

• 酶催化与生物合成机制 •

堵国成 江南大学教授，教育部重大人才工程入选者，现任江南大学副校长，入选国家特殊人才支持计划教学名师。主要从事微生物代谢工程、发酵过程优化与控制以及酶工程与技术的教学和研究工作。担任 *Microbial Cell Factories* 和 *Journal of the Science of Food and Agriculture* 副主编、《生物工程学报》和 *Bioresource Technology* 编委等。获国家技术发明二等奖 2 项，国家科技进步二等奖 1 项，国家教学成果二等奖 3 项，省级教学成果特等奖 1 项、一等奖 2 项。



刘龙 江南大学教授，国家优青、教育部重大人才工程(青年)入选者，现任江南大学生物工程学院院长。主要从事合成生物学与食品生物制造的基础理论、关键技术与工程应用研究。以通讯作者在 *Nature Chemical Biology*、*Nucleic Acids Research*、*Nature Communications* 等期刊发表论文 200 余篇，主编出版 6 部中英文著作和教材，获授权发明专利 90 项(其中国际授权发明专利 15 项)。以第一完成人获江苏省科学技术奖一等奖、全国商业科技进步奖特等奖、青山科技奖、闵恩泽能源化工奖杰出贡献奖等多项省部级科技奖励。



功能膜微域在七烯甲萘醌合成过程中的作用解析

董雅君¹，崔世修^{1,2}，刘延峰^{1,2}，李江华^{1,2}，堵国成^{1,2*}，吕雪芹^{1,2}，刘龙^{1,2*}

1 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 未来食品中心，江苏 无锡 214122

董雅君，崔世修，刘延峰，李江华，堵国成，吕雪芹，刘龙. 功能膜微域在七烯甲萘醌合成过程中的作用解析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2215-2230.

DONG Yajun, CUI Shixiu, LIU Yanfeng, LI Jianghua, DU Guocheng, LÜ Xueqin, LIU Long. Functional analysis of functional membrane microdomains in the biosynthesis of menaquinone-7[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2215-2230.

摘 要：功能膜微域(functional membrane microdomains, FMMs)是细菌细胞质膜上富含脚手架蛋白和聚异戊二烯类物质的结构域，参与细胞生命活动的多个过程。本研究主要聚焦于揭示

资助项目：国家自然科学基金(22278186, 22208122)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22278186, 22208122).

*Corresponding authors. E-mail: DU Guocheng, gdcu@jiangnan.edu.cn; LIU Long, longliu@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-02-16; Accepted: 2023-03-31; Published online: 2023-04-04

FMMs 与 MK-7 之间的相关性, 并对 MK-7 合成进行代谢调控。首先, 通过荧光标记初步确定 FMMs 和 MK-7 在细胞膜上存在相关性; 其次通过分析 FMMs 破坏前后细胞膜上 MK-7 含量的变化以及细胞膜有序度的变化情况, 明确 MK-7 是 FMMs 的聚异戊二烯类关键组分; 接下来, 采用可视化分析探究 MK-7 合成过程中部分关键酶的亚细胞定位, 并通过 FloA 将胞内游离的途径酶 Fni、IspA、HepT 和 YuxO 定位至 FMMs 中, 进而实现 MK-7 合成途径的区室化, 最终成功获得一株高产 MK-7 的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株 BS3AT, 摇瓶水平 MK-7 产量达到 300.3 mg/L, 3 L 发酵罐中 MK-7 产量为 464.2 mg/L。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 功能膜微域; 七烯甲萘醌; 可视化分析; 膜有序度; 区室化

Functional analysis of functional membrane microdomains in the biosynthesis of menaquinone-7

DONG Yajun¹, CUI Shixiu^{1,2}, LIU Yanfeng^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, DU Guocheng^{1,2*}, LÜ Xueqin^{1,2}, LIU Long^{1,2*}

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Functional membrane microdomains (FMMs) that are mainly composed of scaffold proteins and polyisoprenoids play important roles in diverse cellular physiological processes in bacteria. The aim of this study was to identify the correlation between MK-7 and FMMs and then regulate the MK-7 biosynthesis through FMMs. Firstly, the relationship between FMMs and MK-7 on the cell membrane was determined by fluorescent labeling. Secondly, we demonstrated that MK-7 is a key polyisoprenoid component of FMMs by analyzing the changes in the content of MK-7 on cell membrane and the changes in the membrane order before and after destroying the integrity of FMMs. Subsequently, the subcellular localization of some key enzymes in MK-7 synthesis was explored by visual analysis, and the intracellular free pathway enzymes Fni, IspA, HepT and YuxO were localized to FMMs through FloA to achieve the compartmentalization of MK-7 synthesis pathway. Finally, a high MK-7 production strain BS3AT was successfully obtained. The production of MK-7 reached 300.3 mg/L in shake flask and 464.2 mg/L in 3 L fermenter.

Keywords: *Bacillus subtilis*; functional membrane microdomains; menaquinone-7; visualization; membrane order; compartmentalization

七烯甲萘醌(menaquinone-7, MK-7)是维生素 K₂ 的一种亚型, 由 2-甲基-(1,4)-萘醌核和 C3 位侧链上 7 个异戊二烯基团构成^[1](图 1A), 主要贮

存在细胞膜中, 在维持骨骼^[2]、心脑血管健康^[3]等方面具有良好的作用。目前 MK-7 主要通过发酵食品提取、化学合成和微生物发酵 3 种方法进

行制备,其中,通过微生物发酵法对于实现MK-7的高效合成具有重要意义^[4]。在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中存在完整的MK-7合成途径,可以分为糖酵解-磷酸戊糖、分支酸和甲基-4-磷酸赤藓糖醇(methylerythritol-4-phosphate, MEP),以及典型的甲萘醌合成4个模块^[5]。其中,骨架结构(1,4)-二羟基-2-萘甲酸(1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, DHNA)由甲萘醌模块负责合成,以分支酸(chorismic acid, CHA)为底物,经由(1,4)-二羟基-2-萘酰辅酶A水解酶[(1,4)-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA hydrolase, YuxO]、(1,4)-二羟基-2-萘酰辅酶A合酶[(1,4)-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase, MenB]等7种不同的酶参与催化^[6];侧链结构七异戊二烯基焦磷酸(heptaprenyl diphosphate, HDP)由MEP途径负责

合成,以1-脱氧-D-木糖-5-磷酸(1-deoxyxylulose-5-phosphate, DXP)为底物,经由七异戊二烯基焦磷酸合酶(heptaprenyl diphosphate synthase component I/II, HepS/HepT)、法呢基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, IspA)和异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, Fni)等11种不同的酶参与催化^[7];随后HDP在(1,4)-二羟基-2-萘酰辛二烯酯转移酶[(1,4)-dihydroxy-2-naphthoate heptaprenyltransferase, MenA]的催化下转移到骨架结构的C3位^[8],最终通过去甲基甲萘醌甲基转移酶(demethylmenaquinone methyltransferase, MenH)形成MK-7^[9](图1B)。Ma等^[11]在枯草芽孢杆菌168中增加部分限速酶的表达量并进行不同组合,最终使MK-7产量达到50 mg/L。Cui等^[12]通过增强前体供应和构建Phr60-Rap60-Spo0A

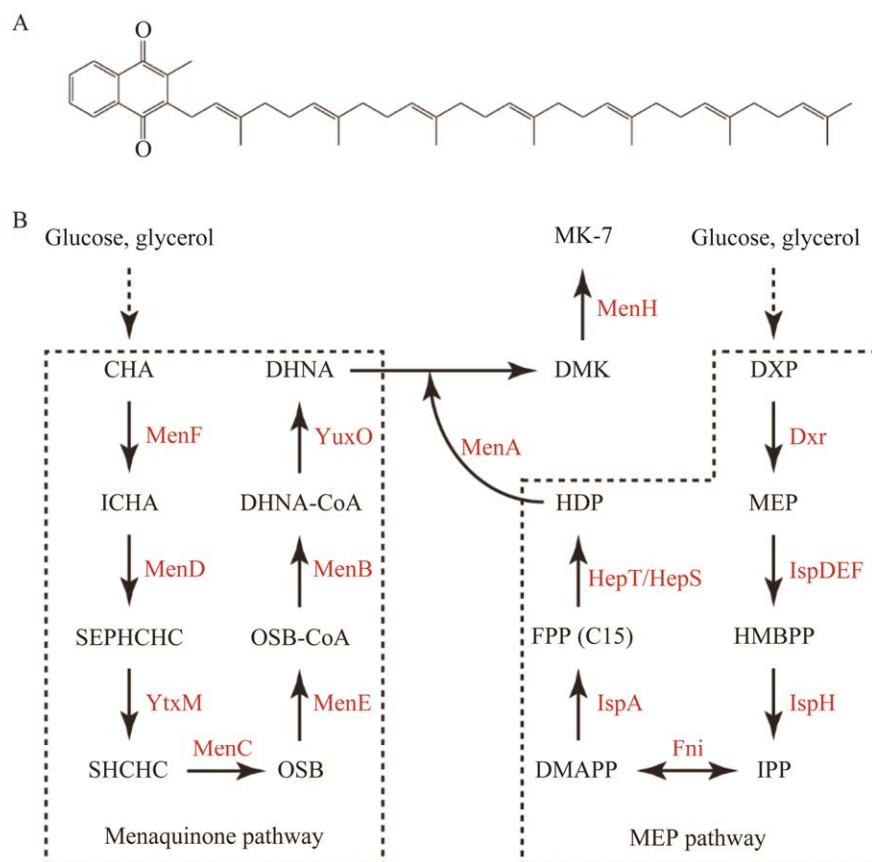


图1 MK-7的化学结构式(A)和合成途径示意图(B)^[10]

Figure 1 Structure (A) and synthesis diagram (B) of MK-7^[10].

群体响应调控系统,使碳流量更多进入 MK-7 合成途径,最终成功获取一株高产 MK-7 的菌株,摇瓶水平 MK-7 产量达到 360 mg/L。

区室化可以将代谢途径中亚细胞定位不同的酶聚集于一个区域,以增加底物或酶的局部浓度,实现更快的反应速率和更高的生产率^[13]。在真核生物中,可以通过脂筏^[14]、线粒体^[15]和内质网^[16]等实现区室化。例如,Deloache 等^[17]将紫色杆菌素前体(prodeoxyviolacein, PDV)合成的途径酶 VioB 和 VioE 与标准过氧化物酶体基质蛋白 1 型信号肽(peroxisome target signal type 1, PTS1)标签融合,使酶在过氧化物酶体中表达,显著提高了 PDV 产量;Avalos 等^[18]在酵母线粒体中表达 Ehrlich 途径的相关酶,提高了局部酶的浓度,显著提高了异丁醇的产量。在细菌中,功能膜微域(functional membrane microdomains, FMMs)等结构域的存在亦可使质膜区室化。由脚手架蛋白和聚异戊二烯类物质构成的 FMMs 参与多种不同类型的细胞生命活动^[19]。其中,脚手架蛋白是 FMMs 的标记蛋白,可以募集蛋白、脂质等物质至 FMMs 中,并促进这些物质间的相互作用和寡聚化^[20-21];聚异戊二烯化合物的存在使 FMMs 具有高度致密性和疏水性,有助于相关蛋白在 FMMs 中集聚^[22]。Lv 等^[23]将 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc)合成所需的途径酶氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶(GlcNAc-6-phosphate N-acetyltransferase, GNA1)、GlcN-6-磷酸合酶(GlcN-6-phosphate synthase, Glms)、磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase, Pgi)和卤酸脱卤酶样磷酸酶(haloacid dehalogenase-like phosphatases, YqaB)与脚手架蛋白融合表达,使 4 种酶聚集在 FMMs 中,通过集聚效应和底物通道效应提高酶的催化效率,最终促进了 GlcNAc 的高效合成。

MK-7 的合成同细胞膜有关,FMMs 在 MK-7 的合成过程中可能存在不可或缺的作用。本研究以枯草芽孢杆菌为研究对象,探讨膜上聚异戊二烯化合物 MK-7 和 FMMs 之间的相关性,并通过 FMMs 实现 MK-7 合成途径中关键酶的区室化。首先,通过可视化观察 MK-7 和 FMMs 的分布特征,明确了二者的相关性;其次,通过分析 FMMs 的完整性破坏前后,细胞膜上 MK-7 含量和膜有序度的变化,明确 MK-7 是构成 FMMs 关键聚异戊二烯类化合物的一种;最后,通过 FloA 蛋白将 MK-7 合成途径中的关键酶锚定至 FMMs 中,获得了一株高产 MK-7 的菌株 BS3AT,摇瓶水平 MK-7 产量达到 300.3 mg/L,3 L 发酵罐中 MK-7 产量达到 464.2 mg/L。结果表明,在枯草芽孢杆菌中通过 FMMs 实现 MK-7 合成途径中关键酶的区室化,可以有效提高 MK-7 的产量,这为 MK-7 的高效合成提供了一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所使用的菌株、质粒如表 1 所示。

1.2 主要试剂及培养基

LB (Luria Broth)培养基:10 g/L 蛋白胨,10 g/L NaCl,5 g/L 酵母粉,121 °C 灭菌 20 min。LB 固体培养基中添加 2%的琼脂粉。

发酵培养基:50 g/L 葡萄糖、50 g/L 甘油、50 g/L 大豆蛋白胨、0.06 g/L 磷酸二氢钾,115 °C 灭菌 20 min。

实验所用抗生素:卡那霉素 50 µg/L、博来霉素 20 µg/L、壮观霉素 100 g/L、氯霉素 30 µg/L。

1.3 仪器和设备

本研究中所使用的主要仪器:PCR 扩增仪(伯乐有限公司)、核酸电泳仪(六一电泳仪厂)、超声波细胞破碎仪(伯乐有限公司)、分光光度计(赛默飞有限公司)、超速离心机(赛默飞有限

公司)、激光共聚焦显微镜(徕卡显微系统公司)、荧光显微镜(尼康公司)、HPLC-1260 (安捷伦公司)、3 L 迪必尔发酵罐(NBS 有限公司)。

1.4 质粒和菌株构建

通过一步克隆法构建本研究所用质粒,所用引物如表2所示。以 pHT01-*floA-eGFP* 质粒构建为例:以 BS168 的基因组作为模板,以 FloA-1F

和 FloA-1R 为引物扩增得到 *floA* 基因片段,以 eGFP-1F 和 eGFP-1R 为引物扩增得到 *eGFP* 基因片段;以 pHT01 质粒为模板,以 Z-1F 和 Z-1R 为引物扩增得到载体基因片段。参照一步克隆说明书中的质粒构建方法,获得质粒 pHT01-*floA-eGFP*。

通过 Cre/loxP 系统构建本研究所用重组枯草芽孢杆菌,所用引物如表 2 所示。以重组工

表 1 本研究中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Name	Description	Reference
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	For plasmid construction	Lab stock
BS168	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Lab stock
BS168C	BS168 derivate, $\Delta floA \Delta floT \Delta yisP \Delta sqhC$	
BS3	BS168 derivate, $P_{veg-kinA}-\Delta PAS-A \Delta kinB \Delta spoIIA \Delta spoIIIE, P_{43-menF} P_{43-menB} P_{hbs-menE} P_{43-entC} \Delta dhbB Phbs-ktk P_{43-ppsA} \Delta ptsG P_{hbs-aroG^{fbr}}::lox72 P_{43-aroK} P_{hbs-ispA} P_{43-hepS/T} P_{hbs-kdpG} P_{43-dxr} P_{43-dxs} P_{43-fni} P_{mena-menaA}::lacA P_{mena-menaA}::thrC P_{mena-menaA}::dacA$	Lab stock
BS3C	BS3 derivate, $\Delta floA \Delta floT \Delta yisP \Delta sqhC$	This work
BS3FA	BS3 derivate, $::P_{43-floA}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3FT	BS3 derivate, $::P_{43-floT}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3AF	BS3 derivate, $::P_{43-floA-fni}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3F	BS3 derivate, $::P_{43-fni}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3AI	BS3 derivate, $::P_{43-floA-ispA}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3I	BS3 derivate, $::P_{43-ispA}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3AT	BS3 derivate, $::P_{43-floA-hepT}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3T	BS3 derivate, $::P_{43-hepT}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3AO	BS3 derivate, $::P_{43-floA-yuxO}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
BS3O	BS3 derivate, $::P_{43-yuxO}$ (integrated site is between <i>yvoA</i> and <i>nagBA</i>)	This work
Plasmids		
P7C6	Pmd18-T containing <i>lox71-Cmr-lox66</i> cassette	Lab stock
P7S6	Pmd18-T containing <i>lox71-Spec-lox66</i> cassette	Lab stock
P7Z6	Pmd18-T containing <i>lox71-Zeo-lox66</i> cassette	Lab stock
pP43NMK	Amp, Kan, <i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle vector	Lab stock
pHT01	Amp, Cm, <i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle vector	Lab stock
pHT01- <i>floA-eGFP</i>	<i>floA-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>floT-eGFP</i>	<i>floT-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>menH-eGFP</i>	<i>menH-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>menA-eGFP</i>	<i>menA-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>menB-eGFP</i>	<i>menB-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>ispA-eGFP</i>	<i>ispA-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>fni-eGFP</i>	<i>fni-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>yuxO-eGFP</i>	<i>yuxO-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>hepS-eGFP</i>	<i>hepS-eGFP</i>	This work
pHT01- <i>hepT-eGFP</i>	<i>hepT-eGFP</i>	This work

表2 本研究中所用引物

Table 2 Primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
Z-1F	GGATGAACTATACAAATAATCTAGAGTCGACGTCCCCGG	39
Z-1R	GTGTACATTTACCTCCTTTAAATTACTTTCATTATGAGTT	41
eGFP-1F	GGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCACT	48
eGFP-1R	GTCGACTCTAGATTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCATGTGTAATCC	47
FloA-1F	TGAAATGTACACATGGATCCGTCAACACTTATGATTCTGG	40
FloA-1R	TACCCATGCTGCCGCCACCGCCGCTTCCTGATTTGCGGTCTTCATCCGAAGG	52
FloA-1F	AGGAGGTGAAATGTACACATGACAATGCCGATTATAATGATCATCGGA	48
FloA-1R	GCCACCGCCGCTTCCTTACTCTGATTTTGGATCGTTTGGCTTCT	46
MenH-1F	AGGAGGTGAAATGTACACATGCAGGACTCAAAAGAACAGCG	41
MenH-1R	GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCTTCCATCCGATATGCGTGCGAG	44
MenA-1F	GCCAGTGAATTCGAGCTCATCAAAATTCCTTCCCCTTTTTCGA	59
MenA-1R	TTACCCATGCTGCCGCCACCGCCGCTTCCTCGGAAATAGCTGATCAATAATCCGATCGA	59
MenB-1F	AGGAGGTGAAATGTACACATGGCTGAATGGAAAACAAAACGGA	43
MenB-1R	GCCGCTTCCCGGAAAACGAGGGAAGTGTCC	43
IspA-1F	AGGAGGTGAAATGTACACGTGACAAATAAATTAACGAGCTTTCTGGCG	48
IspA-1R	ACCGCCGCTTCCGTGATCTCTTGCCGCAATTAAATCAC	48
Fni-1F	AGGAGGTGAAATGTACACGTGACTCGAGCAGAACGAAAAAGAC	43
Fni-1R	GCCGCTTCCTCGCACACTATAGCTTGATGTATTGACC	37
YuxO-1F	GGAGGTGAAATGTACACATGGATATGAAGCACACATTGCTTGAAG	45
YuxO-1R	GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCTTCTTGATGACAGCCAGCGTGC	45
HepS-1F	GGAGGTGAAATGTACACTTGCAAGACATCTACGGAACCTTAGCC	52
HepS-1R	CCATGCTGCCGCCACCGCCGCTTCCCCCTTCTTCCACTTCTGATGATAGGT	52
HepT-1F	AGGAGGTGAAATGTACACATGTTAAATATCATTCGTTTACTGGCGGAG	48
HepT-1R	CCGCCGCTTCCAAATTTTCTTTTACCGATATATTTTGCGATGGCT	48
QC-yisP-U-1F	TGATGCCTGATGCGAAAGTCTTTT	53
QC-yisP-U-1R	ATCCGCTCAAAACACCCGGCCTTGATTGAG	53
QC-yisP-S-1F	AGGCCGGGTGTTTGTAGCGGATAACAATTCACACAGGAA	53
QC-yisP-S-1R	AGACTTGAAGAAGCATAACGCCAGGGTTTCCAGTC	53
QC-yisP-D-1F	GGAAAACCCTGGCGTTATGCTTCTTCAAGTCTAGTATGTTTTTCTTAATTGT	53
QC-yisP-D-1R	ACTGGACAGAAAACAATTAGATCAGCTTTTAGA	53
QC-FloA-U-1F	CAGATCACATTTATATGGCGCCTGG	58
QC-FloA-U-1R	GTGTGAAATTGTTATCCGCTCATAACTTCTCCTCGTTTCTATTAAATTTCTCTCACG	58
QC-FloA-S-1F	AGAAACGAGGAGAAGTTATGAGCGGATAACAATTCACACAGGAA	58
QC-FloA-S-1R	CTCCCTTCTTAGAGAGATAACGCCAGGGTTTCCAGT	58
QC-FloA-D-1F	AAACCCTGGCGTTATCTCTCTAAGAAGGGAGAACGCTGATG	58
QC-FloA-D-1R	ACATTTAAATTTACTTCTTACCCGCCGAA	58
QC-FloT-U-1F	TTGGCTGCCTGAAATAAAATCATGCG	58
QC-FloT-U-1R	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCATCAAATTCCTCCTTTTATGTTAAATGGGTTCAT	58
QC-FloT-C-1F	AAAAGGAGGAATTTGATGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAAC	58
QC-FloT-C-1R	GTTCTGCCCTTTCCTAACGCCAGGGTTTCCAGTC	58
QC-FloT-D-1F	GAAAACCCTGGCGTTAGGAAAGGGCAGAACCGTATGG	58

(待续)

(续表 2)

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
QC-FloT-D-1R	GGTGTCAAAGCAGGTCTTACTACAGG	58
QC-sqhC-U-1F	GGATTTGTTTGACGAGCTGAAAAGC	51
QC-sqhC-U-1R	GTGTGAAATTGTTATCCGCTCATGAAACGTGAATCTTATCAAGCGGAG	51
QC-sqhC-C-1F	GCTTGATAAGATTCACGTTTCATGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC	51
QC-sqhC-C-1R	GAGTTGAGCGTGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCA	51
QC-sqhC-D-1F	AAAACCTTGGCGTTACACGCTCAACTCCTTCAGAAGC	51
QC-sqhC-D-1R	CCGCTTTTCAGCTCTTTATTTGGCAG	51
U-1F	AAACCGATTATTTTGAATGTAACGTATATACCAATGAA	54
U-1R	GTGTGAAATTGTTATCCGCTCATGAATATCAATAAACAATCGCCTATTCCGATT	54
C-1F	ATAGGCGATTGTTTATTGATATTCATGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC	54
C-1R	GGTAAGAGAGGAATGTACACTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTC	54
P43-1F	GGAAAACCTTGGCGTTAGTGACATTCCTCTCTTACCTATAATGGTACCG	54
P43-FloA-1R	ATAAGTGTTGACGGATCCATTGATAGGTGGTATGTTTTCGCT	54
FloA-1F	ACATACCACCTATCAATGGATCCGTCAACACTTATGATTCTG	54
FloA-1R	TTGAAAGGAACATGCTGACTTTGATTTGCGGTCTTCATCCGAAGG	54
FloA-D-1F	ACCGCAAATCAAAGTCAGCATGTTCCCTTTCAAGGTCTTAAT	54
D-1R	GTTTCGATCCTCAAAATGAACGAAGGC	54
P43-SPFH-1R	CGGCATTGTCTATTGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGAAC	45
SPFH-1F	ACATACCACCTATCAATGACAATGCCGATTATAATGATCATCGGA	45
SPFH-1R	CATGCTGACTTTTTATCAGCCTCTGCTGTTGCGA	45
SPFH-D-1F	CAGCAGAGGCTGATAAAAAGTCAGCATGTTCCCTTTCAAGGTC	45
FLoA-2R	GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCTGATTGCGGTCTTCATCCGAAGG	58
Fni-1F	GACCGCAAATCAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGTGACTCGAGCAGAACGAAAAAGAC	58
Fni-1R	CTTGAAAGGAACATGCTGACTTTTATCGCACACTATAGCTTGATGTATTGACC	53
Fni-D-1F	GCTATAGTGTCGATAAAAAGTCAGCATGTTCCCTTTCAAGGTCT	58
IspA-1F	GCAAATCAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGTGACAAATAAATTAACGAGCTTTCTGGCG	59
IspA-1R	AACATGCTGACTTTTAGTGATCTCTTGCCGAATTAATCACA	59
IspA-D-1F	GCGGCAAGAGATCACTAAAAGTCAGCATGTTCCCTTTCAAGGTC	59
HepT-1F	CGCAAATCAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCATGTTAAATATCATTCGTTTACTGGCGGAG	63
HepT-1R	AGACCTTGAAAGGAACATGCTGACTTTTAAATTTTCTTTTACCGATATATTTTGCATGGCT	63
HepT-D-1F	CGGTAAAAGAAAATTTTAAAAGTCAGCATGTTCCCTTTCAAGGTCTTAATGACGCGGCT	63
YuxO-1F	CCGCAAATCAGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCATGGATATGAAGCACACATTGCTTGAAG	59
YuxO-1R	AAGGAACATGCTGACTTTTATTTCTTGATGACAGCCAGCGTG	59
YuxO-D-1F	CATCAAGAAATAAAAAGTCAGCATGTTCCCTTTCAAGGTC	59
P43-Fni-1R	CTGCTCGAGTCACTGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGAAC	43
Fni-2F	ACATACCACCTATCAGTGAAGTCAAGCAGAACGAAAAAGAC	43
P43-IspA-1F	GCCAGAAAGCTCGTTAATTTATTTGTCAGTATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGAAC	64
IspA-2F	ACATACCACCTATCAGTGAAGTCAAGCAGAACGAAAAAGAC	64
P43-HepT-1R	CGCCAGTAAACGAATGATATTTAACATTGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGAAC	60
HepT-2F	ACATACCACCTATCAATGTTAAATATCATTCGTTTACTGGCGGA	60
P43-YuxO-1R	TGTGTGCTTCATATCCATTGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGAAC	59
YuxO-2F	ACATACCACCTATCAATGGATATGAAGCACACATTGCTTGA	59

The underlined sequences are the linker used in the experiment, and the linker used is the flexible linker.

程菌 BS3FA 的构建为例：以 BS168 的基因组作为模板，以 U-1F 和 U-1R 为引物扩增得到上游同源臂基因片段，以 FloA-1F 和 FloA-1R 为引物扩增得到 *floA* 基因片段，以 D-1F 和 D-1R 为引物扩增得到下游同源臂基因片段；以 pP43NMK 质粒为模板，以 P43-1F 和 P43-1R 为引物扩增得到 *P*₄₃ 启动子基因片段；以 P7C6 质粒为模板，以 C-1F 和 C-1R 引物对扩增得到 *lox71-zeo-lox66* 基因片段。通过重叠延伸 PCR 融合表达 5 个片段。通过化学转化的方法将构建好的表达框转入 BS3 中，通过菌落 PCR 验证获得重组工程菌 BS3FA。

1.5 摇瓶发酵

取保藏在甘油管中的重组枯草芽孢杆菌接种至 LB 固体培养基上进行活化，挑取单菌落接种至 2 mL LB 液体培养基中，在 37 °C、220 r/min 培养条件下振荡培养 8 h；取 1 mL 种子液接种至 20 mL 发酵培养基中于 40 °C、220 r/min 振荡培养 6 d。每 24 h 取样 500 μL 监测细胞生长情况，以及 MK-7 含量的检测。每组样品 3 个平行。

1.6 细胞组分的分离和提取

发酵样品：按照上述摇瓶发酵方法，取发酵 2 d 后的发酵液 15 mL 用于细胞组分分离。

细胞外：将发酵样品在 5 000 r/min 离心 10 min，分为“上清 1”和“沉淀 1”。“上清 1”用作检测胞外 MK-7 含量。

全细胞：“沉淀 1”用无菌水洗涤 3 次并用无菌水重悬后，用作检测全细胞 MK-7 产量。

细胞内：重悬后的“沉淀 1”通过超声波细胞破碎仪进行破碎，在 10 000 r/min 离心 40 min，分为“上清 2”和“沉淀 2”；“上清 2”通过超速离心机在 140 000 r/min 下离心 1 h，分为“上清 3”和“沉淀 3”，“上清 3”用作检测细胞内 MK-7 含量。

细胞膜：“沉淀 3”用无菌水重悬后，用作检测细胞膜上 MK-7 含量。

1.7 荧光显微镜观察

eGFP 样品制备：取保藏在甘油管中的重组枯草芽孢杆菌接种到 LB 固体培养基上进行活化，挑取单菌落接种到 2 mL LB 液体培养基中在 37 °C、220 r/min 培养条件下振荡培养 10 h；5 000 r/min、10 min 离心收集菌体，用 LB 液体培养基清洗 3 遍，得到荧光观察样品。

罗丹明 123 样品制备：在发酵 36 h 后的摇瓶发酵液中加入 20 μL 的 2 mmol/L 罗丹明 123 母液，继续孵育 1 h；5 000 r/min、10 min 离心收集菌体，用 LB 液体培养基清洗 3 遍，得到荧光观察样品。

Di-4-ANEPPDHQ 样品制备^[23]：取保藏在甘油管中的重组枯草芽孢杆菌接种到 LB 固体培养基上进行活化，挑取单菌落接种到 2 mL LB 液体培养基中在 37 °C、220 r/min 培养条件下振荡培养 10 h；5 000 r/min、10 min 离心收集菌体，弃上清，添加 1 mL LB 培养基(含有 5 μmol/L di-4-ANEPPDHQ)，于冰上孵育 10 min，离心弃上清，用预冷的 LB 培养基洗涤 3 次。

eGFP 和罗丹明 123 荧光观察：通过使用尼康显微镜 C-HGF (100×油镜)观察 eGFP 和罗丹明 123，使用 FITC 滤光片，通过 ImageJ 软件进行图像处理和分析。

Di-4-ANEPPDHQ 荧光观察：使用激光共聚焦显微镜 Leica TCS SP8 显微镜(60×油镜)，样品采用 488 nm 的激发光波长，500–580 nm (有序相)和 620–750 nm (无序相)的发射光波长，显微镜设置(偏移值，PMT 电压和激光功率)均相同。通过均一化极性数值(generalized polarization value, GP value)来表示定量分析，GP 图像根据 Owen 等^[24]提供的 ImageJ 自定义宏生成。计算公式如下：

$$GP = (I_{500-580} - G_{cor}I_{620-750}) / (I_{500-580} + G_{cor}I_{620-750})$$

其中, $I_{500-580}$ 和 $I_{620-750}$ 分别代表 500–580 nm 和 620–750 nm 通道中每个像素的荧光强度。 G_{cor} 为校准因子, 计算公式如下:

$$G_{cor} = (GP_{the} + GP_{the} GP_{exp} - GP_{exp} - 1) / (GP_{exp} + GP_{the} GP_{exp} - GP_{the} - 1)$$

GP_{exp} 是二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液在相同显微镜设置下中 di-4-ANEPPDHQ 的 GP 值, GP_{the} 则是染料在 DMSO 中的参考值, 一般认为 $GP_{the} = -0.85$ 。处理后的荧光图像中每个像素强度乘 GP 值, 则可以生成色相饱和度亮度的伪彩色 GP 图像。

1.8 MK-7 的萃取和检测

MK-7 萃取: 按照异丙醇和正己烷 1:2 (体积比) 的比例配制萃取液。将待测样品和萃取液按照 1:4 (体积比) 的比例混匀离心后, 上层有机相检测 MK-7 含量。

MK-7 检测: 检测仪器为配备有紫外检测器的高性能液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC), 色谱柱为 C18-ODS 色谱柱 (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm), 流动相为 90% 的甲醇和 10% 的二氯甲烷 (色谱级)。进样量为 10 μ L, 流速为 1 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长 254 nm。MK-7 校准曲线在 1 mg/L 至 100 mg/L 之间呈线性 ($R^2=0.998$)。

1.9 3 L 发酵罐发酵

3 L 发酵罐所用培养基: 50 g/L 葡萄糖、50 g/L 甘油、50 g/L 大豆蛋白胨、0.06 g/L 磷酸二氢钾, 115 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

取保藏在甘油管中的重组枯草芽孢杆菌接种到 LB 固体培养基上进行活化, 挑取一个单菌落接种到 50 mL LB 液体培养基中在 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养条件下振荡培养 10 h; 将种子液按照 4% (体积分数) 的接种量接种到含有 1.5 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中, 培养 6 d。

发酵罐条件设置: 通气量为 1.5 vvm, 发酵温度为 40 $^{\circ}$ C, pH 通过 50% (体积分数) 的氨水维持在 7 左右, 搅拌转速根据溶氧进行调节, 溶氧维持在 50%, 转速在 400–600 r/min。

2 结果与分析

2.1 FMMs 和 MK-7 的相关性分析

为了明确 FMMs 与 MK-7 之间是否具有相关性, 该研究对两者的亚细胞定位进行了分析。有研究指出, 脚手架蛋白 FloA 和 FloT 构成 FMMs 的骨架结构, 可以作为 FMMs 的标志蛋白^[25]。首先, 分别将脚手架蛋白 FloA 和 FloT 与 eGFP 进行融合表达, 进行荧光显微镜观察。结果显示, FloA-eGFP 和 FloT-eGFP 主要以不连续的点状结构分布于细胞膜上 (图 2A、2B)。进一步使用 MK-7 的特异性染料罗丹明 123 染料对课题组前期构建的一株高产 MK-7 菌株 BS3 进行染色^[26]。结果显示, MK-7 也以不均匀的点状结构分布在细胞膜上 (图 2C), 推测 FMMs 和 MK-7 存在相关性。

除脚手架蛋白外, 聚异戊二烯化合物也参与维持 FMMs 的完整性。聚异戊二烯化合物的合成需要 YisP^[27] (合成 C30 萜类化合物) 和 SqhC^[28] (聚异戊二烯环化酶) 的参与。因此, 为了探讨 FMMs 的完整性对 MK-7 合成的影响, 该研究在 BS3 菌株中通过 Cre/loxP 基因编辑方法敲除了基因 *floA*、*floT*、*sqhC* 和 *yisP*, 获得菌株 BS3C, 检测 BS3 和 BS3C 菌株中不同组分的 MK-7 含量。结果发现, FMMs 的完整性被破坏后, MK-7 的总产量基本不变。其中, BS3C 细胞内 MK-7 的含量增加了 26.8%, 细胞膜上 MK-7 的含量降低了 24.8% (图 3B)。这表明在破坏 FMMs 的完整性后, 细胞膜和细胞内 MK-7 的含量发生明显变化。推测可能原因是 FMMs 的完整性被破坏后, 会影响 MK-7 进入细胞膜的过程, 进而使 MK-7 在细胞内积累。

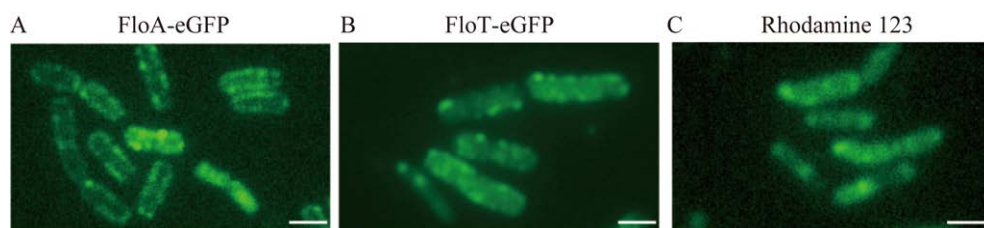


图2 FloA、FloT 和 MK-7 的分布特征 A: FloA 的亚细胞定位. B: FloT 的亚细胞定位. C: MK-7 的亚细胞定位. 标尺=1 μm

Figure 2 Characteristic of FloA, FloT and MK-7. A: Subcellular localization of FloA. B: Subcellular localization of FloT. C: Subcellular localization of MK-7. Bar=1 μm .

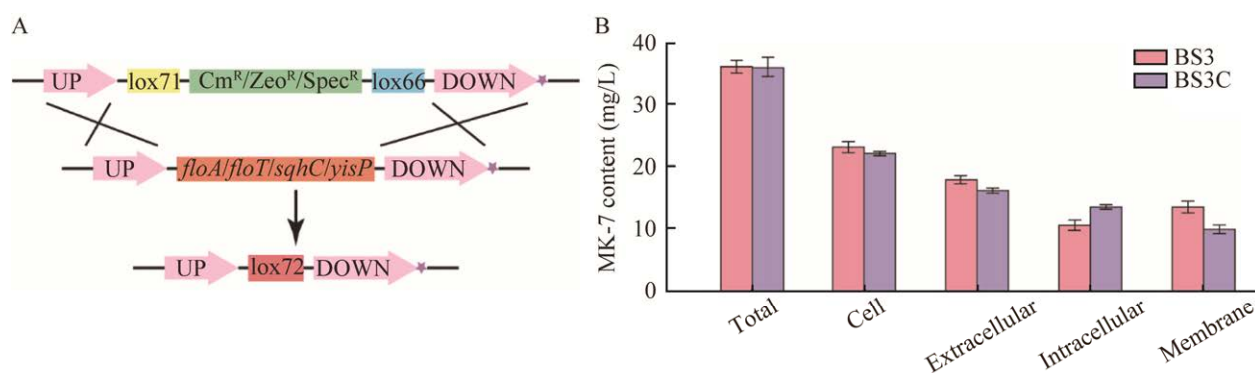


图3 FMMs 完整性破坏对 MK-7 的影响 A: 基因敲除表达框示意图. B: 菌株 BS3 和 BS3C 不同组分中的 MK-7 含量

Figure 3 Effect of disruption of FMMs integrity on MK-7 content. A: Diagram of gene knockout expression box. B: Changes in MK-7 content in different fractions of strains BS3 and BS3C.

FMMs 是一类高度有序的膜结构域, 可以通过膜有序度来表征细胞膜上 FMMs 的变化情况^[23]。为了明确 FMMs 的完整性和 MK-7 对细胞膜有序度的影响, 同样在 BS168 菌株中通过敲除基因 *floA*、*floT*、*sqhC* 和 *yisP*, 获得菌株 BS168C, 使用 di-4-ANEPPDHQ^[29] 染料对 BS3、BS3C 和 BS168C 进行染色, 通过激光共聚焦显微镜采集双通道图像(500–580 nm 和 620–750 nm), 并通过 ImageJ 进行 GP 值分析和图像转化。GP 值可指示膜有序度, GP 值越高, 膜有序度越高。对获得的直方图进行拟合, 获得膜有序度定量分析结果。结果发现, BS3 的 GP 峰值为 0.48, 平均 GP 值为 0.47 ± 0.01 ; BS3C

的 GP 峰值为 0.43, 平均 GP 值为 0.43 ± 0.01 ; BS168C 的 GP 峰值为 0.33, 平均 GP 值为 0.32 ± 0.01 (图 4A–4C)。其中, BS3 的膜有序度高于 BS3C, 表明 FMMs 完整性被破坏后影响了 MK-7 进入细胞膜的过程, 导致了 BS3C 细胞膜上 MK-7 含量降低。BS3C 的膜有序度明显高于 BS168C, 表明 MK-7 可以有效提高细胞膜有序度。上述结果表明 MK-7 是 FMMs 中的一类重要的聚异戊二烯类化合物。

2.2 MK-7 合成途径关键酶的区室化

2.2.1 MK-7 合成途径关键酶的亚细胞定位

为了探究 MK-7 如何定位至细胞膜甚至 FMMs 中, 该研究选择 8 个 MK-7 合成的关键酶:

MenH、MenA、MenB、YuxO、HepS、HepT、Fni、IspA, 拟对它们的亚细胞定位情况进行分析。其中, Fni、IspA、HepS 和 HepT 参与 MK-7 侧链合成; MenB 和 YuxO 参与 MK-7 骨架结构合成; MenA 将侧链 HDP 整合到骨架 DHNA 中形成 DMK, 最后通过 MenH 甲基化形成 MK-7。

分别将上述 8 个关键酶与 eGFP 融合表达, 进行荧光显微镜观察。结果显示, MenH-eGFP、HepS-eGFP 和 MenB-eGFP 均以不连续的点状结

构分布在细胞膜上, 和 FMMs 标记蛋白的亚细胞定位极为类似, 推测 MenH、HepS 和 MenB 主要定位于 FMMs 中; MenA-eGFP 蛋白则是典型的细胞膜定位蛋白; YuxO-eGFP、Fni-eGFP、HepT-eGFP 和 IspA-eGFP 均匀地分布在细胞质中(图 5)。由上述结果可知, 负责骨架结构和侧链合成的关键酶在细胞中存在一定的空间距离, 可能会降低代谢反应速率, 进而影响 MK-7 的合成。

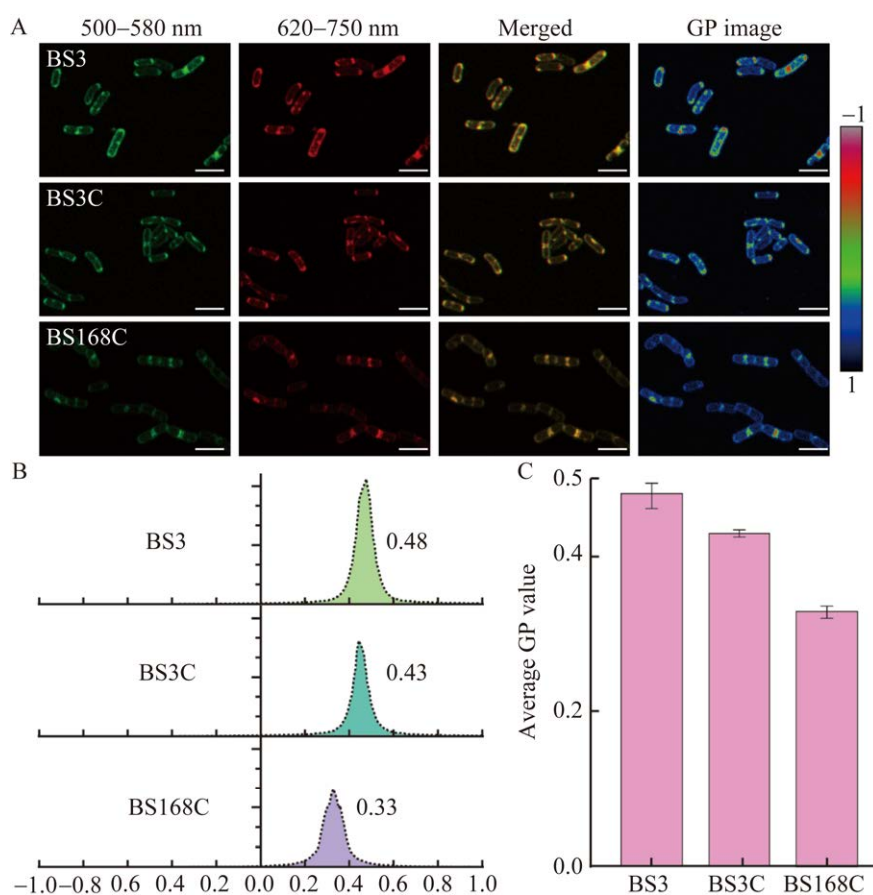


图 4 BS3、BS3C 和 BS168C 膜有序度的定量分析 A: 每一行从左到右依次为 500–580 nm 和 620–750 nm 波长下拍摄的图像、Merged 处理后的图像和 GP 图像。标尺=1 μm 。B: BS3、BS3C 和 BS168C 不同区域的 GP 值分布直方图。C: BS3、BS3C 和 BS168C 的平均 GP 值

Figure 4 Quantitative analysis of membrane order in BS3, BS3C and BS168C. A: Confocal images of BS3, BS3C and BS168C strains from the green channel (500–580 nm) and red channel (620–750 nm), the merged images from both channels and the GP images. Bar=1 μm . B: GP histograms of BS3, BS3C and BS168C strains show the number of pixels distributed in each GP value. C: Average GP values of BS3, BS3C and BS168C.

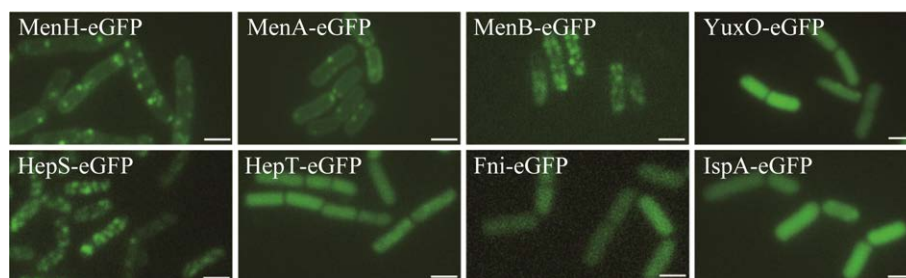


图5 MK-7合成途径关键酶的分布特征 标尺=1 μm

Figure 5 Subcellular localization of pathway enzymes. Bar=1 μm.

2.2.2 通过 FMMs 实现 MK-7 合成途径关键酶的区室化

鉴于 FMMs 和 MK-7 的相关性,本研究尝试使用 FMMs 来进行 MK-7 合成途径关键酶的区室化。首先以 BS3 为出发菌株,分别构建过表达 FloA、FloT 的重组菌株 BS3FA 和 BS3FT,验证过表达不同脚手架蛋白对 MK-7 产量的影响。结果发现,BS3FA 的 MK-7 产量达到 135.3 mg/L,与 BS3 相比提高了 17.8% (图 6A),同时过表达 FloA 对细胞生长也有一定的促进作用。BS3FT 的产量为 94.3 mg/L,与 BS3 相比降低了 18.0%,且 2 d 后,与其他菌株相比, OD_{600} 明显减小(图 6B),这可能是 BS3FT 菌株 MK-7 产量降低的主要原因。因此,选择 FloA 蛋白进行后续研究。

接下来尝试通过使用 FloA 蛋白将 MK-7 合成途径关键酶锚定在 FMMs 中,以实现 MK-7 合成途径关键酶的区室化(图 7A)。以 BS3 为出

发菌株,构建得到融合表达 FloA-Fni、FloA-IspA、FloA-HepT 和 FloA-YuxO 的重组菌株 BS3AF、BS3AI、BS3AT 和 BS3AO。分别以过表达 Fni、IspA、HepT 和 YuxO 的重组菌株 BS3F、BS3I、BS3T 和 BS3O 作为对照,验证 MK-7 合成途径关键酶区室化对 MK-7 产量的影响。结果发现,除过表达 IspA 外,重组工程菌的产量与对照相比都得到了明显提高(图 7B-7I)。其中,BS3AT 的 MK-7 产量最高,达到了 300.3 mg/L,较对照菌株提高了 73.4%。

2.3 3 L 发酵罐产量验证

重组菌株 BS3AT 通过分批培养的方式在 3 L 中发酵罐中进行进一步的发酵验证。初始葡萄糖浓度为 50 g/L,通过 50%氨水维持 pH 在 7 左右。 OD_{600} 在 2 d 后达到峰值,随着发酵时间的延长,MK-7 的增长速率随着细胞裂解而减缓,MK-7 产量在发酵 6 d 后达到了 464.2 mg/L (图 8)。

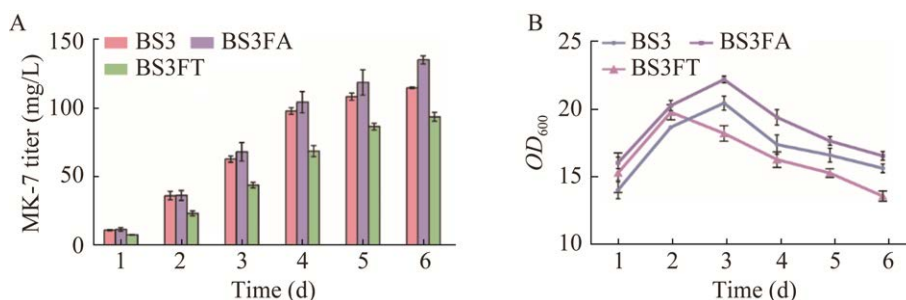


图6 过表达脚手架蛋白对 MK-7 产量的影响 A: BS3、BS3FA 和 BS3FT 的 MK-7 产量. B: BS3、BS3FA 和 BS3FT 的细胞生长情况

Figure 6 Effect of overexpression scaffold proteins on MK-7 production. A: MK-7 titer of BS3, BS3FA and BS3FT. B: OD_{600} of BS3, BS3FA and BS3FT.

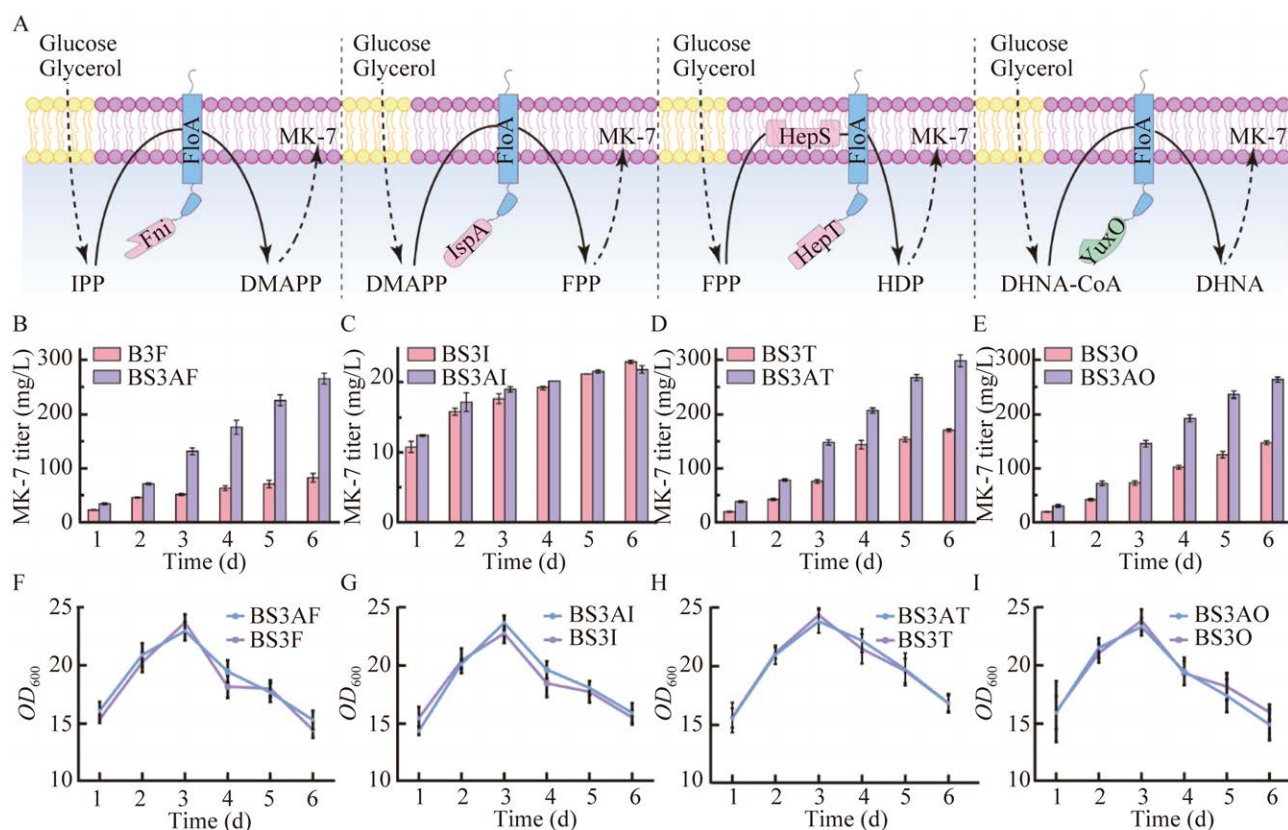


图7 MK-7合成途径的区室化 A: MK-7合成途径关键酶区室化示意图. B: BS3AF和BS3F的MK-7产量. C: BS3AI和BS3I的MK-7产量. D: BS3AT和BS3T的MK-7产量. E: BS3AO和BS3O的MK-7产量. F: BS3AF和BS3F的细胞生长情况. G: BS3AI和BS3I的细胞生长情况. H: BS3AT和BS3T的细胞生长情况. I: BS3AO和BS3O的细胞生长情况

Figure 7 Compartmentalization of MK-7 synthesis. A: Assembly of pathway enzymes *via* FloA. B: MK-7 titer of BS3AF and BS3F. C: MK-7 titer of BS3AI and BS3I. D: MK-7 titer of BS3AT and BS3T. E: MK-7 titer of BS3AO and BS3O. F: OD_{600} of BS3AF and BS3F. G: OD_{600} of BS3AI and BS3I. H: OD_{600} of BS3AT and BS3T. I: OD_{600} of BS3AO and BS3O.

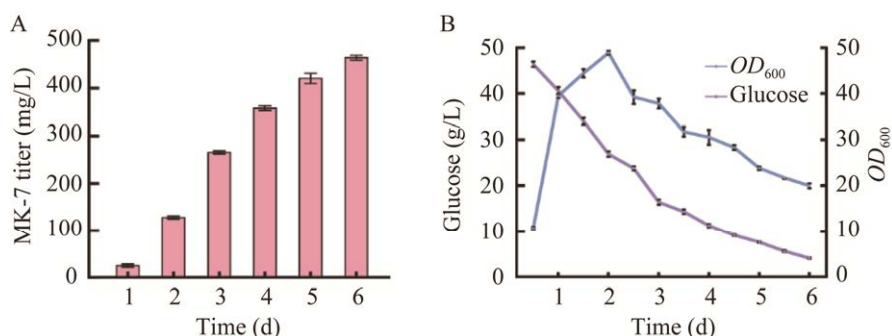


图8 BS3AT在3 L发酵罐中的发酵结果 A: BS3AT的MK-7产量. B: BS3AT中葡萄糖和 OD_{600} 的变化情况

Figure 8 Fermentation of BS3AT in a 3 L bioreactor. A: MK-7 titer of BS3AT. B: Trend of glucose and OD_{600} of BS3AT.

在 3 L 发酵罐和摇瓶中 MK-7 产量的变化整体趋势一致。该结论进一步证明了通过 FMMs 实现 MK-7 合成途径关键酶区室化的有效性。

3 讨论

MK-7 作为脂溶性维生素 K₂ 的重要亚型, 在功能食品等领域有着广泛应用。因此, 通过微生物发酵法实现 MK-7 的高效合成有着重要意义。在模式微生物枯草芽孢杆菌中, 许多研究者通过增强前体供应、阻断副产物合成等方法对 MK-7 的代谢途径进行优化, 期望实现 MK-7 的高效合成^[30-31]。相比于其他改造策略, 区室化可以使目标代谢通路的酶集中于一个区域, 缩短途径酶之间的空间距离, 加快代谢反应速率, 进而实现目标产物的高效合成^[32-34]。因此, 通过细胞膜上特殊的结构域 FMMs 实现枯草芽孢杆菌中 MK-7 合成途径的区室化可以为 MK-7 的代谢改造提供一种新的思路。

本研究首先探讨了 MK-7 和 FMMs 的相关性。通过可视化分析发现, MK-7 和 FMMs 均以不连续的点状结构分布于细胞膜上, 初步推测二者存在相关性。其次 FMMs 的完整性被破坏导致了细胞膜上 MK-7 含量和膜有序度的下降。但是在 FMMs 的完整性被破坏后, MK-7 仍可以有效提高膜有序度, 证明 MK-7 是 FMMs 聚异戊二烯类的关键组分。在此基础上, 尝试通过 FMMs 来实现 MK-7 的高效合成。

在 MK-7 合成过程中, 关键酶 MenH、HepS 和 MenB 定位于 FMMs 中, Fni、IspA、HepT 和 YuxO 游离在细胞质中, MenA 则是典型的细胞膜定位。MK-7 合成相关的关键酶在细胞中的空间位置相对较远, 这可能会导致 MK-7 的合成效率较低。因此, 接下来通过 FloA 蛋白分别融合表达关键酶 Fni、IspA、HepT 和 YuxO, 使得

关键酶定位在 FMMs 中, 缩短关键酶之间的空间距离, 实现 MK-7 合成途径相关关键酶的区室化。通过 FloA 蛋白将 MK-7 合成途径关键酶 HepT 锚定到 FMMs 后, 成功获得一株高产 MK-7 菌株 BS3AT, 在摇瓶水平 MK-7 产量达到 300.3 mg/L, 相比于对照菌株提高了 73.4%, 在 3 L 生物反应器中的产量为 464.2 mg/L。

综上所述, 基于 FMMs 的 MK-7 合成途径关键酶区室化, 有效提高了 MK-7 的产量, 为构建高效合成 MK-7 的微生物细胞工厂提供了新思路。

REFERENCES

- [1] GRÖBER U, REICHRATH J, HOLICK MF, KISTERS K. Vitamin K: an old vitamin in a new perspective[J]. *Dermato-Endocrinology*, 2014, 6(1): e968490.
- [2] BEULENS JWJ, BOOTH SL, van den HEUVEL EGHM, STOECKLIN E, BAKA A, VERMEER C. The role of menaquinones (vitamin K₂) in human health[J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(8): 1357-1368.
- [3] DALMEIJER GW, van den SCHOUW YT, MAGDELEYNS E, AHMED N, VERMEER C, BEULENS JWJ. The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 397-402.
- [4] PAINTER KL, HALL A, HA KP, EDWARDS AM. The electron transport chain sensitizes *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* to the oxidative burst[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(12): e00659-17.
- [5] YANG SM, CAO YX, SUN LM, LI CF, LIN X, CAI ZG, ZHANG GY, SONG H. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* to promote *de novo* biosynthesis of menaquinone-7[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(1): 70-81.
- [6] MEGANATHAN R. Biosynthesis of menaquinone (vitamin K₂) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms[J]. *Vitamins & Hormones*, 2001, 61: 173-218.
- [7] JOHNSTON JM, BULLOCH EM. Advances in menaquinone biosynthesis: sublocalisation and allosteric regulation[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 65: 33-41.

- [8] HIROTA Y, NAKAGAWA K, SAWADA N, OKUDA N, SUHARA Y, UCHINO Y, KIMOTO T, FUNAHASHI N, KAMAO MY, TSUGAWA N, OKANO T. Functional characterization of the vitamin K₂ biosynthetic enzyme UBIAD1[J]. *Public Library of Science*, 2015, 10(4): e0125737.
- [9] LIU Y, YANG ZM, XUE ZL, QIAN SH, WANG Z, HU LX, WANG J, ZHU H, DING XM, YU F. Influence of site-directed mutagenesis of UbiA, overexpression of *dxr*, *menA* and *ubiE*, and supplementation with precursors on menaquinone production in *Elizabethkingia meningoseptica*[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 68: 64-72.
- [10] 崔世修. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效合成七烯甲萘醌[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.
- CUI SX. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for efficient synthesis of menaquinone-7[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [11] MA YW, MCCLURE DD, SOMERVILLE MV, PROSCHOGO NW, DEGHANI F, KAVANAGH JM, COLEMAN NV. Metabolic engineering of the MEP pathway in *Bacillus subtilis* for increased biosynthesis of menaquinone-7[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(7): 1620-1630.
- [12] CUI SX, LV XQ, WU YK, LI JH, DU GC, LEDESMA-AMARO R, LIU L. 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.
- [13] FARHI M, MARHEVKA E, MASCI T, MARCOS E, EYAL Y, OVADIS M, ABELIOVICH H, VAINSTEIN A. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 474-481.
- [14] LAUDE AJ, PRIOR IA. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking[J]. *Molecular Membrane Biology*, 2004, 21(3): 193-205.
- [15] YEE DA, DENICOLA AB, BILLINGSLEY JM, CRESO JG, SUBRAHMANYAM V, TANG Y. Engineered mitochondrial production of monoterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 76-84.
- [16] SHENG JY, STEVENS J, FENG XY. Pathway compartmentalization in peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* to produce versatile medium chain fatty alcohols[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26884.
- [17] DELOACHE WC, RUSS ZN, DUEBER JE. Towards repurposing the yeast peroxisome for compartmentalizing heterologous metabolic pathways[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11152.
- [18] AVALOS JL, FINK GR, STEPHANOPOULOS G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(4): 335-341.
- [19] BRAMKAMP M, LOPEZ D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(1): 81-100.
- [20] PIKE LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(4): 655-667.
- [21] OTTO GP, NICHOLS BJ. The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(23): 3933-3940.
- [22] STUERMER CAO. Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2011, 116(5): 708-713.
- [23] LV XQ, ZHANG C, CUI SX, XU XH, WANG LL, LI JH, DU GC, CHEN J, LEDESMA-AMARO R, LIU L. Assembly of pathway enzymes by engineering functional membrane microdomain components for improved N-acetylglucosamine synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 96-105.
- [24] OWEN DM, MAGENAU A, WILLIAMSON D, GAUS K. The lipid raft hypothesis revisited-new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy[J]. *BioEssays*, 2012, 34(9): 739-747.
- [25] LANGHORST MF, REUTER A, STUERMER CAO. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005, 62(19/20): 2228-2240.
- [26] CHAZOTTE B. Labeling mitochondria with rhodamine 123[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, 2011(7): pdb.prot5640.
- [27] FENG XX, HU YM, ZHENG YY, ZHU W, LI K, HUANG CH, KO TP, REN FF, CHAN HC, NEGA M, BOGUE S, LÓPEZ D, KOLTER R, GÖTZ F, GUO RT, OLDFIELD E. Structural and functional analysis of *Bacillus subtilis* YisP reveals a role of its product in biofilm production[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(11): 1557-1563.

-
- [28] BOSAK T, LOSICK RM, PEARSON A. A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(18): 6725-6729.
- [29] DINIC J, BIVERSTÄHL H, MÄLER L, PARMRYD I. Laurdan and di-4-ANEPPDHQ do not respond to membrane-inserted peptides and are good probes for lipid packing[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2011, 1808(1): 298-306.
- [30] JIN L, LI LH, ZHANG WC, ZHANG RZ, XU Y. Heterologous expression of bovine lactoferrin C-lobe in *Bacillus subtilis* and comparison of its antibacterial activity with N-lobe[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2022, 2(2): 345-354.
- [31] WANG Q, FU WL, LU RQ, PAN CL, YI GF, ZHANG X, RAO ZM. Characterization of *Bacillus subtilis* Ab03 for efficient ammonia nitrogen removal[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2022, 2(3): 580-588.
- [32] ZHU Y, LIU JQ, PARK J, RAI P, ZHAI RG. Subcellular compartmentalization of NAD⁺ and its role in cancer: a sereneNAde of metabolic melodies[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2019, 200: 27-41.
- [33] MA T, SHI B, YE ZL, LI XW, LIU M, CHEN Y, XIA J, NIELSEN J, DENG ZX, LIU TG. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene[J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 134-142.
- [34] LV XM, WANG F, ZHOU PP, YE LD, XIE WP, XU HM, YU HW. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12851.

(本文责编 陈宏宇)