

大肠杆菌的耐酸机制及其改造研究进展

郝雪雁^{1,2}, 刘梦晓^{1,2}, 韩紫依^{1,2}, 房立霞^{*1,2}, 曹英秀^{*1,2}

1 天津大学化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

2 天津大学合成生物前沿研究院, 天津 300072

郝雪雁, 刘梦晓, 韩紫依, 房立霞, 曹英秀. 大肠杆菌的耐酸机制及其改造研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4667-4680.

HAO Xueyan, LIU Mengxiao, HAN Ziyi, FANG Lixia, CAO Yingxiu. Advances in acid-resistant mechanisms and modifications of *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4667-4680.

摘要: 微生物细胞在自然环境或工业应用中经常受到酸胁迫, 严重制约细胞生长性能和产物合成效率。为了在各种酸性环境中生存, 耐酸细菌发展出多种保护机制来维持细胞内 pH 稳态, 如氢离子消耗、细胞膜保护、代谢修饰等。因此, 深入研究耐酸机制、改进菌株耐酸能力对于利用微生物发酵合成高附加值产品具有重要意义。作为模式微生物, 大肠杆菌耐酸机制的研究较为透彻, 近年来其耐酸性改造也取得了重大进展。本文主要总结了大肠杆菌的氧化或葡萄糖抑制系统(acid resistance system 1, AR1)、谷氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 2, AR2)、精氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 3, AR3)、赖氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 4, AR4)和鸟氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 5, AR5)、细胞膜保护以及生物大分子修复等方面的耐酸机制, 并概述了利用传统代谢工程、全局转录工程和适应性实验室进化等方法构建大肠杆菌耐酸菌株的研究进展, 同时展望了大肠杆菌耐酸机制及其改造的后续研究方向。

关键词: 大肠杆菌; 耐酸系统; 细胞膜保护; 生物大分子修复; 菌株改造

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2104400); 国家自然科学基金(NSFC22078240)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2104400) and the National Natural Science Foundation of China (NSFC22078240).

*Corresponding authors. E-mail: FANG Lixia, lxfang@tju.edu.cn; CAO Yingxiu, caoyingxiu@tju.edu.cn

Received: 2023-02-21; Accepted: 2023-04-13; Published online: 2023-06-16

Advances in acid-resistant mechanisms and modifications of *Escherichia coli*

HAO Xueyan^{1,2}, LIU Mengxiao^{1,2}, HAN Ziyi^{1,2}, FANG Lixia^{*1,2}, CAO Yingxiu^{*1,2}

1 Frontier Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Frontiers Research Institute for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Microbial cells are often subjected to acid stress in natural environments or industrial applications, which severely restricts cell growth and product synthesis efficiency. In order to survive in acidic environments, acid-resistant bacteria have developed diverse protective mechanisms such as hydrogen ion consumption, membrane protection, and metabolic modification to maintain intracellular pH homeostasis. Therefore, in-depth research on acid-resistant mechanisms and improving acid resistance of strains are important for microbial biosynthesis of value-added products. As a model microorganism, *Escherichia coli* has been well studied regarding the acid-resistant mechanisms. In recent years, significant progress has been achieved in the research on the acid-resistant modification of *E. coli*. This paper reviews the acid-resistant mechanisms of *E. coli* in terms of oxidative or glucose-repressed system (acid resistance system 1, AR1), glutamate-dependent acid resistant system (acid resistance system 2, AR2), arginine-dependent acid resistant system (acid resistance system 3, AR3), lysine-dependent acid resistant system (acid resistance system 4, AR4), ornithine-dependent acid resistant system (acid resistance system 5, AR5), cell membrane protection, and biomolecular repair. Furthermore, we summarize the progress in constructing acid-resistant *E. coli* strains by metabolic engineering, global transcriptional engineering, and adaptive laboratory evolution. Finally, we discuss the subsequent research directions for further deciphering the acid-resistant mechanisms and improving acid resistance of *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*; acid-resistant system; membrane protection; biomolecular repair; strain modification

微生物在自然环境或工业应用中经常遇到多种压力,如热、酸、氧化和渗透应激等。由于大多数工业微生物发酵过程中会产生酸性物质,因此酸胁迫是最为常见的一种压力^[1]。目前工业微生物发酵过程常使用碱来调节发酵液的 pH,以缓解发酵液对细胞的酸胁迫,但这会产生大量废水并增加了下游过程成本。因此,工程改造增强菌株耐酸性,使用耐酸菌株进行发酵,将成为工业生产中更有效和更节约成本的解决方案。

大肠杆菌是一种常见的肠道细菌,完善的

耐酸机制使其能够在胃酸等极端酸性环境中存活和繁殖。大肠杆菌作为重要的模式微生物,其耐酸机制研究得较为透彻,主要包括利用耐酸系统消耗氢离子、细胞膜修饰防止氢离子进入、大分子修复系统抵御氢离子带来的损伤。利用传统代谢工程、全局转录工程和适应性进化等手段,显著增强大肠杆菌耐酸性,使其广泛应用于有机酸生产^[2]。本文围绕大肠杆菌耐酸机制和耐酸性改造策略展开综述和展望,以期对工业耐酸菌株构建提供启发。

1 大肠杆菌耐酸系统

目前, 大肠杆菌中已经鉴别出 5 种耐酸系统(图 1): 氧化或葡萄糖抑制系统(acid resistance system 1, AR1)、谷氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 2, AR2)、精氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 3, AR3)、赖氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 4, AR4)和鸟氨酸依赖型耐酸系统(acid resistance system 5, AR5)。其中, 除了 AR1, 其余 4 种耐酸系统都需要氨基酸作为底物, 通过氨基酸脱羧酶作用消耗氢离子^[3]。

1.1 氧化或葡萄糖抑制系统

AR1 在无葡萄糖的复杂介质或低葡萄糖浓度的极端酸性(pH<2.5)条件下被激活^[4]。AR1 系统的具体机制尚不完善, 目前已知该系统会受到调节因子 RpoS、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)和环磷酸腺苷受体(cAMP receptor protein, CRP)的调控^[5]。研究表明, RpoS 失活会导致 AR1 系统无法正常发挥耐酸作用, 而 RpoS 的表达受到多种因素的调控, 如 DsrA、RprA 和 ArcZ 等小 RNA (sRNA)^[6]以及 TorR/TorS 双组分系统^[7]可以激活 RpoS 表达。此外, cAMP 是响应环境刺激而产生的第二信使分子, 充当激活下游途径的信号分子; 当 cAMP 水平高时, 会与 CRP 蛋白结合并改变其构象, 激活 AR1 系统的表达^[8]。葡萄糖分解物会引起 cAMP 浓度的降低^[4], 这与葡萄糖存在时 AR1 系统无法正常发挥作用一致。另外, F₀F₁-ATP-合成酶属于 AR1 系统; 多亚基 F₀F₁-ATP-合成酶是位于质膜上的一种复杂复合体, 既可以利用 ATP 水解提供的能量将氢离子输送到胞外, 也可以从胞外转运氢离子进入细胞并合成 ATP; 通过解析 F₀F₁-ATP-合成酶结构发现, F₀ 蛋白主要参与氢离子的运输, 而 F₁ 蛋白则参与催化 ATP 的

水解或合成; 当胞内 pH 值降低时, F₀F₁-ATP-合成酶利用 ATP 将氢离子泵出细胞, 以确保胞内 pH 的动态平衡^[9]。

1.2 谷氨酸依赖型耐酸系统

AR2 也被称为 Gad 系统, 该系统主要通过消耗谷氨酸来缓解胞内酸胁迫, 从而使细菌能够在 pH 值低于 3.0 的酸性环境中存活; Gad 系统的核心成分为脱羧酶 GadA 和 GadB 以及反转运蛋白 GadC; 其中, GadA 和 GadB 依赖于辅因子磷酸吡哆醛(pyridoxal5-phosphatemonohydrate, PLP)催化谷氨酸生成 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和二氧化碳, 并消耗胞内的氢离子; 同时, GadC 负责将产生的 GABA 转运出细胞, 并且转运胞外的谷氨酸至胞内用于脱羧反应^[10]。此外, 研究表明 GadC 还可以转运谷氨酰胺进入胞内, 随后 GlsA 催化谷氨酰胺转化为谷氨酸和氨气并消耗氢离子, 而产生的谷氨酸作为 GadA 和 GadB 的底物进行脱酸^[11]。如此, AR2 系统有效减轻细胞质的酸化, 保护细菌免受酸性环境的损害。

Gad 系统的调控机制十分复杂, 目前已知超过 20 个调控元件参与该系统的表达调控, 其中 GadE、GadW 和 GadX 属于主要调控因子; LuxR 家族的 GadE 是 Gad 系统的中心激活因子, 其与位于 *gadA* 和 *gadBC* 转录起始位点的上游区域结合, 进而激活 *gadA* 和 *gadBC* 表达; GadW 和 GadX 都属于 AraC/XylS 家族, 可以直接激活 Gad 系统, 也可以通过激活 *gadE* 转录进而间接激活 Gad 系统; sRNA GadY 可以与 GadX 的 3'-非翻译区域结合, 促使 GadX 积累, 进而激活 Gad 系统基因的表达^[12]。此外, PhoP、YdeO、EvgA、TrmE、RpoS、RcsB、Crp、H-NS 和 TorR 等调节蛋白也可以通过响应不同环境信号调节 Gad 系统表达^[13]。

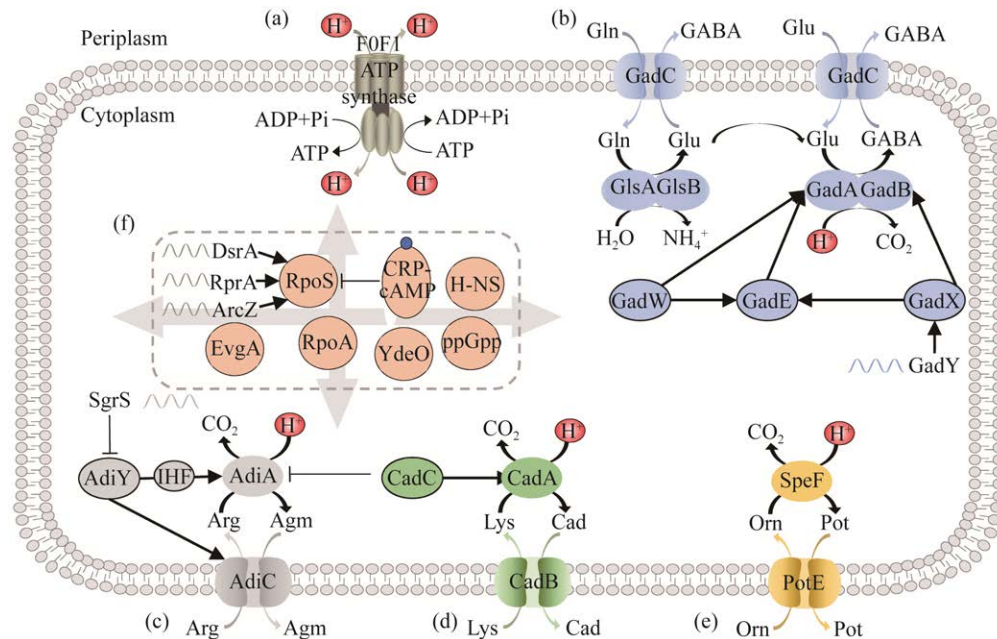


图 1 大肠杆菌耐酸系统及其调节网络示意图 a: 氧化或葡萄糖抑制系统; b: 谷氨酸依赖型耐酸系统; c: 精氨酸依赖型耐酸系统; d: 赖氨酸依赖型耐酸系统; e: 鸟氨酸依赖型耐酸系统; f: 全局调控。ATP: 腺嘌呤核苷三磷酸; ADP: 腺嘌呤核苷二磷酸; Pi: 无机磷酸盐; Gln: 谷氨酰胺; Glu: 谷氨酸; GABA: γ -氨基丁酸; GlsA: 谷氨酰胺酶 1; GlsB: 谷氨酰胺酶 2; GadA: 氨基丁酸谷氨酸脱羧酶 A; GadB: 谷氨酸脱羧酶 B; GadC: 谷氨酸: γ -氨基丁酸反转运蛋白; GadW、GadE、GadX 和 GadY: 谷氨酸依赖性耐酸系统调节因子; Arg: 精氨酸; Agm: 胍丁胺; AdiA: 精氨酸脱羧酶; AdiC: 精氨酸:胍丁胺反转运蛋白; AdiY: 精氨酸依赖性耐酸系统调节因子; IHF: 整合宿主因子; SgrS: 糖转运相关的 sRNA; Lys: 赖氨酸; Cad: 戊二胺; CadA: 赖氨酸脱羧酶 1; CadB: 赖氨酸:戊二胺反转运蛋白; CadC: 赖氨酸依赖性耐酸系统调节因子; Orn: 鸟氨酸; Pot: 腐胺; SpeF: 诱导型鸟氨酸脱羧酶; PotE: 腐胺转运体; DsrA、RprA 和 ArcZ: 小 RNA; RpoS: RNA 聚合酶 σ^s 亚基; cAMP: 环磷酸腺苷; CRP: 环磷酸腺苷受体; H-NS: 组蛋白样核结构蛋白; EvgA、YdeO: 结合 DNA 转录双调控因子; RpoA: RNA 聚合酶 α 亚基; ppGpp: 鸟苷四磷酸

Figure 1 Schematic diagram of acid resistance system and its regulatory network in *Escherichia coli*. a: Oxidation or glucose suppression system (AR1); b: Glutamate-dependent (Gad) system (AR2); c: Arginine-dependent (Adi) system (AR3); d: Lysine-dependent (Cad) system (AR4); e: Ornithine-dependent (Orn) system (AR5); f: Global regulation level. ATP: Adenosine triphosphate; ADP: Adenosine diphosphate; Pi: Inorganic phosphate; Gln: Glutamine; Glu: Glutamic acid; GABA: γ -aminobutyric acid; GlsA: Glutaminase 1; GlsB: Glutaminase 2; GadA: Glutamate decarboxylase A; GadB: Glutamate decarboxylase B; GadC: Glutamate:Gamma-aminobutyrate antiporter; GadW, GadE, GadX, and GadY: Glutamate-dependent acid resistance regulator; Arg: Arginine; Agm: Agmatine; AdiA: Arginine decarboxylase; AdiC: Arginine:Agmatine antiporter; AdiY: Arginine-dependent acid resistance regulator; IHF: Integration host factor; SgrS: Sugar transport-related sRNA; Lys: Lysine; Cad: Cadaverine; CadA: Lysine decarboxylase 1; CadB: Lysine:Cadaverine antiporter; CadC: Lysine-dependent acid resistance regulator; Orn: Ornithine; Pot: Putrescine; SpeF: Inducible ornithine decarboxylase; PotE: Putrescine transporter; DsrA, RprA, and ArcZ: Small regulatory RNA; RpoS: RNA polymerase sigma factor S; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; CRP: Cyclic adenosine monophosphate receptor protein; H-NS: Histone-like nucleoid structuring protein; EvgA and YdeO: DNA-binding transcriptional activator; RpoA: RNA polymerase subunit alpha; ppGpp: Guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate.

1.3 精氨酸依赖型耐酸系统

AR3 被称为 Adi 系统, 该系统在 pH 4.4 的丰富培养基中可以最大程度地被激活; Adi 系统主要由脱羧酶 AdiA 和精氨酸-胍丁胺反转运蛋白 AdiC 组成, 其中, 大肠杆菌利用脱羧酶 AdiA 使精氨酸脱羧形成胍丁胺, 并消耗胞内氢离子, 维持胞内 pH 稳定; 反转运蛋白 AdiC 将胍丁胺转运到胞外以获得新的精氨酸来参与脱羧反应^[14]。脱羧和转运的循环机制保护细胞免受氢离子积聚产生的危害。目前已知大肠杆菌具有 2 种精氨酸脱羧酶 SpEA 和 AdiA, 前者在 pH 8.4 时有最佳的催化作用, 而后者在 pH 5.2 时可以被诱导激活^[15], 因此, 只有 AdiA 可以在 Adi 系统中发挥作用。

Adi 系统受到多种环境因素和转录因子调节。AraC/XylS 家族的 AdiY 是 Adi 系统的主要调节元件, 可通过直接或间接与 IHF 结合作用于 *adiA* 启动子上游, 激活 *adiA* 的转录^[16]。此外, RpoA 可以与 CRP 结合作用于 *adiA* 启动子上游, 激活 *adiA* 的转录; 而 CadC 作为阻遏因子可以直接结合 *adiA* 启动子区域, 抑制 *adiA* 的表达^[17]。

1.4 赖氨酸依赖型耐酸系统

AR4 被称为 Cad 系统, 主要在温和的酸性环境中(pH 值约为 5.8)发挥作用; Cad 系统由赖氨酸脱羧酶 CadA 和反转运蛋白 CadB 组成; CadA 将赖氨酸转化为戊二胺和二氧化碳, 在这个过程中消耗氢离子, 以维持胞内正常环境; CadB 负责将赖氨酸转运到细胞内, 并将戊二胺泵出, 防止胞内过量的戊二胺抑制脱羧反应^[18]。

Cad 系统主要受到 ToxR 家族 CadC 的调控, CadC 与赖氨酸特异性渗透酶 LysP 结合作用于 *cadBA* 启动子区域, 激活 *cadBA* 的表达^[19-20]。此外, 重组组蛋白样核结构蛋白(histone-like

nucleoid structuring, H-NS)在非酸诱导条件下与 *cadBA* 启动子区域结合, 阻碍 RNA 聚合酶发挥作用, 抑制 *cadBA* 的表达; ppGpp 是微生物应对不同环境胁迫压力调控基因表达的信号分子, 当细胞进入稳定期或者面临饥饿时, 10 分子 ppGpp 可以与 CadA 十聚体结合, 以抑制其活性^[21]。

1.5 鸟氨酸依赖型耐酸系统

AR5 被称为 Orn 系统, 该系统可在低 pH (pH 值约为 5.0)和高鸟氨酸水平的厌氧发酵中被激活; Orn 系统由鸟氨酸脱羧酶 SpeF 和反转运蛋白 PotE 组成, 在弱酸条件下, SpeF 通过消耗细胞内的氢离子将鸟氨酸转化为腐胺和二氧化碳, PotE 则负责将胞内腐胺与胞外鸟氨酸交换, 以促进鸟氨酸脱羧反应的进行; Orn 系统是禽致病性大肠杆菌中的主要耐酸系统, 而在大肠杆菌 MG1655 中起次要作用^[22]。

耐酸系统是细菌在酸胁迫条件下的重要保护机制, 上述 5 种耐酸系统研究得较为清晰, 这些系统受到多种环境信号和转录调节因子的调控(表 1)。不同耐酸系统之间存在协同作用, 但协同效应的研究还比较有限。因此, 后续可以关注不同耐酸系统之间的作用方式, 以及在工程改造中合理分配不同系统发挥作用的比列, 从而有效地应对极端环境带来的挑战。此外, 研究表明耐酸系统的激活显著改变了大肠杆菌的基础代谢、代谢物转运和脂质合成^[23], 后续可以结合代谢物变化深入挖掘耐酸系统网络, 为开发菌株耐酸提供更多有效策略。

2 酸压力下的细胞保护与修复

大肠杆菌具有较为完善的耐酸机制, 除了 5 种耐酸系统, 大肠杆菌还具备防御与修复系统来应对酸胁迫, 包括细胞膜调控来阻挡氢离子入侵以及大分子修复来应对氢离子的破坏^[24] (图 2)。

表 1 大肠杆菌耐酸系统特性的研究进展

Table 1 Research progress on characterization of *Escherichia coli* acid resistance system

Acid resistance system	pKa of reactant and product	Response value of pH	Key elements	Regulatory element	References
Oxidation or glucose suppression system (AR1)		pH<2.5	FoF1-ATP-synthetase	RpoS, CRP, etc.	[4-9]
Glutamate-dependent (Gad) system (AR2)	Glutamic acid (2.2, 4.3 and 9.7), γ -aminobutyric acid (4.3 and 10.4), glutamine (2.2 and 9.1)	pH<3.0	GadA, GadB and GadC	GadE, GadX, etc.	[10-13]
Arginine-dependent (Adi) system (AR3)	Arginine (2.0, 9.0 and 12.5), agmatine (9.0 and 12.5)	pH \approx 4.4	AdiA, AdiC	AdiY, CysB, etc.	[14-17]
Lysine-dependent (Cad) system (AR4)	Lysine (2.2, 8.9 and 10.3), Pentanediamine (9.1 and 10.3)	pH \approx 5.8	CadA, CadB	CadC, etc.	[18-21]
Ornithine-dependent (Orn) system (AR5)	Ornithine (1.7, 8.7 and 10.3), Putrescine (8.7 and 10.3)	pH \approx 5.0	SpeF, PotE		[22]

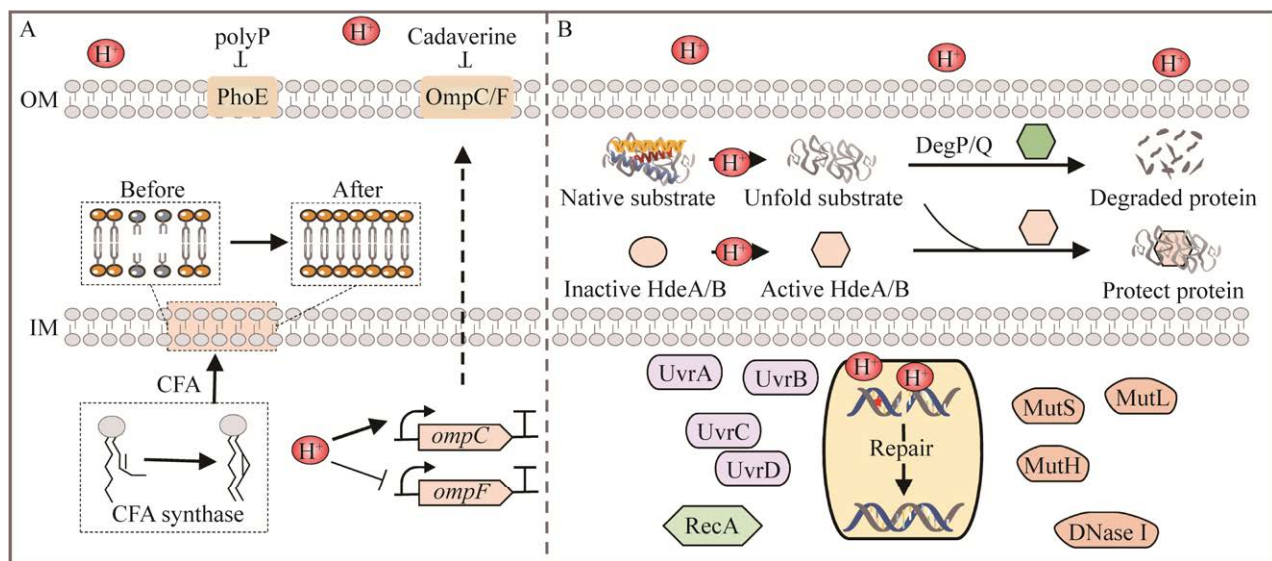


图 2 大肠杆菌耐酸细胞保护与修复机制 A: 细胞膜保护. B: 大分子修复

Figure 2 Protection and repair mechanism of acid-resistant cells in *Escherichia coli*. A: Protection of cell membrane. B: Repair of macromolecule.

2.1 酸压力下的细胞膜保护

除了已知的 5 种胞内耐酸系统, 细胞膜对氢离子的屏障作用也是维持胞内 pH 稳态的重要方式。研究发现, 在培养基酸化时, 周质中的 pH 值会迅速地下降至与胞外大致相同的水平, 这说明外膜不是阻碍氢离子进入细胞的主要屏

障, 虽然内膜可以隔绝强酸高度解离出的氢离子, 但又可以允许一些非电离的分子穿过, 这些非电离分子又可以在周质中进一步解离; 另外, 酸性分子也能以电离形式通过蛋白质通道、瞬时水链或受损的膜进入细胞质^[25]。

为了保护细胞膜免受酸的破坏, 细菌会进

行 2 种修饰: 膜脂成分改变和孔道蛋白修饰。在胁迫条件下, 膜脂成分发生巨大变化, 主要体现在饱和/不饱和脂肪酸比例和平均脂链长度等^[26]。膜脂成分的变化依赖于酶的修饰, 环丙烷脂肪酸合成酶(cyclopropane fatty acid synthase, CFAS)催化亚甲基从 S-腺苷蛋氨酸转移到不饱和脂肪酸, 生成环丙烷脂肪酸(cyclopropane fatty acid, CFA)^[27], 从而降低不饱和脂肪酸含量和细胞膜流动性, 维持胞内稳态。另外, 双组分系统 CpxRA 可以感知外界环境酸化, 并上调脂肪酸合成基因 *fabA* 和 *fabB* 的表达, 改变膜脂成分, 使细胞膜流动性降低, 从而增强抵御酸胁迫的能力^[28]。孔道蛋白的改变也是一种重要的耐酸机制, 这主要通过孔道缩小和孔道蛋白修饰的方式实现。例如, 在酸胁迫时, 大孔道蛋白 OmpF 的表达下调, 而小孔道蛋白 OmpC 的表达上调, 从而提升菌株耐酸能力^[29]。孔道蛋白修饰可以使菌株适应酸胁迫条件, 如孔道蛋白可以和戊二胺阳离子(cadaverine)或者多磷酸(polyphosphates, polyP)结合, 阻止氢离子的内流, 维持胞内 pH 稳定^[30]。因此可以认为细菌膜已经进化出一系列保护机制, 减少氢离子内流, 以稳定细胞内部环境。

细胞膜是细胞内外环境交互作用的关键部位, 对于维持胞内 pH 稳定至关重要。改变细胞膜组分可以有效缓解细胞质的酸化, 但细胞膜组成改变可能会对细胞生长和代谢产生负面影响。因此, 在探究细胞膜改造新靶点时应协同调控菌株生长和代谢特性, 助力鲁棒性耐酸菌株的工业应用。

2.2 酸压力下的大分子修复

酸胁迫可以影响生物大分子(如核酸、蛋白质等)的结构和活性, 而稳定的结构和适当的生物活性是维持细胞正常代谢所必需的。当细胞质酸化时会导致 DNA 的去嘌呤化和去嘧啶化,

还会导致蛋白质的解折叠、聚集甚至变性^[31]。大肠杆菌具有一套较为成熟的 DNA 修复机制和蛋白质修复的分子伴侣机制, 使其在酸胁迫下仍然具有较强的生存能力。

DNA 的修复机制包括核苷酸切除修复、错配修复和 RecA 蛋白修复等。(1) 核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)是重要的修复方式之一, 主要包括全基因组的核苷酸切除修复和转录偶联的核苷酸切除修复。在细菌中, NER 由 UvrA 和 UvrB 蛋白识别损伤位点, 并引导 UvrC 和 UvrD 切除病变区域, 最后由 UvrD 清除受损的 DNA 链^[32]。(2) 错配修复(mismatch repair, MMR)也是一种常见的 DNA 修复机制, 通过修正 DNA 双螺旋上碱基对的错配来维持遗传物质的稳定性^[33]。MMR 过程中, MutS 和 MutL 先识别错误 DNA 序列, 然后 MutH 蛋白结合在 MutSL 复合体上发挥内切酶作用, 切除错误 DNA 序列, 最后 DNase I 发挥外切酶活性将 MutSL 复合体全部切除, DNA 聚合酶和 DNA 连接酶最终将 DNA 形成正确的双链结构^[34]。(3) RecA 蛋白在 DNA 修复中也发挥着重要作用, 具有激活蛋白酶和改变单链 DNA 分子的双重功能^[35]。(4) 本课题组筛选脂肪酸高产菌株发现的新靶点 *aidB* 基因可以编码的 DNA 修复蛋白, 它是参与细胞适应性反应的重要组成部分, 其过表达能够保护细胞免受酸化细胞质或烷化剂的细胞毒性作用^[36]。

大肠杆菌具有高效的伴侣机制来保护蛋白质免受酸胁迫的损伤, 主要包括 HdeA/HdeB、DegP/DegQ 等。其中, HdeA 和 HdeB 是 2 种结构相关的周质伴侣, 它们以不依赖 ATP 的方式发挥作用, 并在酸性胁迫期间最大限度地减少周质中高浓度氢离子和氯离子引起的蛋白质聚集; 在体外中性 pH 条件下, 这两种伴侣会形成无活性的二聚体; 在酸胁迫时, HdeA/HdeB

二聚体迅速转化为部分无序但具有伴侣功能的单体, HdeA/HdeB 单体与底物蛋白结合, 阻止了周质蛋白的变性和聚集^[37]。值得注意的是, HdeA 和 HdeB 的耐酸性能存在差异: 在 pH 2.0–3.0 的细胞中, HdeA 功能最强, 而在 pH 4.0 时 HdeB 则表现出最强的伴侣作用^[38]。周质中并非所有变性蛋白都可以依靠 HdeA/HdeB 重新正确折叠, 错误折叠的蛋白需要通过周质中的蛋白酶 DegP/DegQ 进行降解, 以保证正常的蛋白功能, 维持胞内 pH 稳定^[39]。此外, 还有一些分子伴侣参与蛋白质的保护和修复, 如热休克蛋白 DnaK 有助于纠正蛋白质的折叠和构象, 以调节蛋白质的活性, 从而使细菌适应不同的环境^[40]。

DNA 修复机制和分子伴侣机制对于细菌在胁迫条件下的生存和适应至关重要。虽然已经发现多种修复蛋白, 如 RecA、HdeA/HdeB 和 DegP/DegQ 等, 但对于修复蛋白的结构和活性位点研究得不够透彻, 使其应用受阻。利用

核磁共振等技术从分子水平探究修复蛋白功能, 可为菌株耐酸性改造提供更多理论基础。

3 耐酸菌株改造

耐酸菌株的改造方式随着科技水平的进步不断改善。在过去的几十年中, 传统代谢工程可以实现已知靶点的准确调控, 近年来系统生物学技术快速发展, 如全基因组测序、组学分析等, 促进了细胞网络中基因的功能研究^[41]。目前, 大肠杆菌耐酸菌株改造方法主要包括传统代谢工程、全局转录工程、适应性实验室进化等(图 3)^[42-43]。

3.1 传统代谢工程

传统代谢工程是通过多基因重组技术有目的地对细胞代谢过程进行修饰和改造, 实现代谢途径、细胞特性的改变。现有耐酸机制是指导耐酸菌株改造的重要基础, 耐酸菌株代谢工程改造模块主要包括耐酸关键基因、调控因子、细胞膜组成和分子伴侣等。

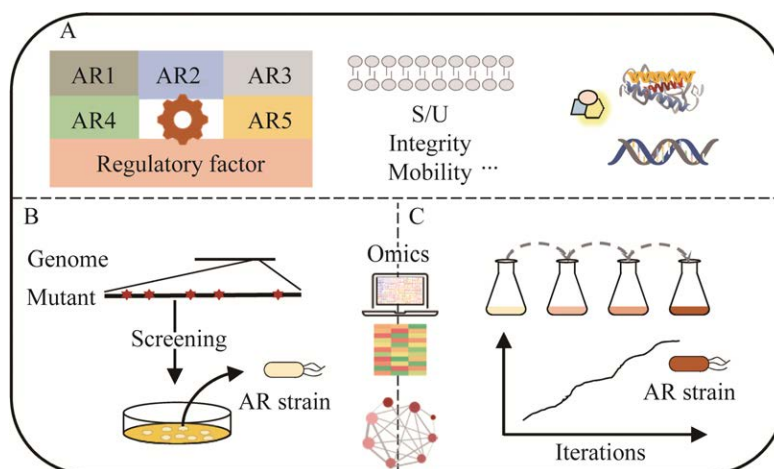


图 3 大肠杆菌耐酸菌株改造方法示意图 A: 大肠杆菌耐酸系统的传统代谢系统调控. B: 全局转录工程筛选大肠杆菌耐酸靶点. C: 适应性进化筛选大肠杆菌耐酸靶点

Figure 3 Modification of acid resistant strain of *Escherichia coli*. A: Regulation of traditional metabolic system in acid resistant system of *Escherichia coli*. B: Global transcription engineering screening of acid tolerance targets in *Escherichia coli*. C: Adaptive evolutionary screening of acid tolerance targets in *Escherichia coli*.

Negrete 等^[44]过表达谷氨酸依赖型耐酸系统调节因子 *gadY*, 使 pH 6.0 条件下工程菌株细胞密度为对照菌株的 1.55 倍。Aiso 等^[45]过表达反义 RNA *ArrS* 进一步激活 *gadE* 的表达, 使大肠杆菌 JM109 在 pH 2.5 条件下细胞存活率显著提升。Gao 等^[46]通过过表达全局转录因子 H-NS, 使大肠杆菌在中等酸胁迫(pH 4.5)条件下细胞密度提高 24%。Tan 等^[47]通过删除细胞膜孔道蛋白 *ompF* 使菌株的耐受性提升, 同时脂肪酸的生产和细胞膜完整性均增加。本课题组^[48]在工程大肠杆菌合成脂肪酸的研究中, 利用 CRISPR 干扰(clustered regularly interspaced short palindromic repeat interference, CRISPRi)技术和组学技术联合挖掘高产脂肪酸靶点, 通过对整合宿主因子(integration host factor, IHF)的 α 亚基 *IhfA*、谷氨酸依赖型耐酸系统核心成分 *GadA*、DNA 修复蛋白 *AidB* 以及膜损伤蛋白 *RyfA* 的组合调控, 使菌株压力耐受性增强, 脂肪酸产量提高了 360%。为了实现基因组合效果最优, Yao 等^[49]利用定向进化构建一个不同强度的酸响应启动子库, 在 pH 5.0 条件下确定 AR 系统的转录因子 *gadE*、周质蛋白伴侣 *hdeB*、ROS 清除酶 *sodB* 和 *katE* 的最佳表达强度, 并将这 4 种基因进行了组合, 最佳组合菌株在 pH 6.0 条件下, 赖氨酸滴度、产量和终 OD_{600} 均有显著提高。

传统代谢工程改造可以基于已有生物学信息理性地调控代谢途径和细胞特性, 实现菌株耐酸能力的提高。但是在对多个耐酸相关代谢路径进行协同调控时, 需要大量的组合试错过程才能获得预期耐受效果, 从而增加了研究时间和成本。后续可以结合人工智能和机器学习等技术, 指导更为精准和高效的代谢工程改造。

3.2 全局转录工程

大肠杆菌具有金字塔形层级调控网络, 通

过优化代谢分布使细胞能够响应自然环境变化(如 pH、温度、营养和渗透压)。转录因子调控可以协助细胞应对环境胁迫^[50], 但传统转录因子调控对于提升细胞生存和生产能力的空间有限。全局转录工程(global transcription machinery engineering, gTEM)通过改造全局转录因子, 直接或间接扰动全局转录调控网络, 这是一种从基因和细胞水平筛选满足条件微生物的高效方法^[51-52]。

cAMP 受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP)是大肠杆菌的 7 个全局调节因子之一, 调节基因组上大约 490 个基因的表达; 通过 CRP 的全局转录工程, 可以构建出适应多种胁迫环境(如低 pH、渗透压和氧化应激等)的耐受菌株^[53]。Basak 等^[54]通过易错 PCR (error-prone polymerase chain reaction)设计了 CRP 基因突变文库, 筛选得到的最佳突变体 AcM1 在 pH 4.24 条件下的生长速率几乎是对照组的 2 倍(0.113 h^{-1} 和 0.062 h^{-1})。Chong 等^[55]利用 CRP 突变体文库获得在浓度为 15 g/L 的乙酸盐中生长速率为 0.083 h^{-1} (对照为 0.016 h^{-1})的突变菌株 A2。此外, Basak 等^[56]利用 CRP 突变体文库筛选获得的突变菌株 OM3 在 12 mmol/L 过氧化氢中生长速率为 0.6 h^{-1} , 而对照菌株生长完全受到抑制。

σ 因子 RpoD 可以招募 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)核心酶形成全酶以启动转录, 调控指数生长阶段的大多数基因, 并且在许多胁迫条件下可以部分取代 σ 因子 RpoS 作用^[57]。Gao 等^[58]利用随机插入-缺失链交换诱变(random insertional-deletional strand exchange mutagenesis, RAISE)方法设计了 RpoD 全局调节因子突变体, 通过外部酸胁迫筛选获得最佳突变体, 该菌株在 pH 3.17 环境下的生长速率达到了 0.22 h^{-1} , 而对照菌株仅为 0.15 h^{-1} ; 转录组分析表明, 突变体与耐酸相关的基因 *gadX*、

gadW 等显著上调。另外, Alper 等^[57]对大肠杆菌 DH5 α 的 RpoD 进行三轮突变, 最佳突变菌株在 70 g/L 乙醇中能维持正常生长, 而对照菌株无法生长; 分析结果显示, 最佳 RpoD 突变菌株中与细胞应激反应相关的基因, 如 *groEL* 和 *htpG* 等被显著上调。

H-NS 是一种 15.5 kDa 的蛋白质, 它能够影响大肠杆菌中 5% 基因的表达, 包括耐酸性相关的基因^[57]。Gao 等^[46]采用易错 PCR 方法构建 H-NS 文库, 并在 pH 4.5 的条件下孵育 24 h, 以筛选出耐酸菌株; 与对照菌株相比获得了具有显著生长优势的 5 个突变体, 这 5 种 H-NS 突变体的 OD_{600} 提高 26%–53%, 在 pH 2.5 条件下, 它们的存活率提高了 10–100 倍。在乙酸和琥珀酸酸化的培养基中, H-NS 突变体的生长也得到了改善。

全局转录工程是一种有助于深入了解基因表达调控机制和复杂生物过程的方法。通过对 CRP、RpoD 和 H-NS 等全局转录因子的工程改造, 成功提高菌株的耐酸性和产品生产能力。对获得的有效突变体进行结构和活性分析, 解析代谢网络调控规律, 可以进一步补充和完善耐酸机制。

3.3 适应性实验室进化

适应性实验室进化 (adaptive laboratory evolution, ALE) 是研究微生物暴露于胁迫环境后适应性反应的重要试验方法。ALE 基于自然选择来富集具有适应性增加的突变体, 与其他方法相比, 这无须先了解实现这种变化所需的遗传性状改变。根据不同的目的, ALE 可以分为生长速率优化、菌株耐受性优化和目标产品产量/滴度提高等不同类型^[59]。

在生长速率优化方面, Du 等^[60]在 pH 5.5 的最小葡萄糖培养基中对大肠杆菌 MG1655 传代 800 次, 进化得到的 6 个独立突变体比起始

菌株的生长速率高 18.0%, 基因组和转录组分析发现: 其中 5 个突变体中出现了 *rpoC* 突变, 虽然不同突变体减轻酸胁迫具有不同策略, 但主要与氨基酸代谢和能量产生和转化有关。Seong 等^[61]在含有 5 g/L 乙酸盐的 M9 培养基中进行 9 轮进化, 获得的最佳突变体在 10–250 mmol/L 乙酸的 M9 培养基中正常生长, 而对照菌株不生长; 转录组学分析发现编码 FOF1-ATP-合成酶的 *atpABCDEFGH* 基因表达显著提升。

在提高耐受性方面, Hughes 等^[62]将大肠杆菌 W3110 在 pH 5.3、6.3、7.0 和 7.8 中进行适应性进化, 在 pH 5.3 传代 2 000 次获得最优耐酸菌株, 其耐酸适应度较对照菌株提高 20%。Harden 等^[63]为了进一步获得大肠杆菌耐酸菌株, 在 pH 4.6 的 LBK (Luria-Bertani with KCl) 培养基条件下进行适应性进化, 获得 8 株耐酸突变菌株, 其中最优突变菌株在 pH 4.6 时终 OD_{600} 提升约 2 倍。此外, Dragosits 等^[64]在 pH 5.5 的条件下适应性进化传代 500 次, 获得突变菌株 P500 的终 OD_{600} 提高约 25%。同时, 适应性进化的正丁醇适应菌株 B500 和渗透适应菌株 O500 在耐酸性方面也具有优异表现。

在提高产品产量/滴度方面, Yang 等^[65]通过适应性进化, 筛选 6 种有机酸(乙酸、D-乳酸、乙醇酸、衣康酸、L-乳酸和琥珀酸)条件下大肠杆菌中的进化菌株, 在进化过程中, D-乳酸和衣康酸条件下的菌株耐受性显著提高; 其中, 在 D-乳酸耐酸适应性进化菌株中, 转录组分析将氢化酶辅助蛋白 HypB 和 HypC 鉴定为耐酸因子; 在 D-乳酸致死条件下, 加强 HypB 和 HypC 的表达可使细胞存活率提高 336.3 倍。此外, 加强 HypB 和 HypC 的表达使 D-乳酸滴度较对照菌株增加了 113.6%^[66]。

适应性实验室进化技术具有高度的可定制性和灵活性, 可以针对特定的目的获得优势突变

体, 无须了解菌株遗传性状, 是一种有前途的进化方法。不过, 相较于其他方法, ALE 技术需要经过多次传代才能达到预期结果, 这增加了时间和资源成本。后续可以结合多种突变形式, 如基因编辑和化学诱变等加速菌株进化的进程。

4 结语与展望

工业化发酵经常面临酸性压力, 制约破坏细胞活力, 从而制约产物合成。因此, 耐酸机制解析和耐酸性改造尤为重要。大肠杆菌可以通过多种途径感知并响应环境中的酸胁迫, 如消耗胞内质子、细胞膜保护和生物大分子修复等机制, 利用这些机制指导工程改造可增强耐酸菌株生长和生产能力。然而, 由于微生物代谢网络的复杂性和互作性, 基于既定的关联基因和调控机制并不能使菌株耐酸能力得到充分开发, 全局转录工程和适应性实验室进化技术的应用一定程度上开拓了菌株耐酸新靶点的挖掘。近年来, CRISPR 技术快速发展, CRISPR 文库可以提供丰富的基因型多样性, 并助力耐受性菌株的快速获得, 为大肠杆菌耐酸机制和耐酸工程菌株改造提供新靶点和新思路。

为了进一步探究耐酸机制并强化菌株耐酸性, 未来可以从以下几个方面进行研究: (1) 深入研究不同类型有机酸和无机酸对细胞的影响, 细化大肠杆菌耐酸机制类型。不同类型酸对细胞影响差异大, 单独和综合分析多类型酸可强化对于耐酸机制的解析。(2) 开发实时监测细胞变化的新方法, 准确分析细胞耐酸响应状态。利用 pH 敏感性元件、氧化环境感应元件等工具组建细胞实时监测系统, 从多时空层面探索细胞耐酸响应机制。(3) 探究酸胁迫条件与其他胁迫条件的交互作用。在实际工业生产中, 可能同时存在多种胁迫条件, 如渗透压力、温度压力等。因此, 研究酸胁迫与其他胁迫条件

的交互作用, 可以深入了解大肠杆菌的细胞适应机制, 进而指导工程策略来增强微生物的工业生存与生产能力。

REFERENCES

- [1] LIN ZL, ZHANG Y, WANG JQ. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 986-991.
- [2] XU JN, GUO L, ZHAO N, MENG XM, ZHANG J, WANG TR, WEI XY, FAN MT. Response mechanisms to acid stress of acid-resistant bacteria and biotechnological applications in the food industry[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(2): 258-274.
- [3] 韩吉娜, 罗欣, 朱立贤, 张一敏, 董鹏程. 大肠埃希氏菌的诱导耐酸响应及其交叉保护作用机制研究进展[J/OL]. *食品科学*, (20220715) [2023-06-05]. <https://gfffgc1d129f57bb244a4hfxbwppkfn0on6n9wfgfy.eds.tju.edu.cn/kcms/detail/11.2206.TS.20220715.0954.004.html>. HAN JN, LUO X, ZHU LX, ZHANG YM, DONG PC. Research Progress on the Mechanisms of *Escherichia coli* to Acid Tolerance Response and Cross-protection[J]. *Food Science*, (20220715) [2023-06-05]. <https://gfffgc1d129f57bb244a4hfxbwppkfn0on6n9wfgfy.eds.tju.edu.cn/kcms/detail/11.2206.TS.20220715.0954.004.html> (in Chinese).
- [4] CASTANIE-CORNET MP, PENFOUND TA, SMITH D, ELLIOTT JF, FOSTER JW. Control of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(11): 3525-3535.
- [5] FOSTER JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(11): 898-907.
- [6] BAK G, HAN K, KIM D, LEE Y. Roles of rpoS-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2014, 3(1): 15-28.
- [7] LI GT, MORIGEN, YAO Y. TorR/TorS Two-Component system resists extreme acid environment by regulating the key response factor RpoS in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 2022, 821: 146295.
- [8] UPPAL S, MAURYA SR, HIRE RS, JAWALI N. Cyclic AMP receptor protein regulates cspE, an early cold-inducible gene, in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(22): 6142-6151.
- [9] RICHARD H, FOSTER JW. *Escherichia coli*

- glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(18): 6032-6041.
- [10] de BIASE D, PENNACCHIETTI E. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the gadBC operon[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(4): 770-786.
- [11] LU PL, MA D, CHEN YL, GUO YY, CHEN GQ, DENG HT, SHI YG. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia[J]. *Cell Research*, 2013, 23(5): 635-644.
- [12] OPDYKE JA, KANG JG, STORZ G. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(20): 6698-6705.
- [13] SCHWARZ J, SCHUMACHER K, BRAMEYER S, JUNG K. Bacterial battle against acidity[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(6): fuac037.
- [14] KANJEE U, HOURY WA. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 65-81.
- [15] CHARLIER D, GLANSDORFF N. Biosynthesis of arginine and polyamines[J]. *EcoSal Plus*, 2004, 1(1): DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.10.
- [16] FANG YL, KOLMAKOVA-PARTENSKY L, MILLER C. A bacterial arginine-arginine exchange transporter involved in extreme acid resistance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(1): 176-182.
- [17] CASALINO M, PROSSEDA G, BARBAGALLO M, IACOBINO A, CECCARINI P, CARMELA LAPELLA M, NICOLETTI M, COLONNA B. Interference of the CadC regulator in the arginine-dependent acid resistance system of *Shigella* and enteroinvasive *E. coli*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(5): 289-295.
- [18] MOREAU PL. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(6): 2249-2261.
- [19] HANEBURGER I, FRITZ G, JURKSCHAT N, TETSCH L, EICHINGER A, SKERRA A, GERLAND U, JUNG K. Deactivation of the *E. coli* pH stress sensor CadC by cadaverine[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 424(1/2): 15-27.
- [20] LINDNER E, WHITE SH. Topology, dimerization, and stability of the single-span membrane protein CadC[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(16): 2942-2957.
- [21] KANJEE U, GUTSCHE I, ALEXOPOULOS E, ZHAO BY, EL BAKKOURI M, THIBAUT G, LIU KY, RAMACHANDRAN S, SNIDER J, PAI EF, HOURY WA. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(5): 931-944.
- [22] KASHIWAGI K, SUZUKI T, SUZUKI F, FURUCHI T, KOBAYASHI H, IGARASHI K. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(31): 20922-20927.
- [23] GOLD A, CHEN L, ZHU JJ. More than meets the eye: untargeted metabolomics and lipidomics reveal complex pathways spurred by activation of acid resistance mechanisms in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2022, 21(12): 2958-2968.
- [24] GAO XP, XU K, AHMAD N, QIN L, LI C. Recent advances in engineering of microbial cell factories for intelligent pH regulation and tolerance[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(9): 2100151.
- [25] WILKS JC, SŁONCZEWSKI JL. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(15): 5601-5607.
- [26] ZHANG JL, BAI QY, PENG YZ, FAN J, JIN CC, CAO YX, YUAN YJ. High production of triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* through manipulation of lipid components[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-13.
- [27] XU W, MUKHERJEE S, NING Y, HSU FF, ZHANG K. Cyclopropane fatty acid synthesis affects cell shape and acid resistance in *Leishmania mexicana*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2018, 48(3/4): 245-256.
- [28] XU Y, ZHAO Z, TONG WH, DING YM, LIU B, SHI YX, WANG JC, SUN SM, LIU M, WANG YH, QI QS, XIAN M, ZHAO G. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1496.
- [29] BEKHIT A, FUKAMACHI T, SAITO H, KOBAYASHI H. The role of OmpC and OmpF in acidic resistance in *Escherichia coli*[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 34(3): 330-334.
- [30] PEREZ-RATHKE A, FAHIE MA, CHISHOLM C,

- LIANG J, CHEN M. Mechanism of OmpG pH-dependent gating from loop ensemble and single channel studies[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(3): 1105-1115.
- [31] van de GUCHTE M, SERROR P, CHERVAUX C, SMOKVINA T, EHRLICH SD, MAGUIN E. Stress responses in lactic acid bacteria[M]//*Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002: 187-216.
- [32] STRACY M, JACIUK M, UPHOFF S, KAPANIDIS AN, NOWOTNY M, SHERRATT DJ, ZAWADZKI P. Single-molecule imaging of UvrA and UvrB recruitment to DNA lesions in living *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12568.
- [33] FENG X, HE CY, JIAO LX, LIANG XH, ZHAO RX, GUO YC. Analysis of differential expression proteins reveals the key pathway in response to heat stress in *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T[J]. *Food Microbiology*, 2019, 80: 77-84.
- [34] RADICELLA JP, CLARK EA, FOX MS. Some mismatch repair activities in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(24): 9674-9678.
- [35] GHODKE H, PAUDEL BP, LEWIS JS, JERGIC S, GOPAL K, ROMERO ZJ, WOOD EA, WOODGATE R, COX MM, van OIJEN AM. Spatial and temporal organization of RecA in the *Escherichia coli* DNA-damage response[J]. *eLife*, 2019, 8: 42761.
- [36] RIPPA V, DUILIO A, Di PASQUALE P, AMORESANO A, LANDINI P, VOLKERT MR. Preferential DNA damage prevention by the *E. coli* AidB gene: a new mechanism for the protection of specific genes[J]. *DNA Repair*, 2011, 10(9): 934-941.
- [37] 朱浩, 刘楠. 分子伴侣蛋白介导的革兰阴性菌耐酸机制研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(2): 164-170.
- ZHU H, LIU N. Advances in research progress on acid tolerance mechanism of Gram-negative bacteria mediated by molecular chaperone protein[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2021, 52(2): 164-170 (in Chinese).
- [38] SALMON L, STULL F, SAYLE S, CATO C, AKGÜL Ş, FOIT L, AHLSTROM LS, EISENMESSER EZ, AL-HASHIMI HM, BARDWELL JCA, HOROWITZ S. The mechanism of HdeA unfolding and chaperone activation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(1): 33-40.
- [39] FU XM, WANG Y, SHAO HQ, MA J, SONG XW, ZHANG M, CHANG ZY. DegP functions as a critical protease for bacterial acid resistance[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(18): 3525-3538.
- [40] CALLONI G, CHEN TT, SCHERMANN SM, CHANG HC, GENEVAUX P, AGOSTINI F, TARTAGLIA GG, HAYER-HARTL M, HARTL FU. DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network[J]. *Cell Reports*, 2012, 1(3): 251-264.
- [41] LI MX, ZHANG JL, BAI QY, FANG LX, SONG H, CAO YX. Non-homologous end joining-mediated insertional mutagenesis reveals a novel target for enhancing fatty alcohols production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 898884.
- [42] CAI G, LIN ZQ, SHI SB. Development and expansion of the CRISPR/Cas9 toolboxes for powerful genome engineering in yeast[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 159: 110056.
- [43] 李书廷, 洪坤强, 汪保卫, 陈聪, 陈涛, 王智文. 大肠杆菌乙酸耐受性菌株的构建及其耐受机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4250-4259.
- LI ST, HONG KQ, WANG BW, CHEN C, CHEN T, WANG ZW. Advances in construction of acetic acid tolerance *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4250-4259 (in Chinese).
- [44] NEGRETE A, SHILOACH J. Constitutive expression of the sRNA GadY decreases acetate production and improves *E. coli* growth[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 148.
- [45] AISO T, KAMIYA S, YONEZAWA H, GAMOU S. Overexpression of an antisense RNA, ArrS, increases the acid resistance of *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 2014, 160(5): 954-961.
- [46] GAO XX, YANG XF, LI JH, ZHANG Y, CHEN P, LIN ZL. Engineered global regulator H-NS improves the acid tolerance of *E. coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 1-13.
- [47] TAN ZG, BLACK W, YOON JM, SHANKS JV, JARBOE LR. Improving *Escherichia coli* membrane integrity and fatty acid production by expression tuning of FadL and OmpF[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 1-15.
- [48] FANG LX, FAN J, LUO SL, CHEN YR, WANG CY, CAO YX, SONG H. Genome-scale target identification in *Escherichia coli* for high-titer production of free fatty acids[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4976.
- [49] YAO XR, LIU P, CHEN B, WANG XY, TAO F, LIN ZL, YANG XF. Synthetic acid stress-tolerance modules improve growth robustness and lysine productivity of industrial *Escherichia coli* in fermentation at low pH[J].

- Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 1-14.
- [50] WANG L, WANG X, HE ZQ, ZHOU SJ, XU L, TAN XY, XU T, LI BZ, YUAN YJ. Engineering prokaryotic regulator IrrE to enhance stress tolerance in budding yeast[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-18.
- [51] TYO KE, ALPER HS, STEPHANOPOULOS GN. Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(3): 132-137.
- [52] LUO JM, ZHU WC, CAO ST, LU ZY, ZHANG MH, SONG B, SHEN YB, WANG M. Improving biotransformation efficiency of *Arthrobacter simplex* by enhancement of cell stress tolerance and enzyme activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(2): 704-716.
- [53] GENG HF, JIANG RR. cAMP receptor protein (CRP)-mediated resistance/tolerance in bacteria: mechanism and utilization in biotechnology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(11): 4533-4543.
- [54] 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: 68-75.
- [55] CHONG HQ, YEOW J, WANG I, SONG H, JIANG RR. Improving acetate tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77422.
- [56] BASAK S, JIANG RR. Enhancing *E. coli* tolerance towards oxidative stress via engineering its global regulator cAMP receptor protein (CRP)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51179.
- [57] ALPER H, STEPHANOPOULOS G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype[J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(3): 258-267.
- [58] GAO X, JIANG L, ZHU LY, XU Q, XU X, HUANG H. 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.
- [59] SANDBERG TE, SALAZAR MJ, WENG LL, PALSSON BO, FEIST AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 1-16.
- [60] DU B, OLSON CA, SASTRY AV, FANG X, PHANEUF PV, CHEN K, WU MY, SZUBIN R, XU SB, GAO Y, HEFNER Y, FEIST AM, PALSSON BO. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* under acid stress[J]. *Microbiology*, 2020, 166(2): 141-148.
- [61] SEONG W, HAN GH, LIM HS, BAEK JI, KIM SJ, KIM D, KIM SK, LEE H, KIM H, LEE SG, LEE DH. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* lacking cellular byproduct formation for enhanced acetate utilization through compensatory ATP consumption[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 249-259.
- [62] HUGHES BS, CULLUM AJ, BENNETT AF. Evolutionary adaptation to environmental pH in experimental lineages of *Escherichia coli*[J]. *Evolution*, 2007, 61(7): 1725-1734.
- [63] HARDEN MM, HE A, CREAMER K, CLARK MW, HAMDALLAH I, MARTINEZ KA 2nd, KRESSLEIN RL, BUSH SP, SLONCZEWSKI JL. Acid-adapted strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 1932-1941.
- [64] DRAGOSITS M, MOZHAYSKIY V, QUINONES-SOTO S, PARK J, TAGKOPOULOS I. Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9: 643.
- [65] YANG JH, ZHANG J, ZHU ZM, JIANG XY, ZHENG TF, DU GC. Revealing novel synergistic defense and acid tolerant performance of *Escherichia coli* in response to organic acid stimulation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(22): 7577-7594.
- [66] YANG JH, PENG Z, ZHU Q, ZHANG J, DU GC. [NiFe] Hydrogenase accessory proteins HypB-HypC accelerate proton conversion to enhance the acid resistance and D-lactic acid production of *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(4): 1521-1530.