

定向驯化高抗糠醛和对羟基苯甲酸的酵母菌株

樊美杉^{1,2*}, 卢圣捷², 张红丹², 钟春梅², 谢君^{2*}

1 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 广东 广州 510640

2 华南农业大学 生物质工程研究院, 广东 广州 510642

樊美杉, 卢圣捷, 张红丹, 钟春梅, 谢君. 定向驯化高抗糠醛和对羟基苯甲酸的酵母菌株[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 371-388.

FAN Meishan, LU Shengjie, ZHANG Hongdan, ZHONG Chunmei, XIE Jun. Directed domestication of yeast strains with high tolerance to furfural and *p*-hydroxybenzoic acid[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 371-388.

摘要: 在木质纤维素原料预处理过程中不可避免地形成抑制剂, 包括糖降解产物(如 5-羟甲基糠醛、糠醛)以及木质素降解的酚类化合物(如 4-羟基苯甲酸、香兰素)等, 这些化合物会降低发酵效率。**【目的】**提高酵母对纤维素水解液中的抑制物耐受性对工业生物质乙醇高效生产至关重要。**【方法】**采用浓度较高的糠醛和对羟基苯甲酸对模式菌株 W303-1A 进行梯度驯化, 对比驯化菌株和出发菌株在不同抑制物浓度下的生长曲线及发酵乙醇性能; 对驯化后菌株和出发菌株进行高通量基因组重测序, 分析其糖代谢途径和耐药性相关的变异点基因, 对与耐抑制物有关的变异点进行分析挖掘。**【结果】**在含有 2.0 g/L 糠醛的培养基中, F-2 菌的乙醇产量为 19.40 g/L, 比原始菌株高 2 倍。在含有 1.6 g/L 糠醛和对羟基苯甲酸的培养基中, B-2 菌的最高乙醇产量为 20.22 g/L, 是原始菌株的 7.6 倍。通过对出发菌株和驯化后菌株进行高通量基因组重测序发现, 糖代谢途径中编码乙醇脱氢酶、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶和丙酮酸脱氢酶的基因发生部分突变, 而 YAP1 (参与氧化应激反应和氧化还原稳态的转录激活剂)、PDR5 (耐多种化学物质的多效 ABC 外运载体)和 RPN4 (锌指蛋白)基因的部分突变对酿酒酵母的耐抑制物具有重要作用。**【结论】**研究结果为进一步优化和构建模式菌株提供更多的操作靶点。

关键词: 酵母; 驯化; 抑制物; 纤维素乙醇

资助项目: 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室项目(E439kf0201)

This work was supported by the Guangdong Provincial Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development Project (E439kf0201).

*Corresponding authors. E-mail: FAN Meishan, meishanfan@scau.edu.cn; XIE Jun, xiejun@scau.edu.cn

Received: 2024-08-07; Accepted: 2024-11-01; Published online: 2024-11-25

Directed domestication of yeast strains with high tolerance to furfural and *p*-hydroxybenzoic acid

FAN Meishan^{1,2*}, LU Shengjie², ZHANG Hongdan², ZHONG Chunmei², XIE Jun^{2*}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Guangzhou 510640, Guangdong, China

2 Institute of Biomass Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: Inhibitors including sugar degradation products (e.g., 5-hydroxymethylfurfural and furfural) and phenols (e.g., 4-hydroxybenzoic acid and vanillin) from lignin degradation are inevitably formed in the pretreatment process of lignocellulose raw materials, exerting a negative impact on the fermentation efficiency. **[Objective]** To improve the tolerance of yeast to inhibitors in cellulose hydrolysates and ensure the efficient production of industrial biomass ethanol. **[Methods]** The model strain W303-1A was domesticated with the inhibitor furfural and *p*-hydroxybenzoic acid alone or in combination. The growth curves and ethanol fermentation performance of the domesticated strain and the original strain were compared under different inhibitor concentrations. We then conducted high-throughput genome resequencing of both the domesticated and original strains to identify the mutations in genes related to the glucose metabolism and drug resistance, thereby analyzing the variation points related to inhibitor tolerance. **[Results]** In the medium containing 2.0 g/L furfural, the ethanol yield of F-2 was 19.40 g/L, which was 2 times higher than that of the original strain. In the medium containing 1.6 g/L furfural and *p*-hydroxybenzoic acid, the highest ethanol yield of B-2 was 20.22 g/L, 7.6 times that of the original strain. Then, high-throughput genome resequencing of the original and domesticated strains revealed several mutations in the genes encoding ethanol dehydrogenase, fructose-1,6-diphosphate aldolase, and pyruvate dehydrogenase in the glucose metabolism pathway. The mutations of YAP1 (transcriptional activator involved in oxidative stress response and REDOX homeostasis), PDR5 (pleiotropic ABC transporter tolerant to multiple chemicals), and RPN4 (zinc finger protein) genes played an important role in the inhibitor tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **[Conclusion]** The findings provide more targets for further optimization and construction of model strains.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; domestication; inhibitors; cellulosic ethanol

过度使用石油等化石燃料带来的储量枯竭、温室气体排放等问题危害着能源安全和生态环境^[1]。近年来,生物质燃料凭借其原料廉价、来源丰富且可再生性等受到了广泛关注,成为替代能源的新选择^[2]。木质纤维素燃料乙

醇是二代生物质能源,包括农林废弃物、工业废残留物、餐厨垃圾等,可以缓解粮食危机^[3]。利用木质纤维素生产乙醇要经过预处理过程,然而在此过程中会产生一些抑制物,严重影响微生物生长和乙醇得率^[4]。抑制物的种类和含

量因原料和预处理方法的不同存在差异, 主要分为酚类化合物(香草醛、丁香醛、苯酚等)、酸类化合物(乙酸、甲酸等)和呋喃醛类化合物(糠醛、5-羟甲基糠醛)三大类。其中酚类化合物在纤维素水解液中的含量很低, 但其毒性却很大, 且一些低分子含有脂肪族官能团的酚类化合物的抑制效果最强^[5]。为了降低抑制剂的抑制作用, 通常会选择在发酵前脱毒处理, 然而此过程复杂, 工业成本较高, 并且会造成糖分的损失, 经济效益不高^[6]。因此, 选育抑制物高耐受性的微生物更加经济有效^[7]。

酿酒酵母是传统乙醇生产工业中使用的微生物, 发酵效率高并且对一些毒性物质耐受性较强, 因此进一步选育抑制物高抗性的酿酒酵母对提高纤维素乙醇生产效率具有重要意义^[8-9]。目前, 选育酿酒酵母主要利用诱变筛选^[10]、定向梯度驯化^[11]、基因工程^[12]等手段。诱变筛选是一种简单的传统选育方法, 会产生多种突变, 具有较强的随机性。基因工程手段是基于基因组、转录组和蛋白组分析, 挖掘靶点基因, 设计出合理的基因改造策略和路线, 有针对性地强化菌株对抑制剂的耐受性。定向梯度驯化则通过施加外界环境压力筛选获得高耐受力菌株, 是自然选择理想表型性状突变菌株的有力方法, 广泛应用于产生耐抑制剂的酵母菌株^[13]。虽然已获得多种耐受单一抑制剂的工程菌株, 并揭示了其耐受机理^[14-15], 但实际水解液的复合抑制剂作用复杂, 包括累加作用和协同作用^[16-18], 其作用机制尚不明了。

本研究选取糠醛和对羟基苯甲酸作为环境压力, 对酿酒酵母 W303-1A 进行单一抑制物和复合抑制物的定向梯度驯化。得到的耐受菌株在不同抑制物种类和浓度的培养基中验证其生长和发酵性能, 并通过高通量重测序分析基因差异, 以期找到新的靶点基因, 阐明酿酒酵母

对糠醛、对羟基苯甲酸的代谢通路, 揭示其耐受机制。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究所用的酿酒酵母菌株为模式菌株 W303-1A, 购自广州星禾科技生物有限公司, 活化后的甘油菌平板划线培养, 挑取单菌落接种于 YPD 液体培养基中振荡培养 12–16 h 备用。

1.2 培养基

YPD 活化培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 20.0 g, 酵母浸粉 10.0。121 °C 灭菌 15 min 后备用(固体培养基则另添加 2% 琼脂粉)。

YPD 驯化培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0。121 °C 灭菌 15 min 后备用。分别加入不同剂量过滤除菌的抑制物, 抑制物为糠醛或对羟基苯甲酸。

YPD 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, 蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0。121 °C 灭菌 15 min 后备用(可加入不同浓度的抑制物制成检测培养基)。

1.3 主要试剂

葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 糠醛购自广州化学试剂厂; 对羟基苯甲酸购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.4 定向驯化

从 YPD 平板挑取生长较好的初代单菌落于 YPD 活化培养基中, 在 30 °C、200 r/min 下培养过夜, 取 1 mL 的菌液 4 °C、5 000×g 离心 5 min 收集细胞, 用无菌水重悬, 最终以初始 $OD_{600}=0.2$ 接种于抑制物浓度为 0.2 g/L 的驯化培养基中, 在 30 °C、200 r/min 下培养 24–48 h, 使得酵母细胞 OD_{600} 值达到 2.0–3.0 左右(即进入稳定期), 重复上述步骤 2–3 次, 直至酵母细

胞在当前浓度的抑制物胁迫下生长速度显著提高；接着，以相同的初始 OD_{600} 值再次接种至抑制物浓度为 0.4 g/L 的驯化培养基中，培养至细胞达到稳定期，在此浓度下重复培养 2–3 次，以此类推，直至完成所有浓度批次的驯化。驯化结束后取菌液划线 YPD 平板培养，挑取生长良好的单菌落作为最终的进化菌株，接种至 YPD 活化培养基中振荡培养 12–16 h 备用，并甘油保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。不同抑制物的浓度都是以 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 g/L 梯度提高。

1.5 进化菌株抑制胁迫下的生长

取进化菌株的活化液划线平板培养，挑取单菌落于适量无菌 ddH₂O 中，使各个菌液的 OD_{600} 保持一致，并将重悬的细胞稀释 4 个梯度 (1、10、100、1 000 倍)，分别吸取 4 μL 对应的菌液点样于添加了不同浓度抑制物的检测平板上， $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2–3 d，观察细胞生长情况并拍照保存。

1.6 进化菌株的发酵性能监测

取进化菌株活化液，接种在含有 50 mL 的 150 mL 锥形瓶中， $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12–16 h 作为发酵种子液。取 2.5 mL 种子液以相同的 OD_{600} 值接种至含有不同浓度抑制物的 YPD 发酵培养基中， $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 下振荡培养 3–4 d，每隔一段时间取样测定葡萄糖、糠醛、对羟基苯甲酸、乙醇等物质的含量。

1.7 样品分析

菌株生长量用紫外分光光度计检测，取不同时间段的发酵液于 600 nm 吸收波长下读取 OD 值。发酵液中的各物质含量测定用高效液相色谱法，其中葡萄糖和乙醇含量的检测用醇柱，柱温 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，流速 0.5 mL/min，流动相为 5 mmol/L 的硫酸溶液。

1.8 基因组重测序

分别挑取出发菌株 W303-1A 和不同抑制物下驯化完成的单菌落于 YPD 液体培养基中，在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下培养 24–48 h，待细胞生长至稳定期后，收集菌液，液氮快速冷却后，置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放待测。

重测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司利用 Illumina 测序平台完成。Illumina MiSeq™ 得出的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(sequenced reads)。此外，对原始数据质量值等信息进行统计，并使用 FastQC 对样本的测序数据质量进行可视化评估。

2 结果与讨论

2.1 W303-1A 的定向驯化

以适合实验室研究的营养缺陷型单倍体菌株 W303-1A 作为出发菌株，分别以糠醛、对羟基苯甲酸以及糠醛+对羟基苯甲酸作为胁迫条件对其进行定向驯化，主要过程如图 1 所示。

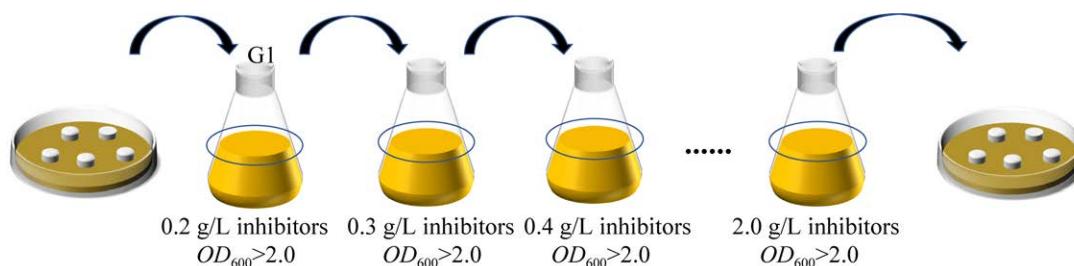


图 1 酵母抗抑制物驯化过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of yeast domestication process.

经过 50 d 的培养后涂布于含有 2.0 g/L 抑制物的 YPD 平板, 将平板倒置于 37 °C 恒温恒湿培养箱中, 培养 24–48 h 分离单克隆。筛选得到糠醛抗性提高的 5 株菌, 分别命名为 F-1、F-2、F-3、F-4、F-5, 对羟基苯甲酸抗性提高的菌株 5 株, 分别命名为 A-1、A-2、A-3、A-4、A-5, 以及糠醛+对羟基苯甲酸抗性提高的菌株 5 株, 分别命名为 B-1、B-2、B-3、B-4、B-5。

2.2 抑制物胁迫下原始菌株和驯化菌株的平板生长情况

为了测试酿酒酵母 W303-1A 中经过一段时间驯化后是否能促进糠醛和对羟基苯甲酸胁迫下的生长性能, 比较了经糠醛驯化后生长较好的 5 株菌(即 F-1、F-2、F-3、F-4、F-5)和对照菌株(W303-1A)在含有不同糠醛浓度培养基中的有氧生长活性(图 2A)。驯化后 5 株菌在糠醛为 0.8 g/L 的 YPD 板上能够较好地生长, 而原始菌株在 0.8 g/L 糠醛的 YPD 培养基上生长相对较弱。原始菌株在 1.2 g/L 糠醛的 YPD 培养基上也能够存活, 但生长速度远慢于驯化后的菌株。驯化后的 5 株菌在含有 1.6 g/L 糠醛的 YPD 的培养基中也可以较好地生长, 而未经驯化的原始菌株则无法生长。当培养基中糠醛的浓度提升至 2.0 g/L 时, 驯化的菌株中 F-2 的生长速度明显高于其他 4 株驯化菌株, 以上结果表明, 驯化后的菌株对糠醛产生了一定的耐受性, 其中, F-2 菌株的耐受性最好。

此外, 本研究测试了经对羟基苯甲酸梯度驯化后的菌株耐受性。如图 2B 所示, 挑取生长状态较好的 5 株驯化后菌株在含有 0.8、1.2、1.6、2.0 g/L 对羟基苯甲酸浓度的 YPD 培养基上生长, 并评估菌落的生长情况。与原始菌株 W303-1A 相比, 驯化后酵母菌株并无明显生长优势。此外, 随着对羟基苯甲酸浓度的增加, 驯化后的 5 株酵母细胞的生长情况与原始菌株 W303-1A 相似且均可以很好地生长。其中, 驯

化后的菌株在 2.0 g/L 对羟基苯甲酸条件下的生长优于对照菌株, 这些结果表明, 定向驯化能够一定程度上提升菌株在对羟基苯甲酸胁迫条件下的生长性能。

为了评估糠醛和对羟基苯甲酸的协同抑制对驯化菌株的毒性, 测定了不同浓度糠醛和对羟基苯甲酸(0.8、1.2、1.6、2.0 g/L)的 YPD 平板上菌株的生长速度。图 2C 显示了原始菌株以及驯化后菌株的生长情况, 对于驯化后的菌株, 在 0.8 g/L 和 1.2 g/L 的抑制物浓度下未观察到生长抑制现象。随着抑制物浓度的增加, 5 株经驯化后的菌株细胞生长均受到明显的生长抑制, 在 1.6 g/L 的浓度时, 原始菌株已无法正常适应当前的环境, 此外, 驯化的菌株生长也受到了一定的抑制。尤其是在浓度 2.0 g/L 时, 几乎所有的菌株均不能在培养基中生长。在添加 0.8–1.6 g/L 糠醛和对羟基苯甲酸的条件下, B-2 的生长速度始终高于其他 4 株驯化菌株, 以上结果表明, 驯化后的菌株对抑制物协同作用的环境产生了一定的耐受性, 其中, B-2 菌株的耐受性最好。

2.3 抑制物胁迫下原始菌株和驯化菌株的发酵性能比较

为了更好地评价驯化后酵母菌株对抑制物的耐受性影响, 对含有不同浓度抑制物的葡萄糖发酵液中原始酵母菌株和驯化菌株的乙醇发酵性能进行了研究。在酿酒酵母的亲本菌株培养中, 添加 2.0 g/L 糠醛可以显著抑制细胞生长, 培养基中葡萄糖的含量几乎未被消耗。与 W303-1A 相比, 驯化后的 5 株菌在 48 h 内达到稳定, 具有通常观察到的滞后期, 并完全消耗葡萄糖(50 g/L), 表明驯化后的菌株已经适应了糠醛环境。在相同的糠醛胁迫条件下, F-2 菌株的生长明显优于其他驯化菌株, 发酵 24 h 时, F-2 菌株乙醇产量为 8.96 g/L, 比其他 4 株驯化菌株高 2.43–6.29 g/L(图 3A、3B), 这一结果与之前的梯度稀释实验结果一致。随着发酵时间的延

长, 驯化后的 5 株菌最终的乙醇浓度几乎相同, 而出发菌株 W303-1A 最终的乙醇浓度约为 2.66 g/L, 远低于驯化后菌株的发酵效率。驯化菌株在培养基中消耗了几乎所有的葡萄糖, 最大乙醇浓度为 19.40 g/L, 葡萄糖转化率为 94.4%。以上结果表明驯化菌株具有较高的糠醛耐受性, 乙醇产量比出发菌株高 2 倍。Li 等将酿酒酵母菌株 E7 在复合抑制剂中驯化, 获得进化菌株 E7403 在

36 h 即可消耗培养基中全部葡萄糖(50 g/L), 最终的乙醇产量也比原始菌株 E7 多了 22.9%^[19]。Liu 等利用进化工程获得了一株对糠醛和 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, HMF)耐受的菌株, 其在 20 mmol/L 的糠醛和 HMF 的存在下, 48 h 葡萄糖被完全消耗且乙醇产量正常, 相比之下, 原始菌株的细胞生长则完全被抑制, 未产生显著的乙醇^[20]。这一结果与本研究观察到的现象相似。

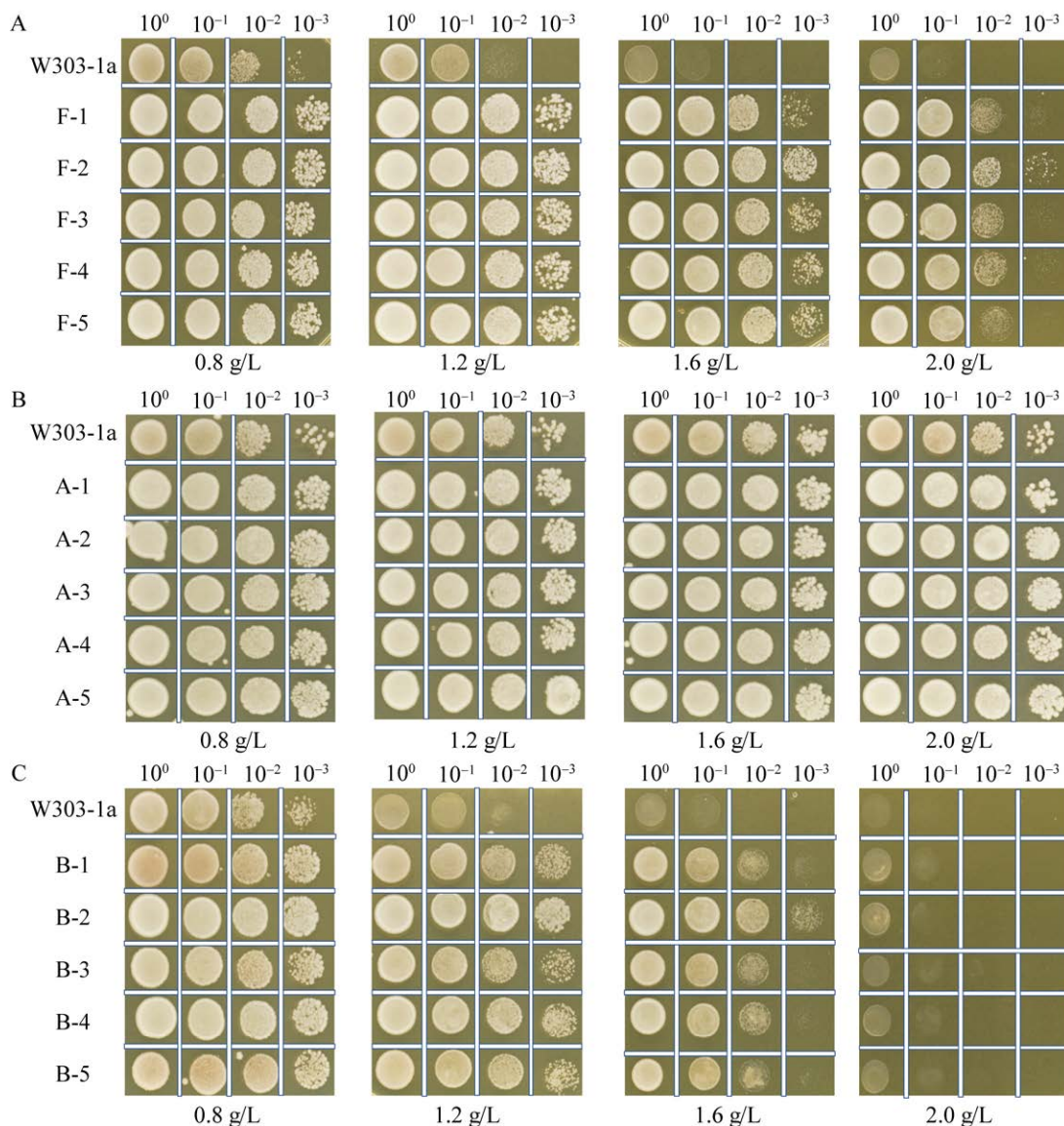


图 2 不同浓度的糠醛(A)、对羟基苯甲酸(B)和糠醛+对羟基苯甲酸(C)抑制胁迫下原始菌株和驯化菌株的平板生长情况

Figure 2 Plate growth of original and domesticated strains under inhibitory stress of different concentrations of furfural (A), *p*-hydroxybenzoic acid (B) and furfural+*p*-hydroxybenzoic acid (C).

本研究测试了出发菌株 W303-1A 和驯化菌株在含 2.0 g/L 对羟基苯甲酸的葡萄糖培养基中的发酵情况(图 3C、3D)。所有的菌株均能在含有对羟基苯甲酸的培养液中生长,对照菌株和驯化后的 5 株菌生长和发酵响应相当,在发酵 12 h 时,原始菌株出现生长迟缓,但细胞生长在指数期不受影响。这一结果表明,在发酵前期,驯化后的菌株会导致生长速度的增加。原始菌株在 72 h 的葡萄糖发酵过程中能够产生与驯化菌株相似的乙醇量,但在发酵 12 h 后观察到乙醇产量的降低,这可能是由于发酵液中部分乙醇挥发导致的。因此,与上述糠醛对酵母发酵性能的结果相比,对羟基苯甲酸的抑制能力远低于糠醛对酵母细胞生长的抑制,而驯化后的酵母菌株则能有效提升细胞对抑制物的耐受性。

在相同的培养条件下,用含有 1.6 g/L 糠醛和对羟基苯甲酸的发酵培养基进行发酵性能测试(图 3E、3F)。原始菌株在含有抑制物的发酵液中细胞生长完全被抑制,其 OD_{600} 值和发酵液中葡萄糖的含量几乎无变化。在添加 1.6 g/L 糠醛和对羟基苯甲酸的条件下,被驯化后的 5 株菌生长响应相当。与出发菌株 W303-1A 相比,驯化后菌株的葡萄糖消耗速度更快、消耗量更大,其中 B-2 和 B-4 菌株在 48 h 内完全消耗葡萄糖,B-1、B-3 和 B-5 菌株在 72 h 后发酵液中的葡萄糖含量也被消耗完全。B-2 菌株的乙醇产生速率比其他 4 株驯化菌都要快,且在 48 h 获得最大乙醇浓度,为 20.22 g/L,葡萄糖转化率为 98.4%,比在糠醛抑制物下驯化菌株高 4.0%。B-2 菌株产生的乙醇浓度是出发菌株的 7.6 倍。在混合抑制物胁迫下的生长和发酵响应规律与单一抑制物存在的时有所不同,这可能是两种抑制物间存在协同作用。研究表明多种抑制物的协同作用对发酵性能的影响高于单一发酵抑制物^[21]。Wang 等通过协同因子

(continuous integration, CI)值来判断化合物是否具有协同作用,得出糠醛,香草酸, HMF 和甲酸对酵母的生长具有明显的协同抑制作用,同时对胞内 ADH 酶活和 ATP 含量也可能具有协同抑制作用,且协同抑制作用大于单一抑制作用^[22]。因此本研究利用糠醛和对羟基苯甲酸对酵母菌株进行驯化十分有意义,结果也表明驯化后的菌株对混合抑制物的耐受显著增强,或许一定程度上解除了乙醇发酵中的抑制物协同作用。

本研究利用驯化策略在不同程度上提高了酿酒酵母在单一和混合抑制物胁迫下的生长和发酵性能。研究表明微生物通过短期驯化获得的抑制物耐受表型不能在后代中稳定遗传,并有学者推测发生抑制物耐受性提高现象的原因是短期抑制物压力胁迫使酵母产生应激作用,并形成了对酚酸应激反应的转录记忆而未发生相关基因突变^[23-24]。因此本研究选取在上述实验中发酵和生长表型优异的进化菌株 F-2、A-2、B-2 进行基因组重测序,进一步了解基因型与表型的关系。

2.4 基因组重测序

2.4.1 数据评估与指控

采用 Illumina MiSeq™ 分别得到的出发菌株 W303-1A、F-2、A-2 和 B-2 基因组序列图像数据,经过 CASAVA 碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(raw reads)。由于测序得到的原始数据中含有带接头、低质量的序列,为了保证信息分析质量,使用 Trimmomatic 对原始数据进行过滤,得到 clean 数据。如表 1 所示,出发菌株 W303-1A、F-2、A-2 和 B-2 检测到的序列数分别为 34 205 540、19 689 382、26 299 894 和 39 691 162 bp,经过滤处理后,有效数据均超过了 95.0%,且数据处理后,4 株菌的重测序结果 Q20、Q30 都在 95.0%以上,其

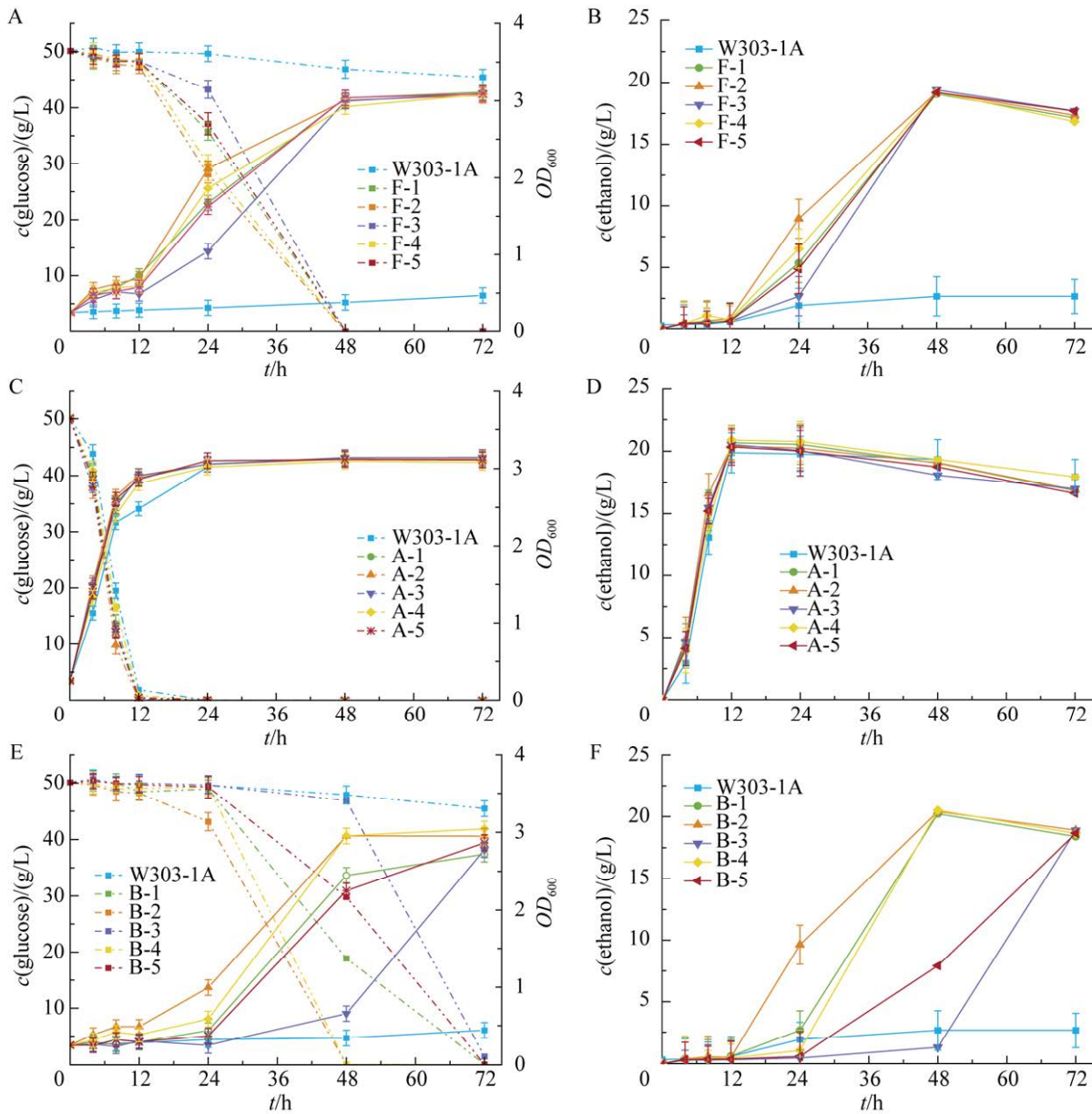


图3 不同浓度的糠醛、对羟基苯甲酸和糠醛+对羟基苯甲酸抑制胁迫下原始菌株和驯化菌株的发酵性能比较。A: 2.0 g/L 糠醛抑制下的葡萄糖和 OD_{600} 浓度变化; B: 2.0 g/L 糠醛抑制下的乙醇浓度变化; C: 2.0 g/L 对羟基苯甲酸抑制下的葡萄糖和 OD_{600} 浓度变化; D: 2.0 g/L 对羟基苯甲酸抑制下的乙醇浓度变化; E: 1.6 g/L 糠醛+对羟基苯甲酸抑制下的葡萄糖和 OD_{600} 浓度变化; F: 1.6 g/L 糠醛+对羟基苯甲酸抑制下的乙醇浓度变化。

Figure 3 Fermentation performance of original and domesticated strains under inhibitory stress of different concentrations of furfural, *p*-hydroxybenzoic acid and furfural+*p*-hydroxybenzoic acid. A: The change of glucose and OD_{600} concentration under inhibitory stress of 2.0 g/L furfural; B: The change of ethanol concentration under inhibitory stress of 2.0 g/L furfural; C: The change of glucose and OD_{600} concentration under inhibitory stress of 2.0 g/L *p*-hydroxybenzoic acid; D: The change of ethanol concentration under inhibitory stress of 2.0 g/L *p*-hydroxybenzoic acid; E: The change of glucose and OD_{600} concentration under inhibitory stress of 1.6 g/L furfural+*p*-hydroxybenzoic acid; F: The change of ethanol concentration under inhibitory stress of 1.6 g/L furfural+*p*-hydroxybenzoic acid.

中, G+C 含量处于 37.9%–39.7%, 结果表明, 测序结果有效, 可用于进一步的信息分析。

测序覆盖度能够间接反映变异检测的完整性, 因此, 平均测序深度(depth)越大, 后续能够检测到的变异位点则越多。如表 1 所示, 出发菌株 W303-1A、F-2、A-2 和 B-2 全基因组的平均覆盖深度分别为 388.4×、229.3×、302.3× 和 448.6×, 此外, 4×、10×和 20×的测序深度覆盖率(coverage)均为 99.0%以上, 这一结果进一步表明测序结果的准确性和可靠性。

2.4.2 变异监测分析

如图 4 所示, 通过主成分分析(principal component analysis, PCA)对三重复和互反实验

中显示一致结果的反应微阵列数据点进行分析。出发菌株 W303-1A 与经驯化后菌株的差异基因分布在不同的区域, 可以得出 4 种菌株的表达模式各不相同。其中, 对羟基苯甲酸对第 1 个 PC 有正向影响, 糠醛对第 2 个 PC 有负向影响。因此, A-2 大致位于 PC1 的 *x* 轴位置。F-2 位于左侧的 *y* 轴位置, A-2 位于右侧象限。驯化后菌株对不同抑制环境的适应性使得部分基因的表达模式发生不同变化, 这可能是由于不同驯化菌株对抑制剂的反应差异导致的。

如表 2 所示, 对 4 种菌株遗传变异进行分析发现, 大部分突变位点分布在基因的外显子区(即 CDS 区域), 而在 UTR3 以及剪切位点区

表 1 重测序数据统计与评估

Table 1 Re-sequence data statistics and evaluation

Sample	Raw bases (bp)	Clean bases (bp)	Clean Q20 (%)	Clean Q30 (%)	G+C (%)	Depth	Coverage 4× (%)	Coverage 10× (%)	Coverage 20× (%)
W303-1A	34 205 540	32 827 660	99.0	96.1	37.9	388.4×	99.7	99.6	99.6
F-2	19 689 382	19 051 580	99.2	96.9	39.6	229.3×	99.6	99.5	99.4
A-2	26 299 894	25 382 568	99.1	96.7	39.7	302.3×	99.6	99.5	99.5
B-2	39 691 162	37 840 814	98.8	95.4	38.4	448.6×	99.7	99.6	99.6

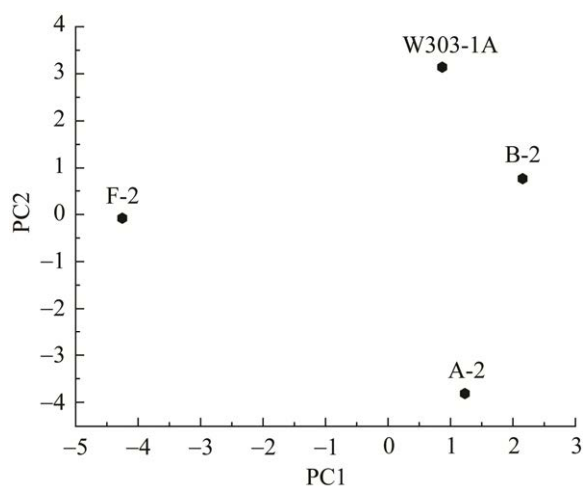


图 4 主成分分析

Figure 4 Principal component analysis.

域的突变数为 0, 这一结果表明经过驯化后, 突变基因多发生在编码区, 这或许是由于非编码区本身在整个基因组的比例较小。此外, 与出发菌株 W303-1A 相比, F-2 菌株具有 3.7×10^4 个 SNP 位点, 其中在编码区的突变点有 3.1×10^4 个, 同义突变点有 3 397 个; A-2 菌株具有 3.7×10^4 个 SNP 位点, 其中在编码区的突变点有 3.1×10^4 个, 同义突变点有 3 399 个; B-2 菌株具有 3.7×10^4 个 SNP 位点, 其中在编码区的突变点有 3.1×10^4 个, 同义突变点有 4 301 个。Meriem 等^[25]研究表明, 当基因突变位点位于编码区时, 突变增加了编码蛋白序列差异的可能性, 从而导致相应基因功能的改变。

表 2 SNP/Indel 的注释结果

Table 2 Results of SNP/Indel annotation

Effect	F-2		A-2		B-2	
	SNP	Indel	SNP	Indel	SNP	Indel
Exonic	31 410	937	31 417	932	31 427	944
Intergenic	25	14	25	14	25	14
Intron	628	99	631	105	629	100
Intragenic	15	10	15	9	15	10
Splicing	20	1	20	1	20	1
Synonymous variant	3 397	0	3 399	0	4 301	0
Missense variant	1 953	0	1 938	0	1 952	0
Frameshift variant	0	99	0	100	0	109
In frame	0	79	0	82	0	77
Start lost	6	2	6	2	6	2
Disruptive	0	49	0	52	0	49
Conservative	0	30	0	30	0	28
Upstream	0	0	0	0	0	0
Downstream	0	0	0	0	0	0
UTR3	0	0	0	0	0	0
UTR5	0	0	0	0	0	0

2.4.3 差异表达基因的功能和代谢通路富集分析

基于 GO (gene ontology)数据库对获得的 SNP 位点和 Indel 位点进行注释,确定突变基因的功能及相关描述信息,以便更加精准高效地找到目的基因。GO 分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)^[26]。数据(false discovery rate, FDR<0.01)以条形图表示(图 5A),其中,在生物过程类别下,大多数基因被注释为代谢过程和细胞过程。在细胞成分方面,差异表达基因(DEGs)主要与细胞和细胞组分有关,在分子功能类别上,大多数基因被注释为催化活性。GO 功能富集分析如图 5B-5D 所示。其中,生物过程中含量最高是细胞缺氧反应过程(GO: 0071456),其次是细胞内信号传递过程(GO: 000494)和肌动球蛋白结构组织的调控过程(GO: 0034497)。细胞成分中,内质网(GO:

0005783)和内质网膜(GO: 0005789)的含量最高。在分子功能类别中,生物素羧化酶活性(GO: 0004360)是最重要的,其次是谷氨酰胺果糖-6-磷酸转氨酶活性(GO: 0004075)和锌离子结合能力(GO: 0008270)。

KEGG 通路数据库是提供一个分子水平有关分子相互作用、反应和关系网络的生物系统,KEGG 通路对 DEGs 的分类主要分为 5 类:代谢、生物系统、环境信息处理、细胞过程和遗传信息处理^[27]。一般来说大多数基因被注释在代谢相关的途径中,其中,代谢类别中,脂类代谢是第二类,其次是碳水化合物代谢和外源性生物降解代谢。在生物系统分类中,消化系统是最丰富的第二类。蛋白质通常不是独立行使其功能的,而是相互协调以完成一系列生化反应,因此,KEGG 通路分析可以帮助揭示与疾病机制或药物作用有关的细胞过程。以 KEGG 数据库为参考,将 158 个差异基因连接

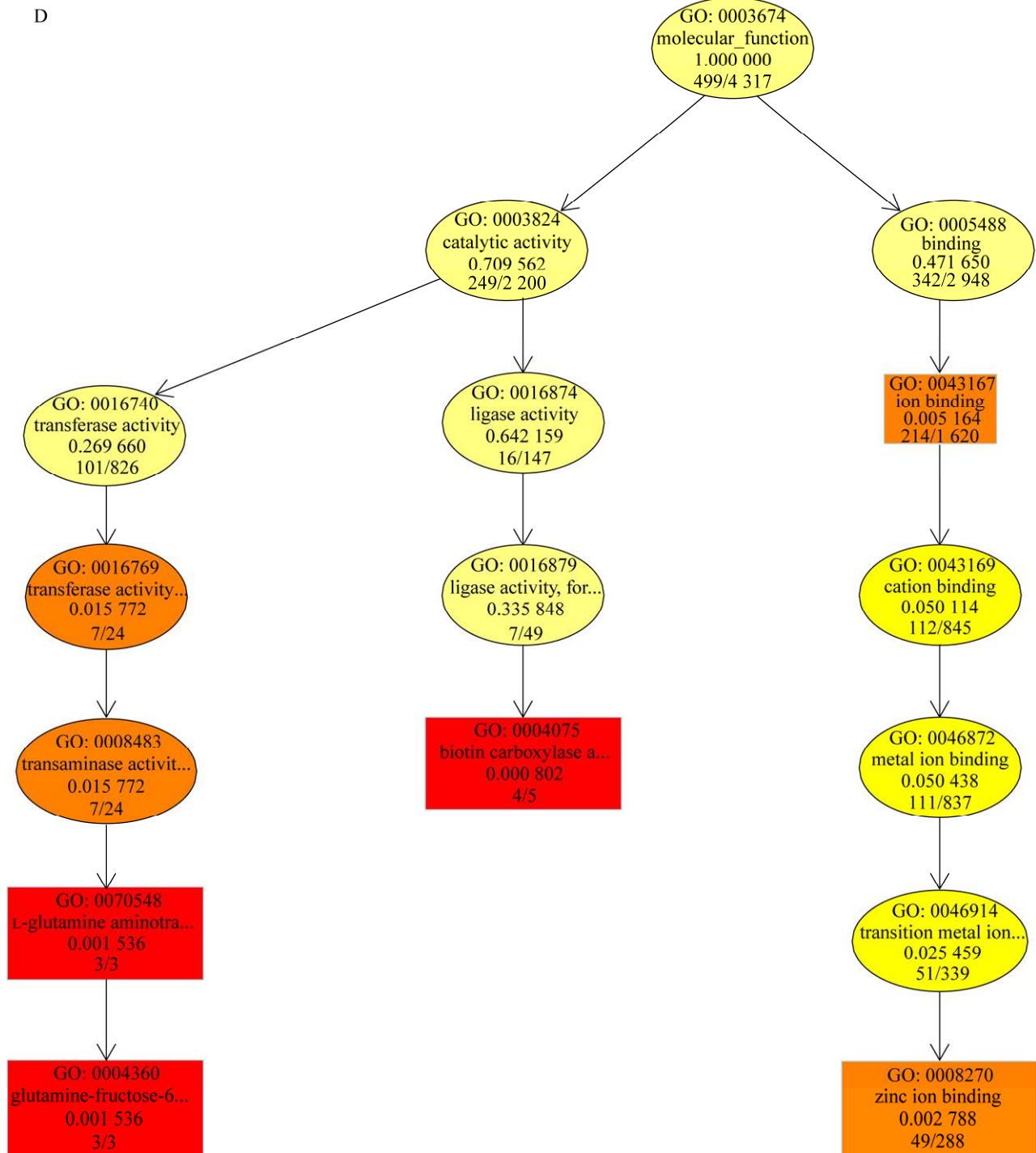


图 5 GO 功能注释图及富集分析。A: 突变基因的 GO 分类; B: 生物过程中突变基因的 GO 分类; C: 细胞成分中突变基因的 GO 分类; D: 分子功能中突变基因的 GO 分类析。色标为富集分析校正 P 值。
Figure 5 Gene ontology (GO) annotations of the differentially expressed genes (DEGs). A: Classification of DEGs; B: GO analyses of DEGs in biological process; C: GO analyses of DEGs in cellular component; D: GO analyses of DEGs in molecular function. The color scale indicates corrected P -value of enrichment analysis.

到不同的路径, 其中 ko 00360: 苯丙氨酸代谢、ko 04728: 多巴胺能突触、ko 00983: 药物代谢和 ko 04923: 调节脂肪细胞的脂质分解通路信号含量较高(图 6)。通过功能富集分析可以看出, 驯化后的菌株发生了一系列突变, 其中参与催化活性功能的相关酶基因和参与药物代谢途径的相关基因能与菌株的耐受性密切相关, 这些基因的功能注释为进一步明确驯化后菌株抗性机制提供重要素材。糠醛和对羟基苯甲酸抑制了酵母的生长或导致较长的滞后期, 进而降低了纤维素乙醇的产量和生产力。根据已公布的 W303-1A 基因组序列^[28], 对基因组进行比对, 排除匹配

的遗传物质。根据 SNP/Indel 注释和发酵参数的统计信息, 找到了与糖代谢和抑制剂抗性相关的基因(表 3 和表 4), 几种机制可以解释呋喃对乙醇发酵的抑制作用。在酵母细胞中, 葡萄糖首先经过糖降解途径转换为丙酮酸, 然后丙酮酸经过丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶生成乙醇。高浓糠醛进入细胞后, 糠醛降解过程会与 TCA 循环、糖降解以及 PPP 等途径竞争 NADH 和还原酶, 进而限制酵母菌生长和发酵效率^[29]。其中, 在糠醛存在下生长的细胞粗提物中, 与糖酵解相关的己糖激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的活性下降, 使得乙醇脱氢酶中的 NADH⁻和

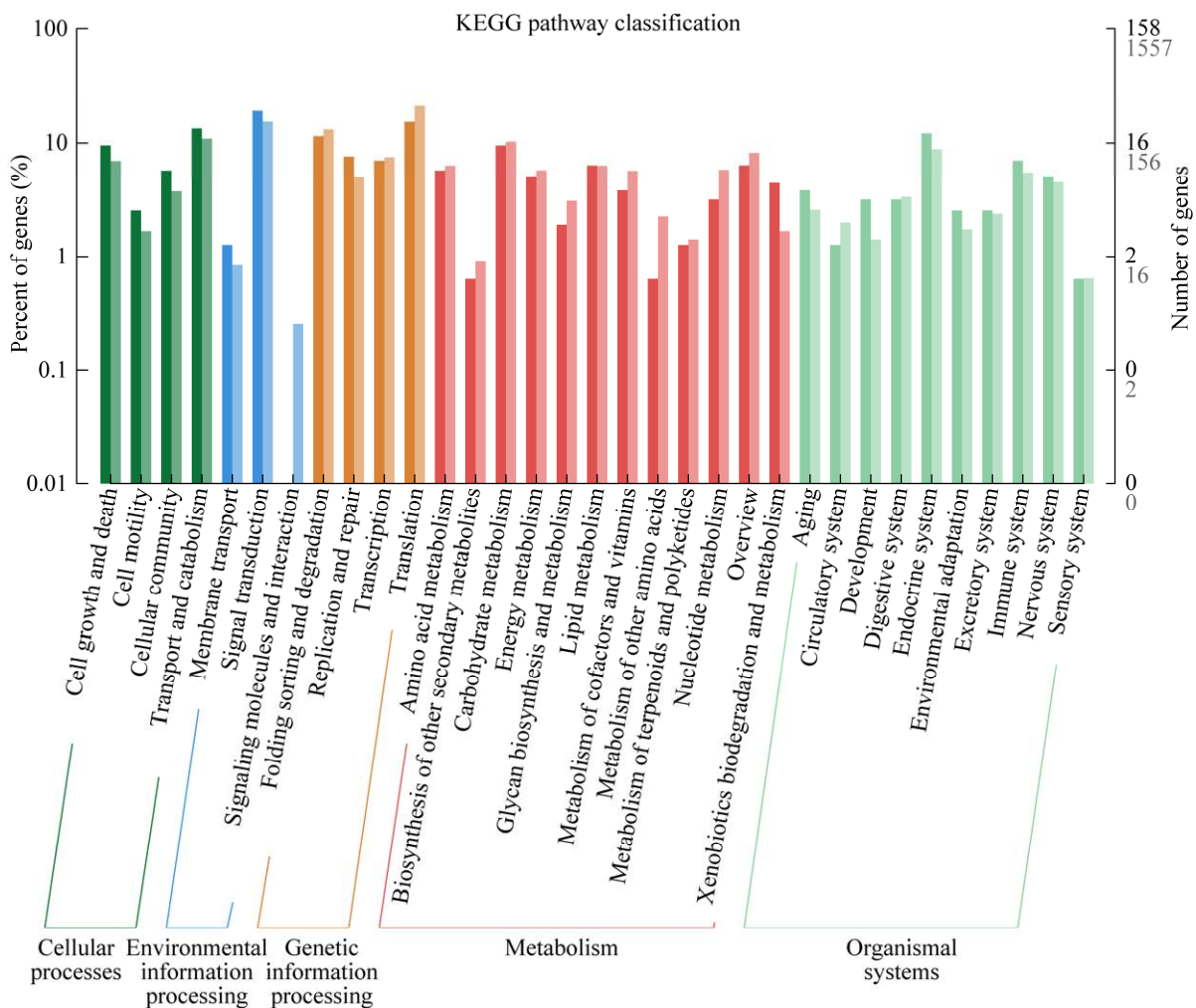


图 6 KEGG 通路突变基因的分类

Figure 6 KEGG pathway classification of differentially expressed genes.

NADPH⁻进行特异性还原 HMF 和糠醛而被消耗。此外，糠醛可以损伤 DNA，阻碍 RNA 和蛋白质的合成，降低酶活性，从而抑制细胞生长，同样，酿酒酵母中的多种脱氢酶/还原酶能够将糠醛和 HMF 还原为相应的毒性较低的醇^[30]。此外，也有研究分析表明，在酿酒酵母中，糠醛会导致活性氧积累、液泡和线粒体膜损伤、染色质和肌动蛋白损伤^[31]。通过重测序分析发现，进化菌株 F-2/B-2 中编码乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH)、果糖-1,6-二磷酸

醛缩酶(fructose-1,6-diphosphate aldolase, FBA)和丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)的基因发生部分突变，这些基因与酵母的糖代谢途径相关，而脱氧酶/还原酶基因的过表达增加了糠醛还原酶的活性，从而增加了酵母对抑制剂的耐受性。Liu 等的研究表明，与野生型相比，过度表达醛还原酶基因的酿酒酵母 NRRL Y-12632 不仅对糠醛 (20 mmol/L) 和 HMF (40 mmol/L) 的耐受性更高，而且更容易恢复，生长更佳^[32]。

表 3 与糖代谢相关主要基因的注释结果

Table 3 Annotated results of major genes in glucose metabolism

Chromosome	Position	Reference	Alteration	Gene ID	Gene	Function
NC_001134.8	678 799	C	T	YBR229C	GLK	葡萄糖激酶 Glucokinase
NC_001136.10	412 388	C	T	YDL022W	GPD1	甘油-3-磷酸脱氢酶[NAD(+)] Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(+))
NC_001139.9	14 086	C	T	YGL257C	SFA	α-淀粉酶 Alpha-amylase
NC_001139.9	971 560	G	A	YGR240C	PFK2	6-磷酸果糖激酶亚族 6-phosphofructokinases
NC_001139.9	986 049	A	C	YGR248W	SOL4	6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 6-phosphogluconolactase
NC_001142.9	357 352	A	G	YJL045W	SDH1b	琥珀酸脱氢酶 Succinate dehydrogenase
NC_001143.9	140 593	G	A	YKL165C	TPI	丙糖磷酸异构酶 Triose phosphate isomerase
NC_001143.9	521 709	G	A	YKR043C	GLK	己糖激酶 Hexokinase
NC_001143.9	569 825	T	G	YKR067W	PGI	6-磷酸葡萄糖异构酶 Fructose-1,6-diphosphate aldolase
NC_001144.5	740 878	C	A	YLR305C	PDC	丙酮酸脱氢酶 Alcohol dehydrogenase
NC_001145.3	57 144	G	A	YML106W	ALD	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 Fructose-1,6-diphosphate aldolase
NC_001146.8	736 950	G	C	YNR059W	ADH	乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase
NC_001145.3	540 024	C	T	YMR135C	GND	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase
NC_001145.3	672 129	T	C	YMR205C	PFK2	6-磷酸果糖激酶亚族 6-phosphofructokinases
NC_001145.3	680 936	T	C	YMR207C	TPL	磷酸甘油醛异构酶基因 Phosphoglyceraldehyde isomerase gene
NC_001144.5	1 039 435	T	A	YLR452C	FBA	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 Fructose-1,6-diphosphate aldolase
NC_001145.3	887 821	T	C	YMR307W	GAS1	1,3-葡聚糖基转移酶 1,3-glucanyltransferase
NC_001146.8	755 761	G	T	YNR067C	FBA	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 Fructose-1,6-diphosphate aldolase
NC_001147.6	68 602	G	A	YOL136C	PFK2	磷酸果糖激酶 phosphofructokinase
NC_001147.6	580 333	C	G	YOR136W	ZWF	6-磷酸葡萄糖脱氢酶 6-phosphate glucose dehydrogenase

表 4 与抑制物抗性相关主要基因的注释结果

Table 4 Annotated results of major genes in inhibitor resistance metabolism

Chromosome	Position	Reference	Alteration	Gene ID	Gene	Function
NC_001136.10	180 644	A	C	YDL154W	<i>MSH5</i>	MutS 家族蛋白 Proteins of the MutS family
NC_001139.9	16 217	C	T	YGL256W	<i>ADH4</i>	乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase
NC_001143.9	120 268	C	T	YKL175W	<i>RPN4</i>	锌指蛋白 Zinc finger protein
NC_001144.5	624 955	T	C	YLR243W	<i>GPN3</i>	推测信号序列结合 GTPase The signal sequence is inferred to bind GTPase
NC_001145.3	556 437	G	A	YMR145C	<i>NDE1</i>	NADH-泛素酮还原酶(H(+)-转移)酶 NADH-ubiquitin-keto reductase (H(+)-transfer) enzyme
NC_001146.8	112 698	C	T	YNL279W	<i>PRM1</i>	信息素调节蛋白 Pheromone regulatory protein
NC_001146.8	450 515	G	A	YNL093W	<i>YPT53</i>	Rab 家族 GTPase 蛋白激酶 Rab family GTPase protein kinases
NC_001146.8	740 284	G	A	YNR060W	<i>FRE1</i>	高铁螯合物还原酶 Ferric chelate reductase
NC_001147.6	57 959	T	C	YOL141W	<i>TPO</i>	聚胺类物质转运蛋白 Transporters of polyamines
NC_001147.6	286 252	A	C	YOL020W	<i>TAT2</i>	芳香族氨基酸跨膜转运蛋白 Aromatic amino acid transmembrane transporter
NC_001147.6	558 497	T	G	YOR124C	<i>HAA</i>	转录激活因子 Transcriptional activator
NC_001147.6	563 945	A	G	YOR127W	<i>RGAI</i>	GTPase 激活蛋白 GTPase activating protein
NC_001147.6	985 344	G	A	YOR347C	<i>PYK2</i>	丙酮酸激酶 Pyruvate kinase
NC_001147.6	730 587	T	A	YOR207C	<i>RET1</i>	DNA 导向 RNA 聚合酶 III 核心亚基 DNA directed RNA polymerase III core subunit
NC_001148.4	880 017	C	G	YPL125W	<i>HXX</i>	己糖激酶蛋白 Hexokinase protein
NC_001148.4	191 944	C	T	YPL188W	<i>YAP1</i>	AP-1 结合蛋白 AP-1 binding protein
NC_001148.4	890 346	T	A	YPR175W	<i>PDR5</i>	多重药物输出 ABC 转运蛋白 Multiple drug exporting ABC transporters

酵母耐受对羟基苯甲酸的生理机制与维持细胞内 pH 有关, 这是由质子-ATP 酶泵提供的, 它以 ATP 为代价从细胞质中去除质子。在糖酵解过程中, 己糖激酶、磷酸果糖激酶和烯醇酶在弱酸和呋喃衍生物存在下的抑制已经被报道^[33]。对羟基苯甲酸在酿酒酵母中引起氧化应激, 抑制蛋白质合成, 损伤 DNA, 可能是酿酒酵母细胞生长受到抑制的原因, 同时也会干扰胞内 TCA 循环、糖降解以及 PPP 等途径中酶的活性, 影响菌株生长和代谢速率。通过重测序结果和相关基因的代谢通路相结合, 将酿酒酵母中与抗抑制物相关的基因与已报道的相关基因进行综合分析比较, 初步确定了与抑制物相关的

YAP1 (参与氧化应激反应和氧化还原稳态的转录激活剂)、PDR5 (耐多种化学物质的多效 ABC 外运载体)和 RPN4 (锌指蛋白)基因产生部分突变或许是导致酿酒酵母中抑制因子耐受性的主要原因^[34]。

3 结论

驯化策略对于构建工业化纤维素乙醇发酵菌株十分有效。本研究通过逐渐提高压力值-抑制物浓度的策略显著提高了菌株的抑制物抗性, 有效提高了乙醇生产效率。在糠醛和对羟基苯甲酸同时存在的情况下, 进化菌株的最终糖转化率为 98.4%。然而在实际预处理水解液

中, 抑制物的组成更为复杂多样; 并且在纤维素乙醇生产的发酵过程中, pH 值、温度以及五碳糖的利用都是影响发酵效率的重要因素。因此, 提高菌株对多重胁迫的适应性才能更大限度地提升生产效率。本研究还对出发菌株和驯化后菌株进行了基因组重测序, 结合参考文献耐抑制物数据对变异点进行分析挖掘, 发现与抗抑制物有关的潜在突变位点, 并对潜在基因进行了分析, 为后续菌株构建提供更多可能的操作靶点。

作者贡献声明

樊美杉: 研究构思和设计、论文撰写和修改; 卢圣捷: 数据收集和处理; 张红丹: 协助实验操作; 钟春梅: 提供技术支持; 谢君: 研究构思和设计。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] LI YC, MITSUMASU K, GOU ZX, GOU M, TANG YQ, LI GY, WU XL, AKAMATSU T, TAGUCHI H, KIDA K. Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2016, 100: 1531-1542.
- [2] ZABED H, SAHU JN, SUELY A, BOYCE AN, FARUQ G. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 71: 475-501.
- [3] JÖNSSON LJ, MARTÍN C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 103-112.
- [4] PARAWIRA W, TEKERE M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(1): 20-31.
- [5] CHUNDAWAT SP, BECKHAM GT, HIMMEL ME, DALE BE. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2: 121-145.
- [6] van DIJK M, ERDEI B, GALBE M, NYGÅRD Y, OLSSON L. Strain-dependent variance in short-term adaptation effects of two xylose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 121922.
- [7] SHAO LY, CHEN H, LI YL, LI JN, CHEN G, WANG G. Pretreatment of corn stover via sodium hydroxide-urea solutions to improve the glucose yield[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123191.
- [8] JÖNSSON LJ, ALRIKSSON B, NILVEBRANT NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 16.
- [9] NIEVES LM, PANYON LA, WANG X. Engineering sugar utilization and microbial tolerance toward lignocellulose conversion[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 17.
- [10] ZHA J, LI BZ, SHEN MH, HU ML, SONG H, YUAN YJ. Optimization of *CDT-1* and *XYL1* expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68317.
- [11] SENATHAM S, CHAMDUANG T, KAEWCHINGDUANG Y, THAMMASITTIRONG A, SRISODSUK M, ELLISTON A, ROBERTS IN, WALDRON KW, THAMMASITTIRONG SNR. Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 1040.
- [12] LI WC, ZHU JQ, ZHAO X, QIN L, XU T, ZHOU X, LI X, LI BZ, YUAN YJ. Improving co-fermentation of glucose and xylose by adaptive evolution of engineering xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* and different fermentation strategies[J]. *Renewable Energy*, 2019, 139: 1176-1183.
- [13] LUO P, ZHANG YN, SUO YK, LIAO ZP, MA Y, FU HX, WANG JF. The global regulator *IrrE* from *Deinococcus radiodurans* enhances the furfural tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 136: 69-77.
- [14] PEREIRA SR, SANCHEZ I NOGUÉ V, FRAZÃO CJR, SERAFIM LS, GORWA-GRAUSLUND MF, XAVIER AMRB. Adaptation of *Scheffersomyces stipitis* to hardwood spent sulfite liquor by evolutionary engineering[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 50.
- [15] OSHOMA CE, GREETHAM D, LOUIS EJ, SMART KA, PHISTER TG, POWELL C, DU C. Screening of non-*Saccharomyces cerevisiae* strains for tolerance to formic acid in bioethanol fermentation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135626.
- [16] KLINKE HB, AHRING BK, SCHMIDT AS, THOMSEN AB. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 15-26.
- [17] PALMQVIST E, GRAGE H, MEINANDER NQ, HAHN-HÄGERDAL B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 63(1): 46-55.

- [18] THOMPSON OA, HAWKINS GM, GORSICH SW, DORAN-PETERSON J. Phenotypic characterization and comparative transcriptomics of evolved *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved tolerance to lignocellulosic derived inhibitors[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 200.
- [19] LI CJ, CHU CY, HUANG LH, WANG MH, SHEU LF, YE H JI, HSU HY. Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Letters*, 2012, 319(2): 203-213.
- [20] LIU ZL, MA MG. Pathway-based signature transcriptional profiles as tolerance phenotypes for the adapted industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistant to furfural and HMF[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(8): 3473-3492.
- [21] 顾翰琦, 邵玲智, 刘冉, 刘晓光, 李玲, 刘倩, 李洁, 张雅丽. 酿酒酵母酚类抑制物耐受性脂质组学研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(1): 15-23.
GU HQ, SHAO LZ, LIU R, LIU XG, LI L, LIU Q, LI J, ZHANG YL. Lipidomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with tolerance to phenolic inhibitors[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(1): 15-23 (in Chinese).
- [22] WANG SZ, HE ZJ, YUAN QP. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle[J]. *Chemical Engineering Science*, 2017, 158: 37-40.
- [23] GU HQ, ZHANG J, BAO J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(9): 1770-1782.
- [24] 李志强, 费本华, 江泽慧. 发酵抑制物对葡萄糖发酵产乙醇的影响[J]. *化工进展*, 2015, 34(S1): 80-84.
LI ZQ, FEI BH, JIANG ZH. Effects of fermentation inhibitors on ethanol production of glucose fermentation[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2015, 34(S1): 80-84 (in Chinese).
- [25] MERIEM ZB, KHALIL Y, HERSEN P, FABRE E. Hyperosmotic stress response memory is modulated by gene positioning in yeast[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2019, 8(6): E582.
- [26] AL-SHAHIB A, UNDERWOOD A. snp-search: simple processing, manipulation and searching of SNPs from high-throughput sequencing[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1): 326.
- [27] DU PLESSIS L, SKUNCA N, DESSIMOZ C. The what, where, how and why of gene ontology: a primer for bioinformaticians[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2011, 12(6): 723-735.
- [28] KANEHISA M, SATO Y. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences[J]. *Protein Science*, 2019, 29: 28-35.
- [29] MATHESON K, PARSONS L, GAMMIE A. Whole-genome sequence and variant analysis of W303, a widely-used strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *G3*, 2017, 7(7): 2219-2226.
- [30] DU J, LIANG JR, ZHANG XJ, WANG JL, LI W, SONG PX, FENG XH. Identifying the negative cooperation between major inhibitors of cellulase activity and minimizing their inhibitory potential during hydrolysis of acid-pretreated corn stover[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126113.
- [31] KIM D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 309.
- [32] 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: 1-10.
- [33] PAES BG, STEINDORFF AS, FORMIGHIERI EF, PEREIRA IS, ALMERIDA JRM. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors[J]. *AMB Express*, 2009, 11(1): 2.
- [34] de MELO HF, BONINI BM, THEVELEIN J, SIMÕES DA, JR MORAIS MA. Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 116-127.