

• 工业生物技术 •

CRISPR/dCas9 干扰 *bcsD* 基因表达调控细菌纤维素结构

黄龙辉^{1,2}, 李雪晶^{1,2}, 孙雪文^{1,2}, 王旭^{1,2}, 王祎彤^{1,2}, 贾士儒^{1,2}, 钟成^{1,2}

1 天津科技大学 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457

2 天津科技大学 教育部工业发酵微生物重点实验室, 天津 300457

黄龙辉, 李雪晶, 孙雪文, 王旭, 王祎彤, 贾士儒, 钟成. CRISPR/dCas9 干扰 *bcsD* 基因表达调控细菌纤维素结构. 生物工程学报, 2022, 38(2): 772-779.

HUANG LH, LI XJ, SUN XW, WANG X, WANG YT, JIA SR, ZHONG C. Regulating the structure of bacterial cellulose by altering the expression of *bcsD* using CRISPR/dCas9. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 772-779.

摘 要: 木葡糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) 是细菌纤维素的主要生产菌株。在该菌中, BcsD 是纤维素合酶的亚基之一, 参与细菌纤维素的组装过程。利用 CRISPR/dCas9 系统调控 *bcsD* 基因的表达量, 获得了一系列 *bcsD* 基因表达量不同的木葡糖酸醋杆菌。通过分析细菌纤维素的结构特征发现, 细菌纤维素的结晶度和孔隙率随着木葡糖酸醋杆菌中 *bcsD* 表达量的变化而发生改变。其中孔隙率的变化范围在 59.95%–84.05% 之间, 结晶度的变化范围在 74.26%–93.75% 之间, 而细菌纤维素的产量并未因 *bcsD* 的表达量变化而发生显著下降。结果表明, *bcsD* 的表达量低于 55.34% 后, 细菌纤维素的孔隙率显著上升, 并且细菌纤维素的结晶度与 *bcsD* 的表达量呈正相关。最终, 通过干扰 *bcsD* 基因的表达, 实现了一步发酵木葡糖酸醋杆菌获得了产量稳定且结构不同的细菌纤维素。

关键词: CRISPR/dCas9; 木葡糖酸醋杆菌; 细菌纤维素; *bcsD*

Received: April 28, 2021; **Accepted:** July 6, 2021; **Published online:** July 24, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21978219, 21576212)

Corresponding author: CHENG Zhong. Tel: +86-22-60601698; E-mail: czhong@tust.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (21978219, 21576212)

Regulating the structure of bacterial cellulose by altering the expression of *bcsD* using CRISPR/dCas9

HUANG Longhui^{1,2}, LI Xuejing^{1,2}, SUN Xuewen^{1,2}, WANG Xu^{1,2}, WANG Yitong^{1,2}, JIA Shiru^{1,2}, ZHONG Cheng^{1,2}

1 State Key Laboratory of Food Nutrition & Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology (Ministry of Education), Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: *Gluconacetobacter xylinus* is a primary strain producing bacterial cellulose (BC). In *G. xylinus*, BcsD is a subunit of cellulose synthase and is participated in the assembly process of BC. A series of *G. xylinus* with different expression levels of the *bcsD* gene were obtained by using the CRISPR/dCas9 technique. Analysis of the structural characteristics of BC showed that the crystallinity and porosity of BC changed with the expression of *bcsD*. The porosity varied from 59.95%–84.05%, and the crystallinity varied from 74.26%–93.75%, while the yield of BC did not decrease significantly upon changing the expression levels of *bcsD*. The results showed that the porosity of bacterial cellulose significantly increased, while the crystallinity was positively correlated with the expression of *bcsD*, when the expression level of *bcsD* was below 55.34%. By altering the expression level of the *bcsD* gene, obtaining BC with different structures but stable yield through a one-step fermentation of *G. xylinus* was achieved.

Keywords: CRISPR/dCas9; *Gluconacetobacter xylinus*; bacterial cellulose; *bcsD*

细菌纤维素 (bacterial cellulose, BC) 是一种由微生物将葡萄糖分子通过 β -1,4-糖苷键连接而成的高分子化合物^[1]。BC 具备生物相容性好、结晶度高、孔隙率高以及抗拉伸能力强等特点^[2]。这些特点使得其被广泛应用于组织培养^[3]、医用材料^[4-5]和造纸^[6]等各个领域。而不同的应用领域对 BC 的结构特性有不同的需求^[7]。因此 BC 在不同领域的应用过程中,需要具备不同的结构特性。

木葡糖酸醋杆菌是 BC 的合成菌株。BC 在合成时呈条带状,从细菌的顶端伸出^[8]。条带由约 46 个微纤维组成,横截面平均为 1.6 nm \times 5.8 nm。细菌纤维素合酶负责 BC 的合成。在杆菌的纵轴上,大约有 50 个单独的合成

位点排列成一行,并与外膜紧密结合^[8]。细菌在合成 BC 的过程中同时对 BC 进行结晶^[9]。细菌纤维素合酶由多个亚基组成,BcsD 是其中之一。BcsD 呈精致的圆柱形状,在缸壁上有一个右旋的二聚体,从而形成了一个功能性的八聚体亚基,此结构说明 BcsD 为葡聚糖链的排出提供了通道^[10]。*bcsD* 的插入失活却并未让细胞失去合成纤维素的能力^[11],这说明 BcsD 不是合成细菌纤维素所必需的。*bcsD* 基因突变的菌株产生的 2 种纤维素异构体 (纤维素 I 和纤维素 II) 比 *bcsD* 基因突变前的对照菌株分子量更低,这表明 *bcsD* 基因参与了纤维素的结晶过程^[11-12]。细菌纤维素的主要生产菌株是木葡糖酸醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*) CGMCC 2955,该菌

株的基因组中存在 4 种纤维素合酶的操纵子 (*bcs I*、*bcs II*、*bcs III*和 *bcs IV*), 而 *bcsD* 基因仅存在于 *bcsI* 操纵子的末端^[13]。

CRISPR/dCas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/dCas9) 系统由 CRISPR/Cas9 系统衍生而来, 用于靶向调控基因表达的一种遗传工具^[14]。该系统由失去切割活性的 Cas9 蛋白 (dead Cas9、dCas9) 和能够与靶位点基因特异性结合的单链 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成^[15-16]。sgRNA-dCas9 复合体靶向基因的位置的差异会使得基因表达的强弱发生改变, 也就是说可以通过选择不同的靶位点来控制干扰基因的表达强度^[17]。

利用 CRISPR/dCas9 系统对 *bcsD* 的表达进行靶向调控, 获得了一系列 *bcsD* 基因表达量不同的木葡糖酸醋杆菌。通过表征 BC 的结构, 探究了 *bcsD* 表达量与 BC 膜结构间的关系。利用基因表达量调控细菌纤维素结构的方法, 有望实现 BC 膜结构的定向调控。相较于通过化学的方法修饰 BC 结构, 利用基因表达量调控细菌纤维素结构的方法, 一方面能够通过一步发酵生产不同结构的细菌纤维素, 进而减少操作流程来节约生产成本; 另一方面, 又能保持材料本身的生物相容性。

1 材料与方法

1.1 菌种

本研究构建载体所用菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 。产 BC 的发酵菌株为木葡糖酸醋杆菌, 该菌株由工业微生物教育部重点实验室筛选, 中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏。

1.2 培养基

G. xylinus CGMCC 2955 培养基 (g/L): 酵母粉 7.5, 蛋白胨 10, Na₂HPO₄·12H₂O 10, pH

为 6.0, 121 °C 灭菌 20 min。葡萄糖 25 g/L, 115 °C 灭菌 15 min。固体培养基另添加 20 g/L 琼脂。

LB (Luria-Bertani) 培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 为 7.0。固体培养基另添加 20 g/L 琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 发酵培养

从固体培养基平板上挑取单菌落至液体发酵培养基, 180 r/min、30 °C 培养 24 h。取 1 mL 发酵液转移至含有 4% (V/V) 纤维素酶 (5 000 U/mL) 的 100 mL 新鲜发酵培养基中, 180 r/min、30 °C 振荡培养 24 h。4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 重悬菌体, 将菌体接种至 100 mL 新鲜发酵培养基中, OD₆₀₀=0.02。振荡培养条件为 180 r/min、30 °C、8 d。静置培养条件为 30 °C、8 d。

1.4 载体构建

实验中所采用的 CRISPR/dCas9 载体为本实验室已构建载体^[18]。表 1 为本实验用到的引物。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

按照 RNA 总提试剂盒 (Bacteria Total RNA Extraction Kit, TaKaRa) 步骤提取细胞总 RNA。

按照反转录试剂盒 (GoScrip™ Reverse Transcription System, Promega) 步骤将 RNA 反转录成 cDNA。

以 *gryB* 为内参基因, cDNA 为模板, 按照实时荧光定量 PCR 试剂盒步骤 (2×SYBR Green qPCR Master Mix, Bio-mike) 测定样本中的 *bcsD* 基因的表达量。其中 *gryB* 基因的引物为 *gryB-S* 和 *gryB-A*; *bcsD* 基因的引物为 *gryB-S* 和 *gryB-A* (表 1)。

1.6 细菌纤维素质量测定

发酵结束后, 将 BC 膜取出并用蒸馏水清洗, 除去发酵液。然后将 BC 浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中除去菌体, 直到 BC 完全呈乳白色后取出。用蒸馏水浸泡 BC 膜, 去除其中

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Sequences (5'→3')	Description
<i>gyrB</i> -S	CTTCTTCTTCCGCCAGATGC	Upstream primer of <i>gyrB</i> for qPCR
<i>gyrB</i> -A	GATGAACAGGACTTCGGCAC	Downstream primer of <i>gyrB</i> for qPCR
<i>bcsD</i> _S	TCAACGCAAACCGGACTTT	Upstream primer of <i>bcsD</i> for qPCR
<i>bcsD</i> _A	CAGTTGATCATGGCCAGCAG	Down stream primer of <i>bcsD</i> for qPCR
<i>bcsD</i> (1-)_S	<u>TAGT</u> GACAACCTTTCAACGCAAAC	Spacer of CRISPRi that targeting to the first base of <i>bcsD</i> negative-strand
<i>bcsD</i> (1-)_A	<u>AAACG</u> TTTTGCGTTGAAAGTTGTC	
<i>bcsD</i> (126+)_S	<u>TAGT</u> CAGCGGAGGCTGCAGCCGAC	Spacer of CRISPRi that targeting to the 126th base of <i>bcsD</i> positive-strand
<i>bcsD</i> (126+)_A	<u>AAACG</u> TTCGGCTGCAGCCTCCGCTG	
<i>bcsD</i> (235+)_S	<u>TAGT</u> GATGCGCATGGCATGGTCCT	Spacer of CRISPRi that targeting to the 235th base of <i>bcsD</i> positive-strand
<i>bcsD</i> (235+)_A	<u>AAACG</u> AGGACCATGCCATGCGCATC	
<i>bcsD</i> (337+)_S	<u>TAGT</u> CCGCTGGATCACGTCGCAGC	Spacer of CRISPRi that targeting to the 337th base of <i>bcsD</i> positive-strand
<i>bcsD</i> (337+)_A	<u>AAACG</u> CCTGCGACGTGATCCAGCGG	
<i>bcsD</i> (418+)_S	<u>TAGT</u> GATGATCGTCTGGCTGGGAA	Spacer of CRISPRi that targeting to the 418th base of <i>bcsD</i> positive-strand
<i>bcsD</i> (418+)_A	<u>AAACT</u> TCCCAGCCAGACGATCATC	

bcsD I cut site is underlined.

的 NaOH，至 pH 为 7.0。最后，将 BC 膜置于 80 °C 恒温干燥箱中，直至恒重。

1.7 扫描电子显微镜 (SEM)

观测 BC 形态，将浸泡至中性的 BC 膜放入液氮中 1 h，用冷冻干燥机处理至恒重。撕去 BC 表层后，喷金 (HITACHI E-1010)，扫描电子显微镜下观察 BC 膜表面结构，并拍照。

Matlab 计算孔隙率^[18]：(1) 对 SEM 照片进行灰度化处理得到图 1。(2) 对图 1 进行二值化。(3) 计算图形中的黑色像素点的个数，得出其占原图中的百分比，即为所求的孔隙率。

matlab 运算代码如下：

```
I=imread('address'); %读取地址
figure (1), imshow (I); %画出图 1
P = rgb2gray (I); %灰度化
figure (2), imshow (P); %显示灰度化后的图像
title ('灰度化后的图像');
level = graythresh (I); %找出阈值
BW = im2bw (I, level); %将图形二值化
```

figure (3), imshow (BW);

length (find (BW==0))/length (BW==1)

1.8 X-射线衍射 (XRD) 测试

采用 X-射线衍射仪 (X-ray diffractometer) 进行检测。将 BC 膜放入样品池，Cu 靶，10 kV 高压，电流 100 mA，扫描范围 2θ=10–30°。扫描速度 10°/min。

结晶度(CrI)的计算：

$$CrI (\%) = (I_{020} - I_{am}) / I_{020} \times 100 \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 CRISPR/dCas9 调控 *bcsD* 基因的表达

实验用到的 pdCas9 载体为表达 dCas9 蛋白和 sgRNA 的载体骨架。将靶向 *bcsD* 基因不同位点的 20 nt 序列整合到 pdCas9 载体，获得了一系列表达 sgRNA-dCas9 复合体的载体。这些 sgRNA-dCas9 复合体分别靶向 *bcsD* 基因反义链的第 1 位碱基和正义链的第 126、235、337、418 位碱基。这些载体分别被命名为 pdCas9_ *bcsD* (1-)、pdCas9_ *bcsD* (126+)、

pdCas9_ *bcsD* (235+)、pdCas9_ *bcsD* (337+) 和 pdCas9_ *bcsD* (418+)。将这 5 个载体以及 pdCas9 载体分别导入木葡糖酸醋杆菌。取发酵 48 h 后的菌体样本, 以 *gryB* 为内参基因测定 *bcsD* 基因的表达量。

如图 1 所示, 以表达 pdCas9 载体的菌株为对照菌株, 表达 pdCas9_ *bcsD* (1-), pdCas9_ *bcsD* (126+)、pdCas9_ *bcsD* (235+)、pdCas9_ *bcsD* (337+) 和 pdCas9_ *bcsD* (418+) 的木葡糖酸醋杆菌中 *bcsD* 基因表达量分别为对照菌株中的 55.34%、35.07%、76.18%、29.39% 和 62.51%。Cui 等的研究表明, 随着靶位点距离启动子越远基因表达受到的抑制就越强, 而且 sgRNA-dCas9

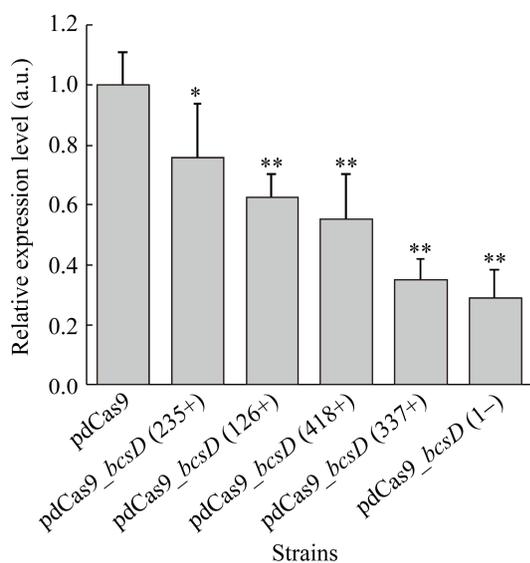


图 1 木葡糖酸醋杆菌中 *bcsD* 的表达量
pdCas9、pdCas9_ *bcsD* (1-), pdCas9_ *bcsD* (126+)、pdCas9_ *bcsD* (235+)、pdCas9_ *bcsD* (337+) 和 pdCas9_ *bcsD* (418+) 分别表示携带相应载体的木葡糖酸醋杆菌; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 1 The expression level of *bcsD* in *G. xylinus*. pdCas9, pdCas9_ *bcsD* (1-), pdCas9_ *bcsD* (126+), pdCas9_ *bcsD* (235+), pdCas9_ *bcsD* (337+) and pdCas9_ *bcsD* (418+) indicate *Gluconacetobacter xylinus* that carried the corresponding plasmid, respectively. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

复合体靶向正义链的抑制效果比反义链好^[17]。然而在本实验中, *bcsD* 基因的表达量并未与靶位点和启动子间的距离表现出明显的相关性。这可能是由于 *bcsD* 与 *bcsA*、*bcsB* 以及 *bcsC* 3 个基因共用一个启动子, 并且位于该操纵子的末端所致。尽管如此, 本实验还是获得了一系列 *bcsD* 表达量分布在 29.39%–100% 之间的菌株, 借此可以探究 *bcsD* 基因表达量与木葡糖酸醋杆菌的生长以及 BC 膜特性间的关系。

2.2 *bcsD* 表达量对发酵的影响

为了探究 *bcsD* 基因的表达量对菌株生长的影响, 测定了发酵 8 d 过程中的 pH 变化曲线 (图 2A) 以及生长曲线 (图 2B)。从图 2A 和图 2B 可以发现, *bcsD* 表达量更低的菌株相对于仅表达 pdCas9 空载体的对照菌株在前 96 h 生长较慢, 在 96–120 h 时间段内则出现了快速增长。而在这段时间里 pH 呈现出先下降再上升的过程。之前的研究表明, 这是由于木葡糖酸醋杆菌在生长的过程中先将葡萄糖转化成了葡萄糖酸使得培养基中的 pH 下降, 而后菌株开始利用葡萄糖酸, 环境中的 pH 开始上升, 菌株也同时进入了二次生长的阶段^[19]。在 120–192 h 期间, 相对于仅表达 pdCas9 空载体的木葡糖酸醋杆菌, *bcsD* 基因受干扰的菌株的生长出现了较大的波动。结合图 3 发现, 在菌株进入二次生长前 *bcsD* 基因表达量降低菌株的 OD 均低于对照; 而在菌株进入二次生长至稳定期期间, 菌株 *bcsD* 表达量降低的菌株的生长速度高于对照; 在进入稳定期后, 与表达 pdCas9 空载体的对照菌株相比, 尽管 *bcsD* 表达受干扰的菌株的 OD 部分高于对照, 部分低于对照, 但总体上都在对照菌株的 OD 值附近发生波动, 并且 OD 的波动趋势开始与对照菌株的 OD 波动趋势相反。这说明 *bcsD* 基因的表达量的变化对菌株在不同生长阶段的生长代谢造成了影响。图 2C 为 *bcsD* 表达量不同的菌株

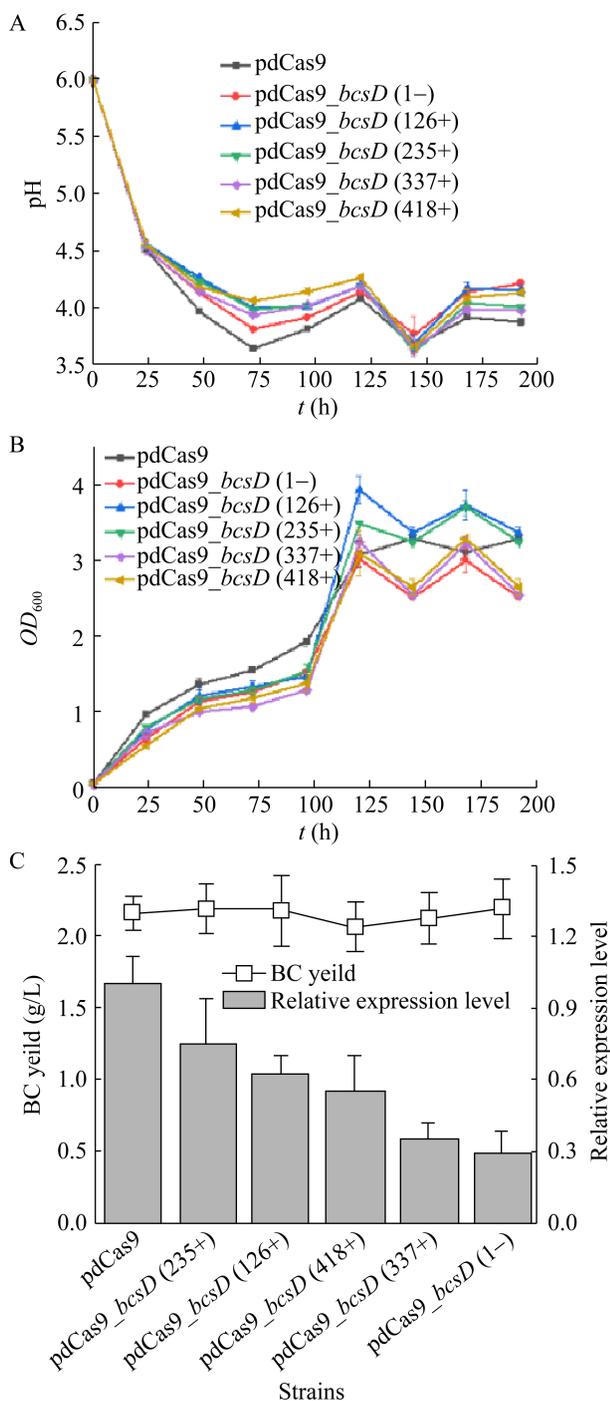


图 2 *bcsD* 表达量对发酵的影响 A: pH 变化曲线; B: 菌株的生长曲线; C: *bcsD* 表达量不同的菌株 BC 产量变化曲线

Figure 2 Effect of *bcsD* expression level on fermentation. Profiles of pH (A), growth (B) and the BC yield of strains with different expression levels of *bcsD* (C).

静置培养 8 d 后, BC 产量的变化曲线。图 2C 结果表明, 木葡糖酸醋杆菌在静置发酵 8 d 后, BC 总产量并没有随着 *bcsD* 基因表达量不同产生显著的变化。

2.3 *bcsD* 表达量对 BC 结构的影响

1990 年, Wong 等对木葡糖酸醋杆菌中的 *bcsD* 基因进行插入失活后, 发现菌株并未失去合成纤维素的能力^[11], 这说明 *bcsD* 并不是合成 BC 所必需的。另一方面, Saxena 等发现 *bcsD* 突变株合成 I 型和 II 型纤维素的能力发生改变, 表明 BcsD 亚基影响了 BC 的结晶过程^[12]。

利用扫描电子显微镜对 BC 膜的形貌观察结果表明, *bcsD* 基因表达量不同的菌株所生产的 BC 膜的孔隙发生了变化 (图 3A)。这说明 *bcsD* 基因表达量的变化影响了 BC 膜的网状结构。利用 matlab 计算相应 BC 膜的孔隙率^[18], 发现当 *bcsD* 基因表达量低于对照菌株的 55.34% 后, BC 膜的孔隙率从 65% 左右上升到了 80% 左右 (图 3C)。另一方面, BC 的孔隙率越大, 单位体积内 BC 的含量越少, 质量密度的测定表明 BC 的密度变化与孔隙率也有相似的变化趋势 (表 2)。随着菌株中 *bcsD* 基因的表达量降低, BC 的孔隙率呈现出了增加的趋势。这表明可以通过 *bcsD* 的表达量来调控孔隙率。研究显示, BC 中连通的孔隙有利于细胞粘附在骨架上并且深入 BC 骨架内部增殖^[20], 因此 BC 膜的孔隙率是影响细胞在 BC 骨架上增殖的因素。而 CRISPR/dCas9 调控 *bcsD* 基因的表达使得 BC 膜的孔隙率可控, 这有利于 BC 在组织方面应用的研究。利用 X-射线衍射测得 BC 的衍射峰显示, BC 膜的衍射峰并没有随着 *bcsD* 表达量的变化发生偏移 (图 3B)。这说明 BC 膜的主要化学结构没有发生变化。但通过计算 BC 膜的结晶度后发现, 随着 *bcsD* 的表达量的降低, BC 的结晶度从 93.75% 降到了 74.26%。

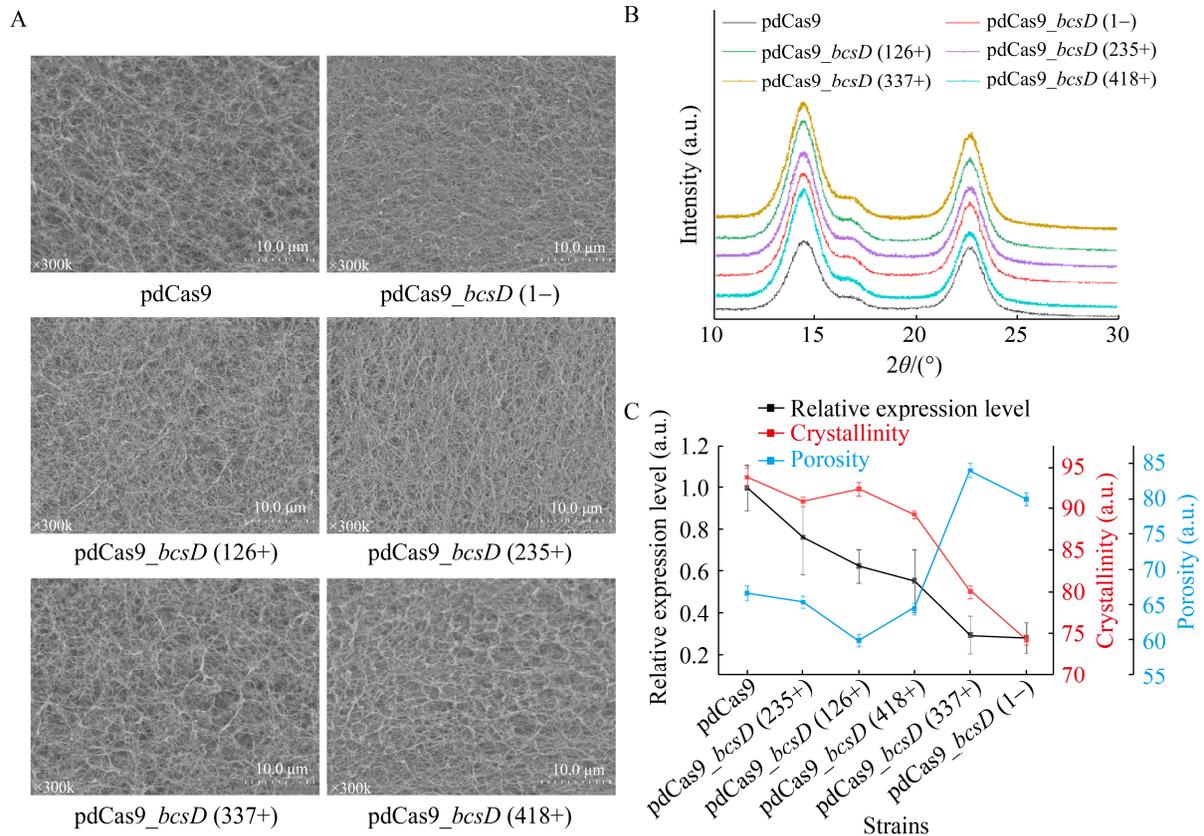


图3 细菌纤维素的结构表征 A: 扫描电子显微镜下BC的网状结构; B: X-射线衍射测得BC的衍射峰; C: 不同菌株 *bcsD* 基因相对表达量、结晶度及孔隙率变化曲线

Figure 3 Structural characterization of BC. (A) The network structure of BC under the scanning electron microscope. (B) The relative expression, crystallinity and porosity of different strains with different expression level of the *bcsD* gene. (C) The diffraction peak of BC measured by X-ray diffraction.

表2 不同菌株产BC的质量密度

Table 2 Mass density of BC produced by different strains

Strains	Mass density of BC (kg/m ³)
pdCas9	7.06±0.20
pdCas9_bcsD (235+)	6.99±0.21
pdCas9_bcsD (126+)	7.29±0.15
pdCas9_bcsD (418+)	7.10±0.17
pdCas9_bcsD (337+)	6.23±0.22
pdCas9_bcsD (1-)	6.36±0.12

图3C表明BC的结晶度与 *bcsD* 的表达量呈正相关,这也从另一方面验证了Saxena等的发现^[12]。

综上,通过CRISPR/dCas9的 *bcsD* 表达进行干扰后,除了其本身转录量的变化,细胞的

生长也随着发酵时间出现了一定程度的波动。这可能是造成BC的结晶度和孔隙率等结构相关参数与 *bcsD* 的表达量并不是呈现出直接的线性关系的原因。尽管如此,随着 *bcsD* 表达量的变化,BC的结晶度和孔隙率在较大范围内发生了变化,并且BC的产量没有发生显著改变。因此,通过CRISPR/dCas9控制 *bcsD* 的表达量来调控BC结构,可作为在一步发酵过程中控制BC结构的方法。

3 结论

木葡糖酸醋杆菌中, *bcsD* 基因表达量的变

化对细胞的生长造成了扰动。

木葡糖酸醋杆菌中, *bcsD* 基因的表达量在 29.39%–100% 范围内变化对相同发酵条件下单位发酵液中 BC 的总产量没有显著影响。

木葡糖酸醋杆菌中, *bcsD* 基因表达量在低于对照菌株的 55.34% 后, BC 的孔隙率显著上升。

当 *bcsD* 基因的表达量在 29.39%–55.34% 时, BC 的结晶度随着木葡糖酸醋杆菌中 *bcsD* 基因的表达量下降而上升。

REFERENCES

- [1] Moniri M, Boroumand Moghaddam A, Azizi S, et al. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. *Nanomaterials*, 2017, 7(9): 257.
- [2] Suresh S. Biosynthesis and assemblage of extracellular cellulose by Bacteria. *Handb Environ Mater Manag*, 2018: 2703-2744.
- [3] Halib N, Ahmad I, Grassi M, et al. The remarkable three-dimensional network structure of bacterial cellulose for tissue engineering applications *Int J Pharm*, 2019, 566: 631-640.
- [4] Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, et al. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*, 1990, 24/25: 253-264.
- [5] Fontana JD, Franco VC, Souza SJ, et al. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, 28/29:
- [6] Basta AH, El-Saied H. Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(6): 2098-2107.
- [7] 李欣, 颜彩玲, 潘凌鸿, 等. 细菌纤维素的合成与调控进展. *生物加工过程*, 2011, 9(4): 64-68.
Li X, Yan CL, Pan LH, et al. Progress in synthesis and regulation of bacterial cellulose. *Chin J Bioprocess Eng*, 2011, 9(4): 64-68.
- [8] Brown RM, Willison JH, Richardson CL. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. *PNAS*, 1976, 73(12): 4565-4569.
- [9] Benziman M, Haigler CH, Brown RM, et al. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *PNAS*, 1980, 77(11): 6678-6682.
- [10] Hu SQ, Gao YG, Tajima K, et al. Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. *PNAS*, 2010, 107(42): 17957-17961.
- [11] Wong HC, Fear AL, Calhoon RD, et al. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *PNAS*, 1990, 87(20): 8130-8134.
- [12] Saxena IM, Kudlicka K, Okuda K, et al. Characterization of genes in the cellulose- synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol*, 1994, 176(18): 5735-5752.
- [13] Liu M, Liu LP, Jia SR, et al. Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6266.
- [14] Lv L, Ren YL, Chen JC, et al. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis. *Metab Eng*, 2015, 29: 160-168.
- [15] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [16] Bikard D, Jiang WY, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [17] Cui L, Vigouroux A, Rousset F, et al. A CRISPRi screen in *E. coli* reveals sequence-specific toxicity of dCas9. *Nat Commun*, 2018, 9: 1912.
- [18] Huang LH, Liu QJ, Sun XW, et al. Tailoring bacterial cellulose structure through CRISPR interference-mediated downregulation of *galU* in *Komagataeibacter xylinus* CGMCC 2955. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(7): 2165-2176.
- [19] Liu M, Zhong C, Zhang YM, et al. Metabolic investigation in *Gluconacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field. *Front Microbiol*, 2016, 7: 331.
- [20] Andersson J, Stenhamre H, Bäckdahl H, et al. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 94(4): 1124-1132.

(本文责编 郝丽芳)