

doi: 10.3969/j.issn.2095-0411.2025.01.006

谷氨酰胺合成酶与运动发酵单胞菌耐受酚醛的关系

易 霞^{1,2,3}, 张 盟^{1,2,3}, 王一龙⁴, 蒙 顾^{1,2,3}, 王心悦^{1,2,3}, 何玉财⁴, 朱 劼^{1,2,3,4}

(1. 常州大学 城乡矿山研究院, 江苏 常州 213164; 2. 生物质高效炼制及高质化利用国家地方联合工程研究中心(常州大学), 江苏 常州 213164; 3. 常州市生物质绿色安全高值利用技术重点实验室(常州大学), 江苏 常州 213164; 4. 常州大学 药学院, 江苏 常州 213164)

摘要: 通过基因表达谱、基因重组和生物信息学技术, 研究谷氨酰胺合成酶与生物炼制菌株耐受酚醛的关系。基因表达谱研究结果表明, 在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛的胁迫下, 运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis* ZM4) 的 I 型谷氨酰胺合成酶基因 *ZMO0493* 分别显著差异上调 2.80, 2.52 和 3.21 倍。通过基因重组发现, *ZMO0493* 过量表达提高了运动发酵单胞菌的酚醛转化和乙醇积累。蛋白互作网络分析发现, *ZMO0493* 蛋白与氧化还原酶 (*ZMO1116*/*ZMO1661*) 和氨基转移酶 (*ZMO0056*/*ZMO1207*) 显著相关, 表明该 I 型谷氨酰胺合成酶与运动发酵单胞菌的酚醛耐受有关。

关键词: 运动发酵单胞菌; 乙醇发酵; 酚醛; 谷氨酰胺合成酶

中图分类号: Q 81

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2025)01-0048-10

Relationship between glutamine synthetase and the tolerance of phenolic aldehydes for *Zymomonas mobilis*

YI Xia^{1,2,3}, ZHANG Meng^{1,2,3}, WANG Yilong⁴, MENG Gu^{1,2,3}, WANG Xinyue^{1,2,3}, HE Yucan⁴, ZHU Jie^{1,2,3,4}

(1. Institute of Urban & Rural Mining, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. National-local Joint Engineering Research Center of Biomass Refining and High-Quality Utilization, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 3. Changzhou Key Laboratory of Biomass Green, Safe & High Value Utilization Technology, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 4. School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: It aimed to study the effect of synthetase on the tolerance of phenolic aldehydes for fermentation strains in biorefinery fields through gene expression profiling, gene recombination and bioinformatics analysis. It showed that the gene *ZMO0493* encoding type I glutamine synthetase for *Zymomonas mobilis* ZM4 was significantly up-regulated by 2.80, 2.52 and 3.21 fold change under the

收稿日期: 2024-05-25。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22278040, 21978072); 常州大学科研启动基金资助项目(ZMF22020021)。

作者简介: 易霞(1979—), 女, 新疆奇台人, 博士, 副教授。E-mail: yixia0110@163.com

引用本文: 易霞, 张盟, 王一龙, 等. 谷氨酰胺合成酶与运动发酵单胞菌耐受酚醛的关系[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2025, 37(1): 48-57.

stress of 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin, respectively, through gene expression profiling assays. It was also confirmed that the over-expression of *ZMO0493* increased phenolic aldehyde conversion and ethanol accumulation through gene recombination technique. Protein interaction network analysis for *Z. mobilis* further illustrated that the protein *ZMO0493* was of significant connection with the oxidoreductases (*ZMO1116*/*ZMO1661*) and acyltransferases (*ZMO0056*/*ZMO1207*). Therefore, type I glutamine synthetase was involved with the tolerance of phenolic aldehydes for *Z. mobilis*.

Key words: *Zymomonas mobilis* ZM4; ethanol fermentation; phenolic aldehydes; glutamine synthetase

木质纤维素生物质预处理过程是确保纤维素和半纤维素有效水解成单糖的先决条件^[1-3]。但是稀酸、稀碱、离子液体、中性热水、蒸汽膨爆和微波等预处理方法,均不可避免地产生强烈抑制糖化过程纤维素酶活性和菌株发酵能力的呋喃醛和酚醛^[4-5]。与呋喃醛不同,酚醛毒性更强、种类繁多、水溶性较差、生物脱毒效果不理想,因此其对生物质能源和生物基化学品生产的抑制尤其显著^[6-8]。可见,酚醛问题是制约生物炼制领域发展的主要瓶颈之一,发酵菌株耐受酚醛是生物质能源和生物基化学品高效发酵的前提之一。研究发现,定向基因进化^[9-10]、基因重组^[11-15]和基因突变^[8]等技术可用于提高生物炼制发酵菌株的酚醛耐受能力。

产乙醇细菌运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* ZM4)具有较高的乙醇产率、较强的胁迫耐受性和可塑的遗传修饰性,在生物炼制领域具有突出的应用潜力^[16-17]。运动发酵单胞菌对酚酸具有较好的耐受性,但是其对酚醛的耐受性较弱^[12, 18]。研究发现,运动发酵单胞菌能够将高毒性的酚醛转化为相应的低毒性酚醇^[12]。随着生物炼制菌株耐受酚醛机制的阐明,众多研究通过基因工程还原酶、激酶、调控因子和转运蛋白等提高运动发酵单胞菌的酚醛耐受能力^[12, 19-22]。基因 *GlnA* 编码的谷氨酰胺合成酶(EC 6.3.1.2),参与谷氨酸和铵根离子生成氨酰胺的转化过程。就抗逆性而言,谷氨酰胺合成酶可提高生物的氧化胁迫^[23]、铵耐受^[24]、镉胁迫^[25]和干旱胁迫^[26]能力。然而,谷氨酰胺合成酶对酚醛胁迫耐受的研究鲜见报道。

文章旨在研究谷氨酰胺合成酶与生物炼制

菌株耐受酚醛的关系。通过 DNA 芯片技术,首先建立了运动发酵单胞菌所有合成酶在酚醛胁迫下的基因表达谱。随后,通过基因重组技术研究谷氨酰胺合成酶目标基因的功能。同时,通过生物信息学技术揭示运动发酵单胞菌谷氨酰胺合成酶的蛋白互作网络关系,为生物炼制酚醛耐受菌株的遗传改造提供新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株和质粒的表型见表 1。运动发酵单胞菌(*Z. mobilis* ZM4)购自美国典型培养物保藏中心(American type culture collection, USA)。酵母浸粉购自英国 Oxoid 公司(Hampshire, UK)。4-羟基苯甲醛(4-hydroxybenzaldehyde, 4-HBA)、丁香醛(Syringaldehyde)和香草醛(Vanillin)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。其他分析级化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株培养

用于培养大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 LB (Luria-bertani)培养基含有 10.0 g/L 蛋白胨、5.0 g/L 酵母浸粉和 10.0 g/L NaCl (pH 为 7.0)。按照 1%接种量将运动发酵单胞菌种子液接种于含 20.0 g/L 葡萄糖、2.0 g/L KH_2PO_4 和 10.0 g/L 酵母浸粉的 RM (Rich medium)培养基,30 °C 静置培养,间隔 4 h 取样。在 RM 培养基中分别添加 5 mmol/L 4-羟基苯甲醛、丁

香醛和香草醛，进行运动发酵单胞菌的酚醛耐受实验，以不添加酚醛的实验组作为对照组。按照 10%接种量将运动发酵单胞菌种子液接种于含

100 mL 新鲜 RM 培养基的 250 mL 三角瓶中，收集细胞供 DNA 芯片测序。所有实验设置 3 个生物学重复。

表 1 菌株和质粒的表型
Table 1 Phenotypes of strains and plasmids

菌株和质粒	表型
<i>E. coli</i> S17-1	<i>RecA Pro HsdR RP4-2-Tc :: Mu-Km :: Tn7</i>
<i>Z. mobilis</i> ZM4	野生型
pHW20a	<i>Tc^r</i> , <i>Mob</i> (RP4), <i>Mob</i> (RSF1010), <i>LacZa</i> , 多克隆位点和 <i>OriV</i>
pHW20a-ZMO0493	过量表达 <i>ZMO0493</i> 基因

1.3 基因表达谱建立

已有相关研究开展了基于 DNA 芯片的运动发酵单胞菌耐受酚醛的基因表达谱实验^[12]，用 Cy3-dCTP 荧光探针标记互补 DNA 片段，用安捷伦 GeneSpring version 12 软件（Santa clara, CA, USA）归一化并质控测序数据。实验组与对照组荧光信号强度的比值经对数转化后即为基因表达谱数据。

1.4 菌株构建

用天根细菌 DNA 提取试剂盒（Cat # DP302-02）提取运动发酵单胞菌的基因组 DNA。扩增目标基因 *ZMO0493* 的正向引物为 AAAACTGCAGATGGCCAATTCGGCATCT（*Pst* I），反向引物为 CCGGAATTCTTAGAGAGAATAATACATTTCAAATTC（*EcoR* I）。图 1 是对照空载质粒 pHW20a 和携带目标基因 *ZMO0493* 的重组质粒 pHW20a-ZMO0493 的构建图。将重组质粒转化至宿主菌 *E. coli* S17-1 后，再通过接合转化方法将重组质粒转化至 *Z. mobilis* ZM4，得到重组菌株 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a 和 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a-ZMO0493^[27-28]。

1.5 菌株粗酶酶活检测

收集菌株 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a 和 *Z. mobilis* ZM4::pHW20a-ZMO0493，并用 PBS 缓冲液（pH 为 7.0）洗涤两次。用超声波

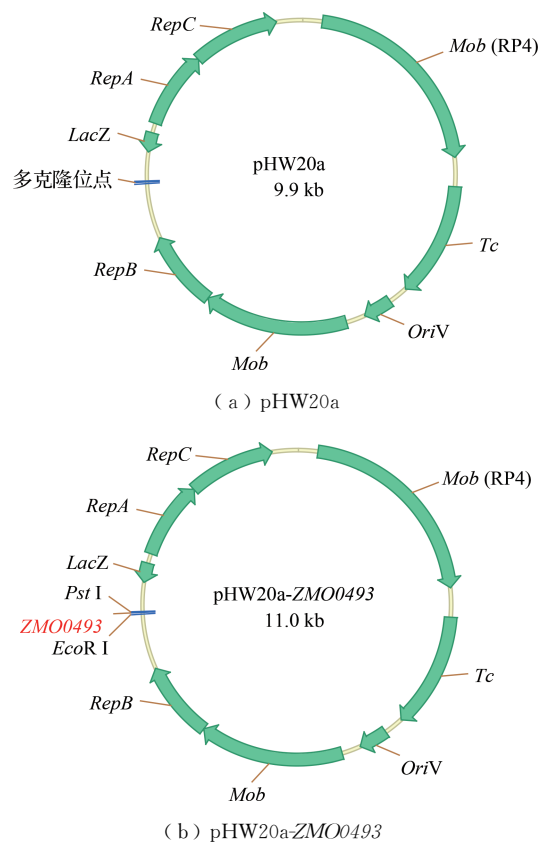


图 1 重组质粒图

Fig.1 Map of recombinant plasmids

超声菌体细胞 8 次，4 ℃，12 000 r/min 离心 5 min 后，用 0.44 μm 滤膜过滤上清液，即为粗酶液。用紫外可见分光光度计在 540 nm 测定谷氨酰胺合成酶 *ZMO0493* 的粗酶酶活^[29]。谷氨酰胺合成酶可催化底物谷氨酰胺生成 *L*-谷氨酸-γ-单羟肟酸。150 μL 酶活反应体系包括 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）（pH 为 7.5），0.05 mol/L *L*-谷氨酸钠，0.03 mol/L

NH_4Cl , 0.02 mol/L MgCl_2 和 0.005 mol/L 三磷酸腺苷 (ATP)。该反应体系于 37 °C 温浴 5 min 后, 加入一定体积粗酶液进行酶促反应。5 min 后, 用 100 μL 反应终止液 (2% HCl , 55 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 20 g/L 三氯乙酸) 终止酶促反应。37 °C 温浴 20 min 后, 在 540 nm 波长处检测 L -谷氨酸- γ -单羟肟酸和氯化铁的红色复合物。谷氨酰胺合成酶 ZMO0493 粗酶的比酶活定义为: 在 37 °C, 每分钟形成 1.0 μmol L -谷氨酸- γ -单羟肟酸所需的粗酶的量。

1.6 HPLC 分析

用配置有 ERC RefractoMax 520 示差检测器 (Thermo Scientific, USA) 和 Aminex HPX-87H 柱子 (Bio-Rad, USA) 的 Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate™ 3000 高效液相色谱检测葡萄糖和乙醇。柱温 55 °C, 流速 0.6 mL/min, 流动相为 5.0 mmol/L H_2SO_4 。酚醛质量浓度参照文献 [12] 报道的方法检测。

1.7 统计学分析

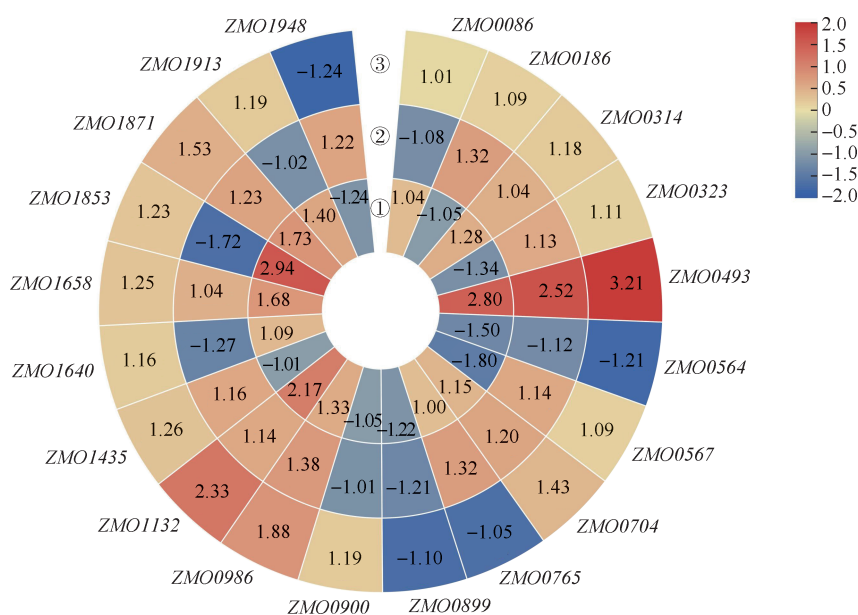
采用 SigmaPlot 14.0 软件进行统计学分析, 用平均数 \pm 标准差表示所有的实验数据。采用

Paired t -test 和 Student t -test 进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 基因转录情况

依据酚醛基因表达谱数据, 文章通过基因注释信息分析运动发酵单胞菌的全部合成酶, 同时将每个合成酶的编码基因与酚醛胁迫下的基因转录值相匹配。图 2 为运动发酵单胞菌所有合成酶在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的基因转录情况。研究表明, 在 4-羟基苯甲醛胁迫下, 基因 ZMO0493, ZMO1132 和 ZMO1853 分别差异上调 2.80, 2.17 和 2.94 倍。在丁香醛胁迫下, 仅 ZMO0493 基因差异上调 2.52 倍。在香草醛胁迫下, ZMO0493 和 ZMO1132 分别差异上调 3.21 和 2.33 倍。可见, 运动发酵单胞菌的谷氨酰胺合成酶编码基因 ZMO0493 在酚醛胁迫下均显著差异表达。前期研究发现, 产乙醇细菌运动发酵单胞菌对酚醛的耐受性较弱, 而且氧化还原、转运和调控这 3 个生物学过程在运动发酵单胞菌酚醛胁迫下的富集度最高^[12]。因此, 部分还原酶 (ZMO1116, ZMO1885 和 ZMO1721)、转运蛋白 (ZMO1288) 和激酶 (ZMO1162) 分



说明: ①为 4-羟基苯甲醛; ②为丁香醛; ③为香草醛。

图 2 运动发酵单胞菌合成酶在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫下的基因转录情况

Fig.2 Gene transcriptional profiling of synthetases for *Z. mobilis* ZM4 under the stress of 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin

别被过量表达以期提高运动发酵单胞菌的酚醛耐受能力^[12, 20-22]。研究揭示了编码 I 型谷氨酰胺合成酶 *ZMO0493* 基因对酚醛胁迫的信号响应。

2.2 菌株构建

重组质粒鉴定和粗酶酶活测定如图 3 所示。由图 3 可知, 运动发酵单胞菌过量表达 *ZMO0493* 基因。通过聚合酶链式反应 (PCR) 和双酶切 (*Pst* I/*Eco*R I) 鉴定, 重组质粒 pHW20a-*ZMO0493* 构建成功。重组运动发酵单胞菌谷氨酰胺合成酶粗酶酶活检测结果表明, 对照菌株 *Z. mobilis* ZM4 :: pHW20a 和携带目标基因的重组菌株 *Z. mobilis* ZM4 :: pHW20a-*ZMO0493* 的比酶活分别为 0.10, 0.18 U/mg,

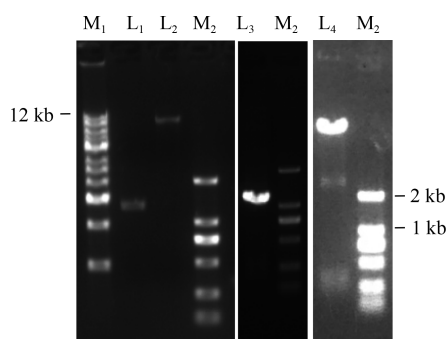
表明 *ZMO0493* 在运动发酵单胞菌中成功过量表达。

2.3 菌株发酵

为了考察 *ZMO0493* 的基因功能, 文章进行了运动发酵单胞菌重组菌株在 4-羟基苯甲醛、丁香醛和香草醛胁迫条件下的乙醇发酵实验, 如图 4、图 5、图 6 所示。由图 4 可知, 在 4-羟基苯甲醛胁迫下, 重组菌株在 4, 8 h 的细胞生长较对照组分别提高了 5.4% 和 1.5%, 葡萄糖消耗分别提高了 11.7% 和 13.5%, 乙醇质量浓度分别提高了 1.0% 和 17.2%, 4-羟基苯甲醛的转化率分别提高了 0.12% 和 9.5%。

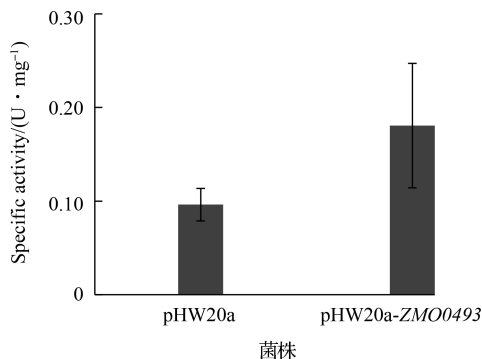
由图 5 可知, 在丁香醛胁迫下, 重组菌株在 4, 8 h 的细胞生长较对照组分别提高了 25.9% 和 18.6%, 葡萄糖消耗分别提高了 55.3% 和 113.1%, 乙醇质量浓度分别提高了 11.8% 和 86.2%, 丁香醛的转化率分别提高了 52.4% 和 204.4%。

由图 6 可知, 在香草醛胁迫下, 重组菌株在 4, 8 h 的细胞生长较对照组分别提高了 20.0% 和 7.5%, 葡萄糖消耗分别提高了 219.0% 和 80.9%, 乙醇质量浓度分别提高了 18.1% 和 101.0%, 香草醛的转化率分别提高了 73.3% 和 115.9%。由此可见, *ZMO0493* 过量表达提高了运动发酵单胞菌的酚醛转化和乙醇发酵。研究表明谷氨酰胺合成酶能提高黄曲霉和藻类的胁迫耐受能力^[23, 30], 这进一步验证了文章的研究结果。*ZMO0493* 过量表达能增强运动发酵单胞菌对酚醛的胁迫耐受能力, 是运动发酵单胞菌乙醇发酵能力提升的根本原因, 这与之前的研究结果一致^[12, 20-22]。需要特别指出的是, 相同质量浓度下, 4-羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛的毒性依次降低^[12], 因此重组菌株对丁香醛、香草醛和 4-羟基苯甲醛的耐受能力依次降低。由此推测, 运动发酵单胞菌的谷氨酰胺合成酶活性也受酚醛种类的影响, *ZMO0493* 过量表达后的酚醛转化和乙醇发酵能力存在差异。



说明: M₁ 和 M₂ 为 DNA marker; L₁ 为 *ZMO0493* 扩增产物; L₂ 为 pHW20a; L₃ 为 pHW20a-*ZMO0493* 重组质粒 PCR 鉴定; L₄ 为 pHW20a-*ZMO0493* 重组质粒双酶切鉴定。

(a) 重组质粒鉴定



(b) 重组菌株粗酶酶活测定

图 3 重组质粒鉴定和粗酶酶活检测

Fig.3 Identification of recombinant plasmids and the determination of enzyme activity of crude enzyme

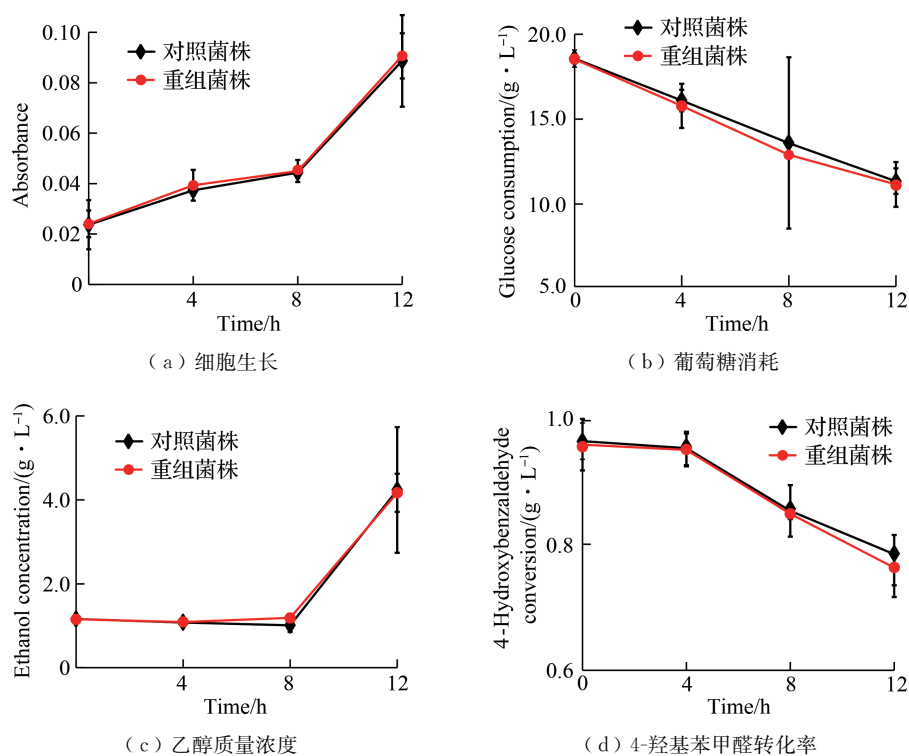


图 4 重组运动发酵单胞菌在 4-羟基苯甲醛胁迫下的乙醇发酵能力

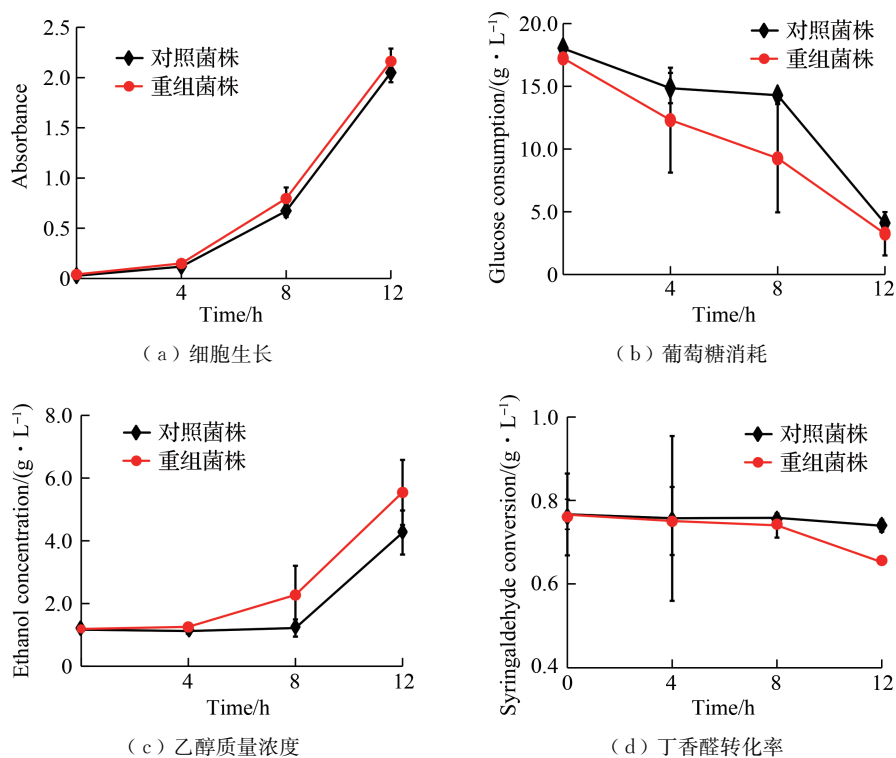
Fig.4 Ethanol fermentability of the recombinant *Z. mobilis* ZM4 strains under the stress of 4-hydroxybenzaldehyde

图 5 重组运动发酵单胞菌在丁香醛胁迫下的乙醇发酵能力

Fig.5 Ethanol fermentability of the recombinant *Z. mobilis* ZM4 strains under the stress of syringaldehyde

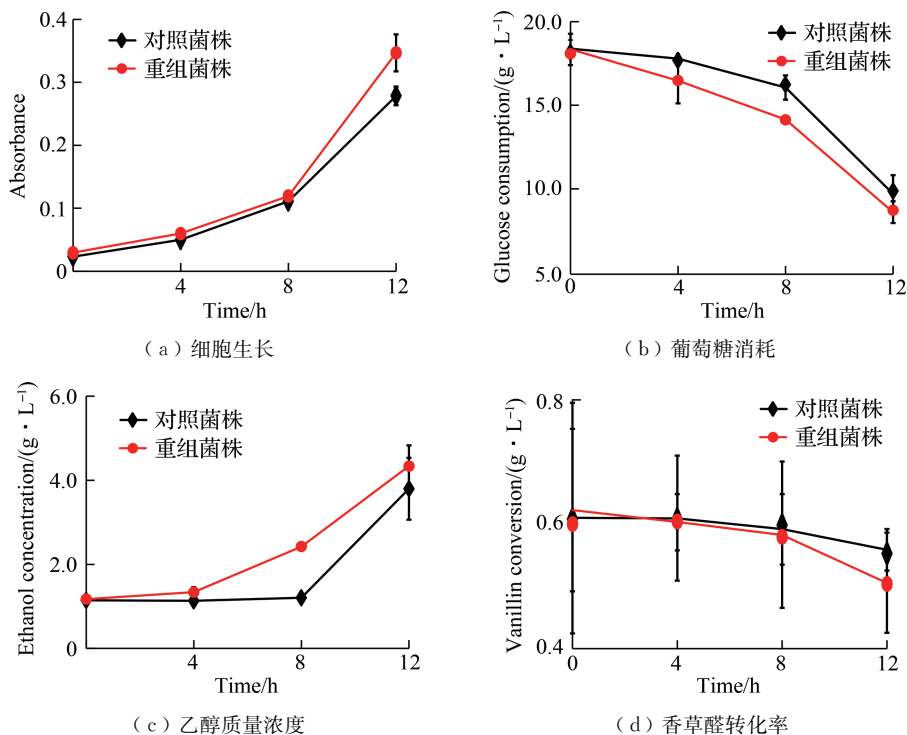


图 6 重组运动发酵单胞菌在香草醛胁迫下的乙醇发酵能力

Fig.6 Ethanol fermentability of the recombinant *Z. mobilis* ZM4 strains under the stress of vanillin

图 7 显示了重组运动发酵单胞菌在不添加酚醛条件下的乙醇发酵能力。重组菌株在 4, 8 h 的细胞生长较对照组提高了 32.2% 和 22.6%, 葡萄糖消耗增加了 33.0% 和 24.1%, 乙醇质量浓度提高了 2.4% 和 10.5%。可见, *ZMO0493* 过量表达可以提高运动发酵单胞菌的乙醇发酵能力。谷氨酰胺合成酶是氮代谢的主要催化酶类, 在生物生长和发育过程中控制氮循环^[31-34]。研究发现, 抑制谷氨酰胺合成酶会破坏光合成和光呼吸, 甚至会使生物体内的活性氧显著积累^[35-36]。谷氨酰胺合成酶与粟酒裂殖酵母 (*Schizosac-*

charomyces pombe) 和巢状曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的生长和发育有关^[37-38], 还与赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*) 的初级和次级代谢产物的合成有关^[39]。研究推测, *ZMO0493* 过量表达很可能是通过促进运动发酵单胞菌的生长提高乙醇的积累。

研究也表明基因 *ZMO1116*^[12], *ZMO1885*^[12], *ZMO1721*^[21], *PP_2680*^[20], *ZMO1288*^[12] 和 *ZMO1162*^[22] 表达后对运动发酵单胞菌的酚醛转化和乙醇积累的促进效果比 *ZMO0493* 强。

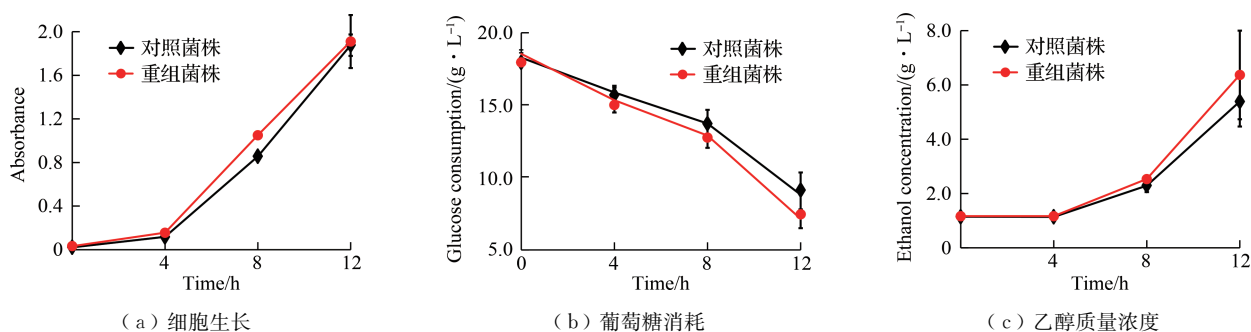
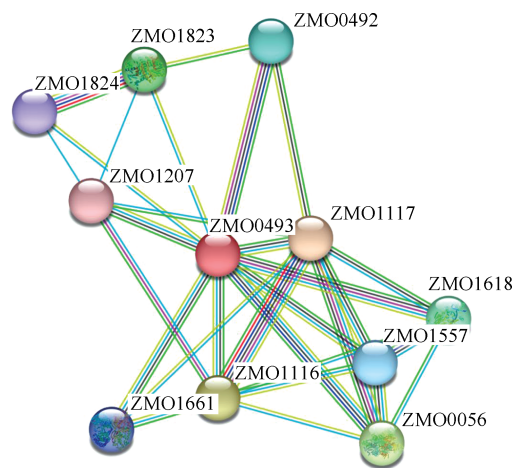


图 7 重组运动发酵单胞菌的乙醇发酵能力

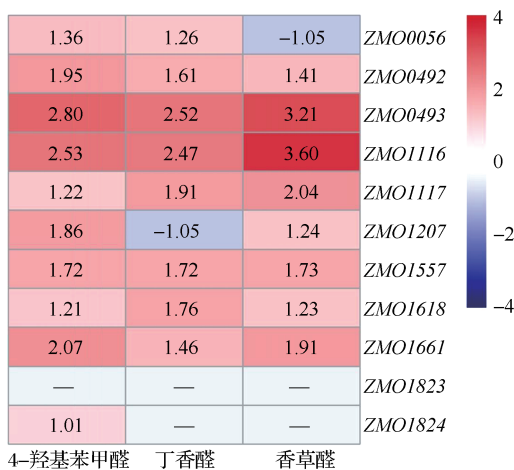
Fig.7 Ethanol fermentability of the recombinant *Z. mobilis* ZM4 strains

2.4 蛋白互作网络分析

用 String 软件进一步分析了运动发酵单胞菌谷氨酰胺合成酶 ZMO0493 蛋白的显著相关性(图 8)。其中,红色和蓝色线分别代表正相关和负相关,红色和绿色分别指上调和下调基因。图 8 (a)表明,ZMO0493 蛋白与 ZMO0056 蛋白,ZMO0492 蛋白,ZMO1116 蛋白,ZMO1117 蛋白,ZMO1207 蛋白,ZMO1557 蛋白,ZMO1618 蛋白,ZMO1661 蛋白,ZMO1823 蛋白和 ZMO1824 蛋白显著相关。图 8 (a) 互作蛋白的基因转录情况如图 8 (b) 所示。由图 8 (b) 可以看出,在以上与 ZMO0493 互作的蛋白中,酚醛胁迫下的互作蛋白 ZMO1116 在 4-羟基苯甲



(a) ZMO0493 蛋白互作网络



(b) 酚醛胁迫下相关基因转录情况

图 8 ZMO0493 蛋白的显著相关性分析
Fig.8 Significant correlation analysis of ZMO0493 protein

醛、丁香醛和香草醛胁迫下的基因转录分别显著差异上调了 2.53, 2.47 和 3.60 倍。通过蛋白互作结果分析,推测谷氨酰胺合成酶 ZMO0493 在酚醛胁迫下起作用,可能是因为它参与了运动发酵单胞菌的酚醛转化过程。以氧化还原酶编码基因 ZMO1116 为例,研究已确认其能够促进酚醛转化和乙醇积累^[12],因此通过 ZMO0493 蛋白显著相关性分析,即可初步建立 ZMO0493 蛋白与 ZMO1116 蛋白的互作关系。ZMO0493 蛋白与 ZMO1116 蛋白及互作网络中其他蛋白的相互作用关系,也是今后的研究内容之一。

3 结 论

首次发现 I 型谷氨酰胺合成酶与生物炼制菌株的酚醛耐受有关。ZMO0493 过量表达提高了运动发酵单胞菌的酚醛耐受和乙醇发酵能力。而且,谷氨酰胺合成酶 ZMO0493 与氧化还原酶和氨基转移酶显著相关。研究可为酚醛耐受运动发酵单胞菌的理性改造提供新的合成酶候选基因,也可为其在乙醇燃料工业化领域的应用提供参考数据。

参考文献:

[1] NARRON R H, KIM H, CHANG H M, et al. Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 39-46.

[2] CANTERO D, JARA R, NAVARRETE A, et al. Pretreatment processes of biomass for biorefineries: current status and prospects[J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2019, 10: 289-310.

[3] 徐忠, 宁艳春, 严生虎, 等. 磷酸钠组合氧气预处理提高玉米秸秆酶解糖化效率[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(3): 65-74.

[4] HE J L, LIU X Y, XIA J, et al. One-step utilization of non-detoxified pretreated lignocellulose for enhanced cellulolytic enzyme production using recombinant *Trichoderma reesei* RUT C30 carrying alcohol dehydrogenase and nicotinate phosphoribosyltransferase [J]. Bioresource Technology, 2020, 310: 123458.

- [5] LI Y, QI B K, WAN Y H. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 324-330.
- [6] FRANDEN M A, PILATH H M, MOHAGHEGHI A, et al. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 99-105.
- [7] DU J, LIANG J R, ZHANG X J, et al. Identifying the negative cooperation between major inhibitors of cellulase activity and minimizing their inhibitory potential during hydrolysis of acid-pretreated corn stover [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126113.
- [8] ZHENG D Q, JIN X N, ZHANG K, et al. Novel strategy to improve vanillin tolerance and ethanol fermentation performances of *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 231: 53-58.
- [9] HACSAHIOGLU B, HOLYAVKIN C, TOPALOGLU A, et al. Genomic and transcriptomic analysis of a coniferyl aldehyde-resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by evolutionary engineering [J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(3): 21-27.
- [10] YAN Z, ZHANG J, BAO J. Increasing cellulosic ethanol production by enhancing phenolic tolerance of *Zymomonas mobilis* in adaptive evolution [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124926.
- [11] LIU H H, ZHANG J, YUAN J, et al. Gene coexpression network analysis reveals a novel metabolic mechanism of *Clostridium acetobutylicum* responding to phenolic inhibitors from lignocellulosic hydrolysates [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 163-169.
- [12] YI X, GU H Q, GAO Q Q, et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 153-157.
- [13] LIANG Z Z, WANG X N, BAO X M, et al. Newly identified genes contribute to vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 503-516.
- [14] CAO W Y, ZHAO W Q, YANG B L, et al. Proteomic analysis revealed the roles of *YRR1* deletion in enhancing the vanillin resistance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 142.
- [15] ZHAO W Q, WANG X N, YANG B L, et al. Unravel the regulatory mechanism of *YRR1p* phosphorylation in response to vanillin stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 48.
- [16] XIA J, YANG Y F, LIU C G, et al. Engineering *Zymomonas mobilis* for robust cellulosic ethanol production [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(9): 960-972.
- [17] YANG S H, FEI Q, ZHANG Y P, et al. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals [J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(6): 699-717.
- [18] GU H Q, ZHANG J, BAO J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corn-cob residue [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(9): 1770-1782.
- [19] YANG S H, PELLETIER D A, LU T Y S, et al. The *Zymomonas mobilis* regulator contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors [J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 135-141.
- [20] YI X, GAO Q Q, BAO J. Expressing an oxidative dehydrogenase gene in ethanologenic strain *Zymomonas mobilis* promotes the cellulosic ethanol fermentability [J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 303: 1-7.
- [21] YI X, MEI J, LIN L, et al. Overexpression of dioxygenase encoding gene accelerates the phenolic aldehyde conversion and ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(9): 3017-3027.
- [22] YI X, WU J F, JIANG H, et al. Kinase expression enhances phenolic aldehydes conversion and ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(8): 1319-1329.
- [23] WANG S, LIN R X, TUMUKUNDE E, et al. Glutamine synthetase contributes to the regulation of growth, conidiation, sclerotia development, and resistance to oxidative stress in the fungus *Aspergillus flavus* [J]. *Toxins*, 2022, 14(12): 822-829.
- [24] LI X, WANG S D, ZHANG M Z, et al. Glutamine

- synthetase (GS) deficiency can affect ammonia tolerance of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 126: 104-112.
- [25] LEE H J, ABDULA S E, JANG D W, et al. Overexpression of the glutamine synthetase gene modulates oxidative stress response in rice after exposure to cadmium stress[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32 (10): 1521-1529.
- [26] NAGY Z, NÉMETH E, GUÓTH A, et al. Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat; glutamine synthetase isoenzymes and rubisco [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 67: 48-54.
- [27] DONG H W, BAO J, RYU D D Y, et al. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(7): 1616-1627.
- [28] DONG H W, FAN L Q, LUO Z C, et al. Improvement of ethanol productivity and energy efficiency by degradation of inhibitors using recombinant *Zymomonas mobilis* (pHW20a-*fdh*) [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(9): 2395-2404.
- [29] GONG C J, YOU X H, ZHANG S Y, et al. Functional analysis of a glutamine biosynthesis protein from a psychrotrophic bacterium, *Cryobacterium soli* GCJ02 [J]. Indian Journal of Microbiology, 2020, 60(2): 153-159.
- [30] ZHANG Y, LI B Z, LUO P, et al. Glutamine synthetase plays an important role in ammonium tolerance of *Myriophyllum aquaticum* [J]. The Science of the Total Environment, 2022, 848: 157596.
- [31] KICHEY T, LE GOUIS J, SANGWAN B, et al. Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat [J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 46(6): 964-974.
- [32] TRAVIS B A, PECK J V, SALINAS R, et al. Molecular dissection of the glutamine synthetase-GlnR nitrogen regulatory circuitry in gram-positive bacteria [J]. Nature Communications, 2022, 13 (1): 3793-3799.
- [33] CUI G X, MI J N, MORET A, et al. A carbon-nitrogen negative feedback loop underlies the repeated evolution of cnidarian-symbiodiniaceae symbioses [J]. Nature Communications, 2023, 14 (1): 6949-6955.
- [34] HACHIYA T, INABA J, WAKAZAKI M, et al. Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 4944-4951.
- [35] TAKANO H K, BEFFA R, PRESTON C, et al. A novel insight into the mode of action of glufosinate: how reactive oxygen species are formed [J]. Photosynthesis Research, 2020, 144(3): 361-372.
- [36] GAO Y J, DE BANG T C, SCHJOERRING J K. Cisgenic overexpression of cytosolic glutamine synthetase improves nitrogen utilization efficiency in barley and prevents grain protein decline under elevated CO₂ [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(7): 1209-1221.
- [37] MARGELIS S, D'SOUZA C, SMALL A J, et al. Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(20): 5826-5833.
- [38] SASAKI Y, KOJIMA A, SHIBATA Y, et al. Filamentous invasive growth of mutants of the genes encoding ammonia-metabolizing enzymes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186028.
- [39] TEICHERT S, SCHÖNIG B, RICHTER S, et al. Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism [J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(6): 1661-1675.

(责任编辑:周安迪)