

# 海藻糖与热激蛋白在酿酒酵母耐受乙醇胁迫中的作用\*

方 华 李 灏\*\*

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)

**摘要** 在燃料乙醇发酵生产过程中,酿酒酵母经常会受到高浓度乙醇的胁迫,导致乙醇转化率和产量降低。面对高浓度乙醇的胁迫,酿酒酵母也具有应对胁迫的应激机制。在对这种应激机制进行了解的基础上,如能提高酿酒酵母对乙醇的耐受性,对于燃料乙醇生产具有重要意义。在高浓度乙醇胁迫下,酿酒酵母细胞会产生一系列保护性物质,如海藻糖、热激蛋白、脯氨酸等,这些物质能够提高酿酒酵母细胞对乙醇的耐受性。海藻糖作为一种重要的碳源、能量贮藏物质,不仅能稳定细胞膜、蛋白质和核酸等大分子物质,还可增强酿酒酵母对高浓度乙醇的耐受性。此外,酿酒酵母还可以产生大量的热激蛋白,增强酿酒酵母的抗逆性。从海藻糖和热激蛋白在乙醇胁迫下对酿酒酵母细胞保护作用的研究方面进行了综述,并对存在的问题进行了讨论与展望。

**关键词** 酿酒酵母 乙醇胁迫 海藻糖 热激蛋白

**中图分类号** Q819

19 世纪以来,随着经济的飞速发展,人类对能源的需求急剧增加,导致全球不可再生能源被大量消耗,能源供需矛盾日趋紧张;此外,使用传统化石能源造成的碳排放导致全球气候变暖,也造成区域性灾害(酸雨、阴霾等空气污染)<sup>[1]</sup>。因此,开发新的可再生能源以代替即将枯竭的煤炭、石油等资源刻不容缓。

近年来,以生物乙醇为代表的生物质能源成为国内外研究的热点。生物乙醇是指以天然含糖或可转化为糖类的生物质原料经发酵、蒸馏等生物技术生产的乙醇产品。生物乙醇作为可再生的清洁能源,具有无污染、使用方便等优点,已进行大规模工业化生产<sup>[2]</sup>。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是工业生产乙醇中最常用的菌株,具有生长速度快、代谢副产物少、能耐受一定浓度乙醇等特性<sup>[3,4]</sup>;但在生物乙醇发酵过程中,酿酒酵母生长仍然受到高温<sup>[5]</sup>、高渗<sup>[6]</sup>、高浓度乙醇<sup>[7]</sup>等影响因素的胁迫,从而导致乙醇终产量降低。乙醇是酿酒酵母进行厌氧糖发酵的终产物,但高浓度

乙醇依然可对酵母细胞产生毒性并诱导一些胁迫反应<sup>[8]</sup>,比如可诱导热激蛋白(heat shock proteins, HSP)的表达以及胞内海藻糖(trehalose)的累积等<sup>[9]</sup>。酿酒酵母细胞内海藻糖、热激蛋白、脯氨酸等保护性物质增多,有利于提高细胞对乙醇胁迫的耐受性。因此,研究乙醇胁迫下酿酒酵母细胞的耐受机制,进而提高酿酒酵母对乙醇胁迫的耐受性,可促进乙醇终产量的提高,大大节约生物乙醇的生产成本,提高生物乙醇的市场竞争力。

本文主要介绍近年来关于生物乙醇发酵过程中,乙醇对酿酒酵母胁迫及酿酒酵母对乙醇应激机制的研究进展;在此基础上,对海藻糖、热激蛋白提高酿酒酵母对乙醇耐受性的研究进展进行了综述。

## 1 酿酒酵母发酵过程中的乙醇胁迫

发酵过程中产生的乙醇是抑制生物乙醇彻底发酵的重要因素,乙醇对酵母细胞的抑制主要表现在改变细胞形态<sup>[10]</sup>、抑制细胞生长和发酵<sup>[11]</sup>等方面,尤其是高浓度乙醇可限制酿酒酵母的彻底发酵,甚至可导致细胞死亡。当发酵液中乙醇浓度低于 30 g/L 时,乙醇

收稿日期:2013-10-22 修回日期:2014-04-12

\* 国家自然科学基金资助项目(31201413)

\*\* 通讯作者,电子邮箱:lihao@mail.buct.edu.cn;lihaoh@163.com

对酿酒酵母几乎无抑制作用;高于 40 g/L 时,酵母出芽受到明显影响;随着乙醇浓度的持续增加,其对酵母生长和发育的抑制作用也愈发明显,当乙醇浓度高于 100 g/L 时,酵母生长完全被抑制,细胞存活率降低<sup>[12]</sup>。乙醇的积累会造成酿酒细胞形态发生变化,使细胞骨架变得松散,细胞变大变形,最终导致酿酒酵母生殖力衰退和乙醇产量下降。本课题组前期结果研究也表明,乙醇能够作用于酿酒酵母细胞的细胞膜及线粒体膜,使线粒体功能退化,促进细胞内活性氧的积累<sup>[13]</sup>。

为维持细胞的正常生长和存活,酿酒酵母可对外界环境刺激产生一系列的应激反应<sup>[14]</sup>。面对高浓度乙醇胁迫,酿酒酵母也具有应对胁迫的应激机制<sup>[15]</sup>。酿酒酵母应激乙醇胁迫的分子机制很复杂,这一应激过程涉及多个基因、蛋白质和代谢物等分子以及多条代谢途径<sup>[16]</sup>。近年来,针对酿酒酵母耐受乙醇的分子机制,国内外学者已展开了一系列相关研究,并对这一机制有了一些认识,这为构建具有更强乙醇耐受性的酿酒酵母菌株提供了理论依据。Shioya 等<sup>[17]</sup>的研究结果表明,在具有高乙醇耐受性的 Sake 酵母中,与色氨酸合成途径相关的基因表达量较高;色氨酸合成酶基因(*TRP2* 和 *TRP5*)和色氨酸透性酶基因(*TAT2*)的过表达可赋予酿酒酵母细胞更强的乙醇耐受性。本课题组前期研究结果也表明,一些氨基酸含量的升高可赋予酿酒酵母细胞乙醇耐受性<sup>[18]</sup>。Hong 等<sup>[19]</sup>运用反向代谢工程方法鉴定了与酿酒酵母乙醇耐受性相关的内源性靶基因,发现过表达 4 个内源性基因 *INO1*、*DOG1*、*HAL1* 或 *MSN2* 可显著提高酿酒酵母对乙醇的耐受性。酿酒酵母对乙醇的耐受性还与热激蛋白或海藻糖的合成或含量有关<sup>[20-21]</sup>。此外,酿酒酵母对高浓度乙醇的耐受性与对其他环境胁迫的耐受性也具有一定的相关性<sup>[22]</sup>。比如,酿酒酵母在高温胁迫和乙醇胁迫下会产生一些相同的生理变化,而且酿酒酵母产生的保护机制具有高度的相似性;增加氯化钠的浓度可增强酿酒酵母对乙醇的抗性,原因可能是高浓度氯化钠使细胞膜脂结构发生了变化<sup>[23]</sup>。

## 2 乙醇胁迫下海藻糖对酿酒酵母细胞的保护

目前,有几种假说用以解释海藻糖对于细胞的胁迫保护机制,比如“水替代假说”、“优先结合假说”、“玻璃态假说”以及海藻糖与分子伴侣的协同作用理论等。虽然这几种假说未能彻底解释海藻糖对酿酒酵母的保护机制,但是其作用机理与海藻糖的晶体结构和

物理化学性质是密切相关的。海藻糖是一种化学性质稳定的非还原性二糖<sup>[24]</sup>,广泛存在于细菌、真菌、植物及很多无脊椎动物细胞内。海藻糖具有高亲水、化学稳定等独特性质<sup>[25]</sup>,这使其成为细胞在环境胁迫下的应激产物,可保护生物大分子物质,并维持大分子物质在胁迫环境下的稳定性<sup>[26]</sup>;此外,海藻糖在胁迫条件下的水解可为蛋白质复性提供能量,所以海藻糖含量被认为是酵母对胁迫因素耐受性的重要指标<sup>[27]</sup>。

当细胞长期处于干燥、高渗等严酷环境时,细胞内的海藻糖含量会显著增加,海藻糖的积累可在不同胁迫应答中起重要作用<sup>[28]</sup>。在酿酒酵母细胞中,海藻糖作为一种重要的碳源、能量贮藏物质,不仅能稳定细胞膜、蛋白质和核酸等大分子物质<sup>[29]</sup>,还可增强酿酒酵母对高浓度乙醇的耐受性。高浓度乙醇可诱导细胞内海藻糖的生成,海藻糖含量与乙醇浓度呈正相关。海藻糖能够以氢键的形式与蛋白质的失水部分结合,代替水分子稳定大分子物质的空间构象,形成一层保护膜,从而抑制乙醇胁迫导致的酿酒酵母细胞膜流动性增强,保护细胞免受乙醇的胁迫<sup>[30]</sup>。

海藻糖由 2 个葡萄糖分子通过半缩醛羟基缩合而成,其合成过程的关键酶是 6-磷酸海藻糖合成酶和 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶<sup>[31-32]</sup>。参与海藻糖合成的酶复合体由四个亚基(*TPS1*, *TPS2*, *TPS3*, *TSL1*)组成,分别由基因 *TPS1*, *TPS2*, *TPS3*, *TSL1* 编码合成,其中 *TPS1* 编码 6-磷酸海藻糖合成酶<sup>[33-34]</sup>,*TPS2* 编码 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶<sup>[35]</sup>。海藻糖在酸性海藻糖酶(由 *ATH1* 编码)和中性海藻糖酶(由 *NTH1* 和 *NTH2* 编码)的催化下分解成 2 个葡萄糖分子<sup>[36-38]</sup>。在乙醇胁迫下,海藻糖合成相关基因 *TPS1*、*TPS2* 和 *TSL1* 的转录增强<sup>[39]</sup>,这之前报道的乙醇胁迫诱导酵母细胞海藻糖积累的结果一致<sup>[40]</sup>。Mahmud 等<sup>[41]</sup>研究发现,同时敲除编码中性海藻糖酶的基因(*NTH1*, *NTH2*)和编码酸性海藻糖酶的基因(*ATH1*),在此基础上过表达编码 6-磷酸海藻糖合成酶的基因 *TPS1* 或编码 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶的基因 *TPS2*,使得酿酒酵母细胞内的海藻糖含量相对于原始菌株 FY834 显著增加,而且 *TPS2* 过表达的酿酒酵母细胞内的海藻糖含量高于 *TPS1* 过表达的酿酒酵母。当培养基中乙醇浓度低于 5% 时,*TPS1* 和 *TPS2* 分别过表达的酿酒酵母细胞的生长活性均高于原始菌株 FY834,但是当乙醇浓度提高到 8% 时,只有 *TPS2* 过表达的酿酒酵母细胞的生长活性高于原始菌株 FY834,这是由于 Tps2p 蛋白质催化的反应(即海藻糖生物合成

途径中的最后一步)是海藻糖合成途径中的关键反应<sup>[42]</sup>。此外,酿酒酵母细胞中海藻糖的积累还与渗透胁迫、氧化胁迫等其他胁迫因素相关。

### 3 乙醇胁迫下热激蛋白对酿酒酵母细胞的保护

在高温胁迫条件下,生物体能够合成具有保护作用的特定蛋白质,可提高细胞膜的稳定性,并参与蛋白质的装配、折叠,抑制蛋白质的降解,这种蛋白质称为热激蛋白。热激蛋白具有分子伴侣的功能,HSP60 是最早被称为分子伴侣的热激蛋白,目前已经证明 HSP90、HSP70 等也具有分子伴侣的作用。

热激蛋白在生物体应激方面具有非常重要的作用。酿酒酵母细胞在胁迫环境下产生的热激蛋白主要有 HSP12、HSP26、HSP70、HSP78、HSP82 及 HSP104 等<sup>[43]</sup>。其中,HSP70 家族是一类分子量在 70 kDa 左右的热激蛋白,具有高度保守的氨基酸序列,最为庞大,也最为普遍。热激蛋白的表达量不仅在热胁迫下显著增加,在其它胁迫因素(如干旱、低温、高渗、氧化等条件)下其表达也显著上调;高浓度乙醇也可诱导酿酒酵母细胞 HSP 基因的表达,产生大量热激蛋白<sup>[44]</sup>。Alexandre 等<sup>[45]</sup>利用基因芯片研究首次揭示了乙醇可诱导 HSP70 家族基因(SSA1、SSA2、SSA3 等)的表达。Izawa 等<sup>[46]</sup>研究发现热胁迫和乙醇胁迫都可诱导酿酒酵母 HSP 基因的转录,但是不同之处在于乙醇胁迫抑制 HSP mRNAs 转出细胞核和 3'末端的加工处理,这表明在热胁迫和乙醇胁迫下酿酒酵母产生热激蛋白的机制不同。Piper 等<sup>[4]</sup>对 HSP104 基因被敲除的酿酒酵母进行乙醇胁迫处理,结果表明 HSP104 基因对高浓度乙醇胁迫下的酿酒酵母可起到保护作用<sup>[4]</sup>。

热激蛋白对酿酒酵母的保护主要是通过维持蛋白质的稳定性来完成的。热激蛋白可从四个方面保护乙醇胁迫状态下酿酒酵母细胞蛋白质的稳定性:(1)防止新生成的蛋白质发生错误折叠和聚集;(2)协助蛋白质在细胞内进行跨膜转运;(3)防止其他蛋白质发生变性和降解;(4)促进变性蛋白质的恢复或加速其降解,重新激活某些酶的活性,维持细胞的正常代谢<sup>[47]</sup>。

此外,热激蛋白还可与海藻糖共同作用,协同赋予酿酒酵母对逆境胁迫的耐受性。Elliott 等<sup>[48]</sup>研究发现,海藻糖可与热激蛋白 HSP104 协同作用,保持细胞在胁迫环境下酶结构的稳定性。一些热激蛋白(如 HSP104)可激活海藻糖合成酶,促进胞内海藻糖含量的

增加。海藻糖可作为稳定辅助分子来维持变性蛋白的半折叠状态,从而有利于热激蛋白等分子伴侣对受损蛋白进行加工修复。

### 4 讨论与展望

由于人们对工业高速发展的负面影响预计不足,预防不利导致了全球性的三大危机:环境污染、资源短缺、生态破坏。传统化石能源的过度消耗使环境污染日益严重,寻找环境友好、可再生的资源成为人类社会生存发展面临的重大问题。生物质能源由于清洁、可再生、并且有丰富的存量等优点成为研究热点,其中生物乙醇已被广泛进行工业生产。但是,发酵过程产生的乙醇可抑制酿酒酵母彻底发酵,限制乙醇终产量的提高,从而降低生物乙醇的经济可行性。

酿酒酵母的乙醇耐受性与海藻糖和热激蛋白的合成相关,过表达海藻糖合成酶基因能够增强酿酒酵母的乙醇耐受性,如果同时提高胞内海藻糖和热激蛋白的含量可能会更有效地提高酿酒酵母的乙醇耐受性。尽管对海藻糖和热激蛋白提高酿酒酵母乙醇耐受性的研究已经取得了很大的进展,但是仍有一些问题需要进一步阐释及解决。比如,热激蛋白和海藻糖在酿酒酵母应对乙醇胁迫过程中起着显著的作用,两者能否实现共表达以提高耐受性?共表达后对细胞的其他代谢途径有无影响,会不会造成细胞的代谢负担?酿酒酵母乙醇耐受性提高以后对其他环境胁迫是否耐受?这些问题将会成为今后研究的热点。

随着科技进步,诸如蛋白质组学、代谢组学等一些新技术已被逐渐应用于酿酒酵母对乙醇耐受性及相关问题的研究<sup>[49-50]</sup>,这将极大促进人们对海藻糖和热激蛋白在提高酿酒酵母乙醇耐受性方面相关性的研究。本课题组前期利用基于气相色谱质谱联用(Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)的代谢组学技术,研究了酿酒酵母细胞对乙醇胁迫的耐受性机制<sup>[20]</sup>。这些新技术也将有助于人们更深刻理解海藻糖和热激蛋白提高酿酒酵母乙醇耐受性的作用机制,进而协助人们更有目的地改造酿酒酵母,提高其乙醇耐受性,为构建更高产的乙醇发酵酿酒酵母菌株提供理论指导。

总之,随着对酿酒酵母乙醇耐受性研究的日益深入,人们将会更深入理解相关基因、蛋白质以及代谢物等不同层次的分子在酿酒酵母耐受乙醇过程中所发挥的作用,并可基于这些认识,筛选潜在改造靶点,从而

针对这些靶点进行工程化改造,构建高产乙醇发酵菌株,进而提高乙醇发酵转化率及产量,广泛地应用于工业生产和日常生活中,为人们的优质生活提供更好的服务。

### 参考文献

- [ 1 ] Gonzalez P. Energy Use, Human. In Levin SA ed. Encyclopedia of Biodiversity. 2<sup>nd</sup> ed. Waltham, MA: Academic Press, 2013. 250-266.
- [ 2 ] Bai F W, Anderson W A, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances, 2008, 26 (1): 89-105.
- [ 3 ] de Llanos R, Llopis S, Molero G, et al. *In vivo* virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. International Journal of Food Microbiology, 2011, 144 (3): 393-399.
- [ 4 ] Piper P W. The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. FEMS Microbiology Letters, 1995, 134 (2-3): 121-127.
- [ 5 ] Birch R M, Walker G M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26 (9-10): 678-687.
- [ 6 ] Sree N K, Sridhar M, Suresh K, et al. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresource Technology, 2000, 72 (1): 43-46.
- [ 7 ] Querol A, Fernandez-Espinar M T, Delolmo M, et al. Adaptive evolution of wine yeast. International Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 86 (1/2): 3-10.
- [ 8 ] Hiraishi H, Okada M, Ohtsu I, et al. A functional analysis of the yeast ubiquitin ligase Rsp5: the involvement of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc-4 and poly-ubiquitination in ethanol-induced down-regulation of targeted proteins. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73 (10): 2268-2273.
- [ 9 ] Kubota S, Takeo L, Kume K, et al. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes those are important for cell growth in the presence of ethanol. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68 (4): 968-972.
- [ 10 ] Dinh T N, 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.
- [ 11 ] Ma M, Liu Z L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87 (3): 829-845.
- [ 12 ] Araki Y, Wu H, Kitagaki H, et al. Ethanol stress stimulates the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107 (1): 1-6.
- [ 13 ] Ma M, Han P, Zhang R, et al. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. Canadian Journal of Microbiology, 2013, 59 (9): 589-597.
- [ 14 ] Ding J M, Huang X W, Zhang L M, et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85 (2): 253-263.
- [ 15 ] Hu X H, Wang M H, Tan T, et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2007, 175 (3): 1479-1487.
- [ 16 ] Teixeira M C, Raposo L R, Mira N P, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75 (18): 5761-5772.
- [ 17 ] 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. Journal of Biotechnology, 2007, 131 (1): 34-44.
- [ 18 ] Li H, Ma M L, Luo S, et al. Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44 (7): 1087-1096.
- [ 19 ] Hong M E, Lee K S, Yu B J, et al. Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. Journal of Biotechnology, 2010, 149 (1-2): 52-59.
- [ 20 ] Chandler M, Stanley G A, Rogers P, et al. A stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Annals of Microbiology, 2004, 54 (4): 427-454.
- [ 21 ] Wu H, Zheng X, Araki Y, et al. Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72 (11): 7353-7358.
- [ 22 ] Gibson B R, Lawrence S J, Leclaire J P, et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31 (5): 535-569.
- [ 23 ] Sharma S C. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 1997, 152 (1): 11-15.
- [ 24 ] Jules M, Beltran G, François J, et al. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of *TPS1* reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74 (3): 605-614.
- [ 25 ] Elbein A D, Pan Y T, Pastuszek I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology, 2003, 13

- (4): 17-27.
- [26] Mahmud S A, Hirasawa T, Furusawa C, et al. Understanding the mechanism of heat stress tolerance caused by high trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113 (4): 526-528.
- [27] Van Dijck P, Colavizza D, Smet P, et al. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (1): 109-115.
- [28] Eleutherio E C, Araujo P S, Panek A D. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes*, 1993, 1156 (3): 263-266.
- [29] Crowe J H, Carpenter J F, Crowe L M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 1998, 60: 73-103.
- [30] Benaroudj N, Lee D H, Goldberg A L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (26): 24261-24267.
- [31] Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6: 109.
- [32] Voit E O. Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 2003, 223 (1): 55-78.
- [33] Bell W, Klaassen P, Ohnacker M, et al. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 209 (3): 951-959.
- [34] Vuorio O E, Kalkkinen N, Londesborough J. Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 216 (3): 849-861.
- [35] De Virgilio C, Bürkert N, Bell W, et al. Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 212 (2): 315-323.
- [36] Jules M, Beltran G, Parrou J L. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of *TPS1* reveals Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (3): 605-614.
- [37] Kopp M, Müller H, Holzer H. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (7): 4766-4774.
- [38] Alizadeh P, Klionsky D J. Purification and biochemical characterization of the *ATH1* gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 1996, 391 (3): 273-278.
- [39] Alexandre H, Dequin S, Blondin B, et al. Global gene expression during short term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 2001, 498 (1): 98-103.
- [40] Lucero P, Moreno E, Lagunas R, et al. Internal trehalose protects from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (10): 4456-4461.
- [41] Mahmud S A, Hirasawa T, Shimizu H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 109 (3): 262-266.
- [42] Kwon H B, Yeo E T, Hahn S E, et al. Cloning and characterization of genes encoding trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase from *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Research*, 2003, 3 (4): 433-440.
- [43] Glover J R, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40. *Cell*, 1998, 94 (1): 73-82.
- [44] Sanchez Y, Taulien J, Borkovich K A, et al. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO Journal*, 1992, 11 (6): 2357-2364.
- [45] Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 2001, 498 (1): 98-103.
- [46] Izawa S, Kita T, Ikeda K, et al. Heat shock and ethanol stress provoke distinctly different responses in 3-processing and nuclear export of *HSP* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 2008, 414 (1): 111-119.
- [47] Morano K A, Liu P C, Thiele D J. Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1 (2): 197-203.
- [48] Elliott B, Haltiwanger R S, Fletcher B. Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1996, 144 (3): 923-933.
- [49] Son H S, Hwang G S, Kim K M, et al. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic approach for understanding the fermentation behaviors of wine yeast strains. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (3): 1137-1145.
- [50] Ye Y, Zhu Y, Pan L, et al. Gaining insight into the response logic of *Saccharomyces cerevisiae* to heat shock by combining expression profiles with metabolic pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 385 (3): 357-362.

The Roles of Trehalose and Heat Shock Proteins for Enhancing Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

FANG Hua LI Hao

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

**Abstract** During the process of bioethanol production, *Saccharomyces cerevisiae* cells are often stressed by the accumulated ethanol, which can lead to inhibition of *S. cerevisiae* growth and low bioethanol yield. To maintain the survival, *S. cerevisiae* cells have evolved a set of stress responses to environmental stimuli including ethanol stress. Fully understanding the mechanism of *S. cerevisiae* responses to ethanol will facilitate the development of strategies to improve the ethanol tolerance of *S. cerevisiae* and contribute to the construction of industrial feasible strains with high bioethanol yield. Under the stress of accumulated ethanol, some protectants, such as trehalose, heat shock proteins (HSPs), and proline can improve the ethanol tolerance of *S. cerevisiae* cells. As an important carbon source and energy storage material, trehalose can not only stabilize the cell membranes, proteins and nucleic acids, but also enhance the ethanol tolerance of *S. cerevisiae*. Furthermore, the up-regulation of HSPs can also improve the ethanol tolerance of *S. cerevisiae* cells. The progresses of protective roles of trehalose and HSPs for enhancing the ethanol tolerance of *S. cerevisiae* were focused on.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol stress Trehalose Heat shock protein

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按拼音首字母排列):

段 昕 鲍晓明 钞亚鹏 陈金春 陈靠山 戴秀玉 邓 宁 范学工 方福德 高海燕  
顾 军 郭 宁 何光源 侯丙凯 侯 伟 胡昌华 花宝光 黄 金 黄凌云 江 宁  
瞿 涤 郎志宏 李桂源 李菊丹 李茹姣 李新玲 李 寅 李勇昊 李用芳 梁前进  
林 娟 刘 斌 刘德华 卢孟柱 卢文玉 马 岚 毛建平 潘 皎 潘 杰 邱并生  
邱德有 邵淑丽 史兆兴 王静云 王友信 王云山 王 真 温博海 吴 洁 习欠云  
徐 虹 许 琳 杨 晓 叶志强 尹大川 于慧敏 于益芝 张俊祥 张 毅 张永军  
张余洋 张正斌 赵世光 郑永唐 朱运峰