

基于基因组 DNA 诱变的遗传重组改造乙醇工业酵母的耐热性及发酵性能

刘秀颖^{1,2}, 何秀萍¹, 卢莹¹, 张博润¹

1 中国科学院微生物研究所 酵母菌分子遗传与育种实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 酵母菌是乙醇发酵工业中非常重要的微生物细胞工厂, 发酵过程中温度变化胁迫一直是影响生产效率的重要瓶颈之一, 选育具有广泛温度适应性的酵母菌株对提高发酵性能和降低生产成本具有重要意义。通过化学诱变和基于基因组 DNA 诱变的遗传重组技术对乙醇工业酵母菌的温度适应性进行改造, 获得耐热性能和发酵性能得到提高的重组酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* T44-2。重组菌株 T44-2 的最高生长温度比原始菌株 CE6 提高了 3 °C, 48 °C 和 52 °C 热激处理 1 h, 重组菌株的细胞存活率分别是原始菌株的 1.84 和 1.87 倍。重组菌株在 30 °C~40 °C 范围内具有良好的糖醇转化率和乙醇产量, 发酵 200 g/L 葡萄糖能够产生 83.8~91.2 g/L 乙醇。重组菌株在 43 °C 和 44 °C 发酵时乙醇产量分别有 69.2 g/L 和 52.6 g/L, 而此时原始菌株基本没有活性。研究结果为酿酒酵母在乙醇高温发酵中的应用奠定了基础, 可极大降低冷却成本。

关键词: 乙醇工业酵母, 遗传重组, 温度适应性, 耐热性

Improvement of thermal adaptability and fermentation of industrial ethanologenic yeast by genomic DNA mutagenesis-based genetic recombination

Xiuying Liu^{1,2}, Xiuping He¹, Ying Lu¹, and Borun Zhang¹

1 Laboratory of Yeast Molecular Genetics and Breeding, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Ethanol is an attractive alternative to fossil fuels. *Saccharomyces cerevisiae* is the most important ethanol producer. However, in the process of industrial production of ethanol, both cell growth and fermentation of ethanologenic *S. cerevisiae* are dramatically affected by environmental stresses, such as thermal stress. In this study, we improved both the thermotolerance and fermentation performance of industrial ethanologenic *S. cerevisiae* by combined usage of chemical mutagenesis and genomic

Received: September 30, 2010; **Accepted:** November 10, 2010

Supported by: Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-YW-11-C4).

Corresponding author: Xiuping He. Tel: +86-10-64807356; E-mail: hexp@im.ac.cn

中国科学院知识创新重大项目 (No. KSCX1-YW-11-C4) 资助。

DNA mutagenesis-based genetic recombination method. The recombinant *S. cerevisiae* strain T44-2 could grow at 44 °C, 3 °C higher than that of the original strain CE6. The survival rate of T44-2 was 1.84 and 1.87-fold of that of CE6 when heat shock at 48 °C and 52 °C for 1 h respectively. At temperature higher than 37 °C, recombinant strain T44-2 always gave higher cell growth and ethanol production than those of strain CE6. Meanwhile, from 30 °C to 40 °C, recombinant strain T44-2 produces 91.2–83.8 g/L of ethanol from 200 g/L of glucose, which indicated that the recombinant strain T44-2 had both thermotolerance and broad thermal adaptability. The work offers a novel method, called genomic DNA mutagenesis-based genetic recombination, to improve the physiological functions of *S. cerevisiae*.

Keywords: ethanologenic yeast, genome recombinant, thermal adaptability, thermotolerance

燃料乙醇作为一种清洁能源得到了越来越广泛的关注。酵母菌, 尤其酿酒酵母, 是以糖质和淀粉质为原料的乙醇发酵最经典的菌株。野生酵母菌的最适生长和发酵温度通常在 30 °C 左右, 而在工业发酵过程中常常面临由地区或季节影响以及发酵过程本身释放的大量热量造成的高温胁迫, 因此温度变化胁迫是影响酵母发酵效率的一个重要限制因素。提高酵母菌的热耐受性以及高温胁迫条件下的发酵性能, 不但对乙醇发酵工业有重要意义, 同时也将极大提高以酵母菌为发酵主体的其他发酵工业的生产效率。

酵母菌的热耐受性一直是酵母菌研究和发酵工业生产的热点问题。研究人员不断尝试各种不同的方法和策略来实现对酵母菌耐热性能的改造^[1]。其中, Banat 等从印度样品中分离到能在 45 °C 发酵葡萄糖的耐高温酵母菌株^[2]。Edgardo 等通过温度适应性驯化使酵母菌株的最高生长温度提高了 3 °C^[3]。Shimoda 等建立了利用缺失校正功能的 DNA 聚合酶 δ 为诱变因子的温度适应性驯化策略^[4]。Sakanaka 等将一株耐高温的克鲁维酵母和高产乙醇的酿酒酵母进行融合, 获得了可以在 43 °C 生长的融合菌株, 但该菌株丧失了高温发酵能力^[5]。随着对酵母菌耐热机制理解的不断加深, 通过对酵母菌热耐受性相关基因的操作来定向改造酵母耐高温性能成为可能。Hiroyuki 等通过过表达泛素连接酶 Rsp5 和多个泛素结合酶提高了野生酵母菌株 CKY8 的多种胁迫耐受性, 获得在 39 °C 的热耐受性明显提高的重组菌株^[6]。但由于酵母热耐受性调控网络和各菌株遗传背景的复杂性, 仅对单个或少数基因的功能进

行调控, 还难以获得理想的效果。而经典的、基于全细胞遗传信息重组的策略对于受复杂机制调控的生理性能的改造仍然是一个重要的选择。本研究采用化学诱变和基于基因组 DNA 诱变的遗传重组方法对乙醇工业酵母菌株进行耐热性能改造, 获得一株耐热性能和发酵性能提高的重组酿酒酵母菌株, 为酿酒酵母在燃料乙醇高温发酵方面的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CE1~CE8 均为本实验室保存的乙醇工业酵母。

1.1.2 培养基和实验试剂

酵母菌常规培养使用 YEPD 培养基, 配方如下 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 自然 pH。乙醇发酵使用 EFM 培养基, 配方如下 (g/L): 酵母粉 6, 蛋白胨 10, 尿素 5, 磷酸二氢钾 1, 水合硫酸镁 1.5, 氯化钙 0.55, 葡萄糖 200, 自然 pH。

使用的其他化学试剂包括磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸二乙酯、硫代硫酸钠以及山梨醇等均购自北京化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 化学诱变

培养至对数中期的酵母细胞, 3 000×g 离心 5 min 收集菌体, 用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 5.8) 洗 2 次, 细胞重悬于等体积的磷酸缓冲液中, 加入 1% (V/V) 的 DES (硫酸二乙酯), 30 °C、

200 r/min 条件下培养 40 min, 加入 10 倍体积的 5% 硫代硫酸钠终止反应。诱变菌液进行梯度稀释后, 涂布在 YEPD 平板上, 分别在 42 °C 和 43 °C 培养 48 h^[7]。

1.2.2 酵母菌总 DNA 的提取和遗传转化

酵母菌总 DNA 的提取参照文献[8]进行。酵母菌的遗传转化参见文献[9]的电击转化法, 略有改动。将 YEPD 液体培养基中活化的酵母菌以 1% 的接种量转接到 5 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C, 200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值达到 1.3~1.6。4 °C、5 000×g 离心 3 min 收集菌体。细胞用预冷的无菌双蒸水和 1 mol/L 山梨醇溶液洗 2 次, 4 °C、5 000×g 离心 3 min 收集菌体。细胞重悬于 50 μL 预冷的山梨醇溶液中, 置于冰上备用。取 40 μL 上述菌液与待转化 DNA 混合后移入 0.2 cm 电转化杯中, 冰浴 5 min, 在 1.5 kV 电压下, 电击 5 ms (BIO-RAD micropulser)。电击后立即加入 0.5 mL 山梨醇溶液, 轻轻混匀后, 转移到 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL YEPD 液体培养基, 30 °C 静置孵育 2 h, 然后 5 000×g 离心 3 min 收集菌体, 无菌水洗 1 次后, 细胞重新悬浮于无菌水中, 均匀涂布在 YEPD 平板上。

1.2.3 基因组 DNA 诱变及遗传重组

不同菌株来源的总 DNA 等量混合, 加入 1% (V/V) 的 DES (硫酸二乙酯), 37 °C 温育 1 h, 然后通过电击转化法转化酵母菌, 转化液涂布在含 1 mol/L 山梨醇的 YEPD 平板上, 分别在 43 °C 和 44 °C 培养 3~5 d, 检测不同单菌落的耐热性。

1.2.4 酵母细胞的温度适应性分析

培养至对数中期的酵母细胞进行梯度稀释, 稀释度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的菌悬液点于 YEPD 平板上, 在不同温度下培养 48 h, 检测酵母细胞对不同温度胁迫的适应能力。为了分析酵母细胞对热激的耐受性, 3 000×g 离心 5 min 收集对数中期的酵母细胞, 细胞重悬于等体积新鲜 YEPD 中, 分别在 48 °C 和 52 °C 处理, 不同时间取出 100 μL 菌液, 梯度稀释后涂布于 YEPD 平板上, 30 °C 培养 48 h, 单

菌落计数后, 以 0 h 为对照, 计算其在热激不同时间后的存活率 (%), 来表征菌株的热激耐受性。

1.2.5 酵母菌株遗传稳定性分析

酵母菌遗传稳定性分析按文献[10]方法进行。将重组菌株在 10 mL YEPD 液体培养基中连续传代 10 次, 培养条件为 30 °C、24 h。将传代 10 次后的菌液适当稀释, 在 YEPD 平板上划线, 挑取约 50 个单菌落, 在无菌水中饥饿 4 h。将饥饿过的单菌落点于 YEPD 平板上, 分别在 44 °C 和 45 °C 培养 48 h, 观察并对比菌落生长情况。

1.2.6 乙醇发酵

将 YEPD 斜面上活化的酵母菌株接种于 2 mL YEPD 液体培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养 16 h, 转接到 10 mL YEPD 液体培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养 18 h, 然后转接到 100 mL EFM 培养基中, 分别在 30 °C、37 °C、40 °C、42 °C、43 °C、44 °C 条件下培养 6 h (150 r/min), 然后进行厌氧发酵, 定时取样检测各项发酵性能指标。每个条件重复 3 次, 每次设 3 个重复。

1.2.7 葡萄糖、乙醇及生物量的测定

在发酵的不同时间点取出发酵液 5 mL, 3 000×g 离心 5 min, 分别收集上清液和细胞沉淀。细胞沉淀在 60 °C 烘干至恒重后称重, 生物量为每升发酵液中细胞的干重 (g/L)。上清液进行适当稀释, 用 SBA-40C 型生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定乙醇和葡萄糖含量, 单位为 g/L。

2 结果与分析

2.1 原始酵母菌株的筛选

对实验室保存的乙醇工业酵母菌株 CE1~CE8 的耐热性和发酵性能进行比较分析, 发现这些菌株在 30 °C 时的发酵性能没有明显差异, 但菌株 CE6 的热耐受性较其他菌株要高, CE6 的最高生长温度是 41 °C (图 1), 而其他菌株的最高生长温度均为 40 °C。因此选择菌株 CE6 进行进一步的耐热性能改造。

2.2 化学诱变提高乙醇酵母的耐热性

酵母菌株 CE6 进行化学诱变后, 菌液涂布于 YEPD 平板上, 在 42 °C 和 43 °C 培养。通过耐热性比较, 筛选到最高能在 43 °C 生长的突变株, 分析比较这些突变株在 30 °C 和 40 °C 条件下的乙醇发酵性能, 发现这些突变株在 30 °C 时的发酵性能与 CE6 相比没有明显差异, 但在 40 °C 发酵时, 其中 2 个突变株的乙醇产量明显优于原始菌株 CE6, 分别命名

为 T43-1 和 T43-2。

2.3 基于基因组 DNA 诱变的遗传重组技术提高乙醇酵母的耐热性

提取突变株 T43-1 和 T43-2 的基因组 DNA, 等量混合后与化学诱变剂 DES 温育, 然后分别电击转化突变株 T43-1 和 T43-2, 比较转化菌株在不同温度条件下的生长情况, 筛选到能在 44 °C 正常生长、45 °C 时生长明显受到抑制的重组菌株 (图 2)。

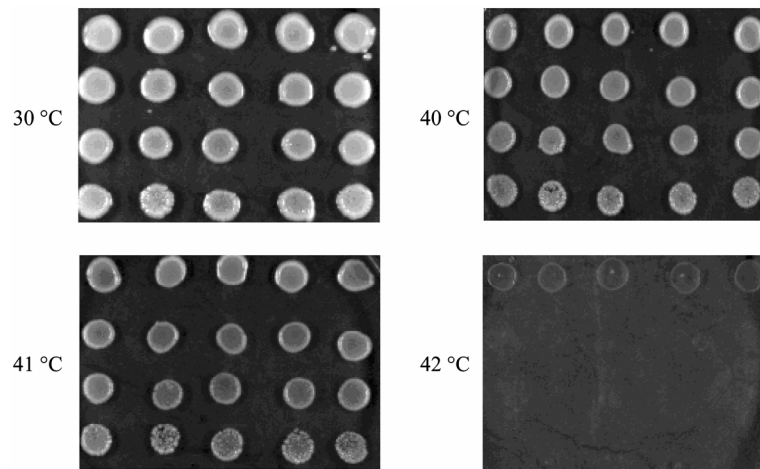


图 1 原始菌株 CE6 在不同温度下的生长情况

Fig. 1 Growth of original strain CE6 at different temperatures. Five colonies of the strain CE6 (from left to right) and serial dilution of 10^{-1} to 10^{-4} (from up to down) were spotted onto YEPD medium and cultivated at different temperature.

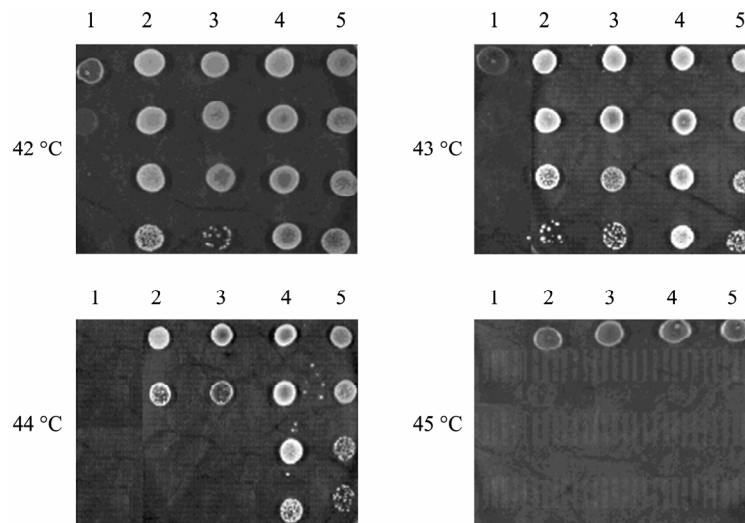


图 2 重组菌株与原始菌株的耐热性比较

Fig. 2 Comparison of thermotolerance among recombinant strains and the original strain. 1: CE6; 2: T44-4; 3: T44-3; 4: T44-2; 5: T44-1. Serial dilution of 10^{-1} to 10^{-4} (from up to down) were spotted onto YEPD medium and cultivated at different temperatures.

比较这些菌株在不同温度下的发酵性能 (30 °C、40 °C、42 °C 下发酵 24 h), 发现在较高温度条件下重组菌株 T44-2 的乙醇产量与原始菌株 CE6 相比有明显提高。

重组菌株 T44-2 和原始菌株 CE6 在 48 °C 和 52 °C 热激处理 0~2 h 的过程中, T44-2 的细胞存活率始终高于原始菌株 CE6, 其中 48 °C 和 52 °C 热激处理 1 h 时, T44-2 的细胞存活率分别是 CE6 的 1.84 倍和 1.87 倍 (图 3), 说明重组菌株 T44-2 比 CE6 具有更强的热激耐受性。重组菌株 T44-2 在 YEPD 液体培养基中 30 °C 传代培养 10 次后, 所检测的单菌落均能在 44 °C 正常生长, 而且随机检测的 10 个单菌落的乙醇发酵性能指标没有明显差异, 说明重组菌株 T44-2 是遗传稳定的。

2.4 不同温度下乙醇发酵性能分析

对不同温度下重组菌株 T44-2 和原始菌株 CE6 的乙醇发酵性能进行比较, 发现在检测的温度范围内, 重组菌株的产乙醇能力均高于原始菌株, 而且温度越高, 这种优势越明显 (图 4)。在 30 °C 和 37 °C 条件下发酵 16 h 后, 200 g/L 的葡萄糖被消耗完, 重组菌株 T44-2 分别产生 91.2 g/L 和 90.3 g/L 乙醇, 原始菌株 CE6 产乙醇量分别为 85.2 g/L 和 85.1 g/L

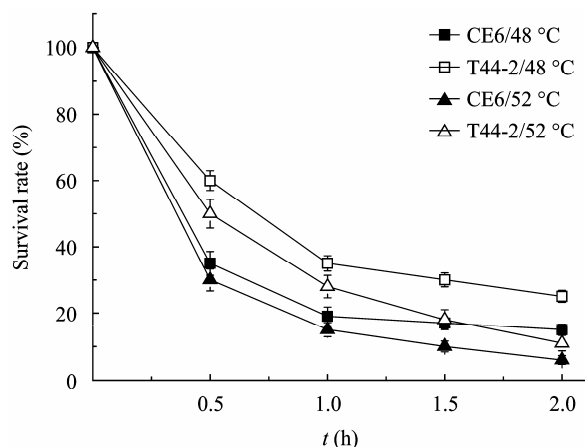


图 3 重组菌株 T44-2 与原始菌株 CE6 在 48 °C 和 52 °C 的热激存活率比较

Fig. 3 Comparison of survival rate of the recombinant strain T44-2 and original strain CE6 under heat shock at 48 °C and 52 °C respectively.

(图 4A、4B)。40 °C 发酵时, 重组菌株 T44-2 和原始菌株 CE6 的发酵时间均比 37 °C 发酵时延长了 14 h, 到 30 h 时乙醇产量达到最高, 重组菌株 T44-2 基本上将 200 g/L 葡萄糖消耗完, 产生了 83.8 g/L 乙醇, 为 37 °C 发酵时乙醇产量的 92.8%, 葡萄糖向乙醇转化的效率为 0.42 g/g; 而原始菌株 CE6 的糖利用率只有 79%, 产生了 64.7 g/L 乙醇, 为 37 °C 发酵时乙醇产量的 76%, 葡萄糖向乙醇转化的效率为 0.41 g/g (图 4C)。两株菌在 42 °C 的发酵性能变化趋势基本与 40 °C 条件下一致, 但生长和代谢活性均有所降低。在 43 °C 和 44 °C 条件下, 原始菌株 CE6 的生长及代谢活性基本停止, 葡萄糖利用率只有 7.5% 和 7%, 只有极少量乙醇产生; 而重组菌株 T44-2 发酵 36 h 后糖利用率分别为 80.4% 和 63.5%, 分别产生了 69.2 g/L 和 52.6 g/L 乙醇, 分别是 37 °C 发酵时乙醇产量的 76.6% 和 58.3% (图 4E、4F)。上述结果表明重组菌株 T44-2 不但对高温具有良好的耐受性, 其发酵活性也具有比较广泛的温度适应性, 在 30 °C~40 °C 范围内均具有良好的糖醇转化率和乙醇产量。

2.5 不同温度下重组菌株的发酵动力学分析

重组菌株 T44-2 发酵初始阶段的菌体生长和乙醇生成较为缓慢, 随着时间的推移, 增长速度明显加快, 经过一段时间, 菌体生长和乙醇生成的速度又趋于缓慢, 以至停止。根据重组菌株细胞生长和乙醇生成的特性, 选用 Verhulst Pearl 提出的 Logistic 方程, 其表达式为:

$$Y = \frac{k}{1 + ae^{-bX}}$$

利用 Origin 7.5 对重组菌株 T44-2 菌体生长曲线和乙醇生成曲线进行拟合。在 30 °C、37 °C、40 °C、42 °C、43 °C、44 °C 的条件下, 重组菌株 T44-2 的菌体生长和乙醇生成趋势均与方程很好地拟合。

根据重组菌株 T44-2 的残余葡萄糖的变化趋势, 选用 Gauss 方程, 其表达式是

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$$

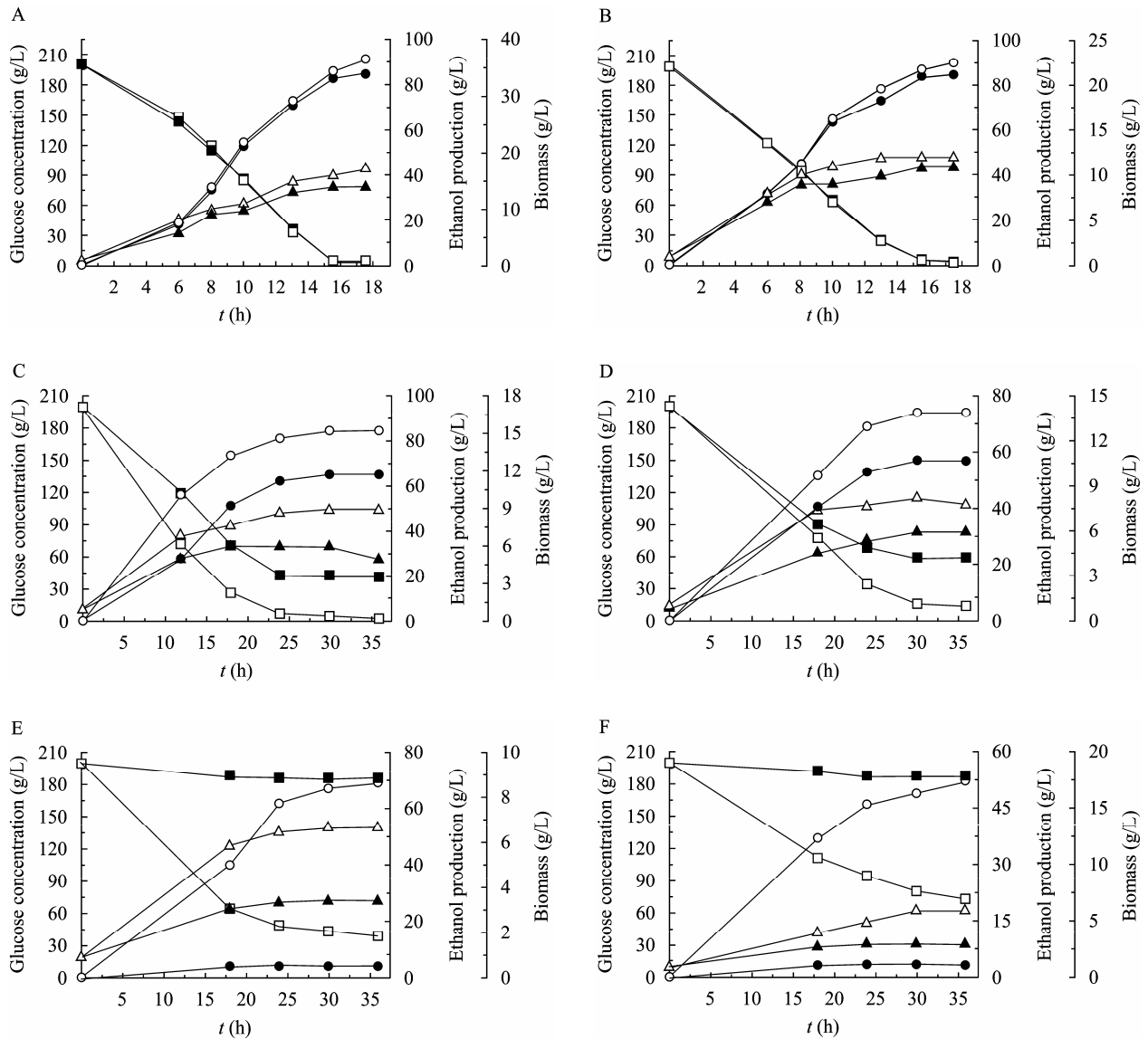


图4 CE6和T44-2分别在30℃(A)、37℃(B)、40℃(C)、42℃(D)、43℃(E)和44℃(F)下的发酵性能比较
Fig. 4 Comparison of fermentation performance of CE6 and T44-2 at different temperature. (A) 30 °C. (B) 37 °C. (C) 40 °C. (D) 42 °C. (E) 43 °C. (F) 44 °C. CE6: Glucose (■), Ethanol (●), Biomass (▲); T44-2: Glucose (□), Ethanol (○), Biomass (△).

利用 Origin 7.5 对重组菌株 T44-2 残余葡萄糖曲线进行拟合, 在 30 °C、37 °C、40 °C、42 °C、43 °C、44 °C 的条件下, 重组菌株 T44-2 的残余葡萄糖趋势均与方程很好地拟合。

由于不同温度下的重组菌株 T44-2 的菌体生长、乙醇生成、残余葡萄糖都能很好地与 Logistic 方程和 Gauss 方程进行拟合, 猜测三者与温度之间可能存在一定的线性关系, 因此分别以重组菌株 T44-2

的菌体生长、乙醇生成、残余葡萄糖为因变量, 以温度和时间作为双自变量进行多重线性回归分析, 经统计学检验, 确定重组菌株 T44-2 的菌体生长、乙醇生成、残余葡萄糖分别与温度和时间呈现出显著的线性关系, 可以建立动力学表达式 (表 1)。重组菌株 T44-2 的菌体生长和乙醇生成随着时间的增加而增大, 温度的升高而减小; 残余葡萄糖则随着时间的增加而减小, 随着温度的升高而增大。

表 1 T44-2 的发酵性能对发酵时间和发酵温度的多重线性回归分析

Table 1 Result of multiple regression of fermentation efficiency of T44-2 for time and temperature

Fermentation efficiency	Equation of multiple regression (<i>t</i> : time; <i>T</i> : temperature)	Prob> <i>F</i>
Biomass (B)	$B=0.2280 \times t + (-0.6862) \times T + 30.3288$	<0.0001
Ethanol (E)	$E=2.3145 \times t + (-2.7197) \times T + 118.0030$	<0.0001
Glucose (G)	$G=(-5.4167) \times t + 5.6032 \times T - 47.5993$	<0.0001

3 讨论

酵母菌作为重要的乙醇发酵微生物, 广泛应用于乙醇以及其他发酵工业。酵母菌在发酵过程中常常面临高温胁迫, 严重地制约着发酵工业的生产效率。因此筛选温度耐受性强、发酵性能高的酵母菌株对于酵母菌在工业生产中的应用具有重要的意义。酵母菌温度耐受性的分子机制非常复杂, 它涉及到细胞内多个生理过程的改变, 包括热激蛋白的诱导表达^[11], 细胞内部结构的稳定性维持^[12], 代谢过程的重构等^[13-14]。与这些生理过程相关的基因同时受到转录和翻译后的蛋白质修饰等多个水平的调控, 不同基因产物之间彼此相互作用, 形成了极其错综复杂的调控网络。目前为止, 虽然确认了大量与酵母菌温度耐受性相关的基因, 但是对这些基因是如何产生和影响细胞温度耐受性的认识还很有限。随着基因工程技术的兴起和对温度耐受性相关基因的不断认识, 人们试图通过调控一个或多个温度耐受性相关基因的表达来定向改造酵母菌的耐热性能, 从而获得耐高温酵母菌株, 但目前还没有很成功的实例。因为酵母菌温度耐受性分子机制的复杂性决定了单个或者少数几个基因的改变难以达到提高酵母菌温度耐受性的效果。

不同的带有“黑箱”属性的微生物育种技术被应用于酵母菌温度耐受性的改进中, Sridhar 等通过 UV 诱变提高了酿酒酵母的温度耐受性, 该菌株在 30 °C 和 40 °C 发酵 250 g/L 葡萄糖, 可以产生 98 g/L 和 62 g/L 乙醇^[15]; Edgardo 等通过自然筛选和适应进化筛选到能够在 42 °C 生长的酵母菌株, 该菌株在 40 °C 发酵葡萄糖, 乙醇产量可以达到理论值的

75%^[3]。国内的 Jin 等同样利用 UV 诱变提高酿酒酵母的耐热性, 获得的耐热菌株在 40 °C 发酵 120 g/L 葡萄糖, 可以产生 28 g/L 乙醇^[16]。上述研究虽然均获得了能在 40 °C 发酵葡萄糖产乙醇的酵母菌, 但在糖醇转化率和乙醇产量方面还难于满足现实的需要。近年来基因组改组技术逐渐被应用于酵母菌耐热性的改造中, 取得了比较好的研究效果^[17]。本研究基于酿酒酵母遗传转化率高, 能够进行大片段基因组 DNA 转化^[18], 技术方法比较成熟的特点, 初步探索了一种新的促进酵母菌基因组 DNA 变异的方法, 并将其应用于乙醇工业酵母的热耐受性改造中, 通过基于基因组 DNA 突变的遗传重组方法筛选到一株温度耐受性和乙醇发酵性能提高的重组菌株 T44-2。重组菌株 T44-2 在 30 °C~40 °C 有良好的发酵性能, 能够耐受乙醇工业生产中的温度波动, 而对发酵性能没有明显影响, 因此重组菌株在实际应用中可以极大减少加热和冷却成本, 实现大宗发酵产品乙醇生产的低能耗和低污染, 有望带来明显的经济效益。基于基因组 DNA 突变的遗传重组育种方法, 克服了基因工程同时调控基因数量有限的不足, 它可以同时在多个位点上引起突变, 同时上调和下调多个基因的表达, 从而扩大和提高基因的突变频率和范围, 为耐高温酵母菌株筛选提供了更大的空间。在上述研究基础上, 将进一步优化基于基因组 DNA 突变的遗传重组方法, 提高遗传转化和同源重组的有效性, 并尝试在酵母菌其他生理功能进化中的应用。另外重组菌株为什么产生了对温度的广泛适应性是我们非常关注的问题, 目前正在利用基因芯片技术进行重组菌株和原始菌株的比较转录组学研究。希望通过揭示重组菌株耐热机制, 为醇

母菌, 甚至其他工业微生物耐热性能的理性设计和改造提供重要的解决策略。

REFERENCES

- [1] Banat IM, Nigam P, Singh D, et al. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part I-yeasts in general. *World J Microbiol Biotechnol*, 1998, 14(6): 809–821.
- [2] Banat IM, Nigam P, Marchant R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World J Microbiol Biotechnol*, 1992, 8(3): 259–263.
- [3] Edgardo A, Carolina P, Manuel R, et al. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 43(2): 120–123.
- [4] Shimoda C, Itadani A, Sugino A, et al. Isolation of thermotolerant mutants by using proofreading-deficient DNA polymerase δ as an effective mutator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst*, 2006, 81(6): 391–397.
- [5] Sakanaka K, Yan W, Kishida M, et al. Breeding a fermentative yeast at high temperature using protoplast fusion. *J Ferment Bioeng*, 1996, 81(2): 104–108.
- [6] Hiraishi H, Mochizuki M, Takagi H. Enhancement of stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase *rsp5* and ubiquitin-conjugating enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(11): 2762–2765.
- [7] Zhang BR, Liu SF, Wang YH, et al. Induced effect by diethyl sulphate and N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidine in *Saccharomyces*. *Hereditas*, 1985, 7(5): 12–13.
张博润, 刘书锋, 王永红, 等. 两种化学诱变剂对酵母菌的诱变效应. *遗传*, 1985, 7(5): 12–13.
- [8] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, et al. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [9] Becker DM, Guarente L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol*, 1991, 194: 182–187.
- [10] He X, Huai W, Tie C, et al. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 25(1): 39–44.
- [11] Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(4): 469–486.
- [12] Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, et al. Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast*, 1993, 9(5): 481–494.
- [13] Hahn JS, Hu ZZ, Thiele DJ, et al. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(12): 5249–5256.
- [14] Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, et al. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(5): 783–790.
- [15] Sridhar M, Sree NK, Rao LV. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. *Bioresour Technol*, 2002, 83(3): 199–202.
- [16] Jin CT, Han N, Wu X, et al. Isolation and characterization of a highly thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol*, 2005, 55(1): 57–61.
- [17] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(1): 139–147.
- [18] Kouprina N, Larionov V. Exploiting the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the study of the organization and evolution of complex genomes. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(5): 629–649.