

酿酒酵母乙醇耐受性的研究进展

刘石雪¹ 王乔平^{1,2} 唐丽薇¹ 严金平¹ 伊日布斯^{1*}

(1 昆明理工大学生命科学与技术学院生物转化实验室 昆明 650500 2 曲靖市动物疫病预防控制中心 曲靖 655000)

摘要 生物乙醇作为一种可再生的清洁能源,正在引起人们的广泛关注。酿酒酵母是乙醇生产中最常用的发酵菌株,但是乙醇耐受性往往成为限制酿酒酵母菌乙醇产量的重要因素。选育耐受高浓度乙醇的酵母菌株对于提高乙醇产率具有重要意义。然而传统的菌株改良方法具有育种周期长,突变方向不定等缺点。主要综述了近年来国内外对酿酒酵母菌耐受乙醇的分子生物学机理方面的研究成果,进而总结了提高酿酒酵母乙醇耐受性的基因工程、代谢工程。

关键词 酿酒酵母 乙醇耐受性 基因工程

中图分类号 Q819

近年来,随着全球环境不断恶化,能源危机日益严重,石油资源日渐紧缺,迫使人们把目光转到绿色可再生的清洁能源上。生物乙醇作为一种绿色可再生新能源,正逐步成为各国能源发展的方向。积极推进和发展这种绿色可再生生物能源产业已经迫在眉睫。

酿酒酵母菌株是最初的也是最主要的工业乙醇生产应用的微生物,酿酒酵母具有发酵速度快、产乙醇浓度高的优良特性,然而乙醇发酵的成功与否取决于酵母菌株在发酵过程中对各种环境压力的耐受能力。这包括对发酵初始高浓度糖的渗透压耐受性,以及对发酵终产物乙醇及副产物有机酸的耐受性。然而在发酵的过程中不断增加的乙醇浓度所产生的压力是限制乙醇生产和最终阻止乙醇发酵的最重要因素^[1]。因为乙醇对酵母细胞存在很大毒害作用,迄今,研究证明乙醇能抑制酿酒酵母糖酵解中关键酶的酶活^[2],诱导产生活性氧^[3,4];通过引起细胞膜磷脂和麦角甾醇成分的变化而影响质膜的流动性^[5,7];还可以增加质膜 H⁺-ATPase 酶的活性,它对于控制细胞的 pH 值及转运机制是至关重要的^[5,8];增加质膜渗透性的非特异性,导致跨膜化学势不平衡等等^[9-10]。这些影响最终抑制了酵母发酵过程中细胞的存活率和乙醇产率。选育耐受高浓度乙醇的酿酒酵母菌株是提高乙醇产率的基本保障。虽然研究工作者们积累了较多关于酿酒酵母乙

醇耐受机理方面的研究成果,但是由于酿酒酵母的乙醇耐受机制非常复杂,当前选育技术仍然以从自然界中直接筛选分离为主。本文结合酿酒酵母乙醇耐受分子机制的研究进展综述了提高其乙醇耐受性的策略与方法。

1 提高酿酒酵母乙醇耐受性的传统方法

传统的菌种改良方法主要包括从自然界中直接筛选分离高产耐高浓度乙醇酵母菌种,或者通过诱变育种、原生质体融合、杂交技术获得性状优良的酵母菌种。在这方面我国的研究人员取得了较多成果,例如彭源德等^[11]从自然界中分离得到 4 株能在 40℃ 生长良好的耐高温酿酒酵母菌,进而通过紫外诱变获得了一株能在 40℃ 高温耐受 16% vol 乙醇浓度的优良菌株 S132。但是传统的诱变技术具有育种周期长,突变的方向不定,有益突变的几率很小等缺点。1994 年以后人们开始利用结合传统诱变与细胞融合技术的一种新型育种技术——基因组改组技术(Genome shuffling)对微生物细胞进行基因组重组,从而大幅度提高微生物细胞的正向突变频率及正向突变速度,使得人们能够在较短的时间内获得高效的正向突变菌株。陆筑凤等^[12]通过基因组改组技术获得了耐受 16% vol 乙醇的酿酒酵母,耐乙醇能力比野生型提高了 33%。Tao 等^[13]通过对 *S. cerevisiae* Z5DΔGPD2 进行三轮基因组改组来提高其发酵性能,获得表型良好的菌株 S.

收稿日期:2013-03-06 修回日期:2013-03-29

* 通讯作者,电子邮箱:irbisc@gmail.com

cerevisiae SZ3-1, 该菌株和亲本菌株相比乙醇产量提高到 8%。进一步分析显示, *S. cerevisiae* SZ3-1 菌株乙醇产量增加的主要原因是菌株自身乙醇耐受性的增强。但是由于酿酒酵母乙醇耐受分子机制的复杂性, 传统的提高酵母乙醇耐受性的方法都具有一定的盲目性。

随着分子生物学研究手段的不断进步, 近年来从基因水平、表达和转录水平揭示乙醇耐受性的分子机制研究越来越多, 同时在实验室阶段提高酿酒酵母乙醇耐受性的基因工程手段、全转录工程手段受到越来越多的关注。

2 提高酿酒酵母乙醇耐受性的基因工程

1999 年 Winzeler 等^[14]对酿酒酵母 2026 个基因的开放阅读框做单敲除实验, 首先开创了基因组水平分析影响乙醇耐性因素的方法。Teixeira 等^[1]通过化学基因组学鉴定出 254 个基因与酿酒酵母乙醇耐受性有关, 其中包括 121 个新发现的基因。他们用 GOToolBox software 软件分析这 254 个基因, 发现它们大多和胞内组织合成, 细胞转运有关, 特别是液泡 pH 值、过氧化物酶、内涵体、细胞骨架、及转录机制等方面。而所揭示的基因在两个报道中并不完全一致, 这可能是因为酿酒酵母培养条件的不同或者遗传背景的不同, 造成这些基因重复水平低^[15]。以上研究结果显示了酿酒酵母乙醇耐性在分子水平上涉及到许多基因以及它们之间的相互作用; 说明其乙醇耐受分子机制的复杂性, 以下将对酿酒酵母菌的乙醇耐受机制及其在实验室阶段提高其乙醇耐受性的基因工程作详细介绍。

2.1 过表达海藻糖合成酶基因提高乙醇耐受性

海藻糖是由两分子葡萄糖通过 α -1-1 糖苷键连接而成的一种非还原性二糖^[16]。酿酒酵母菌株的乙醇耐受性与细胞内的海藻糖含量有关, 在乙醇耐受性酵母菌株中高浓度乙醇刺激会引起细胞内海藻糖的积累, 同样积累高浓度海藻糖的细胞可以耐受外界环境中高乙醇浓度。这可能是因为乙醇压力反应中海藻糖的功能是作为化学分子伴侣, 它可以防止蛋白质的错误折叠^[17-19]。Tao 等^[13]发现在用 10% 乙醇刺激 *S. cerevisiae* Z5 和 *S. cerevisiae* SZ3-1 时, 与海藻糖合成有关的基因 *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* 和 *TSI1* 表达水平都有所提高。除此之外, 编码酸性海藻糖酶基因 *ATH1* 和编码中性海藻糖酶基因 *NTH1* 表达水平都上调。Alexandre 等^[20]也发现乙醇刺激可以诱导 *NTH1* 和 *ATH1* 的上调

表达。研究表明乙醇压力可以同时诱导编码海藻糖合成酶和降解酶基因的表达, 来帮助酵母菌调节细胞内海藻糖含量抵御外界乙醇压力。2012 年 Moon 等^[21]在酿酒酵母内异源表达白色链霉菌的海藻糖合成基因 *SALc*, 重组菌株显示出较高的乙醇耐受性和乙醇产量, 可以耐受 10% vol 的乙醇, 产量为 39g/L 乙醇比对照菌高 6%。因此过表达海藻糖合成酶基因可以提高酿酒酵母乙醇耐受性。

2.2 过表达细胞膜成分合成基因提高乙醇耐受性

高浓度乙醇会破坏细胞壁和细胞膜的完整性和功能, 从而影响细胞的存活力。Ogawa 等^[22]研究发现乙醇刺激可以同时诱导甘露糖蛋白代谢基因 *TIP1*、糖原蛋白代谢基因 *SEDI*、细胞壁组织有关基因 *HSP150* 的上调表达, 这些基因都与细胞壁成分的完整性有关。说明了细胞壁的完整性与其乙醇耐性相关。

麦角固醇是酿酒酵母细胞膜的主要固醇类, 它在调整细胞膜的组份脂类和蛋白质的平衡间扮演着重要的角色^[23]。Teixeira 等^[1]通过化学基因组学鉴定发现参与麦角固醇合成有关的 *ERG2* 和 *ERG24* 基因在乙醇刺激下表达量会发生变化, 使细胞膜麦角固醇含量发生变化。Kubota 等^[24]研究 *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6*, *ERG24*, *ERG28* 麦角固醇合成有关基因敲除突变株不能在乙醇胁迫条件下生长。油酸、棕榈油酸是酵母细胞膜成分的重要不饱和脂肪酸, 它们可以改变细胞膜的流动性和变形性, 适宜程度的流动性是细胞维持正常生理功能的必要条件^[25-28]。油酸、棕榈油酸是经过同一个细胞膜代谢脱氢酶基因 *OLE1* 对硬脂酸和棕榈酸的氧化作用和依赖 NADH 的去饱和作用形成的^[15]。为了研究不饱和脂肪酸与酿酒酵母乙醇耐受性间的关系, Kajiwarat 等^[29]在酿酒酵母中过量表达基因 *OLE1*, 使突变菌株乙醇耐受性增加。但用乙醇刺激野生型酵母菌株时, *OLE1* 基因的 mRNA 转录水平并没有明显变化, 这可能是因为细胞内不饱和脂肪酸的含量与 *OLE1* 基因的 mRNA 的稳定性和翻译水平有关^[30]。研究结果表明, 增加细胞内油酸、棕榈油酸不饱和脂肪酸的含量可以有效改善酿酒酵母的乙醇耐受性。

2.3 过表达氨基酸代谢基因提高乙醇耐受性

研究发现当酿酒酵母细胞在 30℃ 下用 20% (v/v) 乙醇处理 9 小时后几乎所有的细胞都会死亡, 当向培养基中添加氨基酸时有 57% 的细胞仍然可以存活, 表明添加氨基酸能显著提高酿酒酵母菌体的耐乙醇能力^[15]。随后对细胞质膜蛋白质的组成成分和质膜流动

性进行分析,发现这些氨基酸参与了细胞膜蛋白质的合成,并且可能改变了酿酒酵母细胞在面临乙醇压力时的质膜流动性^[15]。在酿酒酵母发酵过程中脯氨酸扮演着重要的角色,它可以保护细胞抵御外界的温度胁迫,氧化胁迫等,还可以增加蛋白质的稳定性^[31-32]。Takagi等^[33]通过将 *PRO1*^{D154N} 基因替换酿酒酵母野生型菌株的脯氨酸合成酶基因 *PRO1*,得到了因为脯氨酸积累而具有更高乙醇耐受性的突变株。同时 Yoshikawa等^[34]发现敲除酿酒酵母的 *PRO1* 基因,突变株比野生型菌株对乙醇浓度更加敏感。但是最新研究结果显示大量脯氨酸的积累会抑制酵母细胞的生长速率,因此为了使酵母细胞耐受更高浓度的乙醇,并且维持较好的生长情况,需要把细胞内脯氨酸的量维持在一定范围之内^[25]。色氨酸被认为是另一种和提高酿酒酵母乙醇耐受性密切相关的氨基酸。敲除色氨酸合成酶基因 *TRP1*, *TRP2*, *TRP3*, *TRP4*, *TRP5* 都会导致酵母细胞对乙醇浓度更加敏感,同时过表达色氨酸合成酶基因 *TRP1*, *TRP2*, *TRP3*, *TRP4*, *TRP5* 或者色氨酸通透酶基因 *TAT2* 都可以增加酿酒酵母的乙醇耐受性^[35]。

2.4 过表达 H^+ -ATPase 酶提高酵母乙醇耐受性

H^+ -ATPase 酶在质子泵上扮演着一个非常重要的角色,并且在真核生物包括单细胞有机体内是高度保守的。酿酒酵母细胞的 H^+ -ATPase 酶通过把细胞质的质子转运到管腔内使液泡酸化,这个功能在维持细胞内的 pH 值方面是非常重要的^[36-41],另外许多全基因组分析显示酵母细胞的 V-ATPase 和许多胁迫耐受有关,比如乙醇胁迫^[15,42-43],有机酸的胁迫^[44-45]等。Teixeira等^[1]构建了编码 H^+ -ATPase 酶基因敲除的突变株和野生型相比对乙醇更敏感。2010 年 Hasegawa 等^[46]研究发现在底层酿酒酵母菌株中过表达 H^+ -ATPase 酶有关基因 *DBF2*, *VMA41/CYS4/NHS5* 和 *RAV2*,重组菌株比亲本菌株有更高的乙醇耐受性,在高糖浓度发酵时有更高的发酵速率。

2.5 一些其它受关注的基因与乙醇耐受性的关系

酿酒酵母菌的乙醇耐受机制非常复杂受多基因控制。除了上面介绍的一些基因外,还有其它基因和提高酿酒酵母乙醇耐受性有关。Voorst 等^[47]和 Betz 等^[48]的研究表明 Asr1p (Alcohol sensitive ring/PHD finger 1 protein) 可能与乙醇耐受性有关。最近, Ding 等^[49]用 8% 乙醇刺激酿酒酵母细胞后通过 RT-PCR 显示 *ASR1* 基因表达量不断增加,刺激 2 小时后达到一个峰值。这一结果也通过下面实验得到了验证,用荧光

显微镜检测 Asr1p 的 C 末端带有绿色荧光标签的荧光水平,绿色荧光标签显示乙醇刺激会引起 Asr1p 在细胞核中的积累。同时 *ASR1* 基因敲除菌株较野生型菌株对乙醇浓度更加敏感。推测在乙醇胁迫下 Asr1p 在核内积累的原因可能是其参与一个复杂的信号转导途径^[15]。热激因子(HSFs)是一系列和胁迫调节有关的热休克蛋白(HSPs),在胁迫条件下热休克蛋白作为一种分子伴侣帮助蛋白质的正确折叠但本身并不参与蛋白质的折叠。Watson 等^[50]最初的研究显示热激处理酿酒酵母细胞可以诱导合成热休克蛋白,同时可以提高酵母细胞的乙醇耐受性。随后对乙醇压力下酿酒酵母全基因组分析显示有 14 个热休克蛋白 *HSP* 基因表达上调 3.4 ~ 21.5 倍,大量热休克蛋白 *HSP* 基因表达水平的变化暗示蛋白质的正确折叠对于酵母乙醇耐受的重要性^[1]。目前很多学者通过细胞全基因转录组学分析研究揭示了许多与酿酒酵母菌的乙醇耐受性机制相关的基因,但是无法区分发生变化的基因与乙醇耐受性的因果关系,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,而不是乙醇耐受性提高的原因^[15]。因此不能通过单一基因敲除或者过表达来有效地提高酿酒酵母的乙醇耐受性。

3 提高酿酒酵母乙醇耐受性的代谢工程

酿酒酵母的乙醇耐受性与许多基因有关,但是某些单个酿酒酵母相关基因的敲除或者过表达,并不能有效地提高其乙醇耐受性。更有效的提高酿酒酵母乙醇耐受性的方法应该是同时调节细胞内多种基因的表达。Alper 等^[51]首先提出“全局转录工程”的概念(global transcription machinery engineering, gTME),全局转录工程是一种全新的改进细胞表型的定向进化方法,通过易错 PCR 等技术对细胞中转录元件进行突变修饰,使细胞的转录在整体水平上发生改变,有利于由多种基因调控的性状得以改进^[52]。2010 年赵心清等^[53]通过 SPT3 定向进化提高酿酒酵母乙醇耐性,通过易错 PCR 建立了 *SPT3* 突变基因文库并转化 *S. cerevisiae* ATCC4126。从突变酵母转化子中筛选到可以耐受 10% 乙醇浓度的酿酒酵母突变株 M25。研究表明运用全局转录工程改善酿酒酵母乙醇耐性等受到多基因协调调控的性状是一个简便高效的手段。

4 结论与展望

酿酒酵母乙醇耐受机理研究成果的不断涌现使研

究者们在提高酿酒酵母的乙醇耐受性方面取得了一定的成绩。但是由于酿酒酵母的乙醇耐受性受多基因控制,这些基因间相互作用关系复杂,其表达量和表达方式受环境影响很大^[15],单一的基因工程操作并没有取得很好的效果。从代谢工程入手利用全局转录方法来提高酿酒酵母乙醇耐受性是一种颇有前景的策略。随着基因组学、蛋白质组学等技术的不断发展,使我们可以从综合和总体的角度,在分子水平上来研究酿酒酵母在各种环境压力下的耐受机制。随着研究的不断深入将会涌现出更多新的酿酒酵母乙醇耐受性机理研究成果,为我们获取提高酵母乙醇耐受性和发酵乙醇产量的新策略奠定理论基础,推动生物质乙醇生产的发展。

参考文献

- [1] Teixeira M C, Raposo L R, Mira N P, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75 (18):5761-5772.
- [2] Ding J, Huang X, Zhao N, et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85(2):253-263.
- [3] Costa V, Reis E, Quintanilha A, et al. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 300(2):608-614.
- [4] 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.
- [5] Aguilera F, Peinado R A, 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.
- [6] 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.
- [7] You K M, Rosenfield C L, Knipple D C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(3):1499-1503.
- [8] Monteiro G A, Sá-Correia I. *In vivo* activation of yeast plasma membrane H-ATPase by ethanol: effect on the kinetic parameters and involvement of the carboxyl-terminus regulatory domain. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1370(2):310-316.
- [9] Salgueiro S P, Sá-Correia I, Novais J M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 54(4):903-909.
- [10] Yang K M, Lee N R, Woo J M, et al. Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(6):675-684.
- [11] 彭源德,朱作华,唐守伟,等. 耐高温、高浓度酒精酵母的选育与耐受性能初步鉴定. *中国亚麻科学*, 2010, 32(3):0135-0141.
- Peng D Y, Zhu Z H, Tang S W. et al. Breeding and preliminary identification of thermotolerant and ethanol enduring yeast strains. *Plant Fiber Sciences in China*, 2010, 32(3):0135-0141.
- [12] 陆筑凤,李超,王昌禄,等. Genome shuffling 技术选育高耐受性酿酒酵母. *酿酒科技*, 2008, 7:0023-0026.
- Lu Z F, Li C, Wang C L, et al. Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high temperature and ethanol tolerance by genome shuffling techniques. *Liquor-making Science and Technology*, 2008, 7:0023-0026.
- [13] Tao X, Zheng D, Liu T, et al. A novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31235.
- [14] Winzeler E A, Shoemaker D D, Astromoff A, et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, 285(5429):901-907.
- [15] 张秋美,赵心清,姜如娇,等. 酿酒酵母乙醇耐性的分子机制及基因工程改造. *生物工程学报*, 2009, 25(4):481-487.
- Zhang Q M, Zhao X Q, Jiang R J, et al. Ethanol tolerance in yeast: molecular mechanisms and genetic engineering. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(4):481-487.
- [16] Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, et al. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90(3):313-333.
- [17] 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.
- [18] An M Z, Tang Y Q, Mitsumasu K, et al. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(7):1367-1374.
- [19] Li Q, Zhao X Q, Chang A K, et al. Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of TPS1 encoding trehalose-6-phosphate synthase 1 for efficient ethanol production. *Metab Eng*, 2012, 14(1):1-8.
- [20] Alexandre H, Ansanay G V, Dequin S, et al. Global gene

- expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 2001, 498(1):98-103.
- [21] Moon M H, Ryu J, Choeng Y H, et al. Enhancement of stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a trehalose biosynthetic gene from *Streptomyces albus*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17(9): 986-996.
- [22] Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, et al. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. J Biosci Bioeng, 2000, 90(3):313-320.
- [23] Vanegas J M, Contreras M F, Faller R, et al. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. Biophys J, 2012, 102(3):507-516.
- [24] 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.
- [25] Ma M, Liu Z L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(3):829-845.
- [26] 张穗生, 黄日波, 周兴, 等. 酿酒酵母乙醇耐受性机理研究进展. 微生物学报, 2009, 36(10):1604-1608.
- Zhang H S, Huang R B, Zhou X, et al. Advances in research on the mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol tolerance. Microbiology, 2009, 36(10):1604-1608.
- [27] Shin G H, Veen M, Stahl U, et al. Overexpression of genes of the fatty acid biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2012, 29(9):371-383.
- [28] 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.
- [29] Kajiwa S, Suga K, Sone H, et al. Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strains by increases in fatty acid unsaturation via metabolic engineering. Biotechnol Lett, 2000, 22(1):1839-1843.
- [30] Martin C E, Oh C S, Jiang Y. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. Biochim Biophys Acta, 2007, 1771(13):271-285.
- [31] Sanchez O J, Cardona C A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresour Technol, 2008, 99(13):5270-5295.
- [32] Samuel D, Kumar T K, Ganesh G, et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding. Protein Sci, 2000, 9(2): 344-352.
- [33] Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, et al. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(12):8656-8662.
- [34] Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, et al. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2009, 9(1):32-44.
- [35] 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.
- [36] Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(11): 917-929.
- [37] Kim H, Kim A, Cunningham K W. Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) promotes vacuolar membrane permeabilization and nonapoptotic death in stressed yeast. J Biol Chem, 2012, 287(23):19029-19039.
- [38] Kane P M. The long physiological reach of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(5): 415-421.
- [39] Martínez-Muñoz G A, Kane P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. J Biol Chem, 2008, 283(29):20309-20319.
- [40] Benlekbir S, Bueler S A, Rubinstein J L. Structure of the vacuolar-type ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* at 11-Å resolution. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(12):1356-1362.
- [41] Ishimoto M, Sugimoto N, Sekito T, et al. ATP-dependent export of neutral amino acids by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(9):1802-1806.
- [42] Auesukaree C, Damnermsawad A, Kruatrachue M, et al. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Genet, 2009, 50(3):301-310.
- [43] Teixeira M C, Mira N P, Sá-Correia I. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22(2):150-156.
- [44] Madeira A, Leitao L, Soveral G, et al. Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2010, 10(3):252-260.
- [45] Mira N P, Teixeira M C, Sá-Correia I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. OMICS, 2010, 14(5):525-540.
- [46] Hasegawa S, Ogata T, Tanaka K, et al. Overexpression of vacuolar H⁺-ATPase-related genes in bottom-fermenting yeast enhances ethanol tolerance and fermentation rates during high-gravity fermentation. J Inst Brew, 2012, 118(1):179-185.

- [47] Voorst V F, Houghton L J, Jonson L, et al. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast*, 2006, 23(5): 351-359.
- [48] Betz C, Schlenstedt G, Bailer S M. Asr1p, a novel yeast ring/PHD finger protein, signals stress to nucleus. *J Biochem*, 2004, 279 (27): 28174-28181.
- [49] Ding J, Huang X, Zhao N, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress involves actions of protein asr1p. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20 (12):1630-1636.
- [50] Watson K, Cavicchioli R. Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. *Biotechnology Letters*, 1983, 5(6): 683-688.
- [51] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9(2):258-267.
- [52] 乔志新, 于群. 全局转录调控及其在代谢工程中的应用. *生物技术通讯*, 2009, 20(5):689-691.
- Qiao Z X, Yu Q. Application of global transcription machinery engineering in metabolic engineering. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(5):689-691.
- [53] 赵心清, 姜如娇, 李宁, 等. SPT3 定向进化提高酿酒酵母乙醇耐性的研究. *生物工程学报*, 2010, 26(2):159-164.
- Zhao X Q, Jiang R J, Li N, et al. Directed evolution of SPT3 to improve ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(2):159-164.

Advances in Research on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Shi-xue¹ WANG Qiao-ping¹ TANG Li-wei¹ YAN Jin-ping¹ Chagan Irbsi¹

(1 Laboratory of Bioconversion, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

(2 Qujing Center for Animal Disease Control and Prevention, Qujing 655000, China)

Abstract Bioethanol as a renewable clean energy is causing widespread concern. *Saccharomyces cerevisiae* is the most commonly strains in the production of ethanol, but ethanol tolerance often become the most important factors that limit the *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production. Improvement of ethanol tolerance of yeast cells is beneficial for ethanol production. However, traditional breeding methods have many shortcomings, such as long breeding cycle, variable mutation direction and so on. Recent research results about *S. cerevisiae* molecular mechanisms of tolerance to ethanol were reviewed, and the genetic engineering, metabolic engineering to improve *S. cerevisiae* ethanol tolerance was summarized.

Key words *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol tolerance Genetic engineering