

## 工业真菌中的交替氧化酶

顾帅<sup>1</sup>, 刘强<sup>1</sup>, 何皓<sup>2</sup>, 李霜<sup>1</sup>

1 南京工业大学 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211800

2 中国石油天然气股份有限公司石油化工研究院, 北京 100195

顾帅, 刘强, 何皓, 等. 工业真菌中的交替氧化酶. 生物工程学报, 2015, 31(1): 43–52.

Gu S, Liu Q, He H, et al. Alternative oxidase in industrial fungi. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 43–52.

**摘要:** 真菌是现代微生物发酵产业的主力军之一。交替呼吸途径 (Alternative respiration pathway, ARP), 以其非磷酸化电子传递途径, 起到了能量溢流 (Energy overflow) 的作用, 调节细胞能量代谢, 平衡碳代谢和电子传递, 有利于代谢产物的积累。此外, 交替呼吸对真菌的抗逆反应和条件致病菌的生理作用也都具有非常重要的影响。交替氧化酶 (Alternative oxidase, AOX) 是线粒体中交替呼吸途径的末端氧化酶, 广泛存在于高等植物及部分真菌和藻类中。由于交替氧化酶对水杨羟肟酸 (Salicylhydroxamic acid, SHAM) 敏感而对细胞色素呼吸抑制剂氰化物不敏感, 交替氧化酶 AOX 介导的交替呼吸途径又被称为抗氰呼吸途径 (Cyanide-resistant respiration, CRR)。近年来, 研究交替呼吸途径和交替氧化酶已成为细胞呼吸代谢领域的热门课题。本文主要对真菌交替呼吸途径和交替氧化酶的结构与其在工业真菌体内功能的最新研究进展作一简要的综述。

**关键词:** 交替呼吸途径, 抗氰呼吸, 交替氧化酶, 工业真菌

## Alternative oxidase in industrial fungi

Shuai Gu<sup>1</sup>, Qiang Liu<sup>1</sup>, Hao He<sup>2</sup>, and Shuang Li<sup>1</sup>

1 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, Jiangsu, China

2 Petrochemical Research Institute of PetroChina Co. Ltd., Beijing 100195, China

**Abstract:** Filamentous fungi have been used in industrial fermentation extensively. Based on non-phosphorylating

**Received:** March 19, 2014; **Accepted:** August 29, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21076104), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A206), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2013CB733605).

**Corresponding author:** Shuang Li. Tel/Fax: +86-25-83172094; E-mail: lishuang@njtech.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21076104), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A206), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB733605) 资助。

网络出版时间: 2014-09-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140166.html>

electron transport process, alternative respiration pathway (ARP) acts as an energy overflow, which can balance carbon metabolism and electron transport, allow the continuance of tricarboxylic acid cycle without the formation of ATP, and permit the turnover of carbon skeletons. Alternative respiration pathway also plays an important role in the stress response of fungi and the physiological function of conditioned pathogen. Alternative oxidase (AOX) is the terminal oxidase responsible for the activity of alternative respiration pathway, which exists widely in higher plants, parts of fungi and algae. Owing to the property that alternative oxidase (AOX) is sensitive to salicylhydroxamic acid (SHAM) and insensitive to conventional inhibitors of cytochrome respiration, alternative respiration pathway by AOX is also named as cyanide-resistant respiration (CRR). In recent years, the study of the alternative respiration pathway and alternative oxidase has been a hot topic in the area involving cellular respiration metabolism. In this review we summarized the latest research advances about the functions of alternative respiration pathway and alternative oxidase in industrial fungi.

**Keywords:** alternative respiration pathway, cyanide-resistant respiration, alternative oxidase, industrial fungi

真菌是现代微生物发酵产业的主力军,其生产应用非常广泛,产品涵盖了有机酸(如柠檬酸、乳酸、富马酸等)、工业酶制剂(如糖化酶、纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶等)、抗生素(如青霉素、头孢菌素 C 等)等大宗生物技术产品。随着研究者对真菌代谢产物积累机制的深入解析,大幅提高了多种真菌代谢产物的转化率和生产速率,推动了相关产业的发展。

近年来,研究者们陆续在多种真菌中发现了交替呼吸途径(Alternative respiration pathway, ARP),该途径是真菌细胞平衡物质代谢和能量代谢的天然途径,对真菌的抗逆反应、发酵产物的代谢积累以及条件致病菌的生理作用都具有非常重要的影响<sup>[1-3]</sup>。

工业真菌是现代微生物发酵产业的主力军,研究真菌代谢产物积累原理至关重要,而交替呼吸途径又与代谢产物的积累有着密不可分的联系。本文主要结合作者的研究工作以及近年来关于真菌的交替呼吸及其交替氧化酶的最新研究成果作一综述,探讨对工业真菌交替氧化酶的认识。

## 1 真菌的交替呼吸途径

交替呼吸途径最早发现于植物中,随后在

藻类、原生动物和真菌中也相继发现了该途径<sup>[4]</sup>。目前,有关交替呼吸途径和交替氧化酶的调控机制及其生理学意义已成为呼吸代谢领域的研究热点。

真菌如同其他真核生物一样,细胞色素呼吸链由 4 个蛋白复合物构成(图 1):复合物 I (NADH 泛醌氧化还原酶)、复合物 II (琥珀酸 泛醌氧化还原酶)、复合物 III (泛醌 细胞色素 *c* 氧化还原酶)和复合物 IV (细胞色素 *c* 氧化酶)。在电子传递过程中,能量由线粒体内膜跨膜复合物 I、III 和 IV 处泵出质子而保留。每个复合物都有特异性的抑制剂,如鱼藤酮和粉蝶霉素 (Piericidin) 可以抑制复合物 I,抗霉素抑制复合物 III,氰化物抑制复合物 IV。

在真菌中,交替呼吸途径以两种形式存在<sup>[5]</sup>:一条是以交替 NADH 脱氢酶 (Alternative NADH dehydrogenases) 介导的,交替电子传递链中的复合物,接受 NADH 的电子并直接转移到泛醌,但这一过程并不泵出质子,NADH 和泛醌之间的自由能 ( $73 \text{ kJ}/2\text{e}^-$ ) 以热量的形式散发。交替 NADH 脱氢酶对鱼藤酮不敏感,因此可通过鱼藤酮对细胞色素途径的抑制来检测交替呼吸的强度。大多数植物和部分真菌有

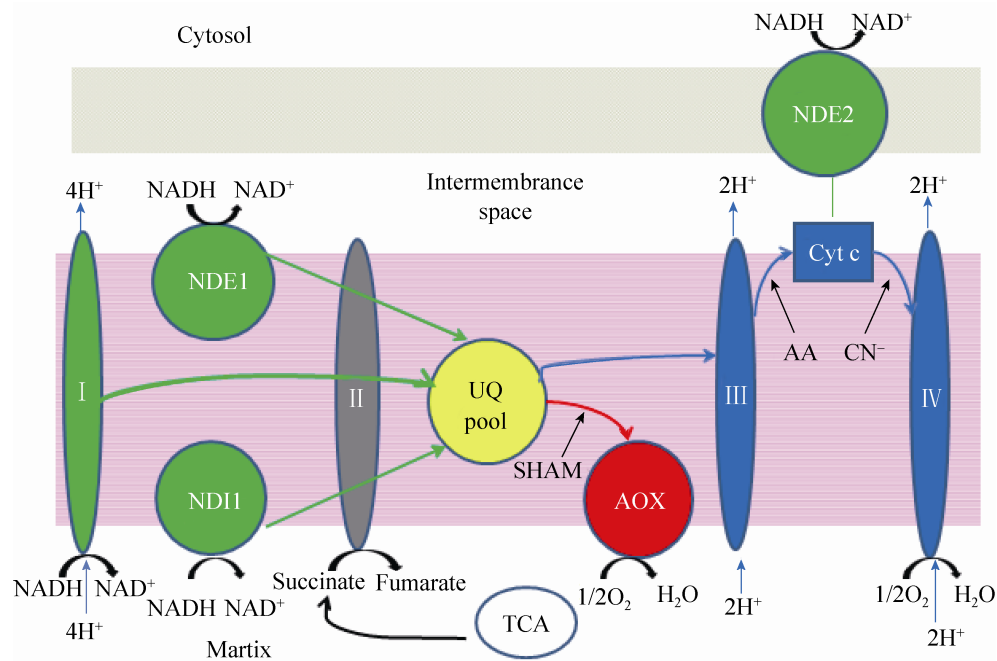


图 1 酵母的线粒体呼吸途径示意图<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Schematic representation of the mitochondrial respiratory chain in yeasts<sup>[4]</sup>. I, II, III, IV: respiratory chain complexes; AOX: alternative oxidase; UQ: ubiquinone; NDI: internal NADH dehydrogenase; NED: external NADH dehydrogenase; TCA: tricarboxylic acid cycle; Cyt c: cytochrome c; SHAM: salicylhydroxamic acid; AA: Antimycin A; CN<sup>-</sup>: cyanide.

交替 NADH 脱氢酶。另一条是以交替氧化酶 (Alternative oxidase, AOX) 介导的, 能将泛醌处的电子直接交给终端受体 O<sub>2</sub>, 绕过复合物 I 和 II, 与交替 NADH 脱氢酶一样, AOX 也不产生可保留的能量, 而是以热量形式散失<sup>[6]</sup>。由于 AOX 介导的交替呼吸途径对氰化物具有抗性, 因此这种交替呼吸途径又被称为抗氰呼吸途径 (Cyanide-resistant respiration, CRR)。真菌的交替呼吸途径同植物的交替呼吸途径一样, 起到了能量溢流的作用。

在真菌的代谢过程中, 交替呼吸途径的存在与否及其强度是可被诱导调节的。在柠檬酸生产菌株黑曲霉 *Aspergillus niger* 中, Hattori 等<sup>[7]</sup>发现交替呼吸途径是一直存在的; 而 Li 等<sup>[8]</sup>发

现在粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 中, 交替呼吸途径可被线粒体蛋白抑制剂氯霉素诱导产生; 用细胞色素呼吸链的抑制剂抗霉素 A 或者氰化钾处理汉逊氏酵母 *Hansenula anomala* 同样能够诱导交替呼吸途径<sup>[9]</sup>。作者也在米根霉 *Rhizopus oryzae* 发酵产富马酸的过程中发现了交替呼吸途径的存在, 在富马酸的快速积累阶段, 交替呼吸强度占总呼吸的比例达到 60%左右, 而到发酵后期, 该强度下降至 40%<sup>[10]</sup>。

## 2 真菌中交替呼吸链的末端氧化酶 AOX

交替氧化酶 AOX 镶嵌在线粒体内膜上, 该酶已经在所有的高等植物、许多藻类和真菌中发现<sup>[11]</sup>。AOX 的功能与复合物 I、复合物 III 相

似, 氧化泛醌并转移 4 个电子与氧结合生成水<sup>[6]</sup>, 即在细胞色素呼吸链抑制剂 (如抗霉素 A 或氰化物) 存在时, 电子传递过程依然能继续进行, 电子依次传递给 AOX 和 O<sub>2</sub>。水杨氧肟酸 (Salicylhydroxamic acid, SHAM) 和没食子酸丙酯 (*n*-propyl gallate) 能特异性抑制 AOX 活性<sup>[12]</sup>, 但不影响细胞色素呼吸链的呼吸活性; 所以 AOX 特异性抑制剂能把细胞色素呼吸途径和交替呼吸途径的呼吸活动区分开, 常用于氧电极 (Oxygen electrode) 测定交替呼吸的活性<sup>[2]</sup>。

### 2.1 交替氧化酶 AOX 的结构

虽然对 CN<sup>-</sup>不敏感的交替呼吸途径很早就被人发现了, 并确定了 AOX 的存在; 由于难以获得完全纯化并具有活性的 AOX, 有关其结构解析的研究工作尚未有明确的结果<sup>[13-14]</sup>。随着生物信息学技术的发展以及其他相关蛋白结构的解析, 人们根据 AOX 序列组成, 对其三级结构提出了两种假设模式: 即 SUM 模式 (图 2A) 和 AN 模式 (图 2B)。SUM 模式是由 Siedow 等<sup>[15]</sup>提出, 该模式认为 AOX 是一个完整的跨膜蛋白, 通过 2 个跨膜的  $\alpha$ -螺旋镶嵌在线粒体内膜上, N 末端和 C 末端为亲水结构域, 伸向线粒体基质, C 末端存在 4 个小  $\alpha$ -螺旋, 其中第 1 和第 4 个螺旋都包含有一个 EXXH 的保守序列单元, 形成双核铁中心。其中铁离子与该蛋白的活性密切相关。Andersson 等<sup>[16]</sup>认为上述的 SUM 模式与其他结构明确的双铁羧酸盐蛋白并非完全一致, 因此提出了与其他双铁蛋白结构类似的 AOX 活性位点模式, 即 AN 模式。AN 模式认为 AOX 是一种膜间蛋白, 而不是跨膜蛋白, 不包含跨膜螺旋结构, 是双核铁羧基蛋白家族中的一员, 由 4 个长螺旋束组成, 并认为这可能是 AOX 的活性位点, EXXH 保守序列位于第 2 和第 4 螺旋上。

该模式被大多数学者所接受, Berthold 等<sup>[17]</sup>研究了 AOX1a 在大肠杆菌中的表达, 且首次获得了交替氧化酶的电子顺磁共振 (Electron paramagnetic resonance, EPR) 信号, 证明了交替氧化酶具有双铁羧基蛋白家族中氢氧桥键的特征。AOX 中的 E217 或 E268 发生丙氨酸 (Ala) 突变后, 在 AOX 失活的同时 EPR 信号也消失了, 该实验支持 AOX 的蛋白结构是 AN 模式<sup>[18]</sup>。

### 2.2 交替氧化酶 AOX 的调控

虽然真菌交替呼吸和植物交替呼吸有很多相似之处, 但是在 AOX 的调控方式上却不尽相同。植物与部分真菌的交替呼吸诱导物和诱导条件如表 1 所示, 例如在植物中, 酮戊二酸和丙酮酸可以有效促进 AOX 活力, 加入丙酮酸后线粒体的交替呼吸活性可提高 4 倍<sup>[19]</sup>。但在微生物中, 尚未发现有机酸对 AOX 的促进作用。而在酵母菌如 *P. anomala*、*C. parapsilosis* 和 *Y. lipolytica* 以及一些霉菌、原生动物中, 嘌呤类核苷酸如 AMP、ADP、d-AMP 或 GMP 可以促进 AOX 的活性<sup>[20]</sup>, 但其作用机制尚不明确。

与真菌细胞色素呼吸调控不一样, AOX 的调控有着更为复杂的调控机理。2009 年, 日本学者发现在柠檬酸发酵过程中黑曲霉的 AOX 在转录水平上受调控<sup>[7]</sup>。作者在研究中发现, 米根霉发酵产富马酸的过程中 AOX 也在转录水平上受调控, 如 N 胁迫条件下 (Nitrogen starve stress) 米根霉的 *aox* 转录水平上升 3.72 倍, 交替呼吸强度亦显著上升 3.39 倍<sup>[10]</sup>。然而 AOX 的调控并不仅仅局限于转录水平, 有研究表明环己酰亚胺能够提高稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 的 AOX 的转录水平, 但却不能够提高 AOX 的活性, 这可能是由于部分转录物质的降解从而使转录水平与 AOX 活性表现不一致<sup>[21]</sup>。

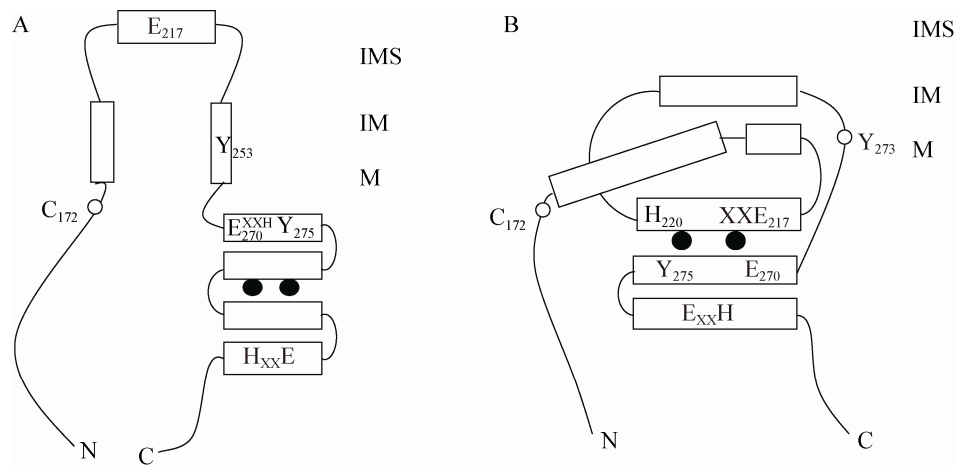


图 2 AOX 结构模式<sup>[18]</sup>

Fig. 2 Two proposed structural models of the AOX<sup>[18]</sup>. (A) The SUM model. (B) The AN model. IMS: intermembrane space; IM: inner membrane; M: matrix.

表 1 植物与部分真菌的 AOX 活性诱导条件

Table 1 The induction condition of the AOX in plants and parts of fungi

Plants or fungi	Inducer or induction condition	Reference
Plants	Low temperatures, osmotic status, wounding, pathogen attack, salicylic acid, citrate levels, pyruvate, et al	[22–24]
Fungi		
<i>Neurospora crassa</i>	Thermal shock	[25]
	chloramphenicol	[26]
	GMP	[27]
<i>Hansenula anomala</i>	Superoxide anion	[28]
	Sulfur compounds	[29]
	Cycloheximide	[30]
	AMP, ADP, GMP, et al	[31]
<i>Aspergillus niger</i>	Antimycin A	[32]
	Chloramphenicol	[33]
<i>Ustilago maydis</i>	AMP	[34]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	AMP, GMP, et al	[35]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Nitrogen stress	[10]

### 3 交替呼吸途径在真菌体内的生理功能

在植物和真菌中，交替呼吸途径可能与来自生物或非生物的环境胁迫因素有关。大约有 800 种植物能在受伤或遭遇病害侵染时产生氰化物，而相应的植物病原菌（如百脉根轮纹病菌 *Stemphylium loti*）则具有 AOX 介导的抗氰呼吸

途径，该途径的存在为解毒蛋白的合成提供了能量<sup>[4]</sup>。

如表 2 所示，真菌的交替呼吸途径在真菌生长、物质代谢和能量代谢等方面也都具有重要的作用。在真菌中研究较多的是交替呼吸途径对代谢产物的积累和对抗氧胁迫的作用。例如，Kern 等<sup>[40]</sup>在研究巴斯德毕赤酵母 *Pichia*

表 2 真菌交替呼吸途径的生理功能

Table 2 The physiological functions of alternative respiration pathway in fungi

Strains	Physiological functions	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	Stimulate citric acid accumulation	[36]
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Resistance to oxidative stress	[37]
	Stimulate antibiotic production	[38]
	Effect on fungal morphology	[5]
Pathogenic fungi	Therapeutic targets	[39]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Stimulate fumaric acid accumulation	[10]
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Regulation of growth, resistance to oxidative stress	[3]

*pastoris* 的交替呼吸时,发现过量表达 *aox* 或敲除 *aox* 后均能影响酵母细胞的生长和底物的代谢水平;Xu 等<sup>[1]</sup>研究发现,在核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 中,交替呼吸能促进菌丝的生长发育及菌核的形成,在培养过程中加入 SHAM 后能明显地抑制菌丝的生长和菌核的形成。在树干毕赤酵母 *Pichia stipitis* 中,交替呼吸可能作为氧化还原缓冲池,在木糖的限氧发酵过程中防止木糖转化为木糖醇<sup>[4]</sup>。

### 3.1 交替呼吸对代谢产物积累的影响

真菌的呼吸途径同其他真核生物的呼吸途径一样,在电子传递过程中,能量由线粒体内膜跨膜复合物<sub>I</sub>和<sub>III</sub>处泵出质子而被保留,驱动合成 ATP,因而每传递两个电子产生 2.5 分子 ATP。NADH/NAD<sup>+</sup>通过呼吸链与 ATP 的产生密切相关,ATP 在细胞的生理功能上发挥着中枢作用。当合成代谢产物消耗的 ATP 有限时就会造成 ATP 的大量积累,进而抑制糖酵解途径的进行,导致底物消耗速率下降,代谢产物减少。但是以 AOX 介导的交替呼吸途径,电子流只在复合物<sub>I</sub>处泵出质子,电子由泛醌传递至 AOX 时,并不与质子泵偶联,导致每传递两个电子只产生 1 分子 ATP,起到了能量溢流的作用,平衡碳代谢和电子传递的关系,将 ATP

合成与 TCA 循环独立开来,使得 TCA 循环继续进行,促进了碳骨架的流通,有利于代谢产物的生成<sup>[41]</sup>。

柠檬酸、头孢霉素 C 等重要工业真菌发酵过程的代谢调控都与交替呼吸(抗氰呼吸)有关。1980 年,Zehentgruber 等<sup>[33]</sup>在黑曲霉 *Aspergillus niger* 中发现了交替呼吸途径,随后 Kubicek 等<sup>[36]</sup>证实该途径与柠檬酸过量积累有重要关系。Kirimura 等<sup>[41]</sup>报道,在 *A. niger* 发酵产柠檬酸阶段,SHAM 敏感呼吸途径增强,氰化物敏感呼吸途径降低;柠檬酸的产量和生产速率随着交替呼吸途径的增强而增强,当发酵液中添加 SHAM 时,柠檬酸的产量和产率迅速下降。1987 年,Hilgendorf 等<sup>[42]</sup>在研究溶氧对顶头孢霉 *Acremonium chrysogenum* 产头孢霉素 C 的影响时,提出该菌中可能存在交替呼吸途径,1991 年 Kozma 等<sup>[42]</sup>证实了该途径的存在,此后进一步解析了交替呼吸促进头孢霉素 C 过量合成的作用机制<sup>[43-44]</sup>。Karaffa 等研究发现,顶头孢霉 *Acremonium chrysogenum* 合成头孢霉素 C 的过程中,交替呼吸途径起到了至关重要的作用<sup>[3]</sup>,菌体的 AOX 活力和头孢霉素 C 生产之间具有良好的正相关性,相关系数达 0.9;使用 SHAM 特异性抑制交替呼吸途径时,头孢霉

素 C 的合成速率会快速下降至几乎为 0,而生物量的合成不受影响。

本课题组对米根霉利用木糖和葡萄糖的代谢差异进行研究发现,米根霉在木糖培养条件下胞内还原力 (NADH/NAD<sup>+</sup>) 和 ATP 含量较高,胞内代谢趋向于合成反应,米根霉生物量较高;而在葡萄糖培养条件下米根霉胞内还原力以及 ATP 的含量较低,但有机酸积累量较高<sup>[45]</sup>。对米根霉的呼吸特征研究表明<sup>[10]</sup>,米根霉代谢木糖时,不存在交替呼吸活性,而米根霉代谢葡萄糖时交替呼吸活性较强,在米根霉利用葡萄糖发酵产富马酸阶段,富马酸的生产速率和米根霉交替呼吸强度成正相关关系,发酵过程中添加 SHAM 会抑制富马酸的积累。这一现象表明交替呼吸起到了减少细胞内氧化还原力,调节胞内氧化还原状态的作用,并且最终导致了代谢产物的变化。

但是,交替呼吸现象的存在也并不总是表现为促进产物合成。Shi 等<sup>[46]</sup>对树干毕赤酵母 *Pichia stipitis* 的 SHAM 敏感型末端氧化酶 (PsSto1p) 的基因 (*PsSTO1*) 进行了敲除,结果表明突变株生长周期更短,发酵木糖产乙醇量增加了 20%;同时,在酿酒酵母中异源表达 *PsSTO1* 能增加总体氧消耗速率并使重组菌获得了抗氧呼吸能力。

### 3.2 交替呼吸对真菌抗氧胁迫 (Oxidative stress) 的作用

生物体细胞在新陈代谢过程中会产生大量的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS),同时生物体细胞也会通过一系列的代谢系统清除 ROS,从而保证生物体内氧代谢的平衡<sup>[47]</sup> (图 3)。细胞内 ROS 的产生和清除是处于一种动态平衡的过程。丝状真菌发酵过程通常需要好氧环境,

提高发酵溶氧水平成为发酵工艺及装备热衷追求的目标。发酵罐的溶氧水平一般会高于摇瓶,理论上真菌在发酵罐中能获得更好的培养;而实际上从摇瓶培养接种到高溶氧发酵罐中时,往往导致延滞期增加,生长速率下降,底物消耗速率下降,胞内蛋白质和 ATP 含量下降。这一现象的产生与增加溶氧时 O<sub>2</sub> 导致细胞内活性氧物质 ROS 的大量积累有关,ROS 抑制了初级代谢关键酶 (3-磷酸甘油醛脱氢酶、顺乌头酸酶等),导致代谢速率下降。

细胞内的活性氧物质 ROS 对交替呼吸途径的激活有着重要作用<sup>[48]</sup>。对生存不利的环境如含有电子传递链的抑制剂氰化物、抗霉素 A,线粒体中蛋白质合成抑制剂氯霉素,以及高温、低 pH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等环境胁迫条件都可以激活交替呼吸途径;其本质在于上述胁迫环境导致了胞内 ROS 的产生,而 ROS 作为调控信号影响一系列基因表达。因此,几乎所有交替呼吸的诱导条件都可以导致 ROS 积累,从而促进 *aox* 基因的表达。AOX 作为 ROS 清除剂,可以在线粒体呼吸链中促使 O<sub>2</sub> 与还原醌相互作用,从而降低 ROS 的产生量<sup>[49]</sup>,而且 AOX 可以抑制线粒体中电子传递链复合物的过度还原,防止产生过多的 ROS,并激活 ROS 清除系统来降低 ROS,从而减少 ROS 对细胞的伤害<sup>[50-51]</sup>。Mangnani 等<sup>[52]</sup>研究发现烟曲霉 *Aspergillus fumigates* 在受到百草枯处理导致的氧化胁迫时,其交替氧化酶在核酸水平和蛋白水平上都有提高。Maxwell 等<sup>[53]</sup>发现抑制 AOX 可导致线粒体 ROS 上升;而反过来表达 AOX 则能降低 ROS,并可以同时增强 ROS 清除系统的活性。因此,可以说交替呼吸途径是一个强力的抗 ROS 系统,这对微生物适应环境胁迫,平衡体内氧化还原水平至关重要。

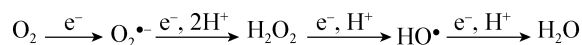


图3 胞内氧活性物质 ROS 的代谢机制<sup>[47]</sup>

Fig. 3 ROS metabolism mechanism in intracellular<sup>[47]</sup>.

#### 4 结束语

近年来的工业生物技术的相关研究表明, ATP、NADH 及 NADPH 等能量因子参与了各种重要平台化学品和聚合物的合成途径, 如何调控能量代谢与物质代谢相匹配, 成为领域关注的热点<sup>[54]</sup>。真菌的交替呼吸途径不仅具有环境胁迫下的抗逆调控作用, 还是微生物平衡物质代谢和能量代谢的天然途径, 用于调节能量代谢, 对于代谢流的迁移以及代谢产物的积累具有重要影响。因此, 对于真菌发酵体系, 可以关注交替呼吸途径的存在与否及其诱导调控方式。交替呼吸途径及其关键酶 AOX 有可能成为工业真菌能量代谢调控的新靶标。

#### REFERENCES

- [1] Xu T, Yao F, Liang WS, et al. Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidase stress of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Microbiol*, 2012, 50(4): 594–602.
- [2] Costa-de-Oliveira S, Sampaio-Marques B, Barbosa M, et al. An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: implications on susceptibility profile and oxidative stress. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(4): 423–429.
- [3] Karaffa L, Sándor E, Kozma J, et al. Cephalosporin-C production, morphology and alternative respiration of *Acremonium chrysogenum* in glucose-limited chemostat. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(6): 701–706.
- [4] Veiga A, Loureiro-Dias MC. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res*, 2003, 3(3): 239–245.
- [5] Li Q, Bai Z, O'Donnell A, et al. Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(3): 457–467.
- [6] Kakizaki Y, Ito K. Engineering plant alternative oxidase function in mammalian cells: substitution of the motif-like sequence ENV for QDT diminishes catalytic activity of *Arum concinatum* AOX1a expressed in HeLa Cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 170(2): 1229–1240.
- [7] Hattori T, Kino K, Kirimura K. Regulation of alternative oxidase at the transcription stage in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid production. *Curr Microbiol*, 2009, 58(4): 321–325.
- [8] Li Q, Ritzel RG, McLean LL, et al. Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 1996, 142(1): 129–140.
- [9] Minagawa N, Yoshimoto A. The induction of cyanide-resistant respiration in the absence of respiratory inhibitors in *Hansenula anomala*. *Agr Biol Chem*, 1987, 101(5): 1141–1146.
- [10] Gu S, Xu Q, Huang H, et al. Alternative respiration and fumaric acid production of *Rhizopus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(11): 5145–5152.
- [11] Stanic M, Zakrzewska J, Hadzibrahimovic M, et al. Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism. *Res Microbiol*, 2013, 164(7): 770–778.
- [12] Inoue K, Tsurumi T, Ishii H, et al. Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 326(1): 83–90.
- [13] Finnegan PM, Umbach AL, Wilce JA. Prokaryotic origins for the mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase nuclear genes. *FEBS Lett*, 2003, 555(3): 425–430.
- [14] Affourtit C, Moore AL. Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum*: measurement, stability and metal requirement.



- Biochim Biophys Acta, 2004, 1608(2/3): 181–189.
- [15] Siedow JN, Umbach AI, Moore AI. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center. FEBS Lett, 1995, 362(1): 10–14.
- [16] Andersson ME, Nordlund P. A revised model of the active site of alternative oxidase. FEBS Lett, 1999, 449(1): 17–22.
- [17] Berthold DA, Voevodskaya N, Stenmark P, et al. EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. J Biol Chem, 2002, 277(15): 43608–43614.
- [18] Albury MS, Affourtit C, Crichton PG, et al. Structure of the plant alternative oxidase: site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology. J Biol Chem, 2002, 277(2): 1190–1194.
- [19] Day DA, Millar AH, Wiskich JT, et al. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. Plant Physiol, 1994, 106(4): 1421–1427.
- [20] Cabrea-Orefice A, Chiquete-Felix N, Espinasa-Jaramillo J, et al. The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: components and supramolecular organization. Biochim Biophys Acta, 2014, 1837(1): 73–84.
- [21] Yukioka H, Inagaki S, Tanka R, et al. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta, 1998, 1442(2/3): 161–169.
- [22] Vanlerberghe GC, McIntosh L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. Plant Physiol, 1992, 100(1): 115–119.
- [23] McIntosh L. Molecular biology of the alternative oxidase. Plant Physiol, 1994, 105(3): 781–786.
- [24] Vanlerberghe GC, McIntosh L. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. Plant Physiol, 1996, 111(2): 589–595.
- [25] Habel D, Plesofsky-Vig N, Brambl R. The respiratory response to heat shock in *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol Lett, 1991, 65(3): 317–322.
- [26] Lambowitz AM, Smith EW, Slayman CW. Oxidative phosphorylation in *Neurospora crassa*. Studies on wild type, poky, and chloramphenicol-induced wild type. J Biol Chem, 1972, 247(15): 4859–4865.
- [27] Umbach AL, Siedow JN. The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. Arch Biochem Biophys, 2000, 378(2): 234–245.
- [28] Minagawa N, Koga S, Nakano M, et al. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. FEBS Lett, 1992, 302(3): 217–219.
- [29] Minagawa N, Sakajo S, Yoshimoto A. Induction of cyanide-resistant respiration by sulphur compounds in *Hansenula anomala*. Agric Biol Chem, 1991, 55(1): 1573–1578.
- [30] Minagawa N, Sakajo S, Komiyama T, et al. A 36-kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. FEBS Lett, 1990, 264(1): 149–152.
- [31] Sakajo S, Minagawa N, Yoshimoto A. Effects of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A-treated yeast *Hansenula anomala*. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(2): 396–399.
- [32] Kirimura K, Matsui T, Sugano S, et al. Enhancement and repression of cyanide-insensitive respiration in *Aspergillus niger*. FEMS Microbiol Lett, 1996, 141(2/3): 251–254.
- [33] Zehentgruber O, Kubicek CP, Röhr M. Alternative respiration of *Aspergillus niger*. FEMS Microbiol Lett, 1980, 8(2): 71–74.
- [34] Juarez O, Guerra G, Martinez F, et al. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. Biochim Biophys Acta, 2004, 1658(3): 244–251.
- [35] Medentsev AG, Arinbasarova AY, Akimenko VK. Reactivation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by nucleoside monophosphates. FEMS Yeast Res, 2004, 5(3): 231–236.

- [36] Kubicek CP, Zehentgruber O, El-Kalak H, et al. Regulation of citric acid production by oxygen: effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1980, 9(2): 101–115.
- [37] Karaffa L, Vaczy K, Sandor E, et al. Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Radic Res*, 2001, 34(4): 405–416.
- [38] Karaffa L, Sándor E, Kozma J, et al. The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999, 51(5): 633–638.
- [39] Martins VP, Dinamarco TM, Curti C, et al. Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. *J Bioenerg Biomembr*, 2011, 43(1): 81–88.
- [40] Kern A, Hartner FS, Freigassner M, et al. *Pichia pastoris* ‘just in time’ alternative respiration. *Microbiology*, 2007, 153(4): 1250–1260.
- [41] Kirimura K, Yoda M, Shimizu H, et al. Contribution of cyanide-insensitive respiratory pathway, catalyzed by the alternative oxidase, to citric acid production in *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(10): 2034–2039.
- [42] Hilgendorf P, Heiser V, Diekmann H, et al. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 27(3): 247–251.
- [43] Kozma J, Lucas L, Schügerl K. Alternative respiration of *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnol Lett*, 1991, 13(12): 899–900.
- [44] Kozma J, Karaffa L. Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J Biotechnol*, 1996, 48(1): 59–66.
- [45] Dou C, Xu Q, Song P, et al. Metabolism of *Rhizopus oryzae* with xylose or glucose as carbon resource. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(4): 468–473 (in Chinese).  
窦畅, 徐晴, 宋萍, 等. 米根霉利用木糖与葡萄糖的代谢差异, *微生物学报*, 2011, 51(4): 468–473.
- [46] Shi NQ, Cruz J, Sherman F, et al. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. *Yeast*, 2002, 19(14): 1203–1220.
- [47] Li Q, Harvey LM, McNeil B. Oxidative stress in industrial fungi. *Crit Rev Biotechnol*, 2009, 29(3): 199–213.
- [48] Martins VP, Dinamarco TM, Soriani FM, et al. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(2): 237–248.
- [49] Møller IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol*, 2001, 52(1): 561–591.
- [50] EI-Khoury R, Dufour E, Rak M, et al. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genet*, 2012, 9(1): e1003182.
- [51] Liao YWK, Shi K, Fu LJ, et al. The reduction of reactive oxygen species formation by mitochondrial alternative respiration in tomato basal defense against TMV infection. *Planta*, 2012, 235(2): 225–238.
- [52] Magnani T, Soriani FM, Martinsl VP, et al. Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 271(2): 230–238.
- [53] Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(14): 8271–8276.
- [54] Zhou J, Liu L, Shi Z, et al. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(1): 94–101.

(本文责编 郝丽芳)