

枯草芽胞杆菌在医药及功能性食品等领域的研究现状及应用进展

李婧¹, 霍毅欣^{*1,2}, 郭淑元^{*1}

1 北京理工大学 生命学院, 北京 100081

2 北京理工大学唐山研究院, 河北 唐山 063611

李婧, 霍毅欣, 郭淑元. 枯草芽胞杆菌在医药及功能性食品等领域的研究现状及应用进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4327-4348.

LI Jing, HUO Yixin, GUO Shuyuan. Research status and application progress of *Bacillus subtilis* in the fields of medicine and functional foods[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4327-4348.

摘要: 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)作为一种广泛应用的优秀微生物平台, 在生物医药和食品领域发挥着重要作用, 被广泛应用于合成各类酶制剂、化合物、药物和保健品等。借助不断发展的基因工程技术和代谢工程方法, 结合完善的基因组序列、遗传工具箱和生物信息学工具, 可以更充分地探索和预测枯草芽胞杆菌的潜在应用价值, 为相关产业提供指导。然而, 在优化代谢途径以提高目的产量、挖掘合成其他物质潜力和开发更高效适配元件方面仍存在挑战。此外, 确保枯草芽胞杆菌在医药和食品领域的安全性, 以避免不良影响也非常必要。本文总结了枯草芽胞杆菌在生物合成领域(如医药和功能性食品)中的应用, 同时探讨了枯草芽胞杆菌作为未来绿色安全微生物平台的应用现状, 并对其产品的发展趋势和技术手段等问题进行了讨论。本文为进一步研究枯草芽胞杆菌的应用和经济价值奠定了基础, 表明其在绿色和可持续发展方面具有巨大潜力。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 医药; 功能性食品; 益生菌

资助项目: 唐山市科技计划(23130228E); 国家自然科学基金(32370095)

This work was supported by the Tangshan Science and Technology Program (23130228E) and the National Natural Science Foundation of China (32370095).

*Corresponding authors. E-mail: HUO Yixin, huoyixin@bit.edu.cn; GUO Shuyuan, guosy@bit.edu.cn

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-28

Research status and application progress of *Bacillus subtilis* in the fields of medicine and functional foods

LI Jing¹, HUO Yixin^{*1,2}, GUO Shuyuan^{*1}

1 School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

2 Tangshan Research Institute, Beijing Institute of Technology, Tangshan 063611, Hebei, China

Abstract: *Bacillus subtilis* serves as a widely used elite microbial platform, playing a pivotal role in biomedicine and food industries. It is extensively employed in synthesizing a variety of enzymes, compounds, pharmaceuticals, and health products. The advancing genetic engineering and metabolic engineering approaches, together with comprehensive genomic sequences, genetic toolkits, and bioinformatics tools enable exploring the potential applications of *B. subtilis*. This exploration offers valuable guidance for related industries. Nonetheless, challenges remain in optimizing metabolic pathways to enhance desired yields, investigating the synthesis potential for other substances, and developing more efficient adapter biobricks. Additionally, ensuring the safety of *B. subtilis* in biomedicine and food is crucial to prevent adverse effects. This review encapsulates the use of *B. subtilis* in biosynthesis of medicine and functional foods, discusses the current application status of *B. subtilis* as a future green and safe microbial platform, and prospects the trends and technical development of its products. This review lays the groundwork for further probing into the application and economic value of *B. subtilis*, showcasing its immense potential for green and sustainable development.

Keywords: *Bacillus subtilis*; medicine; functional food; probiotics

随着人们对绿色、安全、经济的医药产品和保健食品的需求不断增加,对如何高效安全地生产这类有益物质的研究和评估工作也在持续进行。世界各地正在开发和应用利用微生物生产新型生物药品和保健食品的方法,许多由微生物产生的化合物已经在人类日常生活中发挥关键作用,为人类的健康和福祉作出贡献。

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)作为一种广泛应用的微生物,在医药、功能性食品和农业等领域扮演着重要角色。枯草芽胞杆菌是一种常见的革兰氏阳性细菌,是天然安全的宿主细胞,具有多种代谢特性,可利用多种碳源和氮源生长,产生多种酶和代谢产物^[1],其作为生物反应器的优势在于遗传背景清晰,蛋白分泌

能力强,是生产异源蛋白的理想宿主^[2],对提高枯草芽胞杆菌分泌多种天然和同源蛋白质的能力已经持续进行了三十多年的研究^[3]。它的其他生物学特性包括强大的耐受能力、多样的代谢途径和代谢能力、产生各种有益生物活性物质、抗氧化性能等,这使其成为一种理想的微生物工具。

本综述对近年来枯草芽胞杆菌在医药和功能性食品等领域的研究现状和应用进展进行了总结和探讨,阐明了枯草芽胞杆菌在抗菌、抗氧化特性及生产有益化合物途径等方面的重要性,深入开发了相关资源。这为进一步利用枯草芽胞杆菌生产高价值产品提供了科学依据,具有重要的应用价值。同时,期望为枯草

芽胞杆菌在不同领域的应用和改良提供参考和支持。

1 生产酶类和糖类等化合物

枯草芽胞杆菌是被美国食品药品监督管理局认定的安全菌株, 广泛应用于工业生产异源蛋白等^[4]。以下内容将枯草芽胞杆菌生产的化合物, 从合成氨基酸、酶制剂及稀有糖等糖类物质这 3 个方面展开分析, 部分酶结构及氨基酸和糖类物质生产途径如图 1 所示, 包括如 α -淀粉酶和蛋白酶等典型的酶制剂及表面活性剂等重要化合物, 部分产物的生产途径及生产方式将在下文相关内容中详细阐述。在生产酶制剂方面, 相较于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及其他芽胞杆菌属(*Bacillus*), 枯草芽胞杆菌具有突出的优势。大肠杆菌作为常见的微生物模式菌株可实现高蛋白表达, 但对真核和膜蛋白效果有限, 由于蛋白溶解度低导致包涵体形成, 会出现蛋白折叠和分泌困难等问题^[5-6], 酿酒酵母安全性高, 但蛋白质表达量较低, 易产生过量糖基化, 并且转化子不稳定^[7-8]。然而, 芽胞杆菌具有卓越的蛋白质分泌能力, 能在廉价碳源上良好生长, 具有独特的内源代谢和在工业发酵中的稳健表现, 使其成为工业生产产品的具有显著优势的潜力菌株。枯草芽胞杆菌具有公认的安全状态, 推动了软骨素和叶酸等药物以及营养保健品生产的发展^[9]。

本文梳理总结了近 6 年枯草芽胞杆菌不同菌株生产部分关键酶类和化合物的数据, 详见表 1, 同时对比了几种具有代表性的酶制剂在其他微生物平台中的表现。

在枯草芽胞杆菌 JNFE0126 中可同时产纳豆激酶和凝乳酶, 其活性高达 3 511 U/mL^[10], 在地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)中纳豆

激酶活性仅为(37.15±0.89) U/mL^[23]。另外, 碱性蛋白酶目前在大肠杆菌 BL21 中的最大蛋白酶活性为 5 000 U/mL^[24], 在蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) ABBA1 中仅为 200.56 U/mL^[25], 而研究人员通过信号肽筛选和启动子优化, 在枯草芽胞杆菌 WB600 中成功构建了高效分泌碱性蛋白酶的系统, 在摇瓶中产生的碱性蛋白酶活为 18 600 U/mL, 在 5 L 发酵罐中发酵后, 该酶活性能达到 34 050 U/mL^[11]。关于微生物碱性蛋白酶的生产, 还可进一步优化生产参数^[26], 提升其深层发酵的性质和工业应用的效果^[27]来满足工业对碱性蛋白酶的需求。

1.1 合成氨基酸与酶制剂

枯草芽胞杆菌能够合成多种氨基酸如 β -丙氨酸^[28]、L-茶氨酸^[29]和鸟氨酸^[30]等。 β -丙氨酸在生物学和医学研究中具有重要作用, 可以合成肌肽、维生素 B5(泛酸)、其他食品添加剂^[31]和有机太阳能电池双重修饰添加剂^[32]等。在最新的研究中, 枯草芽胞杆菌产 β -丙氨酸的产量可达(108.14±11.90) mg/L, 研究人员通过在枯草芽胞杆菌 168 中表达天然的 L-天冬氨酸- α -脱羧酶, 成功地将 β -丙氨酸产量提高了 842%, 并且鉴定出了 6 个参与 β -丙氨酸合成的基因, 分别是 *ptsG*、*fBP*、*ydaP*、*yhfS*、*mmgA* 和 *pckA*, 还通过导入异源磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 成功将 β -丙氨酸产量提高了 81.7%^[28]。

枯草芽胞杆菌在合成酶制剂及重组蛋白的分泌表达方面也有强大的能力及广泛应用^[33], 酶制剂如中性蛋白酶^[34-35]、 α -淀粉酶^[36]、纤维素酶^[37]、谷氨酰胺酶^[38]、肌酐酶^[39]、蔗糖异构酶^[40]和嗜碱碱性卤杆菌蛋白酶^[14]等。合成酶制剂的主要方法有引入异源基因表达^[29]、表达元件优化、分子修饰、优化启动子信号肽和利用诱变技术获得高产菌株等, 其中用重离子诱变技术对枯草芽胞杆菌进行辐照可以获得高产突变体,

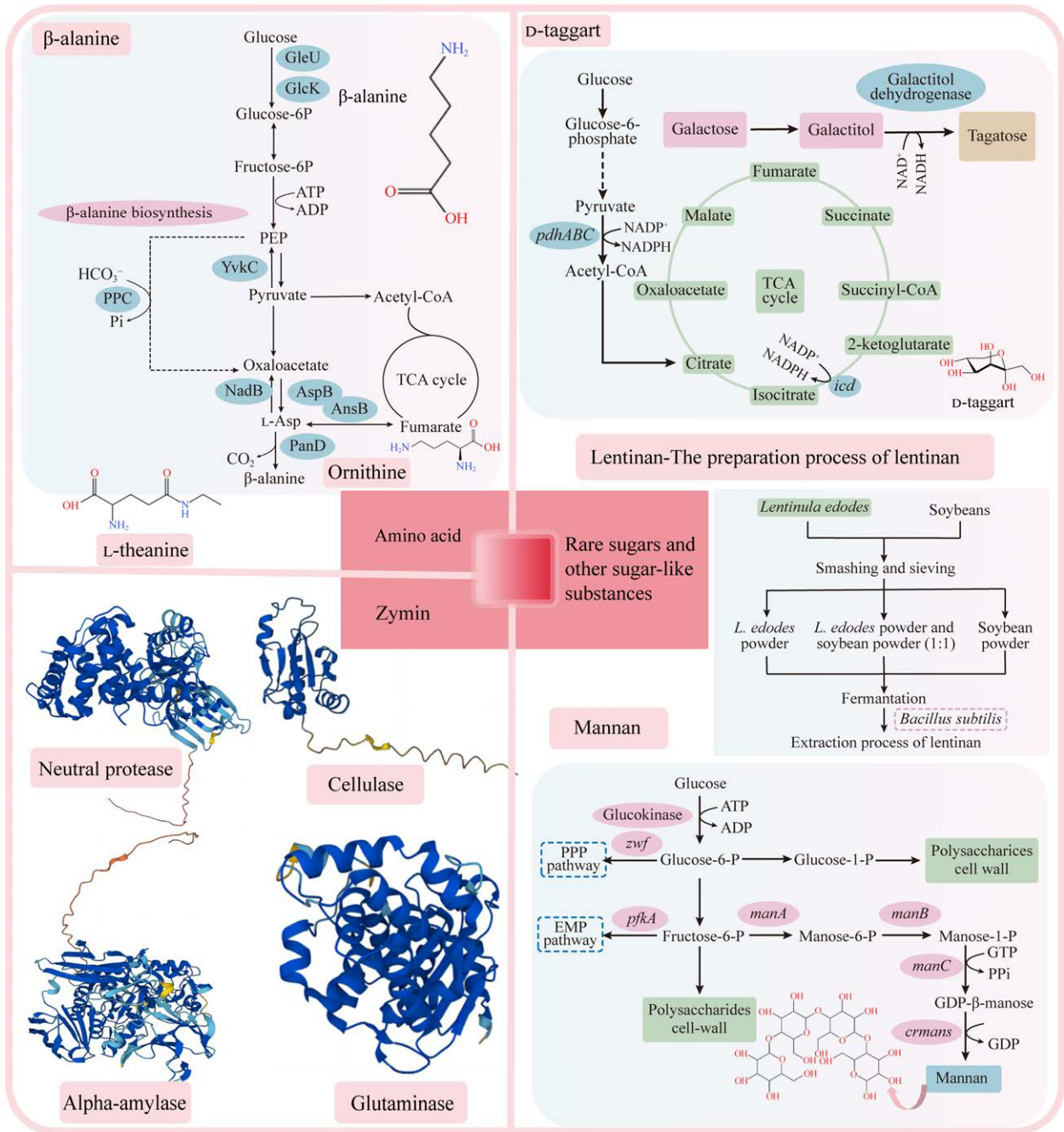


图 1 枯草芽胞杆菌合成氨基酸、酶制剂及稀有糖等糖类物质的结构及代谢途径总结

Figure 1 Summary of the structures and metabolic pathways of amino acids, zymins, rare sugars, and other sugar substances synthesized by *Bacillus subtilis*.

如枯草芽胞杆菌 KC-180-2 的 α-淀粉酶活性为 72.26 U/mL^[36], 因具有耐高温性, 在工业发酵生产 α-淀粉酶方面具有巨大的应用前景。利用枯草芽胞杆菌产蔗糖异构酶, 进而生产异麦芽酮糖,

可以作为蔗糖的健康替代品^[40], 又因其作为食品安全级菌株不存在热原和内毒素等安全问题, 其表达的酶制剂、抗体等可直接用于食品、药物等。

表 1 近 6 年利用枯草芽胞杆菌生产的部分重要酶类和化合物产量的统计

Table 1 Statistics on the production of some important enzymes and compounds using *Bacillus subtilis* in the past six years

Name	Strain	Year	Activity/Yield	Reference	
Enzyme	Nattokinase	<i>B. subtilis</i> JNFE0126	2021	3 511 U/mL	[10]
	Milk-clotting enzyme				
	Alkaline protease	<i>B. subtilis</i> WB600	2023	34 050 U/mL	[11]
Compound	Agarase	<i>B. subtilis</i> WB800n	2018	14.15 mg/mL	[12]
	γ -PGA	<i>B. subtilis</i> ZJS18	2020	15.98 g/L	[13]
	Menaquinone-7	<i>B. subtilis</i> 168 KO-SinR	2022	59.20 mg/L	[14]
	Fengycin	<i>B. subtilis</i> BSf03	2022	885.37 mg/L	[15]
	5-methyltetrahydrofolate	<i>B. subtilis</i> 168	2022	(3.41 \pm 0.10) mg/L	[16]
	Mannan	<i>B. subtilis</i> 168	2020	12.60 g/L	[17]
	Tetramethylpyrazine	<i>B. subtilis</i> BJ3-2	2020	6.93 mg/g	[18]
	Surfactant	<i>B. subtilis</i> SX-20	2023	1.03 g/L	[19]
	Riboflavin	<i>B. subtilis</i> RH33	2022	11.77 g/L	[20]
	D-tagatose	<i>B. subtilis</i> wild type	2023	39.57 g/L	[21]
	Hyaluronic acid	<i>B. subtilis</i> SeHAS RBSTr3	2022	(728 \pm 22.9) mg/L	[22]

1.2 合成稀有糖等糖类物质

香菇多糖^[41]、甘露多糖^[17]、D-塔格糖^[21]和 D-阿洛酮糖^[42]等多种糖类物质均可在枯草芽胞杆菌中生产。香菇多糖具备多种生物活性,包括抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、抗病毒和抗炎等作用,通过利用纳豆枯草芽胞杆菌对香菇进行发酵处理后,香菇多糖的产率提高幅度达到了 87.13%^[41]。低分子甘露聚糖通过影响人体的肠道微生物群,刺激有益细菌例如乳杆菌和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的选择性生长,从而抑制脂肪吸收和血压升高;研究人员在枯草芽胞杆菌中设计了一条全新的合成甘露聚糖的途径,经过优化,成功将甘露聚糖的产量从 0.97 g/L 提升至 12.6 g/L,为提高甘露聚糖的产量提供了一个可行且值得优化的途径^[17]。

近年来,消费趋势强调健康和环保的重要性,这导致人们对低卡路里和稀有糖持续关注,其中一种稀有糖 D-塔格糖,与蔗糖的甜度相同,但是热量只有其三分之一。D-塔格糖具有预防肥胖、降低血糖水平、改善肠道菌群

和防治龋齿的生理功能,可为社会经济带来显著的效益。研究人员成功地在安全宿主枯草芽胞杆菌中建立了合成 D-塔格糖的氧化还原途径。通过启动子调控和脱氢酶介导的辅因子再生,使得 D-塔格糖的产量提高至 39.57 g/L,产糖速率达到 0.33 g/(L·h),凸显了枯草芽胞杆菌生产 D-塔格糖的有效潜力^[21]。D-阿洛酮糖也是一种重要的稀有糖,在食品、化妆品和医药等领域都有着广泛的应用价值,在枯草芽胞杆菌中实现了高效异源表达,采用全细胞方法以 500 g/L D-果糖为底物制备 D-阿洛酮糖,4 h 转化率为 30%^[42]。

2 医药领域的应用

枯草芽胞杆菌在医药领域具有广泛的应用前景,可以作为免疫、抗菌、抗炎、抗氧化等多种药物的原料或药物载体,为人类健康提供新的治疗策略。图 2 为枯草芽胞杆菌在医药领域的产品应用与部分产物作用机制总结,分别从免疫、抗氧化、抗菌、脂肽及生物合成材料等

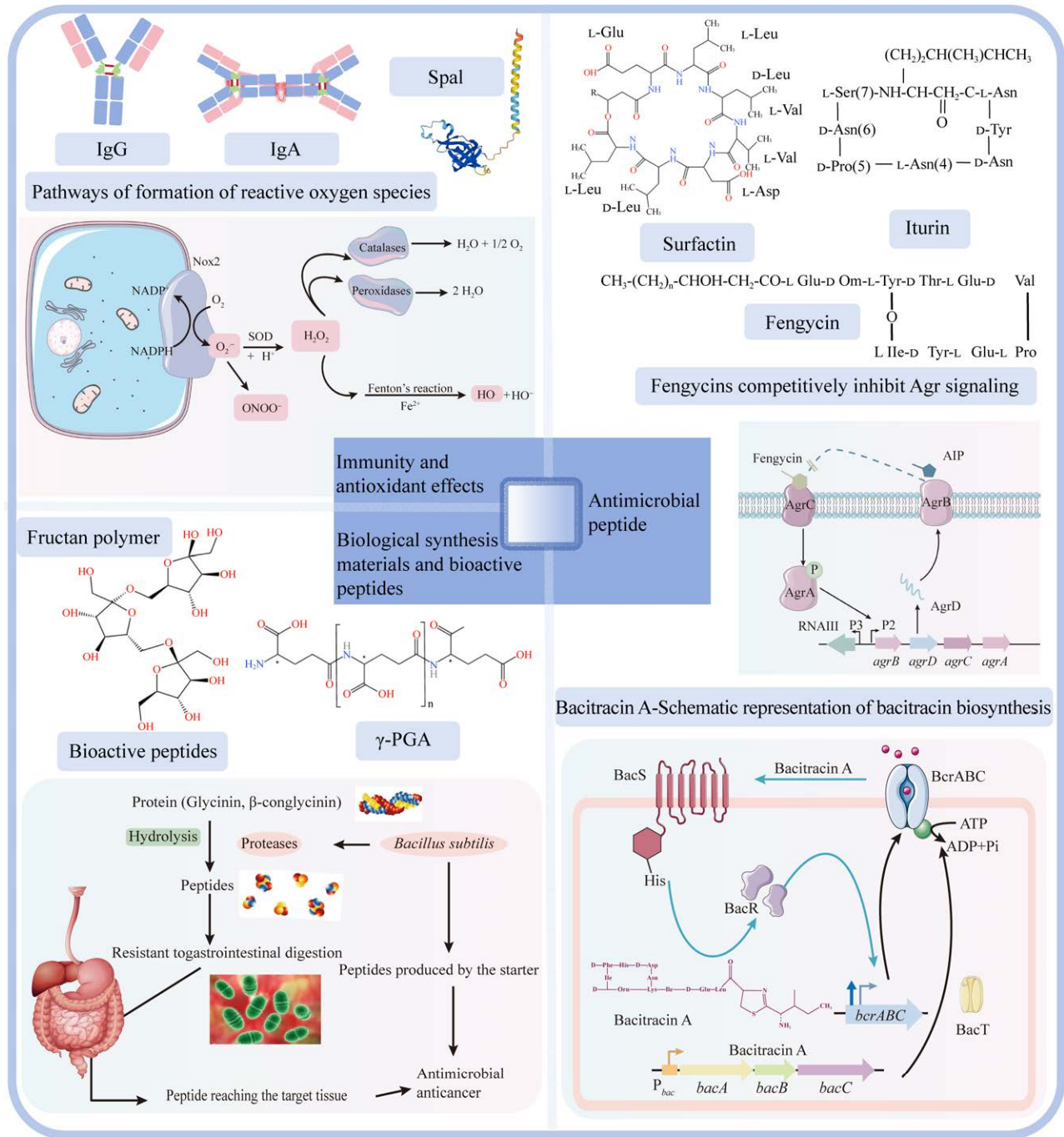


图 2 枯草芽胞杆菌在医药领域的相关物质结构与部分产物作用机制总结

Figure 2 Summary of the relevant substance structures and partial action mechanisms of *Bacillus subtilis* in the medical field.

方面进行总结。在 2022 年 COVID-19 的大流行环境下，因枯草芽胞杆菌的抗菌抗炎等特性，在作为疫苗或治疗剂方面还被发现具有对抗

2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的潜力^[43]。

2.1 免疫调节作用

枯草芽胞杆菌具有一定免疫调节活性，枯

草芽胞杆菌 RJGP16 可以达到刺激局部免疫应答的效果,可促进十二指肠和回肠组织中 IL-6、猪 β -pBD-2 和 TLR-2 的表达和释放,同时增加免疫球蛋白(IgA)产生的细胞数^[44]。这种作用能激发黏膜免疫力,在保护仔猪健康、增强免疫功能^[45]、提高生长性能和预防肠道疾病方面发挥着重要作用。此外,枯草芽胞杆菌表达的 CTA1-DD 蛋白具有佐剂活性^[46],针对血凝素抗原能够诱导更高的血清 IgG 和黏膜 IgA 抗体水平,而枯草芽胞杆菌制备的黏膜佐剂可用作滴鼻给药途径的黏膜疫苗佐剂^[47],有效刺激机体产生特异性黏膜免疫反应。Spal 免疫蛋白是枯草芽胞杆菌 ATCC 6633 产生的一种胞外短胞内蛋白(extracellular short-intracellular protein)的分泌蛋白,通过共价的甘油二酯连接到细胞膜的外部,蛋白结构如图 2 所示。

目前,Spal 介导的免疫机制包括以下 4 种:(1) 通过结合和隔离枯草杆菌素,保护细胞膜免受其插入;(2) 防止枯草杆菌蛋白在孔道形成之前寡聚化;(3) 防止枯草杆菌素-脂蛋白 II 复合物在孔道形成之前生成;(4) 作为 ABC 转运蛋白 SpalFEG 底物的结合蛋白^[48],Spal 和 ABC 转运蛋白 SpalFEG 一起保护枯草芽胞杆菌膜免受枯草杆菌素的插入^[49]。

此外,Spal 也被认为与枯草芽胞杆菌在环境应激条件下的适应能力和耐受性有关,可能参与了枯草芽胞杆菌的生物膜形成和细胞聚集现象。Spal 免疫蛋白具有高亲和力和特异性,可以与特定的抗原结合并发挥免疫效应,所以可被应用于医学诊断、抗体治疗和基因工程等领域。

目前 Spal 的免疫调节作用只针对枯草芽胞杆菌自身,或者具有刺激局部免疫及免疫佐剂活性的作用,开发应用不完全,效果间接,局限性较大,仍有潜力开发相关的免疫与医药产品。

2.2 抗菌抗炎作用

枯草芽胞杆菌具有显著的抗菌抗炎作用,例如对肠道产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)^[50]、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)^[51]、拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)^[52]、美人鱼发光杆(*Photobacterium*)^[53]和烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)病菌^[54]等均具有抑制效果,利用枯草芽胞杆菌制造果聚糖聚合物^[55]和菌喷雾剂^[56]都是典型的利用其抗菌抗炎性质生产的产品。果聚糖聚合物具有抗菌、抗细菌生物被膜和烧伤愈合特性,而枯草芽胞杆菌喷雾剂则是国家药品监督管理局批准的治疗用生物制品,用于防治中小面积烧伤、烫伤、创面感染,同时枯草芽胞杆菌合成的银纳米粒子和氧化铁纳米粒子有抗菌潜力^[57],可以在各种消毒剂和防腐剂中用作抗菌剂。

枯草芽胞杆菌通常通过产生一系列抗菌肽来展现其卓越的抗菌特性。目前,已发现的枯草芽胞杆菌具有抗菌活性的抗菌脂肽类化合物主要包括表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturin)、丰原素(fengycin)、杆菌霉素(bacillomycin)和多黏菌素(polymyxins)等^[58],图 2 为部分抗菌肽结构及作用机制示意图。

这些抗菌肽通过多种机制来对抗其他微生物。首先,它们可以直接破坏细菌细胞膜,导致细胞溶解和死亡。其次,抗菌肽能够穿透细菌膜,并与细菌内部的目标分子相互作用,干扰细菌的生命活动,如 DNA 复制和蛋白质合成。抗菌脂肽类化合物是由微生物如细菌、真菌等产生的一类小分子代谢产物,它们通常由环状短链和 β -羟基脂肪酸链构成^[59],这些化合物由亲水性肽链和亲油性脂肪烃链组成。由于其独特的化学成分和两性分子结构,抗菌脂肽具有抗菌活性和表面活性剂特性,还具有抗肿瘤、抗病毒、抗感染和凝血等药理特性。另外,

从枯草芽胞杆菌 JS-4 中分离到的枯草菌素 JS-4^[60], 对食源性致病菌具有较强的抗菌效果, 可作为食品工业中的一种抗菌防腐剂。而用枯草芽胞杆菌发酵, 可以抑制脂多糖诱导的一氧化氮产生, 增强褐藻抗炎活性^[61]。

此外, 从地衣芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌中分离得到一种杆菌肽^[62], 是具有广泛抗菌谱、快速排泄和低吸收率的优良特性的抗菌剂, 它对大多数革兰氏阳性菌和一些革兰氏阴性菌的细胞壁合成具有抑制作用, 具有不易产生耐药性等特点。因此, 杆菌肽已经在动物饲料和医疗领域广泛应用, 有望成为开发新型抗菌药物的重要资源。其他挥发性化合物, 如核糖体肽和聚酮化合物也属于枯草抗菌谱^[63]。

枯草芽胞杆菌展示出成为多功能的抗菌抗炎和免疫调节剂的潜力, 未来发展方向可以是进一步剖析研究其作用机制、提高产品纯度和稳定性, 并逐步探索其在临床应用中的优势。

2.3 抗氧化特性

枯草芽胞杆菌的表面活性素、抗霉枯草菌素(mycosubtilin)和丰原素这 3 个脂肽家族具有产生抗氧化物质的能力, 可以清除自由基、减轻氧化应激并保护细胞免受损害, 同时发现利用其产生的环状脂肽(plipastatin)在抗氧化方面展现出较高的活性, 并且对丝状真菌具有抑制活性, 在预防植物病害和果蔬采后保存方面发挥着重要作用。利用转换相关重组(transformation-associated recombination)克隆技术克隆环状脂肽合成基因簇并在模式生物枯草芽胞杆菌中可以高效表达^[64]。研究者运用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)自由基、超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基等试剂, 在非细胞模型中对环状脂肽进行了抗自由基/抗氧化活性的研究, 图 2 抗氧化作用中为活性氧的生成途径, 环状脂肽对于

DPPH 自由基呈现出最大的抑制效果, 达到了 22.88%^[65]。这一发现表明, 环状脂肽可被认为是抗氧化物质最佳的候选材料之一。针对这一特性, 有研究对环状脂肽活性进行表征和皮肤敏感性测试, 证明枯草芽胞杆菌在安全性、保质期、产活性肽和产其他对人体皮肤有益的活性化合物方面具有更多优势^[66]。

枯草芽胞杆菌的抗氧化特性为其特有性质, 进一步研究其机理并确保其安全性, 未来可应用于护肤品、化妆品和抗氧化药物的合成中, 具有良好的发展前景。

2.4 生物合成材料与活性肽

枯草芽胞杆菌还具有优良的生物合成能力, 可以产生如生物塑料^[67]等重要的生物合成材料, 具有广泛的应用前景, 对于推动可持续发展和降低环境污染具有重要意义。

利用制糖业废水通过枯草芽胞杆菌 NG05 经济有效地生产聚-β-羟丁酸(poly-β-hydroxybutyrate, PHB), 因其具有无毒、可塑和易降解等特点, 可用于制造生物塑料, 在医药和工业领域有良好的应用前景^[67]。另外一种天然生物聚合物透明质酸(hyaluronic acid, HA), 由于其黏弹性和亲水特性而具有重要的生理和工业应用, 是具有较高临床价值的生化药物。利用新型重组枯草芽胞杆菌 RBSTr3 菌株生产 HA 的最大滴度为(728±22.9) mg/L^[27]。

此外, 枯草芽胞杆菌是目前工业化生产聚谷氨酸(poly-L-glutamic acid, γ-PGA)最普遍使用的优势菌株^[68]。γ-PGA 是一种生物合成材料, 具有良好的生物相容性和可降解性, 所以在工程领域具有广泛的应用前景^[69], 可用作药物缓释材料和医用高分子纤维材料等。在另一项研究中发现, 使用枯草芽胞杆菌 ZJS18 作为研究对象时, 热休克和渗透休克对促进该细菌细胞在恶劣环境下的应激反应起到了显著的作用;

这两种应激因素能够增强 γ -PGA 的产生，最高浓度分别达到 14.53 g/L 和 15.98 g/L^[18]。另外，用枯草芽胞杆菌 MTCC5480 发酵大豆水解后产生特定的生物活性肽，表现出例如抗高血压、抗菌、抗氧化、抗糖尿病和抗癌活性等生物活性特性^[70]。研究具有健康益处的新型生物活性肽，可以将其应用于取代有多种副作用的合成药物。

2.5 调节肠道菌群

近年来，肠道微生物成为了一个备受关注的研究领域，而枯草芽胞杆菌是一种常见的肠道菌群成员，起着重要的生理作用。枯草芽胞杆菌 WB800N 能够调节小鼠肠道微生物组成，保持肠道菌群的稳定性，减轻小鼠糖尿病损伤，提升肠道屏障功能^[71]。牦牛源枯草芽胞杆菌能

调节犏牛肠道菌群和代谢，减轻 D-半乳糖诱导的氧化损伤^[72]。蛋鸡肠道炎症是常见的养殖行业问题，而枯草芽胞杆菌可以调节肠道菌群的组成，从而降低肠道炎症发生的可能性^[73]。枯草芽胞杆菌产生多种有益代谢产物，如各种酶及维生素等^[74]。这些代谢产物能促进肠道黏膜细胞的生长与修复，增加营养吸收，从而抑制肠道炎症和氧化应激等的发生。

2.6 数字技术发展下的机遇

随着枯草芽胞杆菌在生物制药领域的广泛应用(如前提到的作为疫苗或治疗剂有对抗新型冠状病毒的潜力)，生物制药行业也在积极推广智能自动化(图 3)。利用数字技术如自动化数据分析、生物机器学习和个性化医疗等可以提

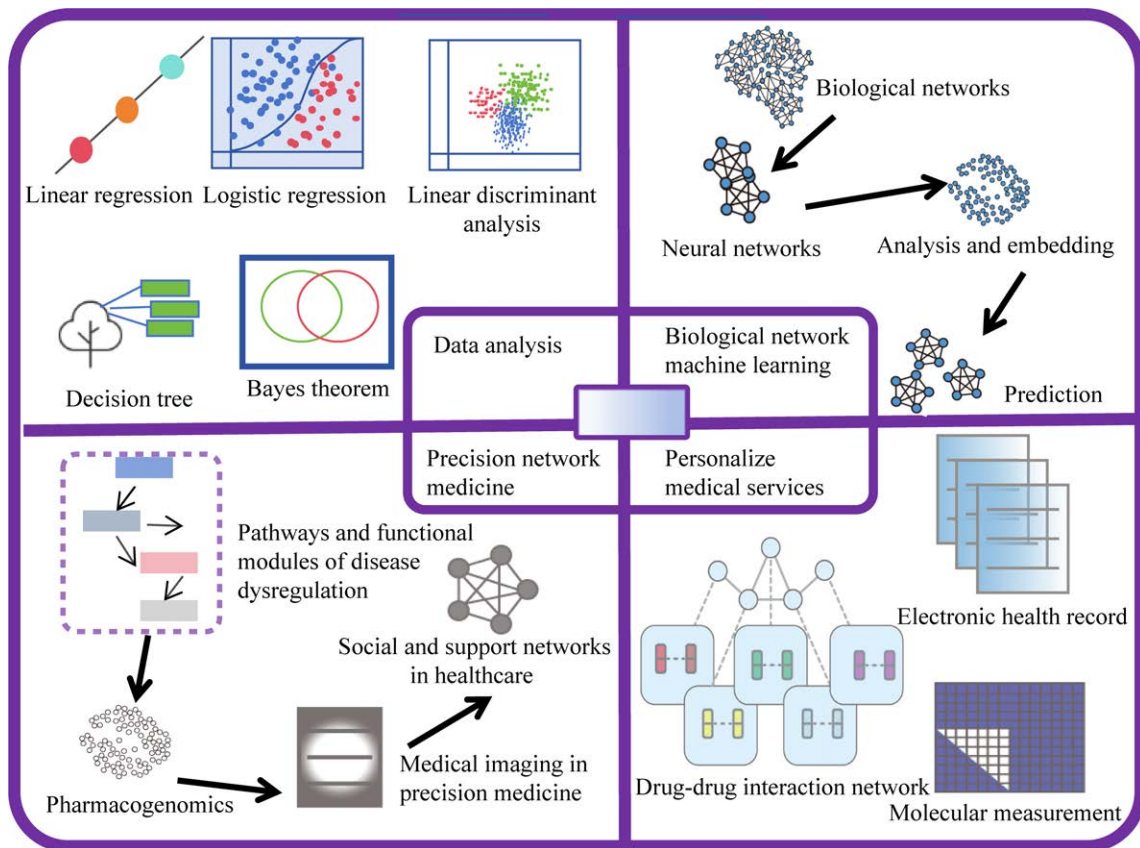


图 3 未来枯草芽胞杆菌在医药领域中可利用的生信工具和发展模式

Figure 3 *Bacillus subtilis* can be utilized by bioinformatics tools and development models in the future medical field.

升生物制药行业的技术水平^[75]。例如在改造枯草芽胞杆菌方面,可以借助机器学习中的迁移学习(transfer-learning),开发核苷酸语言模型,为枯草芽胞杆菌等提供有价值的启动子工具箱^[76]等。随着网络生物学和生物信息学领域的迅速发展^[77],针对生物网络的机器学习与个性化医疗也面临新的机遇与挑战,未来深度挖掘枯草芽胞杆菌在未来精准医疗领域的潜力,可以为其发展带来新的机遇。这种结合生物技术和数字技术的趋势,将为生物制药领域带来更多创新和发展机会,为枯草芽胞杆菌在个性化医疗领域带来新的发展。

3 功能性食品领域的应用

枯草芽胞杆菌作为一种安全的微生物平台,在豆浆饮料^[78]等功能性饮品,益生菌产品、维生素 K₂^[79]和番茄红素^[80]等保健品,以及人参^[81]等中药材中都有着广泛的应用,可提升饮品营养物质成分,作为益生菌带来益处并通过发酵提升中药材有效成分含量等(图 4)。另外,研究还发现枯草芽胞杆菌能提升燕麦^[82]、薏仁米、纳豆^[83]的营养品质,生产香兰素^[84]和乙偶姻^[85]等食用香料。

3.1 功能性饮品

因枯草芽胞杆菌的安全无毒性及防腐抗氧化等特性,在豆浆、益生菌饮料、茶饮料、酸奶及有抗血栓功能的功能性发酵乳^[10]等功能性饮品中都能发挥作用。

利用枯草芽胞杆菌 WX-17 对黄豆进行液下发酵,发现必需氨基酸和短链脂肪酸显著上调,总酚含量和抗氧化剂含量分别提高了 6.32 倍和 1.55 倍;此研究结果表明,以豆渣(okara)为唯一底物,枯草芽胞杆菌 WX-17 进行液体发酵可生产功能性低成本的益生菌饮料,还显示出对革兰氏阳性细菌的抗菌活性^[78],这可能会减少益生菌饮料中对化学防腐剂的需求,并且对

豆类食品中酚类物质含量和抗氧化活性都具有显著的影响^[86]。另外,产 β -葡萄糖苷酶的枯草芽胞杆菌 HJ18-9 发酵的豆奶有可能改善消费者的健康和营养状况,饮料中的氨基氮、 β -葡萄糖苷酶(β -D-glucosidase)活性和糖苷配基(aglycone)含量得到改善,蛋白酶和纤维素酶活性显著升高^[87]。利用枯草芽胞杆菌 ML6 上清液还原 FeCl₃ 生成生物铁纳米颗粒[Bio-Fe(II)NPs],在酸奶中添加不同浓度的 Bio-Fe(II)NPs 作为天然防腐剂可显著提高酸奶的抗氧化能力^[88]。

3.2 益生菌产品

益生菌在肠道内起到平衡菌群、促进消化和增强免疫力的作用,还可通过信号干扰消除病原体^[89]。研究表明,枯草芽胞杆菌具有良好的耐酸性和耐胆盐能力,能够在胃酸和胆盐的环境下存活并繁殖。例如从韩国发酵食品中分离的 2 株枯草芽胞杆菌作为益生菌对洛哌丁胺诱导的小鼠便秘有着良好的疗效,枯草芽胞杆菌 CBD2 和 KMKW4 表现出对肠上皮细胞 HT29 的黏附性和对致病微生物的抑制活性^[90]。因此,枯草芽胞杆菌可以帮助维持肠道健康、改善消化系统功能,并提高免疫力。另外,枯草芽胞杆菌作为益生菌,它的添加可以提高软糖的总酚含量和抗氧化能力。在体外试验中,益生菌菌株的存活率超过了 90.36%^[91]。

未来通过合理的配方和制作工艺,可以将枯草芽胞杆菌添加到各类益生菌饮料、酸奶、发酵产品等功能性食品中,以最大程度发挥其益生菌效果和代谢调节作用,提供给人们更加绿色和健康的食品选择。

3.3 保健品

维生素 K₂ 中的甲萘醌 7 (menaquinone-7) 在防治骨质疏松症和心血管钙化方面展现出了显著的功效。为了提升 MK-7 的生产效率,研究人员以枯草芽胞杆菌 168 作为代谢工程设计的

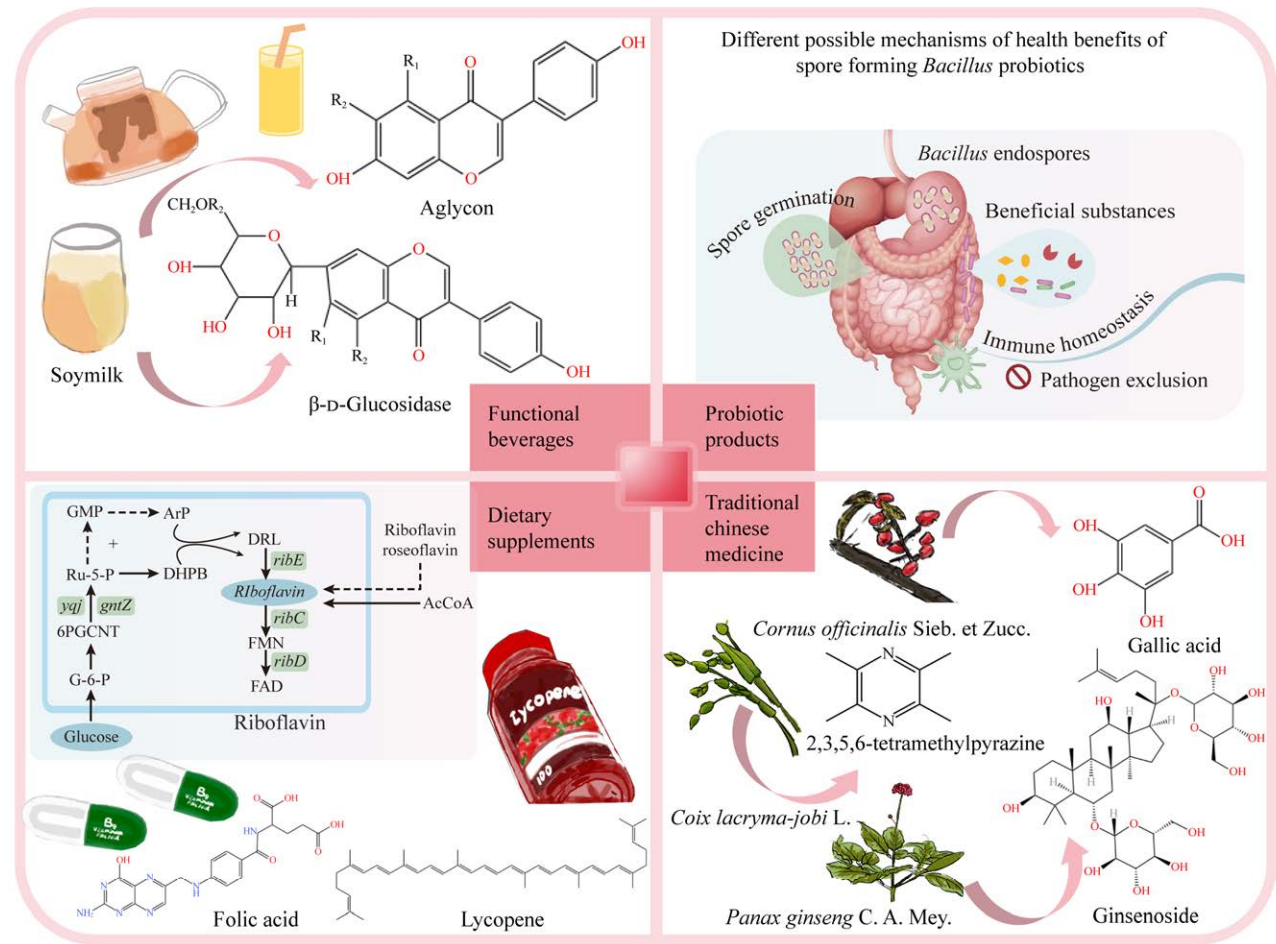


图 4 枯草芽胞杆菌在功能性食品领域的产品应用、作用机理及代谢途径总结

Figure 4 Summary of the application, mechanism of action, and metabolic pathways of *Bacillus subtilis* in the functional food field.

底盘菌株，针对 MK-7 从头生物合成过程中的 MK-7 途径、莽草酸(shikimic acid)途径、4-磷酸甲基赤藓糖醇 (methylerythritol 4-phosphate, MEP)途径及甘油代谢途径这 4 个模块进行了深入的改造，发现通过过表达 *menA*、*dxs*、*dxr*、*yacM-yacN*、*glpD* 等关键基因，并精准敲除 *dhbB* 基因，成功构建了一株高效生产 MK-7 的工程菌株，该菌株经过 144 h 的发酵，MK-7 的产量高达 (69.5 ± 2.8) mg/L^[92]。在后续的研究中，采用 Plackett-Burman (PB) 试验对枯草芽胞杆菌的发酵条件进行了细致的优化。经过优化后 MK-7 的产量显著提升至 94.66 mg/L^[79]。

番茄红素是一种脂溶性类胡萝卜素色素，可以有效地清除自由基，还可以调节细胞凋亡和提高免疫力，通过在枯草芽胞杆菌基因组上异源表达番茄红素合成必需基因，总共操纵了涉及番茄红素生物合成途径的 13 个关键基因，产量目前达到 0.79 mg/L^[93]，还开发了富含番茄红素的新型功能性酸奶，具有极高的抗氧化能力^[94]。

叶酸(folic acid)是多种细胞代谢途径中的重要生物分子。甲基四氢叶酸(N5-methyltetrahydrofolic acid)是叶酸在人体内的唯一活性形式，也是唯一可以通过血脑屏障

预防和治疗神经系统相关疾病的叶酸形式, 叶酸缺乏会导致各种疾病, 包括巨幼细胞贫血、神经管缺陷和心血管疾病。研究者在枯草芽胞杆菌中表达了对氨基苯甲酸合酶(*pabAB*)和氨基脱氧分枝酸裂解酶(*pabC*), 过表达 *guaA* 和 *folBK* 这 2 个基因, 并对枯草芽胞杆菌进行转录分析, 枯草芽胞杆菌 B114 菌株中 5-MTHF 产量最高为(3.41±0.10) mg/L, 产率为 0.21 mg/(L·h), 是微生物合成的最高水平^[21]。

核黄素(riboflavin)是一种重要的维生素, 广泛应用于食品、制药和饲料工业。近年有研究利用遗传和代谢工程对枯草芽胞杆菌菌株进行改良, 提高菌株生产力, 达到 350 mg/L^[95], 然而, 由于细胞内代谢流量不平衡导致前体供应不足, 限制了工业菌株核黄素的合成, 而利用枯草芽胞杆菌通过协调多个基因的表达来平衡细胞内代谢流, 最终工程菌株的核黄素滴度提高 59.27%, 达到 11.77 g/L^[25]。

化学合成法合成维生素等保健品, 成本高、周期长且副作用副产物多, 利用天然安全的微生物平台是首选, 优化产品的代谢途径和开发高效的适配元件仍是提升产量的关键, 利用枯草芽胞杆菌产保健品具有庞大的市场与潜力。

3.4 中药材应用

枯草芽胞杆菌发酵可改变山茱萸^[96]、薏苡^[23]和人参^[81]等中药材的品质。利用枯草芽胞杆菌对中药材山茱萸进行发酵, 均能显著提高发酵后发酵液中没食子酸的含量^[96], 薏苡作为传统中药, 一直被用于滋补食品, 富含多种营养素, 而枯草芽胞杆菌 BJ3-2 则实现了枯草芽胞杆菌发酵薏米产品中高产川芎嗪(*ligustrazine*)、纤溶酶等生物活性成分的生物转化, 甲氧苄啉(*trimethoprim*)产量为 6.93 mg/g^[23], 同时在枯草芽胞杆菌 LM 4-2 中可达到人参皂苷 Rd 的产量提升, 条件优化后产量可达到(6.375±0.006) mg/g^[81]。

橙皮苷是一种黄酮苷, 在柑橘皮中含量丰富并且具有广泛的药理特性, 在食品、医药和保健品中都有广阔的应用前景, 具有保护心脏、降血脂、降压和抗炎作用, 同样也是一种天然抗氧化剂, 已被用作化妆品中的抗氧化成分, 保护皮肤免受紫外线辐射。从枯草芽胞杆菌中表达环糊精葡萄糖基转移酶, 对启动子和信号肽进行了筛选优化, 酶活力提高至 46.5 U/mL, 提高 8.7 倍, 为 α -单糖橙皮苷的规模化生产提供了一种普遍适用的方法^[97]。

随着枯草芽胞杆菌在膳食补充剂、食品和饮料中的日益普及, 其安全性评估也很重要。针对用作膳食补充剂以及食品和饮料的菌株枯草芽胞杆菌 MB40, 研究者在体外和体内研究中对其安全性和耐受性进行了评估。根据基因组测序、菌株特性、筛选不良属性, 以及通过对大鼠和人类进行安全评估研究后表明该菌株不会对人类健康造成任何负面影响^[98]。

利用枯草芽胞杆菌发酵食品及中药材可以使维生素 A 和类胡萝卜素的含量^[99], 以及酪氨酸酶抑制和抗氧化活性显著增加^[100], 是改善食品和传统中草药品质成分的一种很有潜力的方法。这项研究有助于更好地理解枯草芽胞杆菌发酵改变中药有效成分水平的机制, 改善中药的功能成分。

4 农业领域的应用

枯草芽胞杆菌优良的特性在动物饲养(鱼、猪和禽类)和防治植物疾病中都得到了广泛的应用。枯草芽胞杆菌能改善吉富罗非鱼幼鱼^[101]等的抗氧化功能和肉质, 利用其发酵黄芪制剂添加至杂交鲟的饲料, 可提高抵抗链球菌(*Streptococcus*)感染的的能力^[102], 另外可促进肉仔鸡的生长发育^[103]等。

枯草芽胞杆菌还对一些植物疾病有良好的

防治作用,例如马铃薯疮痂病^[104]、猕猴桃软腐病^[105]、百香果叶枯病^[106]、辣椒枯萎病^[107]、藜麦霜霉病^[108]、桃白粉病^[109]和茶焦腐病病原菌^[110]等。枯草芽胞杆菌 CTXW7-6-2 能够产生活性物质对引起猕猴桃软腐病的病原菌-葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.)和链格孢(*Alternaria alternata*)的菌丝产生生长抑制,抑制率分别为 81.76%、69.80%和 32.03%^[105]。菌株 *B. subtilis* GUCC4 则对球形黑孢菌(*Nigrospora sphaerica*)引起的百香果叶枯病有显著的防治作用且具有积极调节百香果生化特性并产生促进植物生长作用的潜力^[106]。枯草芽胞杆菌 10-4 可防止镉诱导的光合色素 Chla、Chlb 和类胡萝卜素的降解,所以可以减轻镉对小麦的毒害效应^[111]。

5 枯草芽胞杆菌的经济价值与改造手段

5.1 经济价值解读

根据模拟实验数据显示,仅利用枯草芽胞杆菌生产脂肪酶,年产量可达 1 689.6 kg,年总运营成本为 16 021 000 美元,投资回收期约为 1.37 年^[112]。这证明了利用枯草芽胞杆菌生产高价值酶制剂,如工业脂肪酶,具有可观的经济可行性和潜力。其他数据显示,在 2020 年的 4 个月中,全球进口了超过 1 840 万美元的枯草芽胞杆菌相关制品,主要以微囊剂剂和可湿性粉剂为主;中国、印度和美国是全球主要的枯草芽胞杆菌生产国,分别出口了 170 万、274 万和 107 万美元的产品^[113]。全球最大的枯草芽胞杆菌进口国是越南,其次是俄罗斯、秘鲁、美国 and 瑞士等国家。据报道,2022 年全球和中国枯草芽胞杆菌市场规模分别为 4.86 亿元人民币和 1.87 亿元人民币,预计到 2028 年,全球枯

草芽胞杆菌市场规模将达到 8.22 亿元人民币,年复合增长率为 8.9%^[114]。

5.2 改造手段

枯草芽胞杆菌具有较高的稳定性和可操作性,由于其具有遗传可控性,对其进行遗传改造可以为定向合成有价值的化合物提供可能。目前针对枯草芽胞杆菌的代谢工程技术主要体现在以下几个方面。(1) 启动子工程。通过优化筛选内源启动子的表达水平,构建合成启动子文库^[115],可实现更精准的表达,除了使用天然启动子,还可构建双重启动子^[116]以降低渗漏表达,构建合成启动子还可增强启动子的特异性和降低启动子之间的影响^[117]。目前,枯草芽胞杆菌常用启动子的有组成型启动子 *P43*、诱导型启动子 *PxyIA* 和固定相启动子 *Psrfa* 等。在野生型启动子 *Pylb* 的基础上,通过改进-35、-10 区和上游序列,开发的强启动子 NBP3510 可以优化枯草芽胞杆菌单拷贝表达盒高效生产外源蛋白^[118]。(2) 途径酶组装。常用的途径酶组装策略主要有无支架酶组装、DNA 支架、RNA 支架和蛋白支架^[119]等外源引入合成途径。(3) 辅因子工程。通过增强辅因子生产途径并重构其生成途径^[120],调控底物转运效率和辅因子再生效率^[121],以实现辅因子利用的最大化。(4) 基因编辑技术。可利用基因敲除、基因敲入、基因突变、碱基编辑技术^[122]和基因组长片段编辑技术^[123]等技术对底盘细胞进行精确而定向的改造。最近创制的枯草芽胞杆菌新型碱基编辑器 BEs,它有效解决了编辑窗口有限的问题,能够在枯草芽胞杆菌中实现高效且广泛的碱基编辑^[124]。此外,不同类型的基因编辑系统,如单质粒基因编辑系统、双质粒基因编辑系统^[125]及基因组整合技术,构建了高效便捷的基因操作工具。在 CRISPR-Cas9 系统中,也可开发不同的核酸酶,筛选 Cas9 的编辑变体如 SpRY,基于 SpRY 的

腺嘌呤碱基编辑器(PLABE)、胞嘧啶碱基编辑器(PLCBE)和腺嘌呤胞嘧啶碱基编辑器(PLACBE),在枯草芽胞杆菌中可以打破前间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)的限制,能够编辑基因组中几乎所有的腺嘌呤和胞嘧啶,在高活性位点的编辑效率可达100%^[85]。枯草芽胞杆菌还有多位点整合新方法,使用携带特异高效靶位点的单个CRISPR-Cas9质粒,能够同时插入最多3个基因拷贝,为构建无标记、无质粒、高表达稳定的枯草芽胞杆菌提供了可能^[126]。在其他方面,引入来源于*PmalA*操纵子基于*malO*的遗传工具箱,能够实现严格、稳健和同质的基因调控^[127],从而显著提高枯草芽胞杆菌外源蛋白的分泌效率。

尽管枯草芽胞杆菌在底盘改造及代谢工程方面取得了显著进展,仍面临外源基因的稳定性和外源蛋白对宿主的影响等问题,综上所述,枯草芽胞杆菌的改造主要以CRISPR基因编辑系统为基础,结合启动子工程、酶工程、辅因子工程和遗传密码拓展(genetic code expansion, GCE)^[128]等多种手段,同时可通过优化发酵培养基、整合激活因子、敲除竞争途径及强化前体供应^[129]等策略,显著提升枯草芽胞杆菌生产化合物的产量、得率和生产强度。

6 结论与展望

随着科学技术的不断发展,枯草芽胞杆菌将在抑菌和抗氧化等医药领域,以及功能性饮品和食品领域中展现出更广阔的未来趋势。

首先,枯草芽胞杆菌作为一种抑菌剂,具有对人畜相对绿色安全、环境兼容性优良、不易产生抗药性等优势,更符合现代社会对农业生产有害生物综合防治的需求。另外,关于枯草芽胞杆菌抗菌物质的分离纯化、抗菌作用的分子机制等也已有丰富的研究,具有重要的

理论意义和指导生产的价值。随着人们对健康的关注度增加,保健品市场蓬勃发展。利用枯草芽胞杆菌合成抗氧化物和维生素等具有保健作用的产物,制成有效的保健品胶囊,可以提供给人们更安全有效的营养物质。此外,虽然枯草芽胞杆菌具有强大的产糖能力,可以将纤维素等废弃物转化为功能性糖类物质,但其产量和应用仍相对较少。未来应重点关注枯草芽胞杆菌作为绿色健康的生物反应器在稀有糖生产方面的潜力。

为了推动其在医药和功能性食品领域的应用,将来关于枯草芽胞杆菌的研究应集中在优化生产工艺、降低生产成本,并充分发挥其增强免疫功能和抗氧化性能的特点。通过深入研究和技术创新,枯草芽胞杆菌有望在功能性糖、脂蛋白、保健品等领域发挥更大潜力,为生物工程领域带来新的发展机遇。

REFERENCES

- [1] 闫子祥, 杨然, 李秀婷. 微生物表达系统研究进展[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 126-135.
YAN ZX, YANG R, LI XT. Advances in microbial expression system[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 126-135 (in Chinese).
- [2] 王杰, 王晨, 杜燕, 徐晶玉, 班睿. 枯草芽胞杆菌表达和分泌异源蛋白的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2815-2826.
WANG J, WANG C, DU Y, XU JY, BAN R. Advances in heterologous protein expression and secretion of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2815-2826 (in Chinese).
- [3] YOSHIDA KI, van DIJL JM. Engineering *Bacillus subtilis* cells as factories: enzyme secretion and value-added chemical production[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020, 25(6): 872-885.
- [4] CAI D, RAO Y, ZHAN Y, WANG Q, CHEN S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(6): 1632-1642.

- [5] MITAL S, CHRISTIE G, DIKICIOGLU D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 208.
- [6] KHLBODAROVA TM, BOGACHEVA NV, ZADOROZHNY AV, BRYANSKAYA AV, VASILIEVA AR, CHESNOKOV DO, PAVLOVA EI, PELTEK SE. *Komagataella phaffii* as a platform for heterologous expression of enzymes used for industry[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(2): 346.
- [7] VIEIRA GOMES AM, SOUZA CARMO T, SILVA CARVALHO L, MENDONÇA BAHIA F, PARACHIN NS. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production[J]. *Microorganisms*, 2018, 6(2): 38.
- [8] BAGHBAN R, FARAJNIA S, RAJABIBAZL M, GHASEMI Y, MAFI A, HOSEINPOOR R, RAHBARNIA L, ARIA M. Yeast expression systems: overview and recent advances[J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(5): 365-384.
- [9] GU Y, XU XH, WU YK, NIU TF, LIU YF, LI JH, DU GC, LIU L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 109-121.
- [10] ZHANG X, TONG YJ, WANG J, LYU XM, YANG RJ. Screening of a *Bacillus subtilis* strain producing both nattokinase and milk-clotting enzyme and its application in fermented milk with thrombolytic activity[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(9): 9437-9449.
- [11] 刘汉焱, 缪礼鸿, 杜薇, 张恩华, 刘蒲临. 嗜碱碱性卤杆菌蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达和优化[J]. *食品与发酵工业*, 2023: 1-9.
LIU HY, MIAO LH, DU Wei, ZHANG EH, LIU PL. Optimization and secretory expression of the alkaline protease derived from *Alkalihalobacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023: 1-9 (in Chinese).
- [12] CUI X, JIANG YC, CHANG LY, MENG L, YU JH, WANG C, JIANG XL. Heterologous expression of an agarase gene in *Bacillus subtilis*, and characterization of the agarase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120(Pt A): 657-664.
- [13] SONG YC, ZHANG YS, HE M, LIU H, HU CY, YANG LZ, YU P. Enhancing the production of poly- γ -glutamate in *Bacillus subtilis* ZJS18 by the heat and osmotic shock and its mechanism[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2020, 50(10): 1023-1030.
- [14] ZHOU MJ, WU J, HU LX, HU WS, HUANG JB, HUANG XL, GAO XL, LUO YN, XUE ZL, LIU Y. Enhanced vitamin K2 production by engineered *Bacillus subtilis* during leakage fermentation[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2023, 39(8): 224.
- [15] GAO GR, HOU ZJ, DING MZ, BAI S, WEI SY, QIAO B, XU QM, CHENG JS, YUAN YJ. Improved production of fengycin in *Bacillus subtilis* by integrated strain engineering strategy[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(12): 4065-4076.
- [16] YANG H, YANG JN, LIU C, LV XQ, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J, LIU YF. High-level 5-methyltetrahydrofolate bioproduction in *Bacillus subtilis* by combining modular engineering and transcriptomics-guided global metabolic regulation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(19): 5849-5859.
- [17] JIN P, LIANG ZG, LI H, CHEN CX, XUE Y, DU QZ. Biosynthesis of low-molecular-weight mannan using metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117115.
- [18] WEN AY, XIE CZ, MAZHAR M, WANG CX, ZENG HY, QIN LK, ZHU Y. Tetramethylpyrazine from adlay (*Coix lacryma-jobi*) biotransformation by *Bacillus subtilis* and its quality characteristics[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(11): 4092-4102.
- [19] 黄燕, 冯劲, 周刚, 王玲玲, 谢小保, 施庆珊, 张琦. 原油污染土壤中生物表面活性剂菌株的筛选和产物鉴定[J]. *微生物学报*, 2023, 63(3): 1060-1071.
HUANG Y, FENG J, ZHOU G, WANG LL, XIE XB, SHI QS, ZHANG Q. Screening and product identification of biosurfactant producing strains in crude oil-contaminated soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 1060-1071 (in Chinese).
- [20] YOU JJ, DU YX, PAN XW, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. Increased production of riboflavin by coordinated expression of multiple genes in operons in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(5): 1801-1810.
- [21] ZHANG GY, AN YF, ZABED HM, YUN JH, PARVEZ A, ZHAO M, ZHANG CS, RAVIKUMAR Y, LI J, QI XH. Rewiring *Bacillus subtilis* and bioprocess optimization for oxidoreductive reaction-mediated biosynthesis of D-tagatose[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 389: 129843.
- [22] AMJAD ZANJANI FS, AFRASIABI S, NOROUZIAN D, AHMADIAN G, ALI HOSSEINZADEH S, FAYAZI BARJIN A, COHAN RA, KERAMATI M. Hyaluronic

- acid production and characterization by novel *Bacillus subtilis* harboring truncated Hyaluronan Synthase[J]. *AMB Express*, 2022, 12(1): 88.
- [23] MO F, CAI DB, HE PH, YANG F, CHEN YZ, MA X, CHEN SW. Enhanced production of heterologous proteins via engineering the cell surface of *Bacillus licheniformis*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(12): 1745-1755.
- [24] MECHRI S, ZARAÏ JAOUADI N, BOUACEM K, ALLALA F, BOURAOU A, FERARD C, REKIK H, NOIRIEL A, ABOUSALHAM A, BOUANANE-DARENFED A, HACÈNE H, LEDERER F, BACIOU L, JAOUADI B. Cloning and heterologous expression of subtilisin SAPN, a serine alkaline protease from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2AT in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 105: 27-41.
- [25] ULLAH N, MUJADDAD-UR-REHMAN M, SARWAR A, NADEEM M, NELOFER R, IRFAN M, IDREES M, ALI U, NAZ S, AZIZ T. Effect of bioprocess parameters on alkaline protease production by locally isolated *Bacillus cereus* AUST-7 using tannery waste in submerged fermentation[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023: 2190-6823.
- [26] SHARMA KM, KUMAR R, PANWAR S, KUMAR A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties[J]. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2017, 15(1): 115-126.
- [27] MRUDULA S. A review on microbial alkaline proteases: optimization of submerged fermentative production, properties, and industrial applications[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2024: 60: 383-401.
- [28] YANG SM, LI JC, MENG R, YU TT, WANG ZJ, XIONG P, GAO ZQ. Screening and identification of genes involved in β -alanine biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2023, 743: 109664.
- [29] ZHANG R, ZHENG LH, ZHOU LC, XIANG LB, JIANG B, ZHANG T, CHEN JJ. Characterization of alkaline *Bacillus amyloliquefaciens* γ -glutamyltranspeptidase expressed in *Bacillus subtilis* and its application in enzymatic synthesis of L-Theanine[J]. *Process Biochemistry*, 2023, 131: 125-132.
- [30] WANG MZ, XU MJ, RAO ZM, YANG TW, ZHANG X. Construction of a highly efficient *Bacillus subtilis* 168 whole-cell biocatalyst and its application in the production of L-ornithine[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(11): 1427-1437.
- [31] 刘浩. L-天冬氨酸 α -脱羧酶的挖掘、改造及在催化合成 β -丙氨酸中的应用[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2023.
- LIU H. Gene mining and molecular modification of L-aspartate α -decarboxylase and its application in catalytic synthesis of β -alanine[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [32] ZAFAR SU, ZHANG WC, YANG S, LI SL, ZHANG YY, ZHANG Y, ZHANG H, ZHOU HQ. Beta-alanine as a dual modification additive in organic solar cells[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2023, 44(9): 171-183.
- [33] 曹雅蒙, 郭淑元. 芽胞杆菌中重组蛋白分泌表达的优化策略及研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3095-3105.
- CAO YM, GUO SY. Optimization strategy and research progress of recombinant protein secretory expression in *Bacillus*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3095-3105 (in Chinese).
- [34] 吴芳彤, 王力源, 秦梦, 赵露, 郑翔, 刘春卯, 曹倩荣. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的固定化及应用的研究[J]. *皮革与化工*, 2023, 40(4): 8-14, 44.
- WU FT, WANG LY, QIN M, ZHAO L, ZHENG X, LIU CM, CAO QR. Immobilization of neutral protease from *Bacillus subtilis* and its application[J]. *Leather and Chemicals*, 2023, 40(4): 8-14, 44 (in Chinese).
- [35] 李振, 崔艳红, 刘长忠, 袁梦. 枯草芽孢杆菌对环境耐受性和产中性蛋白酶能力研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2024(4): 81-87, 92.
- LI Z, CUI YH, LIU CZ, YUAN M. Study on environmental tolerance and neutral protease production capability of *Bacillus subtilis*[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2024(4): 81-87, 92 (in Chinese).
- [36] CUI JN, HU W, LIU YX, LI YL, HU JH, LIU ZY, CHEN JH. Isolation and screening of high-yielding α -amylase mutants of *Bacillus subtilis* by heavy ion mutagenesis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(1): 68-85.
- [37] 陈童锦悦, 覃绍敏, 韦珏, 刘金凤, 陈凤莲, 许力士, 梁晶, 兰干球, 吴健敏. 竹鼠源产纤维素酶枯草芽孢杆菌的生物学特性研究及安全性初步评价[J]. *中国畜牧杂志*, 2024, 60(3): 201-206.
- CHEN T, QIN SM, WEI J, LIU JF, CHEN FL, XU LS, LIANG J, LAN GQ, WU JM. Study on biological characteristics and preliminary safety evaluation of *Bacillus subtilis* producing cellulase from bamboo and mouse[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2024,

- 60(3): 201-206 (in Chinese).
- [38] 毛泽敬, 张祖政, 陈铭, 望松柏, 牛硕, 余华顺, 张彦, 郑贤良. 基于启动子和信号肽优化提高谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1536-1549.
- MAO ZJ, ZHANG ZZ, CHEN M, WANG SB, NIU S, YU HS, ZHANG Y, ZHENG XL. Promoter and signal peptide optimization increases the secretory expression of glutaminase in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1536-1549 (in Chinese).
- [39] 陶政宇, 付刚, 闻建平, 张大伟. 肌酐酶在枯草芽孢杆菌中的异源表达及分泌机制[J]. 化工进展, 2020, 39(4): 1458-1468.
- TAO ZY, FU G, WEN JP, ZHANG DW. Secretion exploration and heterologous expression of creatininase in *Bacillus subtilis*[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, 39(4): 1458-1468 (in Chinese).
- [40] 陈慧玲, 沈浩天, 姜晨, 李宪臻, 郭小宇. 食品安全菌生产蔗糖异构酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2023, 40(5): 88-93.
- CHEN HL, SHEN HT, JIANG C, LI XZ, GUO XY. Research progress of sucrose isomerase in food-safe bacteria[J]. Journal of Biology, 2023, 40(5): 88-93 (in Chinese).
- [41] XU MY, QU YN, LI H, TANG SQ, CHEN CY, WANG YZ, WANG HB. Improved extraction yield, water solubility, and antioxidant activity of lentinan from *Lentinula edodes* via *Bacillus subtilis* natto fermentation[J]. Fermentation, 2023, 9(4): 333.
- [42] 胡扬帆, 王雨露, 费康清, 俞姝瑶, 高雅慧, 李子杰. 枯草芽孢杆菌全细胞转化高效合成 D-阿洛酮糖[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(5): 76-84.
- HU YF, WANG YL, FEI KQ, YU SY, GAO YH, LI ZJ. Efficient synthesis of D-allulose by *Bacillus subtilis* whole cell transformation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(5): 76-84 (in Chinese).
- [43] KHODAVIRDIPOUR A, CHAMANROKH P, ALIKHANI MY, ALIKHANI MS. Potential of *Bacillus subtilis* against SARS-CoV-2- a sustainable drug development perspective[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 718786.
- [44] DENG J, LI YF, ZHANG JH, YANG Q. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets[J]. Research in Veterinary Science, 2013, 94(1): 62-68.
- [45] 李云锋, 邓军, 张锦华, 杨倩. 枯草芽孢杆菌对仔猪小肠局部天然免疫及 TLR 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4): 562-566.
- LI YF, DENG J, ZHANG JH, YANG Q. The effects of *Bacillus subtilis* on local innate immune and expression of TLR of pigs[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2011, 42(4): 562-566 (in Chinese).
- [46] 张元鹏, 侯立婷, 杜露平, 于晓明, 李兰, 杨利, 张浩明, 王义伟, 乔绪稳, 程海卫, 秦竹, 陈瑾, 郑其升. CTA1-DD 蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(9): 42-46.
- ZHANG YP, HOU LT, DU LP, YU XM, LI L, YANG L, ZHANG HM, WANG YW, QIAO XW, CHENG HW, QIN Z, CHEN J, ZHENG QS. Secretion and expression of CTA1-DD protein in *Bacillus subtilis*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 55(9): 42-46 (in Chinese).
- [47] 李志会, 李鹏, 岳盈盈, 宋楠楠, 纪璇, 曹银光, 孟红. 枯草芽孢杆菌芽孢佐剂免疫途径及效果的动物实验观察[J]. 山东医药, 2013, 53(27): 1-3.
- LI ZH, LI P, YUE YY, SONG NN, JI X, CAO YG, MENG H. Experimental study on immunization route and effect of bacillus subtilis spores as mucosal adjuvant[J]. Shandong Medical Journal, 2013, 53(27): 1-3 (in Chinese).
- [48] HALAMI PM, STEIN T, CHANDRASHEKAR A, ENTIAN KD. Maturation and processing of SpaI, the lipoprotein involved in subtilin immunity in *Bacillus subtilis* ATCC 6633[J]. Microbiological Research, 2010, 165(3): 183-189.
- [49] STEIN T, HEINZMANN S, DÜSTERHUS S, BORCHERT S, ENTIAN KD. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(3): 822-828.
- [50] 吴立婷, 黄偲偲, 张辉, 余祖功, 包红朵, 王永娟. 复合噬菌体与枯草芽孢杆菌对肠道产气荚膜梭菌的抑制效果及免疫代谢功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 985-1001.
- WU LT, HUANG SS, ZHANG H, YU ZG, BAO HD, WANG YJ. Compound and *Bacillus subtilis* inhibit intestinal *Clostridium perfringens* and improve immunometabolism of microbiota[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 985-1001 (in Chinese).
- [51] 苗永美, 苗翠苹, 于庆才. 枯草芽孢杆菌 BBs-27 发酵液性质及脂肽对黄色镰刀菌的抑菌作用[J]. 生物技术通报, 2023, 39(9): 255-267.
- MIAO YM, MIAO CP, YU QC. Properties of *Bacillus subtilis* strain BBs-27 fermentation broth and the inhibition of lipopeptides against *Fusarium*

- culmorum*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(9): 255-267 (in Chinese).
- [52] 刘湘, 徐蕾, 王纯波, 肖邦定. 枯草芽孢杆菌发酵液对拟柱孢藻的抑制效果及作用方式[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(12): 1889-1898.
- LIU X, XU L, WANG CB, XIAO BD. Inhibitory effect and mechanism of bacillus subtilis fermentation broth on *Cylindrospermopsis raciborskii*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(12): 1889-1898 (in Chinese).
- [53] 唐海峰, 戴昀峰, 扶洋帆, 邹一明, 高占, 盘赛昆, 王文彬, 杨杰, 卞小莹. 枯草芽孢杆菌中 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的抑菌机理[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(2): 419-432.
- TANG HF, DAI YF, FU YF, ZOU YM, GAO Z, PAN SK, WANG WB, YANG J, BIAN XY. Inhibitory mechanism of bacilosarcin B from *Bacillus subtilis* against *Photobacterium damsela*[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(2): 419-432 (in Chinese).
- [54] 胡亚杰, 范啟铃, 李群岭, 周效峰, 丁婷, 汪章勋, 吴峰. 枯草芽孢杆菌 GXHZ16 抑制烟草疫霉病菌的表达谱分析[J]. *中国生物防治学报*, 2024: 1-17.
- HU YJ, FAN QL, LI QL, ZHOU XF, DING T, WANG ZX, WU F. Expression Profiles of *Bacillus subtilis* GXHZ16 against *Phytophthora nicotiana*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2024: 1-17 (in Chinese).
- [55] HAMADA MA, HASSAN RA, ABDU AM, ELSABA YM, ALOUFI AS, SONBOL H, KORANY SM. Bio-fabricated levan polymer from *Bacillus subtilis* MZ292983.1 with antibacterial, antibiofilm, and burn healing properties[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(13): 6413.
- [56] 郭云. 一种枯草芽孢杆菌喷雾剂及其制备方法[Z]. 2021.
- GUO Y. A type of *Bacillus subtilis* spray and its preparation method[Z]. 2021 (in Chinese).
- [57] SASANI M, FATAEI E, SAFARI R, NASEHI F, MOSAYEBI M. Antibacterial effects of iron oxide and silver nanoparticles synthesized by *Bacillus subtilis*: a comparative study[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2021, 231: 340-347.
- [58] 李道明, 王瑛, 陈超, 曾明白, 李倩如, 贾青云, 刘秀丽, 侯勇跃, 范成明, 陈宇红, 胡赞民. 芽孢杆菌几种重要抗菌脂肽研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(5): 1768-1783.
- LI DM, WANG Y, CHEN C, ZENG MB, LI QR, JIA QY, LIU XL, HOU YY, FAN CM, CHEN YH, HU ZM. Advances in several important antimicrobial lipopeptides from *Bacillus* spp.[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(5): 1768-1783 (in Chinese).
- [59] 金清, 肖明. 新型抗菌肽: 表面活性素、伊枯草菌素和丰原素[J]. *微生物与感染*, 2018, 13(1): 56-64.
- JIN Q, XIAO M. Novel antimicrobial peptides: surfactin, iturin and fengycin[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2018, 13(1): 56-64 (in Chinese).
- [60] WEI ZH, SHAN CJ, ZHANG LX, GE DE, WANG Y, XIA XD, LIU XL, ZHOU JZ. A novel subtilin-like lantibiotics subtilin JS-4 produced by *Bacillus subtilis* JS-4, and its antibacterial mechanism against *Listeria monocytogenes*[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2021, 142: 110993.
- [61] LIN H, LU WJ, TSAI G, CHOU CT, HSIAO H, HWANG P. Enhanced anti-inflammatory activity of brown seaweed *Laminaria japonica* by fermentation using *Bacillus subtilis*[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51: 1945-1953.
- [62] ZHU J, WANG SY, WANG C, WANG Z, LUO G, LI JH, ZHAN YY, CAI DB, CHEN SW. Microbial synthesis of bacitracin: recent progress, challenges, and prospects[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(2): 314-322.
- [63] CAULIER S, NANNAN C, GILLIS A, LICCIARDI F, BRAGARD C, MAHILLON J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 302.
- [64] HU YM, NAN F, MAINA SW, GUO J, WU SL, XIN ZH. Clone of plipastatin biosynthetic gene cluster by transformation-associated recombination technique and high efficient expression in model organism *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 288: 1-8.
- [65] DUSSERT E, TOURET M, DUPUIS C, NOBLECOURT A, BEHRA-MIELLET J, FLAHAUT C, RAVALLEC R, COUTTE F. Evaluation of antiradical and antioxidant activities of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 914713.
- [66] HAWARI FL, ALMADEA T, HANANINGSIH K, BAIKUNI A, MALIK A, ARIFANTI AE, RAMADON D, TJAMPAKASARI CR. Development of bacterial cocktail of strains *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus luteus* as active ingredients for skin care formula[J]. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 2023, 34(2): 236-244.
- [67] SINGH G, KUMARI A, MITTAL A, GOEL V, YADAV A, AGGARWAL NK. Cost effective production of poly- β -hydroxybutyrate by *Bacillus subtilis* NG05 using sugar industry waste water[J].

- Journal of Polymers and the Environment, 2013, 21(2): 441-449.
- [68] 周梦洁. 聚谷氨酸合成优势菌株构建及发酵过程优化[D]. 芜湖: 安徽工程大学硕士学位论文, 2023.
ZHOU MJ. Construction of predominant strain for polyglutamic acid synthesis and optimization of fermentation process[D]. Wuhu: Master's Thesis of Anhui Polytechnic University, 2023 (in Chinese).
- [69] 耿鹏, 吴坤, 蔡亚慧, 张继冉. γ -聚谷氨酸的合成及应用[J]. 许昌学院学报, 2019, 38(5): 92-95.
GENG P, WU K, CAI YH, ZHANG JR. Synthesis and application of γ -polyglutamic acid[J]. Journal of Xuchang University, 2019, 38(5): 92-95 (in Chinese).
- [70] SANJUKTA S, RAI AK. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 50: 1-10.
- [71] MI J, XIE C, ZENG L, ZHU ZW, CHEN N, HE QZ, XU XP, XIE HJ, ZHOU JD, LI L, LIAO JL. *Bacillus subtilis* WB800N alleviates diabetic wounds in mice by regulating gut microbiota homeostasis and TLR2[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 133(2): 436-447.
- [72] 李奥运. 牦牛源枯草芽孢杆菌的筛选及对犏牛肠道菌群和代谢的影响[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2023.
LI AY. Screening of yak-derived *Bacillus subtilis* and its effects on intestinal microbiota and metabolism of calving yaks[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [73] ZOU XY, ZHANG M, TU WJ, ZHANG Q, JIN ML, FANG RD, JIANG S. *Bacillus subtilis* inhibits intestinal inflammation and oxidative stress by regulating gut flora and related metabolites in laying hens[J]. Animal: an International Journal of Animal Bioscience, 2022, 16(3): 100474.
- [74] ELSHAGHABEE FMF, ROKANA N, GULHANE RD, SHARMA C, PANWAR H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1490.
- [75] SRIVASTAVA SK, SRINIVASAN S. Intelligent automation-led transformation of clinical data management: a new solution for a smarter biopharma industry[C]//2020 IEEE-HYDCON. September 11-12, 2020. Hyderabad, India. IEEE, 2020: 1-5.
- [76] XIA Y, DU XW, LIU B, GUO SY, HUO YH. Species-specific design of artificial promoters by transfer-learning based generative deep-learning model[J/OL]. Nucleic Acids Research, 2024. DOI: 10.1093/nar/gkae429.
- [77] ZITNIK M, LI MM, WELLS A, GLASS K, GYSI DM, KRISHNAN A, MURALI TM, RADIVOJAC P, ROY S, BAUDOT A, BOZDAG S, CHEN DZ, COWEN LJ, DEVKOTA K, GITTER A, GOSLINE S, GU P, GUZZI PH, HUANG H, JIANG M, et al. Current and future directions in network biology[J/OL]. Bioinformatics Advances, 2023. DOI: 10.1093/bioadv/vbae099.
- [78] MOK WK, TAN YX, LYU XM, CHEN WN. Effects of submerged liquid fermentation of *Bacillus subtilis* WX-17 using okara as sole nutrient source on the composition of a potential probiotic beverage[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(7): 3119-3127.
- [79] 黄友美, 曹盛, 孙一斐, 李诗敏, 夏雪雪, 袁干军. 枯草芽孢杆菌 DC-1 产维生素 K₂ 的发酵条件优化[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(3): 123-130.
HUANG YM, CAO S, SUN YF, LI SM, XIA XX, YUAN GJ. Optimization of fermentation conditions for vitamin K₂ production by *Bacillus subtilis* DC-1[J]. Food Research and Development, 2024, 45(3): 123-130 (in Chinese).
- [80] XIA Y, SUN LC, LIANG ZY, HAN ZR, LI J, GUO YJ, DONG PY, HUO YH, GUO SY. Chromosome segment scanning for gain- or loss-of-function screening (CHASING) and its application in metabolic engineering[J]. bioRxiv. 2024.10.1101/2024.01.31.578163.
- [81] 尤晓颜, 李亚春, 布青云, 任广跃. 枯草芽孢杆菌 LM 4-2 发酵人参芦头生物转化人参皂苷 Rd 的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2024. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.038539.
YOU XY, LI YC, BU QY, REN GY. Study on Biotransformation of Ginsenoside Rd by Fermentation of Ginseng rhizome by *Bacillus subtilis* LM 4-2[J]. Food and Fermentation Industries, 2024. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.038539 (in Chinese).
- [82] 宋伟, 温瑞雪, 罗卓婷, 王鹏, 施琳. 微生物发酵提升燕麦营养品质研究进展[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(7): 228-237.
SONG W, WEN RX, LUO ZT, WANG P, SHI L. Advances in fermentation derived improvements of nutritional function of oats[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(7): 228-237 (in Chinese).
- [83] 张启凤. 加工参数对枯草芽孢杆菌发酵薏仁米纳豆的品质影响及其货架期的预测[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2023.
ZHANG QF. Effect of processing parameters on the quality of coix seed and natto fermented by *Bacillus*

- subtilis* and its shelf life prediction[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2023 (in Chinese).
- [84] LIU Y, SUN LC, HUO YX, GUO SY. Strategies for improving the production of bio-based vanillin[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 147.
- [85] XIA Y, SUN LC, LIANG ZY, GUO YJ, LI J, TANG D, HUO YX, GUO SY. The construction of a PAM-less base editing toolbox in *Bacillus subtilis* and its application in metabolic engineering[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 469: 143865.
- [86] 唐双庆, 鲁慧琪, 李秀丽, 邱怡君, 王敏, 徐媛, 王红波. 枯草芽孢杆菌发酵对豆类中酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(1): 291-300.
- TANG SQ, LU HQ, LI XL, QIU YJ, WANG M, XU Y, WANG HB. Effects of *Bacillus subtilis* fermentation on phenolic compounds and antioxidant activity in legumes[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24(1): 291-300 (in Chinese).
- [87] LEE KH, KIM SH, WOO KS, KIM HJ, CHOI HS, KIM YH, SONG J. Functional beverage from fermented soymilk with improved amino nitrogen, β -glucosidase activity and aglycone content using *Bacillus subtilis* starter[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(5): 1399-1405.
- [88] EL-SAADONY MT, SITOBY MZ, RAMADAN MF, SAAD AM. Green nanotechnology for preserving and enriching yogurt with biologically available iron (II)[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021, 69: 102645.
- [89] PIEWNGAM P, ZHENG Y, NGUYEN TH, DICKEY SW, JOO HS, VILLARUZ AE, GLOSE KA, FISHER EL, HUNT RL, LI B, CHIOU J, PHARKJAKSU S, KHONGTHONG S, CHEUNG GYC, KIRATISIN P, OTTO M. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference[J]. *Nature*, 2018, 562: 532-537.
- [90] KIM BJ, HONG JH, JEONG YS, JUNG HK. Evaluation of two *Bacillus subtilis* strains isolated from Korean fermented food as probiotics against loperamide-induced constipation in mice[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2014, 57(6): 797-806.
- [91] KAHRAMAN B, KORKMAZ K, DAŞTAN D, TOKER OS, DERTLI E, ARICI M. Production and characterization of probiotic jelly candy containing *Bacillus* species[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2023, 17(6): 5864-5873.
- [92] 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.
- [93] LIU Y, CHENG HJ, LI HN, ZHANG YZ, WANG M. A programmable CRISPR/Cas9 toolkit improves lycopene production in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(6): e0023023.
- [94] LUO H, BAO YH, ZHU P. Development of a novel functional yogurt rich in lycopene by *Bacillus subtilis*[J]. *Food Chemistry*, 2023, 407: 135142.
- [95] CHU RH, LI R, WANG C, BAN R. Production of vitamin B2 (riboflavin) by *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2022, 97(8): 1941-1949.
- [96] ZHOU XR, ZHAO YM, DAI L, XU GF. *Bacillus subtilis* and *Bifidobacteria bifidum* fermentation effects on various active ingredient contents in *Cornus officinalis* fruit[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1032.
- [97] ZHOU JW, SHI Y, FANG JY, GAN T, LU YL, ZHU LJ, CHEN XL. Efficient production of α -monoglucosyl hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus subtilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(15): 4803-4813.
- [98] SPEARS JL, KRAMER R, NIKIFOROV AI, RIHNER MO, LAMBERT EA. Safety assessment of *Bacillus subtilis* MB40 for use in foods and dietary supplements[J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 733.
- [99] KICZOROWSKI P, KICZOROWSKA B, SAMOLIŃSKA W, SZMIGIELSKI M, WINIARSKA-MIECZAN A. Effect of fermentation of chosen vegetables on the nutrient, mineral, and biocomponent profile in human and animal nutrition[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 13422.
- [100] LANG BY, ZHAO YQ, YANG R, LIU AZ, RANJITKAR S, YANG LX. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of traditional fermented *Rosa* from Dali Bai communities, Northwest Yunnan, China[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 22700.
- [101] 程远, 黄凯, 黄秀芸, 钟灵香, 武林华, 黄清, 唐丽宁. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、免疫力和抗氧化功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(6): 1503-1512.
- CHENG Y, HUANG K, HUANG XY, ZHONG LX, WU LH, HUANG Q, TANG LN. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, immunity and anti-oxidation function of juvenile genetic improvement of farmed *Tilapia* (GIFT, *Oreochromis*

- niloticus*][J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(6): 1503-1512 (in Chinese).
- [102]戴旭平. 复合益生菌发酵黄芪的制备及应用[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2022.
- DAI XP. The preparation and application of *Astragalus* fermented using composite probiotics[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [103]齐博, 武书庚, 王晶, 齐广海, 张海军, 阎桂玲, 王旭, 董延. 枯草芽孢杆菌对肉仔鸡生长性能、肠道形态和菌群数量的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(6): 1748-1756.
- QI B, WU SG, WANG J, QI GH, ZHANG HJ, YAN GL, WANG X, DONG Y. Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance, intestinal morphology and bacterial enumeration of broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(6): 1748-1756 (in Chinese).
- [104]ZHOU YJ, LI Q, PENG Z, ZHANG J, LI JH. Biocontrol effect of *Bacillus subtilis* YPS-32 on potato common scab and its complete genome sequence analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(17): 5339-5348.
- [105]CHEN TT, ZHANG ZZ, LI WZ, CHEN J, CHEN XT, WANG BC, MA JL, DAI YY, DING HX, WANG WZ, LONG YH. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* CTXW 7-6-2 against kiwifruit soft rot pathogens revealed by whole-genome sequencing and biochemical characterization[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1069109.
- [106]WANG JR, QIN S, FAN RD, PENG Q, HU XJ, YANG L, LIU ZL, BACCELLI I, MIGHELI Q, BERG G, CHEN X, CERNAVA T. Plant growth promotion and biocontrol of leaf blight caused by *Nigrospora sphaerica* on passion fruit by endophytic *Bacillus subtilis* strain GUCC4[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(2): 132.
- [107]赵志祥, 王殿东, 周亚林, 王培, 严婉荣, 严蓓, 罗路云, 张卓. 枯草芽孢杆菌 Ya-1 对辣椒枯萎病的防治及其对根际真菌群落的影响[J]. 生物技术通报, 2023, 39(9): 213-224.
- ZHAO ZX, WANG DD, ZHOU YL, WANG P, YAN WR, YAN B, LUO LY, ZHANG Z. Control of pepper *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* Ya-1 and its effect on rhizosphere fungal microbial community[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(9): 213-224 (in Chinese).
- [108]秦楠, 周建波, 吕红, 任璐, 陈亚蕾, 田森, 殷辉, 赵晓军. 枯草芽孢杆菌对藜麦霜霉病的防治效果及其促生和改善土壤真菌群落作用[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(14): 159-164.
- QIN N, ZHOU JB, LYU H, REN L, CHEN YL, TIAN M, YIN H, ZHAO XJ. Effects of *Bacillus subtilis* strain LF17 on biocontrol of quinoa downy mildew, growth promotion of quinoa and improvement of soil fungal community[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(14): 159-164 (in Chinese).
- [109]李云波, 赵俊武. 枯草芽孢杆菌与解淀粉芽孢杆菌组合对桃白粉病的防治效果[J]. 中国农技推广, 2023, 39(12): 87-88.
- LI YB, ZHAO JW. Control effect of combination of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on peach powdery mildew[J]. China Agricultural Technology Extension, 2023, 39(12): 87-88 (in Chinese).
- [110]陈思琴, 李丽梅, 温明晓, 沙良, 伯年国, 王藤, 赵紫葭, 雷鑫, 陈立佼, 赵明. 茶树附生枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其抑菌特性分析[J]. 分子植物育种, 2023. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231204.1801.034>.
- CHEN SQ, LI LM, WEN MX, SHA G, BAI NG, WANG T, ZHAN ZJ, LEI X, CHEN LJ, ZHO M. Isolation and Identification of Epiphytic *Bacillus subtilis* from *Camellia sinensis* and analysis of its antibacterial characteristics[J]. Molecular Plant Breeding, 2023. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231204.1801.034> (in Chinese).
- [111]MASLENNIKOVA D, KORYAKOV I, YULDASHEV R, AVTUSHENKO I, YAKUPOVA A, LASTOCHKINA O. Endophytic plant growth-promoting bacterium *Bacillus subtilis* reduces the toxic effect of cadmium on wheat plants[J]. Microorganisms, 2023, 11(7): 1653.
- [112]BARADIA H, KUMAR SM, CHATTOPADHYAY S. Techno-economic analysis of production and purification of lipase from *Bacillus subtilis* (NCIM 2193)[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2023, 53(10): 1237-1242.
- [113]徐磊. 枯草芽孢杆菌全方位分析及市场前景展望[EB/OL]. (2021-06-25) [2024-03-05]. <http://www.jsppa.com.cn/news/yanfa/4938.html>.
- XU L. *Bacillus subtilis* comprehensive analysis and market outlook for spore rodenticides[EB/OL]. (2021-06-25) [2024-03-05]. <http://www.jsppa.com.cn/news/yanfa/4938.html> (in Chinese).
- [114]中国枯草芽孢杆菌市场规模及增长分析[EB/OL]. (2023-10-21) [2024-03-05]. https://www.sohu.com/a/730202401_121714480.
- The market size and growth analysis of *Bacillus*

- subtilis* in China[EB/OL]. (2023-10-21) [2024-03-05]. https://www.sohu.com/a/730202401_121714480 (in Chinese).
- [115]de MEY M, MAERTENS J, LEQUEUX GJ, SOETAERT WK, VANDAMME EJ. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering[J]. BMC Biotechnology, 2007, 7: 34.
- [116]KANG HK, JANG JH, SHIM JH, PARK JT, KIM YW, PARK KH. Efficient constitutive expression of thermostable 4- α -glucanotransferase in *Bacillus subtilis* using dual promoters[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(10): 1915-1918.
- [117]YANG S, DU GC, CHEN J, KANG Z. Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4151-4161.
- [118]ZHOU CY, YE B, CHENG S, ZHAO LZ, LIU YX, JIANG JD, YAN X. Promoter engineering enables overproduction of foreign proteins from a single copy expression cassette in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 111.
- [119]吕雪芹, 武耀康, 林璐, 徐显皓, 于文文, 崔世修, 李江华, 堵国成, 刘龙. 枯草芽孢杆菌代谢工程改造的策略与工具[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1619-1636.
- LÜ XQ, WU YK, LIN L, XU XH, YU WW, CUI SX, LI JH, DU GC, LIU L. Strategies and tools for metabolic engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1619-1636 (in Chinese).
- [120]GU Y, LV XQ, LIU YF, LI JH, DU GC, CHEN J, RODRIGO LA, LIU L. Synthetic redesign of central carbon and redox metabolism for high yield production of N-acetylglucosamine in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 51: 59-69.
- [121]DENG JY, GU LY, CHEN TC, HUANG H, YIN XQ, LV XQ, LIU YF, LI N, LIU ZM, LI JH, DU GC, LIU L. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(10): 2418-2427.
- [122]LI MY, HUO YX, GUO SY. CRISPR-mediated base editing: from precise point mutation to genome-wide engineering in nonmodel microbes[J]. Biology, 2022, 11(4): 571.
- [123]TIAN JH, XING BW, LI MY, XU CG, HUO YX, GUO SY. Efficient large-scale and scarless genome engineering enables the construction and screening of *Bacillus subtilis* biofuel overproducers[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(9): 4853.
- [124]HAO WL, CUI WJ, LIU ZM, SUO FY, WU YK, HAN LC, ZHOU ZM. A new-generation base editor with an expanded editing window for microbial cell evolution *in vivo* based on CRISPR-Cas12b engineering[J]. Advanced Science, 2024: e2309767.
- [125]WU YK, LIU YF, LV XQ, LI JH, DU GC, LIU L. CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1817-1825.
- [126]FERRANDO J, FILLUELO O, ZEIGLER DR, PICART P. Barriers to simultaneous multilocus integration in *Bacillus subtilis* tumble down: development of a straightforward screening method for the colorimetric detection of one-step multiple gene insertion using the CRISPR-Cas9 system[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 21.
- [127]FU G, YUE J, LI DD, LI YX, LEE SY, ZHANG DW. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(11): e2119980119.
- [128]XU CG, ZOU Q, TIAN JH, LI MY, XING BW, GONG JL, WANG JY, HUO YX, GUO SY. Simplified construction of engineered *Bacillus subtilis* host for improved expression of proteins harboring noncanonical amino acids[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(2): 583-595.
- [129]王苗苗, 于慧敏, 何欣, 李艳梅, 杨怀宇. 高产表面活性素的重组枯草芽孢杆菌构建及培养优化[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2377-2386.
- WANG MM, YU HM, HE X, LI YM, YANG HY. Construction and optimization of engineered *Bacillus subtilis* for surfactin production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(11): 2377-2386 (in Chinese).