

微生物耐受乙醇与丁醇机制及其在生物燃料生产与生物转化中的应用

李汉广^{1,2} 周秋香³ 罗玮¹ 王强¹ 李国莹¹ 赵张敏¹ 余晓斌^{1*}

(1. 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江西农业大学 生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

(3. 江西农业大学附属医院 江西 南昌 330045)

摘要: 生物法获取乙醇与丁醇过程中有机溶剂的毒性是生产菌重要环境胁迫因素之一, 且当有机溶剂超过一定浓度时便会抑制微生物的生长, 甚至引起微生物的死亡, 因此提高工业微生物的有机溶剂耐受性对工业生产具有重要的意义。对微生物乙醇及丁醇耐受机制的研究可为选育具有较强溶剂耐受菌提供理论基础。本文系统介绍了微生物耐受乙醇与丁醇的机制, 并对其在生物燃料生产及生物转化中面临的机遇与挑战等问题进行简要的评述。

关键词: 溶剂耐受性, 机制, 应用, 生物燃料

Applications of microbial ethanol and butanol tolerance in biofuel production and biotransformation

LI Han-Guang^{1,2} ZHOU Qiu-Xiang³ LUO Wei¹ WANG Qiang¹ LI Guo-Ying¹
ZHAO Zhang-Min¹ YU Xiao-Bin^{1*}

(1. *The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China*)

(2. *College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China*)

(3. *Affiliated Hospital of Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China*)

Abstract: Solvent toxicity to producing microorganisms is one of the key stress elements during ethanol and butanol production by microbial fermentation. Furthermore, ethanol and butanol inhibit microbial growth and even cause cell death when the concentration reaches a certain value. Improvement of solvent tolerance of these microorganisms is important for industrial applications. Research on the ethanol and butanol tolerance mechanisms of microorganisms can provide basis for breeding of producing strains with improved solvent tolerance. In this paper, we reviewed ethanol and butanol tolerance mechanisms of microorganisms. The opportunities and challenges in the applications for biofuel and biotransformation are also discussed.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21176105, 21466014)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918167; 信箱: lhg7886@sohu.com

收稿日期: 2013-12-05; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

Keywords: Solvent tolerance, Mechanism, Application, Biofuel

随着化石燃料资源供给日益紧张,以及人们对环境保护意识的持续提高,以可再生原料生产能源物质成为全球优先发展的战略。由于乙醇能以淀粉和蔗糖类物质为底物通过微生物发酵法生产,因此乙醇是被认为是一种可替代的燃料物质^[1]。除乙醇之外,丁醇被认为是另一种潜在的可替代的新型生物燃料,无论是燃烧值还是辛烷值丁醇与汽油最为接近。此外丁醇还具备许多优于生物乙醇的特点,如亲水性弱、腐蚀性小、便于管道输送,且能与汽油任意比混合,无需对汽车发动机进行改造,将是替代汽油最理想的生物燃料。因此,近年来以发酵法生产丁醇重新受到人们的重视^[2-3]。

从已有文献可知常用的乙醇生产菌主要为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。而目前丁醇发酵工业主要采用厌氧梭状芽孢杆菌如 *Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii* 等(见表 1)。然而,与其它发酵工业相比,乙醇、丁醇发酵产物主要为有机溶剂,研究表明当乙醇在培养液中累积到一定浓度时,便对酵母细胞产生毒性效应^[4]。而当进行丙酮丁醇发酵时,在分批发酵过程中,通常当发酵液中丁醇浓度超过 13.0 g/L 时便抑止生产菌的生长,而当浓度超过 20.0 g/L 时则对细胞产生毒性效应^[5]。有机溶剂对细胞产生毒性的结果将限制乙醇及丁醇在发酵液中的累积,从而当发酵结束时出现低产物浓度及低产率现象,而提高生产菌的

溶剂耐受性可以保证微生物细胞在发酵过程中保持较好的细胞活性和较高的发酵性能;因此,微生物细胞的乙醇与丁醇耐受性重新成为世界范围内的研究热点。各国科学工作者从细胞和分子水平对微生物细胞的溶剂耐受性进行了较为全面的研究,发现了很多与溶剂耐受性相关的细胞形态及细胞膜脂肪组成的变化和与溶剂耐受性相关的特定基因,并在此基础上对微生物细胞进行了相应的改造,成功提高了微生物细胞的溶剂耐受性。本文系统介绍了近年乙醇与丁醇的溶剂耐受机制研究进展,并展望了其在生物燃料发酵行业与移除严重污染的环境微生物技术等方面的应用前景。

1 微生物耐受乙醇与丁醇机制

1.1 一般应激反应

在有机溶剂存在的胁迫环境中,耐受菌普遍会被诱发大量应激蛋白以抵抗有机溶剂的毒性侵害。Isar 等^[10]通过蛋白印迹分析(Western blot analysis) *Clostridium beijerinckii* ATCC 10132 及其溶剂耐受性突变菌时发现,将野生菌与突变菌置于 0–25%浓度的丁醇环境中,丁醇耐受菌的热激蛋白表达量明显高于野生菌。Mann 等^[3]研究发现当 *Clostridium acetobutylicum* 过量表达相应编码应激反应蛋白基因 *groESL*、*grpE* 和 *hspG* 时其重组菌的丁醇耐受性大大提高,将重组菌与野生菌置于 2%丁醇环境 2 h

表 1 已报道的部分常用乙醇和丁醇生产菌 Table 1 Some strains for producing ethanol or butanol			
菌株 Strains	丁醇耐受性 Butanol tolerance (%，V/V)	乙醇耐受性 Ethanol tolerance (%，V/V)	参考文献 References
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	2.0	—	[6]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> P262	2.0	—	[7]
<i>Clostridium beijerinckii</i> MUT3	4.3	—	[2]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	18.0	[8]
<i>Enterobacter</i> sp. VKGH12	1.5	—	[9]
<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 10132	3.1	—	[10]
<i>Clostridium beijerinckii</i> BA101	1.96	—	[11]

注：—：未实施相关耐受性试验。
Note: —: No tolerance test performed.

后,野生菌不能存活而工程菌仍能保持较高的活力,进一步研究证明重组菌 *groESL*、*grpE* 和 *htpG* 基因的表达量较野生菌分别提高 45%、25%和 56%。而酵母菌的乙醇耐性同样与热休克蛋白质(Heat shock protein)的合成有关。Alexandre 等^[12]研究了酿酒酵母在含有 7% (体积比)乙醇的培养基中处理 30 min 后细胞全局的基因转录分析(Transcriptional analysis)结果;而随后 Chandler 等^[13]研究了酿酒酵母在含有 5% (体积比)乙醇的培养基中好氧培养的基因微阵列分析(Gene microarray analysis)结果,两者的分析结果均表明,热休克蛋白质基因 *Hsp104*、*Hsp26*、*Hsp30*、*Hsp70* 和 *Hsp12* 在乙醇环境胁迫下转录水平提高幅度较大。池振明等^[14]指出通过热冲击产生的蛋白能使酵母菌获得热抗性外,还能提高它们的乙醇耐受能力。一旦酵母细胞在乙醇环境胁迫下产生热冲击蛋白,它们在乙醇环境下的存活力便得到提高,因此,可以通过热冲击处理获得耐乙醇的酵母菌。例如,利用热冲击和乙醇胁迫处理技术获得一株耐受高浓度乙醇酵母菌 37(5),该突变菌能在含 15%–17% (体积比)的乙醇培养基中生长,与原始菌相比,乙醇的耐受能力有较大的提高。Michel 等^[15]通过二维凝胶电泳技术(Two-dimensional gel electrophoresis) (³⁵S)蛋氨酸标记的多肽)分析 *Zymomonas mobilis* 对乙醇的应激反应时发现,有 7 种多肽(66、54、38、31、18.5、16.5 和 14 kD)参与了该应激反应,其中 6 种多肽效应热击反应。

除产生应激蛋白以降低有机溶剂对细胞的毒害外,海藻糖与脯氨酸的合成也是微生物耐受乙醇与丁醇的应急策略之一。Pereira 等^[16]对海藻糖合成酶基因 *TPSI* 的突变体进行热处理,结果发现酿酒酵母对热激和乙醇的耐受性明显降低,从而推测海藻糖合成酶基因对乙醇耐受性的重要性。Lucero 等^[17]研究发现在乙醇胁迫诱导下出现海藻糖的积累。Lei 等^[18]通过研究自絮酵母 SPSC01 的乙醇耐受机制时也证明了海藻糖的积累与乙醇耐受性具有一定的相关性。Sekine 等^[19]研究发现编码酿酒

酵母 γ -谷氨酰蛋白激酶的基因 *PROI* 的点突变(D154N)导致细胞过量积累脯氨酸,同时此种酵母突变体的乙醇耐受性得到提高,显示了胞内脯氨酸含量与酵母细胞乙醇耐受性之间有一定的相关性。张穗生等^[20]研究认为脯氨酸是一种渗透保护物质,而海藻糖在逆境环境胁迫下对细胞具有保护作用,脯氨酸与海藻糖可以减少膜的渗透性改变、防止蛋白质变性,当微生物细胞受到有机溶剂胁迫时,细胞会增加胞内脯氨酸与海藻糖的含量以增强细胞的溶剂耐受性。

1.2 细胞形态的变化

微生物细胞在有机溶剂压力下,通过改变细胞比表面积,减少细胞壁疏水性成份,造成其与有机溶剂亲和力大大降低,以避免溶剂毒性^[21]。Chakravarty 与 Banerjee^[22]研究发现,当细胞生长在含有 3-甲基-1-丁醇的培养基中,*B. licheniformis* S-86 细胞体积增加到初始值的 4.7 倍,导致细胞比表面积大大减少,从而减少其与有机溶剂接触面积,同时也能激发其它溶剂耐受机制,如提高毒物排泄泵的工作效率。Torres 等^[23]通过透射电镜进一步证实,当 *B. licheniformis* S-86 细胞存在于有机溶剂中其细胞壁明显增厚,细胞壁与质膜之间形成一层隔膜从而阻挡有机溶剂渗透入胞内。Zhang 等^[24]发现,当 *E. coli* 及突变株 MT5 处于 1.2%丁醇环境中,MT5 的生长速率是其原始菌的 2 倍,通过油气微生物粘附试验证明 MT5 的细胞表面疏水性低于原始菌。当微生物细胞处于有机溶剂环境中,细胞对其做出不同的应激反应,产生不同的细胞形貌特征。说明改变细胞比表面积,减少细胞壁疏水性成份,这种细胞形态特征的变化也是微生物细胞自身应对环境胁迫变化的一种重要的适应机制。

1.3 细胞膜调节机制

微生物细胞膜既是细胞与外界物质交换的通道,而且对细胞内能量传导有着特殊的意义,同时直接影响到微生物的溶剂耐受性^[25-26]。微生物细胞在适应有机溶剂进化的过程中,通过增加细胞膜饱和/不饱和脂肪酸的比率、细胞膜不饱和脂肪酸的

顺-反异构化及磷脂极性头部的变化等来提高其溶剂耐受性^[27,10]。

Mishra^[28]研究发现富含磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)的酿酒酵母对乙醇具有抗性,而富含磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)和卵磷脂(Phosphatidylcholine, PE)的酿酒酵母对乙醇的抗性较差。Arneborg 等^[29]根据他们的研究结果推测磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI)可能在酵母细胞适应乙醇胁迫过程中起主要的作用。当增加革兰氏阳性溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)所处环境有机溶剂浓度时,研究者发现其细胞膜脂肪酸组成中反式脂肪酸比例由 25.8% 增加到 33.7%,而 20:0 的直链脂肪酸的比例从 19.3% 下降至 10.1%^[30]。Vollherbst-Schneck 等^[31]研究发现当向培养液中添加 1% 的丁醇时, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 细胞膜的流动性大约增加 20%–30%, 当 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 处于丁醇环境胁迫时,其细胞膜会增加饱和脂肪酸的合成水平,相反会减少不饱和脂肪酸的合成速率。Michel 等^[32]通过研究发现,当 *Zymomonas mobilis* 处于乙醇环境时,其细胞膜蛋白将做出相应的改变。

1.4 细胞能量代谢调节

微生物细胞可以通过多种生理功能的改变来提高其对乙醇及丁醇的耐受能力,这些生理功能包括营养物质与离子的运输及细胞代谢等。Jia 等^[33]研究发现,当微生物细胞处于丁醇环境时,胞内 pH 降低而导致跨膜 pH 梯度消失,最终细胞膜 ATPases 活力受到抑制;同时丁醇还能抑制葡萄糖的吸收,从而影响细胞能量代谢,导致胞内 ATP 水平下降。Zheng 等^[34]研究发现 *Clostridium acetobutylicum* 丁醇耐受突变菌在产溶剂阶段能通过非磷酸转移酶系统更高效摄取葡萄糖。因此,Zheng 等认为葡萄糖摄取方法的改变可能与 *Clostridia* 的丁醇耐受性具有相关性。Ezeji 等^[35]认为当溶剂耐受菌处于

丁醇环境压力之下,耐受菌会通过细胞膜的改变以降低葡萄糖吸收、TCA 循环的使用以及氧化还原辅因子的再生率等,从而达到降低细胞维持的能量需求。Alexander 等^[12]和 Chandler 等^[13]通过研究酿酒酵母的乙醇耐受性试验发现,当酿酒酵母受到乙醇胁迫后其与糖酵解相关基因 *GLK1*、*HXK1*、*TDH1*、*ALD4* 和 *PGM* 的转录水平均得到提高。Guimaraes 等^[36]通过研究酿酒酵母发酵过程中酵母胞内及发酵液 ATP、ADP 和 AMP 的浓度变化时发现,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;同样,葡萄糖的主动运输也依赖于能荷的维持。进一步分析证实,当发酵液中的葡萄糖浓度很低时,细胞的能荷不能正常维持,细胞活性将急剧下降,因此说明了细胞能量代谢与乙醇耐受性的重要关系。

2 乙醇与丁醇耐受菌在生物燃料生产及生物转化中的应用

2.1 在乙醇与丁醇发酵工业中的应用

由于代谢工程、分子生物学及发酵耦合分离技术等发酵工业中的应用,微生物发酵法生产有价值的代谢产物(如乙醇、丁醇等)才具有明显的商业价值。目前由微生物产生有价值的生物燃料或其衍生物如图 1 所示^[37],从图 1 可知不同的底物通过微生物转化能产生不同的代谢产物。然而,由于发酵液中有溶剂(乙醇及丁醇)的毒性,最终会影响发酵终产物的产率及生产成本。因此,通过对微生物溶剂耐受性机制的研究,以较为理性方式寻找溶剂耐受性菌是解决此关键问题的一种重要且简便的方法。

Basso 等^[38]通过不断提高生产菌的乙醇耐受性时发现,乙醇的产率也相应得到提高,从而使生物乙醇更具商业价值。当然人们还可以通过其它的工艺过程来提高生物乙醇的竞争力,比如采用较高

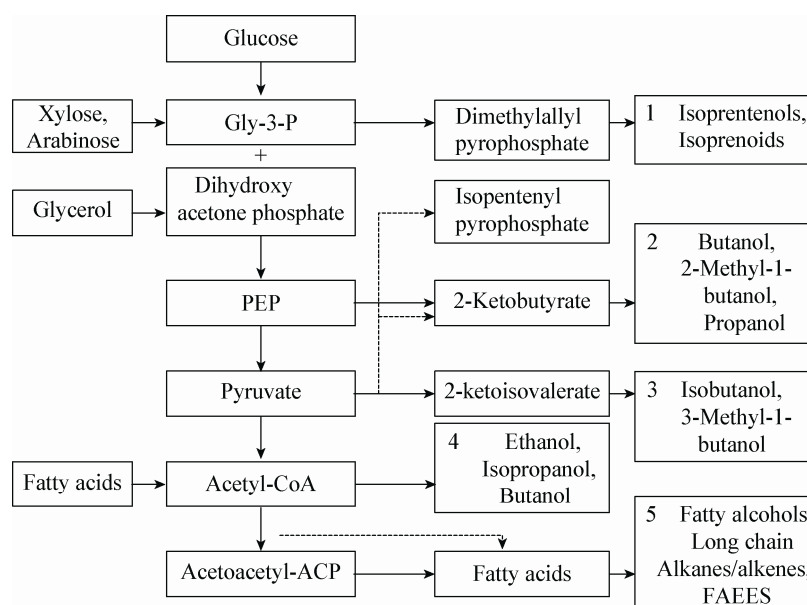


图 1 由“生物燃料底物”合成生物燃料及其潜在衍生产品简图

Figure 1 A general schematic demonstrating the catabolic incorporation of “biofuel substrates” and potential products generated therefrom

的发酵温度,同时及时移除发酵液中的乙醇从而降低乙醇带来的不利影响,尽管如此,如何提高微生物细胞的乙醇耐受性仍是科学工作者研究的热点^[39]。丁醇的毒性和较高的沸点是限制发酵法生产丁醇的主要障碍。然而,近年来在中国和俄罗斯,科学工作者通过连续培养及逐级驯化的方法筛选出丁醇高产菌,丁醇生产企业相继投产^[40-41]。Shi等^[42]对酿酒酵母 SM-3 进行了基因组改组工作,最终获得了可耐受 25% (体积比)乙醇和 55 °C 高温突变株,远优于原始菌[耐受 10% (体积比)乙醇和 40 °C 高温]。Alper 等^[43]采用全转录工程(Global transcription machine engineering, gTME)方法,成功地对关键转录因子 *spt15* 进行了改造,获得了乙醇耐受性大大提高的突变菌,进一步研究发现突变菌的生长速度与原始菌相比也得到了很大的提高。Ting 等^[44]从自然环境筛选一株丁醇高耐受性菌株[能耐受 2.5%–3.0% (质量体积比)丁醇],经 16S rRNA 基因鉴定为 *Enterococcus faecium*。后经研究发现该菌在有氧与无氧条件下均能生长且在厌氧条件下能产生丁醇,与严格厌氧 *Clostridium*

acetobutylicum 相比,该菌无论在有氧或无氧条件下均没有丁酸生成且无两阶段发酵现象,因此,研究者推测 *Enterococcus faecium* 的代谢途径有别于 *Clostridium acetobutylicum*;除开高丁醇耐受性外,该菌株还能经受 10%乙醇(质量体积比)和 3.0%异丁醇(质量体积比)的冲击,因此研究者认为此菌可开发为一种潜在的丁醇生产菌。Jang 等^[45]以 *Clostridium acetobutylicum* PJC4BK 为出发菌株,通过亚硝基胍 (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, NTG)诱变并结合理性筛选模型,获得丁醇高耐受性菌 BKM19,经分批发酵试验发现其总溶剂产量为 32.5 g/L (17.6 g/L 丁醇, 10.5 g/L 乙醇, 丙酮 4.4 g/L),其总溶剂产量较原始菌提高 30.5%;以高密度连续发酵工艺进行丁醇生产,当稀释率为 0.85 h⁻¹ 时,其最大的丁醇及总溶剂产率分别为 9.6 g/(L·h) 和 20.0 g/(L·h)。Guo 等^[46]以 *Clostridium acetobutylicum* 为出发菌株,通过 N⁺束注入诱变技术(Low-energy ion implantation)进行诱变,获得一株高耐受性菌株 IB4,经研究发现当以葡萄糖为碳源时,IB4 的丁醇及总溶剂产量分别为 9.1 g/L 和 12.4 g/L,分别较

原始菌提高 28% 和 17% (原始菌 7.1 g/L 丁醇, 10.6 g/L 总溶剂)。且当 IB4 以除毒后的玉米纤维稀硫酸水解液为碳源进行丁醇生产时发现, 与原始菌相比其表现出良好的丁醇产率。本实验室以 *Clostridium beijerinckii* L175 为出发菌株, 通过 N^+ 束注入耦合 NTG 诱变技术, 同时结合理性筛选模型获得一株高丁醇耐菌 MUT3, 当以葡萄糖为碳源时其丁醇产量为 15.8 ± 0.7 g/L, 较原始菌高出 46% (同等条件下原始菌丁醇产量 10.8 ± 0.6 g/L), 当 MUT3 以糖蜜为碳源时, 在分批发酵时其丁醇与总溶剂产量分别为 15.1 ± 0.8 g/L 和 22.1 ± 0.9 g/L; 而相同发酵条件下, 原始菌丁醇与总溶剂产量分别为 11.2 ± 0.8 g/L 和 14.9 ± 0.7 g/L^[2]。Malaviya 等^[47]以 *Clostridium pasteurianum* 突变株为生产菌, 以甘油为主要碳源, 通过高密度连续发酵工艺进行丁醇发酵, 当稀释率为 0.9 h^{-1} 时, 总溶剂及丁醇的产率分别为 8.3 g/(L·h) 和 7.8 g/(L·h)。Yang 等^[48]通过过量表达 *ADPI* 基因时发现, 在 5.0%–7.5% 的乙醇环境中, 突变菌的生长速率及乙醇产率均高于原始菌, 进一步研究发现突变株的乙醇产率及产量分别高出原始菌 20%–50%。

2.2 在生物转化领域中的应用

由于各国在工业化过程中未对环境保护产生足够的重视, 导致全球很多地方出现严重的环境问题, 有机溶剂是各种污染的主要来源之一。由于乙醇与丁醇耐受菌及其它溶剂耐受菌具备在极端环境中生存及生长的能力, 因此, 乙醇与丁醇耐受菌及其它溶剂耐受菌不但可以用于生物燃料的生产, 而且在生物修复与污水处理, 特别是在生物转化领域有着重要的用途^[49]。Lim 等^[50]研究发现, 利用有机溶剂耐受菌 *Pseudomonas putida* 对被酮类、醇类及醚类等有机溶剂污染过的土壤及水环境进行生物修复, 取得了一定的效果。Ramos-Gonzalez 等^[51]研究发现, 高有机溶剂耐受菌 *Pseudomonas putida* 是一些剧毒化合物理想的生物转化载体, 并通过改造已经成功将甲苯转化为 4-羟基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoate, 4-HBA), 而 4-HBA 广泛用于

有机合成和液体玻璃行业中, 因此利用有机溶剂耐受微生物进行生物修复, 通过其生物转化, 不但能消除环境污染, 而且有时还能变废为宝。然而我国在此领域尚属起步阶段。本实验室以乙醇发酵废水为主要原料, 以丁醇耐受菌为生产菌进行丁醇发酵试验, 经前期试验证明此种清洁生产模式可行。

3 问题与展望

本文系统回顾了微生物耐受乙醇及丁醇的主要机制, 其中细胞膜的调节机制是最为普遍的。其主要通过改变细胞膜脂中饱和/不饱和和脂肪酸的比例、细胞膜不饱和脂肪酸的顺-反异构化及磷脂极性头部的变化等来调节细胞的溶剂耐受性。然而, 除了有机溶剂毒性外, 乙醇与丁醇生产菌在发酵过程中还受到许多其它胁迫因素的影响, 如高渗透压、高温等, 有机溶剂耐受性与其它胁迫耐受性具有一定的联系^[52]。随着各种“组学”(Omics)技术(特别是蛋白质组学技术, Proteomics)及系统生物学 (Systems biology) 的发展, 人们可以更为广泛的了解溶剂耐受菌的生理反应。因此有理由相信在不久的将来更多的溶剂耐受机制将被人们发现。

在过去的近二十年中, 由于受到化学与制药行业启发, 人们已经系统研究了有机溶剂环境下生物催化这一领域。然而, 在有机溶剂环境下酶的稳定性与催化效率仍是一个不可避免的问题。有机溶剂耐受菌所产生的酶类具有耐受极端条件的能力, 因此有机溶剂耐受菌被认为是解决这一问题的有效途径。另外, 开发环境修复和全细胞催化剂的溶剂耐受性菌, 用于移除严重污染的环境技术, 将具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Dien B, Cotta M, Jeffries T. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63(3): 258-266.
- [2] Han-guang L, Wei L, Qiu-ya G, et al. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction[J]. Bioresource Technology, 2013, 137: 254-260.

- [3] Mann MS, Dragovic Z, Schirmacher G, et al. Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(9): 1643-1649.
- [4] 刘石雪, 王乔平, 唐丽薇, 等. 酿酒酵母乙醇耐受性的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(6): 105-110.
- [5] Mariano AP, Qureshi N, Ezeji TC. Bioproduction of butanol in bioreactors: New insights from simultaneous in situ butanol recovery to eliminate product toxicity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(8): 1757-1765.
- [6] Lin YL, Blaschek HP. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(3): 966-973.
- [7] Madihah M, Ariff A, Sahaid K, et al. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(6): 567-576.
- [8] Watanabe M, Tamura K, Magbanua JP, et al. Elevated expression of genes under the control of stress response element (STRE) and Msn2p in an ethanol-tolerance sake yeast Kyokai no. 11[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(3): 163-170.
- [9] Veeranagouda Y, Karegoudar TB, Neumann G, et al. *Enterobacter* sp. VKGH12 growing with n-butanol as the sole carbon source and cells to which the alcohol is added as pure toxin show considerable differences in their adaptive responses[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254(1): 48-54.
- [10] Isar J, Rangaswamy V. Improved n-butanol production by solvent tolerant *Clostridium beijerinckii*[J]. Biomass and Bioenergy, 2012, 37: 9-15.
- [11] Qureshi N, Blaschek HP. Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(4): 594-602.
- [12] Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 2001, 498(1): 98-103.
- [13] Chandler M, Stanley G, Rogers P, et al. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Annals of Microbiology, 2004, 54(4): 427-454.
- [14] 池振明, 高峻. 酵母菌耐酒精机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 373-376.
- [15] Michel G, Starka J. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 165(3): 1040-1042.
- [16] Pereira MD, Eleutherio EC, Panek AD. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Microbiology, 2001, 1(1): 11.
- [17] Lucero P, Penalver E, Moreno E, et al. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4456-4461.
- [18] Lei J, Zhao X, Xue C, et al. Influence of floc size distribution on the ethanol tolerance of a self-flocculating yeast strain SPSC01[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(2): 309.
- [19] Sekine T, Kawaguchi A, Hamano Y, et al. Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(12): 4011-4019.
- [20] 张穗生, 黄日波, 周兴, 等. 酿酒酵母乙醇耐受性机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1604-1608.
- [21] Sardesai YN, Bhosle S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria[J]. Biotechnology Progress, 2004, 20(3): 655-660.
- [22] Chakravarty R, Banerjee PC. Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals[J]. Extremophiles, 2008, 12(2): 279-284.
- [23] Torres S, Baigori MD, Swathy S, et al. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase[J]. Food Research International, 2009, 42(4): 454-460.
- [24] Zhang H, Chong H, Ching CB, et al. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4): 1107-1117.
- [25] Nikaido H. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 4-8.
- [26] Segura A, Molina L, Fillet S, et al. Solvent tolerance in gram-negative bacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(3): 415-421.
- [27] 王鑫昕, 王少华, 李维, 等. 细菌的有机溶剂耐受机制[J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 641-649.
- [28] Mishra P. Tolerance of fungi to ethanol[J]. Mycology Series, 1993, 10.
- [29] Arneborg N, Høy CE, Jørgensen O. The effect of ethanol and specific growth rate on the lipid content and composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in a chemostat[J]. Yeast, 1995, 11(10): 953-959.
- [30] Nielsen LE, Kadavy DR, Rajagopal S, et al. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5171-5176.
- [31] Vollherbst-Schneck K, Sands J, Montencourt B. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47(1): 193-194.
- [32] Michel G, Azoulay T, Starka J. Ethanol effect on the membrane protein pattern of *Zymomonas mobilis*[A]// Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie[M]. Amsterdam: Elsevier, 1985: 173-179.
- [33] Jia K, Zhang Y, Li Y. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance[J].

- Engineering in Life Sciences, 2010, 10(5): 422-429.
- [34] Zheng YN, Li LZ, Xian M, et al. Problems with the microbial production of butanol[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(9): 1127-1138.
- [35] Ezeji T, Milne C, Price ND, et al. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1697-1712.
- [36] Guimaraes PM, Londesborough J. The adenylate energy charge and specific fermentation rate of brewer's yeasts fermenting high-and very high-gravity worts[J]. Yeast, 2008, 25(1): 47-58.
- [37] Taylor M, Ramond JB, Tuffin M, et al. Mechanisms and applications of microbial solvent tolerance[A]/Microbial Stress Tolerance for Biofuels[M]. Berlin: Springer, 2012: 177-208.
- [38] Basso LC, De Amorim HV, De Oliveira AJ, et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8(7): 1155-1163.
- [39] Taylor MP, Eley KL, Martin S, et al. Thermophilic ethanologenes: future prospects for second-generation bioethanol production[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(7): 398-405.
- [40] Ni Y, Sun Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(3): 415-423.
- [41] Zverlov V, Berezina O, Velikodvorskaya G, et al. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 587-597.
- [42] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(1): 139-147.
- [43] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production[J]. Science, 2006, 314(5805): 1565-1568.
- [44] Ting CN, Wu J, Takahashi K, et al. Screened butanol-tolerant *Enterococcus faecium* capable of butanol production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(6): 1672-1680.
- [45] Jang YS, Malaviya A, Lee SY. Acetone-butanol-ethanol production with high productivity using *Clostridium acetobutylicum* BKM19[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(6): 1646-1653.
- [46] Guo T, Tang Y, Zhang QY, et al. *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor tolerance obtained by low-energy ion implantation[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(3): 401-407.
- [47] Malaviya A, Jang YS, Lee SY. Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of *Clostridium pasteurianum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(4): 1485-1494.
- [48] Yang KM, Woo JM, Lee SM, et al. Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpressing an ATP-binding cassette efflux pump[J]. Chemical Engineering Science, 2012, 105(15): 74-78.
- [49] Watanabe H, Tanji Y, Unno H, et al. Rapid conversion of toluene by an *Acinetobacter* sp. Tol 5 mutant showing monolayer adsorption to water-oil interface[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(3): 226-230.
- [50] Lim DB, Kim K, Lee SJ, et al. *Pseudomonas putida* tolerant organic solvent: United States Patents, US 6136589[P]. 2000-10-24.
- [51] Ramos-González MI, Ben-Bassat A, Campos MJ, et al. Genetic engineering of a highly solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to p-hydroxybenzoate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5120-5127.
- [52] Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(5): 535-569.