

酵母耐热性研究及在乙醇生产中的应用

刘月芹,贺晓龙,赵瑞华*

(延安大学 生命科学学院,陕西 延安 716000)

摘要:近年来,提高酵母的耐热性研究已成为国内外学者关注的热点。鉴于此,该文首先概述了酵母耐热机制方面的研究进展,接着总结了目前对酵母的耐热性改造方法及其耐热酵母在乙醇生产中的应用,最后提出可以通过基因全局调控、蛋白质质量控制体系或工程优化等方法进一步提高酵母耐热性,并期望能将理论研究应用于生产实践。

关键词:酵母;耐热机制;耐热性改造;乙醇生产

中图分类号:Q939.95 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-602X(2018)01-0076-04

近年来,就全球范围内,以酿酒酵母作为微生物细胞发酵工厂每年大概可以生产出1000亿升的燃料乙醇,燃料乙醇的生产不仅引起广大学者的关注^[1,2],而且已成为世界各国发展再生能源的潮流^[3]。虽然很多微生物可应用于生产乙醇,但酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)仍是首选菌株^[4]。我们知道酵母最适的生长温度在28~33℃,而在实际的发酵过程中,由于多种因素的影响会导致酵母发酵温度高达40℃以上。这样就会大大降低酵母细胞的存活率,导致产生低水平的乙醇^[5,6]。如果能选育出耐受40℃以上的耐热酵母,就可以缩短发酵周期、减少染菌机率 and 冷却水使用费用,实现发酵温度与酶的最佳催化活性兼容^[7]。因此提高酵母的耐热性,使其在较高温度下仍保持较强的存活能力,进而才能满足工业生产的需求。

在发酵工业,提高酵母细胞的耐热性对高效生产生物化学品和生物燃料是非常重要的^[8]。为此国内外的学者对于酵母耐热性研究的热度有增无减。

1 酵母耐热机制研究

酵母的耐热机制为选育耐热菌株提供了较好的

理论基础^[5]。酵母耐热的生化机制受多种因素控制。研究表明热激蛋白、海藻糖、甘油、ATP酶以及特殊的细胞膜结构等,这些因素在酵母耐热机制中扮演着重要角色^[9]。然而目前研究最清楚的是以热激转录因子启动表达的热激蛋白(Heat shock proteins, HSP)为主要耐热分子的HSR(heat shock response)途径。当酵母受到热胁迫时,短时间内,细胞内会产生大量错误折叠的,未折叠的及变性的蛋白质,正是由于这些蛋白质的存在使得酵母细胞在热激转录因子Hsf1p和Msn2p/4p两种不同响应模式激活和调控下,大量合成热激蛋白^[10,11]。学者们普遍认为,热激蛋白是酵母耐热机制中最关键的一类因子。研究表明,HSP的表达对酵母耐热性的提高有明显效果,耐热性的产生与消失和HSPs的生成与降解相一致^[12]。王钦宏等通过高温适应性进化获得了一株能长时间耐热的酿酒酵母,对进化菌株进行了全细胞蛋白质组定量分析,研究结果表明高温进化与热激反应具有不同的调控机制,并阐明了分子伴侣Mdj1在工业酵母的耐热生长和乙醇合成中所起的重要作用^[13]。酵母体内有精细的蛋白质质量控制系统,但如果酵母细胞受到长期的高温

收稿日期:2018-01-11

基金项目:陕西省教育厅项目(202110029);延安大学博士研究基金(205040122);延安大学产学研合作项目(205110012)

作者简介:刘月芹(1980—),女,安徽蚌埠人,延安大学讲师,博士。

* 通讯作者

胁迫,热激蛋白及泛素降解系统本身的活性也会降低,不能及时对胞内累积的变性蛋白质进行修复,这样就会导致胞内蛋白质体内平衡网络的奔溃^[14]。通过小分子热激蛋白的协助折叠作用,Hsp104对凝集蛋白的解聚和再折叠,以及泛素介导的蛋白降解系统对无法修复的蛋白质的分解再利用等一系列过程,在维持酵母热胁迫条件下,对细胞的稳定性发挥着重要的作用^[15,16]。高温会严重影响酵母细胞内的大分子结构及代谢功能,研究发现当把酵母由30℃转移到40℃培养时,胞内常规蛋白质合成速率明显下降,伴随着的却是海藻糖的合成与累积^[17-19]。海藻糖号称生命之糖,不仅可以为细胞提供能源,最重要的是它对细胞的保护作用,海藻糖可以维持细胞膜的稳定性^[20],在促进细胞耐热性方面具有重要意义。除了目前研究较多的分子伴侣、海藻糖外,质膜H⁺-ATPase、甘油^[21]、固醇、脂类等物质的代谢也开始被越来越多的研究者所关注。酵母细胞在30℃培养条件下,细胞内没有甘油的累积,而在高温条件下就会激活糖酵解途径,从而使整个代谢流的流量增加^[22],同时伴随甘油的大量生成^[23]。麦角甾醇作为真菌细胞膜的重要组成成分,结构稳定,专一性强。Caspeta等对通过高温适应性进化得到的≥40℃的耐热酵母,对其进行全基因组及代谢流分析发现,这些耐热酵母甾醇的表达量显著提高并且其结构也有所改变,这表明甾醇对酵母的耐热性起到了很关键的作用^[24]。酵母获得耐热性期间,其细胞膜的脂质成分也有明显的变化^[22]。此外,高温同时激活了酵母细胞壁合成途径,导致该合成途径相关的基因大量表达,几丁质含量明显上升,增强了酵母细胞壁在逆境下的抵抗力和坚韧度^[25,26]。以上看来,虽然目前酵母耐热性研究有了很好的进展,但研究不够深入,酵母的耐热机制还没有真正的完全揭开。因此,科研工作者应结合现在的研究成果,利用先进的生物技术,在更高水平来继续探讨并揭开酵母耐热机制的黑面纱。

2 耐热酵母的选育及在乙醇生产中应用

耐热酵母选育一直是学者研究和发酵工业生产的热点问题。国内外的学者通过自然选育、适应性进化^[27]、定点突变、基因组改组、基因工程等策略筛选出耐热的酵母或者对酵母菌进行耐热性的改造。自然选育由于其简单易行受到科研工作者的广泛采用,其中,Ballesteros等通过自然筛选获得一株能在

42℃生长并用于SSF(Simultaneous Saccharification and Fermentation)发酵体系生产乙醇的耐热酵母菌株,乙醇产量接近于38 g/L^[28]。但这种方法存在两个方面的问题:一是菌株耐热性会因培养环境慢慢退化;二是筛选效率低,进展比较慢。目前,实验室适应性进化已成为目前国内外学者选育耐热酵母的理想方法。因为该方法不仅可以节省时间,而且能得到理想中的耐热菌株。比如,上述提到的王钦宏和Caspeta也是通过实验室适应性进化获得了耐高温酵母,并以此菌株为研究对象加深了对酵母耐热机制的研究^[13,24]。虽然酵母的耐热机制很复杂,但一定与其碱基序列有密切关系,所以改变碱基序列,改变氨基酸组成,就有可能导致关键蛋白质结构与功能的变化,从而赋予酵母新的性能。为此,Satomura等通过对一株适应性进化酵母菌株的全基因组分析后,采用点突变的方法构建了耐热酵母,其耐热性有显著提高^[29]。然而利用这种点突变的方法想选育出耐热酵母其希望不是很大,因为酵母耐热不可能只涉及到一个或几个基因的作用,所以在点突变的思想上学者们想到了基因组改组。Shi等采用基因组改组的方法不仅将酿酒酵母的耐热温度提高到45℃这样的高温,还可以使其抵抗9.5%(w/v)的乙醇浓度^[30]。所以这种方法将在以后酵母耐热性研究中发挥着比较重要的作用。基因工程技术已普遍应用于社会生活的各个领域,然而利用基因工程技术得到的耐热酵母成功的例子并不多。由于酵母耐热性调控网络的复杂性,当酵母细胞适应一种新的环境时,必然导致细胞功能彻底的改变,包括基因表达和代谢流的改变。所以想通过一个或几个基因的改变想大幅度提高酵母耐热性其可能性不大,而且具有特定耐热功能的基因也不好发掘^[31]。另外获得的耐热工程菌株也存在质粒丢失问题,耐热性难以长期维持。肖冰^[32]通过调节类泛素和热激响应介导的酿酒酵母内部的活性蛋白质平衡,有效提高了酵母细胞的热稳定性和乙醇发酵性能,从而达到工业生产中降低控温能耗的目的。Xu等^[33]通过在工业酿酒酵母细胞中构建人工蛋白质质量控制体系,提高了工业酿酒酵母在37℃发酵条件下的细胞存活能力和乙醇转化率,将乙醇提高到了2.4%。Liu等将古菌嗜热嗜热菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)的小热激蛋白GroS2转化到酿酒酵母中,不仅提高了酿酒酵母在45℃高温下的生长能力,而且将酿酒酵母的最适生长温度提高到

35℃,增强了代谢途径效率^[34]。孙欢等通过在酿酒酵母中过量重组表达极端嗜热菌嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的热激蛋白基因,一方面提高了宿主酿酒酵母在高温处理下的存活率和抗氧化能力,另一方面也提高了宿主在40℃下生产乙醇的能力^[35]。这种导入外源基因从而增强了酵母的耐热性,分析其原因可能是在热激条件下,酵母本身的热激蛋白结构和功能发生改变,或者说是其性能部分丧失,这样就不能赋予酵母较好的耐热性,而来源于嗜热微生物中的热激蛋白在高温下仍能保持较高的活性,这样就有可能增强酵母的耐热性,不过其详细的作用机制仍需进一步的探索研究。但这种方法为我们进一步研究酵母的耐热机制及提高其耐热性提供了较好的方法和思路。由以上研究可以看出,采用不同的改造策略都在一定程度上提高了酵母的耐热性,同时也有部分菌株应用到了乙醇高温发酵生产实践中,提高了高温乙醇发酵能力^[36-38]。虽然目前对于酵母耐热性的改造已取得了较明显的进步,但整体上来说,获得能在42℃高温下长时间正常生长发酵的菌株很少,据中粮集团有限公司和中国微生物发酵产业协会研究表明少数得到的能耐受42℃以上高温的实验室酵母菌株在实际的发酵生产中,其发酵性能部分或全部尚失,热稳定性能很差,所以仍然不能很好的满足工业生产过程对菌株的要求。达不到节能减排降低成本的目的。

3 小结

菌种是发酵工业的关键,所以选育优良的耐热酵母菌种是提高乙醇转化生产效率、降低生产成本的关键^[39]。目前,酵母的耐热机制这个黑匣子还没有完全解开,要选育出能满足SSF发酵体系的耐热酵母,一方面除了利用组学手段加深对酵母耐热机制的研究,解开酵母细胞内蛋白质平衡体系与其耐热性之间的联系外;另一方面应该把获得的耐热实验室酵母菌株这些方法直接应用到工业酵母菌株耐热性改造中,并使其保持较好的耐热稳定性,这才有可能获得适合工业发酵的耐热酵母。相信随着对酵母耐热机理认识的不断加深和生物技术的不断提高,通过基因全局调控、蛋白质质量控制体系或通过工程优化的方法来进一步提高酵母耐热性将成为可能。并将改造出的耐热乙醇酵母应用于生产实践,从而实际意义上大力推动生物乙醇生产的发展。

参考文献:

[1] Caspeta L, Buijs N A A, Nielsen J. The role of biofuels in

the future energy supply[J]. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6(4): 1077 - 1082.

- [2] Singh R, Shukla A, Tiwari S, et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, (32): 713 - 728.
- [3] Caspeta L, Castillo T, Nielsen J. Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes[J]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2015, 3: 184.
- [4] 叶世超, 薛婷, 王晓斐, 等. 酿酒酵母耐高温提高技术的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(21): 126 - 130.
- [5] 叶美莉. 乙醇酵母胁迫耐性及其基因表达响应分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [6] Amillastre E, Aceves - lara CA, Uribelarrea JL, et al. Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed - batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117 (4): 242 - 250.
- [7] Caspeta L, Caro - Bermúdez MA, Ponce - Noyola T, et al. Enzymatic hydrolysis at high - solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol[J]. *Applied Energy*, 2014a, 113: 277 - 286.
- [8] Zhu L, Zhu Y, Zhang Y, et al. Engineering the robustness of industrial microbes through synthetic biology [J]. *Trends Microbiology*, 2012, 20(2): 94 - 101.
- [9] Gao L M, Liu Y, Sun H, et al. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 121(6): 599 - 606.
- [10] Morano K A, Grant C M, Moye - Rowley, et al. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2012, 190(4): 1157 - 1195.
- [11] Lindquist S. Regulation of protein synthesis during heat shock[J]. *Nature*, 1981, 293(5830): 311 - 314.
- [12] Lindquist S. The heat - shock response[J]. *Annual review of biochemistry*, 1986, 55(1): 1151 - 1191.
- [13] Shui W, Xiong Y, Xiao W, et al. Understanding the mechanism of thermotolerance distinct from heat shock response through proteomic analysis of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14(7): 1885 - 1897.
- [14] Hipp M S, Park S H, Hartl F U. Proteostasis impairment in protein misfolding and aggregation diseases[J]. *Trends in Cell Biology*, 2014, 24(9): 506 - 514.
- [15] Gallagher P S, Oeser M L, Abraham A C, et al. Cellular maintenance of nuclear protein homeostasis [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71(10): 1865 - 1879.

- [16] Sontag E M, Vonk W I, Frydman J. Sorting out the trash: the spatial nature of eukaryotic protein quality control[J]. *Current opinion in cell biology*, 2014, 26: 139 – 146.
- [17] Hottiger T, Schmutz P, Wiemken A. Heat – induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (12) : 5518 – 5522.
- [18] Neves M J, François J. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemical journal*, 1992, 288 (3) : 859 – 864.
- [19] Nwaka S, Mechler B, Destruelle M, et al. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS letters*, 1995, 360 (3) : 286 – 290.
- [20] Mahmud S A, Hirasawa T, Shimizu H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109 (3) : 262 – 266.
- [21] Meena R C, Thakur S, Chakrabarti A. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H^+ – ATPase (Pma1) by dextrose and Hsp30 during exposure to thermal stress [J]. *Indian journal of microbiology*, 2011, 51 (2) : 153 – 158.
- [22] 李莉莉. 酿酒酵母耐性机理的代谢组学研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [23] Postmus J, Aardema R, de Koning LJ, et al. Isoenzyme expression changes in response to high temperature determine the metabolic regulation of increased glycolytic flux in yeast [J]. *FEMS yeast research*, 2012, 12 (5) : 571 – 581.
- [24] Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant [J]. *Science*, 2014b, 346 (6205) : 75 – 78.
- [25] Verna J, Lodder A, Lee K, et al. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94 (25) : 13804 – 13809.
- [26] Imazu H, Sakurai H. *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor regulates cell wall remodeling in response to heat shock [J]. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4 (6) : 1050 – 1056.
- [27] Caspeta L, Nielsen J. Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade – off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses [J]. *mBio*, 2015, 6 (4) : e00431 – 15.
- [28] Ballesteros I, Ballesteros M, Cabanas A, et al. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991, 28 (1) : 307 – 315.
- [29] Satomura A, Miura N, Kuroda K, et al. Reconstruction of thermotolerant yeast by one – point mutation identified through whole – genome analyses of adaptively – evolved strains [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23157
- [30] Shi D J, Wang C I, Wang K M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36 (1) : 139 – 147.
- [31] Alper H, Stephanopoulos G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7 (10) : 715 – 723.
- [32] 肖冰, 李珺, 李春. 类泛素介导和热激响应协同提高酿酒酵母的热稳定性 [J]. *化工学报*, 2016, 67 (6) : 2503 – 2509.
- [33] Xu K, Yu L, Bai W, et al. Construction of thermo – tolerant yeast based on an artificial protein quality control system (APQC) to improve the production of bio – ethanol [J]. *Chemical Engineering Science*, 2018, 177: 410 – 416.
- [34] Liu Y Q, Zhang G L, Sun H, et al. Enhanced pathway efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* by introducing thermo – tolerant devices [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 38 – 44.
- [35] 孙欢, 贾海洋, 冯旭东, 等. 酿酒酵母耐热元器件的筛选 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35 (3) : 75 – 83.
- [36] Wang D, Li F L, Wang S A. Engineering a natural *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production from inulin by consolidated bioprocessing [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9 (1) : 96.
- [37] Nuanpeng S, Thanonkeo S, Yamada M, et al. Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice at High Temperatures Using a Newly Isolated Thermotolerant Yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y – 53 [J]. *Energies*, 2016, 9 (4) : 253.
- [38] Hasunuma T, Kondo A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47: 1287 – 1294.
- [39] 苏艳秋, 朱卫华, 吴鹏, 等. 耐高温、耐酸产酒精酵母的筛选与鉴定 [J]. *微生物学杂志*, 2009, 29 (2) : 43 – 47.

[责任编辑 李晓霞]

(下转第 83 页)