



# 基于 RNA-seq 分析 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响

黄茜琳<sup>1</sup>, 黄俊宝<sup>1</sup>, 高旭丽<sup>1</sup>, 罗雅妮<sup>1</sup>, 陶伟<sup>1</sup>, 郭明雨<sup>1</sup>, 刘永圆<sup>1</sup>, 吴晶<sup>1</sup>, 吴超<sup>1</sup>, 薛正莲<sup>1,2</sup>, 陈宇<sup>1,2</sup>, 刘艳<sup>1,2\*</sup>

1 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

2 安徽省工业微生物分子育种工程实验室, 安徽 芜湖 241000

黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴晶, 吴超, 薛正莲, 陈宇, 刘艳. 基于 RNA-seq 分析 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2394-2406.

HUANG Xilin, HUANG Junbao, GAO Xuli, LUO Yani, TAO Wei, GUO Mingyu, LIU Yongyuan, WU Jing, WU Chao, XUE Zhenglian, CHEN Yu, LIU Yan. RNA-seq reveals the effects of *bdhA* knockout on co-production of nattokinase and menaquinone-7 by *Bacillus subtilis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2394-2406.

**摘要:** 纳豆激酶(nattokinase, NK)具有多种生理功能, 是治疗心血管疾病的理想药物。甲萘醌-7 (menaquinone-7, MK-7)是人体不可缺少的脂溶性维生素之一, 可预防骨质疏松和帕金森等疾病。

**【目的】**提高枯草芽孢杆菌中 NK 和 MK-7 共同生产的产量, 揭示重组菌中共同生产 NK 和 MK-7 的机理, 为 MK-7 和 NK 的生成提供新的代谢工程策略。**【方法】**以枯草芽孢杆菌为出发菌株, 敲除 2,3-丁二醇脱氢酶基因(*bdhA*), 构建一株能增加 NK 和 MK-7 共同生产的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168- $\Delta$ *bdhA*。利用 RNA-seq 分析 NK 和 MK-7 合成途径关键酶编码基因的变化, 总结 NK 和 MK-7 共同生产的机制。**【结果】**与原始菌株相比, *Bacillus subtilis* 168- $\Delta$ *bdhA* 中 2,3-丁二醇含量降低 64.0%, 为 2.76 g/L。NK 和 MK-7 的产量较原始菌株提高 30.0%和 60.0%。RNA-seq 分析表明, 中心碳代谢、氧化磷酸化和 NK 及 MK-7 合成等过程相关的基因表达存在差异。NK 负调控因子 *codY* 下调 2.19 倍。在蛋白质分泌途径中, *secA* 下调 0.37 倍, *tatAD* 和 *tatC* 分别上调 2.81 倍和 0.50 倍。**【结论】***bdhA* 的敲除阻断了 2,3-丁二醇的碳通量, 促进甘油的吸收, 碳通量更多地流向 NK 和 MK-7 的合成途径。负调控因子 *codY* 的下调促进 NK 转录, 蛋白转运相关途径

资助项目: 国家自然科学基金(32372295); 安徽省高校杰出青年科研项目(2023AH020013); 安徽省大学生创新创业计划(202310363254)

The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372295), the Outstanding Youth Research Project in Anhui Province Universities (2023AH020013), and the Anhui Provincial Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Program (202310363254).

\*Corresponding author. E-mail: liuyan@ahpu.edu.cn

Received: 2023-12-13; Accepted: 2024-03-18; Published online: 2024-03-21

基因的上下调促进 MK-7 的胞外分泌, 从而实现其产量的增加。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 纳豆激酶; 甲萘醌-7; 2,3-丁二醇脱氢酶; RNA-seq

## RNA-seq reveals the effects of *bdhA* knockout on co-production of nattokinase and menaquinone-7 by *Bacillus subtilis*

HUANG Xilin<sup>1</sup>, HUANG Junbao<sup>1</sup>, GAO Xuli<sup>1</sup>, LUO Yani<sup>1</sup>, TAO Wei<sup>1</sup>, GUO Mingyu<sup>1</sup>, LIU Yongyuan<sup>1</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, WU Chao<sup>1</sup>, XUE Zhenglian<sup>1,2</sup>, CHEN Yu<sup>1,2</sup>, LIU Yan<sup>1,2\*</sup>

1 College of Biology and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

2 Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology Molecular Breeding, Wuhu 241000, Anhui, China

**Abstract:** Nattokinase has a variety of physiological functions and serves the treatment of cardiovascular diseases. Menaquinone-7, one of indispensable fat-soluble vitamins in the human body, can prevent diseases such as osteoporosis and Parkinson's disease. **[Objective]** To enhance the co-production of nattokinase and menaquinone-7 by *Bacillus subtilis*, reveal the co-production mechanism in the recombinant strain, and provide new metabolic engineering strategies for the production of nattokinase and menaquinone-7. **[Methods]** We constructed *B. subtilis* 168- $\Delta$ *bdhA* by knocking out the 2,3-butanediol dehydrogenase gene *bdhA* from *B. subtilis* 168. RNA-seq was employed to measure the expression changes of key enzyme-coding genes in the nattokinase and menaquinone-7 synthesis pathways. **[Results]** Compared with *B. subtilis* 168, the content of 2,3-butanediol in *B. subtilis* 168- $\Delta$ *bdhA* was 2.76 g/L, which was reduced by 64.0%. The yields of nattokinase and menaquinone-7 were increased by 30.0% and 60.0%, respectively. The expression levels of genes related to central carbon metabolism, oxidative phosphorylation, and the synthesis of nattokinase and menaquinone-7 changed by RNA-seq analysis. The expression level of nattokinase negative regulator gene *codY* was down-regulated by 2.19-fold in the mutant. The expression of *secA*, *tatAD*, and *tatC* involved in protein secretion showed the down-regulation of 0.37-fold, up-regulation of 2.81-fold, and up-regulation of 0.50-fold, respectively. **[Conclusion]** The knockout of *bdhA* blocked the carbon flux of 2,3-butanediol and promoted glycerol uptake, causing more carbon fluxing to the synthesis pathways of nattokinase and menaquinone-7. The down-regulation of the negative regulator *codY* promoted the transcription of nattokinase. The up- and down-regulation of genes involved in protein secretion promoted extracellular secretion of menaquinone-7.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; nattokinase; menaquinone-7; 2,3-butanediol dehydrogenase; RNA-seq

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是公认的相对安全的益生菌,可用于固态发酵大豆制得富含纳豆激酶(nattokinase, NK)和甲萘醌-7

(menaquinone-7, MK-7)的纳豆产品<sup>[1-2]</sup>。纳豆中的纳豆激酶是一种碱性丝氨酸蛋白酶,具有优秀的纤溶活性,其纤溶活性是纤溶酶的4倍,可被

肠道吸收直接消化血管内的纤维蛋白<sup>[3]</sup>。芽孢杆菌发酵生产的脂溶性维生素 K<sub>2</sub> 主要为 MK-7, 由甲基萘醌母环和 7 个异戊二烯侧链组成<sup>[4]</sup>。MK-7 作为膜结合电子载体之一, 同辅酶 Q 相似, 在氧化磷酸化和电子转移中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。据报道, MK-7 具有多种生理活性功能, 可预防骨质疏松和帕金森病等<sup>[5]</sup>。纳豆作为一种预防治疗心血管疾病的功能性食品, 由于纳豆中 NK 和 MK-7 的含量相对较低, 其防治效果并不理想。因此, 近年来, 研究者主要通过传统诱变育种技术和发酵条件的优化, 以期提高纳豆中 NK 的活性<sup>[6]</sup>。此外, 基因工程技术和低成本原料的应用也被用于 MK-7 的增产<sup>[7]</sup>。

尽管在枯草芽孢杆菌中对 NK 和 MK-7 的发酵研究较多, 但关于在枯草芽孢杆菌中同时发酵 NK 和 MK-7 研究却较少。在枯草芽孢杆菌中, NK 由 *aprN* 基因编码, 而 MK-7 是由 *menA* 基因编码的 1,4-二羟基-2-萘甲酸(1,4-dihydroxy-2-naphthoate, DHNA)七烯转移酶合成<sup>[8]</sup>。由于 NK 和 MK-7 没有竞争的代谢途径, 因此在枯草芽孢杆菌中可同时生产 NK 和 MK-7, 将二者共同生产时的各自产量提高到与只针对单一产品发酵时的产量相当, 将取得巨大的经济效益。通过代谢工程手段消除发酵过程中的副产物是提高目标产品产量的有效策略, 并已成功应用于协同生产过程中, 实现了单一工艺生产高附加值产品的目标<sup>[9]</sup>。例如利用代谢工程方法在枯草芽孢杆菌中同时生产尿苷和乙偶姻<sup>[10]</sup>。另一种成功的共同生产策略是利用代谢工程手段在大肠杆菌中共同生产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇<sup>[11]</sup>。

在本研究中, 以 *B. subtilis* 168 为原始菌株, 敲除 *bdhA* 基因以实现 NK 和 MK-7 的共同生产。在 NK 和 MK-7 合成途径减少共享前体物质的副产品, 如 2,3-丁二醇, 以增加它们的产量。利用 RNA-seq 技术研究 *B. subtilis* 168- $\Delta$ *bdhA* 菌株中

NK 和 MK-7 共同生产的机制, 比较发酵过程的差异表达基因, 分析上、下调基因, 结合碳水化合物和产物合成代谢途径分析, 发现提高 NK 活性和 MK-7 产量的潜在关键基因。本研究利用代谢工程手段在枯草芽孢杆菌中实现 NK 和 MK-7 的协同生产, 有助于更好地了解纳豆激酶和 MK-7 的生产机理, 为代谢工程提高 NK 和 MK-7 产量提供新的策略, 并为构建能高效生产 NK 和 MK-7 的菌株奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和仪器

*Bacillus subtilis* 168、p7C6 质粒、P<sub>43</sub> 启动子均为本实验室保存。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 振荡培养箱、恒温培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 岛津企业管理(中国)有限公司。

### 1.2 培养基

参考周梦洁等<sup>[12]</sup>的方法配制 Spizizen 感受态培养基。

平板活化培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

半平板培养基: 在平板活化培养基的基础上, 琼脂的添加量为 5.0 g/L。

种子培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 大豆蛋白胨 50.0, 酵母提取物 20.0, 甘油 5.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.62, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.86, 微量元素 (Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 0.07 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.01g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.378 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.04 g/L, CuSO<sub>4</sub> 0.01 g/L, CoCl<sub>2</sub> 0.02 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.52 g/L) 2.0 mL

(过滤除菌后加入灭菌后的培养基中), 0.1 MPa 灭菌 20 min。

### 1.3 培养条件和敲除菌株的构建

取甘油管中的 *B. subtilis* 168 菌株在 LB 固体培养基上划线, 37 °C 培养 12 h。挑单菌落至 50 mL 的种子培养基中, 在 37 °C、220 r/min 下孵育 14–16 h。将种子溶液以体积分数 2% 接种至 50 mL 的发酵培养基, 37 °C 静置发酵 5 d。

基因敲除采用同源重组的方法。从 *Bacillus subtilis* 168 中扩增 *bdhA* 上游和下游各约 1 000 bp, 从 p7C6 质粒中扩增带氯霉素抗性的中间片段, 按照上游、中间及下游顺序, 采用融合 PCR 连接。纯化 PCR 产物导入枯草芽孢杆菌感受态细胞, 并在添加 5 µg/mL 氯霉素的 LB 琼脂平板上涂布, 长出后用菌液 PCR 验证转化菌株 *B. subtilis* 168- $\Delta$ *bdhA*。引物见表 1。

### 1.4 生长曲线、纳豆激酶的酶活和 MK-7 产量的测定

*B. subtilis* 168 菌株和重组菌株活化后, 挑取单菌落至种子培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养, 发酵液进行适当的稀释使  $OD_{600}$  为 0.2–0.8。定时取样测量, 实验重复 3 次, 绘制 2 个菌株的生长曲线。

取发酵液 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 后得粗酶液, 采用紫外分光光度法测定纳豆激酶酶活, 具体方法: 向试管中加入 1.4 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.8) 缓冲液和 0.4 mL 纤维蛋白原溶液 (7.2 mg/L), 37 °C 水浴 5 min; 加入 0.1 mL

凝血酶 (20 U/mL), 37 °C 水浴 10 min 形成人工血栓; 加入 100 µL 待测样品, 37 °C 温育 60 min; 加入 2 mL 三氯乙酸 (0.2 mol/L) 静置 20 min, 终止反应。10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清于 275 nm 波长处测定吸光度。酶活定义: 每分钟在 275 nm 处吸光度增加 0.01 所需要的酶量定义为 1 个单位的纤维蛋白降解酶活力。

利用 HPLC 检测发酵液中 MK-7 产量<sup>[13]</sup>, 取 2 mL 发酵液置于 5 mL 棕色离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 加入 4 倍体积的正己烷: 异丙醇 (2:1, 体积比), 涡旋混匀。避光静置 30 min, 再次离心后取上层液体于 5 mL 离心管中, 使用 0.22 µm 有机膜过滤, 得到样品, 置于棕色进样瓶, 色谱柱为安捷伦 C18 色谱柱 (4.6 mm×50 mm, 5 µm)。

### 1.5 乙偶姻、2,3-丁二醇和乙酸产量的测定

使用 Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm, 5 µm) 色谱柱, 流动相为 5 mmol/L 硫酸水溶液, 流速为 0.6 mL/min, 色谱柱温度为 65 °C, 检测器温度为 35 °C, 进样体积为 20 µL, 测定乙偶姻、2,3-丁二醇和乙酸浓度<sup>[14]</sup>。

### 1.6 RNA 分离和 RNA-seq 数据分析

在第 4 天收集菌株 *Bacillus subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168- $\Delta$ *bdhA* 发酵液。样品在 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, 美国) 提取细菌总 RNA。经 Agilent 2100 Bioanalyzer、Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent 公司) 等仪器检测 RNA 样品

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')
$\Delta$ <i>bdhA</i> -L-F	CCTTGAACAACAATGGGAGA
$\Delta$ <i>bdhA</i> -L-R	GTTATCCGCTCTTATCCAATCACTTCAGCCCC
$\Delta$ <i>bdhA</i> -p7C6-F	GGCTGAAGTGATTGGATAAGAGCGGATAACAATTTACACA
$\Delta$ <i>bdhA</i> -p7C6-R	GGAGTGGTAATCCAACCGTATGTCAATGGCTG
$\Delta$ <i>bdhA</i> -R-F	GCCATTGAACATACGGTTGGATTACCACTCCTATAACTTTTGAT
$\Delta$ <i>bdhA</i> -R-R	GCTTTAGGGCTAACATCCAG

质量(深圳华大基因科技有限公司)。从合格的总 RNA 中去除核糖体 RNA, 将剩余的 RNA 片段反转录成相应的 cDNA, 用于制备文库。最后使用 Illumina X10 (Illumina 公司) 进行测序。通过去除衔接子读数和低质量短片段, 从原始数据中获得 clean 数据。以  $FDR < 0.05$  且  $|\text{fold change}| \geq 2$  为条件筛选样品间的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)<sup>[15]</sup>。将筛选得到的差异基因进一步进行基因本体论(gene ontology, GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 BS168- $\Delta bdhA$ 菌株的构建

如图 1 所示, 构建 *B. subtilis* 168- $\Delta bdhA$  菌

株时, 以 *B. subtilis* 168 菌株全基因组为模板, 经 PCR 扩增得到 1 000 bp 左右的左同源臂和右同源臂; 以 p7C6 质粒为模板 PCR 扩增获得大小为 1 300 bp 左右的氯霉素抗性片段。采用三段融合的方法将 3 个目的片段连接起来, 再次将 PCR 产物扩增获得大小为 2 974 bp 左右的融合片段。采用 Spizizen 转化法将融合 PCR 得到的目的基因转化到枯草芽孢杆菌中。将得到的阳性克隆用抗性平板验证, 将得到的菌株经过测序, 并且用软件 DNAMAN 比对, 显示重组菌株构建成功。

### 2.2 生物量、纳豆激酶与 MK-7 的产量

本研究分别绘制了在发酵培养基静置培养条件下 BS168 和 BS168- $\Delta bdhA$  菌株的生物量、纳豆激酶酶活和 MK-7 产量的曲线。如图 2 所示, 两菌株在生长、NK 及 MK-7 合成量上存在差异。在培养 36 h 之前, 原始菌株 BS168 的  $OD_{600}$  高

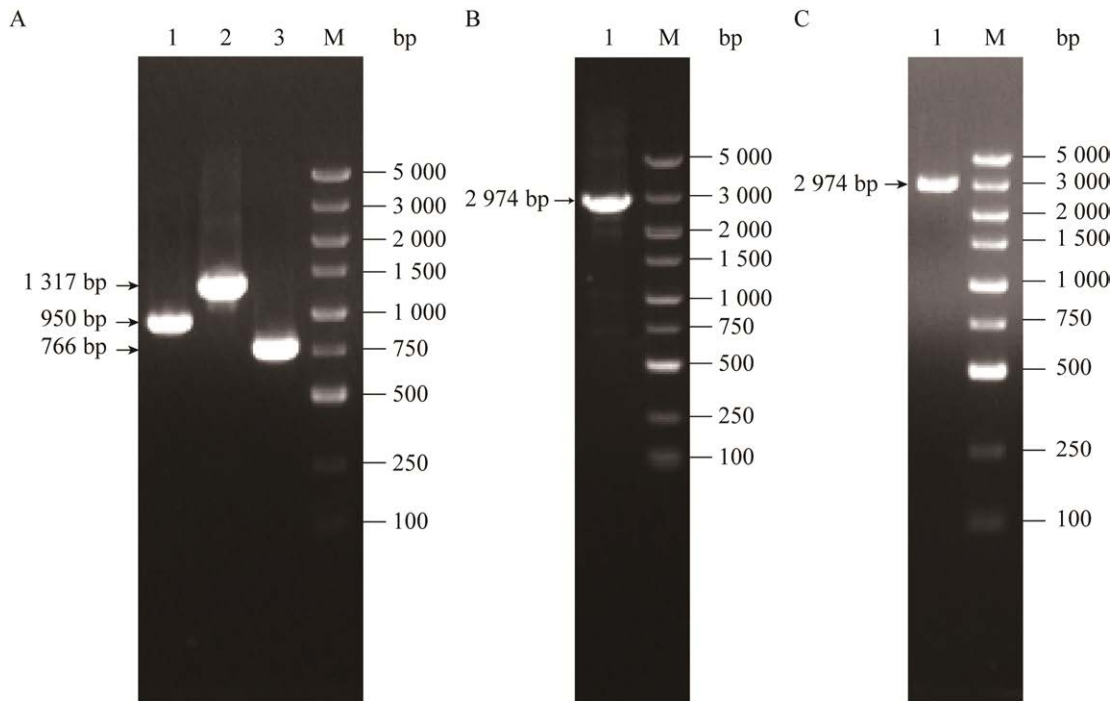


图 1 BS168- $\Delta bdhA$  菌株的构建

Figure 1 Construction of strain BS168- $\Delta bdhA$ . A: Upstream fragment (lane 1), middle fragment (lane 2), and downstream fragment (lane 3) of *bdhA*. B: Fusion fragment of  $\Delta bdhA$  (lane 1). C: Bacterial liquid PCR verification of  $\Delta bdhA$  (lane 1). M: DL5000 DNA Marker.

于重组菌株 BS168- $\Delta bdhA$ , 而在 36 h 后, BS168 菌株的  $OD_{600}$  始终低于 BS168- $\Delta bdhA$  菌株(图 2A)。NK 和 MK-7 的产量随着生物量的增加而增加, 说明它们都是生长相关的代谢产物。两株菌株在 108 h 时 NK 和 MK-7 产量均达到最大值。两菌株在 36 h 和 108 h 的 NK 酶活分别出现下降, 前者可能是发酵时间较短, 产物未完全分泌, 后者可能是发酵后期营养物质缺乏, 导致 NK 作为营养物质被利用。菌株 BS168- $\Delta bdhA$  的 NK 酶活性为 6.0 FU/mL, 较原菌 BS168 提高了 30.0%, BS168- $\Delta bdhA$  和 BS168 菌株比酶活的比值始终大于 1 (图 2B)。MK-7 在菌株 BS168- $\Delta bdhA$  中的最大产率为 24.78 mg/L, 比原菌的产率提高了 60.0% (图 2C)。在摇瓶发酵的基础上加以调整, 使用 5 L 发酵罐发酵培养, 发现

BS168- $\Delta bdhA$  菌株的纳豆激酶酶活为 8.1 FU/mL, MK-7 的产量为 43.97 mg/mL, 较原菌 BS168 分别提高了 39.7%和 90.0% (图 2D)。

### 2.3 枯草芽孢杆菌中乙偶姻代谢的改变

*bdhA* 基因编码的乙偶姻还原酶/2,3-丁二醇脱氢酶, 可将乙偶姻可逆地转化为 2,3-丁二醇。为提高 NK 和 MK-7 的产量, 消除不必要的副产物 2,3-丁二醇, 敲除 *bdhA* 基因。如图 3 所示, 两菌株在乙偶姻、2,3-丁二醇和乙酸的合成量上存在差异。BS168- $\Delta bdhA$  菌株乙偶姻的产量从 17.15 g/L 升至 22.54 g/L。虽然已成功敲除 *bdhA*, 但是 2,3-丁二醇的产量未完全消失, 比原菌降低了 64.0%, 达到 2.76 g/L, 枯草芽孢杆菌中可能还另外存在 2,3-丁二醇合成途径。乙偶姻可转化为乙酸, BS168- $\Delta bdhA$  菌株中乙酸含量为 0.97 g/L, 较原菌降低 33.0%。

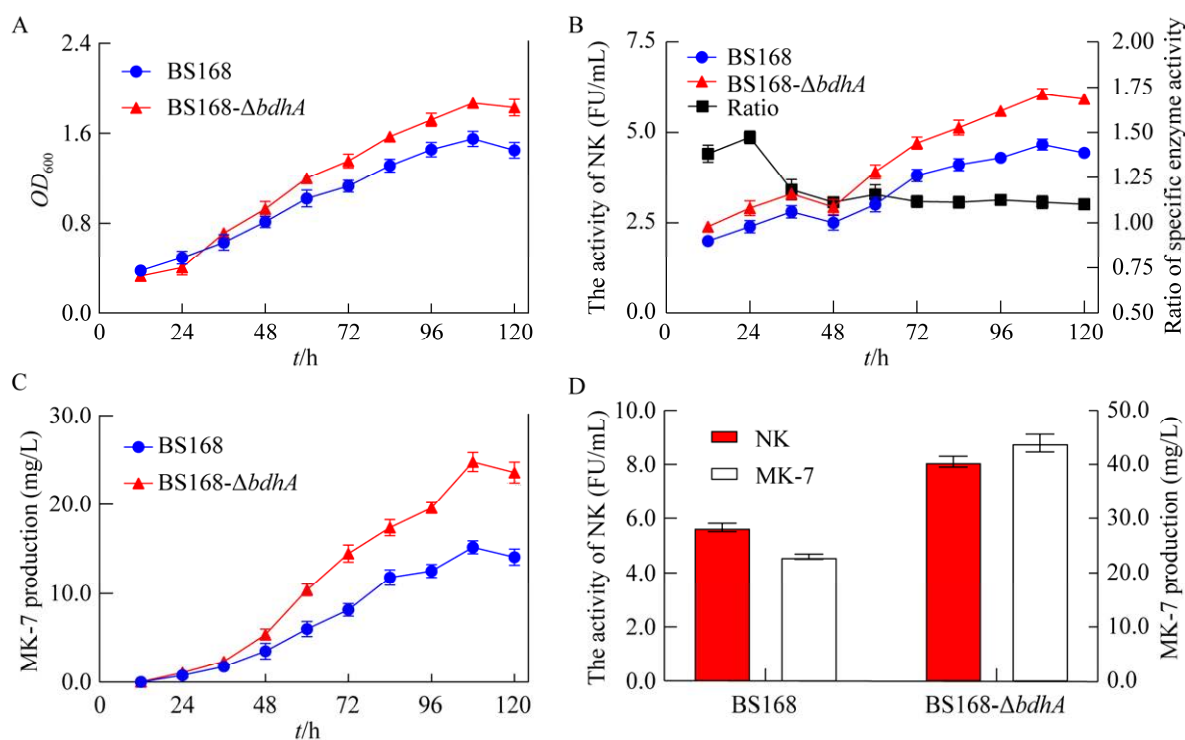


图 2 原菌株 BS168 与敲除菌株 BS168- $\Delta bdhA$  发酵工艺对比

Figure 2 Comparison of the fermentation process between the original strain BS168 and the knockout strain BS168- $\Delta bdhA$ . A: Growth curves of BS168 and BS168- $\Delta bdhA$ . B: Nattokinase activity in BS168 and BS168- $\Delta bdhA$ . C: MK-7 yield of BS168 and BS168- $\Delta bdhA$ . D: 5 L fermenter fermentation results. Error bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent replicates.

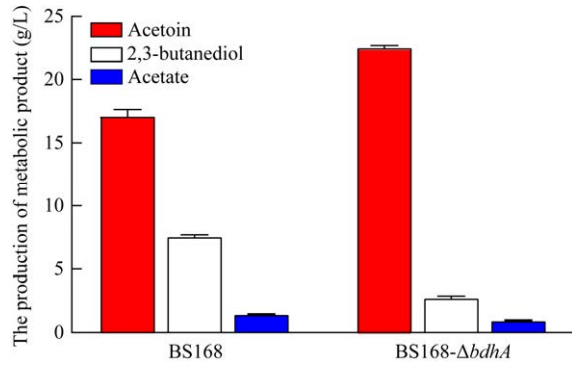


图3 *bdhA* 敲除对代谢产物积累的影响

Figure 3 Effect of *bdhA* knockout on metabolic product accumulation. Error bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent replicates.

## 2.4 BS168- $\Delta bdhA$ 和 BS168 转录组数据分析

利用 RNA-seq 技术对样本进行转录组测序, 研究 NK 和 MK-7 合成发酵过程中相关基因的表达。根据维恩图(图 4A), 鉴定出对照组菌株有 4 006 个有注释的基因, 实验组有 3 719 个有注释的基因, 其中共同调控的基因有 3 712 个, 同

时另有 294 和 7 个基因分别在对照组和实验组中单独表达。通过 DEG seq 软件分析得到显著表达的基因共有 792 个, 其中显著上调和下调基因个数均为 396 (图 4B、4C)。筛选的差异表达基因可注释到 GO 本体中, GO 功能富集分析(图 5A)表明, DEGs 主要集中在细胞生物合成、膜和生物合成过程。根据 KEGG 显著性富集分析(图 5B), 存在显著差异的代谢途径主要集中在核糖体、丙酮酸代谢、三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环和氧化磷酸化, 结果与 GO 功能富集结果一致。

### 2.4.1 中心碳代谢途径相关差异基因表达

中心碳代谢是生物所需能量的主要来源, 通常包括糖酵解途径 (embden-meyerhof-parnas pathway, EMP)、三羧酸循环(TCA)和磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)<sup>[16]</sup>。与中心碳代谢相关的关键基因和代谢途径调控如图 6 所示。甘油是 NK 和 MK-7 生物合成的最佳碳源<sup>[19-20]</sup>, 甘油异化途径是两者生物合成的第一步。

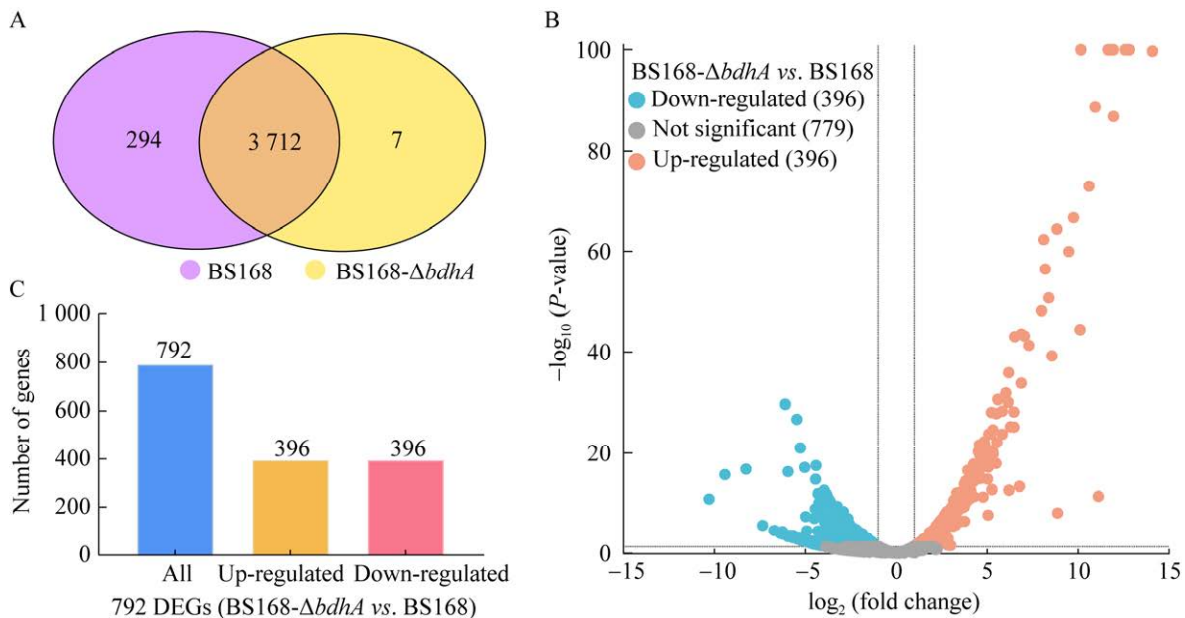


图4 Illumina 深度测序获得的样本草图序列概述

Figure 4 Summary of draft reads of samples by Illumina deep sequencing. A: Global comparison of BS168 and BS168- $\Delta bdhA$  samples by Venn diagrams. B: Number of up-regulated and down-regulated DEGs of the BS168 and BS168- $\Delta bdhA$  samples. C: Visualization of differential genes (volcano-plots).

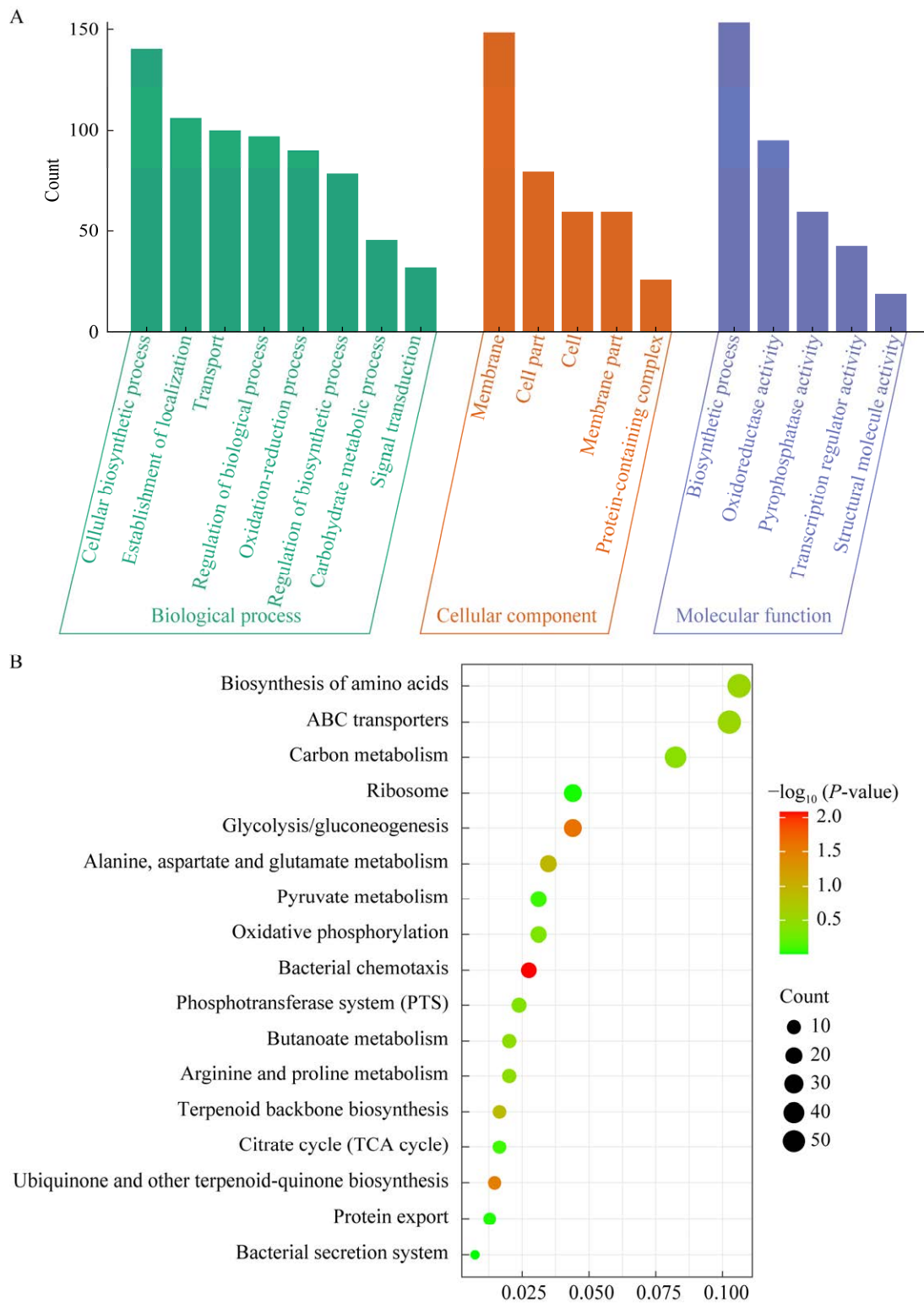


图 5 转录组学分析 BS168 和 BS168- $\Delta bdhA$  的差异

Figure 5 Transcriptomics analysis of differences between BS168 and BS168- $\Delta bdhA$ . A: Gene ontology (GO) functional analysis of differential genes. B: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis of functions of differential genes.



丙酮酸(pyruvic acid, PYR)可用于乳酸、乙偶姻的合成和进入 TCA 参与代谢过程。PYR 在乙酰乳酸合酶(AIsS)和乙酰乳酸脱羧酶(AIsD)作用下生成乙偶姻,乙偶姻在菌体进入稳定期后,可维持细胞内部酸碱度<sup>[10]</sup>。*alsS* 和 *alsD* 分别上调 2.05 倍和 2.45 倍,乙偶姻生成量增加。乙偶姻可进一步生成乙酸、乙酰辅酶 A 和 NADH。负责乙酸合成的乙酸激酶基因 *ack* 下调 0.34 倍。乙偶姻脱氢酶复合物(acetoindehydrogenaseenzymesystem, AoDHES)相关基因上调,乙酰-CoA 生成量增加,可进入 TCA 循环,生成  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate, AKG)和草酰乙酸(oxaloaceticacid, OAA)等。

原核生物的电子传递链存在于质膜上,

NADH 可进入电子传递链再氧化生成 ATP。在枯草芽孢杆菌中, *cydABCD* 操纵子编码呼吸链中完整的细胞色素 bd<sup>[21]</sup>, 有研究表明, *cyd* 缺失菌株可提高能量产生的效率<sup>[22]</sup>。*cydABCD* 分别下调 3.08、2.19、1.67 和 2.63 倍。参与电子传递链的 NADH 脱氢酶基因 *ndH* 和琥珀酸脱氢酶基因 *sdH* 上调,其中 *sdhABC* 分别上调 1.01、2.30 和 1.52 倍,增加电子传递效率,促进 ATP 的合成,为细胞生长代谢提供能量。

#### 2.4.2 MK-7 合成相关差异基因表达

如图 6 所示, MK-7 生物合成途径可分为 4 个模块:甘油异化途径、莽草酸途径(shikimate, SA)途径、甲基赤藓醇磷酸(methylerythritol-4-phosphate,

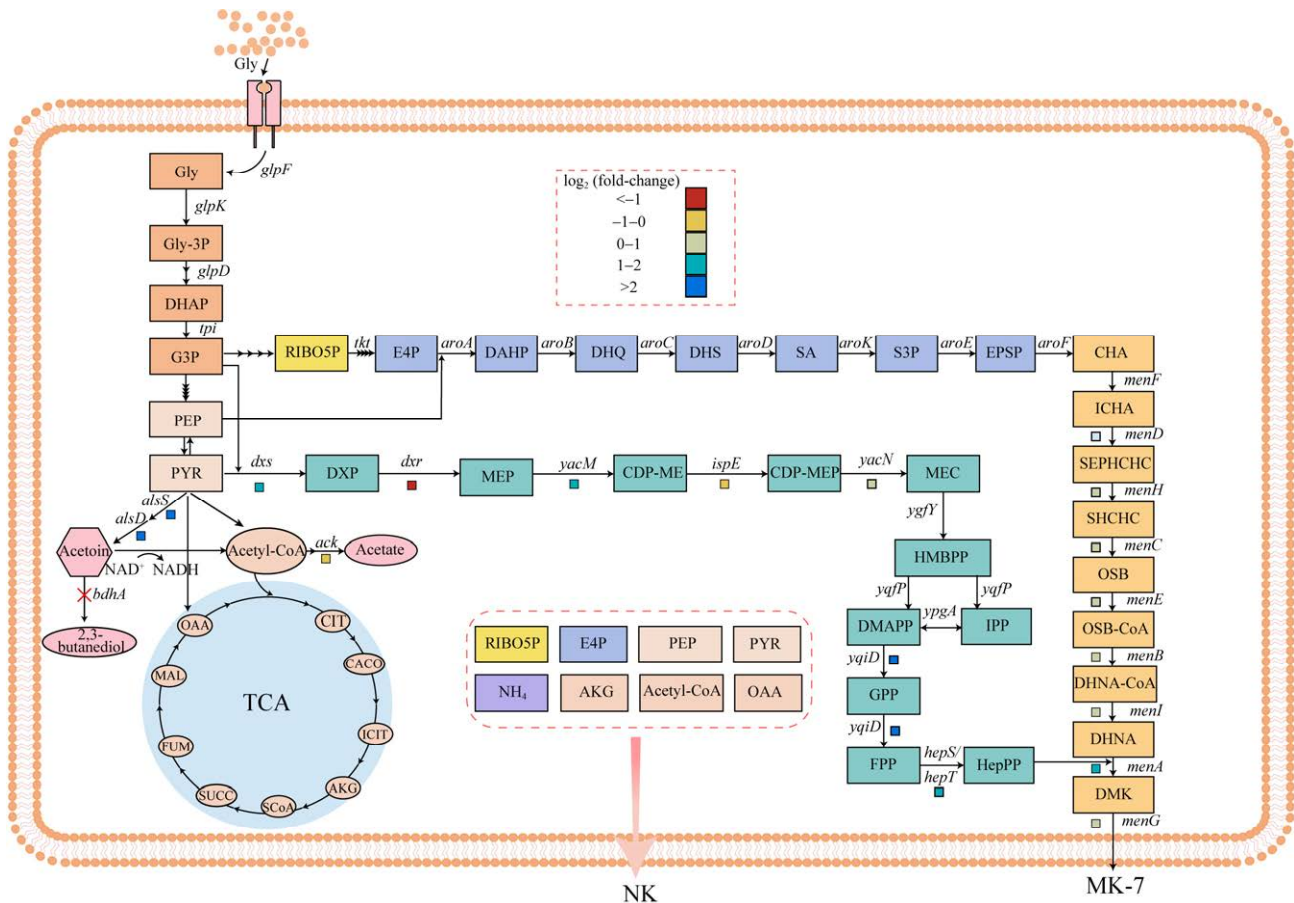


图 6 中心碳代谢和产物合成途径相关基因变化<sup>[17-18]</sup>

Figure 6 Changes in genes related to central carbon metabolism and product synthesis pathways<sup>[17-18]</sup>.

MEP)途径和 MK-7 途径<sup>[13]</sup>。E4P 和 PEP 经 SA 途径生成分支酸(chorismate, CHA), 为 MK-7 的合成提供醌类骨架。G3P 和 PYR 经 MEP 途径生成七烯焦磷酸(heptaprenyl diphosphate, HepPP), 为 MK-7 的合成提供异戊二烯侧链<sup>[22]</sup>。CHA 和 HepPP 经 MK-7 途径最终合成 MK-7<sup>[22]</sup>。

研究表明, MEP 途径的 1-脱氧木酮糖-5-磷酸(1-deoxyxylulose-5-phosphate, DXP)合成酶基因(*dxs*)、MEP 胞苷酰转移酶基因(*yacM*)作为 MK-7 合成的关键基因<sup>[23]</sup>, 分别上调 1.21 倍和 1.75 倍。其中 DXP 还原异构酶基因(*dxr*)和 4-焦磷酸胞苷酰-2-C-甲基-D-赤藓糖醇(CDP-ME)激酶的基因(*ispE*)分别下调 1.83 倍和 0.93 倍, 这可能是 *dxr* 和 *ispE* 的下调减少了某些中间代谢物的积累, 以促进 MK-7 合成。2-C-甲基-D-赤藓糖

醇-2,4-环焦磷酸(2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MECPP)合成酶(*yacN*)作为 MK-7 合成的关键基因, 其上调不明显。HepPP 合成酶(HepS/HepT)催化 HepPP 合成, *hepT* 上调 1.85 倍。SA 途径变化不明显。MK-7 合成途径中, MenA 催化 MEP 途径产生的 HepPP 和 1,4-羟基萘醌(DHNA)反应生成去甲基甲萘醌(2-demethylmenaquinone, DMK), 最终在 DMK 甲基转移酶(MenG)作用下合成 MK-7。此过程中, *menA* 显著上调 1.13 倍, 与此前研究发现 *menA* 过表达, MK-7 产量增加 1.60 倍相一致<sup>[22]</sup>。

### 2.4.3 纳豆激酶合成相关差异基因表达

枯草芽孢杆菌中编码碱性蛋白酶的是 *aprE*, 受多种正负调控因子直接调控<sup>[17]</sup>, *aprE* 上调 1.82 倍(图 7)。

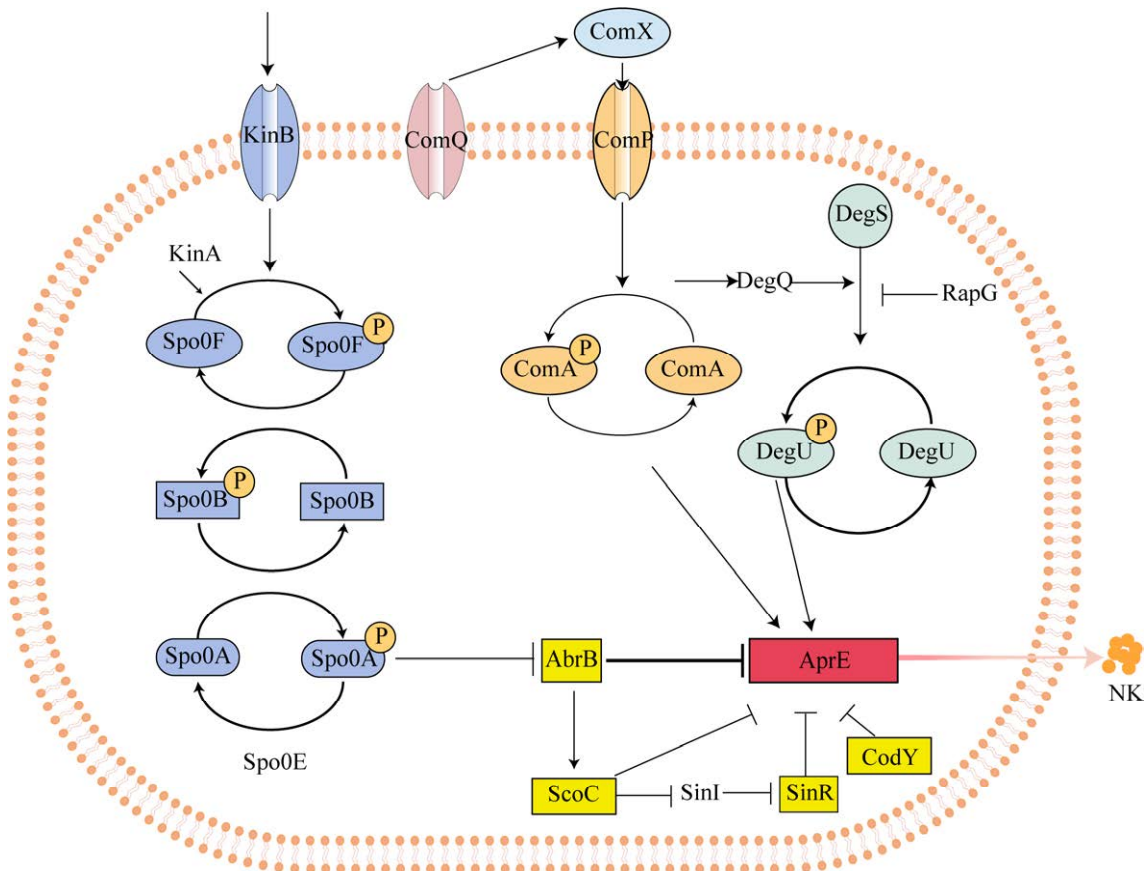


图 7 纳豆激酶转录调控示意图<sup>[24-25]</sup>

Figure 7 Diagram of nattokinase transcriptional regulation<sup>[24-25]</sup>.

反映细胞能量的 GTP 水平的 CodY 直接抑制 *aprE* 的转录, *codY* 下调 2.19 倍, 对纳豆激酶转录的抑制作用明显减弱。ScoC 间接抑制 AprE 的合成, ScoC 表达变化不明显。因为 CodY 介导的抑制作用强于 ScoC, 后者抑制作用很弱且可被其他积极作用抵消<sup>[17]</sup>。SinR 是 *aprE* 的阻遏因子, 表达基本不变。

Spo0A 调节活性受多种磷酸化机制调控, 其中组氨酸蛋白激酶 KinA 和 KinB 以及 2 种磷酸转移酶 Spo0F 和 Spo0B 的上调, 加剧了 Spo0A 磷酸化水平, 进而增强了其对 *abrB* 的抑制作用<sup>[26]</sup>。*abrB* 下调 0.33 倍, 对 NK 的抑制作用减弱。

DegSU 双组分系统通过调控蛋白 DegU 与 *aprE* 的启动子区域的结合, 有效促进纳豆激酶的合成。在能力信号肽(CPS)系统中, ComQ 可促进 ComA 磷酸化, 进而激活 DegQ。DegQ 的

存在可促进 DegS 的磷酸基团向 DegU 的传递过程, *comA* 表达上调促进了该过程。在 RapG-PhrG 系统中, *rapG* 可减弱 DegU 与 AprE 的结合, 间接影响酶的合成, *rapG* 下调但不明显。因此 NK 转录的增强主要由 *codY* 的下调实现的。

#### 2.4.4 转运相关差异表达基因

枯草芽孢杆菌分泌的蛋白质由信号肽依赖分泌途径主导, 包括 Sec 途径、Tat 途径和 ABC 转运子途径。在 Sec 分泌途径中, 跨膜蛋白复合体 SecYEG、副转运蛋白 SecDF-YajC 和跨膜蛋白 YidC 蛋白构成膜上完整的蛋白转运子结构<sup>[27]</sup>, *secG* 和跨膜蛋白 *yidC* 上调。SecA 是一种 ATP 酶, 可为跨膜蛋白供能, *secA* 下调 0.37 倍。Tat 分泌途径负责将折叠蛋白分泌至胞外, *tatAD* 和 *tatC* 分别上调 2.81 倍和 0.50 倍(表 2)。两菌株 MK-7 的胞内胞外含量如图 8 所示, 在培养 96 h 时,

表 2 转运途径相关的差异表达基因

Table 2 Differentially expressed genes (DEGs) in transportation

Gene name	Gene description	Fold change
<i>secG</i>	Preprotein translocase subunit SecG	1.25
<i>yidC</i>	YidC family membrane integrase SpoIIJ	0.46
<i>secA</i>	Preprotein translocase subunit SecA	-0.37
<i>tatAD</i>	Sec-independent protein translocase protein TatAD	2.81
<i>tatC</i>	Twin-arginine translocase subunit TatC	0.50

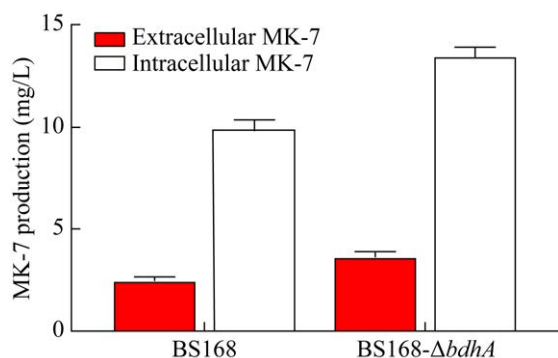


图 8 BS168 和 BS168- $\Delta bdhA$  菌株 MK-7 的胞内胞外产量

Figure 8 Intracellular and extracellular MK-7 production by strains BS168 and BS168- $\Delta bdhA$ . Error bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent replicates.

BS168- $\Delta bdhA$  菌株的 MK-7 胞外分泌量达到 3.61 mg/L, 是对照组的 1.47 倍。此时 MK-7 的总合成为 17.07 mg/L, 是对照组总合成的 1.38 倍。

### 3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌除合成 NK 和 MK-7 外, 还产生相当数量的乙醇、乙酸、乳酸、乙偶姻和 2,3-丁二醇<sup>[19]</sup>。这些代谢副产物的生成, 导致碳溢流, 最终影响 NK 和 MK-7 的产量。如何在不影响细胞生存状态的前提下, 有效减少代谢副产物的形成, 是促进 NK 和 MK-7 合成的关键。Fan 等<sup>[10]</sup>发现 *alsD* 敲除后, 代谢副产物乙偶姻含量

显著降低, 菌体细胞仍维持较好的生长状态。因此, 乙偶姻的合成是共同生产 NK 和 MK-7 的一个重要调控节点, 通过构建的 *bdhA* 缺失菌株可以实现两者的共同生产。

转录组数据显示, *alsS*、*alsD* 分别上调 2.05、2.45 倍, 乙偶姻含量提高约 30.0%。乙酸激酶 *ack* 下调, 副产物乙酸合成量减少 33.0%, 这表明 *bdhA* 的敲除阻断了乙偶姻向 2,3-丁二醇的主要通量, 调控 AoDH ES 的相关基因上调, 乙偶姻流向乙酰-CoA 的碳通量增加。MK-7 合成的 4 个途径中, 虽然 *bdhA* 的敲除促进了对甘油的摄取, 但主要由 MEP 途径增加前体物质 HepPP, 为 MK-7 的合成提供更多异戊二烯侧链, 以实现其产量增长。碳通量的重新分配为 NK 和 MK-7 的合成提供了更多中间代谢物, 如磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸和乙酰辅酶 A 等。研究显示<sup>[28]</sup>, 黄杆菌在 MK-4 的压力胁迫因子作用下, 跨膜转运蛋白(TonB)和 TonB 周质蛋白在 MK-4 耐受菌中的表达显著上调, 这 2 种蛋白与维生素 B<sub>12</sub> 等多种重要物质的跨膜运输和维持黄杆菌细胞被膜结构功能的稳定性相关。*tatAD* 和 *tatC* 分别上调 2.81 倍和 0.50 倍, 可能促进了 MK-7 的胞外分泌。由于 ABC 转运系统可负责氨基酸、蛋白质和维生素等的运输, KEGG 富集显示 ABC 转运系统存在差异, 我们推测 NK 和 MK-7 的胞外分泌与 ABC 转运子可能存在关联。

综上所述, 我们初步确定了 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌中共产 NK 和 MK-7 合成的影响机制。我们通过分析中心碳代谢通路、MK-7 合成、转运和 NK 的合成途径来实现 MK-7 和 NK 的共同生产。*bdhA* 的下调, 促使碳通量的再分配, 为 NK 和 MK-7 的合成提供更多的中间代谢产物, 产生更多的能量, 促进细胞生长、代谢和产物积累。转运系统相关基因的上下调促进 MK-7 的胞外运输, 减少 MK-7 积累对细胞的毒性作

用。本研究利用代谢工程在枯草芽孢杆菌中实现 NK 和 MK-7 的协同生产, 有助于理解 NK 和 MK-7 的共同生产机制, 为采用代谢工程手段提高 NK 和 MK-7 产量提供新的策略。

## 参考文献

- [1] MAHDINIA E, DEMIRCI A, BERENJIAN A. Production and application of menaquinone-7 (vitamin K<sub>2</sub>): a new perspective[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 33(1): 2.
- [2] CHU JX, ZHAO HZ, LU ZX, LU FX, BIE XM, ZHANG C. Improved physicochemical and functional properties of dietary fiber from millet bran fermented by *Bacillus natto*[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 79-86.
- [3] LI GL, LI T, HE F, CHEN C, XU X, TIAN WL, YANG Y, HE X, LI H, CHEN KQ, HAO N, OUYANG PK. Microencapsulation of nattokinase from fermentation by spray drying: optimization, comprehensive score, and stability[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(7): 3906-3916.
- [4] GAO QX, CHEN H, WANG GY, YANG W, ZHONG XT, LIU JZ, HUO XJ, LIU WF, HUANG JZ, TAO Y, LIN BX. Highly efficient production of menaquinone-7 from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(4): 756-765.
- [5] LIU Y, WANG J, HUANG JB, LI XF, CHEN Y, LIU K, ZHAO M, HUANG XL, GAO XL, LUO YN, TAO W, WU J, XUE ZL. Advances in regulating vitamin K<sub>2</sub> production through metabolic engineering strategies[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 40(1): 8.
- [6] MOHAMMADI F, NEZAFAT N, BERENJIAN A, NEGAHDARIPOUR M, ZAMANI M, GHOSHON MB, MOROWVAT MH, HEMMATI S, GHASEMI Y. Extracellular production of a potent and chemically resistant nattokinase in immobilized *Escherichia coli* using response surface methodology[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2018, 19(11): 856-868.
- [7] KATSUYAMA H, SAIJOH K, OTSUKI T, TOMITA M, FUKUNAGA M, SUNAMI S. Menaquinone-7 regulates gene expression in osteoblastic MC3T3E1 cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2007, 19(2): 279-284.
- [8] XU JZ, YAN WL, ZHANG WG. Enhancing menaquinone-7 production in recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* by metabolic pathway engineering[J]. RSC Advances, 2017, 7(45): 28527-28534.
- [9] HU MM, BAO WW, PENG QQ, HU W, YANG XY, XIANG Y, YAN XY, LI M, XU P, HE QN, YANG SH.

- Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for co-production of D-lactic acid and ethanol using waste feedstocks of molasses and corncob residue hydrolysate[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1135484.
- [10] FAN XG, WU HY, JIA ZF, LI GL, LI Q, CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the co-production of uridine and acetoin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(20): 8753-8762.
- [11] ZHANG YF, YUN JH, ZABED HM, DOU Y, ZHANG GY, ZHAO M, TAHERZADEH MJ, RAGAUSKAS A, QI XH. High-level co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol: metabolic engineering and process optimization[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 369: 128438.
- [12] 周梦洁, 胡汶松, 胡刘秀, 余春苗, 王洲, 黄茜琳, 黄俊宝, 梁雪艳, 汤俊, 罗建泉, 薛正莲, 刘艳. 枯草芽孢杆菌聚谷氨酸合成途径相关基因功能研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(1): 387-402.
- ZHOU MJ, HU WS, HU LX, YU CM, WANG Z, HUANG XL, HUANG JB, LIANG XY, TANG J, LUO JQ, XUE ZL, LIU Y. Functions of genes involved in polyglutamic acid synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(1): 387-402.
- [13] ZHOU MJ, JING W, HU LX, HU WS, HUANG JB, HUANG XL, GAO XL, LUO YN, XUE ZL, LIU Y. Enhanced vitamin K<sub>2</sub> production by engineered *Bacillus subtilis* during leakage fermentation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(8): 224.
- [14] WANG M, FU J, ZHANG XY, CHEN T. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced production of acetoin[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(10): 1877-1885.
- [15] PENG C, ZHU SY, LU JY, HU XC, REN LJ. Transcriptomic analysis of gene expression of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis* natto toward different oxygen supply[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109700.
- [16] EYLEM CC, REÇBER T, WARIS M, KIR S, NEMUTLU E. State-of-the-art GC-MS approaches for probing central carbon metabolism[J]. *Microchemical Journal*, 2022, 172: 106892.
- [17] WU J, LI W, ZHAO SG, QIAN SH, WANG Z, ZHOU MJ, HU WS, WANG J, HU LX, LIU Y, XUE ZL. Site-directed mutagenesis of the quorum-sensing transcriptional regulator SinR affects the biosynthesis of menaquinone in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 113.
- [18] LI M, ZHANG ZL, LI SW, TIAN ZG, MA X. Study on the mechanism of production of  $\gamma$ -PGA and nattokinase in *Bacillus subtilis* natto based on RNA-seq analysis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 83.
- [19] UNREAN P, NGUYEN NHA. Metabolic pathway analysis and kinetic studies for production of nattokinase in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(1): 45-56.
- [20] HOLMBERG C, BEIJER L, RUTBERG B, RUTBERG L. Glycerol catabolism in *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of the genes encoding glycerol kinase (*glpK*) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*)[J]. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136(12): 2367-2375.
- [21] WINSTEDT L, YOSHIDA K, FUJITA Y, VON WACHENFELDT C. Cytochrome bd biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the cydABC operon[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(24): 6571-6580.
- [22] 杨绍梅. 枯草芽孢杆菌的模块化路径工程设计促进甲萘醌-7的合成[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2019.
- YANG SM. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* to promote the biosynthesis of menaquinone-7[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2019 (in Chinese).
- [23] ZHAO YR, YANG JM, QIN B, LI YH, SUN YZ, SU SZ, XIAN M. Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(6): 1915-1922.
- [24] WANG YX, WANG J, ZHANG X, TONG YJ, YANG RJ. Genomic and transcriptomic analysis of *Bacillus subtilis* JNFE1126 with higher nattokinase production through ultraviolet combined 60Co- $\gamma$  ray mutagenesis[J]. *LWT*, 2021, 147: 111652.
- [25] ABE S, YASUMURA A, TANAKA T. Regulation of *Bacillus subtilis aprE* expression by *glnA* through inhibition of *scoC* and sigma(D)-dependent *degR* expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(9): 3050-3058.
- [26] QUISEL JD, BURKHOLDER WF, GROSSMAN AD. *In vivo* effects of sporulation kinases on mutant Spo0A proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22): 6573-6578.
- [27] COLLINSON I. SecA: a new twist in the tale[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 199(2): e00736-16.
- [28] 方雪. 黄杆菌维生素 K<sub>2</sub> 胞外分泌的理化调控及其蛋白质组学研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2019.
- FANG X. Physicochemical regulation and proteomics study of extracellular secretion of vitamin K<sub>2</sub> from *Flavobacterium*[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2019 (in Chinese).