

调控乙酰 CoA 合成酶表达促进乙酸利用及 GlcNAc 合成

马文龙^{1,2}, 刘延峰^{1,2}, 吕雪芹^{1,2}, 李江华^{1,2}, 刘 龙^{1,2}, 堵国成^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 是一种重要的功能单糖。在利用枯草芽孢杆菌发酵生产 GlcNAc 的过程中, 乙酸的积累严重抑制了细胞生长和 GlcNAc 合成。为了获得高效利用乙酸生产 GlcNAc 的微生物细胞工厂, 作者通过突变乙酰 CoA (Ac-CoA) 合成酶编码基因 *acsA* 5'UTR 区域内全局转录调控因子 CodY 结合序列, 调控 *acsA* 转录水平, 进一步突变 *AcsA* 乙酰化调控位点, 解除乙酰化修饰, 促进乙酸转化为 Ac-CoA, 最终乙酸积累量由 6.3 g/L 减少到 3.6 g/L, 同时细胞干重 (DCW) 由 2.7 g/L 增加到 5.3 g/L, GlcNAc 产量由 1.9 g/L 提高到 5.0 g/L, 为进一步获得高产 GlcNAc 细胞工厂提供了基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 乙酸; 乙酰辅酶 A 合成酶; N-乙酰氨基葡萄糖

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2020)05-0016-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.003

Modulation of Acetyl-CoA Synthetase Expression Promoted Acetate Utilization and N-Acetylglucosamine Production in *Bacillus subtilis*

MA Wenlong^{1,2}, LIU Yanfeng^{1,2}, LYU Xueqin^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, LIU Long^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) is an important functional monosaccharide. In the production of GlcNAc using recombinant *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), accumulation of acetate inhibits cell growth and GlcNAc production, which also decreases GlcNAc yield. To construct a *B. subtilis* cell factory with efficient acetate utilization and GlcNAc production, expression of acetyl-CoA synthetase *AcsA*, which catalyzes the conversion of acetate to Ac-CoA, was modulated in this study. Specifically, the global transcriptional regulator CodY binding sites in the 5' UTR region of *acsA* were mutated to promote transcription of *acsA*; then, enzyme *AcsA* was modified by deacetylation to improve its activity. Finally, the accumulated acetate during shake flask fermentation reduced from 6.3 to 3.6 g/L, dry cell weight increased from 2.7 to 5.3 g/L, and the GlcNAc yield was increased by 163% up to 5.0 g/L, which indicated that the developed strain offers improved

收稿日期: 2018-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31622001, 31671845, 21676119, 31600068); 江苏省自然科学基金项目(BK20160176)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化与控制、酶工程与技术和微生物代谢工程改造方面的研究。E-mail: gedu@jiangnan.edu.cn

properties for GlcNAc production.

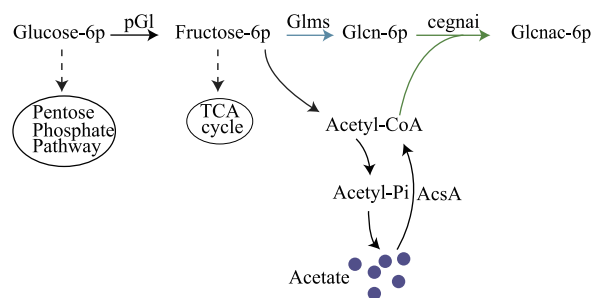
Keywords: *Bacillus subtilis*, acetate, acetyl-CoA synthetase, GlcNAc

N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetyl-glucosamine, GlcNAc), 又称为 2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖, 是一种具有生物活性的氨基单糖。GlcNAc 及其衍生物 (氨基葡萄糖, N-乙酰-D-神经氨酸和 1,6-脱水 N-乙酰胞壁酸) 在药品和保健品领域有着广泛的应用, 比如因其具有消炎和抗肿瘤的作用, 与硫酸软骨素组合使用替代塞来昔布治疗关节炎, 可以避免塞来昔布的副作用; 作为膳食补充剂, 可以增强人的免疫力^[1-3]。另外, 研究表明 GlcNAc 作为药物辅料, 由于其溶解性好, 安全性高, 无副作用, 可以作为化学交换饱和转移磁共振成像对比剂应用于肿瘤诊断^[4-5]。而且, 利用氨基葡萄糖将金纳米颗粒-石墨烯氧化物官能化后, 可以降低非特异性毒性, 提高抗菌活性, 将其作为一种有效的抗菌剂, 在制造医疗器械和废水处理中具有良好的应用潜力^[6-7]。

在之前的研究中, 我们通过阻断重组枯草芽孢杆菌中心碳代谢副产物乙偶姻溢流, 得到 GlcNAc 高产菌株 BSGN10, 其在 3 L 发酵罐中恒 pH 补料分批发酵, GlcNAc 产量可达 48.9 g/L^[8]。然而在摇瓶发酵中, 由于乙酸的积累, 抑制了细胞生长和 GlcNAc 合成, 限制了后续菌株改造。解决乙酸溢流的方法有许多, 如强化内源乙酰 CoA 合成酶 (编码基因 *acsA*) 或异源琥珀酰-CoA-乙酸 CoA 转移酶 (编码基因 *aarC*) 表达, 增强细胞同化乙酸的能力, 将乙酸转化为乙酰-CoA, 为 GlcNAc 合成提供乙酰基供体; 虽然该方法可以减弱乙酸毒性, 但由于琥珀酰-CoA 在反应中转化为琥珀酸, 琥珀酸 (pKa=4.21) 与乙酸 (pKa=4.75) 具有相近的解离常数, 琥珀酸的积累也会产生毒性^[9-10]; 而且该方法可能会形成乙酸—乙酰-CoA—乙酸之间的无效循环, 从整体经济性考虑, 这不是解决乙酸溢流的较优策略。也可以异源表达异柠檬酸裂解酶 (编码基因 *aceB*) 和苹果酸合酶 (编码基因 *aceA*) 构建乙醛酸循环体, 减少乙酸生成, 但乙醛酸循环体与 GlcNAc 合成途径竞争前体 AcCoA, 不利于 GlcNAc 合成^[11]。由于乙酸可以经乙酰辅酶 A (Ac-CoA) 合成酶 *AcsA* 催化生成 Ac-CoA, 为 GlcNAc 的合成提供前体, 所以为了促进 GlcNAc 的合成和乙酸的利用, 作者对 *AcsA* 的表达

进行了调控, 见图 1。

已有研究表明, 全局转录调控因子 CodY 通过结合到 *acsA* 5'UTR 区域阻碍转录, 抑制酶 *AcsA* 的表达^[12-17]; 而且 *AcsA* 翻译后在 K549 位点受乙酰化修饰而失活^[18-19]。为了提高酶 *AcsA* 的表达量和活性, 作者首先对 CodY 结合位点进行了突变, 以解除全局转录调控因子 CodY 对 *acsA* 转录的抑制; 在此基础上, 对 *AcsA*549 位的 Lys 进行定点饱和突变, 解除乙酰化修饰。通过以上改造, 使得 *acsA* 的转录水平提高了 43%, *AcsA* 胞内比酶活提高到 66.7 mU/mg。最终在摇瓶发酵中乙酸积累量降低至 3.6 g/L, 相比出发菌株降低了 43%; 同时 GlcNAc 产量提高到 5.0 g/L, 相比出发菌株提高了 163%。该研究思路与方法为解决枯草芽孢杆菌乙酸溢流提供了借鉴, 为进一步提高 GlcNAc 产量奠定了基础。



GlcN-6P: 氨基葡萄糖-6 磷酸; GlcNAc-6P: 乙酰氨基葡萄糖-6 磷酸; PGI: 葡萄糖-6 磷酸异构酶; GlmS: 谷氨酰胺-果糖-6 磷酸转氨酶; CegNA1: 来自秀丽隐杆线虫的氨基葡萄糖-6 磷酸乙酰基转移酶。

图 1 重组枯草芽孢杆菌中 GlcNAc 合成途径及乙酸代谢途径
Fig. 1 Synthetic pathway of GlcNAc and metabolism pathway of acetate in *Bacillus subtilis*

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 本研究所用的菌株和质粒详见表 1。

1.1.2 主要试剂 Prime STAR (max) DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶以及定量 PCR 试剂盒: 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶

表 1 本文所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

名称	特征	参考文献
菌种		
BSGN10	<i>B. subtilis</i> 168 derivate, $\Delta nagP\Delta gamP\Delta gamA\Delta nagA\Delta nagB\Delta ldh\Delta pta\Delta alsRSD::lox72$	[8]
BSGN10-CodY6	BSGN10 derivate, A10-A11 mutation of CodY binding site in <i>acsA</i> 5' UTR region	本研究
质粒		
p7Z6	pMD18-T containing <i>lox71-zeo-lox66</i> cassette	[20]
pTSC	Em ^r Amp ^r ; temperature sensitive in <i>B. subtilis</i>	[20]
pP43-CeGNA1	Amp ^r , Km ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector; pP43NMK derivate with GNA1 cloned	[8]
pcreK	p7Z6 derivate, constructed for mutation of CodY binding site and saturation mutation of <i>AcsA</i> ^{K549}	This work

EcoR I 和 DpnI: 购自 Thermo 公司; 酵母粉和蛋白胨: 购自 Oxoid 公司; 其他常规试剂: 均为国产分析纯; 引物合成及测序: 均由上海生工有限公司完成。实验中, 博来霉素、卡那霉素和氨苄青霉素的添加质量浓度分别为 25、25、100 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.3 培养基 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10; pH 7.4。

发酵培养基(g/L): 酵母粉 12, 蛋白胨 6, 硫酸铵 6, 葡萄糖 60, 磷酸氢二钾 15, 硫酸镁 3, 七水硫酸亚铁 0.06, 无水氯化钙 0.06。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 pcreK 的构建 pcreK 构建过程见图 2。首先以枯草芽孢杆菌 168 的基因组 DNA 为模板, 以 pcrek-L-F 和 pcrek-L-R 为引物, 扩增得到 creK-L; 再将质粒 p7Z6 用限制性快切酶 *EcoR* I 线性化; 然后以胶回收后的 creK-L 为大引物, 以 *EcoR* I 线性化的质粒 p7Z6 为模板扩增, 将 PCR 产物直接转化 *E. coli* JM109, 次日用引物 pcrek-L-F/pcrek-L-R 进行菌落 PCR 验证, 并挑取条带大小约 2 000 bp 的克隆子测序确认^[21]。其次, 以枯草芽孢杆菌 168 的基因组 DNA 为模板, 以 pcrek-R-F 和 pcrek-R-R 为引物, 扩增得到 creK-R; 然后以胶回收后的 creK-R 为大引物, 直接扩增上述得到的阳性克隆子, PCR 产物经 DpnI 消化后转化 *E. coli* JM109, 次日用引物 pcrek-R-F/pcrek-R-R 进行菌落 PCR 验证, 并挑取条带大小约 850 bp 的克隆子测序确认, 得到质粒 pcreK。所用引物序列见表 2。

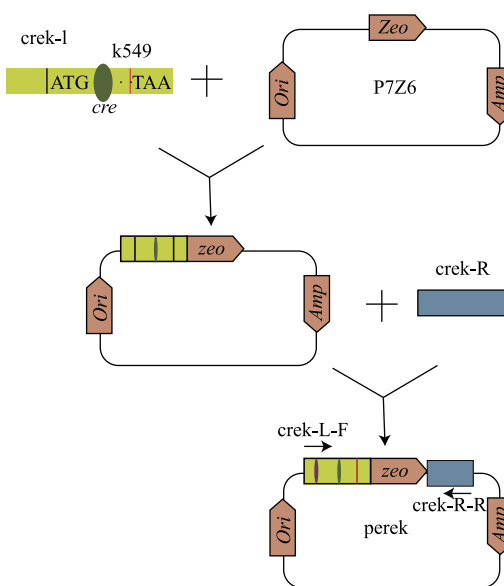


图 2 pcreK 质粒的构建

Fig. 2 Construction of plasmid pcreK

1.2.2 *acsA* 5'UTR 区域内 CodY 结合位点的突变 首先, 在质粒上对 CodY 结合位点进行相应突变。以质粒 pcreK 为模板, 选取适当引物, 按照 Quik Change Site-directed Mutagenesis kit 进行定点突变。然后, 挑取测序正确的阳性克隆子, 以引物对 CreK-L-F/CreK-L-R 扩增后柱回收 PCR 产物, 转化 BSGN10, 对基因组上相应位点进行突变。

1.2.3 *AcsA* K549 饱和突变 *AcsA* K549 饱和突变采用兼并引物的方式进行。首先, 以 pcreK 为模板, 以 K549-F/K549-R 为引物, 在质粒上对 *AcsA*K549 进行饱和突变。然后, 挑取测序正确的阳性克隆子,

表 2 本文所用的引物及序列
Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5' - 3')
pcrek-L-F	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCGGTTAAATCTTTATGAAACTCATAACCTG
pcrek-L-R	AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCTTAATCCTCCATTGTTGACAGATCTCCAG
pcrek-R-F	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCAAGGCGCGCTTGACACAGGAT
pcrek-R-R	GCCAGGGTTTTCCCACTCAGCAGCGGATTCAATTCTTGAGCTGACCGTATC
CreK-L-F	GCGGTTAAATCTTTATGAAACTCATAACCTGC
CreK-R-R	GGATTCAATTCTTGAGCTGACCGTATC
CodY1-F	CATGGTTTATATATTAAAAATTGAGAAGAATATG
CodY1-R	CATATTCTTCTCAATTTTAAATATATAAACCATG
CodY2-F	CATGGTTTATAAAATTAAAAATTGAGAAGAATATG
CodY2-R	CATATTCTTCTCAATTTTAAATTTATAAACCATG
CodY3-F	CATGGTTTATATTCTAAAAATTGAGAAGAATATG
CodY3-R	CATATTCTTCTCAATTTTATAAATATAAACCATG
CodY4-F	CATGGTTTATATTTTGAAAATTGAGAAGAATATG
CodY4-R	CATATTCTTCTCAATTTTCAAAATATAAACCATG
CodY5-F	CATGGTTTATATTTTATAAAATTGAGAAGAATATG
CodY5-R	CATATTCTTCTCAATTTATAAAATATAAACCATG
CodY6-F	CATGGTTTATATTTTATTAAATTGAGAAGAATATG
CodY6-R	CATATTCTTCTCAATTAATAAAATATAAACCATG
K549-F	GAAAACCAGAAGCGGANNKATCATGAG
K549-R	CTCATGATMNNTCGCTTCTGGTTTTTC

以引物对 CreK-L-F/ CreK-L-R 扩增后柱回收 PCR 产物,转化 BSGN10,对基因组上相应位点进行突变。

1.2.4 GlcNAc 摇瓶发酵 种子培养:挑取平板上新鲜转化的单菌落接种到 25 mL LB 液体培养基(250 mL 平底三角瓶)中于 37 ℃、220 r/min 条件下培养 8~10 h。

摇瓶发酵:将种子液按接种体积分数 5%接入 50 mL 发酵培养基中(250 mL 挡板三角瓶),在 37 ℃、220 r/min 条件下培养 48 h。

1.2.5 检测方法 发酵液中 GlcNAc、乙酸和葡萄糖质量浓度用 HPLC 检测^[8];乙酰辅酶 A 合成酶活性通过检测反应液中 NADH 吸光值的变化测定^[22];蛋白质质量浓度用碧云天 Bradford 试剂盒测定。

2 结果与讨论

2.1 CodY 结合位点突变对 *acsA* 转录和乙酸积累的影响

全局转录调控因子 CodY 在革兰氏阳性菌中非常保守,其通过感知胞内 GTP 和支链氨基酸浓度,感知胞外营养物质变化,通过改变对不同结合位点

的亲和力,改变对不同基因的结合,调控相应基因的表达和胞内碳氮代谢流分配,适应胞外环境的变化^[12,15,17]。如图 3(a)所示,在 *acsA* 5'UTR 区域内,CodY 结合序列为 tATaTTtTaAAAA**TT**(小写碱基表示与保守序列的差异;CodY 结合回文保守序列为 AATTTTCWG**AAAA**TT****,红色碱基表示最保守的碱基)^[14]。Belitsky B R 和 Sonenshein A L 通过突变保守的 A10,解除了 CodY 对 *ispA*、*rapA* 和 *rapE* 的抑制^[17]。作者在借鉴 Belitsky B R 和 Sonenshein A L 研究的基础上,对回文序列中 A10、A10-A11 及对应的 T6 及 T5-T6 进行了突变,以减弱 CodY 的结合,并将 t7、a9 分别突变为 C7、G9,以增强 CodY 的结合,作为对照。

如图 3(b)所示,将保守碱基突变为其他碱基均不同程度地促进了基因 *acsA* 的转录。其中,最保守碱基 A10 突变效果尤其明显,突变株 CodY-5 和 CodY-6 中 *acsA* 转录水平分别提高了 35%和 43%,同时乙酸积累量分别降低了 15%和 23%,为 5.5 g/L 和 5.2 g/L。虽然 T6、T5-T6 与 A10、A10-A11 在回文序列中处于对应的位置,但是突变后效果并不明

显, CodY-1 和 CodY-2 中 *acsA* 转录水平仅仅提高了 5% 和 12%, 乙酸积累量也仅仅降低了 5% 和 8%, 为 6.4 g/L 和 6.2 g/L。同时, 将非保守碱基 t7、a9 分别突变为保守的 C7、G9 后, 对 *acsA* 转录和乙酸利用都没有明显的影响。基于以上分析, 选择突变株 CodY-6 进行下一步的改造。

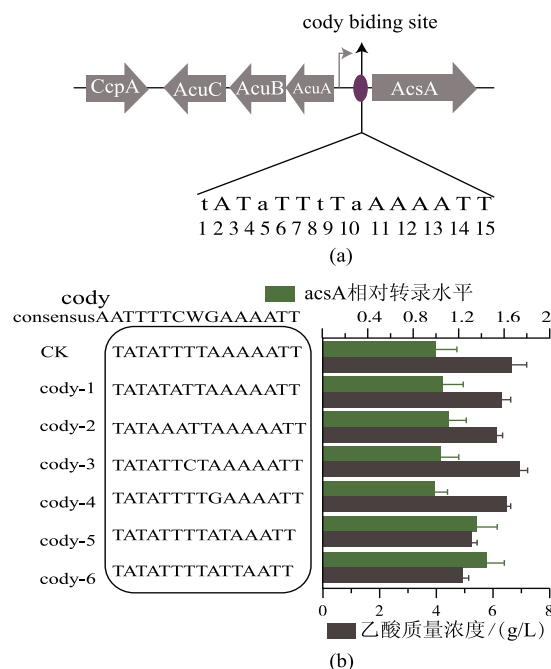


图3 CodY 结合位点突变对 *acsA* 转录和乙酸积累的影响
Fig. 3 Effects of CodY binding sequences mutation on *acsA* transcription and acetate accumulation

2.2 AcsAK549 饱和和突变对 AcsA 酶活和乙酸积累的影响

乙酰化与磷酸化类似, 调控着生物体内许多重要的生理功能, 如受体信号转导、RNA 处置和代谢控制等^[23-24]。如图 4(a) 所示, 枯草芽孢杆菌乙酸利用途径也受乙酰化调控, 该途径中的关键酶 AcsA 在其 Lys549 位点被乙酰基转移酶 AcuA 乙酰化, 导致其活性丧失, 利用乙酸的能力降低。虽然在大肠杆菌中已有通过调控 AcsA 表达促进乙酸利用的报道, 但是在枯草芽孢杆菌中很少有相关的报道^[22, 25]。

为了探究 AcuA 乙酰化对乙酸利用的影响, 作者对其乙酰化位点进行了突变。如图 4(b) 所示, 将 Lys549 突变为其他 19 种氨基酸虽然可以解除乙酰化修饰, 但是由于不同氨基酸其空间位阻或者带电荷性质的不同, 对酶 AcsA 活性和乙酸利用的影响也不尽相同。将 Lys549 突变为碱性氨基酸 Arg 或者

His, 对乙酸利用没有明显影响; 而将 Lys549 突变为酸性氨基酸 (Asp, Glu) 或极性中性氨基酸 (Cys, Met, Gln, Asn, Ser, Thr, Trp, Tyr), 不利于乙酸利用; 当将 Lys549 突变为非极性氨基酸 Gly 和 Pro 时, 明显促进乙酸利用, 乙酸积累量分别减少了 25% 和 19%, 为 3.6 g/L 和 4.0 g/L。乙酸积累量的减少, 说明通过突变解除乙酰化修饰后, 提高了酶 AcsA 的活性。如图 4 所示, 将 Lys549 突变为 Gly 后胞内比酶活为 66.7 mU/mg, 相比 BSGN10-CodY6 提高了 44%, 相比出发菌株 BSGN10 提高了 76%。

2.3 GlcNAc 摇瓶发酵

虽然以上研究表明, 通过促进乙酸利用途径中 AcsA 转录以及通过解除乙酰化修饰可以提高 AcsA 的活性, 促进乙酸的利用, 但是其对细胞生长和产物 GlcNAc 合成的影响仍然未知。为了考察调控 AcsA 表达对枯草芽孢杆菌发酵产 GlcNAc 性能的影响, 挑选乙酸产量显著降低的菌株 BSGN10-CodY6 和 BSGN10-CodY6-AcsAK549G 进行摇瓶发酵, 与出发菌株 BSGN10 进行了比较。

如图 4(d) 所示, 发酵 30 h 后, 菌株 BSGN10-CodY6 和 BSGN10-CodY6-AcsAK549G 的 GlcNAc 产量分别为 3.2 g/L 和 5.0 g/L, 是出发菌株 BSGN10 的 1.7 和 2.6 倍; 同时菌株 BSGN10-CodY6 和 BSGN10-CodY6-AcsAK549G 的生物物质积累量 (DCW) 分别为 3.5 g/L 和 5.3 g/L, 是出发菌株 BSGN10 的 1.3 和 1.9 倍。以上结果表明, 调控 AcsA 表达不但可以促进乙酸利用, 而且可以提高菌株的发酵性能。

3 结 语

增强枯草芽孢杆菌对乙酸的利用能力, 提高其发酵性能, 对于代谢工程改造枯草芽孢杆菌生产高附加值的生物化学品具有重要的意义。已有研究通过在枯草芽孢杆菌中构建乙醛酸循环, 促进 Ac-CoA 与乙醛酸缩合生成苹果酸, 通过促进 Ac-CoA 的消耗, 促进乙酸的利用^[11]。但是对于 GlcNAc 的生产而言, 由于需要 Ac-CoA 为 GlcNAc 提供乙酰基, 构建乙醛酸循环会减少 Ac-CoA 的供给, 不利于 GlcNAc 的合成。由于 Ac-CoA 合成酶 AcsA 以乙酸为底物, 催化其转化为 Ac-CoA, 可以为 GlcNAc 提供乙酰基, 所以促进酶 AcsA 的表达不但可以提高菌株利用乙酸的能力, 而且可以提高其发酵产

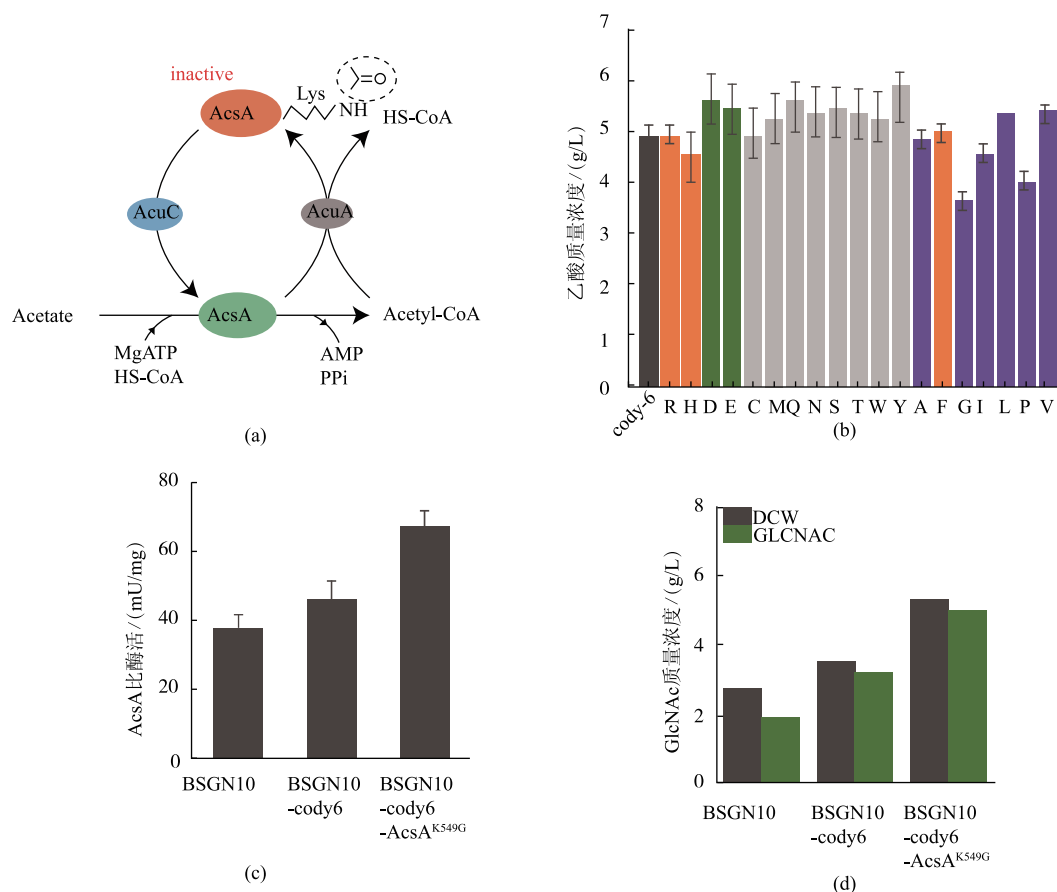


图 4 AcsAK549 饱和突变对乙酸积累、AcsA 酶活和 GlcNAc 合成的影响

Fig. 4 Scheme of the AcsA acetylation and its effects on acetate utilization and GlcNAc production

GlcNAc 的性能。由于 GlcNAc 的合成消耗 Ac-CoA, 可以促进乙酸的利用, 为了进一步提高重组枯草芽孢杆菌发酵产 GlcNAc 的能力, 后续研究将通过强

化 GlcNAc 合成途径中关键酶 GNA1 和 GlmS 的表达, 加强 Ac-CoA 的消耗, 继续减少或消除乙酸积累。

参考文献:

- [1] DU SOUICH P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS[J]. **Pharmacology & Therapeutics**, 2014, 142(3):362-374.
- [2] HOCHBERG M C, MARTEL-PELLETIER J, MONFORT J, et al. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib[J]. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 2016, 75(1):37-44.
- [3] CALVERT M B, MAYER C, TITZ A. An efficient synthesis of 1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid from N-acetylglucosamine[J]. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, 2017, 13:2631-2636.
- [4] LONGO D L, MOUSTAGHFIR F Z, ZERBO A, et al. EXCI-CEST: Exploiting pharmaceutical excipients as MRI-CEST contrast agents for tumor imaging[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017, 525(1):275-281.
- [5] RIVLIN M, NAVON G. Glucosamine and N-acetyl glucosamine as new CEST MRI agents for molecular imaging of tumors[J]. **Scientific Reports**, 2016, 6:32648.
- [6] GOVINDARAJU S, SAMAL M, YUN K. Superior antibacterial activity of GlcN-AuNP-GO by ultraviolet irradiation[J]. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, 2016, 69:366-372.

- [7] VEERAPANDIAN M, YUN K. Functionalization of biomolecules on nanoparticles :specialized for antibacterial applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011, 90(5): 1655-1667.
- [8] MA W, LIU Y, SHIN H, et al. Metabolic engineering of carbon overflow metabolism of *Bacillus subtilis* for improved N-acetyl-glucosamine production[J]. **Bioresource Technology**, 2018, 250: 642-649.
- [9] MULLINS E A, FRANCOIS J A, KAPPOCK T J. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile acetobacter acet[J]. **Journal of Bacteriology**, 2008, 190(14): 4933-4940.
- [10] ZHU N Q, XIA H H, WANG Z W, et al. Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in corynebacterium glutamicum[J]. **Plos One**, 2013, 8(4).
- [11] KABISCH J, PRATZKA I, MEYER H, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for growth on overflow metabolites[J]. **Microbial Cell Factories**, 2013, 12: 72.
- [12] BRINSMADE S R, ALEXANDER E L, LIVNY J, et al. Hierarchical expression of genes controlled by the *Bacillus subtilis* global regulatory protein CodY [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014, 111(22): 8227-8232.
- [13] BELITSKY B R, SONENSHEIN A L. Roadblock repression of transcription by *Bacillus subtilis* CodY[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2011, 411(4): 729-743.
- [14] BELITSKY B R, SONENSHEIN A L. Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2008, 190(4): 1224-1236.
- [15] MOLLE V, NAKAURA Y, SHIVERS R P, et al. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis[J]. **Journal of Bacteriology**, 2003, 185(6): 1911-1922.
- [16] COUTTE F, NIEHREN J, DHALI D, et al. Modeling leucine's metabolic pathway and knockout prediction improving the production of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*[J]. **Biotechnology Journal**, 2015, 10(8): 1216-1234.
- [17] BELITSKY B R, SONENSHEIN A L. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* CodY-binding sites at single-nucleotide resolution[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2013, 110(17): 7026-7031.
- [18] GARDNER J G, ESCALANTE-SEMERENA J C. In *Bacillus subtilis*, the sirtuin protein deacetylase, encoded by the srtN gene (formerly yhdZ), and functions encoded by the acuABC genes control the activity of acetyl coenzyme A synthetase[J]. **Journal of Bacteriology**, 2009, 191(6): 1749-1755.
- [19] GARDNER J G, GRUNDY F J, HENKIN T A, et al. Control of acetyl-coenzyme A synthetase (AcsA) activity by acetylation/deacetylation without NAD(+) involvement in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2006, 188(15): 5460-5468.
- [20] YAN X, YU H J, HONG Q, et al. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(17): 5556-5562.
- [21] BOND S R, NAUS C C. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects[J]. **Nucleic Acids Research**, 2012, 40(W1): W209-W213.
- [22] CASTANO-CEREZO S, BERNAL V, ROHRIG T, et al. Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N-epsilon-lysine acetylation[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, 99(8): 3533-3545.
- [23] KIM G W, YANG X J. Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans[J]. **Trends in Biochemical Sciences**, 2011, 36(4): 211-218.
- [24] BERNAL V, CASTANO-CEREZO S, GALLEG0-JARA J, et al. Regulation of bacterial physiology by lysine acetylation of proteins[J]. **New Biotechnology**, 2014, 31(6): 586-595.
- [25] NOVAK K, FLOCKNER L, ERIAN A M, et al. Characterizing the effect of expression of an acetyl-CoA synthetase insensitive to acetylation on co-utilization of glucose and acetate in batch and continuous cultures of *E. coli* W[J]. **Microbial Cell Factories**, 2018, 17: 15.