



研究报告

分别利用产甘油假丝酵母抗逆转录因子 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 对酿酒酵母菌株糠醛耐受改造姜毓迪^{1,2} 秦语遥^{1,2} 宗红^{1,2} 陆信曜^{1,2} 诸葛斌^{*1,2}

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 江南大学生物工程学院工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】纤维素是生物转化解决能源问题的主要原料之一，其水解物中存在严重影响抑制菌株生长的糠醛，需脱毒才可应用于发酵，提高菌株耐受性是解决纤维素水解液实际生产应用的关键。【目的】酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是主要的纤维素水解液发酵工业菌株，但糠醛耐受性较低，通过分子改造获得具有高糠醛耐受性的菌株。【方法】利用新获得的产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)的相关抗逆转录因子 *CgSTB5*、*CgSEF1* 和 *CgCAS5*，通过分子技术进行 *S. cerevisiae* 改造，考察其对酿酒酵母糠醛耐受性的影响，并尝试应用于未脱毒纤维素乙醇发酵。

【结果】单个表达 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 的酿酒酵母，通过菌株点板实验表明菌株的糠醛耐受性提高25%以上，并且摇瓶发酵结果显示糠醛降解性能明显提高，生长延滞期明显缩短，*S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5* 的未脱毒纤维素乙醇发酵生产效率提高12.5%左右。【结论】转录因子 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 均能对提高酿酒酵母糠醛耐受性起到重要作用，并且有助于提高酿酒酵母菌株未脱毒纤维素乙醇发酵性能。

关键词：产甘油假丝酵母，酿酒酵母，糠醛耐受，转录因子，纤维素水解液

Enhance *Saccharomyces cerevisiae* furfural tolerance by the introduction of *Candida glycerinogenes* transcription factors *CgSTB5* or *CgSEF1*JIANG Yudi^{1,2} QIN Yuyao^{1,2} ZONG Hong^{1,2} LU Xinyao^{1,2} ZHUGE Bin^{*1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 Research Center of Industrial Microbiology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] Cellulose is one of the main raw materials for biotransformation to solve energy problems. Furfural, existing in the cellulose hydrolysate, which seriously affects the growth inhibition of strains, must be detoxified before it can be applied in fermentation. Therefore, improving the strain

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31970033)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918106; E-mail: bzhuge@163.com

Received: 29-01-2021; Accepted: 22-03-2021; Published online: 12-04-2021

基金项目：国家自然科学基金(31970033)

*通信作者：Tel: 0510-85918106; E-mail: bzhuge@163.com

收稿日期：2021-01-29; 接受日期：2021-03-22; 网络首发日期：2021-04-12

tolerance of furfural is the key to solve the practical production application of cellulose hydrolysate. **[Objective]** *Saccharomyces cerevisiae* is a major industrial strain of cellulose hydrolysate fermentation, but it could not tolerant high furfural, and the strain with high furfural tolerance was obtained by molecular modification. **[Methods]** In this study, the furfural relevant transcription factors obtained from *Candida glycerinogenes*, *CgSTB5*, *CgSEF1* and *CgCAS5*, were performed to modify *S. cerevisiae* to investigate their effects on furfural tolerance and apply to the ethanol fermentation of undetoxified cellulose. **[Results]** Expression of *CgSTB5* or *CgSEF1* could increase the furfural tolerance more than 25% in the spot plate experiment. The furfural degradation performance was significantly improved. The growth retardation period was shortened. The production efficiency of undetoxified cellulosic ethanol fermentation with *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5* was increased by about 12.5%. **[Conclusion]** Both *CgSTB5* and *CgSEF1* could improve furfural tolerance in *S. cerevisiae*, which contribute to the improvement of the fermentation performance of undetoxified cellulosic ethanol in *S. cerevisiae*.

Keywords: *Candida glycerinogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, furfural tolerance, transcription factors, cellulose hydrolysis solution

生物质纤维素是世界上最丰富的可再生有机资源,为“绿色发酵”提供了可能性,当前被广泛研究的用纤维素水解液生产生物质乙醇是改善能源结构的有效途径^[1]。然而水解过程中形成的副产物对微生物发酵有严重的影响,其中糠醛是最为重要的醛类抑制因子^[2],必须经脱毒降毒后方可使用,是阻碍生物质纤维素大规模发酵应用的关键问题,因此,获得能够耐受高浓度糠醛的酵母菌株是绿色发酵生产的主要途径之一。

当前的研究表明,酿酒酵母对于糠醛耐受多与NADPH的调控有关,其中有300多个基因在应激作用下得到了诱导表达^[3],但通过对酿酒酵母菌这些基因进行改造后,菌株糠醛耐受能力并未很好地实现预期目标^[4]。

前期研究发现,产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)具有极高的糠醛胁迫耐受性^[5-6]。转录因子可调控多基因表达,通过表达不同的转录因子来实现提高菌株的耐受性是一种较新的育种策略,但截至目前,关于糠醛抗性转录因子的研究还很有限。*C. glycerinogenes*在糠醛胁迫下3个转录因子的转录水平大幅上调,分别为*CgSTB5*、*CgSEF1*和*CgCAS5*,过表达后菌株糠醛耐受性明显提高。经过NCBI数据库比较分析,来源于*S. cerevisiae*的*ScSTB5*和*ScSEF1*与*CgSTB5*和*CgSEF1*虽相似性不高,但有明显保守区。本研究通过在酿酒酵母

中分别表达*C. glycerinogenes*的抗性转录因子基因*CgSTB5*、*CgSEF1*和*CgCAS5*,考察转录因子对重组菌株糠醛耐受性及高糠醛下乙醇发酵性能的影响,以期能为未脱毒纤维素水解液为底物发酵提供优良的菌株资源和新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

研究中所使用的菌株 *Escherichia coli* JM109、*Saccharomyces cerevisiae* W303-1A、*Candida glycerinogenes* WL2002-5、*Saccharomyces cerevisiae* W303/p414、*Saccharomyces cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5*、*Saccharomyces cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1*、*Saccharomyces cerevisiae* W303/p414-*CgCAS5* 为本实验构建菌株。设计的引物序列如表1所示。

1.2 主要试剂和仪器

酵母膏和蛋白胨, Oxoid 公司; 实验用各种限制性内切酶和 *Ex Taq* DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、柱回收试剂盒和酵母 DNA 提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。多功能酶标仪、琼脂糖凝胶电泳仪、液相色谱柱, Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪, Alpha Innotech 公司。所用引物由无锡天霖技术有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列	酶切位点
Primers name	Sequence (5'→3')	Restriction site
CgCAS5-F	CTAAGTTTCTAGAACTAGTGGATCCatgatgcatcttctctcc	<i>Bam</i> H I
CgCAS5-R	GGGCCCCGACGTCCTTAAGCTATAGTTgtaagtattttctctcggtatc	<i>Sma</i> I
CgSTB5-F	ttttctagaactagtggatccATGAGTCTCGTTCACGATCAACAC	<i>Bam</i> H I
CgSTB5-R	atcgaattcctgcagcccggtCTAAACTCTAGTGAGTGTAGATATTCGATG	<i>Sma</i> I
CgSEF1-F	ttttctagaactagtggatccATGTCTTTGAATATCACAAACAAGAGAA	<i>Bam</i> H I
CgSEF1-R	atcgaattcctgcagcccggtTCAATTCCAGCTCAAGGACTGTAG	<i>Sma</i> I
RT-ScREX4-F	GCCTCCGAAAGCAATCCTACCTC	
RT-ScREX4-R	TTCGAGGGGCATATTGGGTTGTAC	
RT-ScDIP5-F	TGGCTTGGCGTACATGAATGTGTC	
RT-ScDIP5-R	TTGAGCACGGCAGGCTTTATCG	
RT-ScGSH1-F	CTTGACAGCATCCATCAGGACCAG	
RT-ScGSH1-R	AGCCAGTTTCGCCTCTTTGTCTTC	
RT-ScOLE1-F	CTACTACGCTGTCGGTGGTGTTC	
RT-ScOLE1-R	CCATTTAGCGGACCCTTCAACGG	

1.3 培养基与培养条件

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。氨苄青霉素抗性平板需额外添加 100 μg/mL Amp。

色氨酸缺陷培养基(g/L): 葡萄糖 20.000, YNB 6.700, 尿嘧啶 0.020, 腺嘌呤 0.020, 除色氨酸外其他氨基酸 0.076。

YPD 培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0。

发酵培养基 YPG (g/L): 酵母粉 10.0, 蛋白胨

20.0, 葡萄糖 100.0。

固体培养基加入琼脂 20.0 g/L。

发酵培养条件: 250 mL 三角瓶 50 mL 装液量, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 初始接菌 *OD*₆₀₀ 值为 0.25。

1.4 基因改造

以 *C. glycerinogenes* 基因组 DNA 为模板^[7], PCR 扩增基因片段 *CgSTB5*、*CgSEF1* 和 *CgCAS5*, 双酶切后连接 p414 载体, 构建重组质粒(图 1)用于在 *S. cerevisiae* 中表达。

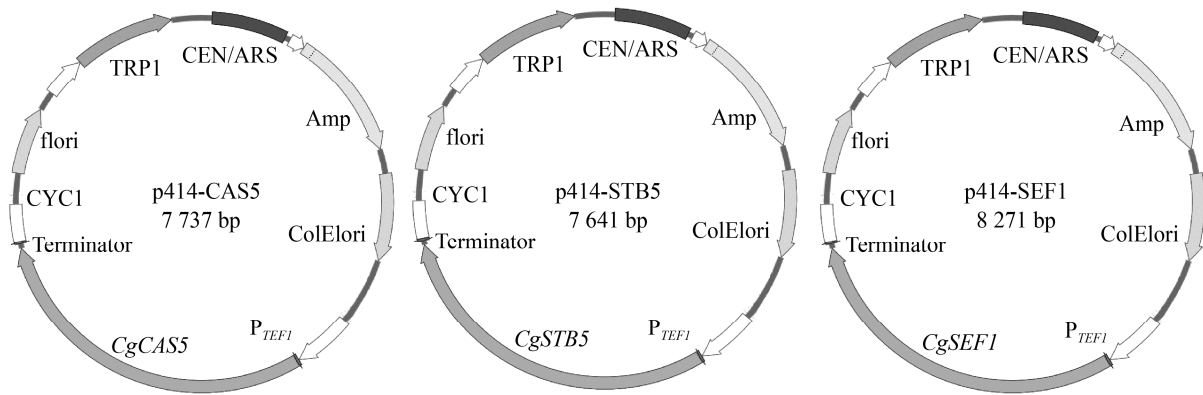


图 1 重组表达质粒 p414-CAS5、p414-STB5 和 p414-SEF1 示意图

Figure 1 The recombinant plasmids of p414-CAS5, p414-STB5 and p414-SEF1

将重组质粒 p414-STB5、p414-SEF1 和 p414-CAS5 采用醋酸锂法^[8]转化酿酒酵母 W303-1A 感受态细胞。以色氨酸作为营养缺陷标记筛选获得重组菌,挑选转化子,划线纯化培养,并利用酵母 DNA 提取试剂盒提取重组菌的基因组 DNA,采用表 1 中对应的引物对 *CgSTB5*、*CgSEF1* 和 *CgCAS5* 的表达进行 PCR 鉴定。

1.5 相关基因表达 RT-PCR 分析

30 °C、200 r/min 条件下用 YPD 培养基摇瓶培养重组菌,12 h 后转接含有 2 g/L 糠醛的 YPD 培养基,30 °C、200 r/min 培养 10 h。酵母总 RNA 提取方法参见文献[9]。RT-qPCR 反应体系与条件参见南京诺唯赞试剂盒说明书。引物序列见表 1。数据分析参照文献[10]。

1.6 重组菌耐受敏感性比较

重组菌株用 YPD 培养基于 30 °C、200 r/min 培养 12–16 h 后,10 000×g 离心 1 min 收集菌体,并用生理盐水洗涤细胞 2–3 次,按 10%接种量分别接入含 2 g/L 糠醛的 YPD 培养基中,30 °C、200 r/min 摇瓶培养 10 h,调整到相同的初始 OD_{600} 值为 1.0,10 倍比依次稀释,点种于含 2 g/L 糠醛的 YPD 平板,30 °C 培养 2 d,方法参照文献[11]。

重组菌在 YPD 培养基中转接 2 次,30 °C、200 r/min 培养 10–12 h 至对数生长中后期,10 000×g 离心 1 min 收集菌体,转接至装有 50 mL YPD 的 250 mL 三角瓶中,并分别添加 1.5 g/L 和 2 g/L 糠醛,30 °C、200 r/min 下培养 54 h,每 6 h 取样用于代谢产物分析。

1.7 重组菌未脱毒纤维素水解液乙醇发酵

利用甘蔗渣进行纤维素水解液的制备方法参考文献[12],未脱毒纤维素水解液经 HPLC 检测含有约 100 g/L 葡萄糖和 1.5 g/L 糠醛。重组菌在 YPD 培养基中转接 2 次,培养 10–12 h 后 10 000×g 离心 1 min 收集菌体,转接至装有 50 mL 未脱毒纤维素水解液的 250 mL 三角瓶中,30 °C、100 r/min 条

件下培养 54 h,每 6 h 取样用于代谢产物分析。

1.8 葡萄糖和乙醇含量的测定

葡萄糖和乙醇的含量通过 HPLC 进行检测,测定方法参照文献[13]。

2 结果与分析

2.1 *S. cerevisia* 重组菌株的糠醛耐受性改造

以 *C. glycerinogenes* 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增获得了转录因子基因 *CgSTB5*、*CgSEF1* 和 *CgCAS5*,并构建重组酵母表达质粒 p414-STB5、p414-SEF1 和 p414-CAS5,构建过程如图 2 所示。重组酵母表达质粒 p414-STB5、p414-SEF1 和 p414-CAS5 经醋酸锂法转化酿酒酵母 W303 后,通过色氨酸缺陷型抗性平板筛选,获得了 3 个成功表达转录因子的重组菌株 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5*、*S. cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1* 和 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgCAS5*。经 RT-qPCR 验证 *CgSTB5*、*CgSEF1* 在重组菌中得到顺利表达(图 3)。

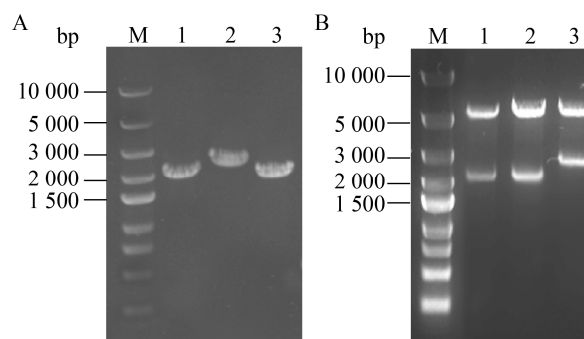


图 2 酵母基因改造电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of genetic modification

注: M: DNA Marker 2503。A: 目的片段的 PCR 扩增: 1: *CgSTB5* 基因的扩增片段; 2: *CgSEF1* 基因的扩增片段; 3: *CgCAS5* 基因的扩增片段。B: p414 重组质粒的双酶切验证: 1: 重组质粒 p414-STB5 (*Bam*H I+*Sma* I); 2: 重组质粒 p414-CAS5 (*Bam*H I+*Sma* I); 3: 重组质粒 p414-SEF1 (*Bam*H I+*Sma* I)

Note: M: DNA Marker 2503. A: Target PCR products: 1: PCR product of *CgSTB5* fragment; 2: PCR product of *CgSEF1* fragment; 3: PCR product of *CgCAS5* fragment. B: Restriction analysis of plasmid p414: 1: Plasmid p414-STB5 (*Bam*H I+*Sma* I); 2: Plasmid p414-CAS5 (*Bam*H I+*Sma* I); 3: Plasmid p414-SEF1 (*Bam*H I+*Sma* I)

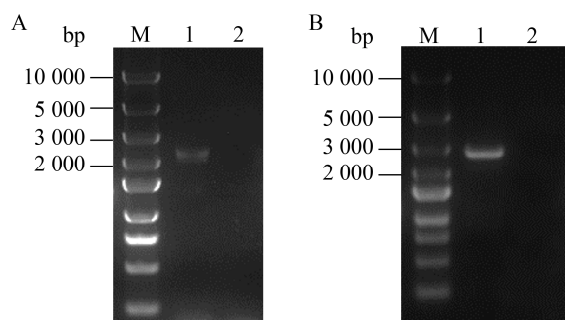


图3 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 基因 RT-qPCR 产物电泳图
Figure 3 Agarose gel electrophoresis of RT-qPCR fragment of *CgSTB5* and *CgSEF1*

注: M: DNA Marker 2503。A: 1: 片段 *CgSTB5*; 2: 对照。
B: 1: 片段 *CgSEF1*; 2: 对照
Note: M: DNA Marker 2503. A: 1: *CgSTB5* fragment; 2: Control.
B: 1: *CgSEF1* fragment; 2: Control

2.2 不同转录因子重组菌对糠醛的耐受性

出发菌株可在 1.5 g/L 糠醛的平板上缓慢生长, 如图 4 的点板耐受性试验所示, 在 2 g/L 糠醛浓度条件下, 出发菌株几乎不生长, 而表达 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 的菌株表现出明显的生长优势, 重组菌的糠醛耐受性提高了 25% 以上。

重组菌株在含 1.5 g/L 和 2 g/L 糠醛的 YPD 培养基中的摇瓶培养结果(图 5)表明, 与原始菌株相比, 重组酿酒酵母在糠醛压力下具有明显的生长优势。在 1.5 g/L 糠醛压力下(图 5A), 表达 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 的菌株仅在 6 h 后即开始快速生长, 36 h 时接近最高生物量, 而对照菌株前 12 h 生长受到抑制, 48 h 才完成菌体生长; 在 2 g/L 糠醛压力条件下(图 5B), 表达 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 的重组菌株生长趋势明显优于对照菌株。

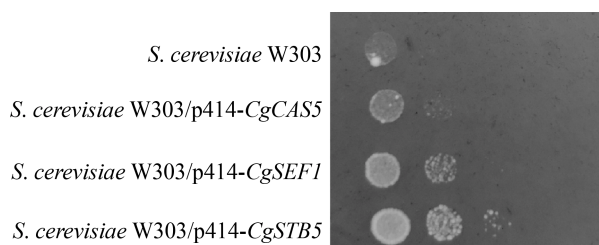


图4 重组菌对 2 g/L 糠醛的敏感性
Figure 4 The tolerance assay of recombinant *S. cerevisiae* to 2 g/L furfural

通过对 2 种糠醛浓度培养过程中糠醛含量的检测(图 5C、5D), *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5* 和 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1* 糠醛降解速率远高于对照菌株, 分别提前 12 h 和 6 h, 而表达 *CgCAS5* 的菌株在糠醛条件下无论生长还是分解性能均未有提高。这一结果表明, 酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5* 和 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1* 不仅提高了糠醛耐受性, 而且具有更优良的糠醛降解能力。

2.3 重组菌糠醛耐受相关基因转录水平

转录因子通过调节耐受性相关的基因表达, 进而改善菌株的耐受性。核糖体功能相关基因 *ScREX4*、细胞转运相关的膜基因 *ScDIP5*、细胞抗氧化相关的谷胱甘肽合成基因 *ScGSH1* 和膜组成相关的脂肪酸合成基因 *ScOLE1* 是细胞耐受性的相关基因。在高糠醛压力条件下, *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5* 和 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1* 相较于对照菌株, 4 个相关基因的上调均十分显著(图 6), 其中表达 *CgSTB5* 的菌株其 *ScDIP5* 和 *ScGSH1* 的相对表达量上调均超过 10 倍, 表达 *CgSEF1* 的菌株其 *ScREX4*、*ScDIP5* 和 *ScGSH1* 的相对表达量上调均超过 5 倍, 然而 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgCAS5* 相对表达水平平均低于对照菌株, 与前面菌株的耐受性结果一致。以上结果表明, 酿酒酵母表达 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 具有良好的糠醛耐受性是基于转录因子 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 对核糖体相关代谢途径、细胞膜转运途径、谷胱甘肽和脂肪酸合成相关途径的调控及糠醛降解能力等多方面共同作用的结果。

2.4 重组 *S. cerevisiae* 未脱毒纤维素乙醇发酵性能

为了考察重组 *S. cerevisiae* 未脱毒纤维素乙醇发酵性能, 利用未脱毒纤维素水解液进行乙醇发酵(图 7), *S. cerevisiae* 单表达 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 的重组菌株相比对照菌均具有生长优势, 并且表达 *CgSTB5* 的重组菌株达到乙醇产量最高值的时间相

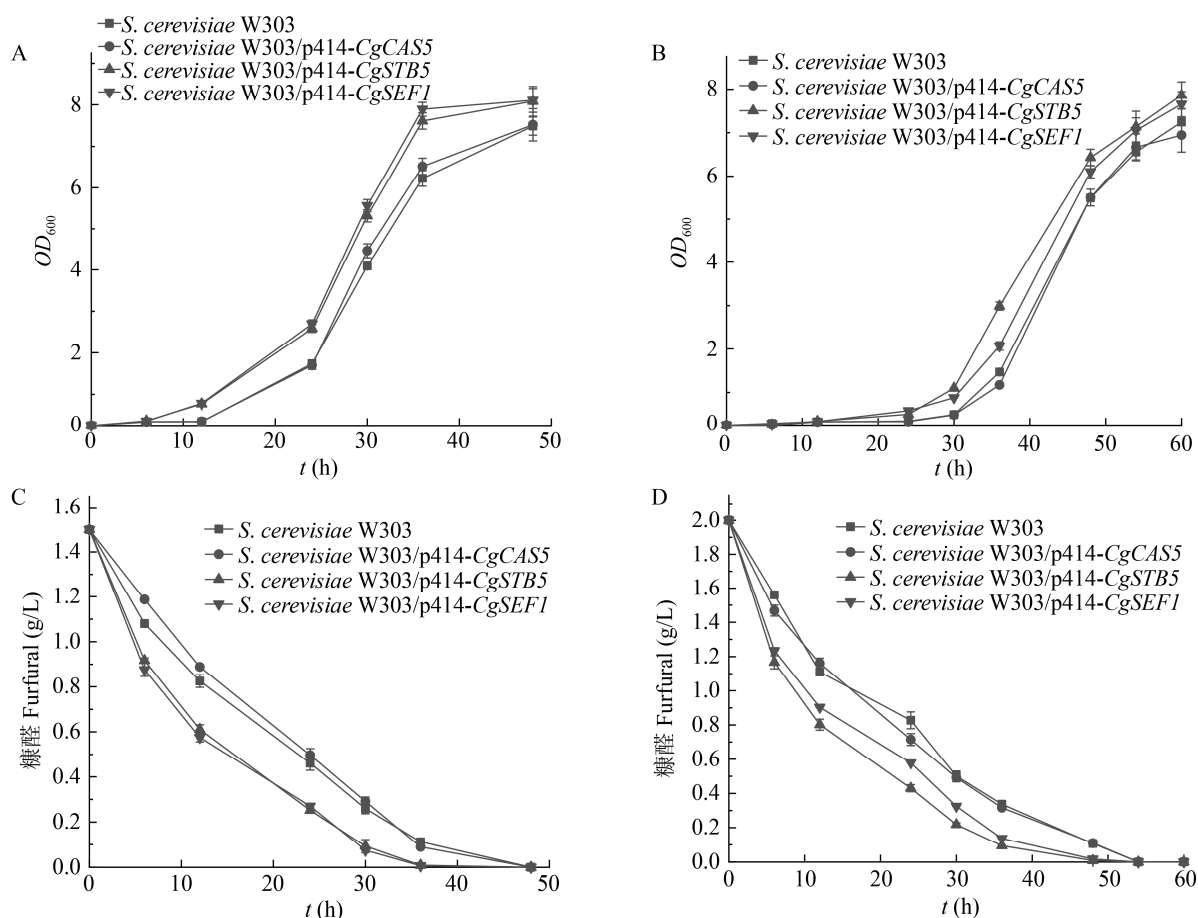


图5 糠醛压力下重组菌株生长曲线(A、B)和糠醛降解(C、D)

Figure 5 Growth curves (A, B) and furfural degradation (C, D) of recombinant strains under furfural stress

注: A、C: 1.5 g/L 糠醛; B、D: 2.0 g/L 糠醛

Note: A, C: 1.5 g/L furfural; B, D: 2.0 g/L furfural

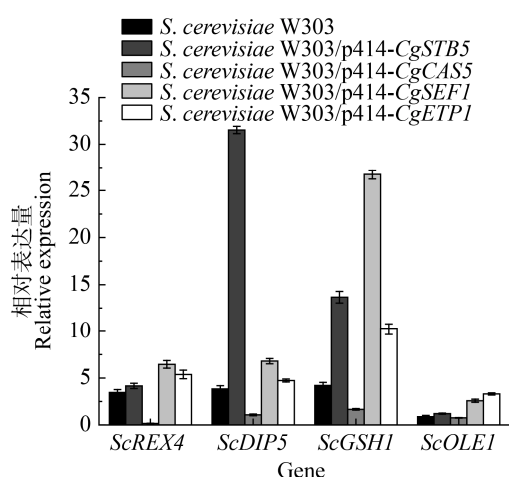


图6 不同重组酵母糠醛压力响应基因表达水平差异

Figure 6 Expression levels of furfural stress-related genes in the *S. cerevisiae* mutants

比对照菌株提前 6 h, 即乙醇生产效率提高 12.5%, 而且乙醇产量提高 9%。上述结果表明, 与对照菌株相比, *S. cerevisiae* W303/p414-CgSTB5 在未脱毒纤维素水解液乙醇发酵中优势明显。

3 讨论与结论

赵鲜仙等^[4]报道了利用 *ADH7* 启动子精细调控表达 *MSN2* 酿酒酵母菌株对糠醛耐受的研究, 使酿酒酵母糠醛耐受明显提高, 但未涉及应用于糠醛抗性发酵产品性能的研究。吴宇等^[14]通过酿酒酵母过表达自身的谷氨酰胺合成酶基因 *GLN1* 提高了糠醛耐受的同时, 发酵乙醇含量提高了 5.3 倍, 但糠耐浓度为 1.55 g/L 时乙醇产量为 8.64 g/L。本文采用异源表达高糠醛耐受菌株 *C. glycerinogenes*

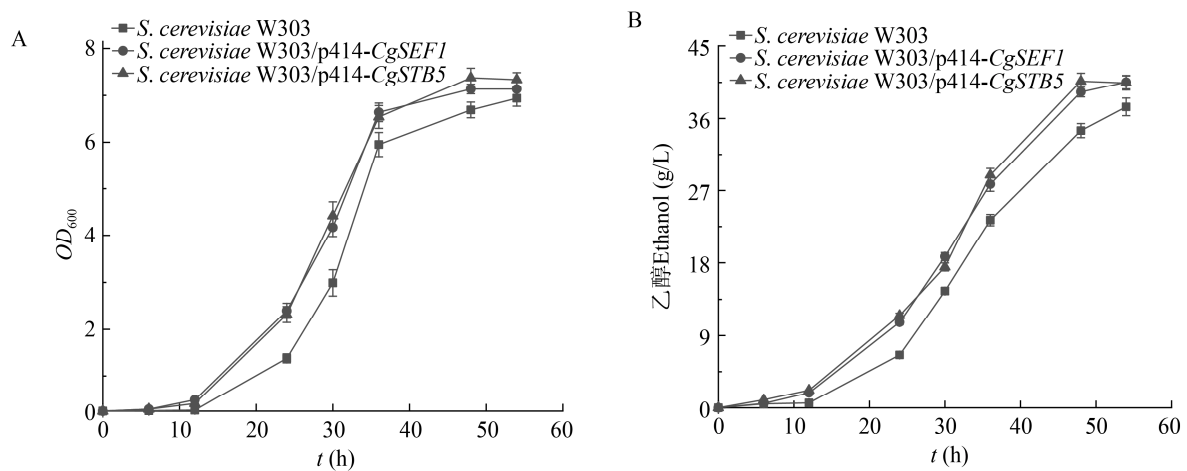


图 7 未脱毒纤维素水解液乙醇发酵

Figure 7 Ethanol fermentation by undetoxified lignocellulosic hydrolysate

注: A: 生长曲线; B: 乙醇积累

Note: A: Growth curve; B: Ethanol accumulation

的转录因子,使 *S. cerevisiae* 糠醛耐受能力提高到 2 g/L,乙醇产量大于 40 g/L。通过表达 *CgSTB5*、*CgSEF1*、*CgCAS5* 的酿酒酵母重组菌株 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5*、*S. cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1*、*S. cerevisiae* W303/p414-*CgCAS5*,表明 *S. cerevisiae* W303/p414-*CgSTB5*、*S. cerevisiae* W303/p414-*CgSEF1* 菌株在 2 g/L 糠醛压力作用下,生长延滞期缩短,并且通过降解糠醛使得耐受能力有明显提升。经 RT-qPCR 分析,在糠醛压力下,转录因子 *STB5* 和 *SEF1* 对于核糖体相关功能基因 *ScREX4*、谷氨酰胺转运蛋白基因 *ScDIP5*、谷胱甘肽相关基因 *ScGSH1* 及编码饱和与不饱和脂肪酸转换相关 *ScOLE1* 的调控都有一定程度的上调。有许多研究证实 *ScSTB5* 作为转录因子的锌簇激活剂,被称为 *S. cerevisiae* 中的多药抗性基因调控因子之一^[15],通过调控磷酸戊糖(Pentose Phosphate, PP)途径维持基础通量,提供核苷酸前体,以满足有氧生长所需的 NADPH^[16]。本实验中表达 *CgSTB5* 的酿酒酵母中 *ScDIP5* 和 *ScGSH1* 上调尤其显著,这表明转录因子 *STB5* 通过调整细胞膜转运机制和提高细胞氧化还原代谢能力来抵御外界

高糠醛条件压力胁迫^[17-18]。*SEF1* 是一种新型的 Cys₆Zn₂ DNA 结合蛋白,其在缺铁环境中通过激活铁吸收基因的转录,在 *Candida albicans* 的毒力中起着至关重要的作用^[19],并且是被推测编码 *C. albicans* 中 GTP 环醇酶 II 和核黄素合成酶的转录因子^[20]。本实验中表达 *CgSEF1* 的酿酒酵母其 *ScGSH1* 表达上调最为明显,其余 3 个基因 *ScREX4*、*ScDIP5* 和 *ScOLE1* 的表达也显著上调,展现出转录因子 *SEF1* 多基因调控的特性,通过细胞膜、核糖体和氧化还原代谢途径共同作用,提高细胞对糠醛胁迫的耐受性^[17-18,21]。酿酒酵母对纤维素水解酶类抑制因子的脱毒及耐受涉及多基因、多层次、复杂的相互作用。

本研究通过来源于产甘油假丝酵母的转录因子 *CgSTB5* 和 *CgSEF1* 对 *S. cerevisiae* 进行应用改造,显著提高了菌株的糠醛耐受和降解能力,提高了 *S. cerevisiae* 未脱毒的纤维素水解液发酵乙醇的性能,可节约资源、降低成本。本研究为提高酿酒酵母糠醛耐受性提供了新的基因资源和思路,也为进一步挖掘 *C. glycerinogenes* 抗逆基因提供了借鉴思路。

REFERENCES

- [1] Ye GY, Zeng DF, Zhang SS, Fan MS, Zhang HD, Xie J. Ethanol production from mixtures of sugarcane bagasse and *Dioscorea composita* extracted residue with high solid loading[J]. Bioresource Technology, 2018, 257: 23-29
- [2] Heer D, Sauer U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain[J]. Microbial Biotechnology, 2008, 1(6): 497-506
- [3] Liu ZL, Moon J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion[J]. Gene, 2009, 446(1): 1-10
- [4] Zhao XX, Zhou C, Zhang SW, Wang LL, Lu YT, Ma MG. Study on furfural tolerance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with fine-tune expression of MSN2 under ADH7 promoter control[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1903-1911 (in Chinese)
赵鲜仙, 周场, 张思伟, 王琳璐, 路亚婷, 马孟根. ADH7 启动子精细调控表达 MSN2 酿酒酵母菌株对糠醛耐受的研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1903-1911
- [5] Zhao ML, Shi DC, Lu XY, Zong H, Zhuge B, Ji H. Ethanol fermentation from non-detoxified lignocellulose hydrolysate by a multi-stress tolerant yeast *Candida glycerinogenes* mutant[J]. Bioresource Technology, 2019, 273: 634-640
- [6] Zhao ML, Zhuge B, Lu XY, Zong H, Shi DC. Research progress in stress tolerance of industrial yeasts[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1155-1164 (in Chinese)
赵美琳, 诸葛斌, 陆信曜, 宗红, 施丁昌. 工业酵母抗逆机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1155-1164
- [7] Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications[J]. BioTechniques, 2011, 50(5): 325-328
- [8] Gietz RD. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1205: 1-12
- [9] Sierkstra LN, Verbakel JM, Verrips CT. Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(12): 2559-2566
- [10] Liu ZL, Palmquist DE, Ma MG, Liu JB, Alexander NJ. Application of a master equation for quantitative mRNA analysis using qRT-PCR[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 143(1): 10-16
- [11] Molin M, Norbeck J, Blomberg A. Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(3): 1415-1423
- [12] Yuan SF, Guo GL, Hwang WS. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(6): 1581-1590
- [13] Guo XK, Fang HY, Zhuge B, Zong H, Song J, Zhuge J, Du XX. *budC* knockout in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion from glycerol to 1,3-propanediol[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2013, 60(6): 557-563
- [14] Wu Y, Wang JH, Zhao X. Enhanced furfural tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by the overexpression of *GLN1* gene[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(8): 69-78 (in Chinese)
吴宇, 王金华, 赵筱. *GLN1* 基因过表达对提高酿酒酵母糠醛耐受性的研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(8): 69-78
- [15] Matsufuji Y, Nakagawa T, Fujimura S, Tani A, Nakagawa J. Transcription factor Stb5p is essential for acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2010, 50(5): 494-498
- [16] Cadière A, Galeote V, Dequin S. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc factor protein Stb5p is required as a basal regulator of the pentose phosphate pathway[J]. FEMS Yeast Research, 2010, 10(7): 819-827
- [17] Ask M, Mapelli V, Höck H, Olsson L, Bettiga M. Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 87
- [18] Yang F, Lu XY, Zong H, Ji H, Zhuge B. Gene expression profiles of *Candida glycerinogenes* under combined heat and high-glucose stresses[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 126(4): 464-469
- [19] Chen CB, Noble SM. Post-transcriptional regulation of the Sef1 transcription factor controls the virulence of *Candida albicans* in its mammalian host[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(11): e1002956
- [20] Dmytruk K, Lyzak O, Yatsyshyn V, Kluz M, Sibirny V, Puchalski C, Sibirny A. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 172: 11-17
- [21] Nasution O, Lee YM, Kim E, Lee Y, Kim W, Choi W. Overexpression of *OLE1* enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(3): 620-631