

## 综述

# 酿酒酵母乙酸耐性分子机制的功能基因组进展

赵心清, 张明明, 徐桂红, 许建韧, 白凤武

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

赵心清, 张明明, 徐桂红, 等. 酿酒酵母乙酸耐性分子机制的功能基因组进展. 生物工程学报, 2014, 30(3): 368–380.  
Zhao XQ, Zhang MM, Xu GH, et al. Advances in functional genomics studies underlying acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 368–380.

**摘要:** 提高工业酿酒酵母对高浓度代谢产物及原料中的毒性底物等环境胁迫因素的耐受性, 对提高工业生产效率具有重要的意义。乙酸是纤维素原料水解产生的主要毒性副产物之一, 其对酵母细胞的生长和代谢都具有较强的抑制作用, 因此, 对酿酒酵母乙酸耐性分子机制的研究可为选育优良菌种提供理论依据。近年来, 通过细胞全局基因表达分析和代谢组分析, 以及对单基因敲除的所有突变体的表型组研究, 对酿酒酵母乙酸耐性的分子机制有了更多新的认识, 揭示了很多新的与乙酸毒性适应性反应和乙酸耐性提高相关的基因。综述了近年来酿酒酵母乙酸耐性的基因组规模的研究进展, 以及在此基础上构建乙酸耐性提高的工业酵母菌的代谢工程操作。结合本课题组的研究, 对金属离子锌在酿酒酵母乙酸耐性中的作用进行了深入分析。未来对酿酒酵母乙酸耐性分子机理的认识及改造将深入到翻译后修饰和合成生物学等新的水平, 所获得的认知, 将为选育可高效进行纤维素原料生物转化、高效生产生物燃料和生物基化学品的工业酿酒酵母的菌株奠定理论基础。

**关键词:** 酿酒酵母, 乙酸耐性, 燃料乙醇, 分子机制, 功能基因组

**Received:** September 11, 2013; **Accepted:** November 12, 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2012AA021205, 2012AA101805), Program for New Century Excellent Talents, Ministry of Education, China (No. NCET-11-0057), National Natural Science Foundation of China (No. 21376043).

**Corresponding author:** Xinqing Zhao. Tel: +86-411-84706319; Fax: +86-411-84706329; E-mail: xqzhao@dlut.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA021205, 2012AA101805), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-11-0057), 国家自然科学基金 (No. 21376043) 资助。

# Advances in functional genomics studies underlying acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

Xinqing Zhao, Mingming Zhang, Guihong Xu, Jianren Xu, and Fengwu Bai

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

**Abstract:** Industrial microorganisms are subject to various stress conditions, including products and substrates inhibitions. Therefore, improvement of stress tolerance is of great importance for industrial microbial production. Acetic acid is one of the major inhibitors in the cellulosic hydrolysates, which affects seriously on cell growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the molecular mechanisms underlying adaptive response and tolerance of acetic acid of *S. cerevisiae* benefit breeding of robust strains of industrial yeast for more efficient production. In recent years, more insights into the molecular mechanisms underlying acetic acid tolerance have been revealed through analysis of global gene expression and metabolomics analysis, as well as phenomics analysis by single gene deletion libraries. Novel genes related to response to acetic acid and improvement of acetic acid tolerance have been identified, and novel strains with improved acetic acid tolerance were constructed by modifying key genes. Metal ions including potassium and zinc play important roles in acetic acid tolerance in *S. cerevisiae*, and the effect of zinc was first discovered in our previous studies on flocculating yeast. Genes involved in cell wall remodeling, membrane transport, energy metabolism, amino acid biosynthesis and transport, as well as global transcription regulation were discussed. Exploration and modification of the molecular mechanisms of yeast acetic acid tolerance will be done further on levels such as post-translational modifications and synthetic biology and engineering; and the knowledge obtained will pave the way for breeding robust strains for more efficient bioconversion of cellulosic materials to produce biofuels and bio-based chemicals.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, acetic acid tolerance, fuel ethanol, molecular mechanisms, functional genome

酿酒酵母广泛应用于食品、酿造及生物能源生产等不同领域,良好的细胞活性有利于增加生物量的积累,促进细胞循环使用,提高发酵效率,但酿酒酵母在生长和发酵过程中,尤其是在工业生产条件下,经常受到高浓度乙醇、极端温度(冷冻或高温等)、低pH及高渗透压等环境胁迫因素的影响,这些环境胁迫条件抑制细胞生长及代谢,从而影响了生产效率。因此,酿酒酵母细胞对环境胁迫因素的反应和耐受性机制一直是国内外学者研究的重点<sup>[1-5]</sup>。

燃料乙醇是目前广泛生产使用的可再生清洁能源,以来源丰富、价格低廉的纤维素原料生产燃料乙醇已成为国内外研究的热点,但目

前限制燃料乙醇大规模生产的关键问题是成本过高。在纤维素乙醇生产中,原料预处理过程中产生的弱酸类、醛类和酚类等抑制物对细胞的生长和发酵具有抑制作用,这些抑制物中,弱酸类化合物中的乙酸含量最高。乙酸由木质纤维素预处理过程中木糖脱乙酰作用生成,在纤维素原料水解液中的浓度受所使用的生物种类及预处理技术的影响而不同,但浓度大约在1-10 g/L<sup>[6]</sup>。酿酒酵母不同菌株对乙酸的耐受性不同,如当乙酸浓度大于2 g/L时,木糖共发酵重组酵母6508-127的木糖利用率和生物量积累受到明显影响,乙酸浓度为10 g/L时,酵母细胞停止利用木糖和生长,而絮凝酵母SPSC01

可在 15 g/L 乙酸中生长和发酵<sup>[5,7]</sup>。作为纤维素原料水解液中主要的毒性副产物,乙酸对酵母细胞的生长和乙醇发酵具有强抑制作用,但长期以来对乙酸如何产生毒性,酵母细胞如何响应乙酸胁迫,以及如何调整代谢抵抗乙酸的毒性了解得还不够深入。与纤维素水解液中的其他抑制物相比,乙酸对细胞全局基因转录的影响要大很多,如当细胞在分别含有乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等抑制物质的培养基中生长的时候,转录组分析结果表明<sup>[8]</sup>,有 150 个基因在乙酸影响下表达出现显著变化,其中 120 个是特异响应乙酸的,含有 72 个上调基因,而在含有糠醛和羟甲基糠醛的培养基中,分别只有 27 个和 31 个基因的表达出现明显变化。因此,乙酸耐性分子机制的功能基因组研究引起了普遍关注。

近年来,国内外学者对在毒性水平的乙酸作用条件下酿酒酵母细胞的适应性反应及耐受性的分子机理进行了深入研究,利用细胞全局转录分析、蛋白组学分析及单基因敲除突变体文库表型组等手段,发现了很多新的与酵母菌乙酸耐性相关的基因,本文着重介绍近年来酵母菌乙酸耐性的功能基因组研究进展。

## 1 乙酸毒性的分子机制

胞内环境酸化是乙酸抑制细胞生长的主要原因。当培养基的 pH 值低于乙酸的解离常数(pKa 4.76)时,分子态的乙酸可通过自由扩散或水甘油通道蛋白 Fps1p 以及转运蛋白 Ady2p 和 Jen1p 转运入细胞内<sup>[9-11]</sup>,从而导致胞内酸化,因此乙酸毒性与细胞生长的环境 pH 有关。研究在 pH 值分别为 5、5.5 和 6 时不同浓度的乙酸对酵母葡萄糖和木糖共发酵的影响,发现随着 pH 值的增加,乙酸对葡萄糖和木糖利用的抑制

得到明显的缓解;如在 15 g/L 乙酸条件下, pH 为 5 时,60 g/L 葡萄糖需要 60 h 才被消耗完,而在 pH 为 6 时只需 12 h 完成发酵<sup>[12]</sup>,因此调节 pH 值可以缓解乙酸对酵母的毒害作用。但是酵母生长和发酵的最适 pH 值偏酸性,而且当培养基中存在高浓度乙酸时不可能通过加入大量的碱来调节其 pH 值,提高发酵菌株的乙酸耐受性,可保证酵母细胞在乙酸浓度较高的条件下具有较好的细胞活性。

利用约 5 000 多个 BY4741 宿主背景的酿酒酵母单基因敲除突变体文库研究与乙酸耐性相关的基因,发现有 650 个基因与乙酸响应相关<sup>[13]</sup>。酵母细胞对乙酸的响应及乙酸的毒性机制见图 1,包括与乙酸转运、胞内酸化后胞内 pH 维持、细胞壁重构、转录因子对细胞代谢的全局调控、氧化胁迫反应以及金属离子对乙酸耐性的作用等<sup>[11,13-18]</sup>。本文将分别就这些过程相关的功能基因组研究进行综述。

### 1.1 细胞壁相关蛋白与乙酸耐性

利用酿酒酵母 BY4741 宿主来源的单基因敲除的突变体,通过考察其在含乙酸平板上的生长情况,鉴别了多个与细胞壁功能相关的基因<sup>[13]</sup>,其功能可能与乙酸胁迫条件下细胞的生长有关,这些基因的功能包括合成细胞壁组分的基因,如 *MNN2*、*MNN9*、*FKS1*、*ROT2*,与细胞壁合成调控作用相关的基因,如 *ROM2*,以及功能未知但敲除后影响出芽的基因,如 *BEM4* 等。细胞壁葡聚糖酶基因 *EGT2* 和 *SCW11* 分别与分裂后的细胞分离和有性生殖中细胞结合有关,其敲除后乙酸和乳酸的耐性均得到提高<sup>[18]</sup>,此外,细胞壁功能相关的基因 *SED1* 和 *SPII* 都编码与胁迫反应相关的细胞壁蛋白,*SPII* 的敲除可导致细胞在乙酸中的生长受到抑制<sup>[19]</sup>,并发

现该基因受转录因子 Haa1p 和 Msn2p 的调控<sup>[20]</sup>, 但 *SEDI* 敲除后, 只提高了乳酸的耐受性, 说明不同有机酸对细胞的毒性和细胞的反应存在一定差异。推测乙酸胁迫条件下细胞壁出现重构, 因此与细胞壁合成相关的基因及一些细胞壁结构蛋白的合成发生变化。细胞壁的合成能减少多孔的结构, 因此通过细胞壁的重构 (Cell wall remodeling) 阻止乙酸通过扩散进入细胞, 从而减少乙酸的毒性。

**1.2 膜蛋白及膜磷脂合成相关基因与乙酸耐性**  
细胞膜蛋白中与乙酸耐性相关的包括乙酸转运相关的蛋白 (如 Fps1p), 以及功能与质子转

运偶联的其他膜转运蛋白。酿酒酵母通过膜质 ATP 酶维持胞内 pH 的稳定, 也通过细胞壁和细胞膜的重构 (Membrane reconfiguration) 降低对分子态乙酸的吸收和防止乙酸对膜的损伤。为维持质膜电位、防止胞内酸化, 细胞膜上的腺苷三磷酸酶  $H^+$ -ATPase (*PMA1* 基因编码) 可水解 ATP 产生能量, 将质子泵出细胞来维持细胞内正常的中性环境。因此在弱酸存在时, 必须有足够的能量供细胞利用, 但是在高浓度乙酸存在时, ATP 消耗过多导致缺乏, 细胞内的质子不能完全被泵出, 从而引起胞内酸化, 抑制细胞生长和代谢<sup>[16]</sup>。

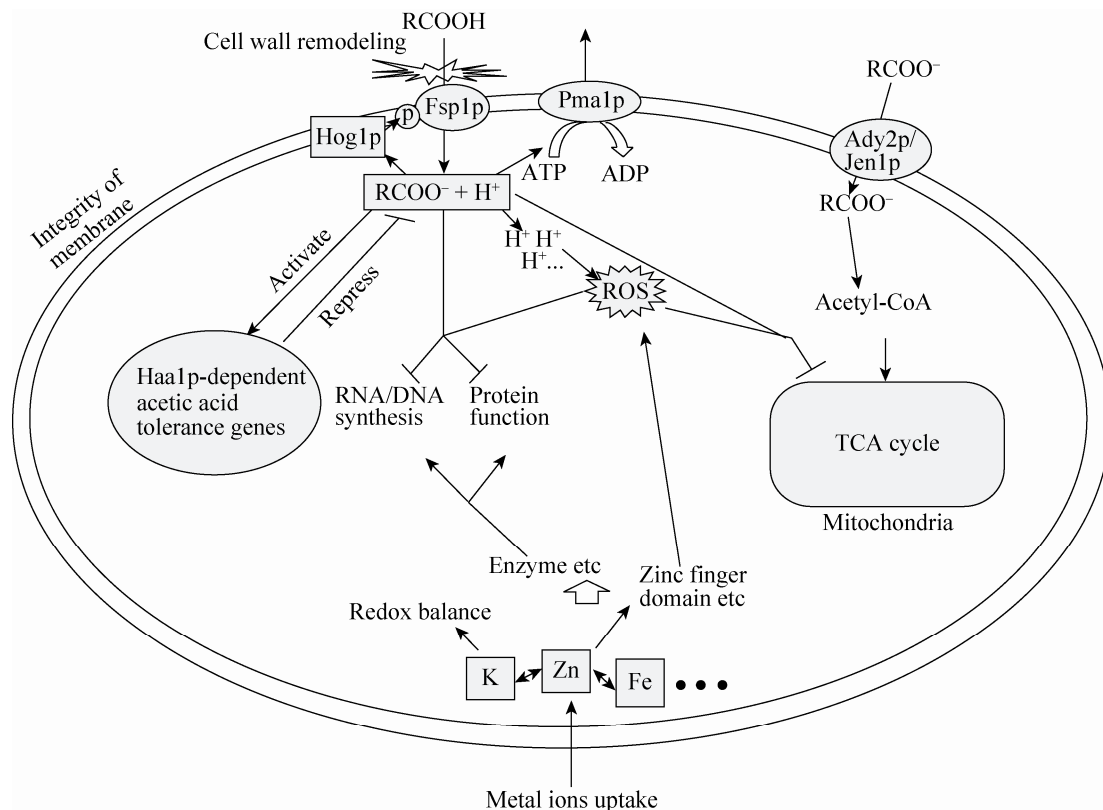


图 1 酿酒酵母中乙酸胁迫的反应机制

Fig. 1 Mechanisms of acetic acid stress response in *S. cerevisiae* cells.

细胞对乙酸毒性的很重要的反应是阻止乙酸进入细胞。细胞可通过瞬时激活 Hog1p 蛋白激酶,将质膜水甘油通道蛋白 Fps1p 磷酸化并发生内吞,因此减少乙酸通过这个孔蛋白的扩散进入<sup>[21]</sup>。敲除 Fps1p 编码基因可提高酿酒酵母乙酸耐性,并提高乙醇产率<sup>[22]</sup>。

日本学者对一株耐乙酸的酿酒酵母菌 ATCC 38555 进行全基因组转录分析发现,与不耐受乙酸的菌株相比,乙酸冲击条件下 ATCC 38555 菌株的 *TOP2* 转录上调更明显,是对照菌提高倍数的 3 倍,提示该膜转运蛋白可能与乙酸耐性有关。*TOP2* 编码多胺转运蛋白,其对物质的转运与质子的转运偶联,已有报道表明,*TOP2* 敲除后菌株的乙酸耐性下降,而该蛋白是与乙酸适应相关的重要调节蛋白 Haa1p 的下游调控蛋白,但该蛋白在乙酸耐性中的具体作用还不清楚<sup>[23]</sup>。

由于细胞膜的成分在细胞胁迫反应中具有重要作用,而细胞膜中磷脂的组成和比例对膜的特性具有重要影响<sup>[24]</sup>。研究者对乙酸、糠醛和酚类物质联合处理条件下细胞膜磷脂的成分和相关基因转录进行了研究,发现对混合抑制物具有良好耐受性的 T 菌株具有较长的磷脂脂肪酸链,亲本菌株耐性不好的 P 菌株中多个编码脂肪酸延长酶和脂肪酸合成酶的基因,包括 *FEN1*、*SUR4*、*FAS1* 和 *FAS2* 在混合抑制物中生长后表达出现下调,但在耐性好的 T 菌株中除了 *FEN1* 基因外没有明显下调,而且 *FEN1* 在 T 菌株中的下调也不如 P 菌株明显。此外, T 菌株同时具有较低的磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 含量和较慢的 PS 向磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 转化的效率,作者发现编码 PS 合成酶的 *CHO1* 基

因在耐性较好的菌株中受抑制物冲击后表达下调,而亲本菌株耐性不好的 P 菌株 *CHO1* 基因在受抑制物冲击后表达上调。磷脂酰胆碱 (Phosphatidylcholine, PC) 由 PE 经过甲基化后合成,在该研究中还发现,耐性好的 T 突变株具有较低的 PE/PC 的比例,与此相应的, T 菌株具有较高的 *CHO2* 基因转录水平,该基因编码一个关键的 PE 甲基化酶<sup>[25]</sup>。

### 1.3 能量代谢相关基因与乙酸耐性

细胞的能量主要来自糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化,由于膜质 ATP 酶和液泡 ATP 酶泵出质子抵抗胞内酸化需要消耗能量,所以能量代谢与乙酸耐性密切相关。利用单基因敲除的突变体文库进行乙酸耐性相关基因的筛选发现,敲除 *HXK2*、*PFK1*、*LPD1*、*PYCI*、*ATP1* 和 *COX9* 等和能量代谢相关的基因后,细胞在含有 4.2–5.4 g/L 乙酸的平板上生长受到严重抑制甚至无法生长<sup>[13]</sup>。日本学者对耐乙酸的酿酒酵母菌 ATCC 38555 在 6 g/L 乙酸处理 30 min 后的全局基因转录进行分析结果表明,与能量代谢相关的很多基因,包括 *ATP15*、*ATP17*、*ATP18*、*COX7*、*COX9*、*COX12* 和 *COX13* 等表达明显上调,而乙酸耐性不强的酵母菌在同样的乙酸冲击条件下未发现这些基因表达的明显变化,显示了耐性菌快速调节能量代谢相关基因是其对乙酸的耐性提高的一个原因<sup>[23]</sup>。

我国天津大学学者对工业酵母在含 18 g/L 乙酸的培养基中培养 20 min 后转录组分析的结果中,揭示了高浓度乙酸冲击条件下,与呼吸作用相关的细胞色素 C 氧化还原酶基因 *COR1*、*COX11*、*PET309*、*COX20* 和 *CBP4* 表达明显下调,同时,线粒体 ATP 酶基因 *ATP4* 和与能量产生有关的线粒体无机焦磷酸酶基因 *PPA2* 的

表达也受到明显抑制,另外,负责糖原代谢和海藻糖代谢的基因表达也出现下调,表明高浓度乙酸冲击对能量储存、电子传递、以及 ATP 再生具有一定影响。作者还发现很多线粒体核糖体蛋白编码基因的转录出现明显下调,表明高浓度乙酸对线粒体的功能具有重要影响作用<sup>[26]</sup>。对乙酸糠醛等胁迫抑制化合物具有良好耐性的菌株及亲本菌株在乙酸糠醛酚类同时存在条件下进行比较蛋白组分析,发现糖酵解途径关键酶 *Eno1p*、*Fba1p* 和 *Adh1p* 等在耐性菌株和敏感菌株中均上调,但在敏感菌中上调更明显,说明敏感菌需产生更多的能量抵抗抑制剂的毒害作用<sup>[27]</sup>。

#### 1.4 氨基酸合成及蛋白代谢与乙酸耐性

氨基酸代谢对细胞的生长和正常代谢至关重要。细胞在乙酸毒性作用下氨基酸的合成可能受到抑制,蛋白折叠和蛋白降解也受到影响,因此氨基酸合成和蛋白代谢基因的功能与乙酸耐性相关。对酵母菌单基因敲除突变体在乙酸平板上的生长比较结果表明,参与甲硫氨酸和半胱氨酸合成的基因 *MET4* 和 *CYS3*,参与组氨酸合成的 *HIS4*,参与甘氨酸合成相关的 *GLY1* 和谷氨酰胺合成的 *GDH1* 基因破坏后,细胞在乙酸平板上的生长受到影响<sup>[13]</sup>。前期研究还发现,高浓度乙酸冲击可引起细胞内精氨酸、组氨酸和色氨酸合成基因的上调<sup>[26]</sup>,说明氨基酸合成与乙酸毒性的反应密切相关。进一步的研究表明,氨基酸代谢的变化不仅仅与氨基酸合成蛋白有关,也与蛋白降解有关<sup>[27]</sup>。在添加含有乙酸的混合抑制剂的处理后,与蛋白折叠和蛋白降解相关的很多蛋白表达均出现上调,其中变化较明显的包括 *Hsp60p*、*Dka1p* 和 20S 蛋

白酶体 *Pre8p* 以及 *Pre1p* 等,因此作者推测,在乙酸等抑制物的存在条件下,细胞产生氧化胁迫,因此造成蛋白变性,而蛋白折叠和降解相关的蛋白表达,有助于细胞恢复正常的生理代谢功能。

#### 1.5 与乙酸耐性相关的金属代谢

许多金属离子是细胞中多种酶的辅酶,其吸收和在细胞内的移动影响细胞代谢。利用酵母菌单基因敲除突变体研究乙酸耐性相关基因时发现<sup>[13]</sup>,个别金属离子代谢相关基因与乙酸耐性有关。与钾离子吸收相关的基因有 *TRK1* 和 *ARL1*,前者是钾离子转运蛋白,后者作为 GTPase 调控钾离子的内流。*TRK1* 敲除后的菌株在 4.2 g/L 乙酸平板上完全不能生长,而 *ARL1* 敲除后细胞可有微弱生长。培养基中添加 0.01 mol/L 和 0.02 mol/L 的氯化钾可明显缓解 2.4 g/L 乙酸对细胞的毒性。添加钾离子能提高酵母的乙酸耐受性,主要原因是在乙酸胁迫条件下,膜质 ATP 酶 *Pma1p* 泵出质子以维持胞内 pH 稳定性,而钾离子是主要回流的离子,因此乙酸胁迫条件下钾离子的吸收有助于质膜的电位平衡。与铁吸收相关基因 *FRE3*、*FIT2* 和 *FIT3* 敲除后,细胞在乙酸平板上的生长也受到抑制,但不如 *ARL1* 破坏后生长抑制程度明显,培养基中添加 1–100 μmol/L  $\text{FeSO}_4$  也没有看到对乙酸毒性的缓解作用,但发现细胞在 4.2 g/L 乙酸中培养 30 min 后,胞内铁的含量比没有经过乙酸胁迫处理的细胞提高了 2 倍,说明乙酸可促进铁的吸收。由于铁可诱导氧化胁迫,因此细胞对铁的吸收、代谢及氧化胁迫相关基因和蛋白的调控比较严格,这解释了为什么添加铁对细胞的乙酸耐性没有影响。本课题组近期研究表明,培养基中

添加硫酸锌可明显改善细胞在高浓度乙酸(10–15 g/L)条件下的乙醇发酵<sup>[7]</sup>。对高浓度乙酸存在条件下锌对细胞全局基因转录的影响进行研究,初步结果发现,与金属转运相关的多个基因在锌添加样品中出现明显下调,这些基因除了编码锌转运相关的蛋白(包括 Zrt1p、Zrt2p 和 Yke4p)以外,还包括铜转运(Ctr3p 高亲和质膜铜转运蛋白)、钾转运(Kha1p, 高尔基体 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 抗转运蛋白)以及铁转运(Mmt2p, 负责线粒体铁积累的未知金属转运蛋白)相关的蛋白等。这些金属代谢相关蛋白基因转录的变化与乙酸耐性的关系正在研究中。

### 1.6 与乙酸耐性相关的转录调控因子

通过乙酸耐受性相关的基因聚类分析,与之相关的转录因子包括 Msn2p、Rim101p、Haa1p、Skn7p、War1、Pdr1、Stb5p、Nrg1p、Cbf1p、Gcr2p、Mig1p、Swi6p、Ume6p、Stp1p、Ace2p、Ino2p、Cst6p 和 Rtg3p 等<sup>[13]</sup>,其中 Haa1p 是最主要的调节蛋白,负责调控 80%与乙酸耐性相关的基因<sup>[28-29]</sup>。对 *S. cerevisiae* BY4741 亲本以及 *HAA1* $\Delta$  突变体在含 3 g/L 乙酸、pH 值为 4 的培养基中培养 15 h,发现破坏子的延滞期比野生型延长了 2.5 倍,而且在此时期破坏子中活细胞数目相对野生型减少,而同样条件下不含酸的培养基中没有发现此现象,因此提出 *HAA1* 基因的表达可以缩短酵母在乙酸胁迫条件下生长的延滞期<sup>[13]</sup>。

在 Haa1p 调控的靶基因很多,但很多基因的具体功能还不清楚。这些靶基因中,*SAP30* 和 *HRK1* 表现出最强烈的对乙酸毒害的保护作用。*SAP30* 编码脱乙酰酶复合体的一个亚基,*HRK1* 编码调节质膜转录活性的蛋白家族中的一个蛋白激酶。敲除 *HRK1* 基因的酵母菌体内

的乙酸的积累明显增加,提示这两个基因的作用很可能与降低胞内乙酸的含量有关<sup>[29]</sup>。Haa1p 调节的基因还包括上文提到的编码细胞质膜上转运蛋白 Tpo2p 和 Tpo3p。过表达 *HAA1* 可提高酿酒酵母的乙酸耐性,并发现转化子中 *TPO2* 和 *TPO3* 等 Haa1p 的靶基因上调<sup>[30]</sup>。

Haa1p 转录因子直接调控许多能够响应乙酸胁迫的基因表达。对这些可能的调控基因的启动子区域的 DNA 结合基序 (Binding motif) 的研究表明, Haa1p 的最小结合基序是 5'-(G/C)(A/C)GG(G/C)G-3'。已发现有 56 个基因的表达受 Haa1p 的直接调控,这些基因包括编码热激蛋白 Hsp30p 和 Hsp26p, 转运蛋白 Pdr12p、Tpo2p 和 Tpo3p 以及转录调节蛋白 Nrg1p、Msn4p、Mcm1p 和 Fkh2p 等,所涉及的代谢过程包括细胞胁迫反应、糖代谢、细胞周期控制、蛋白合成以及降解等。此外, Haa1p 还可通过对 Msn4p 和 Mcm1p 等转录因子的调控间接地调控近 30 个基因的表达,形成了复杂的代谢调控网络。进一步的研究表明,与 Haa1p 亲和力最高的结合基序是 5'-GAGGGG-3',含有这个基序的基因包括 *TPO3*、*TPO2*、*STF2* 和 *AQR1* 等,但虽然具有这个基序的基因 *TPO2* 在乙酸胁迫下提高 18.7 倍,但是同样含有这个基序的 *AQR1* 只提高 1.5 倍,可见 *HAA1* 激活基因的表达还需要其他因子的参与。已发现无论培养基是否有乙酸存在, Haa1p 都能与其下游调控基因 *TPO3* 结合,推测 Haa1p 在无乙酸胁迫的条件下不具有功能,可能在乙酸胁迫条件下才具有转录激活功能<sup>[18]</sup>。

Msn2p 和 Msn4p 是同一个家族的锌指蛋白,和酵母的多种耐性响应相关,如营养缺乏、高温、高渗透压、氧化胁迫等<sup>[31]</sup>。受 Msn2p 和

Msn4p 调控的响应乙酸的基因包括编码分子伴侣蛋白 Hsp26p 和 Sse2p 的基因, 与碳代谢相关的基因 *HXK1* 和 *GPD1* 和抗氧化相关的基因 *CTT1* 和 *GPX1* 等<sup>[32]</sup>, *MSN2* 基因敲除后细胞在乙酸上的生长受到抑制, 但 *MSN4* 敲除对细胞在乙酸上的生长影响不大, 可能与 Msn4p 的作用比较温和有关<sup>[13]</sup>。本课题组对高浓度乙酸存在条件下锌添加对酵母菌全局基因转录影响的研究中, 发现与未添加锌的对照组相比, 锌添加可明显提高 *MSN2* 的转录水平 (未发表资料), 提示锌对高浓度乙酸胁迫条件下细胞活性的保护作用可能与 *MSN2* 的作用有关, 但深入的分子机理还有待探讨。

Rim101p 是 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Cys2His2) 型锌指蛋白, 已知有 35 个基因受其调控, 这些靶点基因的功能与细胞壁结构的维持和铁的吸收有关, 也有一些是功能未知的膜蛋白。敲除 *RIM101* 后细胞在乙酸中的生长受到抑制, 显示该基因与细胞对乙酸毒性的反应和耐性有关<sup>[33]</sup>。

Nrg1p 和 Nrg2p 是葡萄糖抑制作用的调节因子, 近来报道它们也参与酵母菌的胁迫耐性响应基因的调控。当 *NRG1* 和 *NRG2* 两个基因都被敲除, 菌体对高渗和氧化胁迫的抗性增强。Nrg 所抑制的基因大都含有 STREs 或者类似 STRE 的序列, 而且还与 *MSN2* 和 *MSN4* 相关。推测 *NRG1/NRG2* 与 *MSN2/MSN4* 存在竞争关系, 从而避免过度响应环境胁迫<sup>[34]</sup>。

值得指出的是, 每个转录因子对靶基因的调控并不是相互独立的, 不同转录因子可能具有共同的下游基因。利用 YEASTRACT 数据库 (<http://www.yeasttract.com>), 将本文讨论的乙酸

耐性相关基因中与能量代谢、氨基酸代谢的基因, 以及与细胞壁合成相关基因和转运蛋白相关基因进行分析, 得到的这些基因与 Msn2p、Nrg1p 和 Haa1p 之间的相互关联见图 2。

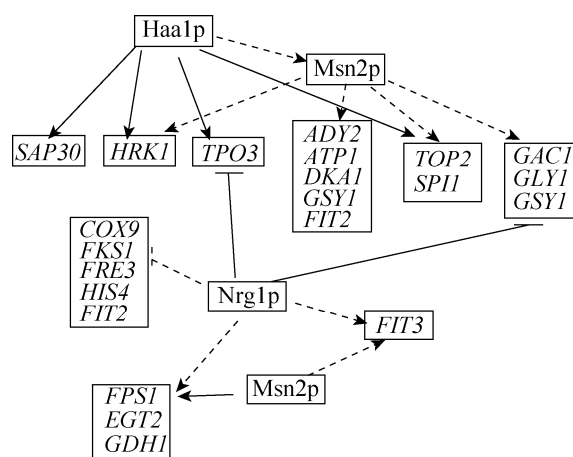


图 2 乙酸胁迫时转录调控因子 Msn2p、Nrg1p 和 Haa1p 之间的关联

Fig. 2 Transcriptional regulatory associations of Msn2p, Nrg1p and Haa1p in yeast cells under acetic acid stress. The model is based on the microarray data obtained in this study and on the information available in the YASTRACT database. Arrows indicate activation, lines indicate repression, solid lines mean documented regulation, dashed arrows or lines show potential regulation.

表 1 为与乙酸胁迫反应相关的主要相关基因<sup>[8,13,20]</sup>。除了上文中提到的基因以外, 还包括与蛋白修饰相关的基因及与细胞骨架蛋白合成及形态发生相关的基因。由于乙酸对细胞的影响主要是延迟期的延长, 推测细胞骨架和形态发生相关基因破坏后, 细胞不能在乙酸上很好生长的原因与突变体细胞生长受到抑制有关。



表 1 酿酒酵母乙酸胁迫反应相关的基因

Table 1 Genes related to acetic acid stress in *S. cerevisiae*

Pathway	Gene name
Lipid metabolism	<i>CRD1 ERG28 LIP5 SAC1 SCS7 CHO2 ERG3 ERG4 ERG6 SUR1 ERG2 HSV2 HTD2 IPK1 ISC1 SUR4 VPS34</i>
Response to stress	<i>ASG1 CCS1 DOT5 FRT1 GTS1 MXR2 WHI2</i>
Mitochondrial function	<i>AEP2 ATP1 ATP11 ATP14 ATP4 ATP5 CBP3 COQ5 COX11 COX12 COX23 COX9 CYT2 FIS1 FMC1 LPD1 MCX1 MDM32 MGM1 MEF2 MGM101 MSS2 MSS51 MTG2 OXA1 PET117 PET122 PET54 POR1 QCR QCR76 QCR8 RRF1 RSM23 RTG2 SAM37 SLS1 YSP1</i>
Transcription factors	<i>MIG1 ACE1 ACE2 CBF1 CST6 GCR2 HAA1 INO2 IXR1 MOT3 MSN2 NRG1 PPR1 RIM101 RTG3 SKN7 STB5 STP1 SUM1 SWI6 THI2 TYE7 UGA3 UME6</i>
Transport	<i>AGP2 AZR1 FET3 FPS1 GUP1 ITR1 MCH5 MDL1 MEP3 NHA1 OPT2 PMR1 RGT2 SPF1 TPO3 TPO1 URE2 YBR241C YIA6 YMD8 YOR378W</i>
Protein folding	<i>CAJ1 DOC1 EMC1 FES1 SSE1 SSZ1</i>
Protein modification	<i>AIM22 ALG12 ARD1 BRE5 COS16 CPR6 CPR7 CTK1 DBF2 FPK1 EUG1 GNT1 GSH2 LAS21 HRK1 KTR4 LIP2 MCK1 MKC7 MTQ2 NAS2 NAT1 NAT3 OST4 PMT1 PMT2 PPT2 PTK2 RPN10 RPS4B SHR5 SWF1 UBC4 UBP14 UBP6 VID22 UBP15VID28 YPK1 ARI1 CAT2 FUM1 GPH1 HXK2 KGD2 NDE1 PCL7 PDA1 PDC1 PFK1 PKP1 PYC1 PYC2 RHR2 RPE1 TPS1 TPS2 YHM2 YJR096w ZWF1</i>
Carbohydrate metabolism	<i>ALF1 APQ12 ARC18 ARP6 BEM2 BEM4 BUB3 BUD25 CYK3 GIN4 HOF1 KAR3 KEL1 LDB18 MDY2 MMR1 NIP100 NUM1 POM34 RGD1 RHO4 RVS161 SAC6 SEH1 THP1 TMA23 VAC17 VAM10 VRP1 YKE2</i>
Cytoskeleton organization and morphogenesis	<i>ABZ2 ARO1 BUD16 COX10 CYS3 DUR1, 2 ECM31 GCN1 GCV3 GDH1 GLY1 HIS7 MET7 MET8 MEU1 MMP1 NPR2 NPR3 PRS3 SLM5 THI6 YBR204C</i>
Ammonium, amino acids and vitamin metabolism	<i>ARL1 FIT2 FIT3 FRA1 FRA2 FRE3 FRE8 TRK1</i>
Ion homeostasis	

## 2 提高乙酸耐性的代谢工程操作

对酿酒酵母乙酸耐性的功能基因组研究发现了多个与乙酸耐性相关的基因，并在此基础上开发了相应的代谢工程改造方法。例如，过表达与乙酸耐受性密切相关的转录因子编码基因 *HAA1*，所获得的菌株具有较高的乙酸耐性，在 7 g/L 乙酸平板上能较好生长，而对照在该乙酸浓度下没有检测到生长。这是利用功能基因组研究提高乙酸耐性的典型范例。

代谢物谱 (Metabolic profiling) 分析研究发现，在乙酸胁迫条件下木糖发酵的过程中，非氧化性的 PPP 代谢途径代谢物核酮糖-5-磷酸、核糖-5-磷酸和景天庚酮糖-4-磷酸等明显积累，表明乙酸明显的减慢了木糖发酵速率，因而通过对在这个过程中起重要作用的基因 *TAL* 进

行过表达，发现过表达后菌株在 1.8 g/L 乙酸条件下的乙醇产量提高了 1.72 倍，而且有趣的是 *TAL* 过表达突变体在 0.03 mol/L 乙酸条件下比在没有乙酸条件下乙醇产量提高 1.35 倍，突变体核酮糖-5-磷酸、核糖-5-磷酸和景天庚酮糖-4-磷酸的含量都下降<sup>[35]</sup>。

对两株发酵性能相似的菌株 YJS329 和 ZK2 在不同抑制物条件下发酵，发现细胞膜结构、中心碳的代谢和抗氧化因子的不同是造成这两个菌株耐受性差异的主要因素，推测 ZK2 菌中油酸相关的基因 *ELO1*、*FEN1* 和 *OLE1* 的表达量高，所以具有较高的乙酸耐性，因此选择对 *ELO1* 在两株酵母菌 YJS329 和 ZK2 过表达，结果发现油酸分别提高了 17.6% 和 9.4%，此外在高浓度乙酸 (10 g/L, pH 4.0) 冲击 2 h 后，过表达 *ELO1* 的重组酵母的细胞存活率明显提高。但

同时也发现,两株菌过表达 *ELO1* 的重组菌细胞活性提高程度有一定的差距,分析是由于 YJS329 和 ZK2 的遗传背景的不同导致。因此对菌株进行改造时需要考虑宿主遗传背景的影响<sup>[36]</sup>。

我国浙江大学学者首次将 RNA 结合蛋白 Lsm6p 编码基因在木糖共发酵工业酵母中过表达,得到的转化子对硫酸的耐受性提高,而且转化子具有较高的木糖利用率和发酵效率。目前对于 LSM 蛋白在乙酸耐性中的研究还不多,其提高耐性的机理也不清楚<sup>[37-38]</sup>。

随着利用单基因敲除突变体文库获得的功能基因组学信息的不断积累,人们希望通过所获得的信息设计代谢工程改造的方法,提高菌株的发酵效率。分析 BY4741 敲除突变体相关结果,研究者找到 11 个基因与乙醇、乙酸及另外两种常见的纤维素水解液中的毒性抑制物糠醛及香草醛耐性相关的基因,并利用相应突变体进行超高浓度乙醇发酵及小麦秸秆水解液发酵实验,证明 *BUD31* 和 *HPRI* 与乙醇收率和发酵速率有关,*ERG1*、*PRS3*、*RAVI*、*PRP4* 和 *VMA8* 与小麦秸秆水解液中细胞活性的保持和利用该底物的发酵速率有关<sup>[39]</sup>,但这些基因在工业酵母中的作用没有进行研究,也没有进行这些基因过表达后乙醇发酵性能的评价。

### 3 存在问题和展望

提高酵母菌的乙酸耐受性可以保证酵母菌发酵过程中较好的细胞活性和较高的发酵性能,随着基因组学、转录组学、代谢组学等手段的发展,对酿酒酵母乙酸耐受性的机理研究不断深入,然而目前存在的问题是:

1) 目前的研究多使用转录组,研究基因转录的变化,但由于存在转录后和翻译后修饰,

以及蛋白间相互作用等调节,酵母菌转录组学的变化不一定反映到蛋白水平的变化。

2) 耐受性与乙醇发酵效率受不同的基因控制,耐性的提高不一定必然带来发酵效率的提高<sup>[32]</sup>,因为耐性相关基因的作用只有在特定胁迫条件下才发挥作用。

3) 目前对功能基因组的研究更多地关注结构基因的功能,但酵母菌的非编码 RNA,启动子活性等都对代谢工程改造具有重要影响<sup>[40-41]</sup>。

未来对酿酒酵母乙酸耐性的研究将深入揭示翻译后修饰等水平的调节机制,并进一步开发非编码 RNA 和启动子等遗传组件,将其用于利用合成生物学手段构建高效的发酵菌株,将具有广阔的应用前景。在制定代谢工程策略的时候,需要结合不同宿主背景和培养条件,考虑不同层次的代谢调控。随着对酿酒酵母乙酸耐性分子机制研究的深入,更多理性的代谢工程改造将成功用于选育高效的工业酿酒酵母菌株。此外,乙酸也作为食品防腐剂用于抑制一些导致腐败的酵母。对这些腐败相关酵母的乙酸耐性机理具有深入认识,也对食品领域防止食品腐败具有重要应用意义。

### REFERENCES

- [1] Zhao XQ, Bai FW. Mechanisms of yeast ethanol tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J Biotechnol*, 2009, 144(1): 23-30.
- [2] Li HX, Zhang XR, Shen Y, et al. Inhibitors and their effects on *Saccharomyces cerevisiae* and relevant countermeasures in bioprocess of ethanol production from lignocellulose—a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1321-1328 (in Chinese). 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. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1321–1328.
- [3] Hao XC, Men X, Zhang Y, et al. Review on molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* inhibitor tolerance during cellulosic ethanol production. *Microbiol China*, 2012, 39(2): 254–263 (in Chinese).  
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. *微生物学通报*, 2012, 39(2): 254–263.
- [4] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1207–1218.
- [5] Lin B, Zhao XQ, Ge XM, et al. Maize straw by-product acid solution for recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 6508-127 fermentation affection. *China Biotechnol*, 2007, 27(7): 61–67 (in Chinese).  
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. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(7): 61–67.
- [6] Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels*, 2009, 2(26): 1–11.
- [7] Xu GH, Zhao XQ, Li N, et al. Improvement of acetic acid tolerance of self-flocculating yeast by zinc supplementation. *CIESC J*, 2012, 63(6): 1823–1829 (in Chinese).  
徐桂红, 赵心清, 李宁, 等. 锌离子提高絮凝酵母高浓度乙酸胁迫耐受性的研究. *化工学报*, 2012, 63(6): 1823–1829.
- [8] Bajwa PK, Ho CY, Chan CK, et al. Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* T2 cells upon exposure to hardwood spent sulphite liquor: comparison to acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural. *Antonie van Leeu*, 2013, 103: 1281–1295.
- [9] Mollapour M, Piper PW. Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(18): 6446–6456.
- [10] Paiva S, Devaux F, Barbosa S, et al. Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2004, 21(3): 201–210.
- [11] Pacheco A, Talaia G, Sá Pessoa J, et al. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(3): 375–381.
- [12] Casey E, Sedlak M, Ho WN, et al. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2010, 10: 385–393.
- [13] Mira NP, Palma M, Guerreiro JF, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 79.
- [14] Gentsch M, Kuschel M, Schlegel S, et al. Mutations at different sites in members of the Gpr1/Fun34/YaaH protein family cause hypersensitivity to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* as well as in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 2007, 7(3): 380–390.
- [15] Strachotová D, Holoubek A, Kučerová H, et al. Ato protein interactions in yeast plasma membrane revealed by fluorescence lifetime imaging (FLIM). *BBA-Biomembranes*, 2012, 1818(9): 2126–2134.
- [16] Giannattasio S, Guaragnella N, Ždravčić M, et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front Microbiol*, 2013, 4(33): 1–7.
- [17] Mira NP, Henriques SF, Keller G, et al. Identification of a DNA-binding site for the transcription factor Haa1, required for *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid stress. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 6896–6907.
- [18] Kawahata M, Masaki K, Fujii T. Yeast genes

- involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. *FEMS Yeast Res*, 2006, 6(6): 924–936.
- [19] Simoes T, Mira NP, Fernandes AR, et al. The *SPII* gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, plays a prominent role in the development of yeast resistance to lipophilic weak-acid food preservatives. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(11): 7168–7175.
- [20] Mollapour M, Shepherd A, Piper PW. Novel stress responses facilitate *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of the monocarboxylate preservatives. *Yeast*, 2008, 25: 169–177.
- [21] Mollapour M, Shepherd A, Piper PW. Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slt2p (Mpk1) activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology*, 2009, 155: 3304–3311.
- [22] Zhang JG, Liu XY, He XP, et al. Improvement of acetic acid tolerance and fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the *FPSI* aquaglyceroporin gene. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 277–284.
- [23] Haitani Y, Tanaka K, Yamamoto M, et al. Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis. *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(6): 648–651.
- [24] Lei JJ, Zhao XQ, Ge XM, et al. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *J Biotechnol*, 2007, 131(3): 270–275.
- [25] Yang J, Ding MZ, Yuan YJ, et al. Integrated phospholipidomics and transcriptomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced tolerance to a mixture of acetic acid, furfural, and phenol. *OMICS*, 2012, 16(7): 374–386.
- [26] Li BZ, Yuan YJ. Transcriptome shifts in response to furfural and acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1915–1924.
- [27] Ding MZ, Wang X, Liu W, et al. Proteomic research reveals the stress response and detoxification of yeast to combined inhibitors. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43474.
- [28] Fernandes AR, Mira NP, Vargas RC, et al. *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 95–103.
- [29] Mira NP, Becker JD, Sá-Correia I. Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in *Saccharomyces cerevisiae* response to acetic acid. *OMICS*, 2010, 14(5): 587–601.
- [30] Tanaka K, Ishii Y, Ogawa J, et al. Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAAI* Gene, encoding a transcriptional activator. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(22): 8161–8163.
- [31] Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*, 1996, 15(9): 2227–2235.
- [32] Schuller C, Mamnun YM, Mollapour M, et al. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 706–720.
- [33] Mira NP, Lourenço AB, Fernandes AR, et al. The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(2): 202–216.
- [34] Vyas VK, Berkey CD, Miyao T, et al. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(11): 1882–1891.
- [35] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, et al. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a

- recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Fact*, 2011, 10: 2.
- [36] Zheng DQ, Liu TZ, Chen J, et al. Comparative functional genomics to reveal the molecular basis of phenotypic diversities and guide the genetic breeding of industrial yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(5): 2067–2076.
- [37] Gao L, Xia L. Sm-like protein enhanced tolerance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to inhibitors in hemicellulosic hydrolysate. *Bioresour Technol*, 2012, 124: 504–507.
- [38] Zhao XQ, Jiang RJ, Bai FW. Directed evolution of promoter and cellular transcription machinery and its application in microbial metabolic engineering—a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1312–1315 (in Chinese).  
赵心清, 姜如娇, 白凤武. 启动子和细胞全局转录机制的定向进化在微生物代谢工程中的应用. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1312–1315.
- [39] Pereira FB, Guimarães PMR, Gomes DG, et al. Identification of candidate genes for yeast engineering to improve bioethanol production in very high gravity and lignocellulosic biomass industrial fermentations. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4(1): 57.
- [40] Zheng DQ, Wu XC, Zhao YH, et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 3020–3027.
- [41] Bumgarner SL, Neuert G, Voight BV, et al. Single-cell analysis reveals that noncoding RNAs contribute to clonal heterogeneity by modulating transcription factor recruitment. *Mol Cell*, 2012, 45(4): 470–482.

(本文责编 陈宏宇)

—————

### 《生物工程学报》入选“2013年中国国际影响力优秀学术期刊”

据2013年12月30日《中国新闻出版报》消息,“2013中国最具国际影响力学术期刊”、“2013中国国际影响力优秀学术期刊”遴选工作已由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、清华大学图书馆、中国学术文献国际评价研究中心完成并发布,《生物工程学报》继入选“2012中国国际影响力优秀学术期刊”后,再次入选“2013中国国际影响力优秀学术期刊”。

“2013中国国际影响力优秀学术期刊”的遴选目的旨在从国际角度全面揭示,力求客观、全面、系统地反映我国学术期刊的学术影响力。评价中心采用的“期刊国际影响力指数”分科技、人文社科两个序列对我国学术期刊进行了排序,由70位期刊评价研究专家评审,根据指数高低分别按TOP 5%选出“2013中国最具国际影响力学术期刊”,按TOP 5%–10%选出“2013中国国际影响力优秀学术期刊”,科技类各175种,社科类各56种。

相关链接: <http://piccache.cnki.net/kns/images2009/other/gonggao/2013CAJZPDF/01.pdf>

