

# 酿酒酵母乙醇耐性的分子机制及基因工程改造

张秋美, 赵心清, 姜如娇, 李倩, 白凤武

大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116024

**摘 要:** 提高工业微生物对毒性代谢产物及高温等环境胁迫因素的耐受性对工业生产具有重要的意义。发酵过程中产生的乙醇对酵母细胞的生长和代谢都具有较强的抑制作用, 是酿酒酵母的重要环境胁迫因素之一。对酿酒酵母乙醇耐性的分子机制的研究可为选育具有较强乙醇耐受性的酵母菌种提供理论基础。近年来, 通过细胞全局基因转录分析和基因功能分析, 对酿酒酵母乙醇耐性的分子机制有了更多新的认识, 揭示了很多新的与乙醇耐性相关的基因, 并在此基础上, 通过对相关基因进行过量表达或敲除, 成功提高了酵母菌的乙醇耐性。以下综述了近年来酵母菌乙醇耐性的生物化学与分子生物学机制的研究进展, 以及构建具有较高乙醇耐性的酵母菌的基因工程操作。这些研究不仅加深了对酿酒酵母乙醇耐性的机理认识, 也可为高效进行生物转化生产生物质能源奠定理论基础。

**关键词:** 乙醇耐性, 乙醇发酵, 基因工程改造, 分子机制, 酿酒酵母

## Ethanol tolerance in yeast: molecular mechanisms and genetic engineering

Qiumei Zhang, Xinqing Zhao, Rujiao Jiang, Qian Li, and Fengwu Bai

Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

**Abstract:** Improvement of stress tolerance to various adverse environmental conditions (such as toxic products, high temperature) of the industrial microorganisms is important for industrial applications. Ethanol produced by yeast fermentation is inhibitory to both yeast cell growth and metabolisms, and consequently is one of the key stress elements of brewer's yeast. Research on the biochemical and molecular mechanism of the tolerance of yeast can provide basis for breeding of yeast strain with improved ethanol tolerance. In recent years, employing global gene transcriptional analysis and functional analysis, new knowledge on the biochemical and molecular mechanisms of yeast ethanol tolerance has been accumulated, and novel genes and biochemical parameters related to ethanol tolerance have been revealed. Based on these studies, the overexpression and/or disruption of the related genes have successfully resulted in the breeding of new yeast strains with improved ethanol tolerance. This paper reviewed the recent research progress on the molecular mechanism of yeast ethanol tolerance, as well as the genetic engineering manipulations to improve yeast ethanol tolerance. The studies reviewed here not only deepened our knowledge on yeast ethanol tolerance, but also provided basis for more efficient bioconversion for bio-energy production.

**Keywords:** ethanol tolerance, ethanol fermentation, genetic engineering, molecular mechanism, *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是重要的工业微生物, 其对环境胁迫因素的反应一直是国内

**Received:** November 17, 2008; **Accepted:** January 5, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30500011).

**Corresponding author:** Xinqing Zhao. Tel: +86-411-84707617; E-mail: xqzhao@dlut.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30500011)资助。

外学者研究的重点<sup>[1,2]</sup>,提高酿酒酵母对环境胁迫因素的耐受性对食品、酿酒等工业的生产具有重要的意义。近年来,以燃料乙醇为代表的生物质能源生产在国内外均成为热点,其中燃料乙醇作为可再生的清洁能源,已经率先实现大规模工业化生产和应用。然而,发酵终点高浓度的乙醇对酵母细胞生长和乙醇发酵具有强烈抑制作用,而提高酵母菌的乙醇耐受性可以保证酵母菌发酵过程中较好的细胞活性和较高的发酵性能,因此酵母菌的乙醇耐受性重新成为世界范围内的研究热点。人们对酵母菌乙醇耐受性的生物化学和分子生物学机理进行了进一步的研究,发现了很多新的与乙醇耐受性相关的基因,并在此基础上进行了相应的遗传工程操作,成功提高了酵母菌的乙醇耐受性。以下着重介绍近年来酵母菌乙醇耐受性的分子机理和相关的基因工程改造。

## 1 乙醇耐受性的分子机制

酵母菌的乙醇耐受性受多基因控制<sup>[3,4]</sup>,这与乙醇表现出对酵母菌的多方位抑制和毒害作用是相吻合的。通过观察在含有 7%和 10%乙醇的培养基上酵母单基因突变体的生长的方法来鉴别与乙醇耐受能力相关的基因<sup>[5,6]</sup>,得到的与乙醇耐受性相关的基因数目分别为 46 个和 137 个,而所揭示的基因在两个报道中不完全一致。早期利用酵母在乙醇短暂冲击后的基因芯片分析研究与乙醇耐受性相关的基因也有报道<sup>[7]</sup>,但与单基因突变体实验所得的结果也不一致。以上研究结果提示了酵母菌乙醇耐受性分子机制的复杂性。酵母菌的乙醇耐受性可能与其遗传背景有关,而且也与检测方法及乙醇胁迫的程度有关。最新的研究结果除了肯定以往的结果以外,还发现了一些新的与酵母菌的乙醇耐受性相关的分子机制。以下主要介绍与酵母菌乙醇耐受性相关的分子机制的最新研究进展。

### 1.1 热休克蛋白和海藻糖相关基因与乙醇耐受性

酵母菌的耐乙醇性能与热休克蛋白(Heat shock protein)和海藻糖的合成有关<sup>[7-9]</sup>。Alexandre 等<sup>[7]</sup>报道了酿酒酵母在含有 7%(V/V)乙醇的培养基中处理 30 min 后,细胞全局的基因转录分析;后续的另一项研究<sup>[8]</sup>报道了酿酒酵母在加入 5%(V/V)乙醇的培养基中好氧培养的基因微阵列分析。两者的分析结果均表明,热休克蛋白基因 *Hsp104*、*Hsp26*、*Hsp30*、

*Hsp70* 和 *Hsp12* 在乙醇胁迫下转录水平提高幅度较大。值得指出的是,Alexandre 等的基因芯片研究结果首次揭示了乙醇可诱导 *HSP70* 家族基因(*SSA1*、*SSA2*、*SSA3*、*SSA4* 和 *SSE1*)的表达<sup>[7]</sup>。在此之前,Sanchez 等<sup>[10]</sup>和 Sales 等<sup>[11]</sup>利用缺失突变体实验已经证实了 *Hsp104p* 和 *Hsp12p* 可以直接影响酿酒酵母的乙醇耐受性: Sanchez 等测试了 *Δhsp104* 突变体的乙醇耐受性与亲本菌株的差别,结果证明热诱导后,亲本菌株可耐受 20%的乙醇,而突变株则不能承受该乙醇浓度; Sales 等发现 *Δhsp12* 缺失突变体在 10%~12%的乙醇中 24 h 的生长速度小于野生型,而其他热休克蛋白虽然在乙醇胁迫下表达量增加,但它们的缺失突变体是否对酵母细胞的乙醇耐受性产生直接作用尚不清楚。

海藻糖合成相关基因 *TPS1*、*TPS2* 和 *TSL1* 在乙醇胁迫下转录水平提高<sup>[7]</sup>,与之前报道的乙醇胁迫诱导海藻糖积累的结果一致<sup>[12]</sup>。海藻糖合成酶基因 *TPS1* 的突变体在进行热处理后<sup>[13]</sup>,对热激和乙醇的耐受性明显降低,显示了海藻糖合成酶基因对乙醇耐受性的重要性。Jung 等<sup>[14]</sup>利用反义 RNA 技术干扰酸性海藻糖酶基因(*ATH1*)在酿酒酵母细胞内的表达,降低了酸性海藻糖酶基因的表达量及酸性海藻糖酶活性,结果发现酿酒酵母发酵性能有所提高;在含有 30% (W/V)葡萄糖的 YPD 培养基中,发酵时间由 88 h 缩短为 44 h,并且在 8% (V/V)的乙醇浓度下存活率明显提高,大约为对照组(未进行反义 RNA 干扰处理)的 1.5 倍。此外,作者对自絮凝酵母 SPSC01 的乙醇耐受性生化机制的研究结果也表明了海藻糖的积累与乙醇耐受性具有相关性<sup>[15]</sup>。然而值得指出的是,也有研究报道海藻糖的积累与乙醇耐受性无关<sup>[16]</sup>,这种不一致的结果是否与酵母菌不同菌种的遗传背景相关尚不清楚。

### 1.2 细胞能量代谢相关基因与乙醇耐受性

Alexandre 等<sup>[7]</sup>和 Chandler 等<sup>[8]</sup>确定了糖酵解相关基因 *GLK1*、*HXK1*、*TDH1*、*ALD4* 和 *PGM* 的转录水平也在乙醇胁迫后得到提高。Alexandre 还同时发现了其他与产能相关的基因(*GPD1*、*HOR2*、*GRE3*、*HOR7* 和 *DAK1*)也存在受到乙醇胁迫时表达量增加的现象<sup>[7]</sup>。在最新的报道中,对 *S. cerevisiae* 发酵过程中细胞内及发酵液中 ATP、ADP 和 AMP 浓度的检测表明,在乙醇发酵过程中,能荷

{adenylate energy charge, EC,  $EC = ([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ }}的维持依赖于葡萄糖的主动运输, 反之, 葡萄糖的主动运输也依赖于能荷的维持。当发酵液中的葡萄糖浓度很低, 不能维持细胞的能荷时, 细胞活性将急剧下降, 说明了细胞能量代谢与乙醇耐性的重要关系<sup>[17]</sup>。这些研究也提示, 在发酵过程中循环使用酵母的时候, 需要考虑酵母细胞的能荷状态, 发酵后期酵母细胞的能荷很低, 只有发酵早期的酵母适合循环使用。

### 1.3 氨基酸合成及转运相关基因与乙醇耐性

Shioya 等<sup>[18]</sup>的 Microarray 分析结果表明, 在乙醇耐性高的 Sake 酵母中, 色氨酸合成途径相关的基因表达量较高。进一步研究表明, 色氨酸合成酶基因(*TRP2* 和 *TRP5*)和色氨酸透性酶基因(*TAT2*)的过量表达可以有效赋予酵母细胞良好的乙醇耐性。向含有 5%乙醇的培养基里添加 100  $\mu\text{g/mL}$  色氨酸后, 细胞的生长速率明显提高, 这说明色氨酸的添加也是赋予酵母细胞乙醇耐性的有效途径。本实验室的早期研究结果表明, 向培养基中添加异亮氨酸(1.0 g/L)、甲硫氨酸(0.5 g/L)和苯丙氨酸(2.0 g/L)时, 自絮凝酵母 SPSC01 于 30°C 在 20%(V/V)乙醇冲击下的存活率得到明显提高, 其中添加氨基酸混合液的实验组存活率为 57%, 而对照组为 0, 表明添加氨基酸能显著提高菌体的耐乙醇能力<sup>[19]</sup>。

日本学者 Sekine 等<sup>[20]</sup>发现编码酿酒酵母 $\gamma$ -谷氨酰蛋白激酶的基因 *PRO1* 的点突变(D154N)导致细胞对脯氨酸的反馈抑制减弱而过度积累脯氨酸, 同时这种酵母突变体的乙醇耐性提高, 显示了胞内较高的脯氨酸含量对提高酵母细胞乙醇耐受性起到一定作用。通过易错 PCR 得到了 *PRO1* 的突变体文库, 得到了更多由于 *PRO1* 基因突变而导致脯氨酸反馈抑制不敏感的突变体, 同时发现, 敲除 *PUT1* 基因(与脯氨酸的分解利用有关), 并替换野生型的 *PRO1* 为突变型的 *PRO1*, 所得到的突变体细胞内脯氨酸含量比对照高 5 倍, 同时乙醇耐性得到提高<sup>[20]</sup>。

Btn2p 负责酿酒酵母胞内蛋白转运, 与氨基酸的运输、pH 调节和离子平衡有关。敲除 *BTN2* 基因导致酿酒酵母对高乙醇浓度耐性的降低, 而这种缺陷可以通过在培养基里补充精氨酸、赖氨酸和谷氨酸来克服<sup>[21]</sup>, 显示了氨基酸的动态平衡与乙醇耐性的相关性。

### 1.4 细胞壁及细胞质膜成分合成基因与乙醇耐性

Yazawa 等<sup>[22]</sup>通过筛选酿酒酵母二倍体纯合子的缺失突变体库(购买于 Invitrogen), 筛选到 2 个单基因缺失的突变体 *ΔURA7* 和 *ΔGAL6*, 其在含 8%(V/V)乙醇的培养基中的生长速度明显高于野生型。*URA7* 编码 CTP 合成酶, 负责磷脂的生物合成及嘧啶的从头合成。*GAL6* 编码氨基肽酶, 属于半胱氨酸蛋白酶家族。这 2 种缺失突变体均对细胞壁溶解酶( $\beta$ -1,3-葡聚糖酶)的抗性增强, 说明了细胞壁的完整性与其乙醇耐性相关。这 2 种突变体对白色荧光染料 Calcofluor (CFW)的敏感性不同, 由于 CFW 抑制细胞壁的合成, 说明这 2 种突变体内细胞壁完整性的改变机制是不同的。作者推测, *ΔURA7* 的乙醇耐性提高与 *URA7* 参与磷脂的合成有关, 而根据以往的报道, *ΔGAL6* 中热击蛋白基因 *HSP12* 和 *HSP26* 的转录水平分别提高 43 倍和 33 倍, 这可能是该突变体乙醇耐性提高的原因。

酿酒酵母的去饱和酶基因 *OLE1* 编码位于细胞质膜上的去饱和酶, 这种酶可以通过氧化作用和依赖 NADH 的去饱和过程催化酵母细胞的棕榈酸和硬脂酸转化为棕榈油酸和油酸。You 等<sup>[23]</sup>用昆虫的膜去饱和酶基因 *ThiNPVE* 对 *OLE1* 基因的突变体进行互补, 由于昆虫的这个酶基因具有立体选择性和底物链长特异性, 互补菌株的膜脂肪酸饱和度得到了定向的改变。研究结果表明, 油酸是使酿酒酵母具有乙醇耐性的有效不饱和脂肪酸, 表达昆虫去饱和酶基因的转化子乙醇耐性最强, 这个转化子在不含乙醇的 YPD 液体培养基中培养至对数后期时油酸产量是棕榈酸的 2 倍, 在含有 5%(V/V)乙醇的 YPD 液体培养基中油酸和棕榈酸产量的比例提高了 4 倍, 说明了油酸在乙醇耐性中的重要作用, 以及通过对细胞油酸合成的定向改造可以提高乙醇耐性。此研究结果与早期在酿酒酵母中过量表达拟南芥脂肪酸去饱和酶 *FAD2* 后乙醇耐性明显提高的研究相符<sup>[24]</sup>。

本实验室在对批式流加发酵的自絮凝酵母 SPSC01 进行乙醇耐性的生化机制研究过程中, 发现油酸与絮凝酵母的乙醇耐性不存在显著的相关性, 棕榈油酸和棕榈酸与絮凝酵母的乙醇耐性存在一定相关性, 而硬脂酸与絮凝酵母的乙醇耐性存在显著的相关性<sup>[25]</sup>, 这与早期在摇瓶培养过程中发现棕榈酸增强絮凝酵母耐乙醇性能的结论不一致, 体现了

培养条件的不同对酵母细胞生理特性的影响, 显示了环境条件对乙醇耐性分子机制研究的重要性。

### 1.5 糖转运蛋白与乙醇耐性

Santos 等<sup>[26]</sup>的研究发现, 乙醇强烈抑制葡萄糖的转运, 而且这种抑制似乎与遗传背景无关, 因为测试的 7 种酵母都得到了同样的结果。但是抑制程度的不同直接影响了发酵效率, 抑制程度在 50% 以下的酵母能更有效的发酵, 而抑制程度大于等于 50% 的酵母菌种在同样的时间内不能完成发酵。这暗示着乙醇的耐性可能与糖的转运以及糖转运蛋白对乙醇的耐受性有关<sup>[26]</sup>。研究结果发现, 不同的酵母在乙醇存在下对葡萄糖的运输能力不同, 显示了质膜转运蛋白对乙醇的耐性不同。可以设想, 如果提高质膜转运蛋白对乙醇的耐性, 则可以保证足够的葡萄糖运输入细胞内, 从而保证细胞在乙醇存在时的活性。Alexandre 等<sup>[7]</sup>和 Chandler 等<sup>[8]</sup>确定了高亲和力己糖转运蛋白基因 *HXT6* 和 *HXT7* 的转录水平在乙醇胁迫后得到提高。这些研究结果表明了葡萄糖转运蛋白对酿酒酵母乙醇耐受性的作用, 提示了可通过对葡萄糖转运蛋白的改造提高酿酒酵母的乙醇耐性。然而酵母细胞存在多种葡萄糖转运蛋白<sup>[27]</sup>, 目前对这些转运蛋白和乙醇胁迫的关系

还很不清楚。

### 1.6 其他

Du 和 Takagi<sup>[28]</sup>发现 N-乙酰转移酶 Mpr1 能够降低酿酒酵母胞内的活性氧分子水平, 保护细胞在各种胁迫环境下的活性, 如氧化胁迫、热胁迫、冻融等。*MPR1* 和 *MPR2* 的缺失突变体对乙醇胁迫高度敏感, 而 *MPR1* 在酵母细胞内的表达可以使酵母细胞获得乙醇耐受性。该研究还发现, 当酵母细胞暴露于乙醇中时, 其活性氧分子浓度提高, 提示 Mpr1 可通过降低酵母细胞的活性氧分子浓度保护细胞免受乙醇的毒害。此外, Voorst 等<sup>[5]</sup>和 Betz 等<sup>[29]</sup>的研究表明, Asr1p (Alcohol sensitive ring/PHD finger 1 protein) 也可能与乙醇耐受性有关。这种蛋白质在细胞核和细胞质之间穿梭, 但当细胞暴露于乙醇中时, Asr1p 则会积聚在细胞核中。而且 Asr1p 只有当受到乙醇胁迫时才会在细胞核中积累, 其他胁迫条件, 如氧化、渗透、养分限制和热胁迫<sup>[29]</sup>都不会使得 Asr1p 积累。推测在乙醇胁迫下, Asr1p 在核内积累的原因可能是核输入加强或核输出受到抑制, 同时 Asr1p 可能参与一个复杂的信号转导途径, 使酵母适应乙醇胁迫。表 1 总结了近年来报道的与乙醇耐性相关的主要基因。

表 1 近年报道的酵母乙醇耐性相关的基因

Table 1 Ethanol tolerance-related genes in yeast reported in recent years

Gene	Gene product and function	Functional analysis
<i>Hsp12</i> <i>TPS1</i>	Heat shock protein protecting membranes from desiccation	<i>Ahsp12</i> grew slower than wild type yeast under 10%–12% ethanol
<i>TPS2</i> <i>TSL1</i>	Synthase subunit of trehalose synthase/phosphatase complex	Transcription level improved under ethanol shock
<i>ATH1</i> <i>HXT6</i> <i>HXT7</i>	Acid trehalase required for utilization of extracellular trehalose Glucose transporter of the major facilitator superfamily	Decreased transcription of <i>ATH1</i> improved ethanol tolerance The expression level improved after ethanol shock
<i>TRP2</i> <i>TRP5</i> <i>TAT2</i>	Anthranilate synthase, catalyzes the initial step of tryptophan biosynthesis Tryptophan synthase involved in tryptophan biosynthesis Tryptophan and tyrosine permease	The overexpression of tryptophan biosynthesis and tyrosine permease conferred yeast cells ethanol tolerance
<i>PRO1</i> <i>PUT1</i> <i>URA7</i> <i>GAL6</i>	Gamma-glutamyl kinase, catalyzes the first step in proline biosynthesis Proline oxidase CTP synthase isozyme involved in phospholipid biosynthesis Cysteine aminopeptidase	Mutation of <i>PRO1</i> improved ethanol tolerance The ethanol tolerance <i>PUT1</i> mutant was improved Disruptant grew better in presence of ethanol Disruptant grew better in presence of ethanol
<i>Mpr1</i> <i>BTN2</i>	Acetyltransferase reducing intracellular ROS V-SNARE binding protein that facilitates specific protein retrieval from a late endosome to the Golgi; modulates arginine uptake	The null mutant of the <i>Mpr1</i> and <i>Mpr2</i> genes showed hypersensitivity to ethanol stress, and the expression of the <i>Mpr1</i> gene conferred stress tolerance The ethanol tolerance of <i>BTN2</i> mutant reduced

## 2 提高乙醇耐性的代谢工程操作

乙醇耐性与很多基因有关, 虽然上述谈到的一些单基因操作提高了乙醇耐性, 但更有效的提高乙醇耐性的手段应该是同时调节细胞内多种基因的表达。2006 年美国学者报道了成功提高乙醇耐性的代谢工程手段<sup>[30]</sup>。该研究结果利用易错 PCR 在 *SPT15* 基因引入突变建立基因组文库, 筛选到了乙醇耐性大大提高的突变体, 而且突变体的生长速度与野生型菌株相比也得到很大提高, 进一步的研究发现, 耐性提高的突变体中 *SPT15* 基因的 3 个点突变, 使其蛋白产物与另一个胁迫相关转录蛋白 SPT3 的结合体的形成受到影响。*SPT15* 是酵母菌 TATA-结合蛋白(TBP)复合体的成分, 是酵母细胞存活必需的转录因子, 具有 RNA 聚合酶 II 活性, 对其进行代谢工程操作可同时改变细胞内多个基因的转录水平, 这种新的代谢工程操作被称为全转录工程(Global transcriptional machinery engineering, gTME)。这个研究结果揭示了蛋白质-蛋白质相互作用的重要性, 是首次成功的提高乙醇耐性的代谢工程操作。

此外, 基因组改组也是短时间内迅速提高菌种特性的手段。对克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)的基因组改组工作获得了对乙醇、高温、冻融胁迫条件的耐性明显提高的突变株, 而且突变株的乙醇产量也得到提高<sup>[31]</sup>。最新报道的对酿酒酵母的基因组改组工作, 获得了可耐受 55°C 高温和耐受 25%(V/V)乙醇的突变体, 远远优于出发菌株(耐受 40°C 高温, 10%乙醇, V/V), 再次证明了基因组改组工作对乙醇耐性、高温耐性等复杂性状改造的有效性<sup>[32]</sup>。

## 3 存在问题和展望

除了乙醇的毒性, 酵母菌在工业生产中还受到许多其他胁迫因素的影响, 如高温、高渗透压等<sup>[1,2]</sup>, 本文主要集中在乙醇耐性的研究, 但是应该指出的是, 乙醇耐性与其他胁迫耐受性具有一定的联系<sup>[1,2]</sup>, 如海藻糖的积累还与氧化胁迫<sup>[33]</sup>、渗透胁迫<sup>[34]</sup>等多种胁迫因素有关, 对 Mpr1 的研究也提示了活性氧分子水平与乙醇耐性的关系<sup>[28]</sup>。研究乙醇耐性的同时应该同时关注对其他耐性条件的影响。在提高乙

醇耐性的基因工程操作中, 也要注意对酵母细胞发酵的影响, 因为提高耐性的最终目标是提高酵母菌的生物转化效率。在对脯氨酸的合成基因进行遗传操作过程中发现酵母菌的乙醇耐性提高, 而发酵性能不变<sup>[20]</sup>; 利用全转录工程进行代谢工程操作所得到的突变体酵母生长速度明显大于野生型, 而且在乙醇耐性提高的同时乙醇的产量也得到提高<sup>[30]</sup>, 提示了通过基因工程方法提高乙醇耐性的同时, 对细胞的发酵性能的影响可能是多方面的。选育对多种环境胁迫因素具有较强耐性的工业酵母, 需要对酵母菌多种胁迫因素的分子机制获得更为深刻的认识。

乙醇耐性的分子机制研究已经开展多年, 但是依然不断有新的相关基因被发现, 一方面这些结果显示了细胞内代谢途径之间的相关性, 同时也强调了不同的培养条件及遗传背景下乙醇耐性分子机制的多样性。目前很多学者利用细胞全基因转录组学分析研究酵母菌的乙醇耐性, 这些组学研究为揭示酵母菌的乙醇耐性机制提供了新的信息, 但是组学研究不能区分发生变化的基因与乙醇耐性的因果关系, 基因的转录水平或者蛋白表达水平的变化可能是乙醇胁迫下细胞的被动反应, 而不是乙醇耐性提高的原因。值得指出的是, 在基因芯片研究中变化不大或者没有变化的基因不一定与乙醇耐性无关, 如上述提到的 *Btn2p* 基因, 在 7%乙醇冲击实验室菌株后进行的基因芯片分析中表达量没有增加, 而且其单基因缺失突变体在乙醇培养基中的生长也没有受到影响, 但是实验证明这个基因与乙醇耐性和生物膜形成相关, 提示了酵母菌乙醇耐性的复杂性, 强调了研究酵母菌的乙醇耐性需要结合多种实验分析手段来进行。

全转录工程的成功为提高酵母菌乙醇耐性的代谢工程操作提供了新的思路<sup>[30]</sup>。随着基因组学和蛋白组学等分析方法及细胞代谢工程操作手段的进一步发展, 对酵母菌乙醇耐性的分子机制的研究以及理性的基因工程操作将得到进一步的深入和提高。未来更多相关基因信息的获得, 将使人们更有效地控制酵母菌的乙醇耐性和对其他胁迫因素的耐受性, 提高乙醇发酵的效率和发酵终点乙醇浓度, 进一步提高生物转化生产生物能源的效率。

## REFERENCES

- [1] Attfield PV. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 1351–1357.
- [2] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, *et al*. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, **31**: 535–569.
- [3] Amore DT, Panchal CJ, Russell I. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit Rev Biotechnol*, 1990, **9**: 287–304.
- [4] Jimenez J, Benitez T. Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeasts. *Curr Genet*, 1987, **12**: 421–428.
- [5] Voorst VF, Houghton LJ, Jonson L, *et al*. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast*, 2006, **23**: 351–359.
- [6] Fujita K, Matsuyama A, Kobayashi Y, *et al*. The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res*, 2006, **6**(5): 744–750.
- [7] Alexandre H, Ansanay GV, Dequin S, *et al*. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2001, **498**: 98–103.
- [8] Chandler M, Stanley GA, Rogers P, *et al*. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol*, 2004, **54**(4): 427–454.
- [9] Wu H, Zheng X, Araki Y, *et al*. Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 7353–7358.
- [10] Sanchez Y, Parsell DA, Taulien J, *et al*. Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 6484–6489.
- [11] Sales K, Brandt W, Rumbak E, *et al*. The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1463**: 267–278.
- [12] Lucero P, Penalver E, Moreno E, *et al*. Internal trehalose protects from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(10): 4456–4461.
- [13] Pereira MD, Eleutherio ECA, Panek AD. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol*, 2001, **1**: 11.
- [14] Jung YJ, Park HD. Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (ATH1) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 1855–1859.
- [15] Lei JJ, Zhao XQ, Bai FW, *et al*. Influence of floc size distribution on the ethanol tolerance of a self-flocculating yeast strain SPSC01. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(2): 309–314.
- 雷娟娟, 赵心清, 白凤武, 等. 絮凝颗粒粒度分布对自絮凝酵母 SPSC01 乙醇耐受能力的影响. *生物工程学报*, 2008, **24**(2): 309–314.
- [16] Lewis JG, Learmonth RP, Attfield PV, *et al*. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biot*, 1997, **18**: 30–36.
- [17] Guimaraes PM, Londesborough J. The adenylate energy charge and specific fermentation rate of brewer's yeasts fermenting high- and very high-gravity worts. *Yeast*, 2008, **25**(1): 47–58.
- [18] Shioya S, Hirasawa T, Yoshikawa K, *et al*. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J Biotechnol*, 2007, **131**(1): 34–44.
- [19] Hu CK, Bai FW, An LJ. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2005, **21**: 809–813.
- 胡纯铿, 白凤武, 安利佳. 膜蛋白氨基酸组成通过改变膜流动性影响粟酒裂殖酵母和酿酒酵母融合株耐酒精能力. *生物工程学报*, 2005, **21**: 809–813.
- [20] Sekine T, Kawaguchi A, Takagi H. Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* gamma-glutamyl-kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(12): 4011–4019.
- [21] Espinazo-Romeu M, Cantoral JM, Matallana E, *et al*. Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Res*, 2008, **8**(7): 1127–1136.
- [22] Yazawa H, Iwahashi H, Uemura H. Disruption of *URA7* and *GAL6* improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2007, **24**(7): 551–560.
- [23] You KM, Rosenfield CL, Knipple DC. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(3): 1499–1503.
- [24] Kajiwarra S, Shirai A, Fujii T, *et al*. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of ethanol tolerance and the *FAD2* gene from *Arabidopsis thaliana*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(12): 4309–4313.
- [25] Lei JJ, Zhao XQ, Ge XM, *et al*. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *J Biotechnol*, 2007, **131**: 270–275.
- [26] Santos J, Sousa MJ, Cardoso H, *et al*. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, 2008, **154**: 422–430.
- [27] Ozcan S, Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol R*, 1999, **63** (3): 554–569.
- [28] Du X, Takagi H. N-Acetyltransferase Mpr1 confers

- ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(6): 1343–1351.
- [29] Betz C, Schlenstedt G, Bailer SM. Asrlp, a novel yeast ring/PHD finger protein, signals stress to nucleus. *J Biochem*, 2004, **279**(27): 28174–28181.
- [30] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, *et al.* Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**: 1565–1568.
- [31] Wei P, Li Z, He P, *et al.* Genome shuffling in the ethanologenic yeast *Candida krusei* to improve acetic acid tolerance. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, **49**: 113–120.
- [32] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36**: 139–147.
- [33] Pedreno Y, Gimeno-Alcaniz JV, Matallana E, *et al.* Response to oxidative stress caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in trehalase genes. *Arch Microbiol*, 2002, **177**: 494–499.
- [34] Majara M, O'Connor-Cox ESC, Axcell BC. Trehalose—an osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high-gravity brewing. *J Am Soc Brew Chem*, 1996, **54**: 149–154.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 人干细胞培养（翻译版）

〔英〕R. I. 弗雷谢尼 〔英〕G. N. 斯泰赛

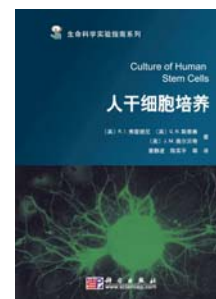
〔美〕J. M. 奥尔贝奇 著

章静波 陈实平等 译

978-7-03-023168-0 ¥68.00 2009年2月出版

本书是 R. Ian Freshney 主编的特殊细胞培养 (Culture of Specialized Cells) 系列丛书之一，旨在介绍近年来涌现出来的诸多干细胞培养方法中最有效和最灵敏的方法与技术。其中包括干细胞系的质量控制程序、胚胎干细胞系的获取与培养、胚胎干细胞 (ES) 和胚胎癌 (EC) 细胞的分化技术、ES 细胞的心肌细胞分化、生殖细胞谱系的培养、胚胎癌干细胞的获取和培养、脐带和脐带血干细胞的培养、骨髓中的多能干细胞、骨髓基质来源的间充质干/祖细胞的培养原则和鉴定、疏松结缔组织干/祖细胞的分离、鉴定和培养、角膜干细胞的培养、乳腺干细胞的培养以及脂肪干细胞的培养。本书每章有简明的导言，介绍背景知识及进展，然后详尽描述培养方法，其中包括培养基和试剂的准备，有的章节还推荐不同的方案供试用者选择，因此本书具有一定的权威性、实用性与时效性。

本书可供干细胞知识与应用相关领域的科研人员、临床医生、高等院校师生、生物工程人员参考。



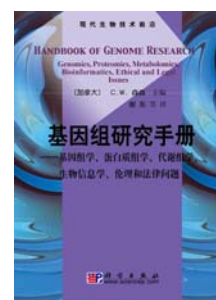
### 基因组研究手册——基因组学、蛋白质组学、代谢组学、生物信息学、伦理和法律问题（翻译版）

〔加拿大〕C.W. 森森 主编 谢东 等译

978-7-03-023119-2 ¥95.00 2009年3月出版

本书旨在为读者引入“组学”的各种基本概念，了解其基本内容，介绍各种常用的“组学”技术，并结合对实例的引用和阐述，展示“组学”的应用及前景。同时，就“组学”的迅猛发展所带来的社会伦理问题，进行了开放性的讨论。基于上述目的，本书分为4个部分：第一部分，关键的生物，对“组学”进行了概括介绍；第二部分，基因组和蛋白质组技术，结合应用实例，详细地介绍了基因组学和蛋白质组学的技术发展；第三部分，生物信息学，对这一在组学研究和应用中不可或缺的工具进行了细致全面的阐述；第四部分，伦理、法律和社会问题，归纳和展示了由“组学”的迅速发展所带来的不可避免的社会问题，并开展了多方面、多视角的讨论。

本书可供分子生物学、生物技术、医药卫生，以及生命科学领域相关科研、技术人员，研究生和高年级本科生参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>