

University of Groningen

## Developing *Bacillus subtilis* as a versatile bioproduct platform for agricultural and pharmaceutical applications

Song, Yafeng

DOI:

[10.33612/diss.168189909](https://doi.org/10.33612/diss.168189909)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Song, Y. (2021). *Developing Bacillus subtilis as a versatile bioproduct platform for agricultural and pharmaceutical applications*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.168189909>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# Chapter 7

**Summary and future perspective**

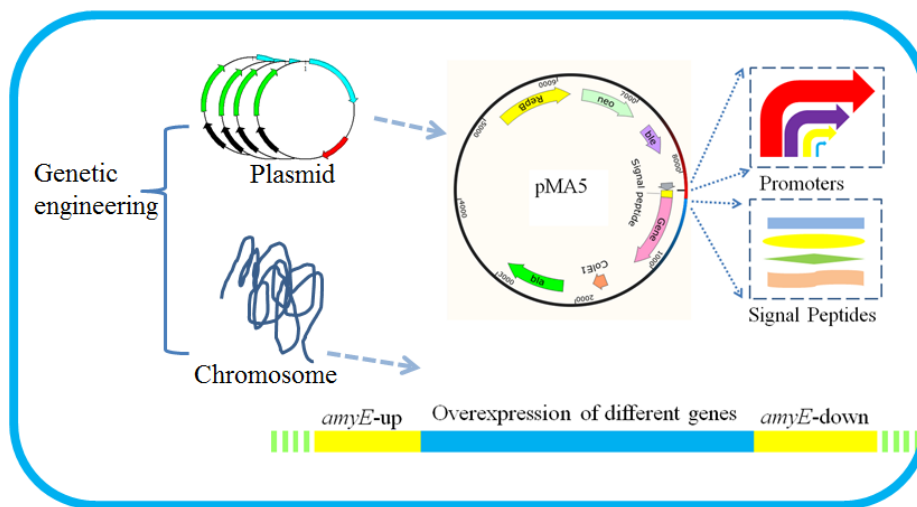
## Summary

Nowadays, the biotechnology industry plays an important role in our everyday life. A continuous demand for microbial platforms with high capacities to produce bio-products at low costs is rapidly increasing. *Bacillus subtilis* is one of the bacterial cell factories, which can challenge these requirements. Not only because its generally regarded as safe status (GRAS), fast growth rate in simple medium, ease of genetic manipulation, *B. subtilis* is also able to secrete proteins in gram per liter ranges due to its high secretion ability.<sup>1</sup> In the first part of this thesis, we introduce how the *B. subtilis* was engineered to produce a high level of  $\beta$ -mannanases.

To degrade the widely existing mannans, which constitutes a major fraction of hemicellulose in softwoods and other plant tissues, the  $\beta$ -mannanases,  $\beta$ -mannosidases and  $\beta$ -glucosidases play important roles as major mannan-degrading enzymes.<sup>2</sup>  $\beta$ -mannanase is responsible for the random hydrolysis of the  $\beta$ -D-1, 4 mannopyranoside linkages in  $\beta$ -1, 4 mannans, one of the most important and representative hemicelluloses. The increased demands of  $\beta$ -mannanase in food, feed, paper and textile industries, attract researchers' attention to use microbes, since the microbial enzymes are easily and economically produced.<sup>3</sup>

The outstanding protein secretion capacity gives *B. subtilis* priority in producing high levels of non-toxic enzymes. As we have proved in **Chapter 2**, it is an excellent host for extracellular  $\beta$ -mannanase production (**Figure 1**). The Sec-dependent signal peptide SP<sub>lipA</sub> confers the highest secretion level among six selected either Sec- or Tat-dependent SPs when fused at the N-terminus of  $\beta$ -mannanase and expressed in plasmid pMA5. Though all these SPs are able to direct the secretion of  $\beta$ -mannanase, the secretion levels are greatly variable. Results indicate that efficient SP alone cannot guarantee unlimited secretion, since bottlenecks might exist during the entire protein synthesis, folding and secretion process. Our subsequent systematic overexpression of each component of Sec-secretory apparatus, signal peptidases, and molecular chaperones demonstrates that an extra copy of *groESL* in the genome of *B. subtilis* could increase the extracellular  $\beta$ -mannanase production to 1.25-fold of the control strain, implying the limiting factor is involved in the protein folding event, which requires assistance from the molecular chaperones. The release of this blockage remarkably smoothes the expression and secretion process, and further optimization of promoters realizes an extra 3.1-fold increase

of  $\beta$ -mannanase level when employing a modified maltose-inducible promoter  $P_{mglv}$ , reaching a final 2207 U/mL after 72h fermentation at shake flask scale.



**Figure 1.** Scheme of combined strategies to improve the secretion of  $\beta$ -mannanase.

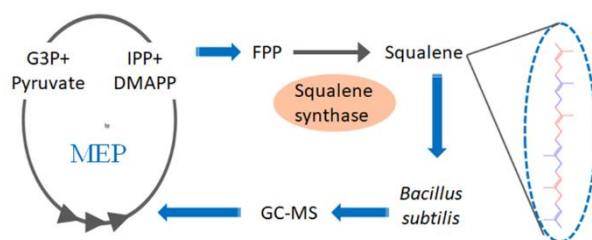
When the secretion machinery components are individually overexpressed, results show no obvious increase in  $\beta$ -mannanase secretion. There is still the possibility that co-overexpression of the secretion components could further enhance the cargo protein secretion by providing extra complete translocons. Also, recent studies suggest that protein production improvement can benefit from optimization of the precise protein folding process.<sup>4</sup> Protein chaperones play an important role in guaranteeing the correct folding of proteins, and it is critical to have enough chaperones to improve the protein synthesis quality.<sup>5</sup> In addition, it is noteworthy that the *groESL* operon is integrated into the genome of *B. subtilis* with only one copy, and it still needs to be confirmed whether more copies of this chaperone will additionally enhance the secretion levels. Moreover, instead of only focusing on the engineering of the protein secretion machinery, it is also necessary to pay attention to the general cell physiology of *B. subtilis*, such as balancing the reducing power of the cytoplasm to facilitate the protein secretion process and reducing the general stress response caused by large-scale protein expression and/or secretion.<sup>1</sup>

For a long time, *B. subtilis* has been developed to produce a large volume of proteins. In recent decades, *B. subtilis* was discovered to be the highest isoprene producer among all the tested microbial species, including *E. coli*.<sup>6</sup> Terpenoids, also known as isoprenoids, are a large group of natural products composed of their hydrocarbon part follow the general

formula  $(C_5H_8)_n$  and the oxygen-containing moieties such as alcohols, aldehydes, or ketones.<sup>7</sup> Regarding functions, many of them have been described to display biological activities, for instance antibacterial, antiviral, antitumor, antiosteoclastic, hepatoprotection, antioxidation and antihypertension. Generally, the production levels of most terpenoids produced by their native plant hosts are extremely low. Moreover, the structural complexity makes it difficult for chemical synthesis on a large-scale. Therefore, the alternative approach of biosynthesis of terpenoids by microbes becomes increasingly prevalent and great accomplishments have been achieved in *E. coli* and yeast.<sup>8,9</sup> Being reported as a high isoprene producer by its endogenous 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, *B. subtilis* has shown very promising advantages in producing different types of terpenoids.<sup>10</sup> In **Chapter 3**, we summarize the metabolic engineering work on *B. subtilis* to produce various terpenoids, and also discuss the current knowledge of MEP pathway enzymes and the subsequent prenyl transferases. In addition, we also overview the current genetic tools and strategies for terpenoid production improvements with some successful examples. Last but not least, we propose some promising strategies for future exploration, hoping to develop *B. subtilis* to an efficient and robust platform for terpenoids' production applied in industry.

As mentioned in **Chapter 3**, the well-known antimalarial and anticancer drugs, artemisinin and paclitaxel, are two successful examples of terpenoid derivatives used in clinical treatments. Their important precursors, amorphadiene (C15) and taxadiene (C20) have been synthesized by *B. subtilis*, with amorphadiene production reaching 416 mg/L after medium optimization and taxadiene production reaching 17.8 mg/L without medium optimization.<sup>11, 12</sup> Except the above mentioned C15 and C20 isoprenoids, many triterpenoids also showed bioactivities such as ginsenoside, ursolic acid and betulinic acids. Triterpenoids contain six isoprene units and their categories include linear, monocyclic, dicyclic and up to pentacyclic skeletons. They exist either in free status, or as esters and glycosides by combination with glycones. In nature, the majority of triterpenoids are derived from the common precursor, the acyclic C30 hydrocarbon squalene, by cyclization and other modifications.<sup>13</sup> Not only as an important intermediate, but squalene also attracts lots of attention due to its antioxidant and nutraceutical properties.

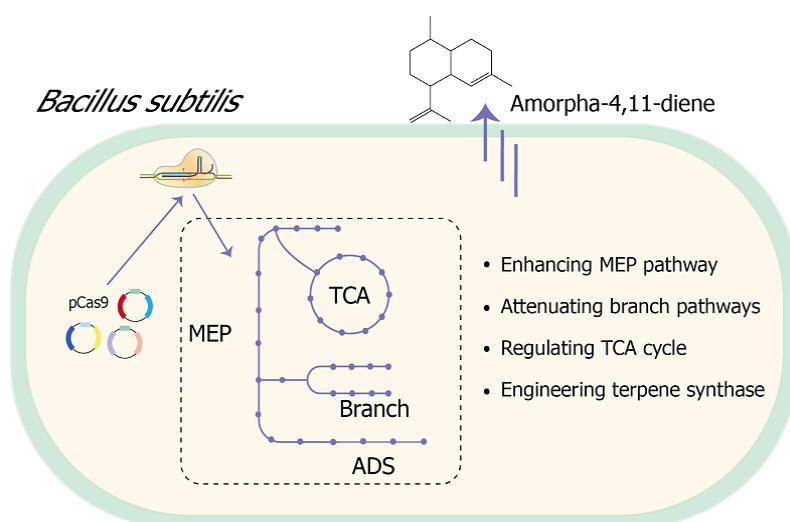
Naturally, squalene synthase (SQS) catalyzes two molecules of farnesyl pyrophosphates (FPP, C<sub>15</sub>) to form squalene. SQSs are widely distributed in different organisms, which show quite low identities at the primary sequence level but high similarities on higher structure levels. Eukaryotic SQSs have been extensively studied, particularly SQS from human beings as promising target for anti-cholesterol drug development, while prokaryotic SQSs are rarely studied.<sup>14</sup> The higher squalene synthesis level observed in *B. subtilis* by BmSQS originated from *Bacillus megaterium* expands the profile of prokaryotic SQSs (**Chapter 4**) (**Figure 2**). Moreover, the relatively low squalene production levels in *B. subtilis* were elevated by screening multiple types of plasmids as SQSs vectors. Both the promoter strengths and plasmid copy numbers affected the final squalene productions. In addition, when higher levels of precursors are provided, higher squalene yields are observed. This is clearly demonstrated by the expression of MEP pathway genes as well as downstream prenyltransferase IspA via low and high copy number plasmids. Although a 29-fold increase of squalene production is achieved by both genetic engineering strategies, the squalene level is still far below the levels produced by *E. coli* and yeast.<sup>15</sup> Further approaches could focus on the protein engineering of SQSs, as expression of terpene synthases has been reported to be problematic. Additionally, introducing the entire heterologous MVA pathway into *B. subtilis* could be another option, as this strategy has been investigated in *E. coli* and resulted a significant improvement in terpenoids' production.<sup>16</sup> Whereas, less endeavors have been reported in *B. subtilis*. Undoubtedly, the successful biosynthesis of squalene in *B. subtilis* makes the first step for producing downstream cyclic triterpenoids.



**Figure 2.** Metabolic engineering work to synthesize and improve the production of squalene in *Bacillus subtilis*.

As exemplified by squalene production in *B. subtilis*, it is noteworthy that metabolic engineering work in *B. subtilis* to improve terpenoids' production mainly focuses on overexpression of MEP pathway genes, selection of terpene synthase expression vectors

and optimization of fermentation conditions.<sup>10</sup> Though more aspects need to be explored, the complicated and time-consuming genetic modification techniques hinder further investigation at the genomic level. The development and application of the CRISPR-Cas9 system in *B. subtilis* provide perfect solutions to solve this problem.<sup>17</sup> Therefore, we established all-in-one plasmid system to perform precise and efficient gene editing at genomic level. Taking amorphaadiene as a readout, we developed a universal strategy to improve terpenoids production in *B. subtilis* (**Figure 3**). This was achieved by systematically exploring different modules to enhance amorphaadiene biosynthesis, including decreasing competing pathways, engineering of terpene synthase and regulation of central metabolic pathway by gene fine-tuning (**Chapter 5**).



**Figure 3. Strategies to improve amorphaadiene production in *Bacillus subtilis*.**

In CRISPR-Cas9 system, the editing templates to repair the Cas9 caused double-strand break could be provided as two forms, either as PCR amplicon or as plasmids. We chose to integrate the editing template into the Cas9 containing plasmid since this has been reported to be more efficient. The editing efficiency of our CRISPR-Cas9 system reached more than 90% when we integrated GFP expression cassette into the *nprE* locus of *B. subtilis* genome and it also enabled the integration of large fragment with 2.5kb length. To perform the next round of genetic engineering, an antibiotic-free condition was used to evict the editing plasmids. This has been demonstrated to be easy and efficient.

The amorphaadiene synthase (ADS) converting FPP to amorphaadiene was fused with GFP (GFPADS) and integrated into the genome of *B. subtilis* to produce amorphaadiene. Our efforts to explore multiple modules to improve amorphaadiene production start with

GFPADS engineering. Two single mutagenesis of ADS (T399S and H448A) and one double mutation (T399SH449A) were introduced into GFPADS but failed to improve amorphaadiene production.<sup>18, 19</sup> Therefore, an extra copy of GFPADS was introduced into *B. subtilis* genome and this resulted in a 27% increase of amorphaadiene titer, thus alleviating synthesis bottleneck from this terpene synthase module. Subsequent competing pathway down-regulation also enhanced amorphaadiene production by 20% compared with the parent strain, and this was achieved by reducing C55 undecaprenyl phosphate (UDPP) synthesis, which is an important precursor for cell wall biosynthesis.<sup>20</sup> Next, we regulated the expression levels of TCA enzymes hunting for candidates that could influence amorphaadiene production. Finally, the combination of useful strategies improved the production of amorphaadiene to 116 mg/L after 48 h fermentation without medium optimization. This demonstrates the importance of engineering host strains through multiple modules.

To systematically engineering the chassis strain for terpenoid production, it is necessary to establish facile, rapid and high-fidelity tools for chromosomal modification. The CRISPR-based engineering tools have provided efficient protocols for genomic fragment deletion, site specific mutation and fragment insertion.<sup>21</sup> In **Chapter 6**, we overview the current development and application of CRISPR-based engineering tools in *B. subtilis*, as well as in other *Bacillus* species, including *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methanolicus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*., *Bacillus smithii* and *Bacillus thuringiensis*. The discovery and mechanism of CRISPR system is described in the first part. Then the three components of this system (gRNA, Cas protein and editing templates) and their influences on editing efficiency are discussed, as well as the deploy strategies of these components. The achievements in gene editing and regulation are introduced with detailed examples, thus giving readers an overview of the up-to-date development and application of this strategy in *B. subtilis*. In the end, potential strategies are suggested hoping to further improve this advanced technique, and provide insights into future directions of CRISPR technologies.

## **Conclusions and future perspective**

Overall, studies of this thesis are aiming at developing *B. subtilis* as a versatile cell factory for producing bio-products. To achieve this goal, we focus on two main types of products, enzyme and terpenoids. The first part is engineering *B. subtilis* to produce high level of



extracellular  $\beta$ -mannanase that could be applied in agricultural fields. The  $\beta$ -mannanase secretion pathway was increased by screening different signal peptides, and overexpressing secretion components and signal peptidase as well as protein chaperones. In addition, the  $\beta$ -mannanase synthesis level was enhanced by selecting strong inducible promoters. We successfully obtained a *B. subtilis* strain with high  $\beta$ -mannanase secretion level by combination of the above strategies. In the second part, we strive for establishing robust *B. subtilis* chassis strains to produce high levels of squalene and amorphaadiene, which are important precursors for pharmaceutical products. The selection of SQS candidates, expression vector comparison, MEP pathway overexpression and fermentation optimization resulted a 29-fold increase of squalene production in *B. subtilis*. In addition, we systematically engineered the MEP pathway module, competitive pathway module, terpene synthase module and TCA cycle module, and successfully improved the extracellular amorphaadiene production in *B. subtilis* from 81mg/L to 116 mg/L after 48 h fermentation at shake flask level.

In the future, the  $\beta$ -mannanase and amorphaadiene strains we created in this study can be used as promising starting strains for further engineering in industrial application. The developed CRISPR-Cas9 system can be used to precisely and efficiently engineer the strains at genomic level. For terpenoids production, the terpene synthase expression level remains to be an important factor that influences the final production of target compounds. Fusion with N-terminal coding sequences and truncation of unnecessary parts could be considered as useful strategies to improve terpene synthase soluble expression.<sup>22</sup> In addition, except for the overexpression of MEP pathway genes, it's also interesting to introduce the heterologous mevalonate (MVA) pathway to *B. subtilis* to evaluate its potential to improve terpenoids production. The overexpression of MVA pathway has significantly boosted the production of various terpenoids in *E. coli* and yeast, but has not been tested in *B. subtilis*. Recently, the artificial isopentenol utilization pathway was found to be able to produce IPP and DMAPP through sequential phosphorylation of isopentenol isomers isoprenol or prenol. This two-step pathway provides a noteworthy alternative to known isoprenoid pathways.<sup>23</sup> The integrated multi-omics data have discovered plenty of interesting targets for future engineering and taking full advantage of these data could significantly benefit the terpenoid production improvements in *B. subtilis*.

## References

- (1) van Dijl, J. M.; Hecker, M., *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact* **2013**, *12*, 3.
- (2) Malgas, S.; van Dyk, J. S.; Pletschke, B. I., A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between beta-mannanase, beta-mannosidase and alpha-galactosidase. *World J Microbiol Biotechnol* **2015**, *31*, 1167-75.
- (3) Dhawan, S.; Kaur, J., Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Rev Biotechnol* **2007**, *27*, 197-216.
- (4) Qi, Q.; Li, F.; Yu, R.; Engqvist, M. K. M.; Siewers, V.; Fuchs, J.; Nielsen, J., Different Routes of Protein Folding Contribute to Improved Protein Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio* **2020**, *11*.
- (5) Westers, L.; Westers, H.; Quax, W. J., *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1694*, 299-310.
- (6) Kuzma, J.; Nemecek-Marshall, M.; Pollock, W. H.; Fall, R., Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Curr Microbiol* **1995**, *30*, 97-103.
- (7) Yazaki, K.; Arimura, G. I.; Ohnishi, T., 'Hidden' Terpenoids in Plants: Their Biosynthesis, Localization and Ecological Roles. *Plant Cell Physiol* **2017**, *58*, 1615-1621.
- (8) Helfrich, E. J. N.; Lin, G. M.; Voigt, C. A.; Clardy, J., Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering. *Beilstein J Org Chem* **2019**, *15*, 2889-2906.
- (9) Paramasivan, K.; Mutturi, S., Progress in terpene synthesis strategies through engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biotechnol* **2017**, *37*, 974-989.
- (10) Pramastya, H.; Song, Y.; Elfahmi, E. Y.; Sukrasno, S.; Quax, W. J., Positioning *Bacillus subtilis* as terpenoid cell factory. *J Appl Microbiol* **2020**.
- (11) Pramastya, H.; Xue, D.; Abdallah, II; Setroikromo, R.; Quax, W. J., High level production of amorphadiene using *Bacillus subtilis* as an optimized terpenoid cell factory. *N Biotechnol* **2021**, *60*, 159-167.
- (12) Abdallah, II; Pramastya, H.; van Merkerk, R.; Sukrasno; Quax, W. J., Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* Toward Taxadiene Biosynthesis as the First Committed Step for Taxol Production. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 218.

- (13) Ghimire, G. P.; Thuan, N. H.; Koirala, N.; Sohng, J. K., Advances in Biochemistry and Microbial Production of Squalene and Its Derivatives. *J Microbiol Biotechnol* **2016**, *26*, 441-51.
- (14) Pandit, J.; Danley, D. E.; Schulte, G. K.; Mazzalupo, S.; Pauly, T. A.; Hayward, C. M.; Hamanaka, E. S.; Thompson, J. F.; Harwood, H. J., Jr., Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 30610-7.
- (15) Schempp, F. M.; Drummond, L.; Buchhaupt, M.; Schrader, J., Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. *J Agric Food Chem* **2018**, *66*, 2247-2258.
- (16) Ye, L.; Zhang, C.; Bi, C.; Li, Q.; Zhang, X., Combinatory optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for beta-carotene production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2016**, *15*, 202.
- (17) Hong, K. Q.; Liu, D. Y.; Chen, T.; Wang, Z. W., Recent advances in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Bacillus subtilis*. *World J Microbiol Biotechnol* **2018**, *34*, 153.
- (18) Abdallah, II; van Merkerk, R.; Klumpenaar, E.; Quax, W. J., Catalysis of amorpho-4,11-diene synthase unraveled and improved by mutability landscape guided engineering. *Sci Rep* **2018**, *8*, 9961.
- (19) Li, J. X.; Fang, X.; Zhao, Q.; Ruan, J. X.; Yang, C. Q.; Wang, L. J.; Miller, D. J.; Faraldos, J. A.; Allemann, R. K.; Chen, X. Y.; Zhang, P., Rational engineering of plasticity residues of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua*: product specificity and catalytic efficiency. *Biochem J* **2013**, *451*, 417-26.
- (20) Zhao, H.; Sun, Y.; Peters, J. M.; Gross, C. A.; Garner, E. C.; Helmann, J. D., Depletion of Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatases Disrupts Cell Envelope Biogenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **2016**, *198*, 2925-2935.
- (21) Choi, K. R.; Lee, S. Y., CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnol Adv* **2016**, *34*, 1180-1209.
- (22) Tian, R.; Liu, Y.; Chen, J.; Li, J.; Liu, L.; Du, G.; Chen, J., Synthetic N-terminal coding sequences for fine-tuning gene expression and metabolic engineering in *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* **2019**, *55*, 131-141.
- (23) Chatzivasileiou, A. O.; Ward, V.; Edgar, S. M.; Stephanopoulos, G., Two-step pathway for isoprenoid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 506-511.

# Hoofdstuk 7

## Samenvatting en toekomstperspectief

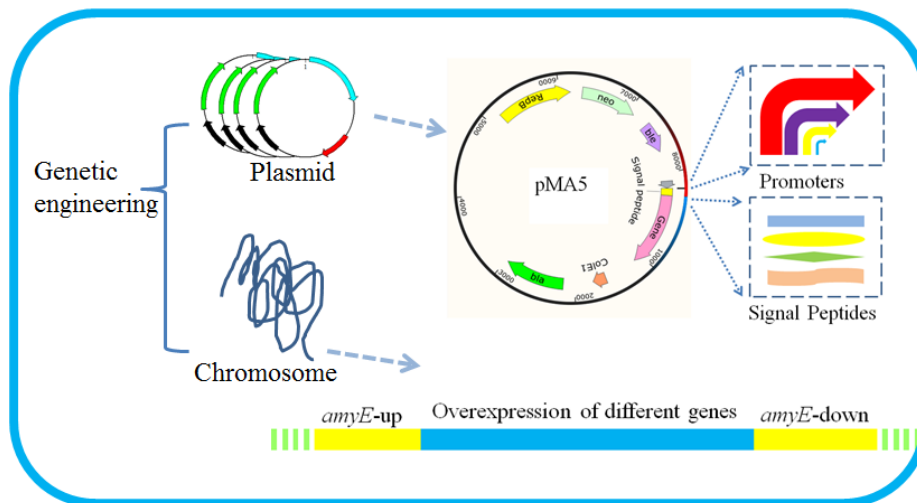
## Overzicht

Tegenwoordig speelt de biotechnologie-industrie een belangrijke rol in ons dagelijks leven. Een continue vraag naar microbiële platforms met hoge capaciteiten om tegen lage kosten bioproducten te produceren, neemt snel toe. *Bacillus subtilis* is een van de bacteriële celfabrieken die deze vereisten kunnen uitdagen. Niet alleen omdat het algemeen wordt beschouwd als een veilige status (GRAS), een snelle groeisnelheid in eenvoudig medium en gemakkelijke genetische manipulatie, *B. subtilis* is ook in staat om eiwitten af te scheiden in gram per liter vanwege het hoge secretievermogen.<sup>1</sup> In het eerste deel van dit proefschrift introduceren we hoe de *B. subtilis* werd ontworpen om een hoog niveau van  $\beta$ -mannanase te produceren.

Om de wijdverbreide mannanen, die een belangrijke fractie van hemicellulose in zacht hout en andere plantenweefsels vormen, af te breken, spelen de  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidasen en  $\beta$ -glucosidasen een belangrijke rol als belangrijke mannan-afbrekende enzymen.<sup>2</sup>  $\beta$ -mannanase is verantwoordelijk voor de willekeurige hydrolyse van de  $\beta$ -D-1,4 mannopyranosidebindingen in  $\beta$ -1, 4 mannanen, een van de belangrijkste en meest representatieve hemicelluloses. De toegenomen eisen van  $\beta$ -mannanase in de voedsel-, voer-, papier- en textielindustrieën trekken de aandacht van onderzoekers om microben te gebruiken, aangezien de microbiële enzymen gemakkelijk en economisch geproduceerd kunnen worden.<sup>3</sup>

Het uitstekende eiwitafscheidingsvermogen geeft *B. subtilis* prioriteit bij het produceren van hoge niveaus van niet-toxische enzymen. Zoals we in **Hoofdstuk 2** hebben aangetoond, is het een uitstekende gastheer voor extracellulaire  $\beta$ -mannanase-productie (**Figuur 1**). Het Sec-afhankelijke signaalpeptide SP<sub>lipA</sub> verleent het hoogste uitscheidingsniveau van zes geselecteerde ofwel Sec- of Tat-afhankelijke SP's wanneer gefuseerd aan de N-terminus van  $\beta$ -mannanase en tot expressie gebracht in plasmide pMA5. Hoewel al deze SP's in staat zijn om de secretie van  $\beta$ -mannanase te sturen, zijn de secretieniveaus sterk variabel. Resultaten geven aan dat efficiënte SP alleen geen onbeperkte secretie kan garanderen, aangezien er tijdens het gehele proces van eiwitsynthese, vouwing en secretie knelpunten kunnen bestaan. Onze daaropvolgende systematische overexpressie van elk onderdeel van het Sec-secretoire apparaat, signaalpeptidasen en moleculaire chaperonnes toont aan dat een extra kopie van *groESL* in het genoom van *B. subtilis* de extracellulaire  $\beta$ -mannanase productie zou kunnen verhogen

tot 1,25-voudig van de controlestam, wat impliceert dat de beperkende factor betrokken is bij de eiwitvouwings gebeurtenis, die hulp van de moleculaire chaperonnes vereist. Het opheffen van deze blokkering maakt het expressie- en secretieproces opmerkelijk glad, en verdere optimalisatie van promotors realiseert een extra 3,1-voudige toename van het  $\beta$ -mannanase-niveau bij gebruik van een gemodificeerde maltose-induceerbare promotor  $P_{mglv}$ , die een uiteindelijke 2207 U/L bereikt na 72 uur fermentatie op schudfles schaal.



**Figuur 1.** Schema van gecombineerde strategieën om de secretie van  $\beta$ -mannanase te verbeteren.

Wanneer de componenten van de secretiemachines afzonderlijk tot overexpressie worden gebracht, laten de resultaten geen duidelijke toename van de secretie van  $\beta$ -mannanase zien. Er is nog steeds de mogelijkheid dat co-overexpressie van de secretie componenten de secretie van ladingeiwit verder zou kunnen verbeteren door extra complete translocons te verschaffen. Ook suggereren recente studies dat verbetering van de eiwitproductie kan profiteren van optimalisatie van het precieze eiwitvouwproces.<sup>4</sup> Eiwit-chaperonnes spelen een belangrijke rol bij het garanderen van de juiste vouwing van eiwitten, en het is van cruciaal belang om voldoende chaperonnes te hebben om de kwaliteit van de eiwitsynthese te verbeteren.<sup>5</sup> Bovendien is het opmerkelijk dat de *groESL*-operon met slechts één kopie in het genoom van *B. subtilis* is geïntegreerd, en het moet nog worden bevestigd of meer exemplaren van deze chaperonne de secretieniveaus extra zullen verhogen. Bovendien is het, in plaats van alleen te focussen op de engineering van de eiwitafscheidings machines, ook aandacht te besteden aan de algemene celfysiologie van *B. subtilis*, zoals het balanceren van het reducerende vermogen van het cytoplasma om het

eiwitafscheidings proces te vergemakkelijken en het verminderen van de algemene stressreactie veroorzaakt door grootschalige eiwitexpressie en/of -secretie.<sup>1</sup>

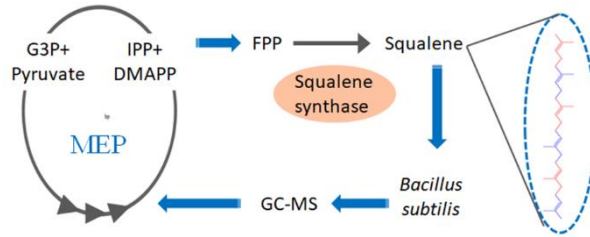
*B. subtilis* is lange tijd ontwikkeld om een groot volume aan eiwitten te produceren. In de afgelopen decennia werd ontdekt dat *B. subtilis* de hoogste isoprene producent is van alle geteste microbiële soorten, waaronder *E. coli*.<sup>6</sup> Terpenoïden, ook bekend als isoprenoïden, zijn een grote groep natuurlijke producten die zijn samengesteld uit hun koolwaterstof gedeelte volgens de algemene formule  $(C_5H_8)_n$  en de zuurstofhoudende delen zoals alcoholen, aldehyden of ketonen.<sup>7</sup> Met betrekking tot functies is beschreven dat veel van hen biologische activiteiten vertonen, bijvoorbeeld antibacterieel, antiviraal, antitumor, anti-osteoclastisch, hepatoprotectie, antioxidatie en antihypertensie. Over het algemeen zijn de productieniveaus van de meeste terpenoïden die door hun inheemse plantengastheren worden geproduceerd extreem laag. Bovendien maakt de structurele complexiteit het moeilijk voor chemische synthese op grote schaal. Daarom komt de alternatieve benadering van biosynthese van terpenoïden door microben steeds vaker voor en zijn er grote prestaties behaald in *E. coli* en gist.<sup>8,9</sup> *B. subtilis* wordt door zijn endogene 2-C-methyl-D-erythritol 4-fosfaat (MEP)-route gerapporteerd als een hoge isoprene producent en heeft veelbelovende voordelen laten zien bij de productie van verschillende soorten terpenoïden.<sup>10</sup> In **Hoofdstuk 3** vatten we het metabole engineering werk van *B. subtilis* samen om verschillende terpenoïden te produceren, en bespreken we ook de huidige kennis van MEP pathway-enzymen en de daaropvolgende prenyltransferases. Daarnaast geven we ook een overzicht van de huidige genetische tools en strategieën voor verbetering van de productie van terpenoïden met enkele succesvolle voorbeelden. Last but not least stellen we enkele veelbelovende strategieën voor toekomstige verkenning voor, in de hoop *B. subtilis* te ontwikkelen tot een efficiënt en robuust platform voor de productie van terpenoïden in de industrie.

Zoals vermeld in **Hoofdstuk 3**, zijn de bekende antimalaria- en antikankermedicijnen, artemisininine en paclitaxel, twee succesvolle voorbeelden van terpenoïderivaten die worden gebruikt in klinische behandelingen. Hun belangrijke voorlopers, amorfadien (C15) en taxadien (C20) zijn gesynthetiseerd door *B. subtilis*, waarbij de amorfadien productie 416 mg/L bereikt na medium optimalisatie en taxadien productie 17,8 mg/L bereikt zonder medium optimalisatie.<sup>11,12</sup> Behalve de bovengenoemde C15- en C20-isoprenoïden, vertoonden veel triterpenoïden ook bio-activiteiten zoals ginsenoside, ursolzuur en

betulinezuur. Triterpenoïden bevatten zes isopreeneenheden en hun categorieën omvatten lineaire, monocyclische, dicyclische en tot pentacyclische skeletten. Ze bestaan óf in vrije toestand, óf als esters en glycosiden in combinatie met glyconen. In de natuur zijn de meeste triterpenoïden afgeleid van de gemeenschappelijke precursor, het acyclische C30 koolwaterstofsqualeen, door cyclisatie en andere modificaties.<sup>13</sup> Niet alleen als belangrijk tussenproduct, maar squaleen trekt ook veel aandacht vanwege zijn antioxiderende en nutraceutische eigenschappen.

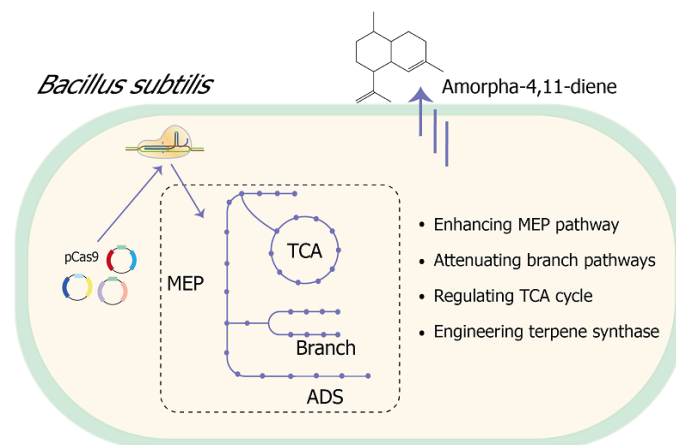
Natuurlijk katalyseert squaleensynthase (SQS) twee moleculen farnesylpyrofosfaten (FPP, C15) om squaleen te vormen. SQS'en zijn wijdverspreid in verschillende organismen, die vrij lage identiteiten vertonen op het primaire sequentieniveau, maar grote overeenkomsten op hogere structuurniveaus. Eukaryote SQS'en zijn uitgebreid bestudeerd, met name SQS van mensen als veelbelovend doelwit voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen cholesterol, terwijl prokaryote SQS'en zelden worden bestudeerd.<sup>14</sup> Het hogere squalene synthese gehalte waargenomen in *B. subtilis* door BmSQS afkomstig van *Bacillus megaterium* vergroot het profiel van prokaryote SQSs (**Hoofdstuk 4**) (**Figuur 2**). Bovendien werden de relatief lage squalene productieniveaus in *B. subtilis* verhoogd door het screenen van meerdere soorten plasmiden als SQSs-vectoren. Zowel de sterke punten van de promotor als de aantallen plasmide-kopieën hadden invloed op de uiteindelijke squalene producties. Bovendien worden hogere opbrengsten van squaleen waargenomen wanneer hogere niveaus van precursors worden verschaft. Dit wordt duidelijk aangetoond door de expressie van MEP-pathway-genen evenals stroomafwaartse prenyltransferase IspA via plasmiden met een laag en een hoog aantal kopieën. Hoewel een 29-voudige toename van squalene productie wordt bereikt door beide genetische manipulatie strategieën, ligt het squaleenniveau nog steeds ver onder het niveau geproduceerd door *E. coli* en gist.<sup>15</sup> Verdere benaderingen zouden zich kunnen richten op de proteïne-engineering van SQS'en, aangezien de expressie van terpeen synthasen problematisch is. Bovendien zou het introduceren van de volledige heterologe MVA-route in *B. subtilis* een andere optie kunnen zijn, aangezien deze strategie is onderzocht in *E. coli* en resulteerde in een significante verbetering van de productie van terpenoïden.<sup>16</sup> Terwijl er minder pogingen zijn gerapporteerd in *B. subtilis*. De succesvolle biosynthese van squaleen in *B. subtilis* maakt ongetwijfeld de eerste stap voor het produceren van stroomafwaartse cyclische triterpenoïden.





**Figuur 2.** Metabole engineering om de productie van squaleen in *Bacillus subtilis* te synthetiseren en te verbeteren.

Zoals geïllustreerd door squaleen productie in *B. subtilis*, is het opmerkelijk dat metabole engineering in *B. subtilis* om de productie van terpenoïden te verbeteren voornamelijk gericht is op overexpressie van MEP-pathway-genen, selectie van terpene synthase-expressie vectoren en optimalisatie van fermentatie omstandigheden.<sup>10</sup> Hoewel er meer aspecten moeten worden onderzocht, belemmeren de gecompliceerde en tijdrovende genetische modificatie technieken verder onderzoek op genomisch niveau. De ontwikkeling en toepassing van het CRISPR-Cas9-systeem in *B. subtilis* bieden perfecte oplossingen om dit probleem op te lossen.<sup>17</sup> Daarom hebben we een alles-in-één plasmide systeem opgezet om nauwkeurige en efficiënte genbewerking op genomisch niveau uit te voeren. Met amorfadieën als uitlezing hebben we een universele strategie ontwikkeld om de productie van terpenoïden in *B. subtilis* te verbeteren (**Figuur 3**). Dit werd bereikt door systematisch verschillende modules te onderzoeken om de biosynthese van amorfadieën te verbeteren, inclusief het verminderen van concurrerende routes, engineering van terpeensynthase en regulering van de centrale metabole route door middel van fijnafstemming van genen (**Hoofdstuk 5**).



**Figuur 3.** Strategieën om de amorfadieënproductie in *B. subtilis* te verbeteren.

In het CRISPR-Cas9-systeem konden de bewerkings sjablonen om de door Cas9 veroorzaakte dubbelstrengsbreuk te repareren als twee vormen worden geleverd, hetzij als PCR-amplicon, hetzij als plasmiden. We hebben ervoor gekozen om de bewerkings sjabloon te integreren in het Cas9-bevattende plasmide, omdat is gemeld dat dit efficiënter is. De bewerkings efficiëntie van ons CRISPR-Cas9-systeem bereikte meer dan 90% toen we de GFP-expressie cassette integreerden in de *nprE*-locus van het *B. subtilis*-genoom en het maakte ook de integratie mogelijk van een groot fragment met een lengte van 2.5 kb. Om de volgende ronde van genetische manipulatie uit te voeren, werd een antibioticumvrije toestand gebruikt om de bewerkings plasmiden te verwijderen. Het is aangetoond dat dit gemakkelijk en efficiënt is.

Het amorfadiëensynthase (ADS) dat FPP omzet in amorfadiëen, werd gefuseerd met GFP (GFPADS) en geïntegreerd in het genoom van *B. subtilis* om amorfadiëen te produceren. Onze inspanningen om meerdere modules te verkennen om de productie van amorfadiëen te verbeteren, beginnen met GFPADS-engineering. Twee enkelvoudige mutagenese van ADS (T399S en H448A) en één dubbele mutatie (T399SH449A) werden geïntroduceerd in GFPADS maar slaagden er niet in de productie van amorfadiëen te verbeteren.<sup>18, 19</sup> Daarom werd een extra kopie van GFPADS geïntroduceerd in het *B. subtilis*-genoom en dit resulteerde in een toename van 27% van de amorfadiëentiter, waardoor het knelpunt van de synthese van deze terpene synthase module werd verlicht. Daaropvolgende concurrerende pathway down-regulatie verhoogde ook de productie van amorfadiëen met 20% in vergelijking met de ouderstam, en dit werd bereikt door de synthese van C55-undecaprenylfosfaat (UDPP) te verminderen, wat een belangrijke precursor is voor de biosynthese van de celwand.<sup>20</sup> Vervolgens hebben we de expressie niveaus gereguleerd van TCA-enzymen die op zoek zijn naar kandidaten die de productie van amorfadiëen zouden kunnen beïnvloeden. Ten slotte verbeterde de combinatie van nuttige strategieën de productie van amorfadiëen tot 116 mg/L na 48 uur fermentatie zonder mediumoptimalisatie. Dit toont het belang aan van het ontwikkelen van hoststammen door middel van meerdere modules.

Om de chassisstam voor de productie van terpenoïden systematisch te ontwerpen, is het noodzakelijk om gemakkelijke, snelle en betrouwbare tools voor chromosomale modificatie te ontwikkelen. De op CRISPR gebaseerde engineering tools hebben efficiënte protocollen opgeleverd voor het verwijderen van genomische fragmenten, plaats specifieke

mutatie en fragmentinvoer.<sup>21</sup> In **Hoofdstuk 6** geven we een overzicht van de huidige ontwikkeling en toepassing van op CRISPR gebaseerde engineering tools in *B. subtilis*, evenals in andere *Bacillus* soorten, waaronder *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methanolicus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii* en *Bacillus thuringiensis*. De ontdekking en het mechanisme van het CRISPR-systeem wordt beschreven in het eerste deel. Vervolgens worden de drie componenten van dit systeem (gRNA, Cas-eiwit en bewerkingssjablonen) en hun invloed op de redactie-efficiëntie besproken, evenals de implementatie strategieën van deze componenten. De verworvenheden op het gebied van genbewerking en-regulatie worden geïntroduceerd met gedetailleerde voorbeelden, waardoor de lezers een overzicht krijgen van de up-to-date ontwikkeling en toepassing van deze strategie in *B. subtilis*. Uiteindelijk worden mogelijke strategieën voorgesteld in de hoop deze geavanceerde techniek verder te verbeteren en inzicht te verschaffen in toekomstige richtingen van CRISPR-technologieën.

### **Conclusies en toekomstperspectief**

Over het algemeen zijn de studies van dit proefschrift gericht op de ontwikkeling van *B. subtilis* als een veelzijdige celfabriek voor het produceren van bioproducten. Om dit doel te bereiken, richten we ons op twee hoofdtypen producten, enzymen en terpenoïden. Het eerste deel is de engineering van *B. subtilis* om een hoog niveau van extracellulair  $\beta$ -mannanase te produceren dat kan worden toegepast in landbouwgebieden. De  $\beta$ -mannanase-uitscheidingsroute werd verhoogd door het screenen van verschillende signaalpeptiden en het tot overexpressie brengen van secretie componenten en signaalpeptidase, evenals eiwitschaperones. Bovendien werd het  $\beta$ -mannanase-synthesegehalte verhoogd door sterke induceerbare promoters te selecteren. We hebben met succes een *B. subtilis*-stam verkregen met een hoog  $\beta$ -mannanase-uitscheidingsniveau door combinatie van de bovenstaande strategieën. In het tweede deel streven we naar het creëren van robuuste *B. subtilis*-chassisstammen om hoge niveaus van squaleen en amorfadien te produceren, die belangrijke voorlopers zijn voor farmaceutische producten. De selectie van SQS-kandidaten, vergelijking van expressieve vectoren, overexpressie van de MEP-route en optimalisatie van fermentatie resulteerden in een 29-voudige toename van squalene productie in *B. subtilis*. Daarnaast hebben we systematisch de MEP-pathway-module, de competitieve pathway-module, de terpene synthase-module en de TCA-cyclus module ontworpen en met succes de extracellulaire

amorfadien productie in *B. subtilis* verbeterd van 81 mg/L naar 116 mg/L na 48 uur fermentatie bij shake kolf niveau.

In de toekomst kunnen de  $\beta$ -mannanase- en amorfadienstammen die we in deze studie hebben gemaakt, worden gebruikt als veelbelovende startstammen voor verdere engineering in industriële toepassingen. Het ontwikkelde CRISPR-Cas9-systeem kan worden gebruikt om de stammen nauwkeurig en efficiënt op genomisch niveau te manipuleren. Voor de productie van terpenoïden blijft het expressieniveau van terpeensynthase een belangrijke factor die de uiteindelijke productie van doelwitverbindingen beïnvloedt. Fusie met N-terminale coderende sequenties en afkappen van onnodige delen kunnen worden beschouwd als nuttige strategieën om de oplosbare expressie van terpeensynthase te verbeteren.<sup>22</sup> Bovendien is het, behalve voor de overexpressie van MEP-pathway-genen, ook interessant om de heterologe mevalonaat (MVA) -route in *B. subtilis* te introduceren om het potentieel ervan om de productie van terpenoïden te verbeteren te evalueren. De overexpressie van de MVA-route heeft de productie van verschillende terpenoïden in *E. coli* en gist aanzienlijk verhoogd, maar is niet getest in *B. subtilis*. Onlangs werd ontdekt dat de kunstmatige route voor het gebruik van isopentenol IPP en DMAPP kan produceren door opeenvolgende fosforylering van isopentenol-isomeren, isoprenol of prenilol. Deze tweestapsroute biedt een opmerkelijk alternatief voor bekende isoprenoïde routes.<sup>23</sup> De geïntegreerde multi-omics-gegevens hebben tal van interessante doelen voor toekomstige engineering ontdekt en ten volle profiteren van deze gegevens zou aanzienlijk kunnen profiteren van de terpenoïde productie verbeteringen in *B. subtilis*.

## Referenties

- (1) van Dijk, J. M.; Hecker, M., *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact* **2013**, *12*, 3.
- (2) Malgas, S.; van Dyk, J. S.; Pletschke, B. I., A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between beta-mannanase, beta-mannosidase and alpha-galactosidase. *World J Microbiol Biotechnol* **2015**, *31*, 1167-75.
- (3) Dhawan, S.; Kaur, J., Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Rev Biotechnol* **2007**, *27*, 197-216.

- (4) Qi, Q.; Li, F.; Yu, R.; Engqvist, M. K. M.; Siewers, V.; Fuchs, J.; Nielsen, J., Different Routes of Protein Folding Contribute to Improved Protein Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio* **2020**, *11*.
- (5) Westers, L.; Westers, H.; Quax, W. J., *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1694*, 299-310.
- (6) Kuzma, J.; Nemecek-Marshall, M.; Pollock, W. H.; Fall, R., Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Curr Microbiol* **1995**, *30*, 97-103.
- (7) Yazaki, K.; Arimura, G. I.; Ohnishi, T., 'Hidden' Terpenoids in Plants: Their Biosynthesis, Localization and Ecological Roles. *Plant Cell Physiol* **2017**, *58*, 1615-1621.
- (8) Helfrich, E. J. N.; Lin, G. M.; Voigt, C. A.; Clardy, J., Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering. *Beilstein J Org Chem* **2019**, *15*, 2889-2906.
- (9) Paramasivan, K.; Mutturi, S., Progress in terpene synthesis strategies through engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biotechnol* **2017**, *37*, 974-989.
- (10) Pramastya, H.; Song, Y.; Elfahmi, E. Y.; Sukrasno, S.; Quax, W. J., Positioning *Bacillus subtilis* as terpenoid cell factory. *J Appl Microbiol* **2020**.
- (11) Pramastya, H.; Xue, D.; Abdallah, II; Setroikromo, R.; Quax, W. J., High level production of amorphadiene using *Bacillus subtilis* as an optimized terpenoid cell factory. *N Biotechnol* **2021**, *60*, 159-167.
- (12) Abdallah, II; Pramastya, H.; van Merkerk, R.; Sukrasno; Quax, W. J., Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* Toward Taxadiene Biosynthesis as the First Committed Step for Taxol Production. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 218.
- (13) Ghimire, G. P.; Thuan, N. H.; Koirala, N.; Sohng, J. K., Advances in Biochemistry and Microbial Production of Squalene and Its Derivatives. *J Microbiol Biotechnol* **2016**, *26*, 441-51.
- (14) Pandit, J.; Danley, D. E.; Schulte, G. K.; Mazzalupo, S.; Pauly, T. A.; Hayward, C. M.; Hamanaka, E. S.; Thompson, J. F.; Harwood, H. J., Jr., Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 30610-7.

- (15) Schempp, F. M.; Drummond, L.; Buchhaupt, M.; Schrader, J., Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. *J Agric Food Chem* **2018**, *66*, 2247-2258.
- (16) Ye, L.; Zhang, C.; Bi, C.; Li, Q.; Zhang, X., Combinatory optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for beta-carotene production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2016**, *15*, 202.
- (17) Hong, K. Q.; Liu, D. Y.; Chen, T.; Wang, Z. W., Recent advances in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Bacillus subtilis*. *World J Microbiol Biotechnol* **2018**, *34*, 153.
- (18) Abdallah, II; van Merkerk, R.; Klumpenaar, E.; Quax, W. J., Catalysis of amorpho-4,11-diene synthase unraveled and improved by mutability landscape guided engineering. *Sci Rep* **2018**, *8*, 9961.
- (19) Li, J. X.; Fang, X.; Zhao, Q.; Ruan, J. X.; Yang, C. Q.; Wang, L. J.; Miller, D. J.; Faraldos, J. A.; Allemann, R. K.; Chen, X. Y.; Zhang, P., Rational engineering of plasticity residues of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua*: product specificity and catalytic efficiency. *Biochem J* **2013**, *451*, 417-26.
- (20) Zhao, H.; Sun, Y.; Peters, J. M.; Gross, C. A.; Garner, E. C.; Helmann, J. D., Depletion of Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatases Disrupts Cell Envelope Biogenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **2016**, *198*, 2925-2935.
- (21) Choi, K. R.; Lee, S. Y., CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnol Adv* **2016**, *34*, 1180-1209.
- (22) Tian, R.; Liu, Y.; Chen, J.; Li, J.; Liu, L.; Du, G.; Chen, J., Synthetic N-terminal coding sequences for fine-tuning gene expression and metabolic engineering in *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* **2019**, *55*, 131-141.
- (23) Chatzivasileiou, A. O.; Ward, V.; Edgar, S. M.; Stephanopoulos, G., Two-step pathway for isoprenoid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 506-511.

