

大肠杆菌全局调控转录因子环腺苷酸受体蛋白质在代谢工程中的应用

王献举¹, 吕静¹, 傅鹏程²

1 中国石油大学(北京)化学工程学院 新能源研究院, 北京 102249

2 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

王献举, 吕静, 傅鹏程. 大肠杆菌全局调控转录因子环腺苷酸受体蛋白质在代谢工程中的应用. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1651-1659.

Wang XJ, Lü J, Fu PC. Regulation of global transcriptional factor cyclic amp receptor protein and its metabolic engineering application in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1651-1659.

摘 要: 环腺苷酸受体蛋白质 (Cyclic amp receptor protein, CRP) 是原核生物共有的一类全局转录因子, 调控原核生物大肠杆菌 *Escherichia coli* 中近一半基因的转录。通过易错 PCR 或 DNA shuffling 的方法可以获得 CRP 突变体文库, 然后经过筛选可以得到目的细胞表型——“抗逆性”增强。本研究综述了突变 CRP 在细胞表型: 抗氧化压力、耐渗透胁迫、耐有机溶剂 (甲苯)、发酵中耐醋酸盐类和生物醇生产中耐生物醇中的应用。推论出 CRP 同样可以应用于相似微生物的表型培育, 并展望了 CRP 的巨大应用潜力。

关键词: CRP, 全局转录因子, 细胞表型, 代谢工程

Received: February 27, 2014; **Accepted:** April 28, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2013CB734002, 2003CB734003, 2011CB200902), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31270886, 31300049).

Corresponding author: Pengcheng Fu. Tel: +86-10-89731091; Fax: +86-10-89731283; E-mail: fupc@mail.buct.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2003CB734002, 2003CB734003), 国家自然科学基金 (Nos. 31270886, 31300049) 资助。

网络出版时间: 2014-05-30

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140121.html>

Regulation of global transcriptional factor cyclic amp receptor protein and its metabolic engineering application in *Escherichia coli*

Xianju Wang¹, Jing Lü¹, and Pengcheng Fu²

¹ College of Chemical Engineering & Institute of New Energy, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, China

² College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: Cyclic amp receptor protein (CRP) is a global transcriptional factor in many prokaryotes, capable of governing nearly half of the total genes in *Escherichia coli*. Through the method of error-prone PCR or DNA shuffling, we can first obtain CRP mutant library and then get the expected cell phenotype with enhanced resistance. In this article, we reviewed the following desired phenotype: enhanced tolerance towards oxidative stress, improved osmotolerance, enhanced organic solvent (toluene) tolerance, improved acetate tolerance of *E. coli* fermentation and improved ethanol tolerance during bio-ethanol production. We then concluded that CRP can also be applied in other host cells to get desired phenotypes. Last, we predicted potential applications of mutant CRP transcriptional factor.

Keywords: cyclic amp receptor protein (CRP), global transcriptional factor, cell phenotype, metabolic engineering

细胞代谢表型的改变主要是通过基因的敲除、突变或过量表达完成^[1]。但由于载体构建困难、转录效率低下、筛选能力不强等限制条件，以上调控主要集中于单个基因上。而细胞表型优化往往涉及多个基因表达的同时上调或是下降，使得单个基因层面的操作既费时又费力。2007年，Stephanopoulos 研究小组提出从改变细胞全局转录水平上提高细胞多基因控制表型即细胞全局转录机制工程 (gTME)^[2]。gTME 通过易错 PCR (Error-prone PCR) 或 DNA 改组 (DNA shuffling) 的方法获得结构改变的转录因子，进而影响转录因子与相关启动子 (Promoter) 序列的识别结合水平，最终从全局上调多个基因转录。作为一个实际应用例子，Stephanopoulos 研究小组通过调控全局转录因子 SPT15 获得了耐高乙醇酵母突变株^[3]。

环腺苷酸受体蛋白质 (Cyclic amp receptor

protein, CRP) 是原核生物共有的一类全局转录调控因子，直接调控基因总数超过 400 个，通过间接调控其他转录调控因子，CRP 可以对占原核生物 *E. coli* 基因总数一半左右起到调控作用^[4]。CRP 由两个完全相同的亚基组成，在有环状 AMP (Cyclic AMP, cAMP) 存在时，CRP 与 cAMP 形成 cAMP-CRP 复合物，该复合物与所调控启动子上游相关序列和 RNA 聚合酶^[5] (RNAP) 相结合，激活或是抑制转录。

最简单的模式原核生物 *E. coli* 中主要含有以下 7 种全局转录因子^[6]：CRP (环 AMP 受体蛋白)、IHF (融合宿主因子)、FNR (延胡索酸和硝酸盐还原蛋白)、FIS (反转刺激因子)、ArcA (厌氧呼吸调控蛋白)、Lrp (亮氨酸应答调控蛋白)、NarL (硝酸盐/亚硝酸盐应答调节)。这 7 种全局转录因子直接调控 *E. coli* 中超过一半基因的转录，其调控的基因总数占到 *E. coli* 中受转录因

子调节基因总数的 2/3 以上 (图 1)。此外,以上全局转录因子可以通过调节其他转录因子进而间接调节基因的转录^[7]。目前获得工业应用的主要有 CRP (环 AMP 受体蛋白) 和延胡索酸和硝酸盐还原蛋白 (Fumarate and nitrate reduction protein, FNR) 两大类全局转录因子。

1 CRP 基本结构特征

一般,CRP 是二聚体结构,每个亚基 (209 个氨基酸残基)包含 3 个结构^[8]——cAMP 结合结构域 (1-134 位氨基酸残基)、DNA 结合结构域 (140-209 位氨基酸残基) 和连接两结构域的铰链区结构域 (135-139 位氨基酸残基)。CRP 调节基因转录过程如下^[9]:首先,cAMP 结合到 CRP 上并改变 CRP 构象;其次,形成的 cAMP-CRP 复合物结合到所调控基因启动子相应序列,识别序列为 22 个碱基对的反向重复序列;再次,结合到 DNA 上的 cAMP-CRP 复合物改变自身蛋白和目标 DNA 序列构象;最后,

改变的构象与 RNAP 结合调控相应的转录过程。

CRP 所结合启动子序列只有单一的 cAMP-CRP 复合物结合位点,根据此结合位点位置的不同,可以将 CRP 调控启动子分为两种类型的启动子^[10]:第一类启动子,CRP 结合位点位于 RNAP 结合位点上游;第二类启动子,CRP 结合位点与 RNAP 结合位点相重叠,大概位于转录起始位点上游 40 个碱基对左右。

CRP 表面与 RNAP 结合的有 3 个不同区域 (图 1),即区域一、区域二、区域三。区域一^[11]位于 CRP 二聚体的上端部分,区域一上氨基酸的有效替代可能导致其与 RNAP 的最初结合受阻。区域二^[12]位于 CRP 二聚体的下端,区域二上氨基酸的有效替代可能导致开放复合物 cAMP-CRP-RNAP 形成受阻而影响转录效果。区域三^[10]紧挨区域二,通过与 RNAP 上 σ 因子结合而影响转录,由于区域三范围比较狭窄并且只作用于少数启动子,所以目前对于区域三研究甚少。

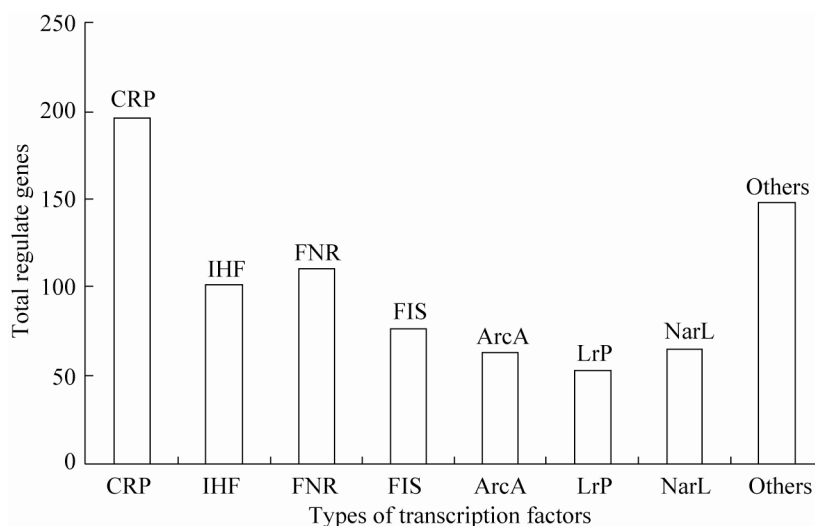


图 1 大肠杆菌中 7 种全局转录因子调控基因总数情况对比 (数据来源于 <http://ecocyc.org>)

Fig. 1 The histogram above shows the seven global transcriptional factors in *E. coli* cells. From the EcoCyc database (<http://ecocyc.org>).

2 CRP 调控基因种类及其功能

CRP 本身能直接调控近 200 个基因的转录，为 *E. coli* 中调节基因总数最多的转录因子，再加上其能够调控 20 多种转录因子而能进一步间接调控相关基因的转录，使得 CRP 是 *E. coli* 中功能最为强大的一类转录因子。

E. coli 中受 CRP 调控 (包括间接调控) 的基因总数为 650 个，可以分为以下几类：DNA 转录调控蛋白、功能酶及其组分、转运蛋白及其组分、膜蛋白及其组分、保守蛋白、未定功能蛋白和其他功能蛋白。各个种类所占比例如图 3 所示。

DNA 转录调控蛋白包括各种与 DNA 序列相结合的蛋白质因子以及与 RNAP 相结合的其他因子。通过调控 DNA 转录相关蛋白，CRP 可以极大地提高受其影响基因的数量。

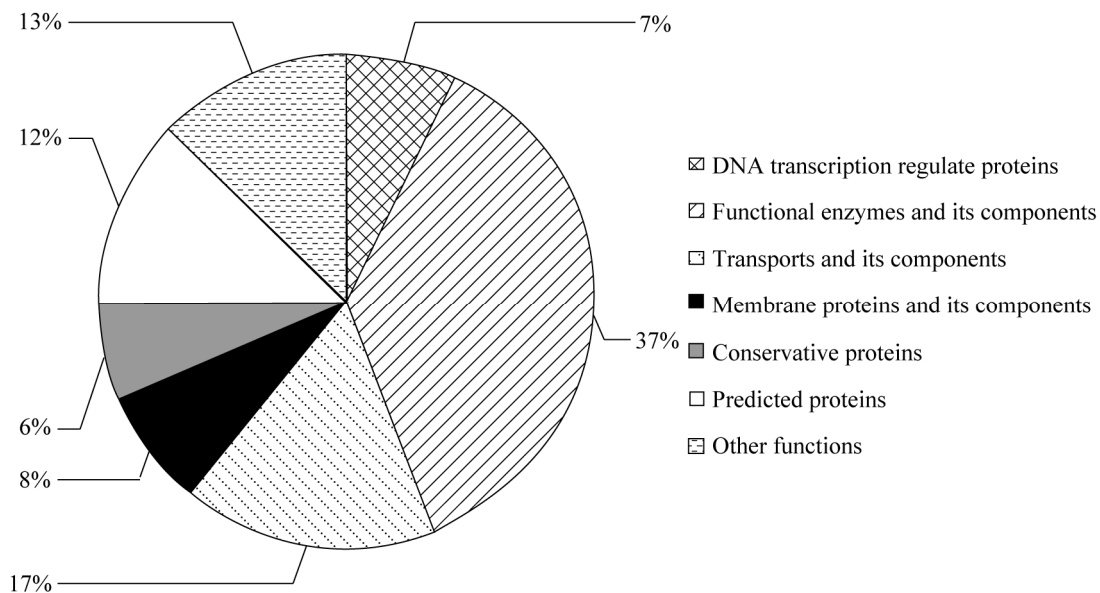


图 3 *E. coli* 中全局转录因子 CRP 调控基因编码蛋白分类

Fig. 3 The pie chart shows the classification of protein encoded by the corresponding genes under the manipulation of transcriptional factor CRP.

CRP 调控的基因中涉及编码功能酶及其组分的为 241 个，占总数的 37%。功能酶是指催化多种代谢路径的酶类，对于细胞代谢维持至关重要。CRP 调控多种复杂细胞表型即通过代谢酶活性的增强或是降低达到。

转运蛋白及其组分是 CRP 调控另一大类基

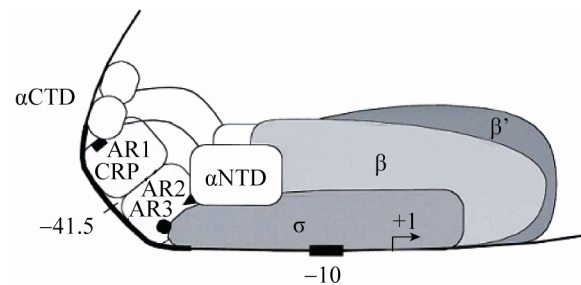


图 2 CRP 基本结构以及其与 DNA 序列、RNA 聚合酶 (RNAP) 结合示意图^[10]

Fig. 2 The schematic structure of CRP and its combination with the specific DNA sequence and RNA Polymerase (RNAP)^[10].

因编码蛋白,相应蛋白总数为 108 个,占 CRP 调控蛋白总和的 17%。转运蛋白在细胞耐渗透胁迫方面影响巨大,通过调节转运蛋白相关基因转录水平可以控制相关物质的输入和输出,进而调整细胞中特定物质含量,提高细胞耐渗透胁迫能力。

CRP 调控的另一类基因是编码膜蛋白及其相关组分的基因。膜蛋白相关组分在细胞的耐热、耐酸以及抗渗透胁迫方面意义重大。

除此之外,CRP 调控的另两类蛋白为“保守蛋白”和“未定功能蛋白”。此两类蛋白极大的丰富了 CRP 调控的基因范围,从而使得调控 CRP 可以获得更多的目的细胞表型,为定向细胞进化提供极其丰富的“筛选库”。

3 调控 CRP 转录因子的应用研究进展

目前应用 CRP 突变去获得目的细胞表型主要包括:生物加工过程中微生物宿主耐受氧化压力的能力、生物处理过程中耐渗透胁迫、生物催化或生物修复过程中耐有机溶剂(甲苯)、发酵过程中耐醋酸盐类和生物醇(乙醇、丁醇)生产过程中耐生物醇的能力。

3.1 调控 CRP 获得耐 H₂O₂ 氧化压力的表型

在生物加工处理过程中,微生物宿主细胞经常处于一种较高氧化压力条件之下,在该条件下活性氧如 O₂⁻、H₂O₂、OH[·]等含量较高,其对于细胞内生物大分子(DNA、蛋白质)组分进行氧化修饰会对宿主细胞造成不可逆损伤^[13]。宿主细胞通用的反应是产生相应的抗氧化酶清除活性氧自由基或是进行 DNA 分子损伤修复^[14],但当宿主细胞内活性氧超过一定浓度时,细胞自身调节机制很难起到作用。

Jiang 等^[15]通过易错 PCR 的方法获得容量

达 10⁵ 的 CRP 突变库,以 H₂O₂ 作为氧化压力条件进行筛选得到耐氧化压力提高的突变菌株,获得的 *E. coli* 突变菌株在 12 mmol/L H₂O₂ 中生长速度为 0.6 h⁻¹ (对照无生长)。最优突变株共有 3 处氨基酸被替换,分别是 69 位的苯丙氨酸被替换为半胱氨酸、82 位的精氨酸被替换为半胱氨酸和 139 位的缬氨酸被替换为甲硫氨酸。其中 69 位和 82 位均处于与 cAMP 结合结构域,139 位处于铰链区结构域。69 位的替代改变 CRP 的构象^[16],82 位的替代改变 CRP 与 cAMP 结合能力的大小^[17],139 位的氨基酸处于连接区域,其可能改变 CRP 与相应启动子序列结合的能力大小^[18]。氨基酸替代总的效用是增强抗氧化酶基因转录水平,从而清除细胞内活性氧自由基。最优突变株除了表现出较高的耐氧化压力之外,还表现出一定的耐热能力^[15]。如此,更加证明 CRP 调控基因数量庞大,应用前景十分广阔。

3.2 调控 CRP 耐 NaCl 渗透胁迫

在微生物发酵过程中,原料中经常有较高含量的糖类和盐类物质,会对细胞造成较高的渗透胁迫^[19],加上生物发酵所得到的生物乙醇或乳酸类物质^[20]也会提高细胞外渗透压力,同样会对细胞的生长造成一定程度的影响,进而影响微生物发酵产量的高低^[21]。如何获取耐高渗透压力的菌株是代谢工程中的一大难题。

Zhang 等^[22]通过随机突变(易错 PCR 和 DNA 改组)方法获得 CRP 突变体文库,而后以 NaCl 为渗透压力条件进行筛选得到抗细胞外渗透压力的突变菌株,突变菌株在 0.9 mol/L NaCl 中生长速度为 0.113 h⁻¹ (对照为 0.077 h⁻¹)。最优突变菌株共有 2 处氨基酸被替换,分别是第 52 位的赖氨酸被替换为异亮氨酸和第 130 位的赖氨酸被替换为谷氨酸。第 52 位和第 130 位的氨基

酸均是位于 CRP 中与 cAMP 结合区域。第 52 位的带正电氨基酸被替换为中性氨基酸更有利于第二类 CRP 所调控启动子的转录^[23], 第 130 位的替代氨基酸改变了 CRP 构象, 影响 CRP 与 cAMP 所形成复合物结构, 从而影响其与 RNAP 的结合而最终影响目的基因的转录^[24]。最优突变株表现出较低转录水平的转运子, 从而阻止细胞外物质的对内转运, 使细胞表现出较高的耐渗透胁迫能力。

3.3 调控 CRP 耐有机溶剂甲苯

有机溶剂在两相生物催化里亲油基生物转化中经常使用, 其被用作增加目标产物产量或萃取出对细胞有毒的副产物的目的^[25]。另外, 在生物修复中受“污染”的位置通常也有有机溶剂如甲苯的存在^[26]。甲苯对于细胞毒害作用相对较大, 较低的量即致使细胞生长停滞甚至死亡。如何获得对有机溶剂甲苯耐性较高的菌种是摆在微生物工业应用界的一个复杂难题。

Basak 等^[27]采用易错 PCR 的方法构建 CRP 突变体文库, 接着用含甲苯的“逆性环境”进行筛选, 获得了甲苯抗性提高的 CRP 突变菌株, 突变菌株在体积分数为 0.23% 甲苯中, 生长速度为 0.51 h^{-1} (对照无生长)。对突变株 CRP 编码基因测序发现突变 CRP 只有 1 处氨基酸被替换, 即第 136 位的苯丙氨酸被替换为异亮氨酸。该替换发生在 CRP 的铰链区结构域, 并且靠近与 cAMP 结合区。第 136 位的氨基酸主要是参与形成 β 发夹结构, 该发夹结构起着连接 CRP 中 C 端与 N 端区域即 cAMP 结合区与 DNA 结合区的功能^[28]。从苯丙氨酸突变为异亮氨酸主要是改变上述 β 发夹结构, 进而改变整个 CRP 构象^[29], 最终影响 CRP 调控基因转录水平。同时, 对突变株转录水平分析, 发现与耐有机溶剂相

关基因 *arcAB* 转录水平提高, *arcAB* 编码所得转运蛋白主要功能是将细胞内毒性有机溶剂如甲苯转运出细胞^[30]。

3.4 调控 CRP 耐醋酸盐

醋酸盐类是一种来源于木质纤维素的发酵副产物, 在过量葡萄糖存在的情况下, 会严重影响微生物生物加工过程^[31-32]。一般在 *E. coli* 发酵过程中, 醋酸盐浓度超过 5 g/L 时, 即抑制细胞生长, 限制发酵罐中细胞的浓度, 进而影响发酵产物产量提高^[33-34]。如何通过代谢工程的方法获得醋酸盐耐性提高的突变菌株是可持续微生物发酵工程中所面临的一大难题。

Chong 等^[35]利用易错 PCR 突变获得 CRP 突变体文库, 接着用醋酸盐压力进行“进化筛选”获得醋酸盐耐性增强的 CRP 突变株。获得的最优 *E. coli* 突变菌株在浓度为 15 g/L 的醋酸盐中, 生长速度为 0.083 h^{-1} (对照为 0.016 h^{-1})。最优突变株中 CRP 氨基酸仅有 1 处发生替换, 即第 138 位的天冬氨酸被替换为酪氨酸。替换位置发生在铰链结构域, 并且靠近与 DNA 结合结构域。通过此次替换, 可能改变 CRP 与相应 DNA 结合能力的大小^[36], 从而影响突变株的转录水平。同时通过 DNA 微阵列分析发现与耐醋酸盐相关基因如 *yfiD*、*pflB*、*gadA*、*gadB* 等表达水平上升, 这类基因编码蛋白主要是抑制细胞内酸化, 从而抵消醋酸盐酸化带来的不良影响^[37]。

3.5 调控 CRP 耐乙醇

生物乙醇作为一种可替代能源正受到越来越多的关注^[38], 生物乙醇主要是通过微生物发酵获得。在发酵过程中, 随着“毒性”终产物乙醇的积累, 微生物生长受阻, 代谢放缓, 导致终产物产量降低^[39-40]。目前, 通过微生物发酵获得的最高乙醇浓度为 60 g/L^[41]。如此, 大规模

生产物乙醇必然要解决乙醇耐性不高的难题。

Chong 等^[42]通过易错 PCR 获得 CRP 突变体文库,接着用乙醇抗性进行筛选获得耐乙醇能力提高的突变菌株。获得的 *E. coli* 突变菌株在浓度为 62 g/L 乙醇中生长速度为 0.08 h^{-1} (对照为 0.06 h^{-1})。通过对获得的突变株进行 DNA 测序,表明其只有 1 处氨基酸发生替换,即第 59 位的甲硫氨酸被替换为苏氨酸。替换位置位于 CRP 上与 cAMP 结合区域。突变结果可能影响 CRP 与 cAMP 的结合状况^[43],进而通过 RNAP 影响目的基因转录水平。另外,对突变株进行 DNA 微阵列分析发现,除通用压力诱导基因转录水平提高之外,乙醇耐性相关基因如 *marA* 转录水平也提高。但进行综合分析发现,乙醇耐性需要多种诱导途径的参与,其耐性提高是多种基因共同调节的结果。

3.6 本实验室有关调控 CRP 研究进展

第三代生物乙醇是利用基因工程的方法改造光合生物蓝藻而生产获得的乙醇。目前,第三代生物乙醇正成为全球研究热点。如今主要有两大瓶颈有待克服:蓝藻本身产乙醇量不高,目前实验获得的最高乙醇产量是 690 mg/L;蓝藻耐受乙醇能力偏低,2%的乙醇即能严重抑制蓝藻细胞的生长。利用 gTME 的方法调控蓝藻(以 *Synechococcus* 7942 为研究对象)全局转录因子 CRP 基因家族 FNR 基因获得 FNR 突变体文库,接着通过高通量筛选的方法获得 FNR 突变体文库。以乙醇抗性作为筛选条件筛选出乙醇耐性提高的菌株。以乙醇产量提高作为实验目的,获得乙醇产量提高菌株。另外通过分析突变 FNR 结构特征可以揭示出 FNR 结构和其功能之间的对应关系。目前实验室正在构建 FNR 突变体文库,已初步筛选出能够耐受 2%乙醇含

量的蓝藻。

本实验的开展既能提高蓝藻乙醇产量和耐受能力,阐明乙醇耐受机制,亦能解决蓝藻生物乙醇规模化生产的瓶颈问题,推动第三代生物乙醇产业的发展,为藻类绿色燃料的可持续发展提供藻种原料和技术储备。

4 结论与展望

利用易错 PCR 或 DNA shuffling 的方法对全局转录因子 CRP 进行突变可以获得期望的目的细胞表型:耐受乙醇、有机溶剂、盐类等各种抗逆性能力增强以及乙醇、丁醇等目标产物生产量增加。调控 CRP 可以从全局水平上调控多个基因转录水平的上升或是下降,正好和细胞表型与多个基因表达的同时上升或是下降的特点相符合。如此,可以通过从突变库里用相应“逆性”环境进行筛选而获得目的细胞表型。

CRP 是原核生物共有的一类全局转录因子,其位于调控网络的最顶端。Wang 等^[44]2012 年提出全局转录因子调控方法即 GRE,该方法的内涵包括利用宿主细胞本身或是外源细胞全局转录因子突变建立相应的库供选择性筛选获得目的细胞表型。同样,也可以将特定细胞中所获特定表型的相应 CRP 突变体转接到另一宿主细胞中,有望获得相同的细胞表型。因此,则可以极大地提高 CRP 突变的应用范围,也省去突变和筛选的重复步骤。如果将 CRP 突变应用于合成生物学的研究,将 CRP 突变体作为一种“元件”用于构建细胞代谢库,也可能会获得意想不到的收获。

转录因子 CRP 结构与其功能目前还没有建立确切的关系,对其突变虽比传统整个基因组突变省时、省力,但同样其突变带有一定的盲

目性, 筛选工作量巨大。下一步的工作应是结合系统生物学的基本方法建立起其结构与其相应功能的联系。如此不仅可以增强相应工作的目的性从而获得更优的细胞表型, 也为解析细胞功能与代谢提供参考。

REFERENCES

- [1] Zhang F, Rodriguez S, Keasling JD. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22: 775–783.
- [2] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9: 258–267.
- [3] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, 314, 1565–1568.
- [4] Ma HW, Kumar B, Dittges U, et al. An extended transcriptional regulatory network of *Escherichia coli* and analysis of its hierarchical structure and network motifs. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 6643–6649.
- [5] Busby S, Ebright R. Transcription activation by Catabolite Activator Protein (CAP). *J Mol Biol*, 1999, 293, 199–213.
- [6] Martinez-Antonio A, Collado-Vides J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6: 482–489.
- [7] Riley M. Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Mic Rev*, 1993, 57: 862–952.
- [8] Passner JM, Schultz SC, Steitz TA. Modeling the cAMP induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 angstrom resolution. *J Mol Biol*, 2000, 304(5): 847–859.
- [9] Baker CH, Tomlinson SR, Garcia AE, et al. Amino acid substitution at position 99 affects the rate of CRP subunit exchange. *Biochem*, 2001, 40(41): 12329–12338.
- [10] Virgil A, Rhodius, Stephen JW, Busby. Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: determinants within activating region 3. *J Mol Biol*, 2000, 299: 295–310.
- [11] Ebright R. Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol*, 1993, 8: 797–802.
- [12] Niu W, Kim Y, Tau G, et al. Transcription activation at Class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell*, 1996, 87: 1123–1134.
- [13] Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 12: 188–194.
- [14] Greenberg JT, Dimple B. Overproduction of peroxide-scavenging enzymes in *Escherichia coli* suppresses spontaneous mutagenesis and sensitivity to redox-cycling agents in oxyR-mutants. *EMBO*, 1988, 7: 2611–2617.
- [15] Basak S, Jiang R. Enhancing *E. coli* Tolerance towards oxidative stress via engineering its global regulator cAMP Receptor Protein(CRP). *PLoS ONE* 7(12): e51179.
- [16] Kumar P, Joshi DC, Akif M, et al. Mapping conformational transitions in cyclic AMP receptor protein crystal structure and normal-mode analysis of *Mycobacterium tuberculosis* apo-cAMP receptor protein. *Biophys*, 2010, 98: 305–314.
- [17] Moore J, Kantorow M, Vanderzwaag D, et al. *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein mutants provide evidence for ligand contacts important in activation. *J Bacteriol*, 1992, 174: 8030–8035.
- [18] Passner JM, Schultz SC, Steitz TA. Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1Å resolution. *J Mol Biol*, 2000, 304: 847–859.
- [19] Ge XY, Yuan JA, Qin H, et al. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 73–78.
- [20] Yang J, Bae JY, Lee YM, 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. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(8): 1776–1787.
- [21] Ionescu M, Belkin S. Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 rpoS mutant in response to osmotic stress. *Appl*

- Environ Microbiol, 2009, 75(2): 483–492.
- [22] 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.
- [23] Williams R, Bell A, Sims G, et al. The role of two surface exposed loops in transcription activation by the *Escherichia coli* CRP and FNR proteins. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6705–6712.
- [24] Popovych N, Tzeng SR, Tonelli M, et al. Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(17): 6927–6932.
- [25] Sardesai YN, Bhosle S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. Biotechnol Prog, 2004, 20: 655–660.
- [26] Prenafeta-Boldu FX, Ballerstedt H, Gerritse J, et al. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialacarbons* sp. strain T1. Biodegradation, 2004, 15: 59–65.
- [27] Basak S, Song H, Jiang RR. Error-prone PCR of global transcription factor cyclic AMP receptor protein for enhanced organic solvent (toluene) tolerance. Process Biochem, 2012, 47: 2152–2158.
- [28] Won HS, Lee YS, Lee SH, et al. Structural overview on the allosteric activation of cyclic AMP receptor protein. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794: 1299–308.
- [29] Passner JW, Ghosh D, Cirino PC. Transcriptional effects of CRP expression in *Escherichia coli*. J Biol Eng, 2009, 3: 13.
- [30] Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J Bacteriol, 1996, 178: 5853–9.
- [31] Geddes CC, Nieves IU, Ingram LO. Advances in ethanol production. Curr Biotechnol, 2011, 22: 312–319.
- [32] Wang L, Ching H, Ching CB, et al. Nanotube supported bioproduction of 4-hydroxy-2-butanone via in situ cofactor regeneration. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94: 1233–1241.
- [33] Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. Biotechnol Biofuels, 2009, 2: 26.
- [34] Kirkpatrick C, Maurer LM, Oyelakin NE, et al. Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2011, 183: 6466–6477.
- [35] Chong H, Yenow J, Wang I, et al. Improving acetate tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP Receptor Protein (CRP). PLoS ONE, 2013, 8(10): e77422.
- [36] Sharma H, Yu SN, Kong JL, et al. Structure of apo-CAP reveals that large conformational changes are necessary for DNA binding. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 16604–16609.
- [37] Arnold CN, McElhanon J, Lee A, et al. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. J Bacteriol, 2001, 183: 2178–2186.
- [38] Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, et al. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol, 2006, 24: 549–556.
- [39] Wackett LP. Biomass to fuels via microbial transformations. Curr Opin Chem Biol, 2008, 12: 187–193.
- [40] Fischer CR, Klein, Marcuschamer D, et al. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. Metab Eng, 2008, 10: 295–304.
- [41] Yomano LP, York SW, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. J Ind Microbiol Biotechnol, 1998, 20: 132–13.
- [42] Chong H, Huang L, Yeow J, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP). PLoS ONE, 2013, 8(2): e57628.
- [43] Won HS, Seo MD, Ko HS, et al. Interdomain interaction of cyclic AMP receptor protein in the absence of cyclic AMP. J Biochem, 2008, 143: 163–167.
- [44] Wang JQ, Zhang Y, Chen YL, et al. Global regulator engineering significantly improved *Escherichia coli* tolerances toward inhibitors of lignocellulosic hydrolysates. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(12): 3133–3142.

(本文责编 陈宏宇)