magnetic Kit, EpiCentre 公司)并同时 RNA 片段化。并依次完成 cDNA 合成、末端修复、A 碱基添加及索引接头的连接。随后, 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳回收目标大小的 cDNA 片段, 并通过 Phusion DNA 聚合酶进行 15 个循环的 PCR 扩增。扩增产物经 TBS380 荧光定量后, 在 DNBSEQ-T7 平台进行 2×150 bp 双端测序。基因表达水平以每千碱基转录本每百万条映射读段(reads per kilobase of transcript per million reads mapped, RPKM) 表示^[15], 差异表达基因分析采用 edgeR 软件完成, 筛选标准为 $|\log_2 \text{fold change (FC)}| \geq 1$ 且错

误发现率(false discovery rate, FDR) ≤ 0.05 , 获得差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)^[16]。对 DEGs 进行功能注释时, 使用 GO (gene ontology, <http://www.geneontology.org>) 数据库^[17], 并通过 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) 进行 KEGG 通路富集分析^[18]。

1.5 添加关键成分代培养伴生菌对 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 转化的影响

在基本培养基中外源添加差异代谢途径中的代谢物后培养伴生菌, 研究培养后的伴生菌对 *K. vulgare* 的影响。以不含伴生菌, 含外源添加等量差异代谢物的基本培养基为对照, 通过测定 2-KLG 含量和 *K. vulgare* 的 OD_{650} 值, 研究伴生菌的伴生机理(具体培养方法与条件见 1.2 节)。

1.6 检测和分析方法

发酵液中 2-KLG 含量和 *K. vulgare* 的光密度值(OD_{650})的测定参照 Xu 等^[19]和冯树等^[11]报道的方法。所有处理均设置 3 次重复。使用 SPSS 19.0 进行统计学分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学上的显著差异。使用 Origin 2024 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基培养伴生菌对 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 产量的影响

3 种培养基(发酵培养基、基本培养基和混合培养基)中培养的伴生菌对 *K. vulgare* 的生长和转化影响不同, 结果如图 1 所示。从 OD_{650} 值来看, 与不接种伴生菌的对照相比, 在 3 种培养基中培养的伴生菌均能显著提高 *K. vulgare* 的 OD_{650} 值(图 1A, $P < 0.05$), 表明在 3 种培养基中培养的伴生菌均能够促进 *K. vulgare* 的生长。然而, 与发酵培养基和混合培养基中培养的伴生菌相比, 基本培养基中培养的伴生菌并不能显著提高 2-KLG 的含量(图 1B, $P > 0.05$)。这表明在基本培养基中培养的伴生菌失去了(或大幅减弱了)促进 *K. vulgare* 转化山梨糖为 2-KLG 的能

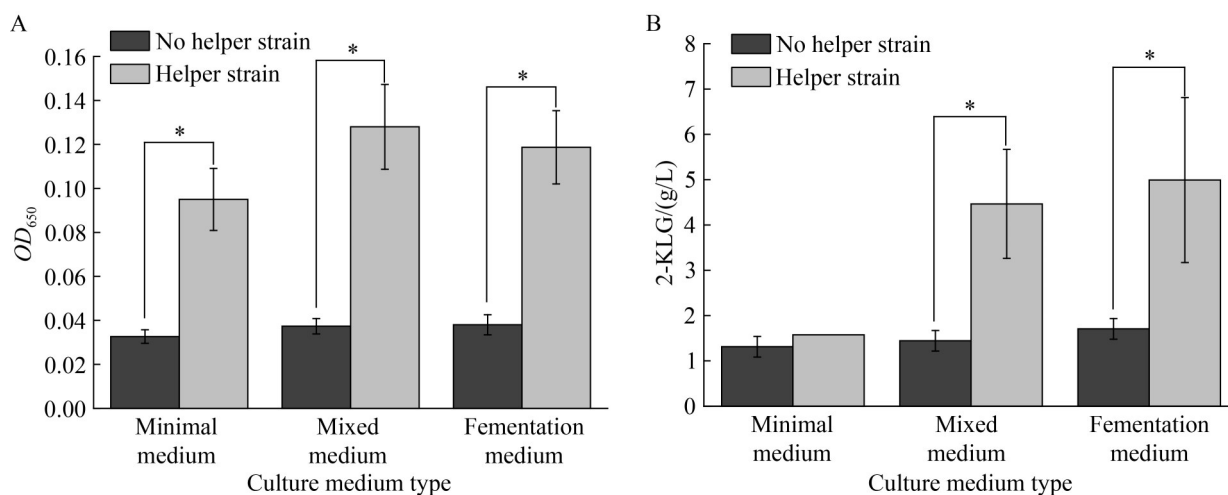


图1 不同培养基培养的伴生菌对产酸菌生长(A)和产酸(B)的影响

Figure 1 The effect of helper-strain cultured in different medium on the growth of *Ketogulonicigenium vulgare* (A) and 2-KLG (B) biotransformation. *: $P < 0.05$, indicating significant differences.

力, 但依然具有促进 *K. vulgare* 生长的能力。不接种发酵培养基、混合培养基与基本培养基中培养的伴生菌, 单独在上述培养基中培养 *K. vulgare* 时, 其 OD_{650} 值及 2-KLG 含量间均无显著差异 ($P > 0.05$)。这说明培养基本身不会对 *K. vulgare* 的生长和产 2-KLG 造成影响。

研究指出, 伴生菌可通过增加 *K. vulgare* 的细胞数量来促进 2-KLG 的转化合成^[20-21]。在本研究中, 在基本培养基条件下, 尽管伴生菌较对照能显著促进 *K. vulgare* 的生长, 但其在促进 *K. vulgare* 转化 2-KLG 方面与对照组无显著差异。该结果表明, 2-KLG 的转化效率与 *K. vulgare* 的细胞密度之间可能无直接关联, 提示伴生菌对 *K. vulgare* 生长的促进作用与对 2-KLG 转化的促进作用可能通过不同的机制实现。

2.2 不同培养基条件对伴生菌基因表达的影响

2.2.1 不同培养基培养的伴生菌差异表达基因

基本培养基与发酵培养基中培养的伴生菌在促进 2-KLG 转化方面表现出显著差异(图 1B)。为了探究其分子机制, 采用比较转录组学技术

分析了 2 种培养条件下(基本培养基和发酵培养基)伴生菌在转录水平上的差异。结果显示, 与基本培养基培养的伴生菌相比, 发酵培养基培养的伴生菌中共有 1 859 个差异表达基因, 其中上调表达基因 1 232 个, 下调表达基因 627 个(图 2A)。

2.2.2 差异表达基因 GO 注释

利用 GO 数据库对上述差异表达基因进行注释后发现, 差异表达基因在生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)上均有注释(图 2B)。差异表达基因在 BP 涉及 13 个功能亚类, 主要为生物调控(biological regulation, 上调 48 个、下调 21 个)、细胞过程(cellular process, 上调 233 个、下调 89 个)、解毒作用(detoxification, 上调 5 个)、发育过程(developmental process, 上调 5 个、下调 5 个)、生长(growth, 上调 32 个、下调 6 个)、生物体间种间相互作用(interspecies interaction between organisms, 上调 5 个)、定位(localization, 上调 33 个、下调 17 个)、代谢过程(metabolic process, 上调 201 个、下调 77 个)、多生物过程(multi-organism process, 上调 8 个)、氮利用(nitrogen utilization, 上调 2 个)、生殖

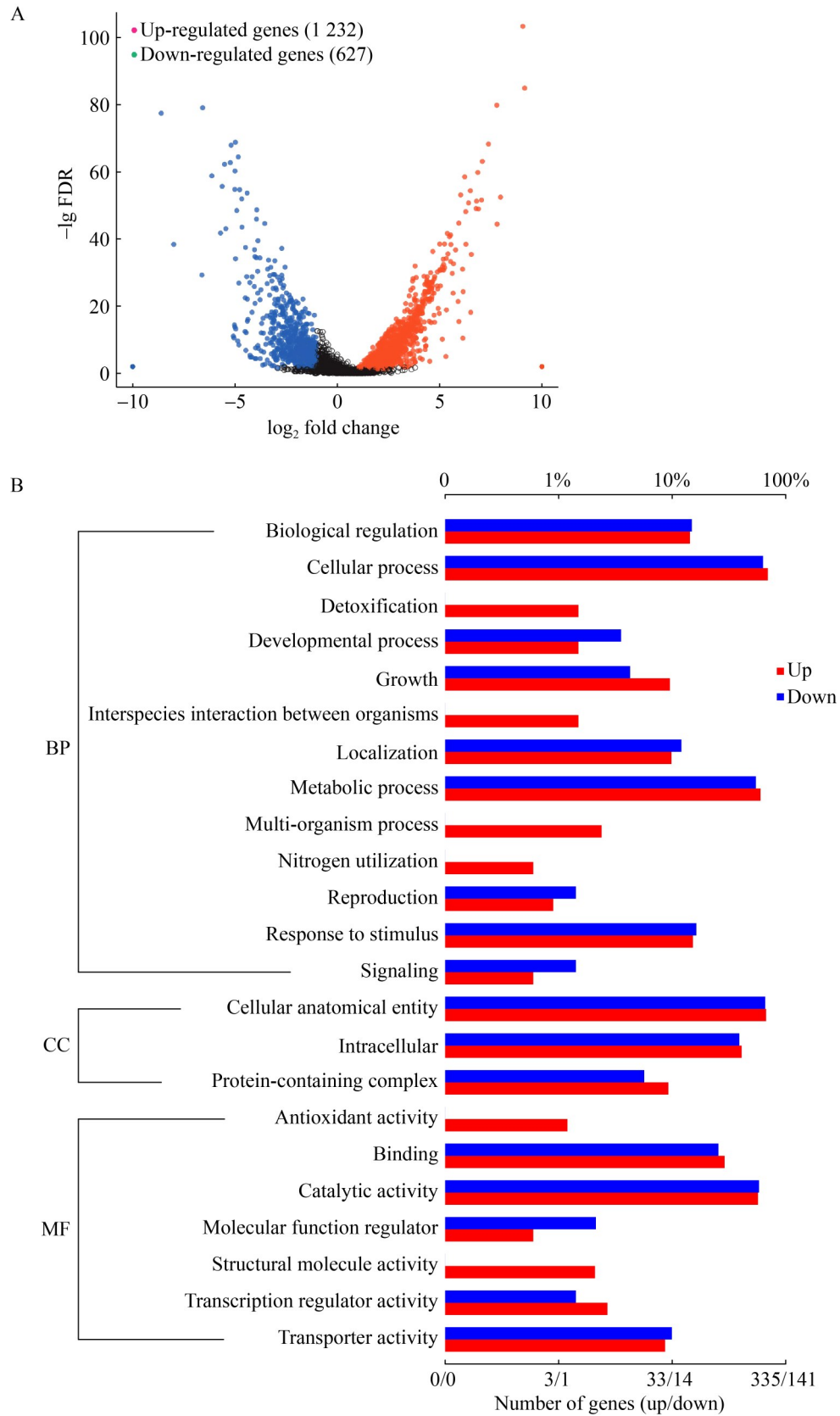




图2 差异表达基因

Figure 2 DEGs. A: Volcano plot of DEGs; B: GO annotation of DEGs; C: KEGG enrichment analysis of DEGs.

(reproduction, 上调 3 个、下调 2 个)、刺激应答 (response to stimulus, 上调 51 个、下调 23 个)、信号传导(signaling, 上调 2 个、下调 2 个)。差异表达基因在 CC 涉及 3 个功能亚类, 主要为

细胞解剖实体(cellular anatomical entity, 上调 225 个、下调 93 个)、细胞内(intracellular, 上调 137 个、下调 55 个)和含蛋白质复合物(protein-containing complex, 上调 31 个、下调 8 个)。差

异表达基因在 MF 涉及 7 个功能亚类, 主要为抗氧化活性(antioxidant activity, 上调 4 个)、结合(binding, 上调 97 个、下调 36 个)、催化活性(catalytic activity, 上调 191 个、下调 82 个)、分子功能调节因子(molecular function regulator, 上调 2 个、下调 3 个)、结构分子活性(structural molecule activity, 上调 7 个)、转录调节因子活性(transcription regulator activity, 上调 9 个、下调 2 个)、转运蛋白活性(transporter activity, 上调 29 个、下调 14 个)。

相较于基本培养基培养的伴生菌, 在发酵培养基中培养的伴生菌在结构分子活性、抗氧化活性、氮利用、生物体间种间相互作用、多生物过程和解毒作用等 6 个功能只注释到了上调表达的基因。其中, 微生物的生物体间种间相互作用和多生物过程功能决定了微生物群落的结构与功能, 并赋予细菌在复杂环境中高效利用资源、优化能量分配的能力^[22]。本研究中, 上调差异基因被注释到 interspecies interaction between organisms 和 multi-organism process 功能, 如能接收和传递信号和影响细菌间的协作行为的 FHA domain-containing protein, 积极参与对高渗性休克的反应的 molecular chaperone DnaK 等, 这些基因的上调可能有益于增强伴生菌在发酵培养基中与外界环境的互动能力, 并通过代谢产物交换或信号传递增强伴生菌与产酸菌之间的协同作用进而增强 2-KLG 的转化。

在细菌的合成代谢中, 解毒并非独立的防御机制, 而是通过清除有害物质、维持胞内稳态, 直接或间接为蛋白质、核酸、细胞壁成分等生物大分子的合成提供保障^[23-24]。已有研究表明, 太阳光中的紫外线 A 段(ultraviolet A, UVA)辐射是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)对环境的主要氧化应激因素, UVA 可通过诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成导致蛋白质和 DNA 损伤, 而 *P. aeruginosa* 则依赖 KatA 和 KatB 2 种过氧化氢酶实现对 ROS 的有效解毒^[25]。抗氧化活性(antioxidant activity)是细

菌解毒过程的重要组成部分, 通过直接清除 ROS 等氧化性损伤分子, 减少对关键生物大分子的破坏, 从而在解毒过程中发挥核心作用。*K. vulgare* 在发酵过程中会产生多种 ROS, 但自身缺乏清除过量 ROS 的能力, 易引发氧化应激, 因此在单独培养条件下其生长会受到氧化胁迫的抑制。在混合培养体系中, 伴生菌可释放多种抗氧化物质, 有效清除发酵体系中的 ROS, 从而促进 *K. vulgare* 的生长与产 2-KLG^[26]。相较于基本培养基中的伴生菌, 发酵培养基中培养的伴生菌的解毒作用相关基因(*kata*, *trxA*, *bcp*)的显著上调, 表明菌株可能通过主动清除毒性物质以维持内环境稳态, 并间接支持合成代谢过程(如酶活性维持与能量供应)。此外, 细菌在实现解毒功能时, 不仅影响自身的生长动态, 还可能通过调控环境 pH 值及代谢产物浓度影响其他物种的生存状态, 进而参与种间相互作用和多生物体过程的调节^[27]。Detoxification 相关基因的上调有助于伴生菌清除对产酸菌有害的代谢副产物和环境毒素, 减轻其对产酸菌酶系统的氧化损伤, 从而使山梨糖脱氢酶(sorbose dehydrogenase, SDH)和山梨酮脱氢酶(sorbose dehydrogenase, SNDH)保持高催化活性, 持续推动 2-KLG 的合成。

总体而言, 相较于基本培养基, 发酵培养基中培养的伴生菌在细胞过程、代谢过程、生物调控、细胞解剖实体、细胞内、结合及催化活性等功能类别中表现出显著差异, 表明发酵培养基可通过多维度调控伴生菌的基因表达与生理功能, 从而提升产酸菌对 2-KLG 的转化效率。在代谢层面, 伴生菌参与代谢过程的差异表达基因中, 上调基因达 201 个、下调 77 个, 在催化过程中, 上调 191 个、下调 82 个, 整个代谢通量显著增强, 有助于高效合成碳水化合物、氨基酸、辅酶等营养物质, 弥补产酸菌的合成缺陷, 为其生长及 2-KLG 合成提供必要的物质基础。在胁迫响应层面, 抗氧化活性检测到 4 个上调基因, 解毒作用相关基因上调 5 个

且均无下调,提示伴生菌可通过表达相关基因清除 ROS 等有害物质,改善产酸菌的氧化还原状态,缓解其生长抑制,进而提高产酸效率。在细胞结构与信号调控层面,结构分子活性相关基因全部表现为上调,表明伴生菌增强了细胞结构组分的合成以维持其生理活性;同时,生物调控中上调基因 48 个、下调 21 个,刺激应答中上调 51 个、下调 23 个,显示在发酵培养基中,伴生菌具备较强的代谢自我调控能力与环境响应能力,有助于维持共培养体系的稳态,为产酸菌提供稳定的产酸环境。综上所述,不同培养基影响了伴生菌在代谢产物的合成、酶的表达与活性调控及信号传导等相关基因的表达,从而促进产酸菌在 2-KLG 转化效率上的提升。

2.2.3 差异基因的 KEGG 分析

基于 KEGG 的富集结果可知(图 2C),与基本培养基培养相比,发酵培养基培养的伴生菌中差异表达基因富集于 116 个代谢通路。其中,显著富集的代谢通路包括牛磺酸与亚牛磺酸代谢(taurine and hypotaurine metabolism, ko00430、8 个差异基因)、新生霉素生物合成(novobiocin biosynthesis, ko00401、6 个差异基因)、烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism, ko00760、14 个差异基因)、碳代谢(carbon metabolism, ko01200、63 个差异基因)、精氨酸和脯氨酸代谢(arginine and proline metabolism, ko00330、19 个差异基因)、叶酸介导的一碳池(one carbon pool by folate, ko00670、10 个差异基因)、链霉素生物合成(streptomycin biosynthesis, ko00521、9 个差异基因)、糖酵解/糖异生(glycolysis/gluconeogenesis, ko00010、21 个差异基因)、氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids, ko01230、73 个差异基因)和苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, ko00400、16 个差异基因)等。包含较多差异基因的代谢途径主要为次级代谢产物生物合成(biosynthesis of

secondary metabolites, ko01110、167 个差异基因)、氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids, ko01230、73 个差异基因)和碳代谢(carbon metabolism, ko01200、63 个差异基因)等,表明伴生菌的这些核心代谢通路在发酵培养基条件下受到显著调控,可能在伴生菌的生理功能重塑中发挥关键作用。

EMP 和 TCA 途径的调控变化可为山梨糖脱氢酶等关键酶提供必需的能量(ATP)和还原力(NADH 和 NADPH),对 2-KLG 的合成至关重要^[8]。在本研究中,伴生菌在发酵培养基中通过上调碳水化合物代谢的相关通路(如 glycolysis/gluconeogenesis)以适应发酵培养基环境,不仅增强了自身能量与还原力的供应,也为 *K. vulgare* 提供了更为充足的中间代谢产物,支持其高效产 2-KLG。此外,在混合培养体系中,微生物之间可能形成“竞争”或“合作”等复杂的相互作用模式,进而诱导产生常规单菌培养难以获得的新型次级代谢产物^[28]。基于上述结果,推测伴生菌可能通过激活次级代谢通路合成多种功能性化合物,而这些次级代谢物在微生态平衡调控、促进产酸菌代谢活性及优化整体发酵效率方面发挥关键作用。

已有研究表明,*K. vulgare* 的氨基酸合成途径不完整,缺乏组氨酸、脯氨酸和苏氨酸等必需氨基酸合成所依赖的关键酶^[9]。伴生菌具备完整的氨基酸代谢通路,能够合成并分泌这些必需氨基酸,从而直接弥补产酸菌的代谢缺陷^[3]。氨基酸等营养物质的供给水平可直接影响基因转录水平,进而调控关键酶的表达量,促进 2-KLG 的高效转化。例如,在不同培养基条件下,细胞可通过感知氨基酸供应状况及外部 pH 变化,动态调整代谢通路及相关酶的表达以适应环境变化^[29]。在发酵培养基中培养时,伴生菌多个氨基酸代谢相关通路的基因表达水平发生显著变化,包括:参与维持细胞内渗透压稳态的脯氨酸代谢通路(arginine and proline metabolism, ko00330、19 个差异基因);在细菌

生长、繁殖和环境适应中发挥多重核心作用的芳香族氨基酸 (phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, ko00400、16 个差异基因); 以及对核酸和蛋白质的生物合成起重要作用的甘氨酸和苏氨酸代谢通路 (glycine, serine and threonine metabolism, ko00260、19 个差异基因) 等。上述结果表明, 伴生菌在发酵培养基中通过上调特定氨基酸代谢途径, 增强营养供给能力, 可能为共培养体系的稳定运行和高效产酸提供支持。

相较于基本培养基, 发酵培养基中培养的伴生菌在烟酸和烟酰胺代谢通路中与 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 合成相关的基因均表现出显著差异表达。已有报道表明, *K. vulgare* 因自身代谢途径缺陷, 缺乏多种关键辅因子的从头合成能力, 需依赖伴生菌或外界环境提供前体物质或直接供给辅因子以维持其生长及 2-KLG 的生物合成, 其中包括生物素 (biotin)、烟酸 (nicotinate)、泛酸 (pantothenate)、硫胺素焦磷酸 (thiamin diphosphate) 等^[13,30-31]。烟酸/烟酰胺在细胞内被转化为 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, 是辅因子合成代谢中的核心中间产物^[32]。 NAD(P)^+ 作为山梨酮脱氢酶 (sorbosone dehydrogenase, SNDH) 的关键辅酶, 其胞外供应水平直接影响该酶的催化活性。伴生菌通过激活烟酸和烟酰胺代谢通路, 增强 NAD(P)^+ 的合成与释放, 为产酸菌提供充足的辅酶支持, 从而提升 SNDH 活性, 进一步促进 2-KLG 的合成效率^[33]。

结合上述研究报道, 推测这些代谢途径的改变是导致 2-KLG 合成差异的关键因素。发酵培养基激活了伴生菌中次级代谢产物生物合成、碳代谢、氨基酸生物合成及辅因子和维生素的代谢等核心代谢通路, 通过合成必需氨基酸、调控相关酶表达及提供关键辅因子等多种代谢互补机制, 有效弥补 *K. vulgare* 的代谢缺陷, 为其生长和 2-KLG 的生物合成提供系统性支持。一方面, 伴生菌通过上调自身氨基酸合成通路, 能够合成 *K. vulgare* 无法自主合成的必需氨基

酸, 并借助胞间物质交换将其供给 *K. vulgare*, 从而补偿 *K. vulgare* 氨基酸合成代谢缺陷。另一方面, 伴生菌在碳代谢通路中表现出较高活性, 可优化碳流分配, 不仅满足自身的能量需求, 还能向 *K. vulgare* 供应丙酮酸、乙酰辅酶 A 等关键中间代谢产物, 支撑其核心代谢的运行。此外, 伴生菌在辅因子和维生素代谢通路的调控, 特别是烟酸和烟酰胺代谢的激活, 有助于合成 NAD(P)H 、叶酸等重要辅因子, 并传递给 *K. vulgare*, 为其 2-KLG 合成过程中的氧化还原反应和酶促催化提供必要的辅酶基础。

2.2.4 不同培养基培养对伴生菌氨基酸和辅因子代谢相关途径的影响

研究表明, *K. vulgare* 不仅缺乏多种辅因子, 还缺失大量氨基酸生物合成路径的关键酶, 而伴生菌则具备更为完整的氨基酸合成途径^[34]。在混菌发酵体系中, 伴生菌可通过向 *K. vulgare* 提供其无法自主合成的营养物质和关键代谢产物, 有效弥补 *K. vulgare* 因氨基酸合成途径、部分碳代谢途径及其他多条代谢通路中关键基因缺失所导致的代谢缺陷, 从而促进 *K. vulgare* 的生长及 2-KLG 的合成^[35]。伴生菌通过合成并释放关键氨基酸、辅因子及嘌呤类物质, 或通过直接转运机制传递给 *K. vulgare*, 不仅补偿其代谢短板, 还有助于缓解氧化应激压力^[2]。与基本培养基相比, 在发酵培养基中培养的伴生菌差异表达基因主要富集于 116 条代谢通路, 其中涉及氨基酸代谢的通路共 14 条, 辅因子和维生素代谢相关通路 11 条。在氨基酸代谢中, 脯氨酸、苏氨酸、甘氨酸及异亮氨酸被认为对产酸菌的生长和 2-KLG 合成具有关键作用^[9]。在辅因子与维生素代谢网络中, 硫辛酸、叶酸、烟酸和生物素发挥核心调控作用。基于上述研究背景, 为阐明不同培养基条件下伴生菌对 *K. vulgare* 的影响机制, 本研究重点解析了伴生菌在氨基酸代谢与辅因子和维生素代谢相关的核心通路中的关键代谢途径 (表 1)。

表1 氨基酸和辅因子代谢关键基因

Table 1 The key genes in amino acid and cofactor metabolic pathways

Pathway description	Gene ID	Gene	Up/down	Gene description
Proline metabolism	M4D59_RS11520	<i>proA</i>	Down	Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase
	M4D59_RS16220	<i>proC</i>	Down	Pyrroline-5-carboxylate reductase
	M4D59_RS19460	<i>putB</i>	Down	Proline dehydrogenase
Glycine, serine and threonine metabolism	M4D59_RS00580	<i>serC</i>	Up	3-phosphoserine/phosphohydroxythreonine transaminase
	M4D59_RS19280	<i>thrC</i>	Up	Threonine synthase
	M4D59_RS19285	<i>hom</i>	Up	Homoserine dehydrogenase
	M4D59_RS22630	<i>gcvPB</i>	Up	Aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase subunit GcvPB
	M4D59_RS22635	<i>gcvPA</i>	Up	Aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase subunit GcvPA
	M4D59_RS22640	<i>gcvH</i>	Up	Glycine cleavage system protein GcvH
	M4D59_RS22645	<i>gcvT</i>	Up	Glycine cleavage system aminomethyltransferase GcvT
Biotin metabolism	M4D59_RS07795	<i>bioD</i>	Down	Dethiobiotin synthase
	M4D59_RS07800	<i>bioI</i>	Down	Pimeloyl-(acyl-carrier protein) synthase
	M4D59_RS13820	<i>BioY</i>	Up	Biotin transporter BioY
Nicotinate and nicotinamide metabolism	M4D59_RS01045	<i>ppnK</i>	Up	NAD kinase
	M4D59_RS01555	<i>surE</i>	Up	5'/3'-nucleotidase SurE
	M4D59_RS02220	<i>pncB</i>	Up	Nicotinate phosphoribosyltransferase
	M4D59_RS02225	<i>nadE</i>	Up	Ammonia-dependent NAD(+) synthetase
	M4D59_RS03835	<i>deoD</i>	Up	Purine-nucleoside phosphorylase
	M4D59_RS03925	<i>cobB</i>	Down	NAD-dependent protein deacylase
	M4D59_RS06595	<i>pncB</i>	Up	Nicotinate phosphoribosyltransferase
	M4D59_RS16135	<i>punA</i>	Up	Purine-nucleoside phosphorylase
	M4D59_RS17155	<i>nadD</i>	Up	Nicotinate-nucleotide adenyltransferase
	M4D59_RS17460	<i>nadA</i>	UP	Quinolinate synthase NadA
	M4D59_RS17465	<i>nadC</i>	UP	Carboxylating nicotinate-nucleotide diphosphorylase
	M4D59_RS17470	<i>nadB</i>	UP	L-aspartate oxidase
	Lipoic acid metabolism	M4D59_RS00645	<i>lpA</i>	UP
M4D59_RS16580		<i>lipM</i>	UP	Lipoyl (octanoyl) transferase
Folate biosynthesis	M4D59_RS03640	<i>DHFR</i>	UP	Dihydrofolate reductase
Isoleucine biosynthesis and degradation	M4D59_RS03610	<i>ilvD</i>	UP	Dihydroxy-acid dehydratase
	M4D59_RS16375	E1.4.1.9	UP	Leucine dehydrogenase
	M4D59_RS16355	<i>bkdA1</i>	UP	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component subunit beta
	M4D59_RS02720	<i>lpd</i>	UP	Dihydrolipoyl dehydrogenase

在维生素 C 生产相关的微生物代谢研究中, *K. vulgare* 的辅因子与维生素代谢网络存在显著缺陷, 其在生物素、叶酸及硫辛酸等物质的代谢与合成途径均不完整^[36-38]。伴生菌具备完整的 B 族维生素合成途径, 可通过代谢互补为 *K. vulgare* 提供生长所必需的生物素等关键因子,

从而发挥重要的伴生作用^[39]。在发酵培养基中, 伴生菌中二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)基因表达上调, 增强了四氢叶酸的合成及其介导的一碳代谢, 进而促进核酸与蛋白质的合成, 有利于产酸菌的生长及 2-KLG 的积累。由于 *K. vulgare* 自身叶酸代谢途径不完整, 缺乏

叶酸还原酶等关键酶, 无法将叶酸有效还原为二氢叶酸 (dihydrofolic acid, DHF) 和四氢叶酸 (tetrahydrofolic acid, THF), 必须依赖伴生菌或外界环境提供^[6,40]。已有研究表明, 外源添加还原型叶酸衍生物可显著提高产酸菌生物量和 2-KLG 产量, 且 Leduc 等^[37]指出, 这类衍生物是满足 *K. vulgare* 生长需求的主要生长因子之一。

在发酵培养基中培养的伴生菌, 其 *lplA* 和 *lipM* 基因显著上调表达, 强化了硫辛酸的生物合成, 从而促进 *K. vulgare* 的生长。根据文献报道, 硫辛酸的合成有 2 种路径。(1) 内源合成途径, 依赖脂肪酸合成途径产生的衍生物作为前体, 主要由硫辛酰合成酶(LipA)和硫辛酰基转移酶(LipB)催化完成。(2) 外源利用途径, 以外源硫辛酸为底物, 通过硫辛酸蛋白连接酶(LplA)将其共价连接至载脂蛋白上^[41]。硫辛酸在 *K. vulgare* 与伴生菌构成的混合发酵体系中具有重要作用, 但 *K. vulgare* 缺少硫辛酸合成的关键基因。潘才惠^[38]的研究进一步证实, 向培养体系中外源添加硫辛酸可显著促进 *K. vulgare* 的菌体生长, 但对 2-KLG 的产酸量提升效果有限。上述关于叶酸与硫辛酸的研究结果表明, 伴生菌对 *K. vulgare* 生长与转化能力的促进作用, 可能通过不同的代谢机制来实现。

在发酵培养基中, 伴生菌的 *bioD* 和 *bioI* 基因表达下调, 而 *bioY* 的表达上调。这一表达模式表明, 在当前环境中生物素供应充足, 菌株通过调控代谢策略, 优先依赖外源摄取而非内源合成生物素, 从而避免在生物素合成上消耗不必要的能量和物质。Al-Ssum 等^[42]研究发现, 生物素缺乏可能影响巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 中乙酰辅酶 A 羧化酶和丙酮酸羧化酶的活性, 进而导致脂质合成受阻, 并限制肽聚糖合成所需氨基酸的供给, 最终影响菌体生长和芽孢形成。因此, 伴生菌的这种调控机制不仅有助于维持自身生物素水平的稳态, 还可在发酵后期通过部分营养细胞裂解释放胞内储

存的生物素, 将其释放至发酵体系中, 作为产酸菌可直接利用的生物素来源, 有效增强产酸菌对发酵环境的适应性与存活能力, 从而促进 2-KLG 产量的提升。

在发酵培养基中, 伴生菌的 *ppnK*、*surE*、*pncB*、*nadE*、*deoD*、*punA*、*nadD*、*nadA*、*nadC* 和 *nadB* 等基因表达显著上调, 增强了 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 的合成与转化能力, 为细胞生长、抗逆响应及产物合成提供了充足的氧化还原辅酶支持。烟酸代谢途径是 NAD^+ 合成的关键前提, 而 NAD (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 作为细胞内重要的辅酶, 在能量代谢、氧化还原反应及其他多种生理过程中发挥至关重要的作用^[43]。细菌的 NAD 的合成主要依赖 2 条途径: 一是从头 (*de novo*) 合成途径, 由 *nadB*、*nadA*、*nadC*、*nadD* 等参与从头合成途径的关键酶催化完成; 二是补救途径 (*salvage pathway*), 其中 *pncB* 编码的烟酸磷酸核糖转移酶 (nicotinate phosphoribosyltransferase) 起关键作用。*nadE* 基因则催化 NAAD 生成 NAD^+ , 参与从头合成途径的终步反应, 同时也介导部分 NAD^+ 补救途径的最终合成步骤^[44]。烟酸作为关键代谢调节物, 其充足供应对 *K. vulgare* 的高效发酵至关重要。当 NAD^+ 或 NADP^+ 供应不足时, 可能影响关键酶 SDH 和 SNDH 的催化活性与效率, 进而导致 2-KLG 产量下降^[45]。

伴生菌的 *ilvD*、E1.4.1.9、*bkdA1* 和 *lpd* 基因在发酵培养基培养时上调表达, 表明异亮氨酸的合成与降解途径均被激活。一方面, 伴生菌高效合成异亮氨酸, 可弥补产酸菌对异亮氨酸的营养缺陷, 从而促进产酸菌的生长和 2-KLG 的积累。另一方面, 异亮氨酸通过降解生成乙酰辅酶 A 与琥珀酰辅酶 A, 进入三羧酸循环以提供能量, 为 2-KLG 的合成过程提供必要的代谢驱动力。此外, 乙酰辅酶 A 水平的提升进一步增强了 2-KLG 合成关键基因 *sdh* 和 *sndh* 的表达, 直接推动了 2-KLG 的高效合成^[46-47]。另外, *serC* 基因上调表达促进丝氨酸的合成。*hom* 与

thrC 基因表达上调, 促进苏氨酸与高丝氨酸的相互转化, 并促进苏氨酸的生物合成。苏氨酸可进一步转化为甘氨酸和丝氨酸, 而甘氨酸与丝氨酸作为一碳代谢中一碳单位的重要供体, 参与调控核酸的生物合成^[48-49]。此外, 甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸均可转化为三羧酸循环中间产物, 用于能量生成或作为前体物质合成其他生物分子^[34]。*K. vulgare* 缺乏完整的苏氨酸和甘氨酸合成酶系统, 而伴生菌中相关合成途径的强化有效弥补了这一缺陷, 所合成的氨基酸被 *K. vulgare* 大量利用以支持其生长与代谢。同时, 属于甘氨酸裂解系统 (glycine cleavage system, GCS) 的 *gcvT*、*gcvPA*、*gcvPB* 和 *gcvH* 基因在发酵培养基培养时上调表达。GCS 是一种存在于所有细胞中的多酶复合物, 包含 P 蛋白(甘氨酸脱羧酶)、H 蛋白(载体蛋白)、T 蛋白(氨甲酰基转移酶)和 L 蛋白(二氢硫辛酰脱氢酶) 4 个亚基, 负责分解甘氨酸生成 CO₂、NH₃ 和一碳单位(5,10-methylene-THF), 参与嘌呤、嘧啶等核苷酸合成以及能量代谢等各种代谢过程^[50-52]。通过 GCS 微生物得以实现甘氨酸与一碳单位之间的动态平衡, 不仅为核苷酸合成提供必需前体, 还参与辅酶四氢叶酸的再生, 从而支持 DNA 复制及孢子形成等关键生理过程^[53]。在营养限制条件下, 甘氨酸还可以作为氮源和碳源被菌体利用, 维持细胞生长与产物合成^[54]。此外, 已有研究表明, 甘氨酸脱羧酶系统(*gcvP* 和 *gcvT*)的上调会释放氨, 可中和胞内酸性环境, 缓解胞质酸化^[55]。值得注意的是, SDH 和 SNDH 最适反应 pH 均为 8.0 左右, 在 pH 偏酸性环境中二者活性都较低^[56]。因此, GCS 的上调表达有助于通过产氨调节局部微环境 pH, 维持 SDH 和 SNDH 这 2 种关键酶的活性, 从而为 L-山梨糖向 2-KLG 的高效转化提供适宜的 pH 微环境。

与上述相反, 在发酵培养基中, 伴生菌的 *proA*、*proC* 和 *putB* 基因表达共同下调。脯氨酸在芽孢杆菌的合成代谢中具有多重核心功能,

其代谢网络与碳、氮循环密切相关。作为碳氮代谢的关键节点, 脯氨酸可通过分解代谢[由脯氨酸脱氢酶 ProDH/PutB 催化, 经 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸(P5C)生成谷氨酸]进入三羧酸循环(TCA), 为能量代谢提供底物, 实现碳源和氮源的高效再利用^[57]。同时, 脯氨酸是一种重要的应激保护剂, 在高渗环境中, 菌体通过抑制 PutBCP 操纵子(包括 PutB 活性)促进胞内脯氨酸积累, 以维持渗透压平衡、防止细胞脱水, 该调控机制可确保脯氨酸优先响应渗透胁迫^[58]。此外, 在原核生物中, 脯氨酸代谢可调控活性氧(ROS)的产生与功能, 进而影响细胞对氧化应激的耐受能力^[59]。因此, 脯氨酸可通过调节渗透压和抗氧化能力, 增强整个发酵体系的稳定性。

2.3 外源添加物质至基本培养基培养伴生菌对 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 转化的影响

在基本培养基中培养的伴生菌能够促进 *K. vulgare* 的生长, 但未能提高 2-KLG 的产量。相较于基本培养基, 发酵培养基中含有成分更为复杂的玉米浆^[60]。Zhang 等^[13]通过对玉米浆中影响 2-KLG 生产的 40 种主要成分进行系统分析, 发现丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、烟酸和生物素是影响 *B. megaterium* 与 *K. vulgare* 混合培养体系中 *K. vulgare* 生长和 2-KLG 产量的关键因子。然而, 目前尚不明确哪些因子主要促进 *K. vulgare* 的生长, 而哪些因子特异性驱动 2-KLG 的转化过程。

在添加不同关键因子的基本培养基中, *K. vulgare* 的 OD₆₅₀ 值变化如图 3A 所示。与在未添加关键因子的基本培养基培养的伴生菌相比, 在添加甘氨酸、脯氨酸、生物素和烟酸的基本培养基中培养的伴生菌, 能显著促进 *K. vulgare* 的生长 ($P < 0.05$)。在添加甘氨酸、苏氨酸、生物素和烟酸的基本培养基中, 混合发酵体系能显著提高 2-KLG 的产量(图 3B,

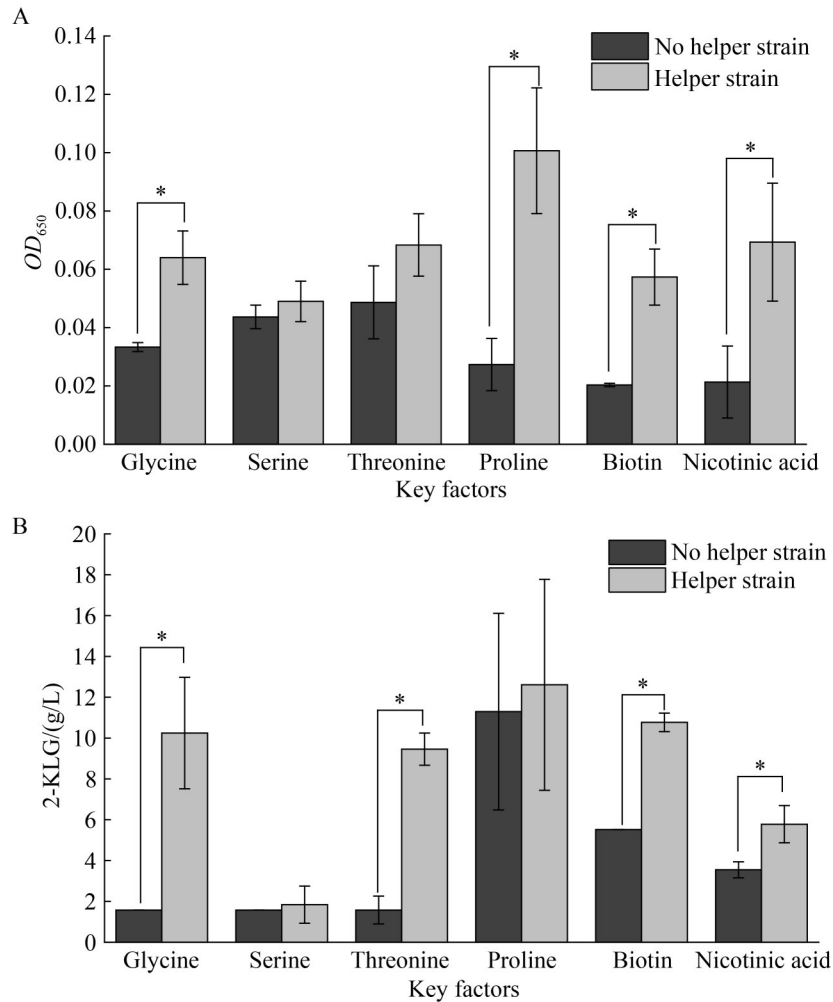


图3 添加不同关键因子对*Ketogulonicigenium vulgare*的生长和2-KLG转化的影响

Figure 3 The effects of key factor on the growth of *Ketogulonicigenium vulgare* and 2-KLG biotransformation. * $P < 0.05$ indicating significant differences.

$P < 0.05$)。这表明伴生菌能够利用特定关键因子合成某些关键物质,从而显著促进 2-KLG 转化或 *K. vulgare* 生长。其中,甘氨酸、脯氨酸、生物素和烟酸是伴生菌促进 *K. vulgare* 生长的关键因子,而甘氨酸、苏氨酸、生物素和烟酸则是伴生菌促进 2-KLG 生产的关键因子。该结果进一步证实,伴生菌促进 *K. vulgare* 转化 2-KLG 并非简单地通过促进其生长实现。

添加甘氨酸培养的伴生菌显著促进了 *K. vulgare* 的生长,并提高了 2-KLG 的转化。甘氨酸可合成谷胱甘肽,且与叶酸合成代谢产物

5,10-亚甲基四氢叶酸的合成有关^[53]。已有研究表明,谷胱甘肽和叶酸均能促进 *K. vulgare* 的生长和 2-KLG 的产生^[61-64]。因此,甘氨酸可能通过促进伴生菌中谷胱甘肽和叶酸的合成,进而促进 *K. vulgare* 的生长和 2-KLG 的产生。

生物素和烟酸不仅促进了 *K. vulgare* 的生长(图 3A),还提高了伴生菌辅助下 2-KLG 的产量(图 3B)。生物素(维生素 H 或维生素 B₇)是多种生物素依赖性羧化酶的必需辅因子,如丙酮酸羧化酶和乙酰辅酶 A 羧化酶^[65]。研究发现,在大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)中添加烟酸可导

致 NAD 和 NADP 的增加^[66]，而 NAD 和 NADP 在众多生物氧化还原反应中发挥关键作用。据此推断，外源添加生物素或烟酸后，伴生菌在基本培养基中促进 2-KLG 生产和 *K. vulgare* 生长的机制可能是生物素或烟酸通过改善伴生菌自身的代谢水平，并分泌更多的刺激物质来实现。

添加苏氨酸培养的伴生菌不能显著促进 *K. vulgare* 的生长，但能显著提高 2-KLG 的转化。相反，在添加脯氨酸后，伴生菌能显著提高 *K. vulgare* 的生长，但不能促进 2-KLG 转化(图 3)。据报道，脯氨酸对 2-KLG 生产的促进作用是通过其在 *K. vulgare* 和 *B. megaterium* 共培养中的渗透保护能力实现的^[60]。在该共培养体系中，脯氨酸对 *K. vulgare* 的渗透保护更为有效，这可能是导致 *K. vulgare* 细胞生长增加的原因。

基于上述结果，可总结出 2 种途径提高 *K. vulgare* 的细胞生长和 2-KLG 的转化。(1) *K. vulgare* 直接利用外源添加的甘氨酸、脯氨酸、生物素和烟酸等物质进行生长或生产 2-KLG；(2) 伴生菌利用培养基中的物质后产生谷胱甘肽和叶酸等代谢物刺激 *K. vulgare* 的生长和 2-KLG 的生产。在混合发酵过程中，这 2 种方式并存，其中后一种方式可能在促进 *K. vulgare* 的生长和

提升 2-KLG 的产量方面发挥更为重要的作用(图 4)。

3 结论

本研究通过比较在发酵培养基、基本培养基和混合培养基中培养的伴生菌对 *K. vulgare* 的生长与转化的影响，发现混合发酵过程中伴生菌对 *K. vulgare* 的生长促进作用和 2-KLG 转化效率的提升是通过不同机制实现的。利用 RNA-Seq 技术比较基本培养基和发酵培养基培养伴生菌的差异基因表达，并对 DEGs 进行了鉴定和功能分析。发酵培养基通过激活伴生菌的碳代谢、氨基酸生物合成以及辅因子与维生素代谢等核心代谢通路，为其自身及 *K. vulgare* 提供必需氨基酸、优化碳源代谢流向，并通过传递 NAD(P)H 和叶酸等关键辅因子，构建多重代谢互补体系，从而弥补 *K. vulgare* 代谢缺陷，促进其生长及 2-KLG 的高效生物合成。进一步通过外源添加关键代谢物的实验验证了甘氨酸、苏氨酸、烟酸和生物素可显著提高基本培养基中 *K. vulgare* 的 2-KLG 产量，而脯氨酸对 *K. vulgare* 细胞数量的增加有积极影响，进一步证实了伴生菌在促进 *K. vulgare* 的生长和

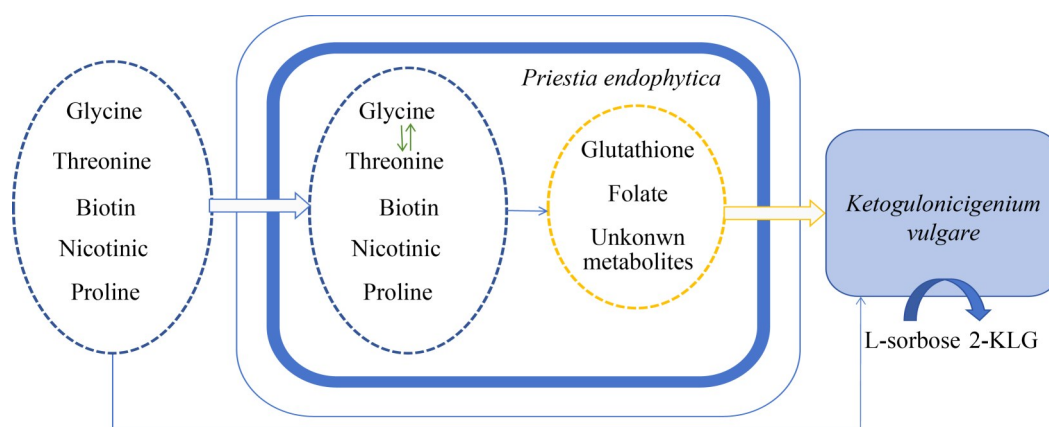


图4 伴生菌促进 *Ketogulonicigenium vulgare* 生长及 2-KLG 转化的可能途径

Figure 4 The probable pathway that helper-strain promoted the growth of *Ketogulonicigenium vulgare* and 2-KLG biotransformation.

2-KLG 转化是通过不同机制实现的。

作者贡献声明

李娜: 数据分析, 论文撰写; 徐慧: 监督管理; 杨伟超: 研究方案设计与指导; 陈忠军: 论文结构指导; 孙子羽: 研究方法指导; 满都拉: 研究方案设计, 论文修改和审核等。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Guo LC, Xi BW, Lu LS. Strategies to enhance production of metabolites in microbial co-culture systems[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 406: 131049.
- [2] Ye C, Xu N, Chen XL, Liu LM. Metabolic model reconstruction and analysis of an artificial microbial ecosystem[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1716: 219-238.
- [3] Liu Q, Liu M, Chen WH, Yuan HB, Jiang Y, Huang D, Liu HL, Wang TF. Recent advances in 2-keto-L-gulonic acid production using mixed-culture fermentation and future prospects[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(3): 1419-1428.
- [4] 张静, 刘立明, 刘杰, 秦苏东, 堵国成, 陈坚. 生物技术法生产维生素C的研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(5): 1-7.
Zhang J, Liu LM, Liu J, Qin SD, Du GC, Chen J. Progress in biotechnological production of vitamin C[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(5): 1-7 (in Chinese).
- [5] Jia N, Ding MZ, Zou Y, Gao F, Yuan YJ. Comparative genomics and metabolomics analyses of the adaptation mechanism in *Ketogulonicigenium vulgare*-*Bacillus thuringiensis* consortium[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46759.
- [6] Cai L, Yuan MQ, Li ZJ, Chen JC, Chen GQ. Genetic engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for enhanced production of 2-keto-L-gulonic acid[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157(2): 320-325.
- [7] Zhou J, Ma Q, Yi H, Wang LL, Song H, Yuan YJ. Metabolome profiling reveals metabolic cooperation between *Bacillus megaterium* and *Ketogulonicigenium vulgare* during induced swarm motility[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 7023-7030.
- [8] Ma Q, Zhou J, Zhang WW, Meng XX, Sun JW, Yuan YJ. Integrated proteomic and metabolomic analysis of an artificial microbial community for two-step production of vitamin C[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26108.
- [9] Pan CH, Wang EX, Jia N, Dong XT, Liu Y, Ding MZ, Yuan YJ. Reconstruction of amino acid biosynthetic pathways increases the productivity of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonicigenium vulgare*-*Bacillus endophyticus* consortium via genes screening[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(7): 1031-1040.
- [10] Wang Y, Li HC, Liu Y, Zhou MY, Ding MZ, Yuan YJ. Construction of synthetic microbial consortia for 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(1): 481-489.
- [11] 冯树, 张舟, 张成刚, 张忠泽. 混合培养中巨大芽孢杆菌对氧化葡萄糖酸杆菌的作用[J]. *应用生态学报*, 2000, 11(1): 119-122.
Feng S, Zhang Z, Zhang CG, Zhang ZZ. Effect of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mixed culture[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(1): 119-122 (in Chinese).
- [12] Jia N, Ding MZ, Gao F, Yuan YJ. Comparative genomics analysis of the companion mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Bc601 and *Bacillus endophyticus* Hbc603 in bacterial consortium[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28794.
- [13] Zhang J, Zhou JW, Liu J, Chen KJ, Liu LM, Chen J. Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonicigenium vulgare* and *Bacillus megaterium*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(7): 4807-4814.
- [14] 满都拉, 杨伟超, 张忠泽, 徐慧. 一种用于培养混合微生物的装置及其培养方法: CN104560688B[P]. 2016-05-04.
Man DL, Yang WC, Zhang ZZ, Xu H. A device for culturing mixed microorganisms and its culture method: CN104560688B[P]. 2016-05-04 (in Chinese).
- [15] Yang K, Huang JY, Zhou P, Wang Y, Xing N, Yang J, Lin KX, Sun YF, Lin HB, Li R. The progressive application of single-cell RNA sequencing technology in cardiovascular diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 154: 113604.
- [16] Sarker B, Matiur Rahaman M, Alamin MH, Ariful Islam M, Nurul Haque Mollah M. Boosting edgeR (Robust) by dealing with missing observations and gene-specific outliers in RNA-Seq profiles and its application to explore biomarker genes for diagnosis and therapies of ovarian cancer[J]. *Genomics*, 2024, 116(3): 110834.
- [17] Yan HY, Wang SJ, Liu HC, Mamitsuka H, Zhu SF. GORetrieve: reranking protein-description-based GO candidates by literature-driven deep information retrieval for protein function annotation[J]. *Bioinformatics*, 2024, 40(Suppl 2): ii53-ii61.
- [18] Bu DC, Luo HT, Huo PP, Wang ZH, Zhang S, He ZH, Wu Y, Zhao LH, Liu JJ, Guo JC, Fang SS, Cao WC, Yi L, Zhao Y, Kong L. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W317-W325.
- [19] Xu A, Yao J, Yu L, Lv S, Wang J, Yan B, Yu Z. Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(6): 1317-1323.
- [20] 吕淑霞, 牛建双, 马镛, 张良, 陈宏权, 张忠泽. VC混菌发酵中大菌不同胞外组分对小菌的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(5): 700-704.

- Lü SX, Niu JS, Ma D, Zhang L, Chen HQ, Zhang ZZ. Effect of different components of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mix-cultured of vitamin C fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(5): 700-704 (in Chinese).
- [21] 焦迎晖, 张惟材, 谢莉, 袁红杰, 陈梦霞. 维生素C发酵中伴生菌对氧化葡萄糖杆菌的影响[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(5): 35-38.
Jiao YH, Zhang WC, Xie L, Yuan HJ, Chen MX. Effects of *Bacillus cereus* on *Gluconobacter oxydans* in vitamin C fermentation process[J]. *Microbiology China*, 2002, 29(5): 35-38 (in Chinese).
- [22] Kouzuma A, Kato S, Watanabe K. Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 477.
- [23] Vicente JB, Ehrenkauf GM, Saraiva LM, Teixeira M, Singh U. *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis[J]. *Cellular Microbiology*, 2009, 11(1): 51-69.
- [24] Reniere ML. Reduce, induce, thrive: bacterial redox sensing during pathogenesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(17): e00128.
- [25] Pezzoni M, Tribelli PM, Pizarro RA, López NI, Costa CS. Exposure to low UVA doses increases *KatA* and *KatB* catalase activities, and confers cross-protection against subsequent oxidative injuries in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 2016, 162(5): 855-864.
- [26] 吕淑霞, 廖林, 张云鹤. Vc混菌发酵中伴生菌解除产酸菌氧化胁迫的研究进展[J]. *沈阳农业大学学报*, 2017, 48(6): 641-646.
Lü SX, Liao L, Zhang YH. Research progress on the oxidative stress relieving of acid-producing strain by companion strain in vitamin C mixed cultures fermentation[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2017, 48(6): 641-646 (in Chinese).
- [27] Rosenthal AZ, Qi YT, Hormoz S, Park J, Li SH, Elowitz MB. Metabolic interactions between dynamic bacterial subpopulations[J]. *eLife*, 2018, 7: e33099.
- [28] 宁哲, 胡波, 武改芳, 孙园园, 何颖, 于豪冰, 刘小宇. 微生物混合培养次级代谢产物及其生物活性研究进展[J]. *中国海洋药物*, 2024, 43(5): 76-86.
Ning Z, Hu B, Wu GF, Sun YY, He Y, Yu HB, Liu XY. Progress in research of secondary metabolites and their biological activities in microbial co-culturing[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2024, 43(5): 76-86 (in Chinese).
- [29] Eggert T, Brockmeier U, Dröge MJ, Quax WJ, Jaeger KE. Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 225(2): 319-324.
- [30] Wang CY, Li Y, Gao ZW, Liu LC, Wu YC, Zhang MY, Zhang TY, Zhang YX. Reconstruction and analysis of carbon metabolic pathway of *Ketogulonicigenium vulgare* SPU B805 by genome and transcriptome[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 17838.
- [31] Fan SC, Zhang ZY, Zou W, Huang Z, Liu J, Liu LM. Development of a minimal chemically defined medium for *Ketogulonicigenium vulgare* WSH001 based on its genome-scale metabolic model[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 169: 15-22.
- [32] Di Stefano M, Conforti L. Diversification of NAD biological role: the importance of location[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(19): 4711-4728.
- [33] 李冬. 氧化葡萄糖酸杆菌中山梨酮/山梨糖脱氢酶的结构功能解析与改造[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
Li D. Structural and functional analysis and engineering of L-sorbose/L-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [34] 贾楠. 比较基因组及代谢组对酮古龙酸杆菌及其伴生菌的解析[D]. 天津: 天津大学, 2016.
Jia N. Comparative genomics and metabolomics analysis of *Ketogulonicigenium vulgare* and companion *Bacillus* strain[D]. Tianjin: Tianjin University, 2016 (in Chinese).
- [35] Ding MZ, Zou Y, Song H, Yuan YJ. Metabolomic analysis of cooperative adaptation between co-cultured *Bacillus cereus* and *Ketogulonicigenium vulgare*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94889.
- [36] Jia N, Ding MZ, Du J, Pan CH, Tian G, Lang JD, Fang JH, Gao F, Yuan YJ. Insights into mutualism mechanism and versatile metabolism of *Ketogulonicigenium vulgare* Hbe602 based on comparative genomics and metabolomics studies[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23068.
- [37] Leduc S, de Troostembergh JC, Lebeault JM. Folate requirements of the 2-keto-L-gulonic acid-producing strain *Ketogulonicigenium vulgare* LMP P-20356 in L-sorbose/CSL medium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(2): 163-167.
- [38] 潘才惠. 工程化改造酮古龙酸杆菌强化混菌间的互作关系[D]. 天津: 天津大学, 2017.
Pan CH. The engineered *Ketogulonicigenium vulgare* enhanced interaction with companion *Bacillus* strain[D]. Tianjin: Tianjin University, 2017 (in Chinese).
- [39] Jia N, Du J, Ding MZ, Gao F, Yuan YJ. Genome sequence of *Bacillus endophyticus* and analysis of its companion mechanism in the *ketogulonicigenium vulgare*-*Bacillus* strain consortium[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135104.
- [40] 张静. 基于生化策略与组学技术的维生素C生产菌株间生理关系解析[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
Zhang J. Analysis of physiological relationship between vitamin C producing strains based on biochemical strategy and omics techniques[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
- [41] 阮丽娟, 胡忠策, 郑裕国. 抗氧化剂 α -硫辛酸的生物合成研究进展[J]. *精细与专用化学品*, 2012, 20(7): 49-53.
Ruan LJ, Hu ZC, Zheng YG. Research advances in biosynthesis of alpha-lipoic acid for antioxidant[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2012, 20(7): 49-53 (in Chinese).
- [42] Al-Ssum RM, White PJ. Effects of biotin deficiency on growth, morphology and sporulation in *Bacillus megaterium* NCIB7581[J]. *Journal of General Microbiology*, 1977, 99(2): 343-351.
- [43] Lin HW, Kwan AL, Dutcher SK. Synthesizing and salvaging NAD: lessons learned from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(9): e1001105.
- [44] Begley TP, Kinsland C, Mehl RA, Osterman A, Dorrestein P. The biosynthesis of nicotinamide adenine

- dinucleotides in bacteria[J]. *Vitamins and Hormones*, 2001, 61: 103-119.
- [45] 吕淑霞, 张云鹤, 白玲, 张林, 杨宇. 维生素C前体2-酮基-L-古龙酸二步混菌发酵研究新进展[J]. *微生物学杂志*, 2015, 35(3): 1-8.
Lü SX, Zhang YH, Bai L, Zhang L, Yang Y. New progress on two-step mixed cultures fermentation for 2-KGA production of vitamin C precursor[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 35(3): 1-8 (in Chinese).
- [46] 王东濠, 蔡晓琴, 罗怀容, 吴桂生. 支链氨基酸对生理功能影响的研究进展[J/OL]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 2025: 1-11. <https://link.cnki.net/urlid/51.1699.N.20250710.1721.003>.
Wang DH, Cai XQ, Luo HR, Wu GS. Advances in the research of branched-chain amino acids in physiological functions[J/OL]. *Journal of China West Normal University (Natural Sciences)*, 2025: 1-11. <https://link.cnki.net/urlid/51.1699.N.20250710.1721.003> (in Chinese).
- [47] Wang CY, Li Y, Gao ZW, Liu LC, Zhang MY, Zhang TY, Wu CF, Zhang YX. Establishing an innovative carbohydrate metabolic pathway for efficient production of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonicigenium robustum* initiated by intronic promoters[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 81.
- [48] Nikiforov MA, Chandriani S, O'Connell B, Petrenko O, Kotenko I, Beavis A, Sedivy JM, Cole MD. A functional screen for myc-responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(16): 5793-5800.
- [49] Wang J, Alexander P, Wu L, Hammer R, Cleaver O, Mcknight SL. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism[J]. *Science*, 2009, 325(5939): 435-439.
- [50] Xu YY, Ren J, Wang W, Zeng AP. Improvement of glycine biosynthesis from one-carbon compounds and ammonia catalyzed by the glycine cleavage system *in vitro*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2022, 22(1): 40-53.
- [51] Hiraga K, Kikuchi G. The mitochondrial glycine cleavage system. functional association of glycine decarboxylase and aminomethyl carrier protein[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(24): 11671-11676.
- [52] Hong Y, Ren J, Zhang XY, Wang W, Zeng AP. Quantitative analysis of glycine related metabolic pathways for one-carbon synthetic biology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 70-78.
- [53] Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia[J]. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*, 2008, 84(7): 246-263.
- [54] Fung Kin Yuen V, Tan Zhi Jun D, Zhou K. Improving glycine utilization in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 193: 108834.
- [55] Okamura-Ikeda K, Ohmura Y, Fujiwara K, Motokawa Y. Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 216(2): 539-548.
- [56] 高媛, 曾伟主, 周景文, 陈坚. 普通生酮基古龙酸菌中山梨糖脱氢酶和山梨酮脱氢酶的纯化及酶学性质分析[J]. *微生物学报*, 2017, 57(10): 1546-1554.
Gao Y, Zeng WZ, Zhou JW, Chen J. Purification and characterization of L-sorbose dehydrogenase and L-sorbose dehydrogenase from *Ketogulonicigenium vulgare* WSH-001[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(10): 1546-1554 (in Chinese).
- [57] Tanner JJ. Structural biology of proline catabolism[J]. *Amino Acids*, 2008, 35(4): 719-730.
- [58] Zapras A, Bleisteiner M, Kerres A, Hoffmann T, Bremer E. Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 250-259.
- [59] Zhang L. Reactive oxygen species homeostasis and proline catabolism [D]. Lincoln: The University of Nebraska-Lincoln, 2015.
- [60] Gao Y, Yuan YJ. Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-L-gulonic acid fermentation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(18): 9845-9853.
- [61] Huang M, Zhang YH, Yao S, Ma D, Yu XD, Zhang Q, Lyu SX. Antioxidant effect of glutathione on promoting 2-keto-L-gulonic acid production in vitamin C fermentation system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(5): 1383-1395.
- [62] Huang Z, Zou W, Liu J, Liu LM. Glutathione enhances 2-keto-L-gulonic acid production based on *Ketogulonicigenium vulgare* model iWZ663[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(4): 454-460.
- [63] Ma Q, Zhang WW, Zhang L, Qiao B, Pan CS, Yi H, Wang LL, Yuan YJ. Proteomic analysis of *Ketogulonicigenium vulgare* under glutathione reveals high demand for thiamin transport and antioxidant protection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32156.
- [64] Zhou J, Yi H, Wang LL, Zhang WW, Yuan YJ. Metabolomic analysis of the positive effects on *Ketogulonicigenium vulgare* growth and 2-keto-L-gulonic acid production by reduced glutathione[J]. *Omics*, 2012, 16(7/8): 387-396.
- [65] 晁碧辉, 宋万明, 李瑶兰, 杨竹青. 生物素对动物糖、脂代谢的影响及其作用机制[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(6): 3511-3518.
Chao BH, Song WM, Li YL, Yang ZQ. Effects and mechanisms of biotin on glucose and lipid metabolism in animals[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(6): 3511-3518 (in Chinese).
- [66] London J, Knight M. Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms[J]. *Journal of General Microbiology*, 1966, 44(2): 241-254.