

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-030

枯草芽孢杆菌底盘细胞的设计、构建与应用

林璐¹, 吕雪芹¹, 刘延峰¹, 堵国成¹, 陈坚², 刘龙¹¹ 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122; ² 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 作为一种重要的模式工业微生物和食品安全微生物, 枯草芽孢杆菌在工业酶和功能营养品的生产方面具有广泛应用。近年来, 随着对枯草芽孢杆菌遗传调控机制的不断揭示, 多种研究策略和技术, 包括基因编辑系统、基因回路、空间支架、无细胞表达系统等, 被用于设计和构建枯草芽孢杆菌底盘细胞高效合成各种生物化学产品。本文首先对基于基因编辑和基于内源性调控系统的枯草芽孢杆菌底盘细胞设计与构建的策略进行了系统的概述。然后, 以高产 *N*-乙酰氨基葡萄糖、七烯甲萘醌、核黄素、透明质酸和 β -环糊精糖基转移酶为例介绍了枯草芽孢杆菌底盘细胞工厂的应用。最后, 从基因编辑效率提升、基因回路响应信号拓展和基因组设计与重构三方面对枯草芽孢杆菌底盘细胞的设计、构建与应用进行了展望。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 底盘细胞; 基因组简化; 基因回路; 基因编辑

中图分类号: Q819

文献标志码: A

Advances in design, construction and applications of *Bacillus subtilis* chassis cellsLIN Lu¹, LV Xueqin¹, LIU Yanfeng¹, DU Guocheng¹, CHEN Jian², LIU Long¹¹Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ²Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: As a model industrial host and an important generally recognized as safe microorganism, *Bacillus subtilis* has been used for a wide range of applications such as the industrial production of enzymes and nutraceuticals. In recent years, with the elucidation of the genetic regulation mechanism of *B. subtilis*, various research strategies and technologies have been designed and developed with this chassis, including gene editing, gene circuits, spatial biomolecular scaffold and cell-free expression systems. In this review, we start with systematic summaries on the construction of *B. subtilis* chassis based on gene editing systems and endogenous regulatory mechanisms. Then applications of *B. subtilis* cell factories are discussed for producing *N*-acetylglucosamine, menaquinone-7, riboflavin,

收稿日期: 2020-03-13 修回日期: 2020-04-08

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金 (31622001); 国家重点研发计划 (2018YFA0900300)

引用本文: 林璐, 吕雪芹, 刘延峰, 堵国成, 陈坚, 刘龙. 枯草芽孢杆菌底盘细胞的设计、构建与应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(2): 247-265

Citation: LIN Lu, LV Xueqin, LIU Yanfeng, DU Guocheng, CHEN Jian, LIU Long. Advances in design, construction and applications of *Bacillus subtilis* chassis cells[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(2): 247-265

hyaluronic acid and β -cyclodextrin glycosyltransferase. Finally, prospects for the design, construction and applications of engineered *B. subtilis* strains are commented, with an emphasis on improving genome editing efficiency, expanding responsive metabolite spectrum for genetic circuits, and rewiring the whole genome.

Key words: *Bacillus subtilis*; chassis cell; reduced genome; gene circuit; gene editing

合成生物学是在基因工程的基础上整合了电子学、计算机学、数学等多门学科的内容,主要通过DNA合成、代谢途径的组装和基因回路的设计等方面来构建新的代谢途径,或者从头合成全新的微生物基因组^[1]。代谢工程旨在优化和重编程细胞代谢网络来增强目标产物的合成或赋予细胞合成新的生物化学品,侧重先整体分析,后局部分析,再到代谢节点进行遗传改造^[2]。近年来,基于合成生物学方法和代谢工程技术构建的微生物底盘细胞已经被广泛应用于生产各种天然高附加值化学品、优质清洁能源和生物材料^[3]。

作为一种典型的革兰氏阳性细菌和模式工业微生物,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)具

有非致病性、强大的胞外分泌蛋白能力以及无明显的密码子偏爱性等优点,并且是一种GRAS(generally recognized as safe)级食品安全宿主菌,在功能营养品、精细化学品和酶制剂的生产中具有广泛应用^[4]。然而,相较于大肠杆菌(*Escherichia coli*),*B. subtilis*底盘细胞的开发还存在较明显的滞后^[5]。因此,设计和构建性能优良的*B. subtilis*底盘细胞具有重要的科学意义与应用价值。本文作者针对近年来*B. subtilis*底盘细胞的设计和构建策略进行了系统的总结和讨论(表1),并通过五个案例详细介绍了*B. subtilis*底盘细胞的实际应用,最后对*B. subtilis*底盘细胞的发展趋势进行了展望。

表1 *B. subtilis*底盘细胞的构建方法

Tab. 1 Methods for the construction of chassis cell in *B. subtilis*

类别	构建方法	功能特性	文献
基因编辑	基因组简化	利用无痕基因敲除技术构建多种基因组简化菌株	[6]
	CRISPR/Cas9迭代系统	实现基因敲除、点突变和基因敲入,避免脱靶效应	[7]
	CRISPR-Cas9工具包	实现基因敲除、多基因敲入和转录抑制	[8]
	CAMERS-B系统	通过设计crRNA阵列实现多基因编辑和调控	[9]
	内源性启动子库	基于细胞生长构建的内源性启动子文库	[10]
	模块化操作单元	在转录翻译和蛋白水解水平上共同调节基因和蛋白的表达	[11]
	DNA支架	通过DNA支架调节途径酶的空间比例和方向	[12]
	RNA支架	通过RNA支架与特异性蛋白结合,转录抑制靶基因的表达	[13]
	内源性空间支架	通过FMMs空间支架构建FMMs-多酶复合物系统	[14]
	无细胞蛋白表达系统	以外源DNA为模板,利用细胞裂解物,可在体外表达蛋白质	[15]
基因回路	<i>glmS</i> 核糖开关	基于GlcN6P响应的天然 <i>glmS</i> 核糖开关	[16]
	配体-适体生物传感器	基于配体凝血酶设计的双功能基因表达调控电路	[17]
	ADC系统	基于生物传感器、CRISPR和合成基因回路的代谢流量动态自发双重调控(autonomous dual control,ADC)系统	[18]
内源性调控系统	Sec分泌途径	通过改善Sec分泌途径,提高异源蛋白的分泌	[19-20]
	群体感应系统	细胞密度达到阈值,动态调节相关基因的表达	[21-22]
	I型毒素-抗毒素系统	通过抗毒素反义RNA与毒素mRNA互补配对,下调基因的表达	[23]
	碳分解代谢阻遏作用	解除碳分解代谢阻遏作用,细胞可同时利用多种碳源	[24]

1 基于基因编辑的 *B. subtilis* 底盘细胞

1.1 基因组简化技术

近年来, 最小基因组的研究加深了人们对 *B. subtilis* 细胞功能及生命进化规律的认识。然而, 最小基因组的底盘细胞通常只能维持细胞的基本代谢, 并不一定具有生长快、抗逆性强等有利性状^[25]。因此, 需要针对性地简化 *B. subtilis* 基因组, 去除非必需代谢途径的干扰, 以降低基因组的复杂度, 提高 *B. subtilis* 对底物和能量的利用效率以及细胞遗传稳定性和生理表型的可控制性, 使其作为生产天然代谢产物或表达异源蛋白的理想宿主细胞。在过去的十多年里, 研究人员利用同源重组技术敲除 *B. subtilis* 基因组的非必需基因, 自上而下获得了一系列 *B. subtilis* 基因组简化菌株。Westers 等^[26] 通过删除 *B. subtilis* 基因组上 5 个噬菌体区域 (*SPβ*、*PBSX*、*pro1*、*pro6*、*skin*) 和 *pks* 操纵子区域, 获得了一个缺少 7.7% 基因组的 *B. subtilis* Δ6 突变株, 相比野生型 *B. subtilis* 168, *B. subtilis* Δ6 的细胞表型没有明显的变化。Takuya 等^[27] 也通过基因敲除的方法, 从亲本菌株 MGB469 中删除了 11 个长度在 11~195 kb 的可分配区域, 获得了一株缺失 874 kb (20%) 基因序列的基因组简化菌株 *B. subtilis* MGB874。与亲本菌株相比, MGB874 在 LB 培养基中与亲本菌株具有相似的生长速率。但在碳源利用方面, MGB874 菌株具有较高的麦芽糖利用率。有趣的是, 将用于表达纤维素酶和蛋白酶的质粒 (pHYS237 和 pHP237-K16) 转化到 MGB874 菌株后, 两种酶的活性分别比亲本菌株高出 1.7 倍和 2.5 倍。研究人员进一步通过转录组学分析发现, MGB874 菌株基因表达的转录调控在指数生长过程中受到干扰, 进入稳定生长阶段后出现重组。尽管尚不清楚这种重组现象是多重基因缺失引起的转录调控协同作用, 还是转录调控中的几个重要转录因子导致, 但 MGB874 菌株进入稳定期后基因表达调控出现重组, 从而可以提高胞外纤维素酶和蛋白酶的活性, 有助于开发用于生产其它工业酶的 *B. subtilis* 底盘细胞。而基于转录组学的分析, 即通过基因功能信息和比较基因组学方法引入合理的基因缺

失, 以期产生可预测的细胞, 可为 *B. subtilis* 底盘细胞的开发提供新思路。

最近, 李扬^[6] 利用无痕删除技术逐步删除了 *B. subtilis* 168 基因组上的 4 个噬菌体区域 (*pro1*~*6*、*spβ*、*skin*、*PBSX*)、2 个操纵子区域 (*pps*、*pks*) 以及基因组上的部分非必需基因 (*ycxB-sipU*、*yisB-yitD*、*pdp-rocR*、*yrkS-yraK*、*yybP-yyaJ*、*ydeK-ydjC*、*lytH-yurT*、*sboA-ywhH*), 获得了一系列精简程度不同的基因组简化菌株。在此基础上, 以代表性基因组简化菌株作为底盘, 分别引入特定目标产物的途径修饰, 可以获得生产不同代谢产物的 *B. subtilis* 底盘细胞。比如, 引入 *acoA*、*bdhA* 基因缺失突变, 与同等修饰的对照菌株相比, 基因组简化菌株产乙偶姻的产量和得率均有所提高; 在简化菌株 BSK756、BSK814 和出发菌株 BSF1 中, 敲除 *purA* 基因, 过表达 *prs*、*purF* 和 *guaB* 基因, 菌株 BSK814G2 的鸟苷产量达到 115.2 mg/L, 是对照菌株的 4.4 倍; 以简化菌株 BSK756 为对象, 引入胸苷合成相关基因修饰, 敲除 *tdk* 基因, 过表达 *prs*、*ushA*、*thyA*、*dut* 和 *ndk* 基因, 菌株 BSK756T3 的胸苷产量达到 151.2 mg/L, 相比野生型菌株增加了 5.2 倍; 在简化菌株 BSR563 的基础上, 过表达 *purF* 基因和 *pur* 核黄素操纵子, 获得了 BSR563R5 菌株, 与对照菌株 BSR0R5 相比, 核黄素的产量增加了 77%。因此, 在基因组简化菌株的基础上, 引入特定产物的途径修饰, 可以构建用于生产天然代谢产物的 *B. subtilis* 底盘细胞。

1.2 CRISPR 基因编辑技术

通过传统 Cre/loxP 等同源重组产生的基因组缺失片段依赖于抗性基因的插入, 并且在去除靶基因后, 基因组上会留下一段外源 DNA 痕迹, 这在一定程度上影响了 *B. subtilis* 在食品发酵方面的应用。基于间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences, CRISPR) 的基因编辑工具是目前最受欢迎的一种基因编辑技术, 利用 CRISPR 技术可以对微生物进行多基因的精确编辑和调控。CRISPR 基因编辑系统是通过引导 RNA (sgRNA) 引导 Cas 蛋白 (如

Cas9、Cpf1等)定位到靶基因位点,随后Cas蛋白在基因组的特定位点对DNA进行切割,造成DNA双链断裂(double strand break, DSB),在同源性定向修复(homology-directed repair, HDR)过程中通过同源臂将特定修饰的片段引入基因组,从而实现基因的敲除、插入或突变,这种方法克服了传统同源重组的不足,可以在*E. coli*和*B. subtilis*等模式菌株产生无外源DNA痕迹的突变体^[28]。

利用CRISPR编辑技术,研究人员通过设计多种sgRNA同时定位到多达6个不同的靶基因位点进行基因编辑,编辑效率从2%到90%不等^[29]。此外,将核酸缺陷型蛋白(dCas蛋白)与CRISPR蛋白的功能结构域融合可以实现对靶基因的转录激活和抑制作用^[30]。因此,CRISPR这项编辑技术为设计和构建*B. subtilis*底盘细胞提供了一个有效的技术前提,可以对*B. subtilis*基因组上的任意基因进行编辑或调控。

1.2.1 CRISPR/Cas基因编辑系统

尽管应用CRISPR/Cas9系统可以敲除*B. subtilis*的基因组大片段,但CRISPR系统的脱靶效应使得敲除基因片的效率很低。为提高基因敲除的效率,So等^[7]通过将靶基因*ppsA*和*ppsE*的sgRNA设计在一起,可以使*pps*操纵子(*ppsABCDE*)的N端和C端都产生DSB,导致CRISPR/Cas9介导的基因组大片段敲除的效率提升至16.7%,相比通过反选择标记系统^[31]导致*pps*操纵子缺失的效率(6.4%)更高。为进一步提高*pps*操纵子的敲除效率,研究人员构建了由包含Cas蛋白(SpCas9)和靶向基因sgRNA的质粒pHCas9以及包含供体DNA模板的质粒pBOA构成的迭代系统,将pHCas9和pBOA转入*B. subtilis* 168中可以产生稳定的SpCas9/sgRNA核酸内切酶复合物,它能在适当的选择压力下长时间孵育,导致“反复”靶向敲除区域,使DSB发生在靶标区域上,直到产生所需的基因缺失片段为止,最终使*pps*操纵子的敲除效率提高至80%。此外,应用这种迭代系统还可以使单基因敲除效率高达100%,使点突变效率达到68%,以及使基因敲入效率达到97%。这项研究通过pHCas9和pBOA两个质粒构建的迭代系统,有助于高效编辑*B.*

*subtilis*基因组上的各种基因。

1.2.2 CRISPRa/CRISPRi基因调控系统

目前已有各种RNA修饰的基因调控工具,如顺式核糖开关^[32]、反义RNA(asRNAs)^[33]或其他非编码RNA(sRNAs)^[34]用于募集蛋白的结构域,以调节基因的表达,但是这些工具存在一定的局限性。比如,顺式核糖开关需要对靶基因的上游序列进行修饰;合成asRNAs需要筛选大量的内源性调控RNA,这种筛选过程需要耗费大量时间,从而限制了其在代谢工程和遗传筛选中的应用。而在CRISPRa/CRISPRi系统中(图1),缺陷型核酸酶(dCas蛋白)不切割DNA,而是与转录阻遏域融合,形成的RNA-蛋白质复合物被引导到靶基因的转录起始位点(TSS)以抑制其转录^[35];或与支架RNA(scRNA)结合,scRNA是一种修饰的gRNA,既编码靶序列又编码RNA发夹,它可以募集转录激活因子或与转录激活域融合,使RNA-蛋白质复合物在TSS位点激活靶基因的转录^[36]。

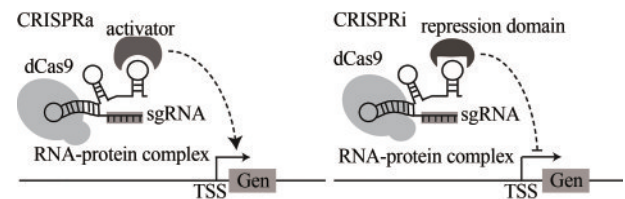


图1 CRISPRa/CRISPRi系统转录激活和抑制的示意图

Fig. 1 Transcriptional activation and inhibition by the CRISPRa/CRISPRi system

(1) CRISPR-Cas9工具包 随着CRISPR技术的不断发展,CRISPR/Cas9系统已被用于多基因的编辑和调控中。最近,Westbrook等^[8]开发了用于*B. subtilis*基因编辑的CRISPR-Cas9工具包,可实现靶向单基因敲除、多基因敲入、连续基因组编辑和基因转录抑制。首先,研究人员展示了基于反选择标记的新型gRNA转录和传递系统的高编辑效率,该程序具有连续基因组编辑的能力,包括用于基因敲除和特异性突变的基因敲入。随后,研究人员通过Biobrick组装方法构建了一个多gRNA传递载体,能同时编辑基因组靶标*amyE*和*ugtP*;最后,研究人员将gCas传递载体与dCas9一起用于转录干扰,将异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导的*lacZ*基因整合至*ugtP*基因座,

通过木糖诱导表达 dCas9 后, 实现了 *lacZ* 的转录抑制。这项研究设计的 CRISPR-Cas9 工具包为 *B. subtilis* 多基因编辑提供了一种技术工具, 可以应用到 *B. subtilis* 的代谢调控中。

(2) CAMERS-B 系统 CRISPR/Cas 系统除利用 Cas9 蛋白外, 还可以利用 Cpf1 蛋白进行基因调控。Cpf1 蛋白可以将前体 CRISPR RNA (pre-crRNA) 加工成成熟的 crRNA, 并且不需要反式激活 crRNA (tracrRNA), 因此, 可以通过设计 crRNA 阵列实现多基因编辑和调控^[37]。最近, Wu 等^[9] 通过设计 crRNA 阵列在 *B. subtilis* 中构建了一种基于 CRISPR/Cpf1 的多基因编辑和转录调控系统 (CAMERS-B), 不仅可以实现 *B. subtilis* 中双基因敲除、多点突变或单基因插入, 还可以对多个基因进行转录抑制和激活。首先, 研究人员创建了一种 SOMACA (synthetic oligos mediated assembly of crRNA aArray) 方法来组装 crRNA, 将 crRNA 阵列和同源修复模板构建到 pcrF11 质粒中。同时, 将来源于 *Francisella novicida* U112 的 Cpf1 和来源于 *Natronobacterium gregoryi* 的 Argonaute 蛋白 (NgAgo) 突变体一起引入到 *B. subtilis* 和 *E. coli* 的穿梭质粒 pHT01 上, 构建了可用于多基因编辑的 pHT-XCR6 质粒。最后, 通过 *B. subtilis* 非必需的蛋白酶基因 (*aprE*、*epr*、*nprE*、*bpr*、*mpr* 和 *nprB*) 验证了该系统的多重基因编辑效果, 可以实现 *B. subtilis* 中双基因敲除、多点突变和单基因插入。为同时实现转录抑制和激活功能, 研究人员进一步将包括 *B. subtilis* 的 I 类转录激活因子 (AbrB、ComA、MalR、ManR、RemA 和 Spo0A)、*B. subtilis* RNA 聚合酶亚基 (RpoE 和 RpoZ)、*E. coli* 来源的转录因子 SoxS 以及 *B. subtilis* 噬菌体 phi29 的 P4 蛋白在内的 10 种激活蛋白, 分别融合到 dCpf1 的 C 端, 并使用组成型启动子 P₄₃ 来表达荧光蛋白 sYFP2、mKate2 和 mTagBFP2, 以测试上述融合蛋白的多基因调控能力。结果发现, dCpf1 融合 RemA 的激活强度最高, 随后, 利用设计的 crRNA 阵列, 进一步证实了 dCpf1-RemA 融合蛋白具有同时抑制和激活 *B. subtilis* 多个基因的能力。最后, 将该 CAMERS-B 系统用于调控 *N*-乙酰氨基葡萄糖 (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) 和乙偶姻的

合成途径。在 GlcNAc 合成途径中, 将编码 6-磷酸氨基葡萄糖乙酰转移酶的基因 *GNAI* 整合到 *B. subtilis* 168 基因组中, 并使用强启动子 P_{veg} 替换编码 GlcN-6-磷酸合酶的基因 *glmS* 的启动子和核酶区域, 获得了 WGN2 菌株。在此基础上, 利用 CAMERS-B 系统进一步敲除 GlcNAc 的分解代谢基因 (*nagA*、*nagB*、*nagP* 和 *gamA*) 以及合成乳酸和乙酸的基因 (*ldh* 和 *pta*), GlcNAc 的产量增加了 1.51 倍, 达到 2195 mg/L。另外, 在乙偶姻合成途径中, 选择分解乙偶姻代谢途径的基因 (*bdhA* 和 *acoA*) 以及合成副产物乳酸和乙酸的基因 (*ldh* 和 *pta*) 作为转录抑制的靶标, 选择乙偶姻合成途径中的途径基因 *alsSD* 及其转录激活因子的基因 *alsR* 作为转录激活的靶标。通过构建针对 *bdhA*、*acoA*、*ldh*、*pta* 和 *alsR* 的 crRNA 阵列, 实现了 CAMERS-B 系统在乙偶姻合成相关途径中的转录抑制和激活, 从而使乙偶姻的产量提高了 44.8%, 达到 25.8g/L。因此, CAMERS-B 系统不仅具有用于改造 *B. subtilis* 生产多种营养化学品的潜力, 还为 *B. subtilis* 的基因组编辑和代谢工程改造提供了一种有效的工具。

1.3 基因调控元件与基因回路的设计

1.3.1 基本调节元件

在合成生物学中往往需要不同的调节元件作用于基因的转录和翻译阶段, 以调控基因或蛋白的表达。因此, 启动子、核糖体结合位点 (RBS)、SD 序列和终止子等基本调节元件的优化是调节相关基因和蛋白表达的基础。其中, 启动子是决定转录和表达的重要遗传物质, 可以对 *B. subtilis* 上的基因进行不同程度的调节 (表 2)。例如, Song 等^[10] 通过对 *B. subtilis* 内源性启动子的挖掘可以筛选出具有抗逆性的菌株, 能在环境胁迫条件下 (渗透压、高盐或高温) 维持细胞生长和产物表达。研究人员具体是通过筛选 *B. subtilis* 中热激蛋白、细胞膜蛋白和对有毒金属具有抗性的蛋白的启动子, 以绿色荧光蛋白 GFP 为报告蛋白, 经过热休克、高盐或乙醇处理后, 考察不同启动子在环境胁迫条件下相较于 P₄₃ 启动子的强度。结果表明, 大多菌株在高渗透压下培养时显示出增强的

荧光活性, 并且强启动子 P_{trnG} 表达的胞质蛋白 β -半乳糖苷酶和 α -淀粉酶的活性相比 P_{43} 表达这两种酶的活性都有显著增强。另外, 除优化基本调节元件外, 还可以组合优化不同的调节元件, 使它们在转录翻译或蛋白水解水平上共同调节基因的表达。比如, Guiziou 等^[11] 利用组成型启动子、RBS

和 SsrA 蛋白质降解标签文库, 构建了一个模块化的表达操作单元, 使 GFP 的表达水平展现了约 14 000 倍的动态范围, GFP 浓度从 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 到 700 $\mu\text{mol/L}$ 跨越五个数量级。因此, 利用这个表达操作单元, 可以不同程度地调节 *B. subtilis* 代谢途径上相关基因的表达。

表2 *B. subtilis* 表达系统常用的启动子

Tab. 2 Common promoters for the *B. subtilis* expression system

名称	类型	性质	文献
P_{43}	组成型	<i>B. subtilis</i> 中 <i>cdd</i> 基因的启动子, 能持续性高效表达基因	[38]
P_{HpaII}	组成型	来源于 <i>Staphylococcus aureus</i> 中的载体 pUB110	[39]
P_{laps}	组成型	人工构建的双启动子, 启动强度是 P_{43} 的 13 倍	[40]
P_{grac}	诱导型	IPTG 诱导, 由 <i>lac</i> 操纵子和 <i>groESL</i> 启动子融合而成	[41]
P_{xyI}	诱导型	受木糖诱导, 且受葡萄糖抑制	[42]
P_{sacB}	诱导型	受蔗糖诱导	[43]
P_{mtIA}	诱导型	受甘露醇诱导	[44]
P_{glv}	诱导型	受麦芽糖诱导	[45]
P_{amy}	诱导型	受淀粉诱导, 可以抵抗碳分解代谢物阻遏的启动子	[46]
P_{ohrB}	诱导型	受环境压力和葡萄糖匮乏诱导	[47]
P_{gsiB}	诱导性	受环境因素(热、盐、酸、乙醇、缺氧等)诱导	[48]
P_{rpsF}	时期特异型	在对数期被激活	[49]
P_{srfA}	时期特异型	在对数中后期被激活	[50]
P_{aprE}	时期特异型	在对数末期被激活	[51]
P_{cry3Aa}	时期特异型	在稳定期被激活	[52]
P_{manP}	自诱导型	适合于高密度发酵	[53]
P_{bs}	合成型	在 <i>E. coli</i> 、 <i>B. subtilis</i> 和 <i>S. cerevisiae</i> 均有活力的广谱启动子	[54]

1.3.2 空间支架

(1) 核酸支架 核酸分子作为遗传信息的载体具有很多优势, 比如, 通过锌指蛋白 (zinc-finger protein, ZFP) 或类转录激活因子 (transcription activator-like effectors, TALEs) 的核酸结合结构域, 可以提供 DNA/RNA-蛋白质的相互作用, 核酸分子短链可折叠形成各种结构或组装成二聚体或多聚体, 从而形成各种特定可编程的三维空间结构。因此, 利用核酸分子自我组装形成的生物支架, 具有很好的功能扩展性, 比如, 可以用于制作纳米生物材料, 或用作向人体递送抗病药物的“桥梁”^[55]。在合成生物学中, 基于核酸分子构建的 DNA 支架^[56] 和 RNA 支架^[57] 被广泛用于酶的空间组装以调节途径酶的比例和方向, 提高酶的催化效率; 或用于募集特异性蛋白, 调控合成途径上相关基因的表达。

DNA 支架用于途径酶的空间组装是一种具有潜力的翻译后策略, 通过调节酶的化学计量数, 可以控制合成途径中相关途径酶的代谢通量^[58]。例如, Liu 等^[12] 利用 DNA 支架对 *B. subtilis* GlcNAc 合成途径的两种关键途径酶的基因 *glmS* 和 *gnal* 在空间上按照 1:2 的比例进行组装优化后, 能有效增强这两种途径酶的协同催化作用, 使 GlcNAc 的产量提高至 4.55 g/L。这可能是由于 DNA 支架促进了途径酶在空间上的相互作用, 控制了中间代谢物的有效浓度, 最终增加了目标代谢产物的积累。

RNA 支架是一种人工合成的非编码 RNA 分子, 通过碱基配对规则进行合理设计, 可以折叠形成具有不同特征的适体结构域, 以募集通路酶或特异性蛋白来调控微生物的合成代谢^[59]。比如, 在 CRISPRa-CRISPRi 基因编辑系统中, 就是通过

设计合适的RNA支架,使支架上的适体域募集相应的转录因子,形成的RNA-蛋白质复合物被引导到转录起始位点以激活或抑制靶基因的转录^[60]。此外,由于来源于*E. coli*的MicC sRNA支架形成的二级结构可以有效阻断mRNA翻译,同时MicC sRNA支架可以通过结合Hfq蛋白增加抑制效率^[61]。基于此,Liu等^[13]将RNA支架成功应用于*B. subtilis* GlcNAc合成途径酶的调控上,通过设计anti-*pfk* sRNA和anti-*glmM* sRNA与Hfq共表达,能有效抑制GlcNAc合成竞争途径中糖酵解和肽聚糖合成模块的活性,单位细胞GlcNAc产率达到2.0 g/g(以干细胞重计)。因此,将核酸支架用于*B. subtilis*中来调节途径酶的比例或通过特与特异蛋白结合用于调控合成途径相关基因的表达方面,具有很大的操作空间。

(2) 基于功能膜微域的内源性空间支架 由于现有的空间支架都是通过外源设计引入的^[13, 62],容易造成细胞代谢负担或者引起代谢过程不稳定,因此,如果利用细胞自身结构类物质,设计和构建代谢负担小、生产过程稳定的三维空间支架来进行途径酶的空间组装,可以避免细胞代谢负担。在*B. subtilis*中,功能膜微域(functional membrane microdomains, FMMs)的存在使质膜发生区域化,且FMMs可以作为蛋白和酶的聚集平台^[63]。最近,Lv等^[64]发现FMMs具有较好的时空稳定性,可以用作组装途径酶的内源性空间支架。基于此,研究人员以*B. subtilis*合成GlcNAc为例,通过脚手架蛋白及其特异性结构域-SPFH(stomatin-prohibitin-flotillin-HflC/K) domain将GlcNAc合成所需的途径酶(GNA1, GlmS, Pgi和YqaB)依次锚定在FMMs空间支架上获取FMMs-多酶复合物系统,发现该系统可以显著提高GlcNAc的产量^[14]。进一步结合代谢模型和动力学分析发现,GlcNAc产量提高的主要原因是FMMs-多酶复合物系统的存在可以形成一条较完整的底物通道,进而增加显著酶的催化效率。此外,研究人员还发现FMMs-多酶复合物系统不仅可以显著提高产物的产量,而且随着SPFH domain表达量的增加,发酵后期细胞的裂解情况得到了明显的缓解,很可能是因为SPFH domain的过表达有利于FMMs结构的稳定,而FMMs的稳定则可以增强细

胞对微环境的适应性。

1.3.3 基因回路

基因回路是通过设计或改造生物调控元件,使细胞感应中间代谢物或信号分子的变化,从而自动控制代谢途径上相关基因的表达^[65-66]。近年来,基于适配体的生物传感器被广泛用于动态调节产物代谢途径上相关基因的表达^[67-68]。例如,Niu等^[16]通过改造天然氨基葡萄糖-6-磷酸(GlcN6P)响应的*glmS*核糖开关及其突变体,可以动态控制GlcNAc合成竞争途径中糖酵解和肽聚糖合成模块的代谢通量,提高了*B. subtilis*中GlcNAc的产量。首先,研究人员引入*trp*终止子以有效释放*glmS*核糖开关的反馈抑制作用。然后,设计了*glmS*核糖开关和其突变体,可对代谢靶标实现不同程度的反馈抑制和激活。最后,利用GlcN6P作为配体,将生物传感器*glmS*核糖开关整合至6-磷酸果糖激酶基因*pfk*和磷酸葡萄糖胺变位酶基因*glmM*的5'-端,可以分别动态抑制糖酵解和肽聚糖合成和途径的活性;同时,将*glmS*核糖开关突变体M5(*glmS*核酶切割位点AG→GG)整合至葡萄糖-6-磷酸异构酶基因*pgi*的5'-端,可以动态增强GlcNAc合成途径的活性,最终使GlcNAc在*B. subtilis*中的产量从9.24 g/L提高至18.45g/L。总之,通过多个靶点动态控制与配体GlcN6P响应相关基因的表达,可以在GlcNAc合成途径、肽聚糖合成途径和糖酵解途径之间实现代谢平衡,并且在没有副产物的情况下提高GlcNAc的产量。

值得注意的是,现有的适配体生物传感器大多只作用于非互补DNA元件,以致不能在生长细胞中复制。Deng等^[17]以2'-的岩藻糖基乳糖(2'-FL)为目标产物,基于配体凝血酶结合的适配体在*B. subtilis*中开发了一种体内双功能基因表达调控回路,用于动态调控2'-FL的合成。首先,研究人员证明了配体分子凝血酶与适配体的结合可以诱导完全互补的双链DNA的解旋。然后,构建了双功能基因表达调控回路,包括用于上调基因的凝血酶结合DNA适体调控元件(TDC)以及用于下调基因的凝血酶结合RNA适体调控元件(TRC),可以使报告基因*eGFP*的表达范围控制在0.084~48.1倍。最后,利用该调控系统,可以动态上调2'-FL合成途径中关键基因*fkp*和*futC*的表达,并

下调基因 *purR* 的表达，导致 2'-FL 的产量从 24.7mg/L 增加到 674mg/L。

然而，同时实现代谢模块的动态调节和自发上调和下调基因仍然面临巨大挑战。最近，Wu 等^[18]在 *B. subtilis* 中设计并构建了一个基于生物传感器、CRISPR 和合成基因回路的代谢流量动态自发双重调控 (autonomous dual control, ADC) 系统，并成功将其应用于 GlcNAc 合成相关代谢网络的优化调控中。首先，利用 *B. subtilis* 中与氨基葡萄糖分解代谢相关的转录因子 GamR 的调控机制，设计了可以响应胞内 6-磷酸氨基葡萄糖 (GlcN6P) 的生物传感器。随后通过将该生物传感器与基于 CRISPRi 的逻辑“非”门进行耦合，构建一种可同时对不同代谢模块进行动态自发上调与下调的 ADC 系统，并使用流式细胞仪对该系统进行了功能验证。然后利用该系统构建了一个反馈调节回路，来同时动态激活 GlcNAc 合成途径和动态抑制其主要的 3 个竞争途径 (糖酵解途径、磷酸戊糖途径和肽聚糖合成途径)。在该反馈回路的调控作用下，当胞内的 GlcN6P 出现积累时，会促进 GlcN6P 流向 GlcNAc 合成途径；同时会对上述竞争途径产生弱化作用，从而进一步增加流向 GlcN6P 的代谢流。通过组装不同强度的激活模块与抑制模块，最终实现了 GlcNAc 合成的动态平衡与最优调控，GlcNAc 的摇瓶产量由 18.3 g/L 提高到了 28.0 g/L；最后，在 15 L 发酵罐上对该反馈回路的稳定性进行了验证，通过补料分批发酵 GlcNAc 产量达到了 131.6 g/L。这种自我调节方法不需要任何外部控制水平，而且提出的可编程基因回路可以扩展至其他微生物细胞和代谢途径的工程化。

1.4 无细胞蛋白表达系统

无细胞蛋白表达系统 (cell-free protein synthesis, CFPS)，是一种相对胞内表达系统而言的开放表达系统。它是以外源 mRNA 或 DNA 为模板，利用原核或真核细胞抽提物的酶系，添加氨基酸、RNA 聚合酶和能量物质等来表达蛋白质的体外翻译系统^[69] (图2)。利用无细胞蛋白表达系统，可以提高蛋白合成的效率，还可以通过掺入

非天然氨基酸，在体外表达非天然蛋白质^[70]。尽管无细胞系统通过制备方法的优化得到了一些改进^[71]，但这些研究大部分集中在 *E. coli* 无细胞系统的改进上，而针对 *B. subtilis* 无细胞系统的报道较少。作为一种重要的 GRAS 模式生物，*B. subtilis* 无细胞系统的开发可能更适用于广泛的微生物学、合成生物学和工业生物技术应用。比如，*B. subtilis* 调控元件的无细胞系统在与体内研究结合时可发挥协同优势，经过多轮无细胞表征的工作流程可导致设计周期的快速迭代，从而有助于在体内进行最终的设计^[72]。

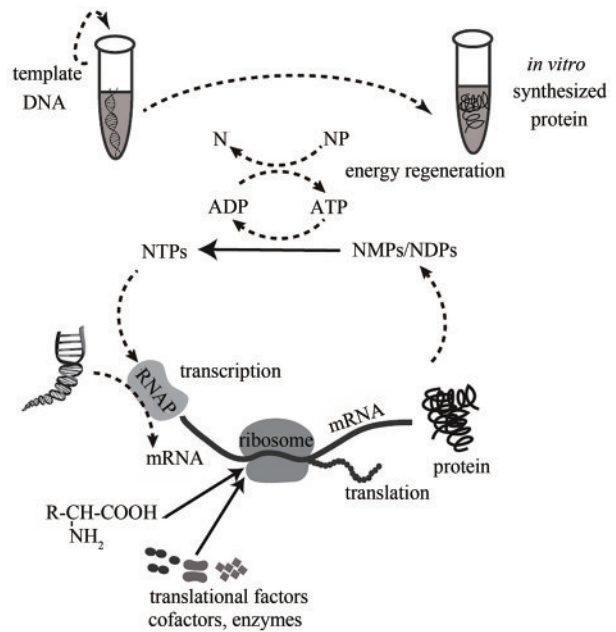


图2 无细胞蛋白表达系统

Fig. 2 Cell-free protein expression system

由于 *B. subtilis* 168 表达的异源蛋白质容易被其自身分泌的内源性蛋白酶降解，因此利用 *B. subtilis* 168 无细胞系统表达异源蛋白的能力有限，只能产生低产量的报告蛋白 GFP (小于 0.3μg/mL)。因此，研究人员选择蛋白酶缺陷菌株 *B. subtilis* WB800N 作为出发菌株^[73]，通过工程化启动子文库表征的遗传调控元件来优化 *B. subtilis* WB800N 无细胞系统，对 58 种不同类型启动子构建的无细胞 GFPmut3b 体系进行初步筛选，在体外利用 *B. subtilis* WB800N 细胞提取物一起表达 GFPmut3b，通过 GFPmut3b 的表征确定了几种不同强度启动子的 *B. subtilis* WB800N 无细胞体系^[15]。改良的 *B. subtilis* WB800N 无细胞系统能够进行持续数小时

的无细胞转录翻译反应，并产生多达 $0.8 \mu\text{mol/L}$ GFPmut3b，是 *B. subtilis* 168 无细胞转录翻译系统 ($0.011 \mu\text{mol/L}$ GFPmut3b) 的 72 倍。最后将 *B. subtilis* WB800N 无细胞系统应用在诱导型表达系统中，以肾素荧光素酶为报告蛋白，证明了 *B. subtilis* WB800N 无细胞转录翻译系统对异源蛋白的生产和表征具有潜在的适用性。除启动子的转录强弱外，影响 *B. subtilis* WB800N 无细胞系统表达异源蛋白的效率可能还包括其他因素，例如，在无细胞系统表达蛋白质过程中，产生的乳酸、乙酸或无机磷酸盐会导致体系的 pH 值发生变化，这也可能对无细胞体系有害。而这些限制因素可以通过使用其他能源得以缓解，比如，麦芽糖是一种能在 *E. coli* 无细胞表达系统中消耗抑制性无机磷酸盐的碳源物质^[74]。通过这些潜在抑制因素的研究可以进一步提高 *B. subtilis* 无细胞表达系统的效率，从而快速、大量生产具有高营养价值的功能性蛋白。

2 基于内源性调控系统构建的 *B. subtilis* 底盘细胞

2.1 Sec 分泌途径

B. subtilis 因其具有良好的分泌能力可以作为工业酶的生产宿主，然而 *B. subtilis* 容易分泌大量蛋白酶，造成异源蛋白的降解，这主要归因于 *B. subtilis* 中 Sec 分泌途径存在的几个瓶颈：转位酶的靶向性差、分子伴侣的缺乏以及异源蛋白的不正确折叠^[75]。在 *B. subtilis* 中，主要有四种组分（信号识别粒子、转位酶、信号肽酶和分子伴侣）参与 Sec 分泌途径。Chen 等^[19] 通过对这四种分泌组分涉及的 23 个基因或操纵子进行过表达，发现了影响异源蛋白分泌的关键因素是 PrsA 脂蛋白和 DnaK 分子伴侣的缺乏。PrsA 脂蛋白可以促进蛋白质的有效折叠，而 DnaK 分子伴侣参与异源蛋白的折叠，可以使聚集最小化以稳定前蛋白的易位构象。随后研究人员将 PrsA 和 DnaK 两种蛋白一起共表达，发现报告蛋白 α -淀粉酶 AmyL 和 AmyS 的分泌量分别提高了 9 倍和 12 倍，酶活分别提高了 1.6

倍和 1.7 倍，进一步说明了这四种分泌组分对异源蛋白表达的重要性。因此，改造后的 *B. subtilis* 可作为异源蛋白表达的优势宿主。此外，通过 Sec 分泌途径改造的 *B. subtilis* 还可以用于疫苗的开发，特别是抗原与孢子外壳蛋白融合的 *B. subtilis* 孢子^[20]。

2.2 群体感应系统

B. subtilis 作为一种土壤微生物，具有在复杂且不断变化的环境中生存的能力，细胞通过复杂的信号转导系统来响应各种各样的胞外刺激。群体感应 (quorum sensing, QS) 是微生物间通过化学信号分子进行信息传递的一种形式，当细菌随菌体生长所分泌的信息分子达到一定的浓度阈值后，菌群检测到信号分子并通过调节相关基因的表达对菌群数量的变化作出回应^[76-77]。*B. subtilis* 通过群体感应效应可以控制感受态和孢子的形成 (图 3)，从而促进细胞群体之间相互协调，以更好地适应胞外环境变化^[78-79]。

在 *B. subtilis* 中，感受态的形成受到两种感受态因子 (ComX 和 CFS) 的调节，当细胞达到一定的数目，感受态因子的浓度积累到一定临界值时诱导感受态的形成^[80]。由 *comQ* 编码的 ComQ 蛋白经修饰处理后，产生具有活性的信号分子 ComX 并分泌到胞外，使信号感应蛋白 ComP 发生自磷酸化，随后该酶将相应的应答调节蛋白 ComA 磷酸化，磷酸化的 ComA 和 *srf* 操纵子结合，激活该操纵子的转录产生 ComS 蛋白，ComS 与 ClpC、ComK、MecA 蛋白一起参与接下来的信号传导，细胞进入感受态状态。CSF 发挥作用的方式与 ComQ 有一些不同，由 *phr* 编码的 CSF 前体在跨膜转运后形成成熟的 CSF，当胞外的 CSF 浓度达到一定浓度时，通过 Spo0K 转运至胞内，通过抑制 RapC 的活性从而促进 ComA 的磷酸化，促进感受态的形成^[81]。基于上述原理，Guan 等^[21] 利用参与信号传导的 *srf* 操纵子的启动子 P_{srfA} ，构建了一种不需要添加诱导剂的细胞密度依赖型 *B. subtilis* 表达系统，可以实现菌体的高密度生长及异源蛋白氨基酸酶和纳豆激酶的高效表达。而芽孢的形成主要受到组氨酸激酶 KinA-E 和转录因子 Spo0A 的调

subtilis 中靶基因的抑制效率最高可达 89.1%。

2.4 碳代谢分解阻遏作用

葡萄糖作为一种细胞生长所需的速效碳源，许多细菌会优先利用葡萄糖作为碳源，当葡萄糖供应耗尽时才使用其他辅助碳源，从而导致培养基中次级碳源的利用率较低，这种现象称为碳分解代谢物阻遏（carbon catabolite repression, CCR）^[85]。由于工业生产发酵中往往以廉价原料为碳源，比如木质纤维素生物质，而 CCR 作用是木质纤维素生物质发酵的主要限制，因此，解除 CCR 作用对菌体同时利用多种碳源至关重要。在 *B. subtilis* 中，CCR 作用是由一种全局转录调节因子 CcpA 发生磷酸化引发的，其活性是由磷酸化辅因子 HPr 通过代谢物控制的激酶 HPr 催化激活的。HPr 在 HPrK 的催化下自磷酸化，CcpA 与磷酸化的 HPr 结合形成三元复合物，从而抑制分解其它碳源相关基因的表达，使菌体优先消耗葡萄糖^[86]（图 4）。因此，要解除 CCR 作用，关键是需要抑制 CcpA 和 HPrK 两种酶的活性。Reu 等^[24] 通过敲除 *ccpA* 基因获得的突变株可以有效利用木质纤维素，并且突变株与 *B. subtilis* 168 有相同的生长速率，*ccpA* 基因的敲除不影响细胞的生长。此外，有研究报道同时敲除 *ccpA* 和 *hprK* 基因，也能有效缓解 CCR 作用，提高葡萄糖的消耗量，使 *B. subtilis* 突变株在含有过量葡萄糖的培养基中正常生长，从而促进核黄素的合成^[87]。

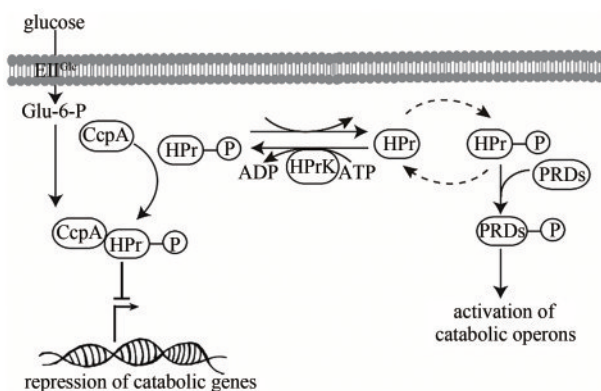


图 4 *B. subtilis* 中碳分解代谢阻遏作用

Fig. 4 Mechanism of carbon catabolite repression in *B. subtilis*

3 *B. subtilis* 底盘细胞的应用

目前，利用 *B. subtilis* 底盘细胞已生产出多种天然生物化学品和工业酶（表 3），如七烯甲萘醌^[22]、核黄素^[88]、鲨肌醇^[89]、软骨素^[90]、L-天冬酰胺酶^[91]、 β -环糊精糖基转移酶^[100]、*N*-乙酰氨基葡萄糖^[9, 16, 18, 102]等。以四种生物产品（*N*-乙酰氨基葡萄糖、七烯甲萘醌、核黄素、透明质酸）和 β -环糊精糖基转移酶等工业酶为例，来简要介绍 *B. subtilis* 底盘细胞的设计与应用（图 5）。

3.1 *N*-乙酰氨基葡萄糖

N-乙酰氨基葡萄糖（*N*-acetylglucosamine, GlcNAc）是氨基葡萄糖的乙酰化衍生物，被广泛应用于维持骨关节健康以及治疗骨关节疾病。近年来，研究人员通过 CRISPR 基因编辑^[9]、空间支架^[13-15]、核糖开关^[17-18]和生物传感器^[19]等工具从多方面改善优化了 GlcNAc 的合成途径，显著提高了 *B. subtilis* 中 GlcNAc 的合成效率。例如，Liu 等^[103] 首先将 GlcN-6-P 合成酶（GlmS）和 GlcN-6-P 乙酰化酶（Gna1）引入 *B. subtilis* 中成功构建了 GlcNAc 合成途径。随后，研究人员利用 DNA 支架增强了 GlcNAc 代谢合成中两种途径酶的协同催化作用^[13]，利用 RNA 支架抑制了 GlcNAc 合成竞争途径中糖酵解和肽聚糖合成模块的活性^[14]。最后，为进一步提高 GlcNAc 的产量，研究人员结合动力学模拟以及动态代谢组学发现了 GlcNAc-6-P 与胞内 GlcNAc 之间存在无效循环，这可能是 GlcNAc 合成途径的限速步骤。通过敲除重组菌 BSGN 中葡萄糖激酶编码基因 *glcK* 阻断了无效循环，导致 GlcNAc 的生产率增加了 2.3 倍^[104]。

此外，通过设计新的代谢途径也可以提高 *B. subtilis* 的生产效率。Gu 等^[102] 通过重新设计中心碳和氧化还原代谢途径，有效提高了 *B. subtilis* 中 GlcNAc 的产量。首先，研究人员删除 GlcNAc 合成途径中编码丙酮酸激酶的基因 *pyk* 和编码 2-脱氢-3-脱氧庚糖酸醛缩酶的基因 *kdgA*，分别阻止烯醇式丙酮酸磷酸（PEP）途径和戊糖磷酸途径中丙酮酸的合成，推进糖酵解的碳通量通过碳重排进入 GlcNAc 合成途径。随后，删除编码磷酸烯醇丙酮

表3 *B. subtilis* 底盘细胞生产的典型生物化学产品和工业酶Tab. 3 Typical bio-chemicals and industrial enzymes produced by *B. subtilis* chassis cell

类别	产品	菌株	方法	产量	文献	
生物化学品	七烯甲萘醌	<i>B. subtilis</i>	Phr60-Rap60-Spo0A 群体响应调控系统	360 mg/L	[22]	
	核黄素	<i>B. subtilis</i> RH33	定点诱变 <i>zwf</i> 、 <i>gnd</i>	15.7 g/L	[88]	
	鲨肌醇	<i>B. subtilis</i> KU303	敲除 <i>iolABCDEFGHI</i> 、 <i>iolHIJ</i> 、 <i>iolX</i> 、 <i>iolR</i> ，过表达 <i>IolG</i> 、 <i>IolW</i> 、 <i>IolT</i> 、 <i>PntAB</i>	27.6 g/L	[89]	
	软骨素	<i>B. subtilis</i> E168H	表达 <i>kfoC-kfoA</i> 、 <i>kfiC-kfiA</i> ，上调 <i>tuaD</i>	5.22 g/L	[90]	
	鸟苷	BSK814G2	敲除 <i>purA</i> 被敲除，共表达 <i>PRS</i> 、 <i>purF</i> 、 <i>guaB</i>	115.2 mg/L	[92]	
	胸苷	BSK756T3	敲除 <i>tdk</i> ，过表达 <i>prs</i> 、 <i>ushA</i> 、 <i>thyA</i> 、 <i>dut</i> 、 <i>ndk</i>	151.2 mg/L	[92]	
	紫穗槐二烯	<i>B. subtilis</i> 1A1	过表达 <i>dxs</i> 、 <i>idi</i> 、 <i>ads</i>	20 mg/L	[93]	
	乙缩醛	<i>B. subtilis</i> BMN	敲除 <i>bdhA</i> ，过表达基因 <i>nox</i>	56.7 g/L	[94]	
	2,3-丁二醇	<i>B. subtilis</i> BSF9	敲除 <i>upp</i> 、 <i>acoA</i> 、 <i>bdhA</i> 、 <i>pta</i> 、 <i>ldh</i> ，过表达 <i>alsS</i> 、 <i>alsD</i> 、 <i>budC</i> 、 <i>udhA</i>	103.7 g/L	[95]	
	异丁醇	BSUL08	敲除 <i>alsS</i> 、 <i>ldh</i> 、 <i>pdhC</i> 、 <i>pgi</i> ，过表达 <i>zwf</i> 、 <i>udhA</i>	6.12 g/L	[96]	
	二吡啶甲酸	<i>B. subtilis</i> OA105	敲除 <i>alsSD</i> ，过表达 <i>spoVGBA</i>	2.3 g/L	[97]	
	苹果酸	BSUPML	敲除 <i>ldh</i> ，过表达异源基因 <i>mdh</i>	1.23 g/L	[98]	
	透明质酸	<i>B. subtilis</i> E168TH	表达 <i>hasA</i> 、 <i>tuaD</i> 、 <i>gtaB</i> 、 <i>glmU</i> 、 <i>glmM</i> 、 <i>glmS</i>	19.38 g/L	[99]	
	<i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖	BP18-afGNA1	重构中心碳和氧化还原代谢	24.5 g/L	[102]	
	典型化学品	α -淀粉酶	<i>B. subtilis</i> 1A237	共表达 <i>PrsA</i> 和 <i>DnaK</i> 蛋白	1352 U/mL	[19]
		纳豆激酶	BSG328	改造 <i>srfA</i> 启动子核心区	93.6 U/mL	[21]
		氨肽酶	BSG329	改造 <i>srfA</i> 启动子核心区	69.8 U/mL	[21]
		L-天冬酰胺酶	<i>B. subtilis</i> WB600	表达 type II ASN	407.6 U/mL	[91]
β -环糊精糖基转移酶		BS5 ATCC 6051a	敲除 <i>srfC</i> 、 <i>spoIIAC</i> 、 <i>nprE</i> 、 <i>aprE</i> 、 <i>amyE</i>	227.8 U/mL	[100]	
植酸酶		<i>B. subtilis</i> BD170	表达 <i>phyC</i>	47.7 U/mL	[101]	

酸激酶的基因 *pckA*，以减轻由 PEP 积累引起的反馈抑制；使用强启动子 P_{43} 替换编码丙酮酸羧化酶的基因 *pycA* 的天然启动子，删除由苹果酸脱氢酶催化生成丙酮酸途径中的基因 *melA*、*malS*、*ywkA* 和 *ytsJ*，异源引入编码丙酮酸羧化酶的基因 *bacpycA*，从而将丙酮酸拉回 TCA 循环，以减少丙酮酸的碳溢出。然后，引入一个 P_{43} 启动子控制的 *glmS* 基因，以促进 GlcNAc 的合成。最后，研究人员引入 4 种独立于 NAD (P) 合成反应的酶（丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶、甘油三磷酸铁氧还蛋白脱氢酶、固氮酶铁蛋白 NifH 和苹果酸酩脱氢酶）来平衡氧化还原电位，重新建立了氧化还原代谢途径。通过对上述碳和氧化还原代谢途径的重新设计，碳通量可以定向流入 GlcNAc 合成的 3 种前体中（果糖-6-磷酸酯、乙酰辅酶 A 和谷氨酰胺），同时阻止副产物丙酮酸的碳溢出，从而将提高的 GlcNAc 摇瓶产量至 24.5 g/L。

3.2 七烯甲萘醌

七烯甲萘醌（menaquinone-7, MK-7）是一种

重要的脂溶性维生素，在凝血和预防骨质疏松症方面发挥关键作用。Cui 等^[22] 根据 *B. subtilis* 中芽孢形成的原理，利用级联信号分子 Phr60 和 Rap60 设计并构建了群体响应调控系统：在细胞生长过程中，随着细胞密度增加，Phr60 不断积累，抑制 Rap60，从而使得 Spo0A 磷酸化启动，且 Spo0A-P 进一步结合至启动子上执行调控功能。首先对 *B. subtilis* 中受碳饥饿和群体响应系统共同调控的转录因子 Spo0A 进行改造，通过敲除组氨酸激酶 KinB、芽孢产生基因 *spoiIA-spoiIE* 以及信号分子 PhrA-B，使转录因子 Spo0A 仅受群体响应信号分子 Phr60-Rap60 的级联调控；进一步通过调节启动子上 Spo0A-P 结合位点的序列、个数与位置，构建具有不同强度的启动子文库，获得了最佳激活型启动子 P_{spoiA} 和最佳抑制型启动子 P_{abrB} ，以实现基因的上调和下调。通过以上研究，成功构建了具有双重调控功能的 Phr60-Rap60-Spo0A 群体响应系统。最后，利用该系统对 *B. subtilis* 中 MK-7 复杂代谢网络中的关键合成基因模块和竞争基因模块进行系统优化和全局调控，使摇瓶中 MK-7 的产量从

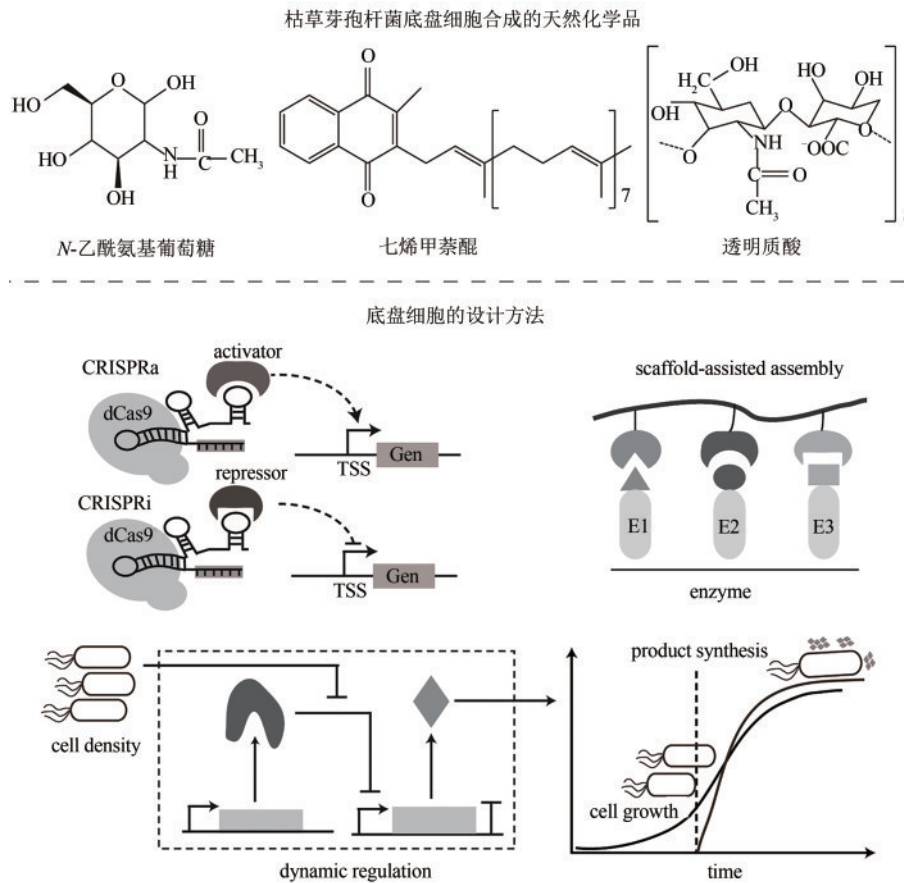


图5 *B. subtilis* 底盘细胞的构建示意图

Fig. 5 Construction of chassis cell in *B. subtilis*

9 mg/L 提高到 360 mg/L, 提高了 40 倍。为进一步提高 MK-7 产量, 研究人员针对 *B. subtilis* 静置培养时形成的生物膜能够有效增加 MK-7 产量的这一现象, 通过比较转录组学、蛋白质飞行质谱等技术揭示了细胞膜和电子转移是促进 MK-7 合成的重要因素^[105]。通过 KEGG 分析了影响生物膜形成的差异基因, 并对促进生物膜形成的 11 种差异基因在前期构建的工程菌 BS20 中进行过表达后, MK-7 的产量均有显著提高, 特别是过表达一种参与信号转导的基因 BSU02000 时, MK-7 的产量从 9.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 增加至 42.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。此外, 研究人员通过蛋白质飞行质谱, 发现甲萘醌-细胞色素还原酶 QcrA-C 对 MK-7 的合成具有明显作用。因此, 研究人员在工程菌 BS20 中使用启动子 P_{43} 同时过表达 BSU02000 基因和编码 QcrA-C 的基因, 在摇瓶中 MK-7 产量达到了 410 mg/L。总之, 研究人员通过群体响应的动态调控和比较转录组来调控 MK-7 的合成, 为构建 *B. subtilis* 底盘细胞以生产类似生物

产品提供了有效策略。

3.3 核黄素

核黄素 (riboflavin, RF) 是维持人和动物机体正常物质代谢所必需的营养物质, 在生物体内以黄素腺嘌呤二核苷酸和黄素单核苷酸的形式存在, 广泛应用于食品、饲料和制药行业。近年来, 研究人员通过增加 RF 前体供应、调节中心碳代谢、以及分析细菌转录组等方面, 不断改善了 RF 在 *B. subtilis* 中的生物合成^[106]。嘌呤核苷酸是 RF 合成途径中的一个重要前体。Shi 等^[107] 对嘌呤合成途径中的关键基因 (*purF*、*purM*、*purN*、*purH*、*purD*) 进行过表达后, 将 *B. subtilis* PK-P 菌株合成核黄素的产量提高了 25%。此外, 通过敲除编码嘌呤操纵子阻遏物的基因 *purR* 后, 合成嘌呤的相关基因的相对转录水平上调了约 380 倍, 并进一步通过定点诱变引入编码酰胺基转移酶的基因 *purF*

后, 获得的 *purF-VQW* 突变菌株合成核黄素的产量比对照菌株增加了3倍^[108]。Wang等^[88]对来源于谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中编码6-磷酸葡萄糖脱氢酶的基因 *zwf* 和编码6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的基因 *gnd* 进行定点诱变, 以消除 *B. subtilis* 细胞内代谢物的变构抑制作用, 在摇瓶培养中共表达突变的 *zwf* 和 *gnd* 脱氢酶, 可以使 *B. subtilis* 合成核黄素的产量提高31%, 并发现工程菌株在戊糖磷酸途径中检测到的代谢物浓度较高。因此, 推断增强戊糖磷酸途径可以有助于核黄素的生物合成。

此外, 通过细菌转录组的分析可以确定RF代谢合成中新的调控靶标。Shi等^[109]对生产核黄素的 *B. subtilis* RH33 和野生型 *B. subtilis* 168 菌株进行了转录组分析, 并结合核苷酸测序和细胞内代谢物浓度的测量, 确定了RF合成途径中的两个关键途径酶可以用来改善核黄素的生产。转录组的数据表明, *pur* 操纵子和编码全局调控因子 PurR 的基因在 *B. subtilis* RH33 中均被下调。PurR 的活性受到嘌呤合成前体磷酸核糖焦磷酸 (PRPP) 的调节, 而低浓度的 PRPP 前体供应是限制 *B. subtilis* RH33 合成核黄素的主要原因。因此, 研究人员对 *B. subtilis* RH33 中合成 PRPP 前体的两个关键酶基因 *prs* 和 *ywlF* 共表达, 可以有效提高核黄素的产量, 在5L分批补料发酵中的产量达到15 g/L。在这项研究中, 基于系统生物学的转录组学分析有助于确立新的合成代谢靶标, 以便进一步改善 *B. subtilis* 中核黄素的产量。

3.4 透明质酸

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是由两个双糖单位 D-葡萄糖醛酸及 N-乙酰葡萄糖胺组成的高分子量酸性黏多糖, 广泛应用于生物制药、化妆品和食品工业领域^[110]。Yang等^[23]通过异源引入透明质酸合酶基因 *hasA*, 实现了透明质酸在 *B. subtilis* 中的表达, 并通过构建 MS-DOS 调控系统对透明质酸合成竞争途径关键基因 *zwf*、*pfkA* 和 *galE* 的表达进行下调, 能够提高透明质酸产量。首先, 研究人员分析了 *B. subtilis* 内源启动子的表达强度与生长时期的关系, 获得了不同生长时期

表达的不同强度的启动子, 包括对数期表达的启动子、稳定期表达的启动子和生长持续表达的组成型启动子。随后通过改造 I 型毒素-抗毒素系统 *bsrG/sr4*, 在 *B. subtilis* 中构建了依赖于 Sr4 的 MS-DOS 转录后基因表达调控系统, 并对 Sr4 进行不同长度的截短, 分析突变体对靶基因 GFP 表达的抑制效率, 证明了调控 RNA Sr4 的核心区域是位于其 3' 端的 33 bp 序列。最后, 利用 MS-DOS 转录后基因表达调控工具对 HA 合成途径的竞争途径 (磷酸戊糖途径、糖酵解途径和细胞壁多糖合成途径) 进行调控, 分别对催化葡萄糖-6-磷酸流向磷酸戊糖途径的基因 *zwf*、催化果糖-6-磷酸流向糖酵解途径的基因 *pfkA*、催化 UDP-葡萄糖流向细胞壁多糖合成途径的基因 *galE*, 以及催化 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖流向细胞壁多糖合成途径的基因 *murAA*、*murAB* 和 *mnaA* 的表达进行下调。由于有些被调控的代谢途径涉及细胞的基本代谢过程, 过度的抑制反而可能会导致 HA 产量的降低。因此, 选择3种不同强度 (弱、中、强) 的组成型启动子 P_{hemA} 、 P_{asd} 和 P_{citZ} 来启动 Sr4 的转录抑制, 对上述基因的表达进行不同程度地下调。结果表明: 当分别对 *zwf*、*pfkA* 和 *galE* 基因的表达下调时, HA 的产量均具有不同程度的提升, 最高产量达到 1.52 g/L, 与对照相比提高了 60.0%。因此, 下调 *zwf*、*pfkA* 和 *galE* 三个基因的表达强度能够减弱磷酸戊糖途径、糖酵解途径和细胞壁合成途径对 HA 合成途径的竞争, 从而促进 HA 产量的提升。

3.5 典型工业酶

B. subtilis 底盘细胞不仅可以用于代谢合成各种天然化学品, 同时是生产工业酶的重要细胞平台^[111]。例如, *B. subtilis* ATCC 6051a 是一种用于工业化生产重组蛋白的菌株, 与 *B. subtilis* 168 相比, ATCC 6051a 菌株的转化性能较差, 并且在发酵过程中容易产生大量泡沫和高抗性的孢子。为提高 ATCC 6051a 菌株作为工业表达宿主的适用性, Zhang等^[100]通过 CRISPR-Cas9 系统, 构建了包含靶标特异性的 sgRNA、Cas9 和同源修复模板的多合一敲除质粒, 可以敲除 ATCC 6051a 中与孢子形成相关的 5 个基因 (*srfC*、*spoIIAC*、*nprE*、*aprE*、

amyE), 最终获得的突变株 ATCC 6051a BS5 在发酵过程中对孢子的形成具有较大的抵抗力, 并且胞外分泌的最高 β -环糊精糖基转移酶 (β -CGTase) 活性达到 277.8 U/mL, 是对照菌 ATCC 6051a 的 2.5 倍。此外, 通过改善 *B. subtilis* 的遗传调控系统, 比如, 过表达 Sec 分泌途径中的脂蛋白和分子伴侣等组分可以有效提高 α -淀粉酶在 *B. subtilis* 中的表达量^[20]; 或是利用感受态形成过程中的群体感应效应, 构建的一种基于 *srfA* 启动子核心区域改造的 *B. subtilis* 自诱导表达系统, 可以用于高效生产异源蛋白氨肽酶和纳豆激酶^[22]。因此, 利用 CRISPR 基因编辑技术和 *B. subtilis* 的自身遗传调控机制, 也能构建优良的 *B. subtilis* 底盘细胞用于生产各种工业酶。

4 展 望

B. subtilis 作为一种重要的工业生产菌株, 通过代谢工程改造已开发出不同类型的底盘细胞, 广泛用于天然生物化学品的合成和工业酶的表达。然而, *B. subtilis* 底盘细胞的设计仍然面临一些挑战。首先, 尽管基于 RNA-蛋白质复合物开发并依赖于碱基对引导的 CRISPR 基因编辑技术已广泛用于转录调控, 与计算蛋白质设计相比, 核酸设计, 特别是混合 RNA 和蛋白质或核蛋白的复合物的设计仍然特别薄弱。为进一步扩展核酸设计, 可以从设计有效折叠途径的角度将 RNA 折叠动力学结合到设计算法中, 以及通过整合 RNA 和蛋白质设计的框架来预测并且设计解决核酸、核蛋白复合物的结构与功能关系。核酸设计的扩展有助于设计与生物传感器相关的 RNA 配体结合结构域, 可以用于改善酶和核糖体内的 RNA 催化位点, 或用于 RNA 指导的 CRISPR 基因编辑系统中 RNA-蛋白质复合物的改进。其次, 尽管已开发出生物传感器、核糖开关等调控元件用于动态调节代谢合成途径上相关基因的表达, 然而响应这些调控元件的中间代谢物通常是合成途径上某一特定的生物大分子, 从而限制了调控元件的使用范围。因此, 如何设计响应生物小分子的调控元件使细胞可以动态控制多条代谢途径上基因的表达, 或如何扩大某一特定生物分子的响应浓度范围使细胞不同程度的激活或抑制基因的表达, 是目前设计生物

传感器面临的主要问题。这可以通过高通量筛选基于转录因子的生物传感器来响应生物小分子的浓度变化, 或基于 Capture-SELEX 技术更有效地筛选出性能优良的核酸适体, 以便更广泛的应用到 *B. subtilis* 底盘细胞的设计和构建中。最后, 通过开发特定的 tRNA/氨酰 tRNA 合成酶系统、核糖体和基因组重编码的生物, 不仅可以扩展 *B. subtilis* 遗传密码系统的蛋白质表达规模, 还可以为 *B. subtilis* 重编码多种非天然氨基酸奠定基础。

参 考 文 献

- [1] LEE J W, NA D, PARK J M, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals [J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(6): 536-546.
- [2] LEE S, MATTANOVICH D, VILLAVARDE A. Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 156.
- [3] GOEL A, WORTEL M T, MOLENAAR D, et al. Metabolic shifts: a fitness perspective for microbial cell factories [J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(12): 2147-2160.
- [4] LIU L, LIU Y, SHIN H D, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6113-6127.
- [5] JUHAS M, REU D R, ZHU B, et al. *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering [J]. *Microbiology*, 2014, 160(11): 2341-2351.
- [6] 李杨. 基因组简化枯草芽孢杆菌的构建及应用 [D]. 天津: 天津大学, 2017.
LI Y. Construction of genome reduced *Bacillus subtilis* and their application in production of bio-based chemicals [D]. Tianjin: Tianjin University, 2017.
- [7] SO Y, PARK S Y, PARK E H, et al. A highly efficient CRISPR-Cas9-Mediated large genomic deletion in *Bacillus subtilis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: a1167.
- [8] WESTBROOK A W, YOUNG M, CHOU C P. Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(16): 4876-4895.
- [9] WU Y, LIU Y, LV X, et al. CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 Assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020. DOI: org/10.1002/bit.27322.
- [10] SONG Y, NIKOLOFF J M, FU G, et al. Promoter screening

- from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications [J]. PLoS One, 2016, 11(7): E158447.
- [11] GUIZIOU S, SAUVEPLANE V, CHANG H J, et al. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis* [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(15): 7495-7508.
- [12] LIU Y, ZHU Y, MA W, et al. Spatial modulation of key pathway enzymes by DNA-guided scaffold system and respiration chain engineering for improved *N*-acetylglucosamine production by *Bacillus subtilis* [J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 61-69.
- [13] LIU Y, ZHU Y, LI J, et al. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved *N*-acetylglucosamine production [J]. Metabolic Engineering, 2014, 23: 42-52.
- [14] LV X, WU Y, TIAN R, et al. Synthetic metabolic channel by functional membrane microdomains for compartmentalized flux control [J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 106-118.
- [15] KELWICK R, WEBB A J, MACDONALD J T, et al. Development of a *Bacillus subtilis* cell-free transcription-translation system for prototyping regulatory elements [J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 370-381.
- [16] NIU T, LIU Y, LI J, et al. Engineering a glucosamine-6-phosphate responsive *glmS* ribozyme switch enables dynamic control of metabolic flux in *Bacillus subtilis* for overproduction of *N*-acetylglucosamine [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(10): 2423-2435.
- [17] DENG J, CHEN C, GU Y, et al. Creating an *in vivo* bifunctional gene expression circuit through an aptamer-based regulatory mechanism for dynamic metabolic engineering in *Bacillus subtilis* [J]. Metabolic Engineering, 2019, 55: 179-190.
- [18] WU Y, CHEN T, LIU Y, et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis* [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(2): 996-1009.
- [19] CHEN J, FU G, GAI Y, et al. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression [J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 92.
- [20] FERREIRA L C S, FERREIRA R C C, SCHUMANN W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors [J]. Anais Da Academia Brasileira De Ciências, 77(1): 113-124.
- [21] GUAN C, CUI W, CHENG J, et al. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis* [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 66.
- [22] CUI S, LV X, WU Y, et al. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis* [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1826-1837.
- [23] YANG S, WANG Y, WEI C, et al. A new sRNA-mediated post-transcriptional regulation system for *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(12): 2986-2995.
- [24] REU D R, RATH H, TH RMER A, et al. Changes of DNA topology affect the global transcription landscape and allow rapid growth of a *Bacillus subtilis* mutant lacking carbon catabolite repression [J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 171-179.
- [25] ARA K, OZAKI K, NAKAMURA K, et al. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2007, 46(3): 169-178.
- [26] WESTERS H, DORENBOS R, VAN DIJL J M, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(12): 2076-2090.
- [27] TAKUYA M, RYOSUKE K, KEIJI E, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis* [J]. DNA Research, 2008, 15(2): 73-81.
- [28] JAKOČIŪNAS T, JENSEN M K, KEASLING J D. CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories [J]. Metabolic Engineering, 2016, 34: 44-59.
- [29] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096.
- [30] BIKARD D, JIANG W, SAMAI P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [31] JEONG D E, PARK S H, PAN J G, et al. Genome engineering using a synthetic gene circuit in *Bacillus subtilis* [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 43(6): e42.
- [32] ISAACS F J, DWYER D J, DING C, et al. Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression [J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(7): 841-847.
- [33] KIM J Y H, CHA H J. Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: improved foreign protein production [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 83(7): 841-853.
- [34] MAN S, CHENG R, MIAO C, et al. Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(8): e50.
- [35] DOMINGUEZ A A, LIM W A, QI L S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, 17(1): 5-15.
- [36] DONG C, FONTANA J, PATEL A, et al. Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 2489.
- [37] ZHU H, LIANG C. CRISPR D T: designing gRNAs for the

- CRISPR-Cpf1 system with improved target efficiency and specificity [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(16): 2783-2789.
- [38] ZHANG X Z, CUI Z L, HONG Q, et al. High level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 4101.
- [39] ZYPRIAN E V A, MATZURA H. Characterization of signals promoting gene expression on the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110 and development of a gram-positive expression vector system [J]. *DNA*, 1986, 5(3): 219-225.
- [40] YANG M, ZHANG W, JI S, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): E56321.
- [41] PHAN T T P, NGUYEN H D, SCHUMANN W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157(1): 167-172.
- [42] KIM L, MOGK A, SCHUMANN W. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application [J]. *Gene*, 1996, 181(1): 71-76.
- [43] YE R, KIM J H, KIM B G, et al. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62(1): 87-96.
- [44] MORABBI H K, WENZEL M, ALTENBUCHNER J. Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: requirements of its use in expression vectors [J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1): 83.
- [45] MING Y M, WEI Z W, LIN C Y, et al. Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved P_{glv} promoter [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 55.
- [46] NAGARAJAN D R, KRISHNAN C. Use of a new catabolite repression resistant promoter isolated from *Bacillus subtilis* KCC103 for hyper-production of recombinant enzymes [J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 70(1): 122-128.
- [47] PANAHI R, VASHEGHANI-FARAHANI E, SHOJAOSADATI S A, et al. Induction of *Bacillus subtilis* expression system using environmental stresses and glucose starvation [J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(2): 879-882.
- [48] MITTENHUBER G. A phylogenomic study of the general stress response sigma factor sigmaB of *Bacillus subtilis* and its regulatory proteins [J]. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 4(4): 427-452.
- [49] NIJLAND R, LINDNER C, VAN HARTSKAMP M, et al. Heterologous production and secretion of *Clostridium perfringens* β -toxoid in closely related Gram-positive hosts [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(3): 361-372.
- [50] WILLENBACHER J, MOHR T, HENKEL M, et al. Substitution of the native *srfA* promoter by constitutive P_{veg} in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on Surfactin production [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 14-17.
- [51] OGURA M, SHIMANE K, ASAI K, et al. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49: 1685-1697.
- [52] LEE S J, PAN J G, PARK S H, et al. Development of a stationary phase-specific autoinducible expression system in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 149(1): 16-20.
- [53] WENZEL M, LLER A, SIEMANN H M, et al. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6419.
- [54] YANG S, LIU Q, ZHANG Y, et al. Construction and characterization of broad-spectrum promoters for synthetic biology [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 287-291.
- [55] SIU K H, CHEN R P, SUN Q, et al. Synthetic scaffolds for pathway enhancement [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36: 98-106.
- [56] CHANDRASEKARAN A R. Programmable DNA scaffolds for spatially-ordered protein assembly [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(8): 4436-4446.
- [57] PORTER E B, POLASKI J T, MORCK M M, et al. Recurrent RNA motifs as scaffolds for genetically encodable small-molecule biosensors [J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(3): 295-301.
- [58] CONRADO R J, WU G C, BOOCK J T, et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 40(4): 1879-1889.
- [59] DELEBECQUE C J, SILVER P A, LINDNER A B. Designing and using RNA scaffolds to assemble proteins *in vivo* [J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(10): 1797-1807.
- [60] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [61] PFEIFFER V, PAPPENFORT K, LUCCHINI S, et al. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation [J]. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2009, 16(8): 840-846.
- [62] LEE M J, MANTELL J, HODGSON L, et al. Engineered synthetic scaffolds for organizing proteins within the bacterial cytoplasm [J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(2): 142-147.
- [63] BRAMKAMP M, LOPEZ D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(1): 81.

- [64] LV X, JIN K, WU Y, et al. Enzyme assembly guided by SPFH-induced functional inclusion bodies for enhanced cascade biocatalysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020. DOI: org/10.1002/bit.27304.
- [65] ANESIADIS N, KOBAYASHI H, CLUETT W R, et al. Analysis and design of a genetic circuit for dynamic metabolic engineering [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(8): 442-452.
- [66] ZHANG J, JENSEN M K, KEASLING J D. Development of biosensors and their application in metabolic engineering [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 28: 1-8.
- [67] MANDAL M, BREAKER R R. Gene regulation by riboswitches [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(6): 451-463.
- [68] BERENS C, GROHER F, SUESS B. RNA aptamers as genetic control devices: the potential of riboswitches as synthetic elements for regulating gene expression [J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(2): 246-257.
- [69] PEREZ J G, STARK J C, JEWETT M C. Cell-free synthetic biology: engineering beyond the cell [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(12): A023853.
- [70] HONG S H, KWON Y C, JEWETT M C. Non-standard amino acid incorporation into proteins using *Escherichia coli* cell-free protein synthesis [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2014, 2: A34.
- [71] SHRESTHA P, HOLLAND T M, BUNDY B C. Streamlined extract preparation for *Escherichia coli* based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing [J]. *BioTechniques*, 2012, 53(3): 163-174.
- [72] KARIM A S, JEWETT M C. A cell-free framework for rapid biosynthetic pathway prototyping and enzyme discovery [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 116-126.
- [73] NGUYEN H D, PHAN T T P, SCHUMANN W. Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall [J]. *AMB Express*, 2011, 1(1): 22.
- [74] CASCHERA F, NOIREAUX V. A cost-effective polyphosphate-based metabolism fuels an all *Escherichia coli* cell-free expression system [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 27: 29-37.
- [75] SONG Y, NIKOLOFF J M, ZHANG D. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2015, 25(7): 963-977.
- [76] WATERS C M, BASSLER B L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21(1): 319-346.
- [77] MILLER M B, BASSLER B L. Quorum sensing in bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(1): 165-199.
- [78] LÓPEZ D, KOLTER R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis* [J]. *FEMS Microbiological Review*, 2010, 34(2): 134-149.
- [79] SCHULTZ D, WOLYNES P G, JACOB E B, et al. Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis* [J]. *PNAS*, 2009, 106(50): 21027-21034.
- [80] HAMOEN L W, VENEMA G, KUIPERS O P. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators [J]. *Microbiology*, 2003, 149(1): 9-17.
- [81] SHANK E A, KOLTER R. Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis* [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(6): 741-747.
- [82] BOGUSLAWSKI K M, HILL P A, GRIFFITH K L. Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(2): 325-348.
- [83] DURAND S, JAHN N, CONDON C, et al. Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis* [J]. *RNA Biology*, 2012, 9(12): 1491-1497.
- [84] JAHN N, PREIS H, WIEDEMANN C, et al. BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*-the first temperature dependent type I toxin-antitoxin system [J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(3): 579-598.
- [85] GÖRKE B, STÜLKE J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 613-624.
- [86] SINGH K D, SCHMALISCH M H, STÜLKE J, et al. Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(21): 7275-7284.
- [87] 应明, 班睿. 枯草芽孢杆菌 *ccpA* 基因敲除及其对核黄素产量的影响 [J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 23-27
- YING M, BAN R. Knockout of the *ccpA* gene in *Bacillus subtilis* and influence on riboflavin production [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(1): 23-27.
- [88] WANG Z, CHEN T, MA X, et al. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(4): 3934-3940.
- [89] TANAKA K, TAKANAKA S, YOSHIDA K I. A second-generation *Bacillus* cell factory for rare inositol production [J]. *Bioengineered*, 2014, 5(5): 331-334.
- [90] JIN P, ZHANG L, YUAN P, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 140: 424-432.
- [91] FENG Y, LIU S, JIAO Y, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1509-1520.

- [92] LI Y, ZHU X, ZHANG X, et al. Characterization of genome-reduced *Bacillus subtilis* strains and their application for the production of guanosine and thymidine [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 94.
- [93] ZHOU K, ZOU R, ZHANG C, et al. Optimization of amorphadiene synthesis in *Bacillus subtilis* via transcriptional, translational, and media modulation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(9): 2556-2561.
- [94] ZHANG X, ZHANG R, BAO T, et al. The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis* [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 23: 34-41.
- [95] FU J, HUO G, FENG L, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for chiral pure meso-2, 3-butanediol production [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 90.
- [96] QI H, LI S, ZHAO S, et al. Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93815.
- [97] TOYA Y, HIRASAWA T, ISHIKAWA S, et al. Enhanced dipicolinic acid production during the stationary phase in *Bacillus subtilis* by blocking acetoin synthesis [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(12): 2073-2080.
- [98] MU L, WEN J. Engineered *Bacillus subtilis* 168 produces L-malate by heterologous biosynthesis pathway construction and lactate dehydrogenase deletion [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(1): 33-41.
- [99] JIN P, KANG Z, YUAN P, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168 [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 21-30.
- [100] ZHANG K, DUAN X, WU J. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 27943.
- [101] VUOLANTO A, VON WEYMARN N, KEROVUO J, et al. Phytase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(10): 761-766.
- [102] GU Y, LV X, LIU Y, et al. Synthetic redesign of central carbon and redox metabolism for high yield production of *N*-acetylglucosamine in *Bacillus subtilis* [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 51: 59-69.
- [103] LIU Y, LIU L, SHIN H D, et al. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for microbial production of *N*-acetylglucosamine [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 107-115.
- [104] LIU Y, LINK H, LIU L, et al. A dynamic pathway analysis approach reveals a limiting futile cycle in *N*-acetylglucosamine over-producing *Bacillus subtilis* [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 11933.
- [105] CUI S, XIA H, CHEN T, et al. Cell membrane and electron transfer engineering for improved synthesis of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis* [J]. *iScience*, 2020, 23(3): 100918.
- [106] LIU S, HU W, WANG Z, et al. Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes [J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 31.
- [107] SHI S, SHEN Z, CHEN X, et al. Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 46(1): 28-33.
- [108] SHI T, WANG Y, WANG Z, et al. Dereglulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 101.
- [109] SHI S, CHEN T, ZHANG Z, et al. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production [J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4): 243-252.
- [110] LIU L, LIU Y, LI J, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives [J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1): 99.
- [111] WESTERS L, WESTERS H, QUAX W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1694(3): 299-310.

通讯作者: 刘龙(1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为代谢工程与合成生物学。
E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn



第一作者: 林璐(1993—), 女, 博士研究生, 研究方向为微生物代谢工程。
E-mail: linlu@stu.jiangnan.edu.cn