



专论与综述

枯草芽胞杆菌基因组删减对异源酶表达影响的研究进展

张金方 李昕悦 徐小健 陈雪佳 牛馨 任绍东 李玉 路福平*

天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津 300457

摘要: 枯草芽胞杆菌作为一种遗传背景清晰、基因编辑成熟的革兰氏阳性菌，是多种重要工业酶的生产宿主。随着转录组、蛋白质组、代谢组等多组学测序和分析技术的发展，通过合理设计简化枯草芽胞杆菌基因组，减少细胞内冗余的调控和代谢网络，使得细胞更精简且便于控制，展现出了枯草芽胞杆菌作为异源酶表达宿主细胞的应用潜力。本文简要综述了枯草芽胞杆菌基因组删减的研究进展，归纳了必需基因的确定方法，重点介绍了枯草芽胞杆菌通过删减基因组提升异源酶表达的研究进展及删减策略，充分展示了枯草芽胞杆菌基因组删减在构建异源酶表达底盘细胞中的重要作用。

关键词: 枯草芽胞杆菌，最小基因组，必需基因，基因组删减，异源酶表达

Advance in the effect of reduction of the *Bacillus subtilis* genome on the expression of heterologous enzymes

ZHANG Jinfang LI Xinyue XU Xiaojian CHEN Xuejia NIU Xin REN Shaodong
LI Yu LU Fuping*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: *Bacillus subtilis* as a Gram-positive bacterium, which has clear genetic background and mature gene editing, and it was also considered as the important host of industrial enzymes. With the development of multi-omics sequencing technologies including transcriptome, proteome and metabolome, the rational design could simplify the *Bacillus subtilis* genome, reduce redundant regulatory and metabolic networks. It makes *Bacillus subtilis* more streamlined and easily to control. Furthermore, *Bacillus subtilis* as a heterologous enzyme expression host has been emerged the potential applications. This article briefly reviewed the advance in the effect *Bacillus subtilis* genome reduction, summarized the essential genes and the methods to identify them in *Bacillus subtilis*, highlighted the research progress and deletion strategies of *Bacillus subtilis* to enhance heterologous enzymes by deleting the genome, and demonstrated the important role of genome reduction in the construction of heterologous enzyme expression on the cellular chassis.

Keywords: *Bacillus subtilis*, minimal genome, essential genes, genome reduction, heterologous enzyme expression

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFB0308401)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60601958; E-mail: lfp@tust.edu.cn

Received: 22-04-2020; Accepted: 01-07-2020; Published online: 10-10-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFB0308401)

*通信作者: Tel: 022-60601958; E-mail: lfp@tust.edu.cn

收稿日期: 2020-04-22; 接受日期: 2020-07-01; 网络首发日期: 2020-10-10

近年来,在分子生物学、生物信息学等多学科交叉融合发展的基础上,合成生物学开始成为生命科学研究及生物技术应用的重要发展学科之一。合成生物学是通过对天然生物系统进行设计和构建而获得新的生物部件、装置和系统来生产所需目的产物的学科^[1]。作为合成生物学的重要组成部分,构建一个易于预测和调控的优良底盘细胞(Cellular Chassis),成为生物系统设计和研究的重要组成部分^[2]。

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种广泛存在于自然界中的革兰氏阳性菌,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认定为安全生产用菌(Generally Recognized as Safe, GRAS)^[3],已经被应用到核黄素、 γ -聚谷氨酸、透明质酸等代谢产物的生产中^[4-6]。同时,枯草芽胞杆菌具有遗传背景清楚、生长速度快、适应能力强、蛋白分泌能力强、无细胞毒素产生以及适合高密度发酵等优点^[7-9],作为异源蛋白表达的“细胞工厂”,在工业酶发酵生产中具有良好的应用前景^[10]。然而作为细胞工厂,枯草芽胞杆菌的基因组包含很多对生长和异源酶表达不利的非必需基因,包括胞外蛋白酶、毒力因子、前噬菌体、菌体自溶、芽胞形成、异源酶转录负调控因子等基因,去除这些非必需基因不仅有利于降低芽胞杆菌基因组的复杂度,增强其鲁棒性(Robustness)和调控性,而且还可以提高宿主对异源酶的生产效率,使其成为理想的底盘细胞^[11]。

随着对越来越多已完成的 *B. subtilis* 多组学测序数据的比较和分析,推动了其最小基因组菌株的构建。目前构建最小基因组主要有 2 种策略:即“自下而上”(Bottom-Up Approach)与“自上而下”(Top-Down Approach)的合成策略^[11]。“自下而上”的策略是通过理性设计,采用从头合成路线,将人工合成的标准化元件、功能基因模块逐步组装起来以合成最小基因组^[12]。“自上而下”的技术路线是对遗传背景已知的基因组进行大片段删

减,尽可能去除非必需基因遗传序列,逐步缩减基因组的规模,从而构建最小化基因组细胞^[13]。该策略由于大片段序列删减技术已经非常成熟,芽胞杆菌在内的多种模式微生物通过基因组精简优化后表现出优良特性,包括优化了代谢调节网络,改善了细胞的能量利用效率,大大提高细胞生理性能的预测性及可控性,因而被广泛应用^[11]。在设计最小基因组时,必须要了解必需基因与非必需基因才能对宿主细胞进行最小基因组改造。必需基因所编码的蛋白质往往参与细胞基础代谢过程,如 DNA 的复制、RNA 的转录或翻译、细胞结构组分的合成、产能代谢、信息传递以及加工蛋白等,这些基因在重要功能结构域发生突变时会引起致死效应^[14]。确定基因的必要性可以为最小基因组的构建提供许多线索。本文针对 *B. subtilis* 基因组删减问题进行分析讨论,对其基因组精简工作的开展提供参考。同时结合近年来国内外的研究成果,对芽胞杆菌的基因组改造进行介绍,并对其基因组删减目前存在的主要问题和发展前景提供了一些可行的解决方案和相关分析,为枯草芽胞杆菌作为异源酶表达的底盘细胞构建奠定基础。

1 枯草芽胞杆菌最小基因组的研究

1.1 枯草芽胞杆菌最小基因组研究进展

自 1997 年 Kunst 等完成对 *B. subtilis* 的全基因组测序后,枯草芽胞杆菌最小基因组的构建也开始了迅速发展^[15]。我们对枯草芽胞杆菌近 20 年的最小基因组改造进行了时间汇总,如图 1 所示^[15-25]。*B. subtilis* 基因组从刚开始删减 7.7%到目前删减 36.5%,相应的非必需基因(如产芽胞、运动、抗生素合成、次生碳源的代谢和未知功能的基因)进行了大量删减,删除不同片段长度获得的菌株,其性能也不尽相同。如:Westers 等删除了类前噬菌体区、前噬菌体区及 *pks* 聚酮化合物合成酶操纵子共 332 个非必需基因,获得的菌株 *B. subtilis* $\Delta 6$ 在

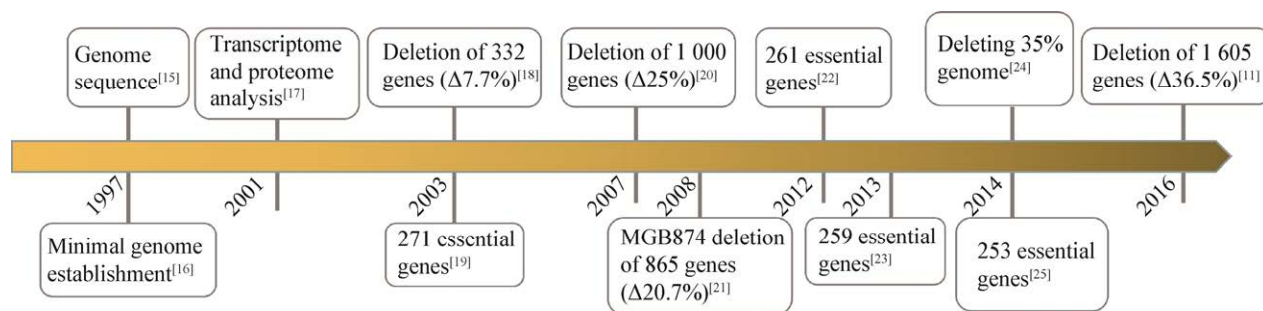


图1 枯草芽胞杆菌最小基因组改造时间汇总

Figure 1 Timeline showing the major achievements in the minimal genome engineering in *Bacillus subtilis*

芽胞、感受态形成特性、代谢通量等方面与野生株相比无显著变化,但细胞运动性、蛋白质分泌、蛋白质组等方面有明显差异^[18];Ara等通过删除约469 kb片段,获得的菌株*B. subtilis* MGB469与野生株相比生长正常,但其异源蛋白表达不稳定^[20];Morimoto等在菌株*B. subtilis* MGB469的基础上删除了11个非必需基因,构建的菌株*B. subtilis* MGB874与野生株相比,生长速率有所降低且染色体分布和细胞形态变化小,但其异源蛋白酶产量显著提升^[21];Li等通过删除约812.4 kb基因片段,获得的菌株*B. subtilis* BSK814与野生株相比,生长速率、产胞率、转化效率明显降低,但其生物量、鸟苷和胸腺嘧啶含量显著提升^[26];Reuß等在*B. subtilis* Δ6基础上进一步删减,删减后的菌株*B. subtilis* PS38(删减36.5%非必需基因)在复杂培养基中的生长速度与野生型菌株相比生长速率降低,这也是截至目前报道的枯草芽胞杆菌最精简基因组^[11]。

在对枯草芽胞杆菌进行最小基因组研究的过程中,比较基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等多组学分析对理解芽胞杆菌内源性特征和建立最小基因组具有重要作用。Buescher等和Nicolas等通过转录组、蛋白质组、代谢组等多组学手段对*B. subtilis*基因组内的基本功能和代谢网络调控进行了详细阐明,为后续基因组删减提供了参考^[27-28]。Reuß等将几种已构建的删减菌株的转录

组、蛋白质组学进行比较,发现必需基因在构建菌株中只占有所有基因的6%,却产生了57%的翻译活性,相比之下,25%未知基因只使用了3%的翻译活性,同时验证了必需基因在枯草芽胞杆菌内进行转录调控、蛋白质翻译的重要意义^[11]。Yuan等利用比较基因组和转录组学,对枯草芽胞杆菌亲缘关系较为密切的地衣芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌进行了系统分析,并通过比较不同发酵时间点的转录差异,确定了产酶过程中差异基因及其代谢调控方式,为研究枯草芽胞杆菌生产异源酶提供了借鉴^[29]。

通过实验获取的芽胞杆菌生理信息和多组学分析结合,目前已建立了专门的芽胞杆菌基因组数据库(表1),例如DBTBS、SubiWiki、MetaCyc、SubtiList、SubtiPathways和SubInteract数据库^[27-28,30-35]。研究人员可以从这些数据库中提取所需要的信息,对包括DNA序列、代谢通路、蛋白质互作、基因转录调控等数据进行分析,从而实现对芽胞杆菌作为底盘宿主进行基因组改造。

1.2 枯草芽胞杆菌必需基因鉴定方法

在构建最小基因组的过程中,必须了解细胞内必需基因之间的功能和相互作用,并且确定基因的必要性。目前确定必需基因的方法主要有比较基因组学、单个基因敲除、转座子诱变和基于代谢网络预测等^[11]。

表 1 枯草芽胞杆菌基因组信息数据库

Table 1 *B. subtilis* genome information database

Database name	Website	Applications
DBTBS	http://dbtbs.hgc.jp/	Transcriptional regulation information of <i>B. subtilis</i>
SubiWiki	http://subiwiki.uni-goettingen.de/	Obtaining integrated information of genome sequence; Metabolic network regulation; protein-protein interaction of <i>B. subtilis</i>
MetaCyc	http://biocyc.org/download.shtml	Metabolism of <i>B. subtilis</i> and application of enzyme regulation
SubtiList	http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/	Obtaining gene sequence of <i>B. subtilis</i>
SubtiPathways	http://subiwiki.uni-goettingen.de/subtipathways.html	Obtaining metabolic pathway of <i>B. subtilis</i> and its regulation mechanism
SubtInteract	http://cellpublisher.gobics.de/subtinteract/startpage/start/	Obtaining protein-protein interactions of <i>B. subtilis</i>

1.2.1 比较基因组确定必需基因

比较基因组学主要利用必需基因数据库, 根据目的菌株与数据库中近缘菌株必需基因的序列相似性比对结果, 推测基因的必需性。一般而言, 必需基因是基因组中普遍存在的高度保守基因, 这种方法预测准确性与参照物种相关, 基于近缘物种的基因组比较分析结果相对较准确^[35]。借助基因组 GC 组岛分析以及复制原点分析等在线软件, 可以对目标菌株基因组序列分析, 预测或识别外源序列, 确定必需基因序列^[36]。Zhang 等利用基因组 GC 组岛数据库 VFDB 和 PFAST 对 28 种原核微生物中的基因组岛进行分析, 通过比对发现必需基因 362 个, 其中 64 个毒力因子和 60 个噬菌体相关必需基因^[37]。Liu 等对支原体菌株基因组进行了比较基因组分析, 分别发现了 256 个和 196 个基因构成了这些支原体的最小基因集^[38]。Rey 等通过对地衣芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌和嗜碱芽胞杆菌基因组进行比较, 发现三者基因组存在 1 719 个共有基因, 但是在转座因子、胞外酶和次级代谢相关基因存在明显差异^[39]。Anderson 等通过对枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、炭疽杆菌和苏云金芽胞杆菌进行基因组比较发现, 这 4 个芽胞杆菌基因组中 1 381 个核心蛋白家族是共有的, 而胞外多糖、细胞壁和芽胞衣蛋白相关基因存在显著差异, 这也为研究 *B. subtilis* 必需基因提供了借鉴^[40]。但是, 比较基因组学分析也有局限性, 因为其只考虑了在进化过程中保持足够相似的基

因, 不包括具有高进化速率的基因, 这些基因在远距离分类群的比较中可能不会显示出它们的关系, 可能忽略了一些优良的必需基因。

1.2.2 单个基因敲除确定必需基因

通过单个基因敲除使基因组改变而引发表型变化, 必需基因的缺失必将导致细胞死亡, 而非必需基因的缺失通常是非致死性的, 通过逐一缺失单个基因后菌株能否生存来确定必需基因^[41]。在大肠杆菌 BW25113 中, 通过单个基因敲除获得了 3 985 个单突变株, 确定基因组中包括 303 个必需基因^[42]。Stuani 等在不动杆菌中通过单个基因敲除的方法获得 2 594 个突变株, 进而确定基因组中包括 499 个必需基因^[43]。Kobayashi 等第一次对枯草芽胞杆菌基因组进行了大面积单个基因敲除, 获得了必需基因为 271 个的最小基因组^[19]。Tanaka 等对枯草芽胞杆菌基因组 157 个区域进行单独删减, 大小从 2 kb 到 159 kb 不等, 总共有 146 基因被成功删除, 其中单个删除区域覆盖了 76% 的基因组^[22]。虽然通过严格考察基因突变的致死性来确定必需基因很精确, 但是这种方法大大增加了工作量, 同时也可能将同工酶基因鉴定为非必需基因。

1.2.3 转座子诱变技术确定必需基因

转座子诱变技术是利用转座子能够插入到基因组中引起基因突变而对染色体进行修饰的方法, 该方法也可以用于鉴定细菌的必需基因。Gerdes 等对大肠杆菌 K12 菌株 MG1655 基因组进行

了 Tn-5 转座子插入突变, 共鉴定出 620 个生存必需基因^[44]。Hutchison 等利用转座子失活方法推断 *M. genitalium* 的 265–350 个编码蛋白质的必需基因^[45]。Hutchison 等利用转座子诱变技术得到了蕈状支原体 JCVI-syn3.0 (531 kb, 473 个基因), 其基因组比自然界中发现的任何自主复制的细胞的基因组都要小, 这是目前构建最小基因组的最成功尝试^[46]。Hirokawa 等利用转座子诱变技术对大肠杆菌中的遗传信息进行分析, 并通过该技术分别构建了最小基因组菌株 DGF-327 和 DGF-298, 与野生株相比生物量明显提高^[47]。全局转座插入诱变法效率高, 结果较为准确, 应用较广泛。但是, 该方法也会错误地将不含转座子的基因确定为必需基因且随机性过强, 不易准确控制精简区域, 还需通过全基因组测序来鉴定敲除区域^[41]。

1.2.4 基于代谢网络的计算模拟确定必需基因

全面了解基因型和表现型之间的关系将极大促进最小基因组的设计, 目前针对两者之间的代谢网络关系进行了计算机模拟分析。即利用简化微生物的基因组数据和 NCBI 数据库建立起基因与蛋白间的对应关系, 从而建立起初始的代谢网络, 并经过相应的数学分析、代谢通量平衡分析 (Flux Balance Analysis, FBA)、代谢调节最小化分析 (Minimization of Metabolic Adjustment, MOMA) 等方法与已知基因组信息结合, 通过计算机确定必需基因^[48]。Zhang 等利用计算机模拟和单基因缺失的方法对细菌的代谢途径进行分析, 该网络包含了 478 个编码蛋白基因, 然后使用判断和迭代程序将基因分为三类: 核心必需、合成致命和非必需基因^[48]。Hao 等提出了一种基因组最小化代谢网络模型的方法, 该方法能够模拟细胞在正常生长前提下的细胞网络代谢途径, 并利用该方法将枯草芽胞杆菌实验模型由开始的 1 147 个基因简化到 420 个基因, 完成了最小基因组模型的构建^[49]。Reuß 等通过网络代谢模型分析, 对 *B. subtilis* PS38 在复合培养基中的生长必需基因进行实验验证, 发现该菌株生存的必需基因包括 523 个编码蛋白质

基因和 119 个编码 RNA 的基因, 这些蛋白质和 RNA 编码基因是 *B. subtilis* 进行染色体复制、转录、翻译、蛋白质折叠、分泌、新陈代谢和细胞分裂等所必需的^[11]。这种计算模拟方法也有其自身的局限性, 由于代谢网络模拟预测与代谢模型的精度相关, 在代谢网络模型精度欠缺的情况下, 预测结果的准确性可能受较大影响。但是该方法使每个基因的本质具有可靠性, 并且可以结合实验进一步验证所构建的最小基因组菌株, 这种方法是未来发展最小基因组构建工业生产菌株的必要工具。

2 基因组删减对枯草芽胞杆菌异源酶表达的研究

2.1 基因组删减对枯草芽胞杆菌异源酶表达的研究进展

将枯草芽胞杆菌基因组中的非必需基因进行逐步删减, 有利于整合异源酶的高效生产元件, 以利于获得高产菌株。自 2008 年开始就有关于枯草芽胞杆菌基因组删减提高异源酶表达的报道, 如: Morimoto 等构建了菌株 *B. subtilis* MGB874 ($\Delta 20.7\%$), 相比于野生株, 其碱性蛋白酶和碱性纤维素酶分别提高了 3.5 倍和 2.7 倍^[21]; Manabe 等在菌株 *B. subtilis* MGB874 的基础上敲除 *rocDEF-rocR* 基因区域, 该区域与精氨酸降解途径关联, 使得谷氨酸盐代谢发生上调, 构建的菌株 MGB874 $\Delta rocDEF-rocR$ 与 MGB874 相比, 碱性蛋白酶生产力和生物量显著提升^[50]; Manabe 等利用菌株 *B. subtilis* MGB874 和 MGB874 $\Delta rocG$, 通过添加碱溶液和补充氮源使培养基 pH 值上调, 使 α -淀粉酶和碱性纤维素酶 Egl-237 产量提升到 1.08 g/L 和 5.5 g/L^[51-52]; Suárez 等以构建的最简基因组 *B. subtilis* PG10 ($\Delta 34.6\%$) 为底盘, 在表达金黄色葡萄球菌来源的 4 种蛋白, 即趋化抑制蛋白 (Chip)、补体抑制剂 (SCIN)、免疫抗原 A (IsaA) 和核酸酶 (Nuc) 异源酶表达方面有明显优势, 克服了异源酶在分泌过程中的不稳定性^[53] (表 2)。

表 2 枯草芽胞杆菌基因组删减对异源酶产量的影响

Table 2 The effect of deleting *B. subtilis* gene for high-level production of heterologous enzyme

Strains	Methods	Yields	References
<i>B. subtilis</i> MGB874ΔrocDEF-rocR	Deletion of <i>rocDEF-rocR</i> fragment	Increasing protease production	[50]
<i>B. subtilis</i> MGB874ΔrocG	Deletion of <i>rocG</i> fragment	The level of alkaline cellulase Egl-237 obtained corresponded to about 5.5 g/L	[51-52]
<i>B. subtilis</i> PG10	Deleting 1.46 Mb (36%) fragment	Improving four secreted proteins of <i>S. aureus</i> : CHIPS, SCIN, IsaA, Nuc	[53]
<i>B. subtilis</i> Δ6	Deleting 320 kb (7.7%) fragment	Increasing AmyL production	[18]
<i>B. subtilis</i> MG1M	Deleting 991 kb (25%) fragment	The recombinant protein was unstable	[20]
<i>B. subtilis</i> MGB874	Deleting 874 kb (20.7%) fragment	Increasing cellulase and protease production (1.7 and 2.5-fold, respectively)	[21]

然而,并非敲除区域越多,敲除菌株生长和异源酶的表达都能提升,如构建的枯草芽胞杆菌 PS38、MGB469、MG1M 出现了生长速率缓慢、异源酶产量降低的现象^[25]。因此,从应用的角度出发,通过删减构建最小基因组不一定意味着最小的生存必需基因的集合,而是对异源酶表达有利的合适的基因集合。对枯草芽胞杆菌进行基因删减时,对删减后的不同菌株进行代谢通量和多组学分析可以获得其代谢调控和异源酶表达的变化。Toya 等对 MGB874 来源的产纤维素酶工程菌株进行 ¹³C 代谢通量分析,结果显示,删减后的宿主菌株糖酵解通量及乙酸合成通量比野生型菌株小,磷酸戊糖途径产生过量的 NADPH 有助于纤维素酶生产^[54]。Fischer 等对枯草芽胞杆菌基因组上的 137 基因进行单独删减,利用 ¹³C 技术进行代谢通量分析,发现了 *comA*、*oppACD*、*spo0A*、*spo0F*、*hpr* 基因删减对整个菌体代谢调控并没影响,但菌体生长速率得到提升^[55]。

2.2 相关基因删减对异源酶表达的提升策略

目前对枯草芽胞杆菌基因组进行删减来提升异源酶表达,主要从以下几个策略考虑(图 2):

- (1) 删减阻碍异源酶蛋白表达的非驯化特性基因;
- (2) 删减菌体自溶的基因和阻碍菌体生长的基因,有效提高菌体生物量,使异源酶表达提升;
- (3) 删

减阻碍异源酶表达的负调控因子,提高异源酶在枯草芽胞杆菌内的转录水平。

2.2.1 删减枯草芽胞杆菌非驯化特性基因

枯草芽胞杆菌通常具有一些未驯化的特性,如产生大量的泡沫、胞外蛋白酶、在环境不利条件下产芽孢等,这些未驯化的特性会阻碍芽胞杆菌对异源酶的表达,同时增加了芽胞杆菌工业生产的要求和难度。研究表明,通过对这些未驯化的特性基因的删减,可有效提高异源酶的表达。如:利用 6 种(WB600)、7 种(WB700)、8 种(WB800)或 9 种(WB900)胞外蛋白酶缺陷的枯草芽胞杆菌可显著提高 α-淀粉酶、木聚糖酶、内切葡聚糖酶、纳豆激酶、麦芽糖淀粉酶等多种酶的产量^[10];Zhang 等对枯草芽胞杆菌基因组上的 *srfC* (泡沫基因)、*spoIIAC* (芽胞基因)、*nprE* (中性蛋白酶)、*aprE* (碱性蛋白酶)和 *amyE* (淀粉酶)基因进行删减,使普鲁兰酶的酶活量显著提升^[56];Zhou 等以碱性蛋白酶为目标产物,对芽胞杆菌中的芽胞形成相关基因 *sigE* 和 *sigF*、胞外多糖 *eps* 基因簇、几丁质酶基因 *chiA*、淀粉酶 *amyL* 和泡沫相关基因 *lchAC* 操纵子进行删除,获得的突变菌株其碱性蛋白酶表达量提升了 62.19%,有力地证明了删除非驯化特性基因可有效提高外源碱性蛋白酶的活力^[57-59]。

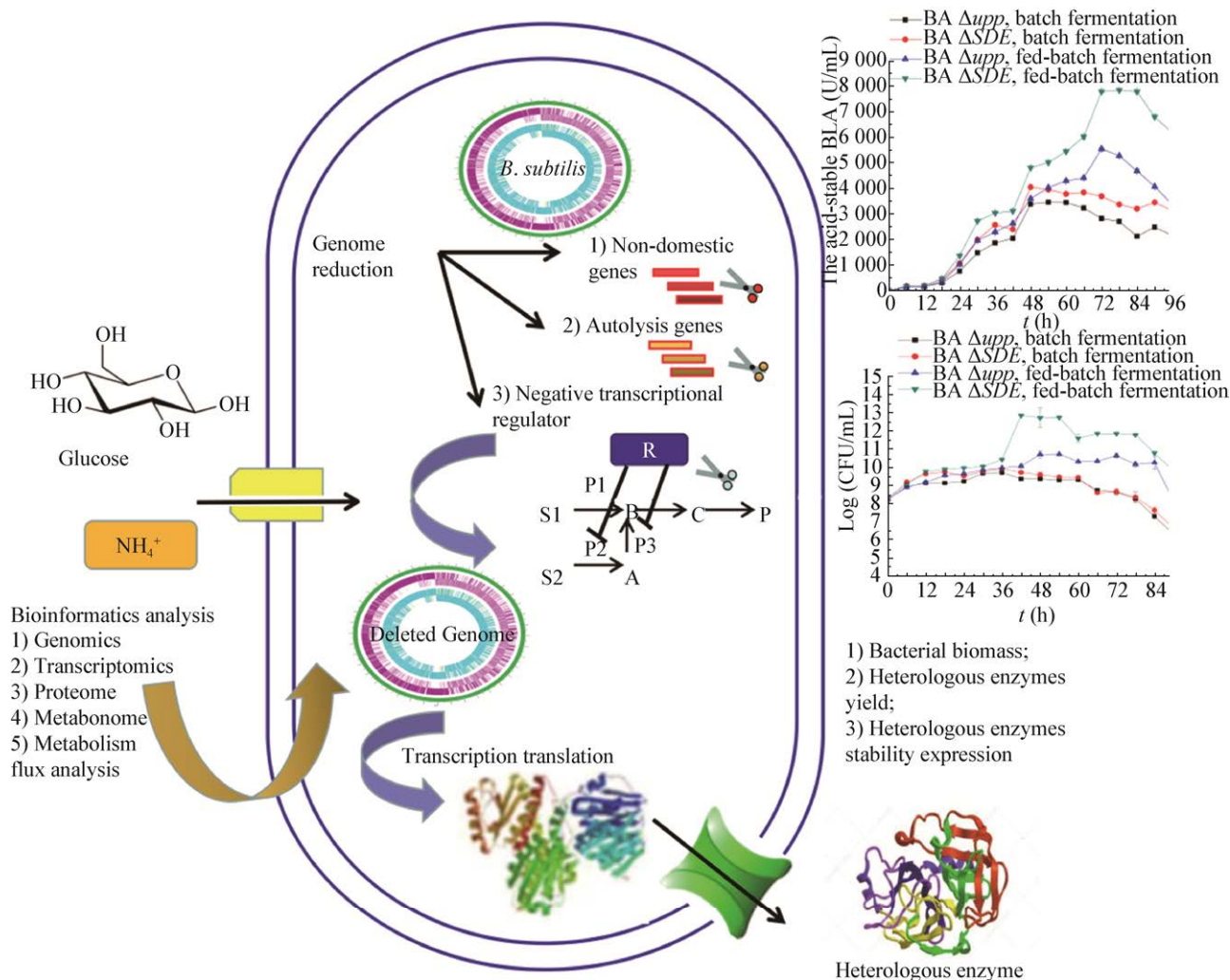


图2 枯草芽胞杆菌基因组删减提高异源酶表达策略^[33]

Figure 2 The strategy of reduction genome of *B. subtilis* to increase heterologous enzyme expression^[33]

2.2.2 删减枯草芽胞杆菌自溶基因

高密度发酵是生产外源蛋白的重要前提,而在发酵过程中由于存在营养缺乏、生长环境压力、次级代谢产物的积累以及菌体自然生长的限制导致了菌体自溶的产生。细菌自溶会导致细胞生物量降低,影响异源蛋白的生产,极大地限制了芽胞杆菌持续表达外源蛋白的能力。在芽胞杆菌中,细胞裂解通常发生在饥饿环境或衰老阶段,根据其自溶相关研究可以分为以下几点:

(1) 肽聚糖水解酶相关基因调节自溶

肽聚糖水解酶又称自溶素,通过裂解肽聚糖

中的共价键参与肽聚糖翻转和分裂。枯草芽胞杆菌中至少有 35 个编码肽聚糖水解酶的基因,它们参与了细胞分离、运动、产芽胞和自溶^[60]。根据其作用位点的不同,可分为胞壁酸酶、酰胺酶、内肽酶和氨基葡萄糖酶,其中包括了 *LytC*、*LytD*、*LytE*、*LytF*、*LytG*、*CwlO*、*CwlS* 和 *CwlK* 等肽聚糖水解酶^[60]。*LytC* (N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶)和 *LytD* (β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶)是芽胞杆菌生长过程中产生的主要自溶素,并都受到 *sigD* 的转录调控^[61]。*LytC* 被认为是介导细胞自溶的关键肽聚糖水解酶,单独缺失 *lytC* 可以有效抑制

细胞裂解^[62]。如单独敲除 *B. subtilis* ATCC 6051 中的 *lytC* 基因增加了菌体密度, 淀粉酶活力提高了 1.6 倍^[63]。*lytC* 与 *lytD* 同时缺失也会抑制细胞裂解, 但抑制作用要小于 *lytC* 单缺失突变体^[61]。*lytE* 和 *lytF* 编码肽链内肽酶, 参与菌体分离, 单独缺失 *lytE* 和 *lytF*, 突变体出现生长分离(分裂还是分离)缺陷, 但抑制细胞自溶效果并不显著^[64]。此外, *lytE* 与影响细胞长度增加的 *cwlO* 双缺失突变体会导致菌体致死效应^[65]。

(2) 胞外蛋白酶相关基因调节自溶

研究发现胞外蛋白酶参与降解细胞壁中的肽聚糖水解酶, 可以降低细胞中自溶素的水平。胞外蛋白酶缺失的菌株裂解程度增加, 其中胞外蛋白酶 AprE 和 NprE 稳定自溶素能力比 NprB、Bpr、Mpr 和 Epr 更大^[66]。Kodama 等研究证明, 适当缺失自溶素基因可以提高胞外蛋白酶缺失菌株的重组蛋白产量, 在串联敲除 8 种胞外蛋白酶的基础上分别敲除自溶素相关基因 *lytC* 和 *sigD*, 有效提高了外源蛋白的产量并延缓了自溶^[67]。

(3) 磷壁酸相关基因调节自溶

肽聚糖水解酶的调节除了受到胞外蛋白酶的作用外, 还受到细胞壁上磷壁酸的调节。磷壁酸是由核糖醇和甘油的残基组成的阴离子聚合物, 其通过细胞壁中的磷酸二酯键连接。作为阴离子聚合物, 磷壁酸是各种免疫细胞和多种细菌产生过剩阳离子肽抗生素的靶向目标; 同时, 磷壁酸可以与肽聚糖水解酶进行结合, 调节细胞表面净负电荷的含量, 对正常菌体代谢过程中产生的肽聚糖水解酶进行调控; *dlt* 操纵子介导脂磷壁酸 D-丙氨酸化是细胞表面净负电荷修饰的主要过程, *dlt* 操纵子的缺陷可以改善细胞壁的净负电荷^[68]。Chen 等通过缺失 *dlt* 操纵子(*dltABCD*), 使地衣芽孢杆菌的纳豆激酶、 α -淀粉酶和 β -甘露聚糖酶分别提高了 37.13%、44.53% 和 53.06%, 使其蛋白分泌能力提高^[68]。

(4) 同类相食相关基因调节自溶

除了肽聚糖水解酶对菌体自溶起主导作用

外, 菌体之间的同类相食也会导致菌体自溶的产生。菌体在生长受营养限制条件下, 会激活部分细胞中的孢子形成调节因子 Spo0A, 进而调节 Skf 和 Sdp 操纵子。*skf* 操纵子的第一个基因 *skfA* 编码的一种抗生素作为杀伤因子, 杀死不表达 Spo0A 的细胞^[69]。同时, 在表达 Spo0A 的细胞中, *sdp* 操纵子会产生信号蛋白 SdpC, 进一步增加杀伤作用, 通过杀死不表达 Spo0A 的细胞来摄取营养物质^[69]。Wang 等通过串联缺失枯草芽孢杆菌 168 中的 *lytC*、*xpf*、*skfA* 和 *sdpC*, 使细胞裂解减少 83.70%, β -半乳糖苷酶和纳豆激酶分别提高了 2.6 倍和 1.72 倍^[69]。Zhou 等对调控 *skf* 和 *sdp* 的调节基因 *spo0A* 进行敲除, 发现敲除后的 $\Delta spo0A$ 菌株自溶速率明显加快, 而且外源碱性蛋白酶的产量显著降低^[58]。该结果也进一步证实了同类相食调节基因 *spo0A* 在整个菌体代谢网络的复杂性, 需要人们进一步挖掘同类相食相关基因的关键调控因子和信号传递^[58,70]。

(5) 原噬菌体相关基因调节自溶

原噬菌体是指整合在细菌基因组或者环状质粒上的一类噬菌体, 它们是细菌噬菌体的一种潜在形式。当细菌受到刺激时, 原噬菌体可以被诱导进入裂解循环, 在大量复制后通过裂解细胞释放出噬菌体颗粒^[70]。在枯草芽孢杆菌中推测至少有 10 个原噬菌体或者噬菌体残余序列, 它们分别是 *skin*、*PBSX*、*sp β* 以及 *prophage1-7*, 其中 *PBSX* 和 *sp β* 是被证明依然保留着形成噬菌体颗粒的功能, 它们在特定条件下可以被诱导^[69]。Li 等对 *B. subtilis* 168 基因组上已知的原噬菌体(*prophage1-7*、*sp β* 、*skin*、*PBSX*)进行全部删减, 与亲本相比, 删减后的菌株 *B. subtilis* BSK756 自溶速率显著降低, 进一步证实原噬菌体相关基因与菌体自溶有关^[26]。

2.2.3 删减阻碍异源酶表达的转录负调控因子

提高芽孢杆菌中的异源酶表达还可以通过对其转录调控因子删减来实现。对转录调控因子的选择思路分为两种, 一种是选择与蛋白转录本身直接或者间接调控的转录因子, 如转录调节因子

SalA 可以直接抑制 *ScoC* 转录来实现对碱性丝氨酸蛋白酶 *AprE* 的正向调控^[71]; 另一种是选择与蛋白表达相关的代谢网络转录调控因子, 通过对异源蛋白分泌代谢途径进行分析, 从中选取对蛋白表达有影响的调控因子, 将代谢网络与转录调控相结合, 这种调控因子的选择主要是因为异源蛋白分泌的引入会使宿主细胞的代谢负担增大, 出现因异源蛋白的合成材料供给不足而阻碍异源蛋白的合成^[72]。因此, 通过对细胞代谢进行调节, 为异源蛋白合成提供充足的 ATP、氨基酸以及其他所需的资源, 进而促进宿主细胞更好地合成异源蛋白^[73]。这种与代谢途径相关的转录调控因子通常都是全局调控因子, 即一个转录调控因子对代谢途径中的多个过程都有调控作用, 有利于实现较大范围的调控作用^[73]。如通过对碳、氮代谢相关的转录调控因子 *CcpA*、*CodY* 基因删减来提高枯草芽胞杆菌中异源 β -半乳糖苷酶的产量^[74]。如缺失了 *CodY* 转录调控因子的枯草芽胞杆菌, 丝氨酸蛋白酶 *Vpr*、金属蛋白酶 *Mpr* 的产量明显增加^[75]。此外, 对异源酶的转录调控还可以通过利用 sRNA 来实现, 即通过构建目的蛋白 sRNA 基因缺陷的菌株来降低其对目的蛋白转录的抑制作用, 以此提高目的蛋白的产量^[76]。

3 存在问题及解决方案

随着近几年对枯草芽胞杆菌基因组的不断删减和改造, 其已成为碱性蛋白酶、 α -淀粉酶、脂肪酶等多种重要酶制剂的微生物细胞工厂。尤其是通过“自上而下”的技术路线删减基因组, 使多个简化基因组细胞完成构建, 如 *B. subtilis* MBG874 已经用于商业化生产。然而, 在枯草芽胞杆菌最小基因组构建和基因删减过程中仍然存在一系列问题, 如现有基因编辑系统存在编辑效率低、大片段区域删减困难等问题; 片面地追求基因组最小化, 容易对菌株的生长、代谢和遗传等造成不利的影响。基于此, 从 3 个方面对目前基因组删减存在的主要问题提出一些可行的解决方案。

(1) 基因编辑系统的开发

在枯草芽胞杆菌中已经成功开发了同源重组、Cre-loxP 等基因编辑手段, 但在实际操作过程中存在着编辑效率低、大片段敲除困难等限制因素。近年来发现的 CRISPR/Cas9, CRISPR/dCas9 编辑手段显示出诸多优势, 与传统的基因编辑方法相比, 存在着编辑效率高、多位点编辑能力强、编辑系统结构精简等优势。我们以穿梭质粒 pWH1520 为结构骨架, 构建了单质粒 CRISPR/Cas9 敲除系统, 不论是单点突变、大片段基因删减, 其基因缺失率达到 90% 以上, 该系统为芽胞杆菌有效地基因删减和代谢调控提供了支持, 具有广泛的应用前景^[57]。然而, 随着以 Cas9 蛋白为基础的 CRISPR 系统的广泛应用, 研究者们也发现了 Cas9 蛋白存在的局限性, 主要体现在其造成的双链断裂对宿主产生的毒性和脱靶问题。为了解决这一问题, 研究者通过失活 Cas9 蛋白单个核酸内切酶结构域获得 Cas9 切口酶 (Cas9nickase, Cas9n), 与双链切割活性 Cas9 相比, Cas9n 对宿主细胞生长压力小, 单链切口易于修复而且脱靶几率较小, 可有效提高枯草芽胞杆菌基因组删减效率^[77]。未来随着研究的深入以及生物信息学、结构生物学等学科的发展, 新型 CRISPR/Cas 系统将会继续得到开发, 从而进一步拓展 CRISPR/Cas 基因编辑系统的应用范围。

(2) 多组学分析和计算模拟芽胞杆菌全局代谢网络

片面地追求基因组最小化, 容易对菌株的生长、代谢和遗传等造成不利的影响。因此, 在构建小基因组细胞工厂的过程中, 不能忽视基因与基因之间的网络代谢调节, 同时要兼顾枯草芽胞杆菌对环境的适应能力和大规模培养的潜力, 借助转录组数据、比较基因组学等多组学分析, 模拟枯草芽胞杆菌在生长调节和异源酶表达调控上的关键基因。Reuß 等对构建的最小基因组菌株 *B. subtilis* PS38 进行的转录组、代谢组、蛋白质组学

系统分析, 包括必需基因和非必需基因的翻译效率、基因间的代谢调控的研究, 为研究枯草芽胞杆菌作为细胞工厂的应用奠定了基础^[11]。Yuan等^[29]以地衣芽胞杆菌和解淀粉芽胞菌为研究对象, 利用比较基因组、转录组和代谢组学对两种菌株的异源蛋白酶生产过程进行了转录和代谢差异分析, Zhou等也对阻碍异源酶表达的不良特性基因进行了研究, 发现改良后的芽胞杆菌生产异源酶效果提升显著^[57-59], 为芽胞杆菌生产异源酶提供了一定的依据。利用生物系统研究、计算机模拟辅助和控制代谢途径等策略可以平衡细胞生长和异源酶合成的代谢流量, 实现合理设计对基因组进一步缩减, 最终获得含有预定功能基因的更简单和可预测的细胞工厂, 用于工业化生产。

(3) 枯草芽胞杆菌生长特性及异源酶表达代谢途径的改善

对枯草芽胞杆菌生长特性的改善也会提高其异源酶的表达。截至目前, 大部分已构建的最小基因组底盘细胞的生长速度明显低于野生株, 这不仅延长了细胞培养周期, 也降低了异源酶的生产效率, 并且在引入外源酶表达途径过程中也会降低生长速度。为了减轻底盘细胞的代谢负担, 可以从以下两方面进行: 一方面, 可以通过合理分配细胞内部资源利用, 如降低枯草芽胞杆菌对环境扰动和中央碳代谢过度表达的响应, 将其朝向细胞生长的重要途径流通, 可能会提高细胞的生长速度^[78-79]; 另一方面, 为了减轻底盘细胞异源酶表达的代谢负担, 可以调节关键细胞生长基因(如参与中央碳代谢的基因)使细胞生长与异源酶生产分离, 以减少细胞生长与异源酶合成之间前体的竞争, 还可以通过蛋白质成本计算引入细胞消耗较少的经济途径, 减少异源酶对细胞生长的影响^[80-81]。

4 展望

由于遗传学背景较清楚、生长速度快、培养基条件要求较低、安全性能高等特点, 枯草芽胞

杆菌已经成为工业酶生产上最常用的表达系统, 尤其是通过对枯草芽胞杆菌基因组删减提升异源酶的表达是当前的研究热点之一。通过基因组删减提升异源酶表达的过程中, 确定删减靶区域是关键前提, 尤其是建立完善的大片段敲除策略。进行基因组删减优化并非盲目删减非必需基因, 而应该是尽可能改造出只包含有利基因的枯草芽胞杆菌菌株。根据异源酶目标基因进一步优化基因组, 以提高底盘细胞的适配性。有研究以工业酶生产常用宿主地衣芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌为研究对象, 利用多组学分析技术对其产酶调节机制进行了研究, 在对基因组删减技术优化的同时, 于基因组不同位点, 包括复制起始位点 *ori* 及其对称位点整合异源酶目标基因, 显著提升了菌体生长速率和蛋白酶产量^[29,59]。

随着多组学测序技术的快速发展, 结合分子遗传手段, 枯草芽胞杆菌基因组删减提升异源酶表达的研究已经取得了一定进展, 但具体调控通路还需要进一步探究。在基因组删减的过程中, 研究者应注意基因组改造后的枯草芽胞杆菌代谢水平与生长速率相对较低这一特性, 正确判断某一通路或基因、蛋白等表达水平变化是调节菌体有效生产异源酶的前提, 明确关键通路后展开相应基因的功能研究对解析基因组删减提升异源酶表达有重要意义。

未来随着各种技术之间的交叉与相互渗透, 通过合理的系统构建与优化, 枯草芽胞杆菌作为异源酶表达的底盘宿主, 必将克服目前阻碍其发展的重重壁垒, 最终成为一种表达异源酶的最佳微生物细胞工厂。

REFERENCES

- [1] Liu YF, Li JH, Du GC, Chen J, Liu L. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: recent advances and future directions[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(1): 20-30
- [2] Koo BM, Kritikos G, Farelli JD, Todor H, Tong K, Kimsey H, Wapinski I, Galardini M, Cabal A, Peters JM, et al. Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*[J]. *Cell Systems*, 2017, 4(3):

- 291-305.e7
- [3] Li Y, Zhu XJ, Zhang XY, Fu J, Wang ZW, Chen T, Zhao XM. Characterization of genome-reduced *Bacillus subtilis* strains and their application for the production of guanosine and thymidine[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 94
 - [4] Wang GL, Shi T, Chen T, Wang XY, Wang YC, Liu DY, Guo JX, Fu J, Feng LL, Wang ZW, et al. Integrated whole-genome and transcriptome sequence analysis reveals the genetic characteristics of a riboflavin-overproducing *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 138-149
 - [5] Halmschlag B, Steurer X, Putri SP, Fukusaki E, Blank LM. Tailor-made poly- γ -glutamic acid production[J]. Metabolic Engineering, 2019, 55: 239-248
 - [6] Westbrook AW, Ren X, Moo-Young M, Chou CP. Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(1): 216-231
 - [7] Van Dijl JM, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 3
 - [8] Cui WJ, Han LC, Suo FY, Liu ZM, Zhou L, Zhou ZM. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(10): 145
 - [9] Neef J, Bongiorno C, Schmidt B, Goosens VJ, Van Dijl JM. Relative contributions of non-essential Sec pathway components and cell envelope-associated proteases to high-level enzyme secretion by *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 52
 - [10] Zhang K, Su LQ, Wu J. Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2020, 11: 295-318
 - [11] Reuß DR, Altenbuchner J, Mäder U, Rath H, Ischebeck T, Sappa PK, Thürmer A, Guérin C, Nicolas P, Steil L, et al. Large-scale reduction of the *Bacillus subtilis* genome: consequences for the transcriptional network, resource allocation, and metabolism[J]. Genome Research, 2017, 27(2): 289-299
 - [12] Tarnopol RL, Bowden S, Hinkle K, Balakrishnan K, Nishii A, Kaczmarek CJ, Pawloski T, Vecchiarelli AG. Lessons from a minimal genome: what are the essential organizing principles of a cell built from scratch?[J]. ChemBioChem, 2019, 20(20): 2535-2545
 - [13] Gu Y, Xu XH, Wu YK, Niu TF, Liu YF, Li JH, Du GC, Liu L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 109-121
 - [14] Grazziotin AL, Vidal NM, Venancio TM. Uncovering major genomic features of essential genes in Bacteria and a methanogenic Archaea[J]. The FEBS Journal, 2015, 282(17): 3395-3411
 - [15] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessi eres P, Bolotin A, Borchert S, et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Nature, 1997, 390(6657): 249-256
 - [16] Itaya M. A synthetic DNA transplant[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(7): 687-689
 - [17] Yoshida KI, Kobayashi K, Miwa Y, Kang CM, Matsunaga M, Yamaguchi H, Tojo S, Yamamoto M, Nishi R, Ogasawara N, et al. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(3): 683-692
 - [18] Westers H, Dorenbos R, Van Dijl JM, Kabel J, Flanagan T, Devine KM, Jude F, S  ror SJ, Beekman AC, Darmon E, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(12): 2076-2090
 - [19] Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, et al. Essential *Bacillus subtilis* genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(8): 4678-4683
 - [20] Ara K, Ozaki K, Nakamura K, Yamane K, Sekiguchi J, Ogasawara N. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2007, 46(3): 169-178
 - [21] Morimoto T, Kadoya R, Endo K, Tohata M, Sawada K, Liu SA, Ozawa T, Kodama T, Kakeshita H, Kageyama Y, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*[J]. DNA Research, 2008, 15(2): 73-81
 - [22] Tanaka K, Henry CS, Zinner JF, Jolivet E, Cohoon MP, Xia FF, Bidnenko V, Ehrlich SD, Stevens RL, Noirot P. Building the repertoire of dispensable chromosome regions in *Bacillus subtilis* entails major refinement of cognate large-scale metabolic model[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(1): 687-699
 - [23] Commichau FM, Pietack N, St  lke J. Essential genes in *Bacillus subtilis*: a re-evaluation after ten years[J]. Molecular BioSystems, 2013, 9(6): 1068-1075
 - [24] Juhas M, Reuß DR, Zhu BY, Commichau FM. *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering[J]. Microbiology, 2014, 160(11): 2341-2351
 - [25] Liu YF, Liu L, Li JH, Du GC, Chen J. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(5): 548-562
 - [26] Li Y, Zhu XJ, Zhang XY, Fu J, Wang ZW, Chen T, Zhao XM. 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
 - [27] Buescher JM, Liebermeister W, Jules M, Uhr M, Muntel J,

- Botella E, Hessling B, Kleijn RJ, Le Chat L, Lecointe F, et al. Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism[J]. Science, 2012, 335(6072): 1099-1103
- [28] Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, et al. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*[J]. Science, 2012, 335(6072): 1103-1106
- [29] Yuan FY, Li K, Zhou CX, Liu H, Chai HN, Lu FP, Zhang HT. Identification of two novel highly inducible promoters from *Bacillus licheniformis* by screening transcriptomic data[J]. Genomics, 2019, 112(2): 1866-1871
- [30] Sierro N, Makita Y, De Hoon M, Nakai K. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(S1): D93-D96
- [31] Michna RH, Zhu BY, Mäder U, Stülke J. SubtiWiki 2.0-an integrated database for the model organism *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 44(D1): D654-D662
- [32] Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Kaipa P, Krummenacker M, Latendresse M, Paley S, Rhee SY, Shearer AG, Tissier C, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(S1): D623-D631
- [33] Liu L, Liu YF, Shin HD, Chen RR, Wang NS, Li JH, Du GC, Chen J. 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
- [34] Lammers CR, Flórez LA, Schmeisky AG, Roppel SF, Mäder U, Hamoen L, Stülke J. Connecting parts with processes: SubtiWiki and SubtiPathways integrate gene and pathway annotation for *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology, 2010, 156(3): 849-859
- [35] Mäder U, Schmeisky AG, Flórez LA, Stülke J. SubtiWiki-a comprehensive community resource for the model organism *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(D1): D1278-D1287
- [36] Osterman AL, Gerdes SY. Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics[M]. Totowa: Humana Press, 2008: 1-416
- [37] Zhang X, Peng C, Zhang G, Gao F. Comparative analysis of essential genes in prokaryotic genomic islands[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 12561
- [38] Liu W, Fang LR, Li M, Li S, Guo SH, Luo R, Feng ZX, Li B, Zhou ZM, Shao GQ, et al. Comparative genomics of mycoplasma: analysis of conserved essential genes and diversity of the pan-genome[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35698
- [39] Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, de Leon AL, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species[J]. Genome Biology, 2004, 5(10): r77
- [40] Anderson I, Sorokin A, Kapatral V, Reznik G, Bhattacharya A, Mikhailova N, Burd H, Joukov V, Kaznadzey D, Walunas T, et al. Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 250(2): 175-184
- [41] Zhang LY, Chang SH, Wang J. How to make a minimal genome for synthetic minimal cell[J]. Protein & Cell, 2010, 1(5): 427-434
- [42] Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2(1): 2006.0008
- [43] Stuari L, Lechaplais C, Salminen AV, Séguens B, Durot M, Castelli V, Pinet A, Labadie K, Cruveiller S, Weissenbach J, et al. Novel metabolic features in *Acinetobacter baylyi* ADP1 revealed by a multiomics approach[J]. Metabolomics, 2014, 10(6): 1223-1238
- [44] Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balázs G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, et al. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(19): 5673-5684
- [45] Hutchison III CA, Peterson SN, Gill SR, Cline RT, White O, Fraser CM, Smith HO, Venter JC. Global transposon mutagenesis and a minimal mycoplasma genome[J]. Science, 1999, 286(5447): 2165-2169
- [46] Hutchison III CA, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, Gill J, Kannan K, Karas BJ, Ma L, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome[J]. Science, 2016, 351(6280): aad6253
- [47] Hirokawa Y, Kawano H, Tanaka-Masuda K, Nakamura N, Nakagawa A, Ito M, Mori H, Oshima T, Ogasawara N. Genetic manipulations restored the growth fitness of reduced-genome *Escherichia coli*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(1): 52-58
- [48] Zhang Y, Thiele I, Weekes D, Li ZW, Jaroszewski L, Ginalski K, Deacon AM, Wooley J, Lesley SA, Wilson IA, et al. Three-dimensional structural view of the central metabolic network of *Thermotoga maritima*[J]. Science, 2009, 325(5947): 1544-1549
- [49] Hao T, Han BB, Ma HW, Fu J, Wang H, Wang ZW, Tang BC, Chen T, Zhao XM. *In silico* metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for improved production of riboflavin, Egl-237, (R, R)-2, 3-butanediol and isobutanol[J]. Molecular BioSystems, 2013, 9(8): 2034-2044

- [50] Manabe K, Kageyama Y, Morimoto T, Ozawa T, Sawada K, Endo K, Tohata M, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. Combined effect of improved cell yield and increased specific productivity enhances recombinant enzyme production in genome-reduced *Bacillus subtilis* strain MGB874[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8370-8381
- [51] Manabe K, Kageyama Y, Morimoto T, Shimizu E, Takahashi H, Kanaya S, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. Improved production of secreted heterologous enzyme in *Bacillus subtilis* strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 18
- [52] Manabe K, Kageyama Y, Tohata M, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. High external pH enables more efficient secretion of alkaline α -amylase AmyK38 by *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 74
- [53] Suárez RA, Stülke J, Van Dijl JM. Less is more: toward a genome-reduced *Bacillus* cell factory for “difficult proteins”[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(1): 99-108
- [54] Toya Y, Hirasawa T, Morimoto T, Masuda K, Kageyama Y, Ozaki K, Ogasawara N, Shimizu H. ^{13}C -Metabolic flux analysis in heterologous cellulase production by *Bacillus subtilis* genome-reduced strain[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 179: 42-49
- [55] Fischer E, Sauer U. Large-scale *in vivo* flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism[J]. Nature Genetics, 2005, 37(6): 636-640
- [56] Zhang K, Duan XG, Wu J. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 27943
- [57] Zhou CX, Liu H, Yuan FY, Chai HN, Wang HK, Liu FF, Li Y, Zhang HT, Lu FP. Development and application of a CRISPR/Cas9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 329-337
- [58] Zhou CX, Zhou HY, Zhang HT, Lu FP. Optimization of alkaline protease production by rational deletion of sporulation related genes in *Bacillus licheniformis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 127
- [59] Zhou CX, Zhou HY, Li DK, Zhang HT, Wang HB, Lu FP. Optimized expression and enhanced production of alkaline protease by genetically modified *Bacillus licheniformis* 2709[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 45
- [60] Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 259-286
- [61] Chen R, Guttenplan SB, Blair KM, Kearns DB. Role of the σ^D -dependent autolysins in *Bacillus subtilis* population heterogeneity[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(18): 5775-5784
- [62] Nayyab S, O'Connor M, Brewster J, Gravier J, Jamieson M, Magno E, Miller RD, Phelan D, Roohani K, Williard P, et al. Diamide inhibitors of the *Bacillus subtilis* *N*-acetylglucosaminidase LytG that exhibit antibacterial activity[J]. ACS Infectious Diseases, 2017, 3(6): 421-427
- [63] Kabisch J, Thürmer A, Hübel T, Popper L, Daniel R, Schweder T. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(2): 97-104
- [64] Yamamoto H, Kurosawa SI, Sekiguchi J. Localization of the vegetative cell wall hydrolases LytC, LytE, and LytF on the *Bacillus subtilis* cell surface and stability of these enzymes to cell wall-bound or extracellular proteases[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(22): 6666-6677
- [65] Hashimoto M, Ooiwa S, Sekiguchi J. Synthetic lethality of the *lytE cwlO* genotype in *Bacillus subtilis* is caused by lack of D, L-endopeptidase activity at the lateral cell wall[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(4): 796-803
- [66] Stephenson K, Bron S, Harwood CR. Cellular lysis in *Bacillus subtilis*; the affect of multiple extracellular protease deficiencies[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 29(2): 141-145
- [67] Kodama T, Endo K, Ara K, Ozaki K, Kakeshita H, Yamane K, Sekiguchi J. Effect of *Bacillus subtilis* *spo0A* mutation on cell wall lytic enzymes and extracellular proteases, and prevention of cell lysis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103(1): 13-21
- [68] Chen YZ, Cai DB, He PH, Mo F, Zhang Q, Ma X, Chen SW. Enhanced production of heterologous proteins by *Bacillus licheniformis* with defective D-alanylation of lipoteichoic acid[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(9): 135
- [69] Wang Y, Chen ZM, Zhao RL, Jin TT, Zhang XM, Chen XD. Deleting multiple lytic genes enhances biomass yield and production of recombinant proteins by *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 129
- [70] Hofler C, Heckmann J, Fritsch A, Popp P, Gebhard S, Fritz G, Mascher T. Cannibalism stress response in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology, 2016, 162(1): 164-176
- [71] Derouiche A, Shi L, Bidnenko V, Ventrone M, Pignonneau N, Franz-Wachtel M, Kalantari A, Nessler S, Noirot-Gros MF, Mijakovic I. *Bacillus subtilis* SalA is a phosphorylation-dependent transcription regulator that represses *scoC* and activates the production of the exoprotease AprE[J]. Molecular Microbiology, 2015, 97(6): 1195-1208
- [72] Zou W, Edros R, Al-Rubeai M. The relationship of metabolic burden to productivity levels in CHO cell lines[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2018, 65(2): 173-180
- [73] Cai DB, Zhu J, Zhu S, Lu Y, Zhang BW, Lu K, Li JH, Ma X, Chen SW. Metabolic engineering of main transcription factors in carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms for enhanced production of bacitracin in *Bacillus*

- licheniformis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(4): 866-875
- [74] Cao HJ, Villatoro-Hernandez J, Weme RDO, Frenzel E, Kuipers OP. Boosting heterologous protein production yield by adjusting global nitrogen and carbon metabolic regulatory networks in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 143-512
- [75] Barbieri G, Voigt B, Albrecht D, Hecker M, Albertini AM, Sonenshein AL, Ferrari E, Belitsky BR. CodY Regulates expression of the *Bacillus subtilis* extracellular proteases Vpr and Mpr[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(8): 1423-1432
- [76] Hertel R, Meyerjürgens S, Voigt B, Liesegang H, Volland S. Small RNA mediated repression of subtilisin production in *Bacillus licheniformis*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 5699
- [77] Xu T, Li YC, He ZL, Van Nostrand JD, Zhou JZ. Cas9 nickase-assisted RNA repression enables stable and efficient manipulation of essential metabolic genes in *Clostridium cellulolyticum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1744
- [78] Gupta A, Reizman IMB, Reisch CR, Prather KLJ. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 273-279
- [79] Lo TM, Chng SH, Teo WS, Cho HS, Chang MW. A two-layer gene circuit for decoupling cell growth from metabolite production[J]. Cell Systems, 2016, 3(2): 133-143
- [80] Noor E, Flamholz A, Bar-Even A, Davidi D, Milo R, Liebermeister W. The protein cost of metabolic fluxes: prediction from enzymatic rate laws and cost minimization[J]. PLoS Computational Biology, 2016, 12(11): e1005167
- [81] Wortel MT, Noor E, Ferris M, Bruggeman FJ, Liebermeister W. Metabolic enzyme cost explains variable trade-offs between microbial growth rate and yield[J]. PLoS Computational Biology, 2018, 14(2): e1006010

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊, CSCD 核心期刊, 中国科技核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2021 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413