

酿酒酵母在纤维素乙醇生产中对毒性化合物的 耐受机理研究进展

郝学才 门珣 张宜 杨非 曹萌 翟冬梅 田沈*

(首都师范大学 生命科学学院 北京 100048)

摘要: 利用木质纤维素生产燃料乙醇的过程中, 前期预处理所产生的抑制剂会影响酵母的正常生长和后续的发酵过程。为减小抑制剂的影响所采取的一些脱毒策略往往造成糖的损失和生产成本的增加, 这在实际生产与经济上是不可行的。因此, 具有强的抑制剂耐受性的酿酒酵母菌株对于提高纤维素乙醇产率是十分重要的。近十年来, 对于酿酒酵母胁迫耐受机制的研究取得了一些重要的进展, 着重介绍目前酿酒酵母对抑制剂耐受机制的研究现状, 包括一些关键性基因的表达及代谢通路过程分析等。同时也介绍一些应对抑制剂提高酵母发酵能力的措施。

关键词: 发酵抑制剂, 耐受性, 基因表达, 代谢通路分析

Review on molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* inhibitor tolerance during cellulosic ethanol production

HAO Xue-Cai MEN Xun ZHANG Yi YANG Fei CAO Meng
ZHAI Dong-Mei TIAN Shen*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 10048, China)

Abstract: Pretreatment of lignocellulosic materials for ethanol production generates inhibitory compounds that interfere with microbial growth and subsequent fermentation. To facilitate fermentation process, detoxification techniques have been commonly applied to remediate these inhibitory compounds. However, these additional steps result in sugar loss and an extra

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD22B01)

*通讯作者: Tel: 86-10-68902330; 信箱: cnu_tianshen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-02; 接受日期: 2011-10-17

cost in practice. To meet desired overall yields during ethanol production, it is of great practical importance to improve the inhibitor-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. In the last decade, significant progress has been made in understanding the mechanisms of yeast stress tolerance. This article reviewed the molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* inhibitor tolerance focusing on its enhanced expression and pathway analysis of some key genes. We also discussed the strategies for improving the fermentation performance of yeast.

Keywords: Inhibitor, Stress tolerance, Gene expression, Pathway analysis

随着化石能源的日益枯竭和环境污染的日益加剧, 可再生清洁能源生物乙醇的开发和利用受到了人们的广泛关注。木质纤维素是世界上最为丰富的生物物质资源, 而且大部分此类物质没有得到很好的利用, 因此, 利用木质纤维素生产燃料乙醇具有重大的经济价值和社会意义。对木质纤维素原料进行预处理是生物乙醇生产过程中必不可少的步骤, 然而在此过程中会产生大量的抑制剂从而影响酵母菌的正常生长和随后的发酵过程^[1]。虽然预处理的方法不同, 产生的抑制剂种类也有一些变化, 但经过预处理后的水解液中主要的抑制剂是呋喃醛类衍生物、苯酚和有机弱酸^[2], 它们能够降低微生物的酶活性和生理活性、打断 DNA 链、抑制蛋白质和 RNA 的合成^[3]等。为了减少抑制剂所带来的毒害作用, 可采用一些物理、化学性的处理策略, 但这又无意间增

加了生产成本^[4]。生物处理法也能够去除醛类抑制剂, 但是需要额外消耗碳源, 从而降低了纤维素产乙醇的底物转化效率^[5], 因此微生物的耐毒性研究受到了更为广泛的关注。经过酸处理后糖降解的过程中, 抑制剂糠醛(Furfural)和 5-羟甲基糠醛(HMF)分别是由戊糖和己糖脱水形成的^[6]。通过抑制剂转化产物的化学结构鉴定^[7], 证明了 Furfural、HMF 分别转化为糠醇(Furanmethanol, FM)和 2,5-二羟甲基呋喃(2,5-Bis-hydroxymethylfuran, FDM), 这也是从化学结构上为抑制剂的生物转化途径提供了一定的理论依据(图 1)。另有研究报道^[4]通过对 FM 和 FDM 的识别和鉴定, 发现位于这两种化合物呋喃环上的醛基是抑制剂毒性的原因, 而不是呋喃环, 因为大量的呋喃化合物对酿酒酵母是没有毒害作用的。常见的弱酸类抑制剂有甲酸、乙酸和乙酰丙酸, 弱酸引起

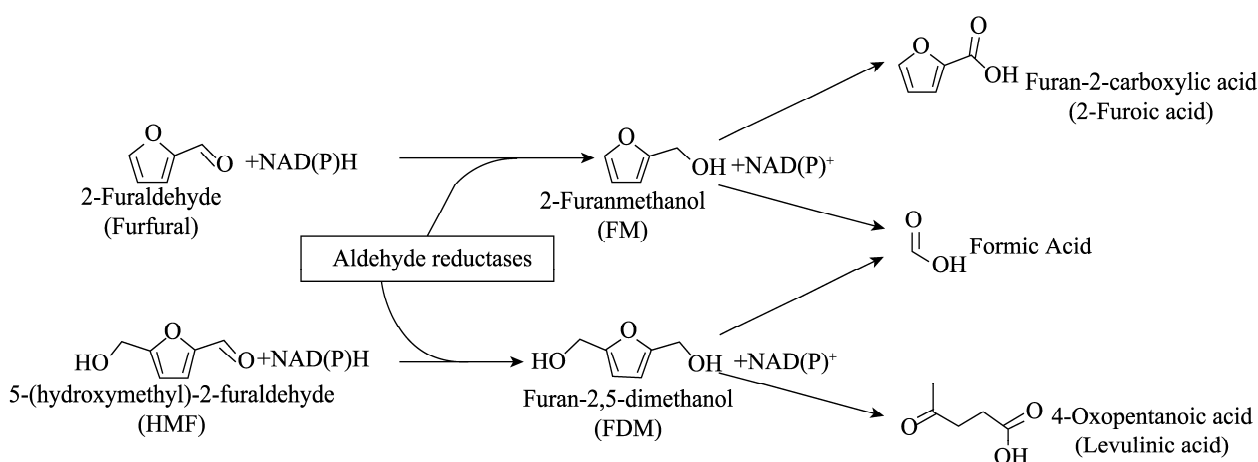


图 1 糠醛和 5-羟甲基糠醛生物转化途径^[8]

Fig. 1 Conversion pathways of 2-furaldehyde (Furfural) and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) ^[8]

的细胞内环境酸化是抑制细胞生长的主要原因。此外,乙酸还可抑制部分糖酵解酶类的活性。在木质纤维素降解产生的多种抑制物中,酚类化合物对发酵具有最强的抑制作用,并且低分子量的化合物毒性更强。目前的研究推测酚类化合物破坏了细胞膜的完整性。酵母能够适应及耐受抑制剂能力的研究能够为我们进一步提高酿酒酵母的耐受性提供一定的理论依据。在酿酒酵母对抑制剂耐受性和脱毒分子机制的探讨中,人们进行了大量的实验研究,取得了很大进展。

1 毒性化合物耐受的分子生物学机制

1.1 酿酒酵母对抑制剂的响应表现

抑制剂对酿酒酵母的影响主要是抑制酵母生长,使延滞期增长,降低乙醇得率和产量,且抑制作用程度取决于其浓度以及菌株的遗传背景^[9]。大量研究报道了酿酒酵母对抑制剂的响应表现。

Liu Z. L. 等^[10]人通过添加抑制剂(糠醛和 5-羟甲基糠醛),对初步筛选的酵母菌株进行了乙醇发酵性能测试,并详细阐述了微生物细胞对于抑制剂具有明显的剂量依赖效应。结果发现,耐抑制剂菌株 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC211239 最高能耐受 30 mmol/L 的 Furfural、60 mmol/L 的 HMF 以及 10 mmol/L 的 Furfural、HMF 混合物。诸多研究^[11-12]表明,一般情况下酿酒酵母在一定的耐受范围内,经过延滞期的适应及调整,能够从抑制剂的毒害作用中恢复过来,最终的乙醇产量并未受到太大的影响。然而超过一定的耐受范围,菌株的正常生长则会受到明显的抑制,无法恢复其活性。通常糠醛的毒害作用大于 5-羟甲基糠醛,并且两者存在着明显的协同效应,当同时添加这两种抑制剂时,毒害作用明显加强,菌株耐受能力明显降低。

Larsson 等^[13]研究了乙酸、甲酸和乙酰丙酸对

酿酒酵母乙醇发酵的影响,研究结果表明低浓度的弱酸(<100 mmol/L)可以增加乙醇得率,而在高于这一浓度时,乙醇得率则会降低。林贝等^[14]对酿酒酵母木糖利用重组菌株 6508-127 的研究结果表明,甲酸对菌株的影响力大于乙酸,且对菌体生长的抑制强于对乙醇生成过程的抑制。

1.2 酿酒酵母在分子水平上的适应性变化

在抑制剂存在的情况下,酵母菌株正常的生长代谢受到了较大的影响,直到抑制剂(糠醛和 HMF)浓度降到一定的水平,酵母才开始正常的代谢消耗葡萄糖。大量编码不同还原酶的基因受到了诱导,这已被报道认为是对抑制剂进行生物转化的需要。耐受菌株能够将醛基还原,变成醇、弱酸等,这就需要辅酶(NADH、NADPH)提供还原力。酿酒酵母在分子水平上对抑制剂的适应性变化成为了研究热点。

Gorsich S. W. 等^[15]选取了戊糖磷酸途径(PPP)中的关键性酶,着重找出这些酶基因的表达与耐受抑制剂的相关性。研究发现,戊糖磷酸途径中的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(ZWF1)的过表达会使得酵母菌在抑制剂(糠醛)存在的情况下,其本身的生长状况得到一定的提升。Liu 等^[8]研究发现耐抑制剂菌株与普通的酵母菌相比,在葡萄糖代谢通路上至少有 16 个基因有更高的表达丰度,其中很多都是葡萄糖代谢、NAD(P)H 代谢和再生过程中的关键基因,如 *HXK1*、*HXK2*、*GLK1*、*TDH1*、*TDH3* 等(图 2)。图 2 中展示了两种不同酵母菌株经过相同条件的抑制剂处理后对相关基因在 0 到 42 h 表达水平的差异比较,红色的表示表达水平下调,绿色表示表达水平上调。

Ma 和 Liu^[16]研究发现耐受菌株还能够从 TCA 循环中得到 NAD(P)H 的再生,这个过程中包含很多与 TCA 紧密相关的氨基酸代谢途径的很多基因,包括得到诱导的 *CHAI*、*ALT1*、*PUT1*、*PUT2*、*CAR1* 和得到抑制的 *ARG1*、*ARG3*、*ARG4*、

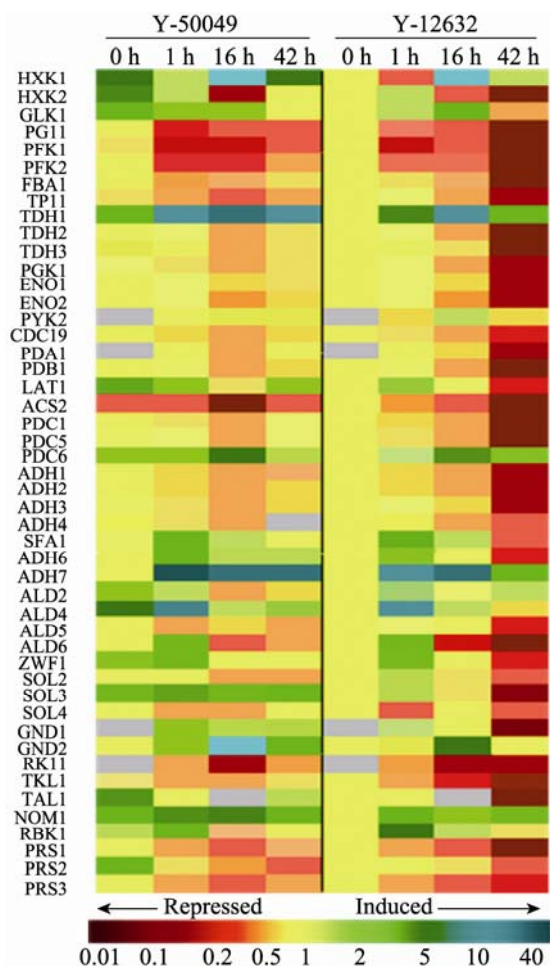


图2 两种酿酒酵母相关基因的表达差异图^[8]

Fig. 2 Comparison of mRNA expression for selected genes of *Saccharomyces cerevisiae* Y-50049 and Y-12632^[8]

ARG5 等。Z. Lewis Liu^[17] 建立了抑制剂(Furfural 和 HMF)转化代谢模型, 这两种抑制剂的转化途径类似, 但对辅酶的喜好并不相同, Furfural 更偏好于辅酶 I (NADH), 而 HMF 则偏好于辅酶 II (NADPH), 但这并不是绝对专一的, HMF 的还原过程也需要辅酶 I, 这也就更加大了对有限 NADH 的竞争, 对于 NADPH 的竞争也是类似的。在一定的抑制剂浓度下, 抑制剂就主导了对辅酶的竞争利用, 因而酵母正常的生长代谢过程受到了较大影响, 当它们被还原到一个较低的水平后, 正常的代谢又将重新开始。这也就与前述

研究的结论相一致: 在一定耐受浓度下, 经过一段延滞期, 耐受菌株能够恢复活性并正常的产乙醇。

Song 等^[18]研究发现至少有 7 个转录因子基因与菌株耐受性相关, 包括 *YAP1*、*YAP5*、*YAP6*、*PDR1*、*PDR3*、*RPN4* 和 *HSF1*, 这些转录因子被认为是酵母在抑制剂作用下诱导表达相关基因的关键调节因子, 在 mRNA 水平上展示出了较高的转录水平。在抑制剂的影响下, 还有大量的 *PDR* 基因家族的基因转录水平也得到了明显的提升。对于酿酒酵母在分子水平上的适应变化主要体现在代谢途径中关键性的酶、热应激蛋白以及转录调控因子。

1.3 耐受抑制剂菌株代谢通路的调控

菌株在抑制剂胁迫压力下所发生的调整变化是极其复杂的, 无论是整体水平上的表型响应还是分子水平的调控表达, 如何在这些复杂的变化调整中得出具有说服力的结论是当前亟待解决的问题, 这也是对于菌株耐受抑制剂机理的研究所面临的巨大挑战。

糖酵解与戊糖磷酸途径在葡萄糖代谢中紧密相关, 从目前对抑制剂(Furfural 和 HMF)的研究^[19]中发现, 在一定浓度糠醛与 5-羟甲基糠醛同时存在的情况下, 一般普通的菌株不能正常生长, 而且糖代谢通路中的大部分相关基因受到严重抑制; 而耐毒菌株通过一段延滞期对代谢通路进行一定的调整变化, 从而快速地恢复活性并代谢葡萄糖实现乙醇发酵, 在代谢葡萄糖的起始阶段, *HXK1*、*HXK2* 和 *GLK1* 的表达会明显提高, 从而保证最初葡萄糖磷酸化阶段正常进行。随后戊糖磷酸途径中的 *ZWF1*、*SOL3*、*GND1* 和 *GND2* 的过表达与糖酵解中磷酸葡萄糖异构酶的抑制, 使得葡萄糖的代谢向磷酸戊糖途径偏转。这一过程的发生是极具生理意义的, 它使得耐毒菌株在抑制剂的压力胁迫下能够产生足够的

NAD(P)H, 以保证继续消耗葡萄糖产乙醇与脱毒代谢。

Gorsich 等^[15]对 *ZWF1* 和 *GND1* 基因进行敲除突变后发现, 突变后菌株对抑制剂变得敏感, 说明了 *ZWF1* 和 *GND1* 对抑制剂耐受性发挥着极其重要的作用。*ZWF1* 在开始阶段的过表达对葡萄糖代谢途径向磷酸戊糖途径偏转起到了重要的作用, 随后 *GND1*、*GND2*、和 *TDH1* 等影响 NAD(P)H 再生的基因表达都得到了上调, 醛还原酶编码基因 *ALD4*、*ALD6*、*ADH6*、*ADH7* 和 *SFA1* 的表达也得到了提升, 这些生理活动调整都是为了产生大量的 NAD(P)H, 而抑制剂转化产生的 NAD^+ 和 NADP^+ 再被用来进行氧化还原反应^[20], 从而获得氧化还原平衡。

Bro 等^[21]证实磷酸葡萄糖脱氢酶在氧化还原代谢中发挥重要的作用。耐受菌株通过上述代谢通路偏转的调整, 使得抑制剂的转化与正常代谢的竞争得到一定的平衡。所有的这些调整都是为了在抑制剂存在的情况下获得一定的能量与氧化还原的平衡, 从而也就形成了独特的代谢通路(图 3), 耐受菌株在抑制剂作用下相关基因转录水平的调整变化, 其中红色代表抑制下调, 绿色代表上调, 黑色表示并无太大差异变化, 线条的粗细程度代表了变化差异的大小。从图 3 中可以清晰的看到抑制剂对糖酵解与戊糖磷酸途径中关键性酶活性的影响。

2 提高酿酒酵母耐受性的方法和手段

在利用生物物质原料生产燃料乙醇的研究中, 酿酒酵母作为公认的、较好的生产菌株, 多种生物学手段被用于对其进行改造, 以期获得较好的效果。

2.1 菌种筛选

从自然界中直接分离筛选耐抑制剂菌株是一种经济实用的办法。因为在自然界长期进化中,

这些菌株在遗传性能、耐抑制剂和产生乙醇能力方面相当稳定, 国内外不乏成功的例子。筛选出的这些菌株除了可以直接用于发酵外, 也可作为菌种驯化或基因工程技术改造的出发菌。

从自然界中直接筛选耐抑制剂菌株中, 目前本实验室筛选的专利菌株 Y1、Y4 在未脱毒的稀酸水解液中, Y1、Y4 均体现出了较好的耐受性^[22], 其中 Y1、Y4 在 24 h 内能完全消耗完葡萄糖, 最高的乙醇产量分别达到理论值的 96%、88.2%。在添加抑制剂糠醛和 5-羟甲基糠醛的实验中, Y1、Y4 经过一段延滞期最高能耐受糠醛和 5-羟甲基糠醛浓度分别为 5.0 g/L、7.0 g/L。筛选的此类菌株不仅在未脱毒的水解液中展示出了良好的抑制剂耐受性, 而且也为进一步的提高菌株耐毒性、开发新菌种奠定了理论基础。

2.2 菌种驯化

对初步筛选的菌株进行驯化, 以进一步提高其抑制剂耐受性。这是一种较为简单有效的方法, 而且效果也较好。与短期的适应相比, 由长期驯化得到的菌株具有一定的遗传稳定性, 即使在没有选择性压力的条件下, 其优良性状也能继续保持。

Liu Z. L.^[23]为提高菌株的抑制剂耐受性进行发酵试验时, 对菌株进行预先驯化, 使其首先在含有低浓度抑制剂的液体培养基中生长, 待其生长状况达到对数期, 转移至含有抑制剂的新鲜培养基中, 以相同方式反复转移直至最后得到稳定的培养物, 然后将其转移至含有更高浓度抑制物的培养基中, 反复操作直至达到想要的菌种耐受性水平。结果发现, 耐抑制剂菌株能够完全转化 30 mM 的 Furfural 和 60 mM 的 HMF, 同时延滞期明显缩短, 驯化结果较为理想。

本实验室对 Y7 在添加有糠醛或 HMF 的培养基中的驯化也得到了相似的结果, 并且表现出了

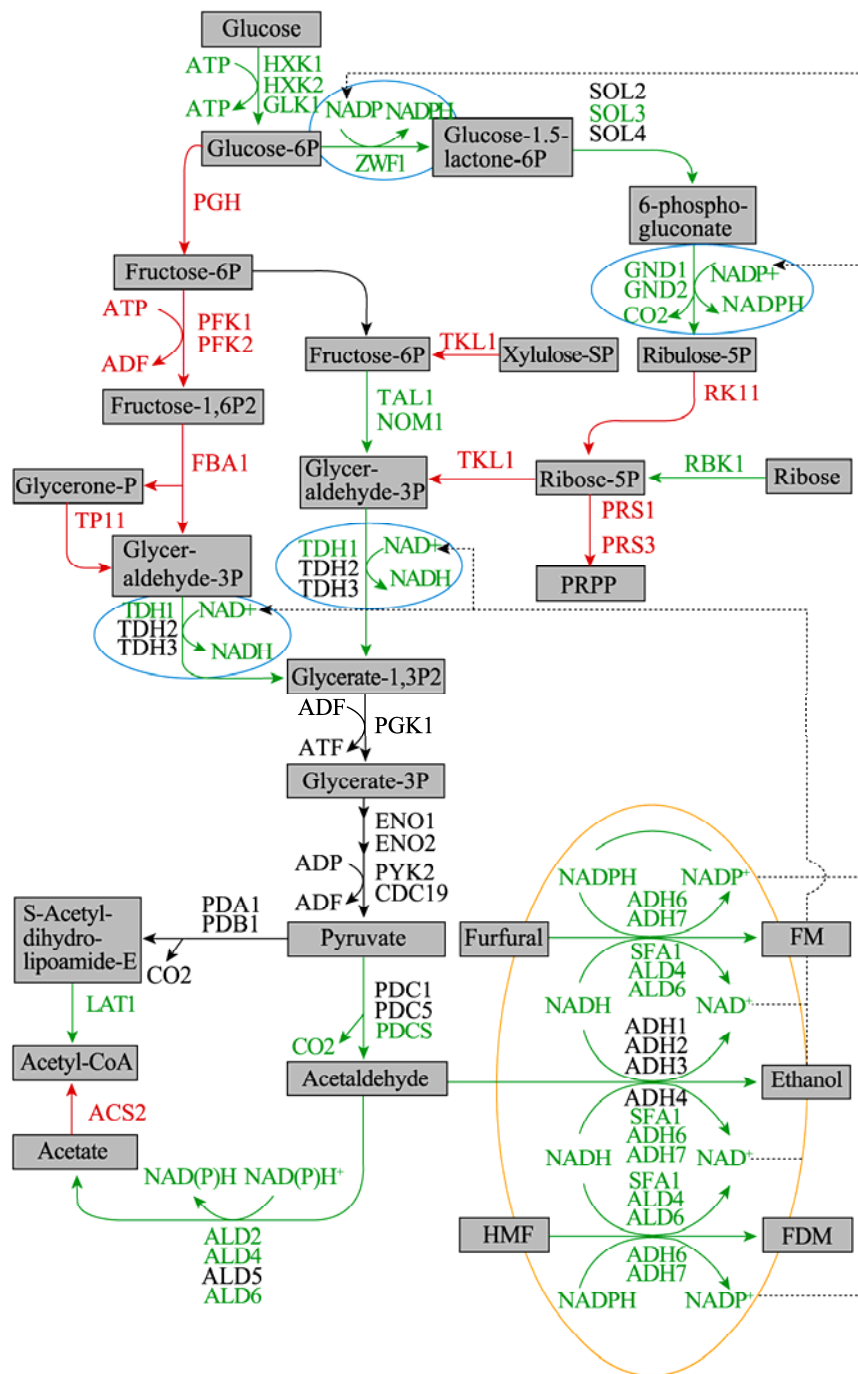


图3 酿酒酵母 NRRL Y-50049 糖代谢通路调节图^[8]

Fig. 3 A schematic illustration of glucose metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-50049^[8]

良好的抑制剂耐受性。在未脱毒的稀酸水解液中, 筛选的 Y7 可以在 72 h 内消耗完糖(葡萄糖、木糖), 乙醇产量达到理论值的 93.6%, 经过 24 h 的延滞期 Y7 最高能耐受 3 g/L 的糠醛和 5-羟甲基糠醛的

混合物。

Martin 等^[24]将酿酒酵母木糖利用重组菌株 TMB3001 在含有多重抑制物的甘蔗渣水解液进行了驯化。与出发菌株相比, 驯化菌株在含较

低浓度水解液(75%)的培养基中有较高的糠醛和HMF转化率,分别为74%和40%,而前者的转化率分别为22%和20%,同时在这一条件下,驯化菌株乙醇得率提高了83.3%,生物量提高了100%。

2.3 基因工程改造提高酿酒酵母的耐受性

对酵母进行特定的基因操作,可以使其具有更好的发酵生产乙醇能力^[25-26],对于提高抑制剂耐受性也有很大的应用前景,几种与呋喃醛类化合物转化有关的氧化还原酶已被鉴定且用于构建对木质纤维素水解液中抑制物有更高耐受性的酿酒酵母菌株^[27]。

Petersson 等^[20]分别在含有及不含 HMF 的培养基中对酿酒酵母实验室菌株 CBS8066 和高抑制剂耐受性菌株 TMB3000 进行培养,通过生物芯片技术分析得出 TMB3000 中至少有 15 种还原酶在 HMF 诱导下大量表达。分别将 15 种还原酶基因在酿酒酵母中进行超表达,与对照相比,超表达 *ADH6*、*ADH7* 或 *SFA1* 等基因,可增加 HMF 的还原能力。

Gorsich 等^[15]通过对酿酒酵母单基因突变体库的筛选,找到 62 种与糠醛耐受性相关的基因。对其中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的基因 *ZWF1* 进行超表达,酿酒酵母可以在高浓度的糠醛下生长,可能是因为超表达使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性增加,为糠醛还原酶或依赖 NADPH 的胁迫应激酶类(如谷胱甘肽还原酶)提供了大量的还原力。

对于增强酵母菌株对弱酸类、酚类化合物的耐受性也可以采取类似的方法,Endo 等^[28]通过对 *S. cerevisiae* BY4743 单基因缺失突变体的筛选找到 76 个与香草醛耐受性相关的基因。通过在酵母中表达白腐真菌 *Trametes versicolor* 漆酶基因得到的重组菌可以在含 1.25 mmol/L 松柏醛的培养基中生长,而此浓度的松柏醛完全抑制对照菌株。

Larsson 等^[29]将编码苯基丙烯酸脱羧酶的基因 *PAD1* 在酿酒酵母中超表达,超表达后的菌株在含有阿魏酸和肉桂酸的培养基中或是在云杉水解液中均有较高的生长速率和乙醇生产能力。在有氧或限氧的条件下,超表达 *PAD1* 的菌株转化阿魏酸和肉桂酸的速率都高于对照菌,在云杉稀酸水解液中,超表达菌株的糖消耗速率更快,且乙醇产生速率增加了 24%至 29%。

预处理产生的抑制物对酿酒酵母乙醇发酵的影响,是木质纤维素乙醇生物加工过程亟待解决的难题之一。近年来对抑制物形成、作用机制及酵母耐受机制的研究已经取得了很大进展,无论是采用自然筛选、菌种驯化还是利用基因工程手段,不断提高菌种的抑制剂耐受性才是最终的目标,表 1 着重介绍了近年来几株具有较好抑制剂耐受性菌株的耐受性能。其中 Y1、Y4、Y5、Y7 为本实验室专利菌株。

3 讨论与展望

研究表明,耐毒酵母菌株对于木质纤维素水解液中抑制剂的耐受与脱毒,是大量基因调控与相互作用的结果,尤其是在氧化还原反应中的还原酶,被认为是直接将醛类抑制剂进行还原从而降低它的毒性。整个代谢通路体系发生了调整变化,很多基因的表达在开始的阶段会受到一定的抑制,在菌株一段的延滞期适应与调整之后,活性得到恢复。另有研究报道,一些热激蛋白、激活蛋白基因家族等,对菌株的抑制剂耐受性也发挥着重要的作用。

除了抑制剂的毒性,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^[31-32],本文主要集中在醛类抑制剂耐性的研究,但是应该指出的是,抑制剂耐性与其他胁迫耐受性具有一定的联系,研究抑制剂耐性的同时应该关注对其他耐性条件的影响。抑制剂耐性的

表 1 抑制剂耐受菌株的发酵性能
Table 1 The performance of different inhibitor-resistant strains

菌种 Strains	抑制剂 Inhibitors (mmol/L)		延滞时间 Lag phase (h)	乙醇产量 Ethanol yield (g/g)	参考文献 Reference
<i>S.cerevisiae</i> ATCC211239	30	Furfural	24		Liu. ZL ^[7]
	60	HMF	24		
	10	Furfural+HMF	12		
<i>S.cerevisiae</i> 307-12H60	30	HMF	8	0.3	Liu Z. Lews ^[10]
<i>S.cerevisiae</i> NRRLY-50049	20	Furfural+HMF	12	0.43	Liu Z. Lews ^[8]
Y1	52	Furfural	24	0.49	Tian Shen ^[22]
	55	HMF	24		
	42	Furfural+31HMF	24		
Y4	52	Furfural	24	0.45	Tian Shen ^[22]
	55	HMF	24		
	42	Furfural+31HMF	24		
Y5	42	Furfural	24	0.47	Tian Shen ^[30]
	31	HMF	12		
	31	Furfural+24HMF	24		
Y7	42	Furfural	24	0.477	Tian Shen ^[22]
	31	HMF	24		
	31	Furfural+24HMF	24		

分子机制研究^[32]中,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抑制剂耐性分子机制的多样性。

目前对酵母耐性机制的研究主要是对表型、基因、蛋白或者代谢物中的某一方面的分析。虽然发现了一些胁迫相关基因和关键的细胞保护物质,但是胁迫过程中的表型特征、基因调控和物质代谢之间的关系还不甚清楚,因此细胞表型、基因转录与物质代谢之间的相互解读更有利于了解酵母在胁迫下所发生的一系列应激响应。目前本实验课题组也致力于此方面的研究,希望通过细胞表型响应、基因转录和蛋白表达水平进行全面的阐述,进一步打开酿酒酵母物质响应的黑匣子。通过胁迫前后酵母代谢通量的变化,找

到胁迫扰动的代谢途径,实时动态的分析酵母的耐性机制,以期对工业酿酒酵母的育种提供更为直接的方向指导。

总之,随着从菌株的粗放式筛选到分子生物学水平的深入研究,人们对酿酒酵母菌株耐性机制的探究得到了长足的发展,从而最终将解决木质纤维素制取燃料乙醇菌种这一主要技术瓶颈,从根本上推进纤维素乙醇的工业化进程。

参 考 文 献

[1] Luo CD, Brink DL, Blanch HW. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol[J]. Biomass and Bioenergy, 2002, 22(2): 125-138.
[2] Palmquist E, Almeida JS, Hahn-Hägerdal B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of

- saccharomyces cerevisiae* in batch culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 62(4): 447–454.
- [3] Modig T, Lidén G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase[J]. The Biochemical Journal, 2002, 363 (Pt 3): 769–776.
- [4] Liu ZL, Blaschek HP. Lignocellulosic biomass conversion to Ethanol by *Saccharomyces*[A]/Vertès AA, Qureshi N, Yukawa HP, et al. Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries[M]. Bioenergy, 2010: 17–36.
- [5] Nichols NN, Dien BS, Cotta MA. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(19): 7545–7550.
- [6] Boopathy R, Bokang H, Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1993, 11(3): 147–150.
- [7] Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004, 31(8): 345–352.
- [8] Liu ZL, Ma MG, Song MZ. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 282(3): 233–244.
- [9] 李洪兴, 张笑然, 沈煜, 等. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1321–1328.
- [10] Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005, 121–124(1/3): 451–460.
- [11] Liu ZL. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(1): 27–36.
- [12] Liu ZL, Slininger PJ. Development of genetically engineered stress tolerant ethanologenic yeasts using integrated functional genomics for effective biomass conversion to ethanol[R]. CAB International, Wallingford, UK, 2005: 283–294.
- [13] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(3/4): 151–159.
- [14] 林贝, 赵心清, 葛旭萌, 等. 玉米秸秆酸解副产物对重组酿酒酵母 6508–127 发酵的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7): 61–67.
- [15] Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(3): 339–349.
- [16] Ma MG, Liu ZL. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4*, and *HSF1* as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 660.
- [17] Liu ZL, Moon J, Andersh BJ, et al. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(4): 743–753.
- [18] Song M, Ouyang Z, Liu ZL. Discrete dynamical system modelling for gene regulatory networks of 5-hydroxymethylfurfural tolerance for ethanologenic yeast[J]. IET Systems Biology, 2009, 3(3): 203–218.
- [19] Liu ZL. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 809–825.
- [20] Petersson A, Almeida JR, Modig T, et al. A 5-hydroxymethylfurfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae ADH6* gene con-

- veys HMF tolerance[J]. *Yeast*, 2006, 23(6): 455–464.
- [21] Bro C, Regenberg B, Nielsen J. Genome-wide transcriptional response of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with an altered redox metabolism[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(3): 269–276.
- [22] Tian S, Zhou GX, Yan F, et al. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(5): 656–660.
- [23] Liu ZL. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(1): 27–36.
- [24] Martín C, Marcet M, Almazán O, et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(9): 1767–1773.
- [25] Jeffries TW, Shi NQ. Genetic engineering for improved Xylose fermentation by yeasts[J]. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1999, 65: 117–161.
- [26] Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J. Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(1): 34–50.
- [27] Almeida JRM, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund MF, et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(4): 625–638.
- [28] Endo A, Nakamura T, Ando A, et al. Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2008, 1(1): 3.
- [29] Larsson S, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae Pad1p* on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(1/2): 167–174.
- [30] Tian S, Zhu JY, Yang XS. Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood[J]. *Applied Energy*, 2011, 88(5): 1792–1796.
- [31] Attfield PV. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(13): 1351–1357.
- [32] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(5): 535–569.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。