

工业生物技术

表达耐辐射异常球菌 IrrE 蛋白对产丁二酸大肠杆菌耐渗透压的影响

朱兴贵¹, 吴明科¹, 马江锋¹, 高有军², 陈美丽¹, 姜岷¹

1 南京工业大学 生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

2 常茂生物化学工程股份有限公司, 江苏 常州 213034

朱兴贵, 吴明科, 马江锋, 等. 表达耐辐射异常球菌 IrrE 蛋白对产丁二酸大肠杆菌耐渗透压的影响. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1372-1380.

Zhu XG, Wu MK, Ma JF, et al. Influence of expressing IrrE from *Deinococcus radiodurans* on osmotic stress tolerance of succinate-producing *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1372-1380.

摘 要: 高渗透压胁迫是降低生物法制备丁二酸生产效率的关键因素之一。为提高丁二酸生产菌株对高渗透压胁迫的耐受性能, 本研究考察了外源引入全局调控蛋白 IrrE 提高大肠杆菌耐高渗透压胁迫性能的可行性。试验结果表明, 在不同浓度 Na⁺胁迫下, 重组菌生长和发酵性能明显提升。在 5 L 罐发酵中, 重组菌最大细胞干重、糖耗和丁二酸产量比对照菌分别提高了 15.6%、22%和 23%, 表明引入 IrrE 蛋白可提高菌株对高渗透压胁迫的耐受能力。进一步比较重组菌和对照菌胞内相容性物质海藻糖和甘油的浓度后发现, 重组菌胞内海藻糖和甘油浓度明显提高, 其最大积累量分别是对照菌的 1.3 和 3.8 倍, 推测 IrrE 可通过增加胞内相容性物质的积累提高菌株对高渗透压胁迫的耐受性。

关键词: 渗透压, 全局调控, IrrE 蛋白, 丁二酸

Received: March 23, 2016; **Accepted:** May 12, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076105), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, Special Research Found for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20123221110008).

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-84172062; E-mail: bioengine@njtech.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21076105), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701), 江苏高校优势学科建设工程资助项目, 高等学校博士学科点转向科研资金 (No. 20123221110008) 资助。

Influence of expressing IrrE from *Deinococcus radiodurans* on osmotic stress tolerance of succinate-producing *Escherichia coli*

Xinggui Zhu¹, Mingke Wu¹, Jiangfeng Ma¹, Youjun Gao², Meili Chen¹, and Min Jiang¹

¹ State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

² Changmao Biochemical Engineering Company Limited, Changzhou 213034, Jiangsu, China

Abstract: Hyper-osmotic stress is one of the key factors that decrease the efficiency of biological succinic acid production. To increase the osmotic stress tolerance of succinate-producing *Escherichia coli*, we studied the influence of IrrE, an exogenous global regulator, on cell osmotic stress resistance. Fermentation results showed that cell growth and succinic acid production by the recombinant increased under different Na⁺ concentrations. Meanwhile, the maximum dry cell mass, glucose consumption and succinic acid concentration increased 15.6%, 22% and 23%, respectively, when fermented in a 5-L bioreactor. Expressing IrrE improved cell resistance to hyper-osmotic stress. Further comparison of intracellular osmoprotectants (trehalose and glycerol) concentrations showed that trehalose and glycerol concentrations in the recombinant increased. This suggested that introduction of IrrE could enhance intracellular osmoprotectants accumulation which conferred cell with improved resistance to osmotic stress.

Keywords: osmotic pressure, global regulation, IrrE, succinic acid

高渗透压胁迫是微生物发酵过程中常见的胁迫之一。以丁二酸生产为例,为维持合适的菌株生长代谢环境,发酵过程中需不断添加 pH 中和剂中和所生成的丁二酸,结果体系中被引入大量的金属离子如钠、钾、铵等,使得发酵末期体系的渗透压不断增大,对菌株的生长及产酸产生了严重的抑制。Lee^[1]和 Fang^[2]等曾报道,在产丁二酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 和产丁二酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* 发酵过程中,当 NaCl 的浓度分别高于 4 g/L 和 0.5 mol/L 时,菌体的生长以及产酸性能都受到抑制。此外,高糖和产物浓度也会对菌株造成高渗透压的胁迫。因此,提高菌株对高渗透压胁迫的耐受性能是提高整个丁二酸发酵过程效率的关键因素之一。

研究者们已在这一方面展开了不同策略的研究,获得了一些耐受性能提升的菌株。如 Fang 等^[3]通过连续培养法筛选出可耐受 0.7 mol/L NaCl 的丁二酸放线杆菌 CH050,其丁二酸产量达 66 g/L,比出发菌株提高了 37.5%。徐敏等^[4]通过紫外线和甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变处理,得到 1 株产丁二酸放线杆菌突变菌,丁二酸产量达到 35.8 g/L,较出发菌提高了 37.7%。另一方面,向发酵液中外源添加相容性物质也是提高菌株耐受性能的常用方法之一。如在发酵培养基中添加甜菜碱,Andersson 等^[5]发现在高糖浓度下 (150 g/L) 菌株生产丁二酸发酵周期比未添加甜菜碱的缩短了 32 h。Fang 等^[2]比较了高渗透压胁迫下不同相容性物质对 *A. succinogenes* 产丁二酸的影响后发现,当添加 25 mmol/L 脯

氨酸时,菌株 *A. succinogenes* NJ113 生产丁二酸浓度达到最高,为 56.2 g/L,比未添加情况下提高了 22.2%。此外,利用基因工程技术实现胞内相容性物质如海藻糖的合成也是提高大肠杆菌在高渗透压下的方法之一^[6]。然而,需要指出的是,细胞能耐受高渗透压胁迫,往往需要协调体内众多基因的转录和翻译水平,单个或几个基因的改造和修饰虽可提高菌株的耐受性,但具有一定的局限性,因此需要从全基因组水平上进行转录调控以更好地提高菌株对高渗透压胁迫的耐受性。

全转录工程 (Global transcription machinery engineering) 是通过调控全基因组转录水平获得有益细胞表型的一种定向进化方法^[7]。如对 CRP^[8-10]、spt15^[11-12]和 σ 因子^[13]的改造可以有效提高生物体对渗透压、乙醇和丁醇的耐受性。IrrE 是来自于耐辐射异常球菌 *Deinococcus radiodurans* 的一个全局调控蛋白^[14],其作为激活生物体内相关重要基因的开关,可调控至少 400 个基因^[15]。研究表明异源引入 IrrE 可以增强微生物耐受辐射^[16]、氧化及高温胁迫的能力^[17-18]。此外将其外源表达还可提高植物对干旱和盐胁迫的耐受性能^[19]。在运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中表达 IrrE 可有效提高其对乙醇、酸、渗透压和热等多重胁迫的耐受性,使得菌种在发酵过程保持旺盛的生长和代谢活力,乙醇产量达 14.59 g/L,比出发菌株提高了 66.7%^[20]。在产乙醇大肠杆菌 *Escherichia coli* 中引入 IrrE,不仅提高大肠杆菌耐受渗透压能力,且乙醇生产中两个关键酶丙酮酸脱羧酶 (PDC) 和乙醇脱氢酶 (ADH) 的活力都得到提升^[21]。在以葡萄糖和木糖为碳源发酵时,乙醇产量分别达 39.63 g/L 和 34.53 g/L,分别提高了

14.7%和 26.3%。

因此,本文以产丁二酸大肠杆菌 BER208 为出发菌株,引入 IrrE 调控蛋白,考察其对菌株耐受高渗透压胁迫的影响。在此基础上,检测了 IrrE 对胞内相容性物质合成的影响,初步解析了 IrrE 提高菌株耐高渗透压性能的原因。

1 材料与方法

1.1 菌株

Escherichia coli BER208 :保藏号为 CCTCC NO: M2012351^[22];其是由丁二酸生产菌株 *E. coli* AFP111 (F+ λ - *rpoS396* (*am*) *rph-1* Δ (*pf1B*: : Cam) *ldhA*: : Kan *ptsG*) 通过 ARTP 诱变和进化代谢选育得到。

Escherichia coli DH5 α : F- ϕ 80d1acZ Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*rk*-, *mk*+), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*。

1.2 培养基

JSM 培养基 :柠檬酸 3 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 4 g/L, KH₂PO₄ 8 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 8 g/L, NH₄Cl 0.2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.75 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, CaCl₂·2H₂O 10 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 0.5 mg/L, CuCl₂·2H₂O 0.25 mg/L, MnSO₄·H₂O 2.5 mg/L, CoCl₂·6H₂O 1.75 mg/L, H₃BO₃ 0.12 mg/L, Al₂(SO₄)₃ 1.77 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.5 mg/L, 柠檬酸铁 16.1 mg/L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min ;维生素 B₁ 20 mg/L, 生物素 2 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 IrrE 重组大肠杆菌的构建

从 NCBI 中获得 *groE* 启动子^[23]和 *irrE* 基因的序列信息,由 Primer 5 软件设计引物,如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of Primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	GGATACCCCCATTCCCCGTCC
P2	GACGTTGGCACTGGGCACGTG GGGTCCTCCTGTG
P3	CACTCACAGGAGGACCCAC GTGCCAGTGCCAACGTC
P4	GTTCACTGTGCAGCGTCCTG

以耐辐射异常球菌基因组 DNA 为模板,采用 Over-lap PCR 方法连接,使用 DNA 聚合酶进行 PCR。扩增条件:94 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 45 s,59 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 3 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增得到 *groE* 和 *irrE* 片段,切割回收纯化后,经第 3 轮 PCR,条件如上,将两片段融合成一条,再通过 T-A 克隆连接到 pMD19-T 载体上。通过菌落 PCR 和测序对 IrrE 重组大肠杆菌进行筛选和鉴定,成功构建带有 *groE* 启动子的对照质粒 pMG1 和成功表达 IrrE 的质粒 pMG1-*irrE*。

1.3.2 种子培养方法

将保存于-80 °C 冻存管中的菌株以 1% 的接种量转接到装液量为 5 mL 的试管中,37 °C、200 r/min 过夜培养作为一级种子。将试管中的一级种子,以 1% 的接种量转接到含 100 mL JSM 的 500 mL 三角瓶中,37 °C、200 r/min 培养 6 h,作为二级种子。

1.3.3 血清瓶厌氧发酵

按 1% 接种量 将二级种子液接种到含 30 mL JSM 发酵培养基的血清瓶中,通 CO₂ 气体 2 min 以维持厌氧,200 r/min、37 °C 培养 48 h。

1.3.4 发酵罐分批补料培养方法

采用发酵培养基,在 5 L 发酵罐(上海生物宝兴)中进行一步厌氧发酵,接种量 10%,发酵温度 37 °C,用 20% Na₂CO₃ 溶液控制 pH 在

6.8,转速 200 r/min,初糖浓度为 30 g/L,当糖浓度低于 5 g/L 时补加葡萄糖至 30 g/L。

1.3.5 分析检测

菌体密度测定:紫外可见分光光度计(Spectrumlab752S),于 600 nm 处测定吸光值,细胞干重 DCW=OD₆₀₀×0.4。

葡萄糖浓度测定:生物传感分析仪(SBA240C,山东省科学院生物研究所)。

发酵液中有机的测定:用高效液相色谱法检测,色谱柱为 Prevail Organic Acid,流动相为 25 mmol/L KH₂PO₄ (pH 2.5) 流速 1.0 mL/min,紫外检测波长 215 nm。

相容性物质的提取^[24]:取 1 mL 样品,4 °C、12 000×g 离心 10 min,并用冰冷的蒸馏水洗涤 2 次。所得细胞用 700 W 微波炉微波破碎。破碎方式为微波破碎 60 s,间歇 30 s,循环 6 次后用 1 mL 蒸馏水室温提取 1 h。离心后上清液用微孔滤膜过滤后,-80 °C 保存待用。

相容性物质的检测^[24]:用高效液相色谱分析海藻糖和胞内甘油的含量。色谱柱为 Aminex·resin-based 柱(Bio-Rad,美国);柱温为 65 °C;流动相为 5 mmol/L H₂SO₄,流速为 0.800 mL/min。海藻糖的单位定义为每克细胞干重所含海藻糖的质量,胞内甘油的单位定义为每克细胞干重所含胞内甘油的质量。

2 结果与分析

2.1 IrrE 重组大肠杆菌的构建和鉴定

分别以引物 P1、P2 进行第一轮扩增得到 *groE* 启动子片段,通过 T-A 克隆连接到 pMD19-T 载体上,成功构建对照质粒 pMG1 质粒。以引物 P3、P4 进行第 2 轮扩增得到 *irrE* 基因片段,再以 P1、P4 为引物进行第 3 轮扩增得到 *groE-irrE* 融合片段,

再通过 T-A 克隆构建质粒 pMG1-*irrE* 质粒。以 pMD19-T 上通用引物 M13F/M13R 进行菌落 PCR, 筛选阳性克隆, 再通过 *Kpn* I 酶切验证和测序鉴定成功构建 *IrrE* 重组大肠杆菌, 结果如图 1 所示。

2.2 引入 *IrrE* 对菌株在不同钠离子浓度下厌氧生长及产酸的影响

以 NaCl 为渗透压调节剂, 首先考察了不同浓度 Na⁺胁迫对照菌 *E. coli* BER208 的生长及产酸性能。由表 2 可知, 随着 Na⁺浓度的提高, 菌株 *E. coli* BER208 的生长和产酸性能不断降低。如在 0.5 mol/L Na⁺胁迫下, 细胞干重和丁二酸产量分别为 0.53 g/L 和 3.51 g/L, 相比于 0.3 mol/L Na⁺浓度下的细胞干重和产酸量分别降低了 76% 和 83%, 表明细胞受到了严重的渗透压胁迫。引入 *IrrE* 后, 在相同 Na⁺浓度下, 重组菌生长、糖耗、产酸量和糖酸得率相比对照菌株都有明显提升, 仍以 0.5 mol/L Na⁺胁迫下的生长和产酸情况为例, 重组菌 BER208/pMG1-*irrE* 生长和产酸性能明显提升, 细胞干重和产酸量分别较对照菌提高了 4.2 和 4.4 倍, 同时丁二酸相对于葡萄

糖的收率提高了 22.6%。该研究结果表明, 引入 *IrrE* 可提高丁二酸生产大肠杆菌 BER208 对高渗透胁迫的耐受性。但是, 随着 Na⁺浓度的不断提高, *IrrE* 提升菌株耐高渗透压性能不断减弱, 表明 *IrrE* 只有当渗透胁迫在一定范围内才能体现出明显效果, 继续提高渗透压压力, *IrrE* 对菌株耐渗透压性能的提升能力减弱。

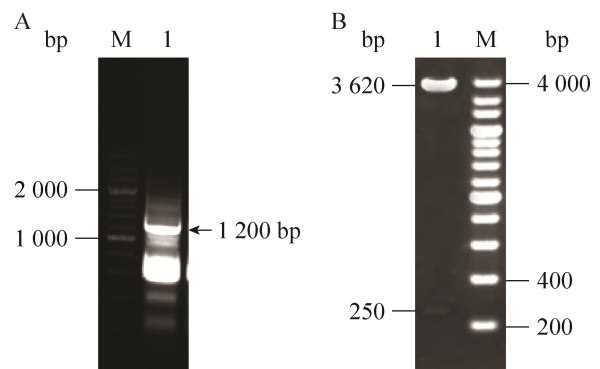


图 1 *IrrE* 表达质粒的构建和鉴定

Fig. 1 The construction and identification of *IrrE*-expressing plasmid. (A) Gel electrophoresis of *groE-irrE* fusion fragment. 1: *groE-irrE* fusion fragment 1200 bp; M: DL5000 marker. (B) The identification of *IrrE*-expressing plasmid by *Kpn* I digestion. M: 200 bp marker.

表 2 对照菌 *E. coli* BER208/pMG1 和重组菌 *E. coli* BER208/pMG1-*irrE* 在不同 Na⁺浓度下厌氧发酵结果

Table 2 The anaerobic fermentation results of *E. coli* BER208/pMG1 and *E. coli* BER208/pMG1-*irrE* under different Na⁺ concentration

Strains	Na ⁺ concentration (mol/L)	DCW (g/L)	Consumed glucose (g/L)	Product (g/L)			Yield (g/g) ^a
				Succinate	Acetate	Pyruvate	
BER208/pMG1	0.3	2.21±0.31	25.02±0.65	20.21±0.32	1.81±0.21	1.34±0.32	0.807
	0.5	0.53±0.11	5.75±0.32	3.51±0.43	0.39±0.02	1.3±0.08	0.610
	0.7	0.31±0.05	3.75±0.34	2.04±0.34	0.32±0.01	0.57±0.34	0.544
BER208/pMG1- <i>irrE</i>	0.3	3.21±0.24	32.23±0.23	28.17±0.92	2.08±0.21	1.21±0.22	0.874
	0.5	2.23±0.05	20.75±0.43	15.52±0.72	2.89±0.32	1.66±0.34	0.748
	0.7	0.47±0.23	8.00±0.23	4.92±0.33	1.21±0.03	1.28±0.63	0.615

a: yield is defined as the percentage of the concentrations of succinic acid in consumed glucose. Each value is the mean of three parallel replicates ± standard deviation.

2.3 IrrE 对重组菌在分批补料发酵过程中的影响

在上述研究结果的基础上,进一步在 5 L 发酵罐中考察重组菌厌氧生长及发酵产酸的情况,结果如图 2 所示。厌氧发酵 85 h 后,重组菌最大细胞干重达到 2.3 g/L,共消耗 72 g/L 葡萄糖,丁二酸产量为 53.2 g/L,得率为 0.736 g/g,其细胞干重、耗糖和丁二酸产量分别比对照提高了 15.6%、22%和 23%,但是糖酸得率没有明显提升。进一步考察发酵过程发现,在前 50 h 阶段,对照菌和重组菌的细胞生长、耗糖速度和丁二酸产量基本一致,而在 50 h 以后出现了明显的分化,即对照菌 BER208 的生长和产酸受到抑制,而重组菌 BER208/pMG1-*irrE* 则继续保持较高的生长和产酸能力。该结果表明,随着丁二酸产量的增加,发酵后期体系的渗透压不断增大,对菌株的生长和产酸产生了抑制,而表达 IrrE 后可提高菌株对高渗透压胁迫的耐受性。另一方面,极端情况下菌株生长性能的提高并不一定同步提升菌株的代谢性能,但本实验结果表明,引入 IrrE 不仅提高了细胞在高渗透压环境下的生长能力,同时使得细胞代谢合成丁二酸的性能也得到提升。

2.4 引入 IrrE 对菌株胞内海藻糖和甘油含量的影响

亲和性溶质是不带净电荷的易溶有机渗透保护物质,其在细胞内大量积累,能够给细胞的正常生理活动、DNA 复制和蛋白质分子的正确折叠提供稳定环境,从而提高微生物对高渗透压环境胁迫的耐受能力^[25-28]。海藻糖和甘油是细菌中广泛存在的亲和性物质。

为进一步解析 IrrE 提高菌株对高渗透压胁迫的耐受机制,分别对重组菌和对照菌体内的海藻糖和甘油含量进行了检测比较。如图 3 所示,

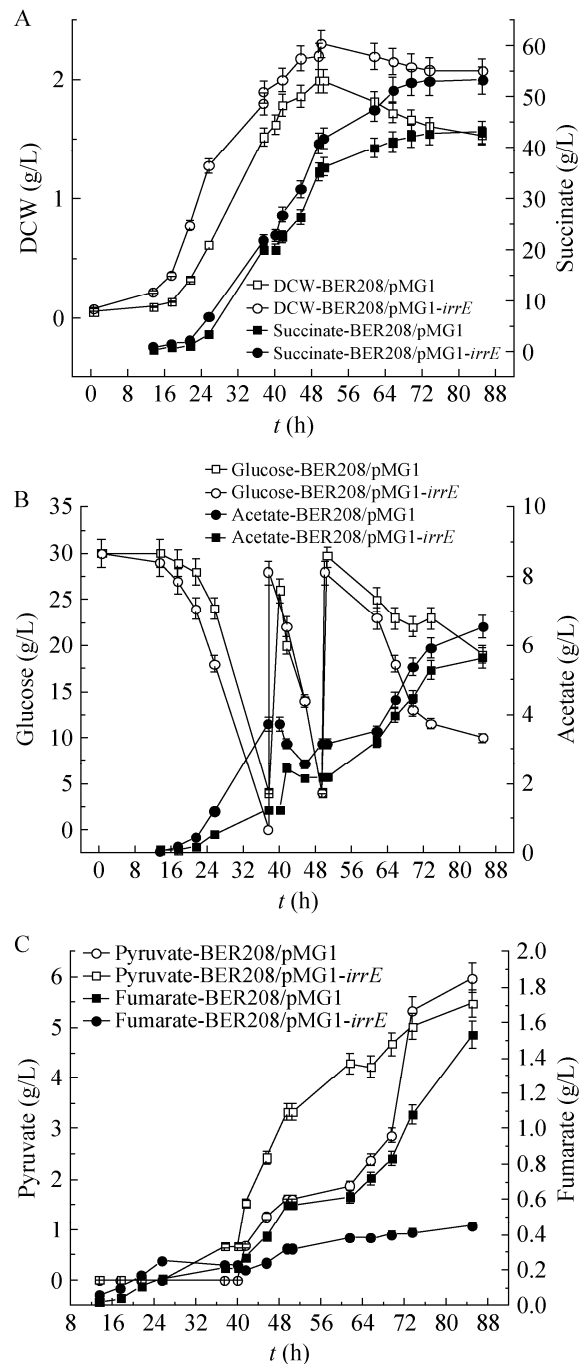


图 2 对照菌 *E. coli* BER208 和重组菌 *E. coli* BER208/pMG1-*irrE* 在 5 L 发酵罐一步厌氧发酵结果
Fig. 2 Exclusive anaerobic fermentation results of *E. coli* BER208 and *E. coli* BER208/pMG1-*irrE* in 5 L fermentor. (A) DCW and succinic acid. (B) Consumed glucose and acetate. (C) Pyruvate and fumarate.

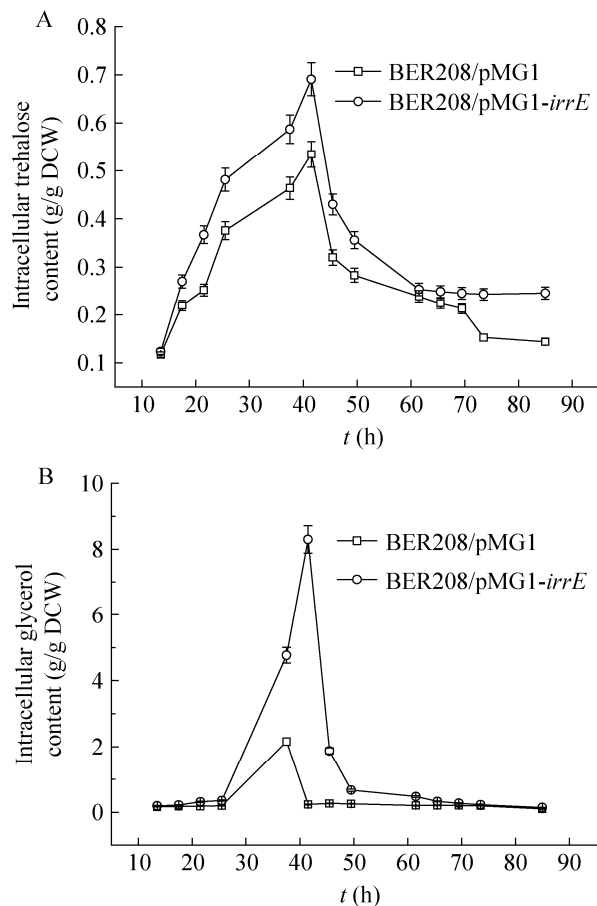


图3 对照菌 *E. coli* BER208 和重组菌 *E. coli* BER208/pMG1-*irrE* 胞内海藻糖浓度 (A) 及甘油浓度 (B) 对比

Fig. 3 The intracellular concentration of trehalose (A) and glycerol (B) in *E. coli* BER208 and *E. coli* BER208/pMG1-*irrE*.

发酵过程中, 重组菌胞内的海藻糖和甘油浓度均高于对照菌。在前 41.5 h, 随着培养基中 Na^+ 浓度积累细胞感知渗透压增加, 两株菌胞内海藻糖积累量快速上升, 在第 41.5 h 积累量都达到最大值, 其中重组菌胞内海藻糖浓度为 0.69 g/g DCW, 是对照菌 1.3 倍, 随后推测随着细胞的生长海藻糖可能作为胞内的一种储存性碳源被消耗利用而下降。同时, 发酵中期两株菌胞内甘油积累量也随着渗透压增加而增加, 且分别在 37.5 h 和

49.5 h 达到最大值, 其中重组菌胞内甘油浓度为 8.29 g/g DCW, 较对照菌提高了 3.8 倍, 随后更多甘油可能被运输到胞外继续保护细胞, 从而胞内的浓度逐渐降到很低^[29]。周正富等^[16]考察在有氧条件下引入 *IrrE* 后对菌株胞内海藻糖和甘油代谢相关基因转录水平的影响后发现, 外源引入 *IrrE* 一方面可降低甘油降解途径关键基因 (*glpABC* 和 *glpQ*) 及甘油转运途径关键基因 (*glpT*) 转录量, 另一方面可提高海藻糖合成途径关键基因 (*otsBA*) 的转录水平, 同时海藻糖分解途径相关基因 (*treBC*) 转录水平显著下调。因此我们认为厌氧条件下引入 *IrrE* 可能对胞内海藻糖和甘油的合成、降解和转运相关基因的转录水平也产生了影响, 使得菌株胞内相容性物质海藻糖和甘油的积累量提高, 并最终提高菌株对高渗透胁迫的耐受性。

3 结语

为提高丁二酸生产菌株对高渗透压胁迫的耐受性, 本文考察了利用 *irrE* 基因提高产丁二酸大肠杆菌 *E. coli* BER208 耐高渗透压胁迫的可行性。5 L 发酵罐结果表明, 引入 *IrrE* 后可有效提高 *E. coli* BER208 在高浓度 Na^+ 胁迫下的生长和代谢性能, 重组菌生长能力和丁二酸产量比对照菌提高了 15.6% 和 23%。进一步对菌株胞内相容性物质海藻糖和甘油的检测发现, 引入 *IrrE* 后胞内海藻糖和甘油最大浓度分别提高了 1.3 倍和 3.8 倍, 表明 *IrrE* 可通过提高胞内相容性物质的浓度提高菌株对高渗透胁迫的耐受性。

REFERENCES

- [1] Lee PC, Lee WG, Lee SY, et al. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and

- succinic acid production. *Proc Biochem*, 1999, 35(1/2): 49–55.
- [2] Fang XJ, Li J, Zheng XY, et al. Influence of osmotic stress on fermentative production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(1): 138–147.
- [3] Fang XJ, Li J, Zheng XY, et al. Enhancement of succinic acid production by osmotic-tolerant mutant strain of *Actinobacillus succinogenes*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(12): 3009–3013.
- [4] Xu M, Zheng P, Ni Y, et al. Breeding of Na⁺-tolerant mutants of *Actinobacillus succinogenes*. *Ind Microbiol*, 2008, 38(5): 7–11 (in Chinese).
徐敏, 郑璞, 倪晔, 等. 丁二酸放线杆菌的耐高浓度钠离子菌株选育. *工业微生物*, 2008, 38(5): 7–11.
- [5] Andersson C, Helmerius J, Hodge D, et al. Inhibition of succinic acid production in metabolically engineered *Escherichia coli* by neutralizing agent, organic acids, and osmolarity. *Biotechnol Progr*, 2009, 25(1): 116–123.
- [6] Purvis JE, Yomano LP, Ingram LO. Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 71(7): 3761–3769.
- [7] Qiao ZX. Application of global transcription machinery engineering in metabolic engineering. *Lett Biotechnol*, 2009, 20(5): 689–691 (in Chinese).
乔志新. 全局转录调控及其在代谢工程中的应用. *生物技术通讯*, 2009, 20(5): 689–691.
- [8] Zhang HF, Chong HQ, Ching CB, et al. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(4): 1107–1117.
- [9] Chong HQ, Huang L, Yeow JW, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP). *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e57628.
- [10] Zhang HF, Chong HQ, Ching CB, et al. Random mutagenesis of global transcription factor cAMP receptor protein for improved osmotolerance. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(5): 1165–1172.
- [11] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, 314(5805): 1565–1568.
- [12] Liu HM, Xu L, Yan M, et al. gTME for construction of recombinant yeast co-fermenting xylose and glucose. *Chin J Biotech*, 2008, 24(6): 1010–1015 (in Chinese).
刘红梅, 许琳, 严明, 等. gTME构建共发酵木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母. *生物工程学报*, 2008, 24(6): 1010–1015.
- [13] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9(3): 258–267.
- [14] Udupa KS, O'Cain PA, Mattimore V, et al. Novel ionizing radiation-sensitive mutants of *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, 1994, 176(24): 7439–7446.
- [15] Chen Z, Zhou ZF, Zhang W, et al. Research progress of the global regulator IrrE in *Deinococcus radiodurans*. *Curr Biotechnol*, 2013, 3(3): 179–184 (in Chinese).
陈震, 周正富, 张维, 等. 耐辐射异常球菌全局调控蛋白IrrE的研究进展. *生物技术进展*, 2013, 3(3): 179–184.
- [16] Gao GJ, Bing T, Liu LL, et al. Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*. *DNA Repair*, 2004, 2(12): 1419–1427.
- [17] Pan J. Salt tolerance and transcription profiling of *Escherichia coli* harboring the *irrE* gene, a global regulator of radiation resistance [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009 (in Chinese).
潘婕. 转抗辐射总体调控基因 $irrE$ 大肠杆菌的耐盐性及转录谱分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [18] Zhou ZF. Global regulation of the enhanced salt stress resistance *Escherichia coli* by IrrE, a transcriptional regulator of *Deinococcus*

- radiodurans* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese).
周正富. 耐辐射异常球菌转录调节蛋白IrrE增强大肠杆菌盐胁迫抗性的全局调控机制 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [19] Trape S. Impact of climate change on the relict tropical fish fauna of central sahara: threat for the survival of adrar mountains fishes, mauritania. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4400.
- [20] Zhang Y, Ma RQ, Zhao ZL, et al. *irrE*, an exogenous gene from *Deinococcus radiodurans*, improves the growth of and ethanol production by a *Zymomonas mobilis* strain under ethanol and acid stress. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(7): 1156–1162.
- [21] Ma RQ, Zhang Y, Hong HZ, et al. Improved osmotic tolerance and ethanol production of ethanologenic *Escherichia coli* by IrrE, a global regulator of radiation-resistance of *Deinococcus radiodurans*. Curr Microbiol, 2011, 62(2): 659–664.
- [22] Jiang M, Wan Q, Zhang CQ, et al. Strain capable of producing succinic acid, method for producing succinic acid and application thereof: China, CN102864113A. 2013-01-09 (in Chinese).
姜岷, 万青, 张常青, 等. 产丁二酸的菌株及其生产丁二酸的方法和应用: 中国, CN102864113A. 2013-01-09.
- [23] Meima R, Rothfuss HM, Gewin L, et al. Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. J Bacteriol, 2001, 183(10): 3169–3175.
- [24] Liu HJ, Zhang JA, Liu DH. Study on analysis and accumulation of intracellular glycerol and trehalose of *Candida krusei*. Mod Chem Ind, 2010, 30(S2): 110–113 (in Chinese).
刘宏娟, 张建安, 刘德华. 克鲁氏假丝酵母胞内甘油与海藻糖的分析及其积累研究. 现代化工, 2010, 30(S2): 110–113.
- [25] Brown AD. Microbial water stress. Bacteriol Rev, 1976, 40(4): 803–846.
- [26] Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch Microbiol, 1998, 170(5): 319–330.
- [27] Rengpipat S, Lowe SE, Zeikus JG. Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetoethylicus*. J Bacteriol, 1988, 170(7): 3065–3071.
- [28] Wood JM, Bremer E, Csonka LN, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. Comp Biochem Physiol Part A Mol Integrat Physiol, 2001, 130(3): 437–460.
- [29] Zhang Y, Liang M, Liu DH. The metabolism of trehalose and intracellular glycerol in *Candida krusei* responding to high osmosis. Chin J Biotech, 2001, 17(3): 332–335 (in Chinese).
张岩, 梁萌, 刘德华. 克鲁氏假丝酵母在高渗环境中海藻糖和胞内甘油积累的研究. 生物工程学报, 2001, 17(3): 332–335.

(本文责编 郝丽芳)