

酿酒酵母乙醇耐受性机理研究进展

张穗生* 黄日波 周 兴 黎贞崇 黄志民

(广西科学院 广西 南宁 530003)

摘要: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)一直是主要的生物乙醇和酿酒业发酵菌株,具有发酵速度快、乙醇产量高特性。然而,产物乙醇积累造成的毒性效应是限制乙醇产量的主要因素之一,研究酿酒酵母乙醇耐受性为解决这一工业难题奠定了理论基础。本文从乙醇对酵母细胞生理、细胞结构和组分的影响,以及酿酒酵母乙醇耐受性的遗传基础方面综述了酿酒酵母乙醇耐受性机理的研究进展。

关键词: 酿酒酵母, 乙醇耐受性, 机理

Advances in Research on the Mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Tolerance

ZHANG Sui-Sheng* HUANG Ri-Bo ZHOU Xing LI Zhen-Chong HUANG Zhi-Min

(Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530003, China)

Abstract: The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is most widely used for producing bioethanol in alcoholic industry due to its higher ethanol yield and fermentation rate. However, the toxic effect of accumulated ethanol is one of the main factors, which limit high ethanol production. Thus, investigating the mechanisms of yeast ethanol tolerance will provide the basis for solving the industrial problem. This article reviewed the mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol tolerance focusing on its cell physiological behaviors, structure and biochemical composition, as well as its genetic basis.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Ethanol tolerance, Mechanism

乙醇是重要的生物能源产品、化工原料和饮用酒成分,粮食、糖类发酵法是生产乙醇的主要方法之一,利用非粮作物、制糖工业的副产品、农林业废物等原料生产燃料乙醇正成为潮流。酿酒酵母是乙醇生产的最常用的发酵菌株,具有发酵速度快、产乙醇浓度高的优良特性。然而,高浓度乙醇的毒性影响到酿酒酵母的生长、存活、发酵能力,进而限制了产物浓度的提高^[1]。对酿酒酵母乙醇进行筛

选、改造,提高其乙醇耐受性是解决这一难题的有效方法,此项工作需要以酿酒酵母乙醇耐受性机理为理论指导。出于研究手段局限,以往研究多集中于细胞生理、细胞结构、生化组分与酿酒酵母乙醇耐受性的关系。近年来,伴随着研究技术进步,尤其是分子生物学研究手段的运用,使对酿酒酵母乙醇耐受性机理研究深入到分子遗传学基础层次。研究为优良酿酒酵母菌株选育、燃料乙醇和酿酒业生产

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20666002); 广西科学院基本科研业务费项目(No. 08YJ16SW05)

*通讯作者: Tel: 86-771-2303999; ✉: zss99@vip.163.com

收稿日期: 2009-03-10; 接受日期: 2009-05-05

提升打下了基础,不仅可以增加发酵产物乙醇浓度,促进增产创收,还可以大大减少下游处理产物蒸馏费用,有利于节能环保^[2]。同时,由于发酵菌株在耐受有机溶剂方面具有共同的应激机制^[3],研究对新一代生物燃料生产也有借鉴作用,本文对酿酒酵母乙醇耐受性机理研究进展进行综述。

1 乙醇对酿酒酵母细胞生理的影响

发酵过程中,随着发酵液里的乙醇增加,乙醇对酿酒酵母的毒性增大,酿酒酵母受乙醇毒性影响所出现的生理变化主要是改变细胞形态和细胞生理活动。细胞形态变化体现为:乙醇造成细胞形态变化,细胞骨架出现疏散,细胞变大,使得发酵过程中对数生长中期的细胞大小比发酵初始菌株明显增大^[4]。细胞生理活动变化体现为:细胞周期延长;生长受到抑制,在一定乙醇浓度胁迫下,细胞不再生长,培养基加入 2%~10%(V/V)乙醇后,菌株生长速率会有不同程度的下降,5%~10%(V/V)乙醇强烈抑制大多数酿酒酵母菌株细胞生长,造成细胞明显生长迟缓、存活减少,当乙醇浓度高于细胞最大耐受浓度时,酿酒酵母迅速死亡,发酵能力削弱,发酵速度和产乙醇量下降;细胞呼吸被抑制、呼吸缺陷的小菌落突变体产生率高;选择性吸收物质能力降低,体现为质子跨膜移动梯度动力变小、膜的流动性和渗透性增加、对葡萄糖、葡萄糖胺、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钾等物质吸收速度和吸收量均降低^[5,6]。

2 乙醇耐受性与酿酒酵母的细胞结构和组分相关

运用生物化学、细胞生物学技术,探究酿酒酵母乙醇耐受性原因,发现其细胞结构、组分变化出现了规律变化,主要涉及线粒体结构完整性、细胞质膜组分和细胞内保护性物质变化。

2.1 线粒体结构完整性与酿酒酵母乙醇耐受性相关

线粒体是氧化代谢场所,与维持酿酒酵母的生长速度、发酵速度、呼吸率有关,线粒体丢失或线粒体膜结构不完整的菌株产生呼吸缺陷的小菌落突变体。用含有乙醇的培养基检测发现,乙醇耐受性

高的酿酒酵母菌株产生呼吸缺陷的小菌落突变体概率较低^[7],说明具有完整结构的线粒体对酿酒酵母耐受乙醇必不可少。

2.2 细胞质膜组分变化与酿酒酵母乙醇耐受性相关

质膜具有屏障作用,骨架为脂类双分子层,磷脂、糖脂、甾醇等是生物膜主要脂类,含有亲水基团(磷酸、胆碱、丝氨酸或乙醇胺等)和疏水端(大多是脂酰基),膜蛋白结合于脂双层中。乙醇耐受性与质膜的主要成分(膜脂、膜蛋白)有一定关系,其中脂类变化的规律如下:1) 磷脂的含量和组分方面,长链脂肪酸含量高的酿酒酵母可以耐受的乙醇浓度较高;脂肪酸不饱和性也影响酵母乙醇耐受性,培养基的乙醇增加使酿酒酵母质膜单不饱和长链脂肪酸(例如油酸)增多,饱和脂肪酸(例如棕榈酸)的数量降低^[8]。磷脂肌醇含量与酿酒酵母在乙醇毒性影响下的存活有关,能够组成型产生肌醇的突变体比野生型细胞在乙醇胁迫下存活率高^[9];2) 糖脂的含量和组分方面,对乙醇的适应改变表现为总糖脂量上升、糖脂中的唾液酸、己糖胺、半乳糖含量下降、葡萄糖、脑苷脂、脑磷脂、单葡萄糖甘油二酯含量上升^[10];3) 甾醇的含量和组分方面,在乙醇胁迫下麦角甾醇增加,推测麦角甾醇可以增加细胞膜的坚韧性,减少膜的流动性;4) 质膜各组分比例关系方面,乙醇耐受性高的酿酒酵母菌株含有高麦角固醇/磷脂比例、高卵磷脂含量、相对低比例的磷脂酰乙醇胺^[7]。

与乙醇耐受性相关的酿酒酵母膜蛋白 H^+ -ATPase 研究较多, H^+ -ATPase 是一种重要的膜蛋白,其功能是伴随着 ATP 水解,参与将质子泵出质膜外,形成跨膜质子梯度,推动物质运输。在乙醇溶液中, H^+ -ATPase 质子跨膜梯度的质子驱动力降低。据研究,乙醇耐受性高的酿酒酵母 H^+ -ATPase 活性相对较大,可以消减乙醇对跨膜质子流的影响^[8]。

2.3 细胞内保护性物质变化与酿酒酵母乙醇耐受性相关

海藻糖、热激蛋白(Heat shock protein, HSP)、脯氨酸等细胞内保护性物质含量增多,有利于酿酒酵母耐受高浓度乙醇。HSP 是最初发现于高温刺激条件下,生物体所合成的特定蛋白质,具有保护作用,可以稳定细胞膜和蛋白质,参与蛋白质装配、折叠,防止蛋白质变性、凝集。现发现乙醇也可以诱导酿

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

酒酵母 HSP 产生^[11]; 海藻糖是由两个葡萄糖残基以 α ,1,1-糖苷键构成的非还原性二糖, 性质稳定, 在逆境胁迫下对细胞具有保护作用, 而脯氨酸是一种渗透保护物质, 海藻糖、脯氨酸可以防止蛋白质变性、减少膜的渗透性改变, 酿酒酵母细胞内的海藻糖、脯氨酸在乙醇胁迫一定时间后含量增加^[12,13]。

3 酿酒酵母乙醇耐受性的遗传基础

运用 DNA 芯片和基因突变等分子生物学技术, 研究酿酒酵母乙醇耐受性遗传学基础, 发现酿酒酵母乙醇耐受性与多基因相关, 这些基因涉及到细胞多种生理活动, 可以归类为: 信号转导系统、能量利用、物质代谢与运输、细胞形态建成、多种逆境应激等有关基因。并且, 酿酒酵母乙醇耐受性相关基因表达方式复杂, 根据推测, 乙醇激活细胞信号转导途径传递信号, 调节相应基因转录, 进而改变细胞结构成分、合成保护物质(HSP、海藻糖、脯氨酸等)和调整其它生理变化, 使细胞存活、适应胁迫最终恢复活力。已有报道的与酿酒酵母乙醇耐受性相关基因及其表达复杂性具体如下:

3.1 与酿酒酵母乙醇耐受性相关的信号转导有关基因

信号系统感受外界刺激, 进行信号转导, 使酿酒酵母能及时响应外界环境变化, 做出适应性反应。酿酒酵母丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联体系、高渗透压甘油信号转导途径参与调控感应乙醇变化, 其成员 *slt2p*、*gpd1*、*hor2*、*gre3*、*dak1*、*hor7* 等受乙醇诱导表达增加^[14]; 在乙醇环境中表达量增多的信号转导有关基因还有: 响应外界信号, 调节减数分裂的调控基因 *ume6*^[6]、转录因子 *msn2p* 和 *ars1p*^[14]等。

3.2 与酿酒酵母乙醇耐受性相关的能量利用有关基因

酿酒酵母对乙醇应激反应可能需要消耗大量能量, 受乙醇胁迫, 与能量代谢相关基因 *glk1*、*hxx1*、*ydr516C*、*tdh1*、*ald4*、*cit2*、*mcr1*、*pyc1* 等基因表达上调^[15], 编码 F-型 ATP 合成酶基因 *atp14*、*atp18*、*atp19* 等线粒体 ATP 合成有关基因^[16]、*ptk2*、*yor137C*^[17]等调控 ATP 合成基因表达量也大增, 涉及能量代谢的信号转导系统成员 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *gpd1*、3-磷酸甘油酯酶基因 *hor2*、甘油代谢相关基因 *dak1*^[17]等表达量也增加。

3.3 与酿酒酵母乙醇耐受性相关的物质代谢与运输有关基因

根据细胞对乙醇应激反应需要, 酿酒酵母蛋白质、核酸、脂类等物质代谢与运输活动出现调整。在乙醇胁迫下, 与细胞生长减缓可能相应, *rrl9*、*arpL32*、*kar4*、*yef3* 等与蛋白质合成代解有关的基因, *nop1*、*nop5* 等与核酸合成代谢有关基因表达量下降^[15]; 与质膜成分变化需要可能相应, *ole1*、*opi3*、*faa1*、*eht1* 等^[15]与脂类代谢有关基因表达上调, 而与肌醇生物合成有关的肌醇-1-磷酸合成酶基因 *ino1*^[9]表达被证明不可缺少; 与物质运输所出现的特定变化可能相应, *mep2*、*dip5* 等与氮类运输有关基因、*hxt6*、*hxt7* 等^[15]与糖类运输有关基因、*ccc2*、*ctr2* 等^[17]与铜离子运输蛋白有关基因、*clc1*、*vps34*^[6]、*btn2*^[18]等与蛋白质定位有关基因、*rat8p*^[19]等与核酸运输有关基因表达出现变化。

3.4 与酿酒酵母乙醇耐受性相关的细胞形态建成有关基因

与酿酒酵母在乙醇环境下细胞变大可能相应, *tdp3*^[6]、*swe1*^[20]、*bem2*、*pat1*、*rom2*、*ada2*^[21]等细胞形态建成及其调控基因表达改变。对突变体的表型检测显示, *swe1* 突变体在乙醇中失去细胞骨架变化体积改变现象; *bem2*、*pat1*、*rom2*、*ada2* 突变体除了对乙醇敏感外, 对白色荧光染料 calcofluor white、溶壁酶 zymolyase 等影响细胞壁结构的试剂也敏感^[21], 同样说明细胞形态完整性对于酿酒酵母的乙醇耐受性十分重要。

3.5 与酿酒酵母乙醇耐受性相关的多种逆境应激有关基因

酿酒酵母乙醇耐受性的机制与其响应热、氧化等逆境的反应有相通之处, 许多参与乙醇应激基因同样参与抗氧化、热保护等多种抗逆境反应。例如, 在乙醇胁迫下, 应激多种逆境产生保护物质有关基因出现表达变化, *pro1*、*put1*、*car2* 等与脯氨酸含量积累有关基因、编码脯氨酸转运蛋白 *put4* 基因 mRNA 水平提高^[13]; 海藻糖合成相关基因 *tps1*、*tps2*^[15]加大表达量; 在热应激下表达的编码 Hsp 蛋白基因 *hsp26*、*hsp42*、*hsp30*、*hsp104*、*hsp12*、*hsp78* 和 *hsp70* 家族同源基因 *ssa1*、*ssa2*、*ssa3*、*ssa4*、*sse1*、*hsp30* 的同源物 *yro2* 等基因在乙醇应激下表达增多^[15]; 乙醇毒性诱导活性氧产生, 为了减少活性氧对细胞的破坏, *sod1*^[11]、*sod2*、*ctt1*、*ahp1*、*grx1*、*grx4*、

ttr1^[15]、*mpr1*^[22]等与抗氧化有关的基因被激活。

3.6 酿酒酵母乙醇耐受性相关基因表达的复杂性
与酿酒酵母乙醇耐受性相关基因相互之间相互联系, 形成精确的调控网络, 基因表达量、表达方式十分复杂, 例如, 在不同时段的反应发现, 反应初期和反应后期的基因表达谱差异非常大, 不仅表达出现变化的基因数量相差很大, 所涉及的基因也不相同, 反应初期基因表达出现剧烈变化, 反应后期的基因表达参数与对照细胞相比变化较小^[15]; 甚至同时存在两种相反的基因表达调控方式, 如正调控 ATPase 的基因 *ptk2*、*yor137C*, 负调控 ATPase 的基因 *hsp30*, 受乙醇胁迫表达都上调^[16], 酿酒酵母可能通过此类基因表达调控方式精确地控制乙醇胁迫下能量和物质平衡。

4 研究展望

酿酒酵母乙醇耐受性机理尚有待于研究解释的问题有: 未知功能基因在参与乙醇逆境响应过程中所起的作用^[17], 数量性状基因座与乙醇耐受性的关系^[23], 菌株差异和培养条件对酵母乙醇耐受性的影响^[24]等等; 在应用研究上, 利用已知的酿酒酵母乙醇耐受性机理, 通过改变培养条件、微生物选育, 已使酿酒酵母耐受乙醇能力大为提高。目前, 科研人员正把转录组学、代谢组学等先进技术手段运用于高耐受乙醇酿酒酵母选育研究^[25-27], 例如, Alper 使用全转录工程(Global transcription machine engineering, gTME)方法, 对关键的转录因子 *spt15* 进行成功改造, 突变体的乙醇耐受性显著提高^[28]。今后, 对酿酒酵母乙醇耐受性分子机理研究将成为研究热点, 不断涌现的酿酒酵母乙醇耐受性机理研究成果, 将指导获取高乙醇耐受性的新型酿酒酵母以及形成新的策略提高乙醇发酵产量, 推动生物乙醇生产和酿酒业的发展。

参 考 文 献

- [1] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, *et al.* Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, **31**(5): 535-569.
- [2] Maiorella B, Wilke CR, Blanch HW. Alcohol production and recovery. *Adv Biochem Eng*, 1981, **20**: 43-92.
- [3] Taylor M, Tuffin M, Burton S, *et al.* Microbial responses to solvent and alcohol stress. *Biotechnol J*, 2008, **3**(11): 1388-1397.
- [4] Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, *et al.* Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS ONE*, 2008, **3**(7): e2623.
- [5] Alexandre H, Charpentier C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J Ind Microbiol Biotech*, 1998, **20**: 20-27.
- [6] Kumar GR, Goyashiki R, Ramakrishnan V, *et al.* Genes required for ethanol tolerance and utilization in *saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic*, 2008, **59**(4): 401-411.
- [7] Chi Z, Arneborg N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*, 1999, **86**(6): 1047-1052.
- [8] Aguilera F, Peinado RA, Millán C, *et al.* Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol*, 2006, **110**(1): 34-42.
- [9] Furukawa K, Kitano H, Mizoguchi H, *et al.* Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *J Biosci Bioeng*, 2004, **98**(2): 107-113.
- [10] Malhotra R, Singh B. Ethanol-induced changes in glycolipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, **128**(3): 205-213.
- [11] Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, *et al.* Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J*, 1992, **11**(6): 2357-2364.
- [12] Singer MA, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(11): 460-468.
- [13] Kaino T, Takagi H. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(2): 273-283.
- [14] Van Voorst F, Houghton-Larsen J, JΦnson L, *et al.* Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast*, 2006, **23**(5): 351-359.
- [15] Chandler M, Stanley GA, Rogers P, *et al.* A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 2004, **54**(4): 427-454.
- [16] Dinh TN, Nagahisa K, Yoshikawa K, *et al.* Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, DOI 10.1007/s00449-008-0292-7.
- [17] Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, *et al.* Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2001, **498**(1): 98-103.
- [18] Espinazo-Romeu M, Cantoral JM, Matallana E, *et al.*

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Res*, 2008, **8**(7): 1127–1136.
- [19] Takemura R, Inoue Y, Izawa S. Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock. *J Cell Sci*, 2004, **117**(pt18): 4189–4197.
- [20] Kubota S, Takeo I, Kume K, *et al.* Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(4): 968–972.
- [21] Takahashi T, Shimoi H, Ito K. Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 2001, **265**(6): 1112–1119.
- [22] 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.
- [23] Hu XH, Wang MH, Tan T, *et al.* Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2007, **175**(3): 1479–1487.
- [24] Lei J, Zhao X, Ge X, *et al.* Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *J Biotechnol*, 2007, **131**(3): 270–275.
- [25] Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi, *et al.* Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(12): 8656–8662.
- [26] Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, *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.
- [27] Zhao XQ, Xue C, Ge XM, *et al.* Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield. *J Biotechnol*, 2009, **139**(1): 55–60.
- [28] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, *et al.* Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**(5805): 1565–1568.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自2008年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以E-mail附件的形式发送到编辑部信箱:tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明:“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式:邮件 tongbao@im.ac.cn 或电话 010-64807511