



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170313

利用全局转录调控工程提高菌株耐受性研究进展

郭学武, 张玉, 陈叶福, 肖冬光

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 微生物在不同环境胁迫下的耐受性对于生物燃料和生物化学品的高效生产有重要意义。目前广泛应用于提高微生物菌株耐受性的方法包括过表达的自身或外源与耐受性相关的基因、适应性进化、人工诱变或基因组改组等。近年来,人们试图通过全局转录工程调控蛋白直接或间接操纵转录调控网络,以提高微生物胁迫耐受性。本文就利用全局转录调控工程提高菌株耐受性的研究进展包括对提高乙醇耐受性、耐酸性、耐有机溶剂、氧化应激耐受性以及耐糖性进行综述,阐明利用全局转录调控工程提高微生物耐受性所具有的广阔前景。

关键词: 全局转录调控工程; 乙醇耐受性; 耐酸性; 有机溶剂耐受性; 氧化应激耐受性; 耐糖性

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2018)03-0001-08

Global Transcription Machinery Engineering to Improve Strain Tolerance

GUO Xuewu, ZHANG Yu, CHEN Yefu, XIAO Dongguang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Microbial tolerance under different environmental stresses is important for the efficient production of biofuels and biochemicals. Methods widely used for strain tolerance improvement include overexpression of well-characterized native or exogenous resistant structural genes, long-term adaptive evolution, artificial mutagenesis or genome shuffling combined with selection, and so on. In recent years, attempts have been made for direct or indirect manipulation of the transcriptional regulation network by engineering transcriptional regulatory proteins to enhance the microbial stress tolerance of industrial relevance. This paper summarized the advancement of the research to improve strain tolerance through global transcription machinery engineering, including studies to improve ethanol tolerance, acid resistance, resistance to organic solvents, oxidative stress tolerance and resistant to sugar. It showed that this methodology has great prospects for improving microbial stress tolerance.

Key words: global transcription machinery engineering; ethanol tolerance; acid tolerance; solvent tolerance; oxidative stress tolerance; sugar tolerance

微生物在环境变化过程中的反应能力对于其在自然环境下的生存至关重要,因为其可能经常处于热或冷、极端 pH、渗透压改变、营养饥饿和有毒化合物的极端环境下。同样,在工业生产中微生物也会面临极端环境,例如,通过利用木质纤维素水解产物作为碳源生产生物质、生物燃料以及生物材料,木质纤维素水解产物(呋喃衍生物、酚类化合物和有机酸)和抑制产物(乙醇、丁醇和异丁醇)中的有毒物质会显著

抑制微生物发酵,因此严重阻碍了工业规模的生物炼制^[1-3]。另外,当产物本身是疏水性并且有细胞毒性时,微生物细胞本身会受到产物的压力,在这些压力下,产物的生成途径不能正常工作,导致生产效率降低。尽管维持细胞内环境的稳定可以确保细胞内适当的稳态,但是当细胞外环境改变破坏酶的最佳活性和代谢使细胞结构不稳定时,也可以造成细胞内环境产生波动,导致生产力和微生物活性降低。因此,在

收稿日期: 2017-11-21; 修回日期: 2018-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21406168)

作者简介: 郭学武(1980—),男,湖南常德人,副研究员;通信作者: 肖冬光,教授, xiao99@tust.edu.cn

胁迫条件下, 研究者们不断寻找新的方法以提高微生物的耐受性以及保持代谢活性并促进其高效生产。

近年来, 提高菌株的耐受性成为人们的研究热点, 广泛用于提高耐受性的方法为过表达微生物耐性相关基因如溶剂外排泵和热休克蛋白等相关内源或外源基因、长期适应性进化、人工诱变或基因组改组等^[4-7]以提高微生物对药物、渗透压等各种压力条件的耐受性。Patnaik 等^[8]通过全基因组重排的方法提高了乳酸菌 (*Lactobacillus*) 的耐酸性, 使乳酸的产量提高了 3 倍; Fiocco 等^[9]通过过表达热激蛋白 (sHSP) 改善了胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的抗寒性, 同时发现菌株对乙醇和丁醇的耐受性也得到提高; Borden 等^[10]通过在丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) ATCC824 中过表达转录调节因子 CAC1869, 发现菌株的丁醇耐受性提高了 81%; Tomas 等^[11]在硫解酶启动子下过表达蛋白 groESL 提高了丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) ATCC824 的丁醇耐受性; Park 等^[12]通过突变含锌指基因的人工转录因子, 筛选出了具有耐热性的大肠杆菌 (*E. coli*); Alper 等^[13]通过 σ 因子的全局转录调控工程 (σ^{70}), 使大肠杆菌对乙醇的耐受质量浓度高达 60 g/L, 并且能够同时耐受十二烷基磺酸钠 (SDS); Gorsich 等^[14]在 ORFs 缺失突变文库中筛选出了具有糠醛耐受性的酿酒酵母。但在大多数情况下, 因为抗胁迫性是一个复杂的多基因表型, 通过简单地过表达某些功能基因或途径, 虽然在一定程度上有效, 但不一定能够达到所需的耐受水平。尽管长期的适应性进化和人工诱变或基因组改组方法没有这样的限制, 但是非常耗时且费力, 并且所得到的表型难以转化为新的菌株。而且, 这些方法的固有缺点是获得所需表型的总体具有随机性, 导致获得所需耐受突变体的可能性降低。为打破以上局限, 人们尝试并建立了许多依赖特定的转录调控因子或 DNA 结合序列改造微生物耐受性的方法, 但由于仍局限在某一或特定基因簇中而达不到所期望的效果^[15-17]。

由于细胞能够通过调整自身全局转录机制的某些组件, 从而精细调节自身成百乃至上千个基因, 基于该理论建立了全局转录调控工程 (global transcription machinery engineering, gTME) 的方法能突破以上限制。gTME 是一种全新的能在整体水平上改变细胞基因组转录而获得目的细胞表型的定向进化方法, 能在全局水平上强化微生物细胞的目标性能, 是在基因和细胞水平上改造微生物细胞的新途径^[18]。几种转录因子包括含锌指基因的人工转录因子^[19-21]、 σ 因

子^[13,22]、Spt15^[18]、H-NS^[23]、Hha^[24]和 cAMP^[25-26]都是通过全局转录工程进行修饰, 以改善菌株耐受性及获得其他优良表型。

gTME 中研究较多的是 σ 因子, σ 因子是 DNA 依赖型 RNA 聚合酶的活性中心, 与 $\alpha 2\beta\beta'\omega$ 亚基单元 (RNA 聚合酶核心酶) 构成全酶, 参与胞内所有 RNA 的合成, 其功能如图 1^[27]所示。 σ 因子能够特异性地识别基因启动子的 -35 区和 -10 区, 并激活转录过程的起始。 σ 因子全局转录调控工程的实施策略如图 2 所示。随着 gTME 方法的发展, 目前已经成功建立了利用转录因子工程提高菌种耐受各种抑制剂的方法, 在提高菌种耐受性方面取得了一定的进展。本文仅就全局转录调控工程提高菌株耐受性的研究包括乙醇耐受性、有机溶剂耐受性、耐酸性、氧化应激耐受性以及耐糖性进行综述。

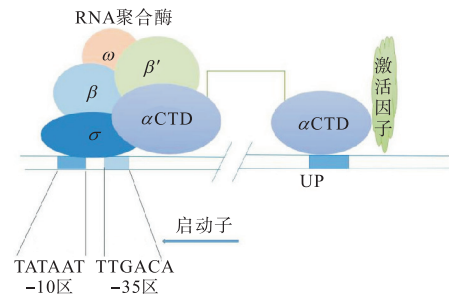


图 1 全局转录调控因子 σ 的功能示意图

Fig. 1 Function diagram of global transcriptional regulatory factor σ

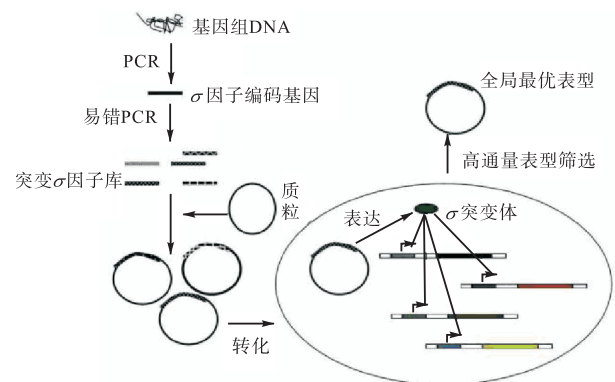


图 2 σ 因子全局转录调控工程的实施策略

Fig. 2 Implementation strategy of global transcription regulation project with factor σ

1 提高乙醇耐受性

生物的代谢途径呈网络体系, 细胞中基因与表型之间并非线性对应关系, 细胞的特定表型往往由多个

基因控制,因而只有在基因组水平上同时对控制目的表型的多个基因进行修饰才有可能使得目的表型得到较高的表达,gTME通过对调控基因转录的转录元件(σ 因子和各种转录因子等)进行合理化改组修饰(如易错 PCR、DNA shuffling 等),使得整个基因组的转录发生全局性改变,从而导致许多由多种基因控制的复杂的细胞表型得到改变,最终获得需要的优良表型.因此,将 gTME 应用于大肠杆菌(*E. coli*),通过对全局转录调控因子 σ^{70} (起始大部分基因在指数生长细胞中的转录)的诱变会改变启动子的识别,进而从全局转录水平上调节转录组的转录特征^[28-29].将具有低、中和高突变率的 σ^{70} 因子的易错 PCR 产物混合在一起,并通过连续传代培养以提高乙醇的耐受性.获得 σ^{70} 的突变株可以耐受 70 g/L 的乙醇溶液,而亲本只能耐受 40 g/L 的乙醇溶液.在同一研究中,用不同的方法成功筛选出了耐乙醇和十二烷基硫酸钠(SDS)的多重耐受性表型^[30].Alper 等^[13]也证明了在大肠杆菌中 σ^{70} 的全局转录调控工程可以提高菌株的乙醇耐受性,使乙醇的耐受性达到 60 g/L,同时菌株的 SDS 耐受性也得到了提高,并可以大量生产番茄红素.cAMP 受体蛋白(CRP)在大肠杆菌中调节 400 多种基因,从而可以在转录水平上改善大肠杆菌的乙醇耐受性,Chong 等^[25]通过改造大肠杆菌的全局转录因子 CRP 以提高乙醇耐受性,在易错 PCR 库中筛选出了乙醇耐受性最好的 CRP 突变体 E2(M59T),在 62 g/L 乙醇中的生长速率为 0.08 h⁻¹,而对照菌株的仅为 0.06 h⁻¹.随后,将 M59T 突变体整合到基因组中以产生突变体 iE2.当暴露于 150 g/L 乙醇中时,15 min 后 iE2 的存活率约为 12%,而对照菌株的存活率为 0.01%.对 CRP 调节的 444 个基因进行的逆转录 PCR 分析(RT-PCR)揭示了在不含乙醇的情况下 iE2 中差异表达的基因有 203 个,而 92 个基因在乙醇胁迫时显示差异表达.这些基因属于中枢中间代谢(*aceE*、*acnA*、*sdhD*、*sucA*)、铁离子运输(*entH*、*entD*、*fecA*、*fecB*)和一般应激反应(*osmY*、*rpoS*)等多种功能群.全局转录调控工程不只应用到大肠杆菌中,在其他细菌中也同样适用.Tan 等^[31]在运动发酵单胞菌中通过随机诱变全局转录因子 RpoD 蛋白(σ^{70}),从易错 PCR 库中筛选出了耐乙醇的突变菌株,培养 54 h 后残糖量为 0.64%,而对照菌株的残糖量接近 5.43%;在 9%乙醇压力下,突变菌株在 30~54 h 时乙醇产量为 13.0~14.1 g/L,对照菌株仅为 6.6~7.7 g/L.其研究结果表明,运动发酵单胞菌

中 RpoD 在提高乙醇耐受性方面发挥了重要作用,通过 gTME 操纵 RpoD 可以为复杂表型菌株的改良提供借鉴.

对于较复杂的真核微生物酿酒酵母的转录机制而言,gTME 用于靶向 RNA 聚合酶 II 转录因子 D 的两个组成部分,即 TATA 结合蛋白复合体的成分 SPT15 和 TATA 相关因子 TAF25.在此基础上构建了两个易错 PCR 基因文库,并在葡萄糖和乙醇复合压力下进行筛选.研究^[18]发现:SPT15 突变文库中乙醇耐受性提高的突变体 SPT15-300 中有 3 个氨基酸发生突变,在 6%乙醇溶液和 100 g/L 葡萄糖溶液中生长 20 h 后,生长速度与野生型菌株相比提高了 13 倍;在 10%~20%乙醇体积分数下,突变体的乙醇耐受性也有显著提高.SPT15 是酵母细胞存活必需的转录因子,通过结合 RNA 聚合酶 II 和十几种基本的转录因子,可以转录基因组中大部分 mRNA,通过代谢工程方法也可以同时改变细胞中多个基因的转录水平.Yang 等^[32]应用类似的方法筛选出了两株乙醇耐受性提高的酿酒酵母菌株,在生物反应器中用 20%葡萄糖发酵 24 h 产生的乙醇比对照菌株提高 25%,乙醇的产量和生产率也大大提高,分别由原来的 0.31 g/g 和 2.6 g/(L·h) 提高到 0.39 g/g 和 3.2 g/(L·h).由此研究表明,gTME 筛选出的菌株不但增强了乙醇耐受性,还提高了乙醇产量.赵心清等^[33]对酿酒酵母负责胁迫相关基因转录的 SAGA 复合体成分 SPT3 编码基因进行易错 PCR 随机突变,筛选得到了 1 株在 10%乙醇溶液中生长较好的突变株 M25.该突变株在 125 g/L 葡萄糖中进行乙醇发酵时,最终乙醇的产量比对照菌株提高了 11.7%.

全局转录调控工程可通过改变全局转录调控因子对多基因控制的表型进行有效的系统工程改造,而乙醇耐受性正是受多基因调控的.因此,全局转录工程是获得乙醇耐受性高产菌株十分有效的方法之一.

2 提高有机溶剂耐受性

在全细胞生物催化中,如果存在不溶或难溶于水的底物或产物,通常采用非水系统(如有机溶剂)来促进疏水底物和(或)产物的溶解^[34],然而有机溶剂对于大多数微生物是有毒的.这些有机溶剂通过掺入细胞膜脂质与膜结合使蛋白质变性,破坏膜的基本功能^[35],导致细胞死亡并降低全细胞生物催化效率.据报道^[36]大肠杆菌几乎不耐受 log *P* 值低于 3.4 的有机

溶剂,例如,即使体积分数低至 0.1%,甲苯对大肠杆菌也有毒性^[37].因此,在含水/有机溶剂两相体系中开发工业应用的有机溶剂耐性(organic solvent tolerance, OST)微生物是至关重要的.

Matsui 等^[38]通过对有机溶剂耐受性的酿酒酵母进行分析,在转运蛋白编码基因的启动子区中发现了转录调控因子 *Pdr1p* 发生了突变;随后通过对转录因子 *PDR1* 进行单点突变,成功筛选出了具有有机溶剂耐受性的菌株.该菌株能够在 YPD 培养基/异辛烷两相系统中将 3-氧代丁酸丁酯还原成 3-羟基丁酸丁酯.大肠杆菌中涉及 OST 的几个基因(例如 *glpC*、*purR* 和 *manXYZ*)与葡萄糖代谢有关,因此有学者对 OST 所必需的碳水化合物代谢的调控因子进行了研究.在正己烷或正己烷与环己烷混合物的压力下筛选大肠杆菌的 7 个敲除突变体(*acrA*、*acrB*、*cra*、*crp*、*cyaA*、*fnr* 和 *mhc*),发现腺苷酸环化酶(*CyaA*)和全局调控因子 cAMP 受体蛋白(CRP)的敲除使得突变体增强了 OST,这两种耐受性突变体显示出细胞内己烷浓度降低和对有机溶剂相的附着减少^[39].Basak 等^[40]通过全局转录调控因子 CRP 以提高大肠杆菌的 OST,选择甲苯作为有机溶剂压力,通过易错 PCR 产生突变的 *crp* 基因,从随机诱变文库中富集筛选出了甲苯耐受突变体 M2,在 0.23% 甲苯中 M2 的生长速率为 0.51 h^{-1} ,而野生型菌株的生长被完全抑制.与野生型相比,M2 在其他有机溶剂如正己烷、环己烷和对二甲苯中也表现出优异的生长性能.Zhang 等^[41]在环己烷的压力下,筛选 *rpoD* 突变文库,旨在筛选出全局转录调控因子 σ^{70} 突变体有机溶剂耐受性提高的大肠杆菌,结果显示含有 σ^{70} 突变体 C9 的大肠杆菌 JM109 菌株具有耐受 69% 环己烷的能力,筛选出 OST 的大肠杆菌可以潜在地应用于非水相生物催化和生物燃料的生产.用 2D-PAGE 检测携带 C9 大肠杆菌 JM109 菌株产生的总蛋白质差异,并且在不同的溶剂压力下,204 个高丰度蛋白质显示出超过两倍的差异,其研究还表明了几个基因(*gapA*、*sdhB*、*pepB* 和 *dppA*)在增强大肠杆菌 OST 方面起着关键作用,主要涉及在溶剂胁迫下维持较高的细胞内能量水平.以上研究说明全局转录调控工程是用于增强 OST 表型工程菌株的有效方法之一.

3 提高耐酸性

某些生物催化过程在低 pH 下,特别是在有机酸

的生产过程中或利用木质纤维素酸水解产物生产生物燃料过程中,细胞的活力会逐渐下降.因此,筛选低 pH 或耐酸突变体在工业生产中具有重要的意义^[42-45].此前的研究^[46-48]发现,大肠杆菌在酸压力下应激反应的关键调控因子之一是受 CRP 调控的 σ 因子 *RpoS*.这些发现表明,对自身 CRP 的修饰可能会改变大肠杆菌在低 pH 下的耐受性.Basak 等^[49]试图从转录水平改善菌株耐酸性,采用易错 PCR 方法突变大肠杆菌的全局转录调控因子 CRP,根据其生长性能,从随机诱变文库中筛选出耐酸突变体 AcM1.在 pH 4.2 时,AcM1 的生长速率(0.113 h^{-1})与对照菌株(0.062 h^{-1})相比有大幅度增加,并且该菌株在 48 °C 时也具有较好的耐热性.实时定量 PCR 结果显示,负责细胞耐酸性的关键酶——谷氨酸脱羧酶在 AcM1 突变体中的活性比亲本菌株提高了 2 倍,AcM1 突变型 CRP 与 I 型、II 型和 III 型 CRP 依赖型启动子的差异性结合表明,对自身 CRP 的修饰可能导致全局转录水平的改变.

Klein-Marcuschamer 等^[22]应用 gTME 技术对植物乳杆菌的 σ 因子进行改造,发现仅突变了 σ 因子中的 1 个氨基酸位点(Q³⁴⁵K)就明显提高了植物乳杆菌对乳酸和高浓度盐的耐性.张力^[50]基于细胞全局转录水平,采用融合 PCR 技术获得 RNA 聚合酶(RANP)的首要亚基 σ 因子的表达序列,并采用易错 PCR 技术引入突变,获得转录突变库,筛选获得乳酸耐受性提高的优势菌株 LA5.由于氨基酸的替换及 C 末端 27 个氨基酸的缺失,导致了 σ 因子的空间结构发生了变化,产生了一定的调控效果,提高了其在高酸环境下的生长速度.

Gao 等^[51]采用随机插入缺失链交换诱变(RAISE)的三步法突变大肠杆菌全局调节因子 Sigma D(*RpoD*)以改善其耐酸性.从随机诱变文库中筛选出了耐酸突变体 VII,其在 pH 低至 3.17 时的生长速率(0.22 h^{-1})比亲本菌株(0.15 h^{-1})高得多.为了更好地理解 *RpoD* 对调节网络的整体影响,对其进行的转录组学分析表明,除了耐酸性外,大肠杆菌中有 95 个基因(2.1%)被诱导,178 个(4.0%)基因被抑制,包括对海藻糖生物合成、核苷酸生物合成、碳代谢以及氨基酸利用;还包括主要调控因子(*ArcA*、*EvgA*、*H-NS* 和 *RpoS*)和基因/操纵子特异性转录因子(*GadX*、*GadW*、*AppY*、*YdeO* 和 *KdgR*).这些结果更好地说明了 *RpoD* 在大肠杆菌的生长阶段充当了全局转录调控因子.

Tanaka 等^[52]发现 Haa1 (酿酒酵母中参与适应弱酸的转录激活因子)的过表达导致了乙酸耐受性的提高, Haa1 的诱导削弱了参与乙酸进入细胞的基因表达或者增加了乙酸输出细胞的基因表达. Masuda 等^[53]通过响应调节因子 EvgA 的过表达可以在细胞生长指数阶段赋予大肠杆菌耐酸性, 在 LB 培养基 (pH 2.5) 中处理 1 h 后, EvgA 高表达菌株的存活率比对照提高了 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 过表达 EvgA 和敲除 EvgA 大肠杆菌的微阵列分析显示, EvgA 直接或间接调节至少 37 个基因, 其中包含结构基因 *gadABC* 和 *hdeAB* 以及转录调节基因 *ydeO*、*yhiE* 和 *gadX*. *ydeO* 的过表达增强了菌株的耐酸性, 而 *ydeO* 的缺失能部分降低菌株的耐酸性.

4 提高氧化应激耐受性

氧化应激是由活性氧 (ROS) 和非自由基产生和清除之间不平衡引起的, 如羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和单线态氧的氧化程度超过氧化物的清除^[54]. ROS 会对细胞成分 (DNA、脂质和蛋白质) 以及细胞氧化还原平衡造成严重损害^[55], 因此筛选对 ROS 具有较高耐受性表型的菌株对于工业规模的经济生产是非常重要的. Zhao 等^[56]利用全局转录调控机制在两个质粒突变文库 (*spt15* 和 *taf25* 分别编码 TBP 和 Taf (II) 25) 中成功地筛选出了两株由 H_2O_2 引起的氧化应激耐性的酵母菌株. 在温和 H_2O_2 压力下 ($\leq 3.5 \text{ mmol/L}$), 氧化耐受菌株的细胞生长性能与 H_2O_2 浓度呈正相关. 发酵结果表明突变株 *taf25-3* 与对照菌株相比延滞期较短, *taf25-3* 对 H_2O_2 诱导的氧化应激适应能力提高, 发酵效率提高. 这表明一般转录因子 (*spt15* 和 *taf25*) 中的几个氨基酸被取代可以修饰细胞氧化防御系统并提高酿酒酵母的抗氧化能力. *CodYst* 是调节链球菌代谢网络的全球转录调节因子, Lu 等^[57]构建了 *codYst* 缺失的突变体, Wang 等^[58]比较了嗜热链球菌 ST2017 及 *codYst* 缺陷型菌株中在不同 H_2O_2 应激下的细胞存活率. 结果显示: 在 2 mmol/L H_2O_2 的温和氧化胁迫下, 野生型菌株和 *codYst* 缺陷型突变体的细胞存活率相似, 并且与未处理的菌株相比仅减少了 1 个数量级. 当受到 10 mmol/L H_2O_2 的强烈氧化应激时, *codYst* 缺陷型突变体的细胞存活率急剧下降, 比野生型菌株低大约 3 个数量级, 说明全局转录因子 *codYst* 在维持嗜热链球菌 ST2017 的氧化应激中具有

重要的作用. Basak 等^[59]通过改造大肠杆菌中的全局调控因子 CRP 以改善大肠杆菌在氧化应激条件下的耐受性, 这些蛋白可以直接或间接调节氧化还原感应调节因子 SoxR 和 OxyR 等, 在 H_2O_2 压力下通过易错 PCR 筛选出了具有氧化应激耐受性的最佳突变体 OM3. 该突变体菌株可在 12 mmol/L H_2O_2 中生长, 生长速率为 0.6 h^{-1} , 而在此 H_2O_2 浓度下野生型菌株的生长被完全抑制. OM3 还具有异丙苯基过氧化物耐受性和高温耐受性. 细胞内的 ROS 决定细胞的活性, 对活性氧测定发现不管是否在 H_2O_2 的压力下, OM3 菌株中活性氧的浓度都低于野生菌株. Pan 等^[60]在大肠杆菌中过表达全局转录调控因子 IrrE 提高了对渗透压、热和氧化应激的耐受性. 像 IrrE 这样的全局转录调控因子经常激活多种途径, 其中一些途径可能不是针对靶向应激耐受表型的特异性途径.

5 提高耐糖性

肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) 五碳糖利用性能优良, 在木糖生物转化方面极具开发潜力, 但其木糖耐受力较低, 阻碍了其工业化应用. 本课题组^[61]利用易错 PCR 的方法对产 2,3-丁二醇的肺炎克雷伯氏菌 (KPG) 全局转录调控因子 σ 的编码基因 *rpoD* 进行突变, 将突变产物连接 pDK7 质粒后转入亲本菌株, 构建突变菌株文库, 从突变文库中筛选出了具有木糖耐受性并高产 2,3-丁二醇的肺炎克雷伯氏菌株 kpC. 与亲本菌株相比, 木糖的消耗速率提高了 169%, 2,3-丁二醇的产量提高了 216%, 且亲本菌株在 48 h 之后基本不耗糖, 说明对全局转录调控因子 σ 的突变提高了肺炎克雷伯氏菌对木糖的耐受能力.

6 展望

目前, gTME 主要关注天然的 σ^{70} 因子, 只有锌指蛋白已被用于设计人工调控因子, 而大部分的全局转录调控因子尚未被开发研究. 大肠杆菌本身的 7~14 个全局转录调控因子中被大量研究的主要是 σ^{70} 因子, 到目前为止, 只有 CRP 能突变产生不同的表型. 生存在恶劣环境条件下, 微生物的外源调节因子构成了可能赋予重组宿主抗性的转录调节蛋白库, 对于 IrrE 这样的外源全局调控因子来说, 在不同的宿主或者相似的宿主中可能会成为新的全局转录调控因子的演化原型. 特别是在转录组学、蛋白质组学和

DNA 与蛋白质相互作用(PDI)分析的帮助下,深入剖析由全局转录调控工程带来的转录/翻译谱的变化,会使人们认识到识别和靶向直接负责胁迫耐受表型具体的基因和途径,进而应用到提高菌株耐性的研究. 总之,全局转录调控工程方法应该扩展到更多天然的、外源的和人工调控的因子,并结合新的合成生物学的方法,使人们更深刻地了解如何人为调控工业微生物的基因组表达,在工业生产中使微生物在相关的压力条件下具有更好的适应性.

参考文献:

- [1] Attfield P V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15 (13) : 1351-1357.
- [2] Shima J, Ando A, Nakamura T. Environmental stress tolerance of yeast: Importance in industrial uses and molecular mechanisms[J]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 2010, 57 (6) : 225-231.
- [3] Nicolaou S A, Gaida S M, Papoutsakis E T. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12 (4) : 307-331.
- [4] Bajwa P K, Shireen T, D'Aoust F, et al. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2009, 104 (5) : 892-900.
- [5] Geddes C C, Mullinnix M T, Nieves I U, et al. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (3) : 2702-2711.
- [6] Shi D J, Wang C L, Wang K M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36 (1) : 139-147.
- [7] Tomas C A, Beamish J, Papoutsakis E T. Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (7) : 2006-2018.
- [8] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20 (7) : 707-712.
- [9] Fiocco D, Capozzi V, Goffin P, et al. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77 (4) : 909-915.
- [10] Borden J R, Papoutsakis E T. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (9) : 3061-3068.
- [11] Tomas C A, Welker N E, Papoutsakis E T. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (8) : 4951-4965.
- [12] Park K S, Jang Y S, Lee H, et al. Phenotypic alteration and target gene identification using combinatorial libraries of zinc finger proteins in prokaryotic cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (15) : 5496-5499.
- [13] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9 (3) : 258-267.
- [14] Gorsich S W, Dien B S, Nichols N N, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71 (3) : 339-349.
- [15] Gerber H P, Schaffner W. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches[J]. *Science*, 1994, 263 (5148) : 808-811.
- [16] Kim J S, Kim J, Cepek K L, et al. Design of TATA box-binding protein/zinc finger fusions for targeted regulation of gene expression[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94 (8) : 3616-3620.
- [17] Park K S, Lee D K, Lee H, et al. Phenotypic alteration of eukaryotic cells using randomized libraries of artificial transcription factors[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21 (10) : 1208-1214.
- [18] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production[J]. *Science*, 2006, 314 (5805) : 1565-1568.
- [19] Lee J Y, Sung B H, Yu B J, et al. Phenotypic engineering by reprogramming gene transcription using novel arti-

- cial transcription factors in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(16): e102.
- [20] Park K S, Lee D K, Lee H, et al. Phenotypic alteration of eukaryotic cells using randomized libraries of artificial transcription factors[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1208–1214.
- [21] Tol N V, Zaal B J V D. Artificial transcription factor-mediated regulation of gene expression[J]. *Plant Science*, 2014, 225(8): 58–67.
- [22] Klein-Marcuschamer D, Stephanopoulos G. Assessing the potential of mutational strategies to elicit new phenotypes in industrial strains[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(7): 2319–2324.
- [23] Hong S H, Wang X, Wood T K. Controlling biofilm formation, prophage excision and cell death by rewiring global regulator H-NS of *Escherichia coli*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(3): 344–356.
- [24] Hong S H, Jintae L, Wood T K. Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal[J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(6): 717–728.
- [25] Chong H, Huang L, Yeow J, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57628.
- [26] Zhang H, Chong H, Chi B C, et al. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*, for improved 1-butanol tolerance[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2012, 94(4): 1107–1117.
- [27] 乔志新, 于群. 全局转录调控及其在代谢工程中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(5): 689–691.
- [28] Gao G, Tian B, Liu L, et al. Expression of *Deinococcus radiodurans*, PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*[J]. *DNA Repair*, 2003, 2(12): 1419–1427.
- [29] Gardella T, Moyle H, Susskind M M. A mutant *Escherichia coli* sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1989, 206(4): 579–590.
- [30] Santos C N S, Stephanopoulos G. Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, 12(2): 168–176.
- [31] Tan F, Wu B, Dai L, et al. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 4.
- [32] Yang J, Bae J Y, Lee Y M, et al. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2011, 108(8): 1776–1787.
- [33] 赵心清, 姜如娇, 李宁, 等. 利用 SPT3 的定向进化提高工业酿酒酵母乙醇耐受性[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 159–164.
- [34] Heipieper H J, Neumann G, Cornelissen S, et al. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2007, 74(5): 961–973.
- [35] Sikkema J, de Bont J A, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(2): 201–222.
- [36] Inoue A, Horikoshi K. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log *P*[J]. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1991, 71(3): 194–196.
- [37] Sardesai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents[J]. *Research in Microbiology*, 2002, 153(5): 263–268.
- [38] Matsui K, Teranishi S, Kamon S, et al. Discovery of a modified transcription factor endowing yeasts with organic-solvent tolerance and reconstruction of an organic-solvent-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(13): 4222–4225.
- [39] Okochi M, Kurimoto M, Shimizu K, et al. Effect of global transcriptional regulators related to carbohydrate metabolism on organic solvent tolerance in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2008, 105(4): 389–394.
- [40] Basak S, Song H, Jiang R. Error-prone PCR of global transcription factor cyclic AMP receptor protein for enhanced organic solvent (toluene) tolerance[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2152–2158.
- [41] Zhang F, Qian X, Si H, et al. Significantly improved solvent tolerance of *Escherichia coli*, by global transcription machinery engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 175.
- [42] Morel F, Delmas F, Jobin M P, et al. Improved acid tol-

- erance of a recombinant strain of *Escherichia coli*, expressing genes from the acidophilic bacterium *Oenococcus oeni*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(2): 126–130.
- [43] Suthers P F, Cameron D C. Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms: US6852517 B1[P]. 2005–02–08.
- [44] Vemuri G N, Eiteman M A, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1715–1727.
- [45] Taherdazeh M J, Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review[J]. Bioresources, 2007, 2(3): 472–499.
- [46] Small P, Blankenhorn D, Welty D, et al. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of *rpoS* and growth pH[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(6): 1729–1737.
- [47] Cheville A M, Arnold K W, Buchrieser C, et al. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1996, 62(5): 1822–1824.
- [48] Henggearonis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 373–395.
- [49] Basak S, Geng H, Jiang R. Rewiring global regulator cAMP receptor protein (CRP) to improve *E. coli* tolerance towards low pH[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 173(1): 68–75.
- [50] 张力. 全局转录工程选育耐受乳酸产物的基因工程菌研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [51] Gao X, Jiang L, Zhu L, et al. Tailoring of global transcription sigma D factor by random mutagenesis to improve *Escherichia coli* tolerance towards low-pHs[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 224: 55–63.
- [52] Tanaka K, Ishii Y, Ogawa J, et al. Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the HAA1 gene, encoding a transcriptional activator[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(22): 8161–8163.
- [53] Masuda N, Church G M. *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(22): 6225–6234.
- [54] Storz G, Christman M F, Sies H, et al. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(24): 8917–8921.
- [55] Spirin A S, Lim V I. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37(8): 1670–1680.
- [56] Zhao H, Li J, Han B, et al. Improvement of oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through global transcription machinery engineering[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(5): 869–878.
- [57] Lu W W, Wang Y, Wang T, et al. The global regulator CodY in *Streptococcus thermophilus* controls the metabolic network for escalating growth in the milk environment[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2349–2358.
- [58] Wang Y, He H Y, Li H H, et al. The global regulator CodY responds to oxidative stress by the regulation of glutathione biosynthesis in *Streptococcus thermophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(11): 8768–8775.
- [59] Basak S, Jiang R. Enhancing *E. coli* tolerance towards oxidative stress via engineering its global regulator cAMP receptor protein (CRP) [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51179.
- [60] Pan J, Wang J, Zhou Z, et al. IrrE, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in *Escherichia coli* and *Brassica napus*[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4422.
- [61] 郭学武, 肖冬光, 张玉, 等. 一株高木糖耐性肺炎克雷伯氏菌株及其构建方法: 201611156954.7[P]. 2017–07–25.

责任编辑: 郎婧