



引用格式:王光路,张帆,周忆菲,等. 枯草芽孢杆菌甘油激酶编码基因定点突变提升甘油利用水平的研究[J]. 轻工学报,2020,35(6):1-8.

中图分类号:TS201.3;Q789 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.06.001

文章编号:2096-1553(2020)06-0001-08

枯草芽孢杆菌甘油激酶编码基因定点突变提升甘油利用水平的研究

Effect of site-specific mutagenesis of glycerol kinase coding gene on the glycerol utilization of *Bacillus subtilis*

王光路¹,张帆¹,周忆菲¹,王梦园¹,赵金垒¹,李明笑²,
杨雪鹏¹,马歌丽¹

WANG Guanglu¹,ZHANG Fan¹,ZHOU Yifei¹,WANG Mengyuan¹,ZHAO Jinlei¹,
LI Mingxiao²,YANG Xuepeng¹,MA Geli¹

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 河南省口岸食品检验检测所,河南 郑州 450003

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Food Inspection and Testing Institute of He'nan Province, Zhengzhou 450003, China

关键词:

枯草芽孢杆菌;甘油激酶;定点突变;无痕等位基因置换

Key words:

Bacillus subtilis;
glycerol kinase;
site-specific mutagenesis;
markerless gene replacement system

摘要:采用无痕等位基因置换方法,将枯草芽孢杆菌基因组上的甘油激酶编码基因 *glpK* 第 270 位氨基酸残基 M 突变为 I,构建了突变菌株枯草芽孢杆菌 M270I,并分析了该突变菌株的生长特性.结果表明:对甘油激酶编码基因 *glpK* 进行定点突变可有效提升枯草芽孢杆菌对甘油的利用水平,与出发菌株枯草芽孢杆菌 168 Δ_{upp} 相比,突变菌株枯草芽孢杆菌 M270I 在 M9 甘油基本盐液体培养基中的比生长速率提升了 11%,延滞期缩短了 2~4 h,最大菌体生物量提升了 16%.

收稿日期:2020-06-06

基金项目:国家自然科学基金联合基金项目(U1904101);河南省科技攻关重点研发与推广专项项目(202102310021,182102310607)

作者简介:王光路(1986—),男,山东省枣庄市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为代谢工程和合成生物学.

Abstract: By employing a site-specific mutagenesis strategy for glycerol kinase (encoding by *glpK*), the active-site residue Met270 was replaced with Ile in the *Bacillus subtilis* genome. A mutant strain *Bacillus subtilis* M270I was constructed successfully by using the markerless gene replacement system. The results of growth analysis indicated that the mutant strain got a higher level of glycerol utilization. Compared with the control strain *Bacillus subtilis* 168 Δ_{upp} , the mutant strain exhibited higher specific growth rate (increased by 11%) and higher biomass yield (improved by 16%) with a shorten lag phase (shorten 2 ~ 4 h) in the M9 glycerol minimal medium.

0 引言

甘油分子具有较高的碳含量和还原力,可作为转化底物获得更高得率的还原性化合物^[1]. 作为一种廉价碳源,甘油已被广泛应用于微生物发酵工业以合成高附加值的化学品,包括各种醇类(1,3-丙二醇、丁醇、琥珀酸等)、有机酸类化合物等^[2-3].

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种生物安全模式菌株,被广泛用作工业发酵宿主菌株. 目前,研究者对枯草芽孢杆菌的生理生化特性、遗传背景等已有深入的了解,其相关分子生物学方法和基因操作技术也都较为成熟^[4-5].

枯草芽孢杆菌能够以甘油作为唯一碳源,对甘油的利用主要为好氧利用途径^[6-7]. 枯草芽孢杆菌的甘油分解代谢过程为:胞外甘油在甘油运输协助蛋白(*glpF* 编码基因)的帮助下,通过协助扩散的方式进入胞内,经过甘油激酶(*glpK* 编码基因)的 ATP 磷酸化作用转化为甘油-3-磷酸,并进一步在甘油-3-磷酸脱氢酶(*glpD* 编码基因)的催化作用下生成二羟丙酮磷酸进入糖酵解途径,最终被分解代谢^[8].

然而,枯草芽孢杆菌利用甘油时严谨的调控机制使其对甘油的利用水平较低^[9],同时,*glpF*、*glpK*、*glpD* 等编码基因的表达受 DNA 水平和 RNA 水平复杂而严谨的调控限制,因此,如何提高枯草芽孢杆菌甘油代谢途径中重要酶的酶活力成为解决问题的关键^[10-11]. 甘油激酶是枯草芽孢杆菌甘油分解代谢途径中的限速酶,可限制甘油的分解代谢效率,降低对甘油的

利用水平^[12].

目前尚无提升枯草芽孢杆菌甘油利用水平的相关报道,因此,本文拟采用笔者前期开发的无痕等位基因置换方法^[13],首先对枯草芽孢杆菌进行无痕基因组修饰,然后对枯草芽孢杆菌基因组上的甘油激酶编码基因 *glpK* 进行定点突变,以提升甘油激酶的酶活力,进而提升枯草芽孢杆菌对甘油的利用水平,以期微生物发酵工业利用甘油合成高附加值的化学品提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 主要材料 枯草芽孢杆菌 168 Δ_{upp} (*Bacillus subtilis* 168 Δ_{upp})、大肠杆菌 Dh5 α 感受态细胞和质粒 pSS,均由郑州轻工业大学食品与生物工程学院实验室贮藏.

1.1.2 主要试剂 酵母提取物、蛋白胨,北京兰伯瑞生物科技有限公司产;快速限制性内切酶 Fast Digest™ *Bgl*II、*Xho*I、*Sal*I、*Kpn*I,美国 Thermo Scientific 有限公司产;硫酸卡那霉素、氯霉素、Taq DNA 聚合酶、谷氨酰胺、色氨酸、五氟尿嘧啶(5-FU)、KOD-plus 高保真 DNA 聚合酶、细菌 DNA 提取试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、维生素 B₁,上海生工生物工程有限公司产;琼脂粉,索莱宝生物科技有限公司产;无水葡萄糖,天津市大茂化学试剂厂产;其他用于配制培养基和理性参数测定的试剂均为国产分析级.

1.1.3 培养基 LB 液体培养基:10 g/L 蛋白胨,5 g/L 酵母提取物,10 g/L NaCl,调节 pH 值至 7.5,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min.

LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入 20 g/L 琼脂粉,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min.

M9 甘油基本盐液体培养基:将 12.8 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.0 g KH_2PO_4 、0.5 g NaCl 和 1.0 g NH_4Cl 溶解于 200 mL 蒸馏水中,配制 $5 \times \text{M9}$ 盐溶液,于 0.1 MPa 压力下灭菌 15 min,备用.在 1000 mL 无菌量杯中,依次加入已灭菌的 $5 \times \text{M9}$ 盐溶液 200 mL、浓度为 1 mol/L 的 MgSO_4 溶液 2 mL、体积分数为 20% 的甘油溶液 20 mL 和浓度为 1 mol/L 的 CaCl_2 溶液 0.1 mL,再加入灭菌双蒸水,定容至 1000 mL,即得 M9 甘油基本盐液体培养基.对于该基本盐液体培养基,每 100 mL 培养基中还需加入 1 mL 质量分数为 0.5% 的已过滤除菌的色氨酸溶液,以满足枯草芽孢杆菌工程菌株的生长需求.

5-FU 负筛选培养基的配方见表 1.

表 1 5-FU 负筛选培养基配方表

Table 1 5-FU negative selection medium preparation table

成分	体积/mL
质量分数为 40% 的葡萄糖溶液	2.00
1000 \times 微量元素	0.10
质量分数为 0.5% 的色氨酸溶液	1.00
质量分数为 4% 的谷氨酰胺溶液	5.00
10 \times Spizzen 基本盐	10.00
质量分数为 0.1% 的维生素 B1 溶液	0.10
浓度为 20 mmol/L 的 5-FU 溶液	0.05
质量分数为 1.5% 的琼脂溶液	81.75
总体积	100

1000 \times 微量元素:27.0 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.9 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L H_3BO_3 , pH 值为 7.2,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min.

10 \times Spizzen 基本盐:2.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 18.3 g/L K_2HPO_4 , 6.0 g/L KH_2PO_4 , 12.0 g/L $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 值为 7.2,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min.

5-FU 溶液:用二甲基亚砜(DMSO)溶解后,过滤除菌.

1.2 主要设备与仪器

HH.S11-2 型数显恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂产;DGG-9140 型电热恒温鼓风干燥机,上海森信实验仪器有限公司产;QWY-200S 型三层组合式全温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司产;YP20001 型电子天平、CP214 型分析天平,上海奥豪斯仪器有限公司产;SensoQuest labcycler 系列快速梯度 PCR 仪,德国 SensoQuest 公司产;UV-1800 型紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司产;EF2 型 Syngene G:BOX 凝胶成像系统,上海启步生物技术有限公司产.

1.3 实验方法

1.3.1 大肠杆菌 Dh5 α 感受态细胞的 CaCl_2 转化和质粒提取 取适量体积的质粒 pSS 置于 1.5 mL 无菌离心管中,再加入 200 μL 大肠杆菌 Dh5 α 感受态细胞,轻弹管壁混匀,冰浴 30 min,42 $^\circ\text{C}$ 热激 90 s,冰浴 3 min,加入 2 倍体积的 LB 液体培养基(提前预热到 37 $^\circ\text{C}$)至离心管中,于 37 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养 45~60 min.无菌环境下,量取约 150 μL 培养好的菌悬液,均匀涂布到含有相应抗生素的 LB 固体培养基平板上,于 37 $^\circ\text{C}$ 条件下恒温培养 12 h.

采用质粒 DNA 小量抽提试剂盒对质粒进行提取:量取 3 μL 质粒,加入 1 μL Loading buffer,于 120 V 条件下,琼脂糖(质量分数为 1.5%)凝胶电泳 25~30 min.

1.3.2 甘油激酶的定点突变 无痕等位基因置换方法为笔者前期开发的一套基因组编辑方法^[13],其中出发菌株枯草芽孢杆菌 168 Δupp 来

源于枯草芽孢杆菌 168, 基础操作质粒 pSS 来源于质粒 pUC18. 实验步骤如下:

1) 采用 Spizizen 转化法^[5], 将正确构建的定点突变载体导入枯草芽孢杆菌 168 Δupp 中, 用含有氯霉素的 LB 固体培养基筛选重组成功的阳性克隆, 并用菌落 PCR 进行验证;

2) 将阳性克隆菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 条件下振荡培养 6 h (OD_{600} 约为 2), 继而于 5-FU 负筛选培养基上划线;

3) 挑选单菌落, 使用引物 M270I-F-F、M270I-B-B 进行菌落 PCR, 筛选甘油激酶突变菌株;

4) 通过基因测序进一步确定甘油激酶突变菌株是否构建成功, 并将构建成功的突变菌株命名为枯草芽孢杆菌 M270I.

1.3.3 菌株生长曲线的测定 将突变菌株枯草芽孢杆菌 M270I 和出发菌株枯草芽孢杆菌 168 Δupp 进行活化, 分别挑取生长状况良好的单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基试管内, 于 37 °C、240 r/min 条件下培养至菌体对数生长期中期. 取适量的菌体培养液, 于 4 °C、6000 r/min 条件下离心 1 min, 弃上清液, 采用质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液洗涤菌体, 并重复该操作一次. 初始 OD_{600} 约为 0.02, 取适量洗涤后的菌液至 50 mL M9 甘油基本盐液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 条件下进行菌体培养, 并测定菌株生长曲线.

2 结果与分析

2.1 甘油激酶突变引物的设计结果

以文献[10]报道的大肠杆菌甘油激酶突变体为目标, 将枯草芽孢杆菌甘油激酶 *glpK* 编码氨基酸序列上传至 Swiss-model 服务器, 从 Templates 中查找到的相似甘油激酶^[14] 汇总如下: 1) *Staphylococcus aureus* 3GE1; 2) *Enterococ-*

cus casseliflavus glycerol kinase 1R59; 3) *Escherichia coli* 1BOT; 4) *hyperthermophilic archaeon* 2ZF5; 5) *Cellulomonas* sp. NT3060 2D4W; 6) *Thermus thermophilus* HB8 2DPN. 利用 EScript 服务器 (<http://escript.ibcp.fr/EScript/EScript/>) 对上述氨基酸序列进行多序列比对^[15], 同时引入大肠杆菌甘油激酶的 *glpK* 编码基因晶体解析结构数据 1BOT^[16], 获得的比对结果(节选部分)如图 1 所示. 其中, 红色框包含的氨基酸残基是指完全一致的序列, 蓝色框包含的氨基酸残基是指该部分氨基酸残基为保守替代. 由图 1 可以看出, 枯草芽孢杆菌甘油激酶的 *glpK* 编码氨基酸和其他已解析结构的 *glpK* 编码氨基酸在二级结构上具有很高的相似性, 表明它们均具有保守的亚基拓扑结构和活性位点区域.

选择文献[8]报道的突变点 G816A 作为设计对象, 将其对应氨基酸突变为 M272I. 该突变对应图 1 中 1BOT 第 271 位氨基酸位点 M (1BOT 的氨基酸序列是从第 2 位开始, 因此此处是 271 位), 而与枯草芽孢杆菌的甘油激酶 *glpK* 对应的是第 270 位氨基酸位点 M, 即枯草芽孢杆菌甘油激酶多肽链 TGCFML 中的 M. 若将其定点突变为氨基酸残基 I, 则可能出现同样的突变效果. 参照枯草芽孢杆菌 168 的密码子偏好性 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), I 共有 3 个密码子, 分别为 AUU、AUC 和 AUA, 其中 AUU 为常用密码子, 因此选择将第 810 位氨基酸位点 G 定点突变为 T, 即将 ATG 突变为 ATT.

根据无痕等位基因置换方法, 使用 Oligo 7 软件设计引物, 并由上海生工生物工程有限公司合成. 其中, 选择上游同源区酶切位点为 *BglII/XhoI*, 下游同源区酶切位点为 *SalI/KpnI*:

M270I-F-F AGCC agatct CAAGTTCAAG-AGCGATTCTGT(*BglII*);

M270I-F-B ATCC ctcgag TCCCCGGTAT-

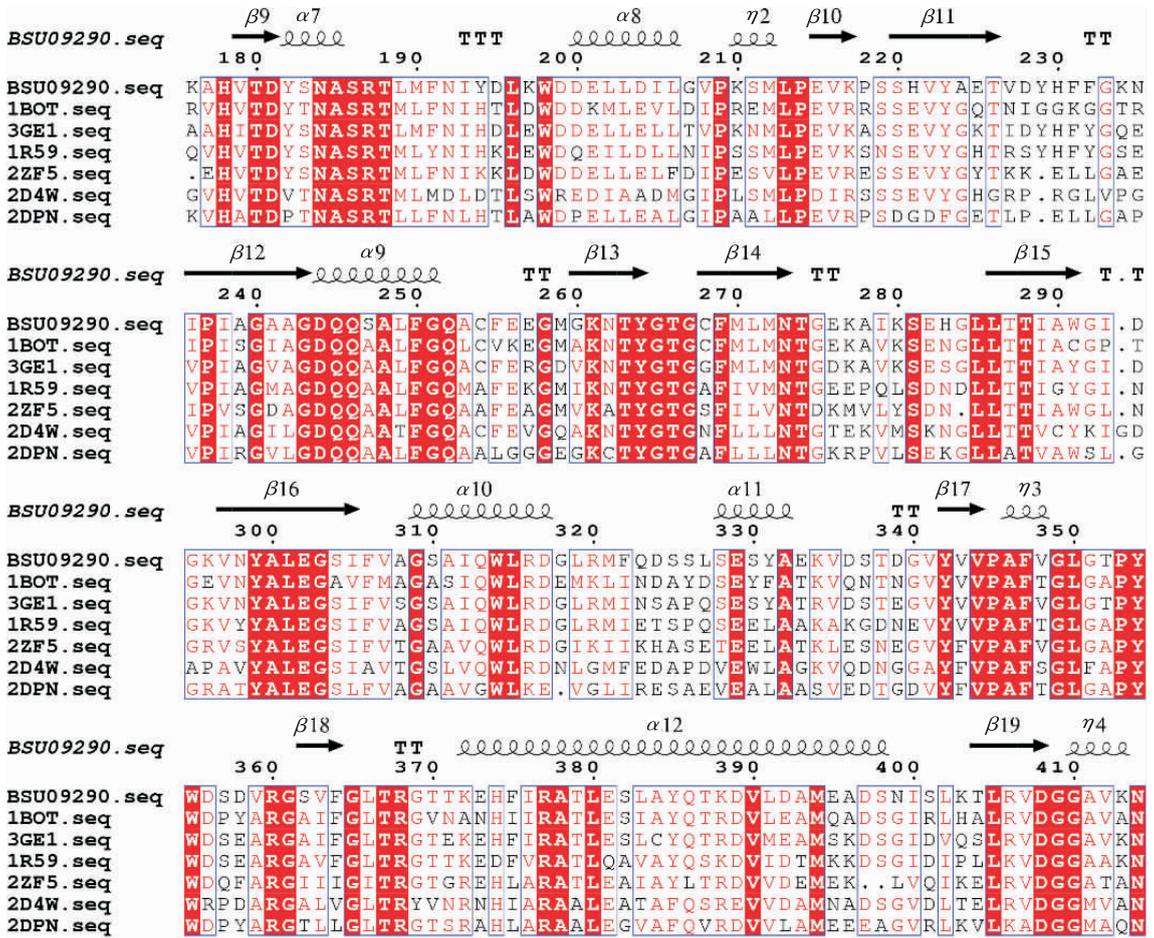


图 1 枯草芽孢杆菌甘油激酶 *glpK* 与 Templates 中相似甘油激酶氨基酸序列比对结果(节选部分)

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of *glpK* of *Bacillus subtilis* with other similar glycerol kinase from Templates in Swiss-model server(excerpts)

TCATCAGAATGAAACATCCTGTGCC(*XhoI*);

M270I-B-F AAGG gtcgac GGCACAGGAT-GTTTCATTCTGATGAATACCGGGA (*SalI*);

M270I-B-B GTTA ggtacc GTTTCCTCCT-TGTTGTCACG(*KpnI*).

2.2 定点突变载体质粒的构建结果

采用细菌 DNA 提取试剂盒提取枯草芽孢杆菌 168 的基因组,利用 M270I-F-F、M270I-F-B 为引物,枯草芽孢杆菌 168 基因组为模版,使用 KOD-plus 高保真 DNA 聚合酶扩增得到大小为 789 bp 的上游同源臂 M270I-F;利用 M270I-B-F、M270I-B-B 为引物,枯草芽孢杆菌 168 基因组为模版,使用 KOD-plus 高保真 DNA 聚合酶扩

增得到大小为 836 bp 的下游同源臂 M270I-B. 将 M270I-F 的 PCR 片段切胶回收后,使用快速限制性内切酶 *BglII* 和 *XhoI* 进行双酶切,连接、转化质粒 pSS 后得到质粒 pSS-M270I-F;再将 M270I-B 的 PCR 片段切胶回收后,使用快速限制性内切酶 *SalI* 和 *KpnI* 进行双酶切,连接、转化质粒 pSS-M270I-F 后得到质粒 pSS-M270I-FB. 提取 4 个质粒进行酶切验证,结果如图 2 所示. 泳道 1—4 分别为质粒 1[#]—4[#] 的 *BglII* 和 *XhoI* 双酶切,泳道 5—8 分别为质粒 1[#]—4[#] 的 *SalI* 和 *KpnI* 双酶切. 泳道 1 和 5 为 1[#] 质粒酶切结果,泳道 2 和 6 为 2[#] 质粒酶切结果,泳道 3 和 7 为 3[#] 质粒酶切结果,泳道 4 和 8 为 4[#] 质粒酶

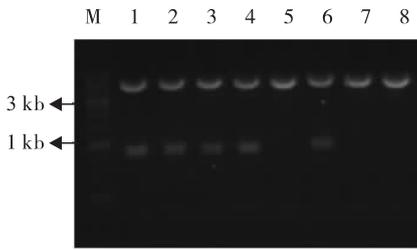


图2 质粒 pSS-M270I-FB 的电泳图

Fig.2 Digestion verification of plasmid pSS-M270I-FB

切结果.

由图2可以看出,构建成功的定点突变载体能同时被 *Bgl*II/*Xho*I 双酶切和 *Sal*I/*Kpn*I 双酶切. 其中 2[#]质粒 *Bgl*II/*Xho*I 双酶切和 *Sal*I/*Kpn*I 双酶切均有目的条带,这表明定点突变载体质粒 pSS-M270I-FB 构建成功.

2.3 突变菌株的构建结果

采用 Spizizen 转化方法,将 2[#]质粒 pSS-M270I-FB 的双交换基因重组整合至枯草芽孢杆菌 168 Δ *upp* 中,在含有氯霉素的 LB 固体培养基平板上培养阳性克隆菌株,待菌落长出后进行菌落 PCR 验证,其中,阴性对照模板是枯草芽孢杆菌 168 Δ *upp* 基因组,阳性对照模板是基因测序正确的 2[#]质粒 pSS-M270I-FB 基因组. 抗性筛选菌落 PCR 结果如图3所示,其中,泳道1—8为抗性筛选的8个阳性克隆菌株,泳道9为阴性对照模板,泳道10为阳性对照模板.

由图3可以看出,泳道1—8在4 kb左右均有明显的条带,而预期的 PCR 扩增大小为 3779 bp,且和阳性对照模板一致,表明突变质粒 pSS-M270I-FB 已成功转化至枯草芽孢杆菌 168 Δ *upp* 的基因组,且泳道1—8所对应的突变菌株均为构建成功的目标菌株.

选择 1[#]突变菌株在含有氯霉素的 LB 固体培养基平板上划线,再通过 5-FU 负筛选培养基筛选出定点突变成功的阳性克隆菌株. 对 5-FU 负筛选出的菌株进行菌落 PCR 验证,阳性对照

模板是枯草芽孢杆菌 168 Δ *upp* 基因组,阴性对照模板是 2[#]质粒 pSS-M270I-FB 基因组. 5-FU 负筛选菌落 PCR 结果如图4所示,其中,泳道1为阴性对照模板,泳道2为阳性对照模板,泳道3—8分别为 5-FU 负筛选培养基平板上长出的 2[#]、3[#]、10[#]、28[#]、39[#]和 45[#]阳性克隆菌株菌落.

由图4可以看出,泳道4、6、7和8均与阳性对照模板相同,条带大小约为 1.5 kb,而预期目的条带的大小为 1591 bp,所以这4条泳道对应菌株均为阳性菌株. 通过基因测序发现,45[#]菌株包含目的基因突变,将该构建成功的突变菌株命名为枯草芽孢杆菌 M270I.

2.4 突变菌株生长特性分析

生长特性一般可以通过最大比生长速率的大小、延滞期的长短、最大菌体生物量的大小进行表征. 将突变菌株枯草芽孢杆菌 M270I 和出

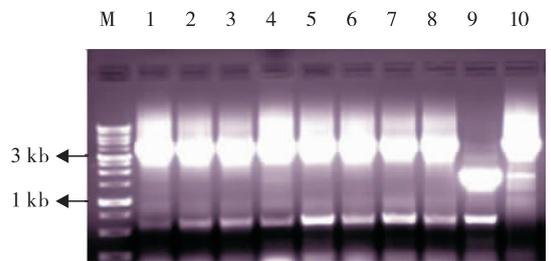


图3 抗性筛选菌落 PCR 电泳图

Fig.3 Screening of positive transformed clones by colony PCR

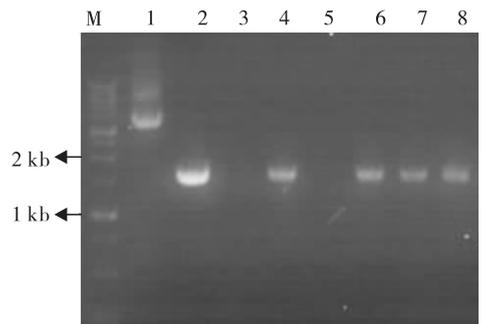


图4 5-FU 负筛选菌落 PCR 电泳图

Fig.4 Screening of negative clones in 5-FU medium by colony PCR

发菌株枯草芽孢杆菌 168 Δupp 分别在以甘油作为唯一碳源的 M9 甘油基本盐液体培养基中进行培养,突变前后菌株的生长情况如图 5 所示.

由图 5 可以看出,相较于出发菌株枯草芽孢杆菌 168 Δupp ,甘油激酶突变使菌株枯草芽孢杆菌 M270I 在 M9 甘油基本盐液体培养基上的比生长速率提升了 11% (M270I 比生长速率为 0.358),延滞期缩短了 2~4 h,最大菌体生物量提升了 16%,这表明甘油激酶定点突变可以有效提升枯草芽孢杆菌对甘油的利用水平.

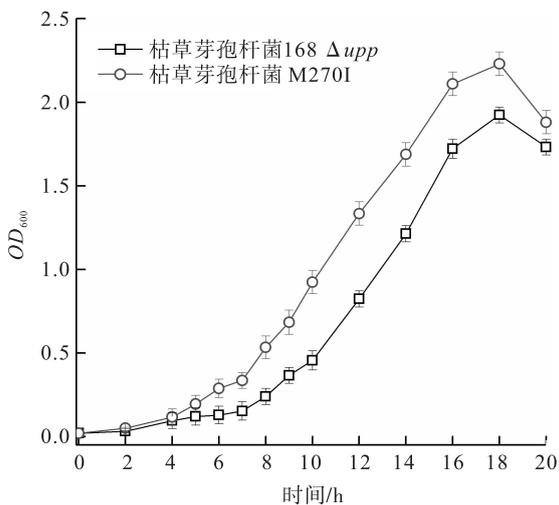


图 5 突变前后菌株的生长情况对比

Fig. 5 Comparison of the growth of mutant with that of original strain

3 结论

本文采用无痕等位基因置换方法,将枯草芽孢杆菌基因组上的甘油激酶编码基因 *glpK* 第 270 位氨基酸残基 M 突变为 I,成功构建了突变工程菌株枯草芽孢杆菌 M270I. 相较于出发菌株枯草芽孢杆菌 168 Δupp ,甘油激酶编码基因 *glpK* 定点突变 (M270I) 使枯草芽孢杆菌在 M9 甘油基本盐培养基上的比生长速率提高了 11%,延滞期缩短了 2~4 h,最大菌体生物

量提升了 16%. 本研究可以有效提升枯草芽孢杆菌的甘油代谢能力,同时,突变菌株枯草芽孢杆菌 M270I 可作为利用甘油的宿主菌株,用于合成高附加值的化学品.

参考文献:

- [1] CHOI W J. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals [J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2008, 2(3): 173.
- [2] ALMEIDA J R M, QUIRINO B F, FÁVARO L C L, et al. Biodiesel biorefinery: Opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 48.
- [3] GERVÁSIO P D S, MACK M, CONTIERO J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(1): 30.
- [4] CÉLINE F, EHRlich S D, NOIROT P. A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 46(1): 25.
- [5] ANAGNOSTOPOULOS C A, SPIZIZEN J. Requirements for transformation in *Bacillus Subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1961, 81(5): 741.
- [6] 刘小红. 甘油合成关键酶基因的克隆表达及其应用 [D]. 汉中: 陕西理工学院, 2014.
- [7] SOUSA M D, DANTAS I T, FELIX A K N, et al. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2014, 57(2): 295.
- [8] KARLA M, RAMÓN D A, GEORGINA H, et al. Coultivation of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an

- Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system [J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7(1):1.
- [9] EMMANUELLE D, PASCALE S, SANDRINE P, et al. Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(4):1039.
- [10] HERRING C D, RAGHUNATHAN A, HONISCH C, et al. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(12):1406.
- [11] 胡海艳, 甘祥武, 黄秀敏, 等. 基于易错 PCR 的 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化研究 [J]. *轻工学报*, 2020, 35(4):8.
- [12] 付月灵, 刘峙, 张文蔚, 等. 植物病原细菌 III 型效应子的双向作用 [J]. *中国生物防治*, 2010 (S1):95.
- [13] SHI T, WANG G, WANG Z, et al. Establishment of a markerless mutation delivery system in *Bacillus subtilis* stimulated by a double-strand break in the chromosome [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11):e81370.
- [14] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2):195.
- [15] ROBERT X, GOUET P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1):W320.
- [16] ORMÖ M, BYSTROM C E, REMINGTON S J. Crystal structure of a complex of *Escherichia coli* glycerol kinase and an allosteric effector fructose 1,6-bisphosphate [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(47):16565.