

微生物耐受糠醛机制的研究进展*

张小欢^{1,2,3,4}, 张宇^{1,2,3†}, 王琼^{1,2,3}, 元伟^{1,2,3},
许敬亮^{1,2,3†}, 王忠铭^{1,2,3}, 袁振宏^{1,2,3,5}

(1. 中国科学院广州能源研究所, 广州 510640; 2. 中国科学院可再生能源重点实验室, 广州 510640;
3. 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 广州 510640; 4. 中国科学院大学, 北京 100049;
5. 生物质能源河南省协同创新中心, 郑州 450002)

摘要:由木糖脱水生成的糠醛会严重抑制微生物的生长与后续发酵过程。高温液态水和稀酸处理等是去除生物质中半纤维素较好的方法, 却不可避免地会导致大量糠醛产生。本文简述糠醛的产生和降解途径及糠醛对微生物危害的研究进展, 对糠醛耐受过程中涉及到的细胞形态分析与氧化胁迫、蛋白响应、基因响应和氧化还原平衡等进行了概述。

关键词:糠醛; 耐受机制; 降解路径; 氧化还原平衡; 响应分析

中图分类号: TK6

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.2095-560X.2017.03.005

Research and Development on the Microbial Furfural-Tolerance Mechanism

ZHANG Xiao-huan^{1,2,3,4}, ZHANG Yu^{1,2,3}, WANG Qiong^{1,2,3}, QI Wei^{1,2,3},
XU Jing-liang^{1,2,3}, WANG Zhong-ming^{1,2,3}, YUAN Zhen-hong^{1,2,3,5}

(1. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. CAS Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou 510640, China;
3. Guangdong Provincial Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Guangzhou 510640, China;
4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
5. Collaborative Innovation Centre of Biomass Energy, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Furfural from xylose dehydration inhibits the microbial cell growth and subsequent fermentation. High temperature liquid water and dilute sulfuric acid are excellent ways to remove semi-cellulose from biomass, while furfural would be inevitably produced. In this paper, the studies on the microbial furfural-resistance mechanism were summarized. The production/degradation pathway of furfural and its negative impact on microorganism were described. The protein response, gene response and redox balance involved in the furfural degradation process were analyzed and the effects of furfural on the cellular morphology and oxidative stress were studied.

Key words: furfural; tolerance mechanism; degradation pathway; redox balance; response analysis

0 前言

全球变暖和石化能源枯竭问题的严峻性迫使人们不得不将研究重心转向开发可再生能源。我国拥有丰富的木质纤维素原料, 2014–2015 年度玉米芯产量约 4578 万 t^[1], 以秸秆等木质纤维素为原料、利用微生物发酵生产乙醇^[2]等能源替代品和衣康酸^[3]等化工品备受关注。木质纤维素类生物质的细胞壁主要由木质素、纤维素和半纤维素构成, 须经过一

系列预处理过程如酸或碱处理, 才能被高效糖化利用^[4]。预处理过程能破坏木质纤维素原料结构的顽固性以提高底物的酶解可及性, 但同时也不可避免地生成呋喃及其衍生物、酸类、酚类等抑制物, 严重阻碍了微生物的生长和后续发酵过程。这些抑制物主要有三大类: 弱酸类(甲酸、乙酸等)、呋喃醛类(5-羟甲基糠醛、糠醛等)和酚类(丁香醛、藜芦醇、香草醇等)化合物(图 1)^[5]。利用高温液态水处理木质纤维素原料的过程中, 根据原料、时间、

* 收稿日期: 2017-02-22 修订日期: 2017-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(21506215)

† 通信作者: 张宇, E-mail: zhangyu@ms.giec.ac.cn; 许敬亮, E-mail: xjl@ms.giec.ac.cn

温度和反应液进料流量的不同,糠醛浓度从 0.05 g/L 至 4.0 g/L 不等^[6-7]。

糠醛作为一种典型的抑制物,会严重抑制微生物生长和发酵过程^[8]。为解决这一难题,许多学者将研究重心集中在高耐受糠醛菌种的筛选工作。ZHENG 等^[9]从皂素厂污水处理池的活性污泥中分离出一株菌株 DS1,经鉴定为蜡样芽胞杆菌属,DS1 能够以糠醛为唯一碳源进行生长,糠醛耐受浓度高达 4 g/L。此外,不少学者也尝试采用共生方式来培养微生物,以达到在含有糠醛的水解液中生长且高效率发酵的目的。HANLY 等^[10]用动态流量平衡研究酿酒酵母和木糖发酵酵母各自生长和共生长对 HMF (五羟甲基糠醛) 和糠醛的耐受性,发现等量接种液共生长对糠醛耐受性明显优于其他条件。目前,虽然可以采取驯化或诱变等手段随机选育出糠醛耐受性菌株,但是菌株耐受糠醛的机制却一直不清晰。掌握微生物对糠醛的耐受机制,有助于科学设计基因改造路线,从分子水平定向改造微生物细胞,提高微生物细胞对糠醛的耐受性,有助于从根本上解决糠醛对微生物的抑制问题。本文详述了糠醛的产生及其降解路径,并概述糠醛对细胞生长产生的胁迫和糠醛降解过程关键酶的研究工作,对微生物耐受糠醛机制的研究进展与重要研究结果进行了归纳与整理,以供相关学者研究参考。

1 糠醛的产生与毒性

糠醛是由木糖等五碳糖脱水生成,常见的预

处理方法如高温液态水和稀酸法都容易生成大量的糠醛^[11]。DUNLOP^[12]总结前人工作得出戊聚糖在酸催化水解下生成戊糖,戊糖经一步或两步反应生成糠醛。RASMUSSEN 等^[13]发现了木糖经开环转化为糠醛的机理,木糖中吡喃糖氧、1-OH 和 2-OH 质子化,后经脱氢脱水生成糠醛,其中质子化步骤为其限速步骤。

糠醛会抑制参与碳代谢如 TCA 循环和糖酵解的相关酶活^[9-10]。另外,MODIG 等^[14]的研究表明,2 mmol/L 的糠醛可以阻断丙酮酸向乙酰辅酶 A 转化的两条路径:(1) 丙酮酸经丙酮酸脱氢酶 (PDH) 直接转化为乙酰辅酶 A;(2) 涉及丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶 (AIDH) 和乙酰辅酶 A 合成酶的 PDH 旁路。BANERJEE 等^[15]向酵母产乙醇发酵培养基加入 2 g/L 糠醛后,无论是在胞内还是胞外,其磷酸丙糖脱氢酶的活性都被严重抑制,从而糖酵解被抑制;糠醛还能抑制一些蛋白质的合成,如含硫氨基酸的蛋白质等^[5]。糠醛还可以导致胞内活性氧积累,从而损伤线粒体、液泡膜、肌动蛋白细胞骨架和核染色质等细胞结构的形态及功能^[16]。以上毒性作用最终造成细胞的生物量、比生长速率和产物得率低,严重时还会造成细胞完全死亡。

去除糠醛工序会增加生产成本,从微生物本身解决抑制问题是最理想的方法,即选育糠醛耐受性强的微生物进行原位脱毒,获得耐受糠醛能力强的目标菌株后,可以进一步研究其对糠醛的耐受机制。

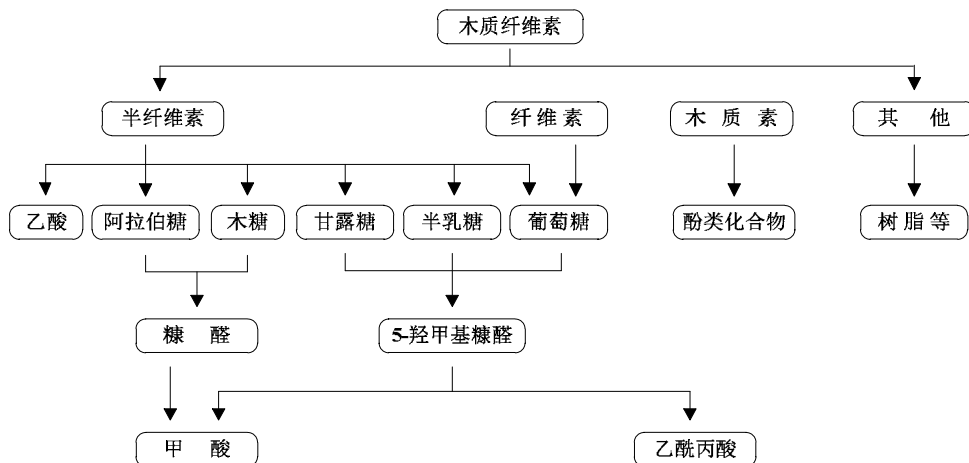


图 1 木质纤维素经预处理产生抑制物的途径^[5]

Fig. 1 Inhibitors formation from lignocellulosic pretreatment

2 微生物降解糠醛的路径

糠醛降解路径总体为：糠醛依次经过糠醇和糠酸降解为氧代戊二酸，氧代戊二酸进入 TCA 循环被降解。KOENIG 等^[17]最早提出糠醛氧化成糠酸，糠酸继续降解成氧代戊二酸，氧代戊二酸进入 TCA 循环^[17-18]，图 2。这个观点受到大多数学者的认同^[18]。

BOOPATHY^[19]研究了产甲烷菌 *Methanococcus* sp. Strain B 耐受糠醛性质，发现该菌株在厌氧条件下将糠醛转化成糠醇。NICHOLS 等^[20]采用 HPLC-UV-MS/MS 方法，分析经稀酸处理后的玉米秸秆水解液中 *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 对糠醛抑制物的代谢行为。质谱结果表明，糠醛和 HMF 峰强减弱或消失的同时，出现了糠醇和 HMF 的峰。

但是对糠醇后续的降解，不同学者所持的观点不同。王晓凤等^[18]筛选出丝状真菌 *Amorphotheca*

resinae ZN1，并对该菌株的糠醛代谢路径进行了研究。代谢途径为：糠醛首先快速地转化为毒性较低的糠醇；在有氧条件下，糠醇又再度生成不会对微生物产生危害的低浓度糠醛，糠醛继续氧化为糠酸。TSUGE 等^[21]研究谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 在耗氧和厌氧条件下糠醛脱毒作用，发现在耗氧条件下，糠醛被降解成糠醇和糠酸（即 2-呋喃甲酸）且二者的比例取决于糠醛的初始浓度；在厌氧条件下，糠醛主要的降解产物为糠醇。TSUGE 等的研究结论支持王晓凤等的观点，但二者采用的菌种差别是否会造成不一样的结论还有待研究。

RAN 等^[22]对 *Amorphotheca resinae* ZN1 生物降解糠醛和 HMF 的研究也表明了氧气的重要性。*A. resinae* ZN1 优先利用糠醛和 HMF（在含有葡萄糖的培养基），并提出糠醛的降解路线，其路径见图 3，与王晓凤等提出的略有不同。

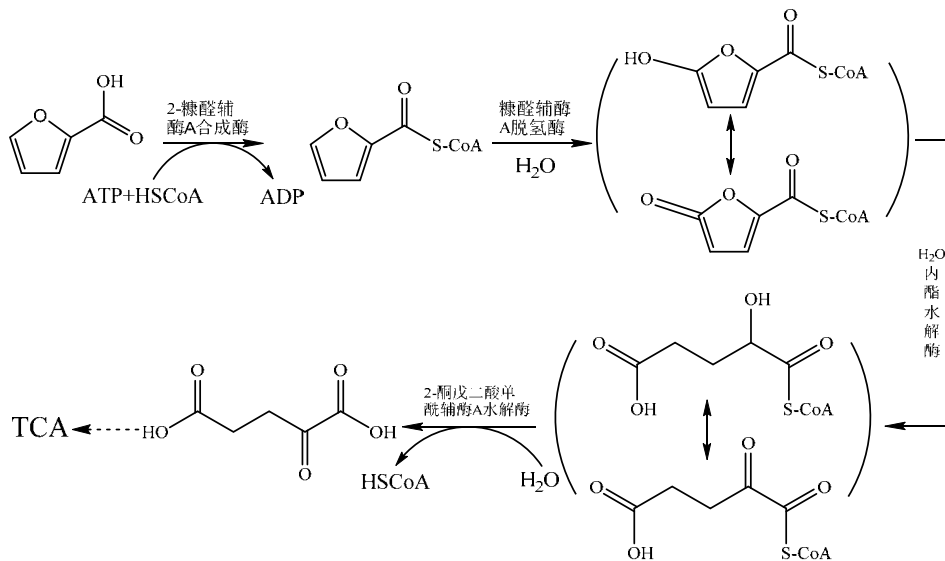


图 2 糠酸进入 TCA 循环的过程^[17-18]

Fig. 2 The process of furoic acid into TCA circle

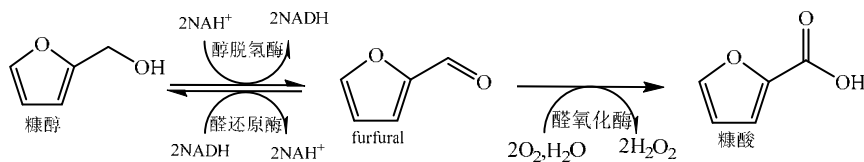


图 3 糠醛、糠醇和糠酸在生物细胞内相互转化路径^[22]

Fig. 3 Interconversion pathway of furfural, furfural alcohol and furoic acid in the cell

3 微生物对糠醛的响应分析

微生物对糠醛的耐受是一个非常复杂的生物学过程^[23-25]，总体包括两方面：一是微生物降解转化

糠醛；二是微生物形成自我保护机制，修复糠醛给微生物带来的损伤，调节生物合成与能量代谢，响应糠醛的胁迫。相对于原始酵母依赖糖酵解和糖异生抵抗胁迫，耐受酵母能通过较低的氨基酸代谢、

核苷酸代谢和较高的能量代谢,使本身具有更强的耐受能力^[26-27];糠醛抑制糖酵解途径,导致 ATP 缺乏,另糠醛转化也需要消耗一定能量和氧化还原酶及其辅酶,对此耐受酵母上调参与电子传递/能量合成和酶表达的相关基因^[26,28-29]。

许多学者采用不同方法从不同角度研究糠醛对微生物的影响,并对比糠醛耐受菌株和普通菌株响应差异以探究微生物耐受糠醛的机制。因此,本文从糠醛耐受过程中涉及到的细胞形态分析与氧化胁迫、蛋白响应、基因响应和氧化还原平衡等方面进行概述。

3.1 细胞形态分析和氧化胁迫

对糠醛抑制物所做出胁迫反应的微生物中,研究较系统和深入的是酵母细胞^[30-32]。糠醛诱导微生物内与细胞形态相关的基因,使糠醛更容易进入细胞内^[5,30],同时高表达 *HMG1* 基因,该基因导致细胞膜层叠增强,加速糠醛的降解转化^[33],并会对微生物产生氧化胁迫和未折叠蛋白胁迫等^[34]。

3.1.1 细胞形态分析

糠醛对细胞的影响是全面性的,使细胞从外部形态到内部细胞器形态都不同于正常细胞。采用基因组、蛋白组、转录组等系统生物学分析手段,糠醛会影响细胞内线粒体、液泡、核染色质和细胞骨架形态^[35]。此外,微生物的细胞膜和细胞壁也会受到破坏,从而使糠醛更易进入胞内^[26,33]。在糠醛耐受酵母菌株中,包括细胞壁合成和细胞壁信号转导相关基因的表达显著下调,可能导致细胞壁变薄;另外,导致细胞膜层叠增强的 *HMG1* 基因在糠醛耐受菌株中是高表达的,这些因素可能导致糠醛转化加快从而增强菌株的耐受能力^[33]。

丁明珠^[26]探讨了酿酒酵母对复合抑制剂(1.3 g/L 糠醛,0.5 g/L 苯酚,5.3 g/L 乙酸)的响应机制。转录和磷脂水平的实验结果表明,复合抑制剂严重阻碍酵母细胞中磷脂酰乙醇胺转化为磷脂酰胆碱的步骤,抑制剂的存在使酵母细胞膜曲率增加、孔径增大,从而使抑制剂更易进入胞内,继而对细胞产生抑制作用。糠醛、苯酚和乙酸对酵母的抑制作用具有协同作用,在糠醛单一作用下,其对细胞膜实际作用效果还有待研究。

3.1.2 氧化胁迫

ALLEN 等^[16]认为糠醛对细胞造成伤害是由于糠醛诱导了活性氧的积累。在酿酒酵母中糠醛确实

造成了活性氧的积累,而活性氧的积累造成线粒体(管状转变为聚集态)液泡(一个大液泡转变为多个小液泡)核染色质(紧密、有序球状转变为扩散无组织结构)和肌动蛋白细胞骨架(线状转变为补丁状)形态上的改变,但是通过扫描电子显微镜观察发现,糠醛进入细胞并不会改变细胞壁结构。细胞壁形态并没有明显的变化,因此提出了一个新的观点:糠醛通过诱导细胞内活性氧的积累,影响细胞器的变化,进而影响细胞生长和发酵。然而,糠醛是通过活性氧积累方式还是其他方式对细胞产生影响仍需待探究。

3.2 蛋白响应分析

糠醛作用于微生物的时间和生长时期的不同,胞内蛋白质的表达量有着显著的差异,蛋白所对应的功能也有很大的差别。糠醛致死浓度作用于酿酒酵母普通菌株和耐受菌株 20 min 得到 76 和 66 个相对表达量发生变化的蛋白;作用时间为 2 h 得到 53 和 48 个相对表达量发生变化的蛋白。包括能量、碳水化合物和碳水化合物代谢以及嘌呤核苷酸在内的细胞功能受到显著影响,其中氨基酸代谢为糠醛耐受菌株所特有。在糠醛耐受菌株中,与硫氨基酸(L-甲硫氨酸和半胱氨酸)合成相关的蛋白(Met6p 和 Sah1p)呈现上调(同时下调了其降解相关途径蛋白的表达)并且醇脱氢酶 Adh1p 相对表达量在 20 min 和 2 h 均出现上调,但与葡萄糖发酵和三羧酸循环相关蛋白的表达量上调过程受到延滞^[34]。

然而,当糠醛作用于细胞迟滞期时,细胞可以通过上调氧化还原酶以对抗糠醛对细胞的影响,而作用于生长期时,细胞通过诱导细胞凋亡使得具有糠醛耐受性的细胞能进行生长繁殖。LV 等^[36]利用蛋白质组学分析方法研究酿酒酵母对三种抑制物(5.3 g/L 乙酸,1.3 g/L 糠醛,0.5 g/L 苯酚)在迟滞期和指数生长期中蛋白质相对表达量的变化,分别为 194 和 215 个蛋白质。酿酒酵母细胞通过共调控蛋白质的折叠与合成以减少错误折叠蛋白的生成,进而节省能量,增强糖酵解途径,重新调整代谢途径(戊糖磷酸途径和乙醇的合成替代甘油和乙酸的合成途径),在迟滞期上调氧化还原酶,在指数生长期诱导细胞程序性死亡。

细胞可通过减少不必要蛋白质氨基酸的合成,将能量用于降解糠醛的方式以抵抗糠醛的影响,在这种方式中,与糠醛降解相关脱氢酶的合成显著上

调。CLARKSON 等^[37]发现 *T. pseudethanolicus* 39E 本身具有糠醛耐受性，可以在含有糠醛的培养基中生长(糠醛浓度 ≤ 15 mmol/L)，通过多维蛋白组分析，发现该细菌中的 *Tech39_1597* 编码的丁醇脱氢酶(BdhA)和 *Tech39_1598* 编码的醛酮还原酶(AKR)以 NADPH 为辅酶在糠醛的脱毒中起重要作用。(BdhA 与大肠杆菌中的 YqhD, ARK 与大肠杆菌中 DkgA 相似)。利用 ^{18}O 标记鸟枪比较蛋白质组学分析方法，研究在糠醛影响下酿酒酵母的全蛋白质表达情况，也观察到了醇脱氢酶的变化^[24]。醇脱氢酶对微生物的糠醛耐受性起着较大的作用。

3.3 基因响应分析

糠醛的加入会使酿酒酵母上调与转录翻译调控有关基因和应激反应蛋白基因{主要是核黄素-磷酸合成(*FMN1*)、异柠檬酸氧化(*IDHL*)、外源物质脱毒(*ECM38*)、寡糖合成(*ALG13*)和磷脂酰乙醇胺合成(*EPT1*)};下调代谢过程中的转录调控基因{C1-四氢叶酸合成(*MIS1*)、假尿苷合成(*PUS2*)、甘油合成(*RHR2*)、亚精胺和精胺合成(*SPE2*)}^[24]。上调的胁迫反应蛋白基因和下调的核糖体蛋白基因都在线粒体中，表明线粒体在微生物耐受糠醛上起重要作用。

大多数 NADH 依赖性脱氢酶的导入会增强微生物糠醛耐受性。WANG 等^[38]将 NADH 依赖性丙二醇氧化还原酶(FucO)转入至大肠杆菌中，使得携带有 FucO 的大肠杆菌可以在 15 mmol/L 糠醛中以木糖为碳源进行乙醇或乳酸发酵，且其产量与对照组几乎相等。ISHII 等^[28]构建了酿酒酵母重组菌株 TMB3000，菌株导入了 NADH 依赖性醇脱氢酶(ADH1)、木糖还原酶(XR)和木糖醇脱氢酶(XDH)。由 TMB3000 突变得到的醇脱氢基因 *m6Adh1* 编码的脱氢酶(m6ADH1)为 ADH1 的同工酶。实验表明在含有糠醛(40 mmol/L)的培养基中，ADH1 和 m6ADH1 可以通过 NAD⁺的再生缓解氧化还原失衡，减少木糖醇的积累而增大乙醇产量。

此外，一些 NADPH 依赖性醛脱氢酶也被发现对微生物糠醛耐受性起着重要的作用。PARK 等^[39]将乙醛脱氢酶 ALD6 的基因导入酿酒酵母内，在含有 2 g/L 糠醛和 0.5 g/L HMF 中比生长率、乙醇浓度和乙醇产量比对照组增长了 20% ~ 30%。ALD6 在抑制物耐受性中有两种作用：一种是直接氧化糠醛和 HMF；另一种是供应 NADPH，催化内生还原酶对呋喃衍生物还原反应。

除了上述常见的醇脱氢酶和醛脱氢酶，一些新的氧化还原酶也不断被人们发现。WANG 等^[40]发现一种氧化还原酶基因 *ucpA*, *ucpA* 的表达可以明显地增强大肠杆菌的糠醛耐受性，然而人们对 *ucpA* 的认识还非常少。

KOOPMAN 等^[41]研究 *Cupriavidus basilensis* HMF14 对糠醛和 HMF 的降解路径，通过基因工程手段使降解糠醛所需要的所有基因均位于 *hmfABCDE* 基因簇中，基因簇中的任何一个基因对糠醛降解都非常重要，包括 *hmfE* 编码硫酯辅酶 A 水解酶。KOOPMAN 等认为糠醛降解基因都位于基因簇中，若该观点正确，那么将该基因簇导入发酵菌使得发酵菌具有糠醛耐受性，工业发酵生产生物能源将会上升到一个新的阶段，但糠醛降解过程中需要的不仅仅是该基因簇所转录翻译的酶。

3.4 氧化还原平衡

NAD (NAD⁺和 NADH) 和 NADP (NADP⁺和 NADPH) 是许多生物过程中基本常见的介质，如能量代谢、线粒体功能、钙稳态、抗氧化/代氧化胁迫、基因表达、免疫功能、衰老和细胞死亡。NAD 介导能量代谢和线粒体功能，NADP 是细胞抗氧化系统的关键组成部分，NADH 和 NADPH 涉及活性氧生成^[42]。NAD 和 NADP 几乎与细胞内所有的活动都有关联。由此可见，糠醛作为电子受体进入细胞后将使细胞内氧化还原水平失去原有的平衡。FucO、ADH1 和 m6ADH1 为 NADH 依赖性^[38]，ALD6 为 NADPH 依赖性，这些酶通过调节 NAD 和 NADP 水平使得微生物具有糠醛耐受性。

在糠醛影响下，酿酒酵母细胞内 ADP、ATP 的水平上升，但是 NADH、NAD⁺、NADH/NAD⁺的水平下降^[24]。在 HMF 和糠醛共同的影响下，以木糖为碳源的酿酒酵母的能态只是稍微下降而氧化还原平衡受到了严重的影响。糠醛的加入对实验组能荷(指在总腺苷酸系统中所负荷的高能磷酸基数量)不会产生很大的影响，但严重破坏了细胞原有的氧化还原平衡。

ASK 等^[43]采用转录组分析方法对比了葡萄糖和木糖对酿酒酵母糠醛耐受性的影响。在以葡萄糖为碳源的实验中，糠醛加入后，酿酒酵母的比生长率和甘油产量都下降，而乙醇产量上升，NADH 和 NADPH 的浓度不变但是 ATP 的浓度上升了；在以木糖为碳源的实验中，酿酒酵母的甘油和乙酸的产

量上升,而木糖醇的产量被严重抑制,NADH和NADPH的浓度下降,ATP浓度下降。木糖代谢途径见图4。生成1 mol乙酸伴随1 mol NADPH的生成,每产生1 mol甘油消耗1 mol NADH。转录组分析表明,耗NADPH的路径被抑制,如氨基酸合成、硫和氮同化过程。不同的碳源对微生物糠醛耐受性程度也有一定的影响,相对较难利用的碳源,较易利用的碳源可使微生物细胞对糠醛的耐受性更强。

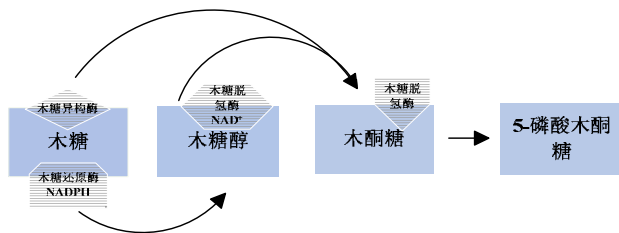


图4 木糖代谢途径

Fig. 4 The metabolic pathway of xylose

微生物中NADH/NAD⁺和NADPH/NADP⁺也对糠醛的降解起到重要作用。微生物降解糠醛需要大量的NADH和NADPH,细胞为提供这些还原力不得不上调生成还原力的相关基因,并且抑制消耗还原力的过程以满足还原力的供应。微生物通过提高TCA循环和抑制甘油合成以应对糠醛对细胞产生的影响^[24,35]。糠醛转化为糠醇时需要消耗NADH,大多数NADH依赖性脱氢酶的导入会增强微生物糠醛耐受性,或通过基因工程改变关键酶对还原力的选择,从而提高目的产物的产量。这些都证明了NAD和NADP平衡在微生物细胞中的重要性。

4 结 论

糠醛不仅会改变细胞及细胞器形态,造成胞内活性氧积累,使细胞从基因表达到转录再到蛋白质翻译都发生了显著的变化。糠醛还会破坏细胞内氧化还原平衡,微生物耐受糠醛能力与恢复或调整胞内氧化还原平衡有关。如果微生物能够越快恢复或者能够重新调整氧化还原平衡使之适应糠醛的存在,那么该微生物耐受糠醛的能力越强。糠醛转化为糠醇时需要消耗NADH,以NADH为还原力的酶在其中起着重要的作用,可以尝试在细胞内导入一条NADH补充路径以平衡被破坏的氧化还原平衡。大胆地假设,在细胞内导入一个互补的途径使细胞内的氧化还原处于平衡状态,该路径甚至可以是一个新的物质生成途径。通过动力学分析,同一种酶

对不同底物的结合能力不同使该酶选择性降解某种底物。这意味着胞内或许存在候选酶可降解糠醛,提醒我们对不同微生物甚至是同一种微生物降解糠醛的途径可能不同。在未来的研究工作中,可以从氧化还原水平去考察酶的作用,结合系统生物学和动力学分析技术,整体地把握氧化还原平衡和胞内酶的变化,再利用基因工程手段在实践生产中提高微生物发酵产量。

参考文献:

- [1] 王红彦,张轩铭,王道龙,等. 中国玉米芯资源量估算及其开发利用[J]. 中国农业资源与区划, 2016, 37(1): 1-8. DOI: 10.7621/cjarrp.1005-9121.20160101.
- [2] WANG J Q, HIRABAYASHI S, MORI T, et al. Improvement of ethanol production by recombinant expression of pyruvate decarboxylase in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2016, 122(1): 17-21. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.12.002.
- [3] KUENZ A, GALLENMÜELLER Y, WILLKE T, et al. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2012, 96(5): 1209-1216. DOI: 10.1007/s00253-012-4221-y.
- [4] LOOW Y L, WU T Y, JAHIM J M, et al. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment[J]. Cellulose, 2016, 23(3): 1491-1520. DOI: 10.1007/s10570-016-0936-8.
- [5] 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. DOI: 10.3321/j.issn:1000-3061.2009.09.007.
- [6] 余强,庄新妹,袁振宏,等. 高温液态水中甜高粱渣半纤维素水解及其机理[J]. 化工学报, 2012, 63(2): 599-605. DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2012.02.037.
- [7] 吕双亮,庄新妹,余强,等. 渗滤与间歇高温液态水预处理甘蔗渣的对比研究[J]. 太阳能学报, 2015, 36(3): 664-670. DOI: 10.3969/j.issn.0254-0096.2015.03.024.
- [8] THOMSEN M H, THYGESEN A, THOMSEN A B. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2009, 83(3): 447-455. DOI: 10.1007/s00253-009-1867-1.
- [9] ZHENG D, BAO J G, LU J M, et al. Isolation and characterization of a furfural-degrading bacterium *Bacillus cereus* sp. strain DS1[J]. Current microbiology, 2015, 70(2): 199-205. DOI: 10.1007/s00284-014-0702-9.
- [10] HANLY T J, HENSON M A. Dynamic model-based analysis of furfural and hmf detoxification by pure and mixed batch cultures of *S. cerevisiae* and *S. stipitis*[J]. Biotechnology and bioengineering, 2014, 111(2): 272-284. DOI: 10.1002/bit.25101.
- [11] BEHERA S, ARORA R, NANDHAGOPAL N, et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. Renewable and sustainable

- energy reviews, 2014, 36: 91-106. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.047.
- [12] DUNLOP A P. Furfural formation and behavior[J]. Industrial & engineering chemistry, 1948, 40(2): 204-209. DOI: 10.1021/ie50458a006.
- [13] RASMUSSEN H, SØRENSEN H R, MEYER A S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms[J]. Carbohydrate research, 2014, 385: 45-57. DOI: 10.1016/j.carres.2013.08.029.
- [14] MODIG T, LIDÉN G, TAHERZADEH M J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase[J]. Biochemical journal, 2002, 363(3): 769-776. DOI: 10.1042/bj3630769.
- [15] BANERJEE N, BHATNAGAR R, VISWANATHAN L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. European journal of applied microbiology and biotechnology, 1981, 11(4): 226-228. DOI: 10.1007/BF00505872.
- [16] ALLEN S A, CLARK W, MCCAFFERY J M, et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for biofuels, 2010, 3: 2. DOI: 10.1186/1754-6834-3-2.
- [17] KOENIG K, ANDRESEN J R. Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from pseudomonas putida Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition[J]. Journal of bacteriology, 1990, 172(10): 5999-6009. DOI: 10.1128/jb.172.10.5999-6009.1990.
- [18] 王晓凤, 张建, 辛秀娟, 等. 丝状真菌 *Amorphotheca resinosa* ZN1 的糠醛降解代谢分析[J]. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1070-1079.
- [19] BOOPATHY R. Anaerobic biotransformation of furfural to furfuryl alcohol by a methanogenic archaeobacterium[J]. International biodeterioration & biodegradation, 2009, 63(8): 1070-1072. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.09.011.
- [20] NICHOLS N N, SHARMA L N, MOWERY R A, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate[J]. Enzyme and microbial technology, 2008, 42(7): 624-630. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2008.02.008.
- [21] TSUGE Y, HORI Y, KUDOU M, et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98(20): 8675-8683. DOI: 10.1007/s00253-014-5924-z.
- [22] RAN H, ZHANG J, GAO Q Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinosa* ZN1[J]. Biotechnology for biofuels, 2014, 7: 51. DOI: 10.1186/1754-6834-7-51.
- [23] 杨雪雪. 酿酒酵母基因组中糠醛耐受相关基因的初步研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [24] LIN F M, QIAO B, YUAN Y J. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound[J]. Applied and environmental microbiology, 2009, 75(11): 3765-3776. DOI: 10.1128/AEM.02594-08.
- [25] LIN F M, TAN Y, YUAN Y J. Temporal quantitative proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* in response to a nonlethal concentration of furfural[J]. Proteomics, 2009, 9(24): 5471-5483. DOI: 10.1002/pmic.200900100.
- [26] 丁明珠. 酵母对纤维素水解液中复合抑制剂耐受的系統分析与解耦[D]. 天津: 天津大学, 2011.
- [27] MATSUDA F, SHIRAI T, ISHII J, et al. Regulation of central carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic inhibitors[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2013, 116(1): 59-64. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.018.
- [28] ISHII J, YOSHIMURA K, HASUNUMA T, et al. Reduction of furan derivatives by overexpressing NADH-dependent Adh1 improves ethanol fermentation using xylose as sole carbon source with *Saccharomyces cerevisiae* harboring XR-XDH pathway[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(6): 2597-2607. DOI: 10.1007/s00253-012-4376-6.
- [29] MA M G, WANG X, ZHANG X P, et al. Alcohol dehydrogenases from *Scheffersomyces stipitis* involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(18): 8411-8425. DOI: 10.1007/s00253-013-5110-8.
- [30] 夏金梅, 林凤鸣, 元英进. 酵母对抑制剂耐受的系統分析[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1159-1163.
- [31] LIU Z L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2011, 90(3): 809-825. DOI: 10.1007/s00253-011-3167-9.
- [32] 郝学才, 门珣, 张宜, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 254-263.
- [33] 李炳志. 酵母对纤维素乙醇生产中的抑制剂响应的系統生物学研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [34] 林凤鸣. 糠醛和苯酚对酵母作用定量蛋白质组学及脂肪模块构建[D]. 天津: 天津大学, 2011.
- [35] ASK M, BETTIGA M, MAPELLI V, et al. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for biofuels, 2013, 6: 22. DOI: 10.1186/1754-6834-6-22.
- [36] LV Y J, WANG X, MA Q, et al. Proteomic analysis reveals complex metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells against multiple inhibitors stress[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98(5): 2207-2221. DOI: 10.1007/s00253-014-5519-8.
- [37] CLARKSON S M, HAMILTON-BREHM S D, GIANNONE R J, et al. A comparative multidimensional LC-MS proteomic analysis reveals mechanisms for furan aldehyde detoxification in *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E[J]. Biotechnology for biofuels, 2014, 7: 165. DOI: 10.1186/s13068-014-0165-z.
- [38] WANG X, MILLER E N, YOMANO L P, et al. Increased furfural tolerance due to overexpression of NADH-dependent oxidoreductase FucO in *Escherichia coli* strains engineered for the production of ethanol and lactate[J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(15): 5132-5140. DOI: 10.1128/AEM.05008-11.
- [39] PARK S E, KOO H M, PARK Y K, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource technology, 2014, 175: 107-114. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.047.

- 2011, 102(10): 6033-6038. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.101.
- [40] WANG X, MILLER E N, YOMANO L P, et al. Increased furan tolerance in *Escherichia coli* due to a Cryptic *ucpA* gene[J]. Applied and environmental microbiology, 2012, 78(7): 2452-2455. DOI: 10.1128/AEM.07783-11.
- [41] KOOPMAN F, WIERCKX N, DE WINDE J H, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2010, 107(11): 4919-4924. DOI: 10.1073/pnas.0913039107.
- [42] YING W H. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences[J]. Antioxidants & redox signaling, 2008, 10(2): 179-206. DOI: 10.1089/ars.2007.1672.
- [43] ASK M, BETTIGA M, DURAI SWAMY V R, et al. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown

xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase[J]. Biotechnology for biofuels, 2013, 6: 181. DOI: 10.1186/1754-6834-6-181.

作者简介：

张小欢 (1992-), 女, 硕士研究生, 从事衣康酸生产菌土曲霉耐受糠醛菌株的诱变与筛选。

张宇 (1982-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事木质纤维素产燃料乙醇和衣康酸研究。

许敬亮 (1977-), 男, 博士, 研究员, 从事木质纤维素产燃料乙醇, 长链醇和有机酸工作。