

Abstract

Project Code: TRG5780194

Project Title: Probing mechanisms of and improving *n*-butanol tolerance in *B. subtilis* using an untargeted metabolomics approach

Investigator:

Dr. Nawaporn Vinayavekhin	Department of Chemistry, Faculty of Science, CU
Assoc. Prof. Dr. Alisa Vangnai	Department of Biochemistry, Faculty of Science, CU
Assoc. Prof. Dr. Polkit Sangvanich	Department of Chemistry, Faculty of Science, CU

E-mail Address: nawaporn.v@chula.ac.th

Project Period: June 2, 2014 – June 1, 2016

Abstract:

1-Butanol has been utilized widely in industry and can be produced or transformed by microbes. However, current knowledge about the mechanisms of 1-butanol tolerance in bacteria remains quite limited. In this research project, we applied untargeted metabolomics to study *Bacillus subtilis* cells under 1-butanol stress and identified 55 and 37 ions with significantly increased and decreased levels, respectively. Using accurate mass determination, tandem mass spectra, and synthetic standards, 86% of these ions were characterized. The levels of phosphatidylethanolamine, diglucosyldiacylglycerol and phosphatidylserine were found to be upregulated upon 1-butanol treatment, whereas those of diacylglycerol and lysyl phosphatidylglycerol were downregulated. Most lipids contained 15:0/15:0, 16:0/15:0 and 17:0/15:0 acyl chains, and all were mapped to membrane lipid biosynthetic pathways. Subsequent two-stage quantitative real-time reverse transcriptase PCR analyses of genes in the two principal membrane lipid biosynthesis pathways revealed elevated levels of *ywiE* transcripts in the presence of 1-butanol and reduced expression levels of *cdsA*, *pgsA*, *mprF*, *clsA* and *yfnI* transcripts. Thus, the gene transcript levels showed agreement with the metabolomics data. Lastly, the cell morphology was investigated by scanning electron microscopy, which indicated that cells became almost two-fold longer after 1.4 % (v/v) 1-butanol stress for 12 h. Overall, the studies uncovered changes in the composition of glycerolipids and phospholipids in *B. subtilis* under 1-butanol stress, emphasizing the power of untargeted metabolomics in the discovery of new biological insights. The obtained knowledge from this project provides a good basis for further studying 1-butanol tolerance mechanisms, as well as engineering *B. subtilis* to be more tolerance to 1-butanol in the future.

(Most contents presented in this report were adapted from the published article; the final publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6692-0>.)

Keywords: metabolomics, *Bacillus subtilis*, 1-butanol tolerance, membrane lipids

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780194

ชื่อโครงการ: การศึกษากลไกและพัฒนากาหนดต่อ *n*-butanol ของ *B. subtilis* โดยใช้วิธีการเมตาบอลิซึมอย่างไม่เจาะจง

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน:

อาจารย์ ดร.นวพร วินยเวทิน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ดร.อลิสสา วั่งใน

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: nawaporn.v@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 มิถุนายน 2557 – 1 มิถุนายน 2559

บทคัดย่อ:

1-บิวทานอลเป็นสารที่ใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรม และสามารถผลิตหรือเปลี่ยนรูปได้โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ความรู้เกี่ยวกับกลไกความทนต่อ 1-บิวทานอลในแบคทีเรียยังคงค่อนข้างจำกัด โครงการวิจัยนี้จึงประยุกต์ใช้วิธีเมตาบอลิซึมอย่างไม่เจาะจงเพื่อศึกษาเซลล์บาซิลลัส ซับทีลีส ภายใต้ความเครียดจาก 1-บิวทานอล และระบุไอออนจำนวน 55 และ 37 ไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นและน้อยลงเมื่ออยู่ได้สภาวะนี้ตามลำดับ 86 เปอร์เซนต์ของไอออนจำนวนนี้ได้รับการระบุเอกลักษณ์โดยใช้ข้อมูลค่ามวลแม่นยำ แทนเต็มแมสสเปกตรัม และการเทียบค่ากับสารมาตรฐาน สารฟอสฟาติลเอทานอลามีน ไดกลูโคซิลไดเอซิลกลีเซอรอล และฟอสฟาติลซิทรีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมี 1-บิวทานอล ในภาชนะเลี้ยงเชื้อ ส่วนไดเอซิลกลีเซอรอลและไลซิลฟอสฟาติลซิทรีนมีปริมาณลดลง ไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วยไซเอซิล 15:0/15:0, 16:0/15:0 และ 17:0/15:0 และอยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์ของเมมเบรนลิพิด การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้เพื่อลิเมอเรสแบบเวลาจริงของยีนในวิถีชีวสังเคราะห์ของเมมเบรนลิพิด 2 วิถีหลัก แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของยีน *ywiE* เมื่อมี 1-บิวทานอล และการลดลงของยีน *cdsA*, *pgsA*, *mprF*, *clsA* และ *yfnI* การเปลี่ยนแปลงของปริมาณยีนนี้สอดคล้องกับข้อมูลเมตาบอลิซึม สุดท้าย การศึกษาฐานวิทยาศาสตร์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำให้ทราบว่า เซลล์ยาวขึ้นเกือบ 2 เท่า หลังอยู่ภายใต้ความเครียดจาก 1-บิวทานอล ปริมาณ 1.4 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยภาพรวม การวิเคราะห์เมตาบอลิซึมอย่างไม่เจาะจงแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกลีเซอโรลิพิดและฟอสโฟลิพิดในบาซิลลัส ซับทีลีส ภายใต้ความเครียดจาก 1-บิวทานอล ซึ่งเน้นย้ำให้เห็นถึงความสามารถของเมตาบอลิซึมอย่างไม่เจาะจงในการค้นพบความเข้าใจอย่างลึกซึ้งทางชีววิทยาใหม่ๆ องค์ความรู้ที่ได้ในงานวิจัยนี้จะเอื้อต่อการนำไปศึกษากลไกและพัฒนากาหนดต่อ 1-บิวทานอลของบาซิลลัส ซับทีลีสในเชิงลึกต่อไป

คำหลัก: เมตาบอลิซึม, บาซิลลัส ซับทีลีส, การทนต่อ 1-บิวทานอล, เมมเบรนลิพิด