酿酒酵母菌共表达 *XYLA* 和 *XKS1* 发酵木糖生产酒精

刘小琳 江 宁* 贺 鹏 卢大军 沈 安

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080. * 联系人, E-mail: jiangn@sun.im.ac.cn)

摘要 分别从腾冲嗜热菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4T) 和毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 中克隆到木糖异构酶基因 (xylose isomerase gene, *XYLA*) 和木酮糖激酶基因 (xylulokinase gene, *XKS1*)。共表达这 2 个基因的重组菌 EF1014 不仅可以在以木糖为惟一碳源的培养基上生长, 而且在厌氧条件下能发酵木糖生产酒精。在不同温度下用不同浓度的木糖分别进行的发酵实验表明, 当木糖浓度为 50 g/L 时, 酒精的产量达到最大值 0.11 g/g 木糖。与此同时, 28.4% 的木糖被利用, 并产生 1.54 g/L 的木糖醇。当发酵温度从 30 提高到 37 时, 酒精产量没有明显变化。

关键词 木糖异构酶基因 木酮糖激酶基因 共表达 木糖 酒精 酿酒酵母

微生物转化生物质生产酒精是当前研究的热点之一。在生物质降解物中, 木糖占有相当大的比例。自然界利用木糖的酵母菌同化木糖的最初两步反应是在木糖还原酶 (xylose reductase, XR) 及木糖醇脱氢酶 (xylitol dehydrogenase, XDH) 催化下完成的。木糖首先在 XR 的催化下, 还原成木糖醇, 随后由 XDH 氧化成木酮糖^[1]。在大多数细菌, 如 *E. coli* 和 *Bacillus* 等中, 木糖通过木糖异构酶 (XI) 直接转化为木酮糖^[1]。然后, 木酮糖在木酮糖激酶 (XK) 的作用下转变成 5-磷酸木酮糖, 进入磷酸戊糖途径。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 具有高的酒精产量和产率, 对抑制因子以及发酵过程中的不利因素的高耐受性, 对高浓度酒精的耐受以及非致病性等优良特性。但由于缺乏木糖代谢的最初 2 个酶 XR 和 XDH 而不能代谢木糖。

为了使酿酒酵母具有发酵木糖的能力, 将依赖 NAD(P)H 的 XR 及依赖 NAD⁺ 的毕赤酵母 XDH 克隆到其中, 得到能够发酵木糖生产酒精的重组菌^[2,3]。但同时带来的问题是: XR 对 NADPH 的亲性和远远大于 NAD, 这就导致在 XDH 催化的木糖醇氧化成木酮糖的过程中, 辅因子的不平衡, 其直接后果就是副产物木糖醇的积累和甘油等的生成, 从而影响终产物酒精的产量。木糖异构酶因不需要辅助因子, 因此它再次受到研究者的注意^[4]。但分别从 *Actinoplanes missouriensis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Escherichia coli* 和 *Lactobacillus pentosus* 等菌中克隆到 *XYLA* 所构建的酿酒酵母重组菌均

不能在木糖上生长^[5,6]。

木酮糖激酶 (xylulokinase, XK) 是酵母木糖代谢的第 3 个关键酶。它催化木酮糖 (xylulose) 生成 5-磷酸木酮糖。Marko 等人^[7]的研究结果表明, 酿酒酵母自身较低的木酮糖激酶活性限制了木糖分解^[8,9]。因此, 引入 *XKS1* 将 XK 活性提高到一适当水平, 并促进木糖吸收和随后的酒精发酵是行之有效的解决方法^[10,11,12]。

本文在酿酒酵母 EF 326 中共表达腾冲嗜热菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4T) 的 *XYLA* 基因和毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 的 *XKS1* 基因。研究其对酿酒酵母发酵木糖生产酒精的影响, 并测定了在不同条件下木糖发酵的终产物浓度和重组酶的活性, 以利于将来对重组菌的进一步改造。

1 材料与方法

() 菌株和质粒。 *E. coli* DH5 α 和 *S. cerevisiae* EF 326 分别用来进行质粒构建和酵母转化。用于克隆木糖异构酶基因的腾冲嗜热菌基因组 DNA 由本所向华博士提供。腾冲嗜热菌是我国科学家 1998 年在云南省腾冲地区发现的一株新的嗜热菌。利用全基因组“霰弹法”测序策略, 成功地获得了腾冲嗜热菌全基因组序列 (GenBank 登录号: AE008691)^[13]。用于克隆木酮糖激酶基因的毕赤酵母以及质粒 pURL129 和 pVgb-EX2 由本实验室保存。

() 培养基和培养条件。 *E. coli* 用 LB 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 必要时添加 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素。酵

母菌用添加 2%葡萄糖的 YP 培养基(1%酵母提取物, 2%胰蛋白胨) (YEPD)在 30 °C 培养. 酵母转化子用含 0.6 mmol/L 甲醛的 YEPD 培养基选择. 生长实验的培养基为添加 2%木糖的 YP. 酶活分析的培养基为添加 0.5%葡萄糖和 2%木糖的 YP.

() DNA操作. 核酸操作按照文献[14]进行. 质粒提取采用北京鼎国生物技术公司的微量质粒提取试剂盒, 限制酶和其他修饰酶购自大连宝生物. 酵母转化按照Adams 等人[15]的方法进行. *E. coli*采用常规的CaCl₂ 转化法[14].

以嗜嗜嗜嗜嗜基因组 DNA 用作模板, PCR 扩增 *XYLA*. 扩增的寡核苷酸引物是 P1 (5'-CGTCTCT-AGAATTTGTGGATTCCCTGGC-3', 下画线处为 *Xba* 酶切位点)和 P2(5'-CGCATGATCAGCTTTCTAC-CCCTCCTCG-3', 下画线处为 *Bcl* 酶切位点). 以毕赤酵母的基因组 DNA 为模板扩增 *XKS1*. 引物为 P1(5'-AATAGATCTTCACGTAGTTGACACTCAC-3', 下画线处为 *Bgl* 酶切位点)和 P2 (5'-TGAAGCTTGTCTATCGTGATATTCGCAC-3', 下画线处为 *Hind* 酶切位点). 这 2 个基因扩增时都包括其本身的启动子和终止子. 引物设计采用 Primer Primer 5.0 软件.

扩增 *XYLA* 时, *Pfu* 多聚酶购自美国 Promega 公司. PCR 扩增体系包括 2 mmol/L MgSO₄, 2 mmol/L dATP, 0.5 μmol/L 引物, 0.1 μg 模板和 2.5 U *Pfu* 多聚酶, 反应的终体积是 50 μL. 循环加热仪为德国 Eppendorf 5530. 扩增程序为: 94 °C, 10 min; 94 °C, 40 s, 50 °C, 40 s, 72 °C, 80 s, 共 30 个循环; 72 °C, 10 min. 然后将反应混合物冷却至 4 °C. 扩增 *XKS1* 的程序和 *XYLA* 的基本相同, 但其变性温度为 55 °C, 延伸时间为 120 s.

将 *XYLA* 和 *XKS1* 的 PCR 产物依次插入质粒 pRUL129 中, 得到 pRUX2. 用 *Sac* 和 *Kpn* 分别对 pRUX2 和 pVgb-EX2 进行酶切, 将 pRUX2 中含有 *XYLA* 和 *XKS1* 的酶切片段和 pVgb-EX2 中含有 *SFA1* 的酶切片段相连接, 得到 pRX2 (图 1). *SFA1* 编码甲醛脱氢酶, 使宿主菌具有甲醛抗性. 本文用作选择性标记. pRX2 用于进行酵母转化.

() 酶活分析. 酿酒酵母细胞在 YEPD 培养基中 30 °C 培养至稳定期, 3000×g 离心 5 min 收集菌体, 然后用 0.9% NaCl 溶液洗涤 1 次. 菌体悬浮于裂解缓冲液中(100 mmol/L 三乙醇胺 pH 7.0, 1.0 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 加入一定数量的小玻璃珠(直径 0.5 mm), 4 °C 下旋涡振荡器上振荡 5 min, 然后 4 °C

图 1 pRX2 质粒构建

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/CSB2005-50-7-653>

5000×g 离心 5 min. 上清液储存于-20℃ 用于测定酶活和蛋白含量. 蛋白含量的测定按照 Bradford 等人^[15]的方法进行.

木糖异构酶的酶活分析方法按照文献^[7]进行. 木酮糖激酶的酶活分析方法按照文献^[16]进行. 酶的比活力用 U/mg 蛋白来表示. 1 单位的定义为: 在分析条件下每分钟转化 1 μmol 底物所需要的酶量. 测定在 340 nm 光波下进行.

XI 的酶活测定在 pH 7.0, 30~100℃ 之间进行. 酶活分析液为 10 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 10 mmol/L 三乙醇胺(pH 8.0), 0.15 mmol/L NADH, 0.2 U 山梨醇脱氢酶 (Sigma) 和酶粗提液 0.2 mL, 用无菌水调终体积至 1.0 mL. 反应从添加 250 mmol/L 木糖开始. 反应时间为 30 min.

XK 的酶活分析液为: 50 mmol/L Tris, 50 mmol/L 氨基乙酸, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 氰化钾, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L 磷酸烯醇丙酮酸, 5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L ATP, 0.3 mmol/L NADH, 25 U 乳酸脱氢酶和丙酮酸激酶, 0.1 mL 酶粗提液, 无菌水调终体积至 0.5 mL. 反应从加入 1 mmol/L 木酮糖开始.

() 发酵条件和分析方法. 在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL YP 培养基, 补充木糖至终浓度 2%. 摇瓶以橡皮塞封口, 插入一玻璃套管以提供通气. 发酵温度为 30℃ 或 37℃, 摇床转速为 100 r/min, 发酵时间 72 h.

酵母细胞生长率用细胞干重来表示(CDW, g/L). 将一定体积的培养物在 4℃ 下 3000×g 离心 5 min, 蒸馏水洗涤细胞 2 次. 将细胞置于一预先称重的小烧杯内, 105℃ 温箱烘干过夜. 木糖醇浓度用化学法测定^[17]. 乙醇和木糖浓度用生物传感仪(SAB-40C, 山东微生物研究所)测定.

2 结果和讨论

2.1 在酿酒酵母中表达 XYL1 和 XKS1

将均带有自身启动子和终止子的 XYL1 和 XKS1 克隆于 GPD1 启动子和 CYC1 终止子之间, 构建以 SFA1 为选择标记的酵母表达载体 pRX2. pRX2 转化酿酒酵母 EF-326, 用含有 0.6 mmol/L 甲醛的 YEPD 培养基进行选择, 得到重组菌 EF-1014.

早期在酿酒酵母中表达木糖异构酶没有获得成

功, 主要是因为重组酵母所产生的木糖异构酶没有活性. 可能的原因是不正确的酶折叠、后期翻译模式不合适、分子内/间的二硫键不同以及细菌和酵母最适 pH 的不同^[18]. Walfridsson 等人^[5]和 Bao 等人^[6]都推测在酿酒酵母中成功表达木糖异构酶的关键在于选择一个分类上亲缘关系更近的基因来源. 迄今为止, 在酿酒酵母中成功表达的木糖异构酶几乎都来自于耐热嗜热菌(*Thermus thermophilus*)^[1]. 从分类上看, 嗜热菌属于古细菌, 许多特性比真细菌更接近酿酒酵母. 本文的研究证明, 来自于真细菌嗜热菌的木糖异构酶也可以在酿酒酵母中有效表达. 这为构建木糖发酵工程菌木糖异构酶基因来源提供了一个新的选择.

毕赤酵母的木酮糖激酶是来自于真菌的惟一已经定性的, 有助于将木糖向乙醇转化的木酮糖激酶. 在酿酒酵母中异源表达毕赤酵母木酮糖激酶基因可以增强其木酮糖发酵^[10]. 本文克隆到的毕赤酵母木酮糖激酶基因 ORF 为 1872 bp, 与基因库的序列相比, 其同源性为 97.76%, 推导出其氨基酸同源性为 99.83%. 毕赤酵母木酮糖激酶基因与酿酒酵母木酮糖激酶基因不同之处在于它没有核酮糖激酶活性, 因此对木酮糖的亲合性更大^[16].

2.2 酶活性

将酵母细胞培养至稳定期, 分别测定 EF326 和 EF1014 的 XI 和 XK 活性. 重组菌 EF1014 在 30℃ 下的 XI 和 XK 的比活力分别为 0.12 U/mg 蛋白和 1.2 U/mg 蛋白. 在 37℃, XI 的活性稍有提高, 为 0.14 U/mg 蛋白; 而 XK 活性却下降较多, 为 0.07 U/mg 蛋白. 宿主菌在 30℃ 和 37℃ 均检测不到 XI 和 XK 活性.

同时, 我们还测定了不同温度和不同 pH 条件下的 XI 活性. 结果表明, 重组 XI 的最适温度为 80℃, 在这个温度下, XI 的比活力达到最大值 1.0 U/mg 蛋白. 当温度降到 60℃ 以下时, 酶活急剧下降. 30℃ 和 40℃ 时的酶活分别为最大值的 12% 和 15%. 这个结果表明重组酵母中的 XI 仍然具有耐热性. 重组 XI 在 pH 6~7 时上升较快, 以 pH 7 为最适值(图 2).

重组菌经过连续 20 代的培养仍然具 XI 和 XK 活性, 这表明重组质粒在酿酒酵母宿主中是比较稳定的.

图2 在不同温度及 pH 条件下异构酶的相对活性变化

2.3 表达 *XYLA* 和 *XKS1* 对重组酵母菌在木糖上生长的影响

生长实验分别在液体培养基和固体平板上进行。结果表明,在以木糖为惟一碳源的液体培养基中培养 72 h 后,EF1014 的细胞干重显著增加,而宿主菌 EF326 的细胞干重未见增长(图 3)。二者在葡萄糖平板上均能生长良好,而在木糖平板上,只有 EF1014

图3 EF-326 与 EF-1014 在以木糖为惟一碳源的振荡培养中生长状况

能生长(图 4)。但与在葡萄糖上的生长相比,EF1014 在木糖上的生长仍然较为缓慢。木糖运输系统的低效率和在生长温度下 XI 的低活力也许是 EF1014 在木糖上生长缓慢的主要原因。在酿酒酵母细胞内,木糖通过葡萄糖促进运输系统运输,这个系统对木糖的亲合力仅为其对葡萄糖的 1/200^[19,20]。此外,酵母细胞内的环境不利于 XI 表现活性。腾冲嗜热菌 XI 的最适温度为 80℃,而实验条件下的生长温度仅为 30℃。

2.4 表达 *XYLA* 和 *XKS1* 对重组酵母菌木糖发酵产酒精的影响

分别用 50、100、150 和 200 g/L 浓度的木糖作为碳源进行重组菌 EF1014 的发酵实验,并分别测定酒精和主要副产物木糖醇的产量。结果如表 1 所示。随着木糖消耗的增加,木糖醇的产量也有所增加。当木糖浓度为 100 g/L 时,乙醇产量达到最大值。但是,在木糖浓度为 50 g/L 时出现乙醇的最高产率 0.11 g/g 木糖和木糖最高消耗率 28.4%。因此,选用 50 g/L 木

图4 EF-326 和 EF-1014 在以木糖或葡萄糖为惟一碳源的 YP 培养基上生长
1 示 EF-326; 2 示 EF-1014。培养基含 20 g/L 蔗糖, 30℃ 培养 3 d

表 1 EF-1014 30 时在不同木糖浓度中的发酵结果

木糖浓度/g·L ⁻¹	木糖醇产量/g·L ⁻¹	乙醇产量/g·L ⁻¹	乙醇产率/g·g ⁻¹ 木糖	木糖残留量/g·L ⁻¹	木糖转化率(%)
50	1.54	1.61	0.11	35.8	28.4
100	1.57	1.68	0.10	83.3	16.7
150	1.62	1.63	0.09	132.7	11.5
200	1.78	1.55	0.09	182.3	8.85

糖作为碳源进行EF326 和EF1014 的发酵对照实验. 经过 72 h 的发酵, EF326 代谢了 3.3 g/L 的木糖, 产生 0.91 g/L 的木糖醇, 没有乙醇产生. 而EF1014 消耗了 14.2 g/L 木糖, 木糖醇和乙醇的产量分别为 1.54 和 1.61 g/L, 细胞干重也增加了 2 倍. EF326 发酵液中木糖被消耗少许以及EF326 和EF1014 均有木糖醇产生可能是*GRE3* 编码的醛-酮还原酶的缘故^[21]. 敲除酿酒酵母中的*GRE3* 基因可以有效降低木糖醇的产量^[22]. 此外, 内源的木糖醇脱氢酶^[23]也会使反应向有利于木糖醇形成的方向进行. 木糖醇对乙醇的生成有双重副作用, 它抑制木糖异构酶^[24], 降低木糖吸收率并减少乙醇形成的碳流量. EF1014 木糖发酵实验同时在 37 进行, 但结果(结果未显示)与 30 没有明显差异.

迄今为止, 所有表达*XYLA*的重组酿酒酵母菌均不能在以木糖为惟一碳源的培养基上生长^[4-6,25]. 表达*XYLA* 但敲除*GRE3*的重组菌TMB3102能够生长并发酵产乙醇^[1]. 共表达*XYLA*和*XKS1* 的重组菌 TMB 3103 发酵产生木糖醇, 而没有乙醇产生^[1].

增加木糖消耗并尽量降低木糖醇的产量是木糖发酵产酒精的关键因素. 使用多拷贝质粒载体能有效提高XI活性^[22], 并增加木糖消耗. 另一方面, 将XK活性提高到一个适当水平能有效促进木酮糖发酵. 当木酮糖积累较少时, 由内源木糖醇脱氢酶催化的反应将不再向有利于木糖醇形成的方向进行. 代谢模型已经表明, 过量表达代谢途径中的初始激酶会使细胞内ATP消耗殆尽, 从而导致细胞内磷酸化糖的积累^[26]. 有实验证明, 随着XK活性的提高, 酵母细胞在木糖上的生长会受到抑制, 酒精产量也下降^[8]. 这表明引入酶的活性应与整个代谢网络相协调. 在今后的几年内, 菌种改良的工作将会持续进行, 生物转化生产酒精在商业应用也变将得越来越可行^[27].

致谢 感谢中国科学院微生物研究所向华博士提供的嗜热菌基因组DNA. 本工作为国家重点基础研究发展计划(批准号: 2004CB719002)和中国科学院知识创新工程的资助项目.

参 考 文 献

- 1 Träff K L, Otero Cordero R R, van Zyl W H, et al. Deletion of the *GRE3* aldose-reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *Xks1* genes. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 5668~5674[DOI]
- 2 Walfridsson M, Hallborn J, Penttilä M, et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 4184~4190
- 3 Sedlak M, Ho N W Y. Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of cofermenting glucose and xylose. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, 113~116: 403~416[DOI]
- 4 Kuyper M, Winkler A A, van Dijken J P, et al. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: A proof of principle. *FEMS Yeast Res*, 2004, 4: 655~664[DOI]
- 5 Walfridsson M, Bao X M, Anderlund M, et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 4648~4651
- 6 鲍晓明, 高东, 王祖农. 嗜热细菌木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中的高效表达. *微生物学报*, 1999, 39(1): 49~54
- 7 Kuyper M, Harhangi H R, Stave A K. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res*, 2003, 1574: 1~10
- 8 Jin Y S, Jeffries T W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2003, 105-108: 277~286[DOI]
- 9 Xue X D, Ho N W Y. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. *Appl Biochem Biotechnol*, 1990, 24-25: 193~199
- 10 Jin Y S, Jones S, Shi N Q, et al. Molecular cloning of *XYL3* (D-xylulokinase) from *Pichia stipitis* and characterization of its physiological function. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1232~1239[DOI]
- 11 Johansson B, Christensson C, Hobley T, et al. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect

- on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4249~4255[DOI]
- 12 Pitkanen J P, Aristidou A, Salusjarvi L, et al. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. Metabolic Engineering, 2003, 5: 16~31[DOI]
- 13 Bao Q, Tian Y, Li W, et al. A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. Genome Res, 2002, 12: 689~700[DOI]
- 14 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- 15 Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A, et al. Methods in Yeasts Genetics: Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997
- 16 Flanagan T, Waites M J. Purification and characterization of D-xylulokinase from the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* NCYC-1541. Enzyme Microb Technol, 1992, 14: 975~979[DOI]
- 17 Bok S H, Demain A L. An improved colorimetric assay for polyols. Anal Biochem, 1977, 81: 18~20
- 18 Amore R, Wilhelm M, Hollenberg C P. The fermentation of xylose: An analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinaplnes* xylose isomerase genes in yeast. Appl Microbiol Biotechnol, 1989, 30: 351~357[DOI]
- 19 Sedlak M, Ho N W Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. Yeast, 2004, 21: 671~684[DOI]
- 20 Eliasson A, Christensson C, Wahlbom C F, et al. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3381~3386[DOI]
- 21 Traff-Bjerre K L, Jeppsson M, Hahn-Hagerdal B, et al. Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2004, 21: 141~150[DOI]
- 22 Lonn A, Traff-Bjerre K L, Cordero R R, et al. Xylose isomerase activity influence xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xylA* from *Thermophilus*. Emzy Microbial Technol, 2003, 32: 567~573[DOI]
- 23 Richard P, Toivari M H, Penttila M. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. FEBS Lett, 1999, 457: 135~138[DOI]
- 24 Yamanaka K. Inhibition of D-xylose isomerase by pentose and D-xylitol. Arch Biochem Biophys, 1969, 107: 179~197
- 25 Moes C J, Pretorius I S, van Zyl W H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene(*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotech Lett, 1996, 3: 269~274
- 26 Teusink B, Walsh M C, van Dam K, et al. The danger of metabolic pathways with turbo design. Trends Biochem Sci, 1998, 23: 162~169[DOI]
- 27 Jeffries T W, Yong S J. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 63: 495~509[DOI]

(2004-11-23 收稿, 2005-03-02 收修改稿)