

研究报告

代谢工程改善野生酵母利用木糖产乙醇的性能

张凌燕^{1,2}, 张梁^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 王正祥¹, 石贵阳^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 生物资源与转化研究室, 无锡 214122

摘要: 从 256 个自然样品中筛选得到 1 株可高效转化 D-木糖的酵母。通过生理生化和分子生物学方法鉴定, 证实该菌株是属于 *Candida tropicalis*。以该酵母为研究对象, 增加木糖醇脱氢酶表达量, 通过改变代谢流以达到提高酒精产率的目的。以 pXY212-XYL2 质粒为基础载体, 构建了含有潮霉素抗性的 pYX212-XYL2-Hygro, 电击转化进入野生型 *C. tropicalis*, 潮霉素抗性筛选, 得到含高拷贝木糖醇脱氢酶基因的重组菌株 *C. tropicalis* XYL2-7。重组菌的比酶活达到 0.5 u/mg protein, 比原始菌株提高了 3 倍。实验表明, 重组菌木糖醇得率比原始菌株降低了 3 倍, 酒精得率提高了 5 倍。首次通过实验验证了热带假丝酵母利用木糖产乙醇的可行性, 这对研究酵母利用秸秆、麦糠、谷壳等纤维质农业废弃物生产燃料乙醇具有重要启示。

关键词: 热带假丝酵母, 木糖, 乙醇, 木糖醇脱氢酶

Metabolic Engineering for Improving Ethanol Fermentation of Xylose by Wild Yeast

Lingyan Zhang^{1,2}, Liang Zhang^{1,2}, Zhongyang Ding^{1,2}, Zhengxiang Wang¹, and Guiyang Shi^{1,2}

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

2 Laboratory of Biomass Refinery & Processing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: One yeast strain, which was isolated from 256 natural samples, was found to be able to utilize D-xylose effectively. On the basis of assimilation physiological and molecular biological tests, the yeast strain was identified as a strain of *Candida tropicalis*. Furthermore, metabolic engineering breeding strategy was applied to change the metabolic flux in order to increase ethanol productivity. In this study, the *C. tropicalis* was used as the host strain and the plasmid pYX212-XYL2, which was formerly constructed for over expression of XYL2 gene encoding xylitol dehydrogenase (XDH) from *Pichia stipitis*, was used as the backbone of the recombinant vector. A *hygro* gene was inserted into downstream position of XYL2 gene, meanwhile, the result plasmid pXY212-XYL2-Hygro transformed into *C. tropicalis* by electroporation. Thus, a recombinant yeast *C. tropicalis* XYL2-7 was obtained through hygromycin B resistance screening and its specific XDH activity was 0.5 u/mg protein, which was 3 times more than that of the parent strain. Additionally, the recombinant yeast was applied in the fermentation of xylose. Compared with the parent yeast, it was concluded that the xylitol yield in the broth decreased by 3 times, however, the ethanol yield increased by 5 times. The feasibility of ethanol production from xylose by *C. tropicalis* was firstly studied in this paper. These research results are helpful to advance the bioconversion of renewable resources (e. g. straw, wheat bran, and husk) to fuel ethanol.

Keywords: *Candida tropicalis*, xylose, ethanol, xylitol dehydrogenase

Received: January 14, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 20706024), the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2007AA10Z359).

Corresponding author: Guiyang Shi. Tel: +86-510-85918229; Fax: +86-510-85815339; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20706024)和国家 863 计划(No. 2007AA10Z359)资助。

我国是一个农业大国, 以农作物秸秆、林木枝条为主的农业废弃物资源十分丰富, 但并未得到有效利用, 反而对农业生态形成了一定的压力; 同时, 我国也是一个能源资源相对贫乏的国家, 如何科学利用农业废弃物进行能源生产, 对于实现可持续发展战略意义重大。

近年来利用秸秆、麦糠、谷壳等农业废弃物生产燃料乙醇正逐步成为人们研究的热点。随着木质纤维素预处理技术的不断改进和发展, 特别近年来发展迅速的稀酸预处理、蒸汽爆碎等技术可高效破坏植物纤维结构, 提高微生物的降解转化速率。高活力纤维素酶, 可利用纤维二糖的重组工业酒精酵母的研究^[1,2]使木质纤维素原料中纤维素的水解和高效利用成为可能。因此, 微生物本身代谢半纤维素水解液中各种戊糖底物(木糖、阿拉伯糖等)的能力, 已成为决定纤维质原料水解液发酵成败的关键^[3,4]。

据报道, 酵母菌中有 6 个种利用木糖发酵产生酒精的量相对较大^[5], 但这些菌株由于发酵速率慢且产生大量副产物而不能应用于酒精工业生产。因此, 人们通过各种育种技术构建能发酵木糖产生酒精的酵母工程菌, 即将与木糖代谢相关的酶类的基因以及相关的辅酶系统相应的基因克隆到酿酒酵母中, 使其能利用木糖产生酒精, 郭婷^[6]等将木糖还原酶基因(*XYL1*), 木糖醇脱氢酶基因(*XYL2*), 木酮糖激酶基因(*XKS1*)转入工业酿酒酵母获得表达, 酒精产率提高了 12%。Pitanen^[7]等将 *XYL1*、*XYL2*、*XKS1* 基因克隆到酿酒酵母中, 得到重组酵母能利用木糖产 3 g/L 的乙醇。

本文从自然界中筛选出一株能高效利用木糖的热带假丝酵母, 该菌能够快速利用木糖生成木糖醇,

并产生微量的酒精。以这株酵母为研究对象, 在国内首次尝试将天然底物利用策略^[8]应用到酵母中, 通过增加细胞内木糖醇脱氢酶的表达量, 来减少木糖醇的积累, 试图将代谢流引向乙醇形成方向(图 1), 以达到提高乙醇产量的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

稍微腐烂的热带水果、花朵、土壤、酒曲、酒醅、热带温泉土、水样等。

1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli* JM109); PYX212-*XYL2* 游离穿梭质粒(含酵母 *TPI* 启动子, 树干毕赤酵母木糖醇脱氢酶基因)由本实验室先期构建, 物理图谱如下(图 2); pSKsymHyg 质粒由本实验室保存; 其他质粒均在本实验中构建。

1.1.3 培养基

木糖培养基: D-木糖 10 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, KH₂PO₄ 1 g, NaCl 0.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCl₂ 0.1 g, 酵母粉 0.2 g, 水 1000 mL。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 定容至 1 L, pH 7.0; 用于大肠杆菌培养。固体培养基添加 1.5% 琼脂; 挑转化子时, 加入 100 μg/mL 氨苄青霉素。

YEPD 培养基: 胰蛋白胨 20 g, 酵母粉 10 g, 葡萄糖 20 g, 定容至 1 L。固体培养基添加 1.5% 琼脂, 用于热带假丝酵母培养; 添加一定浓度潮霉素 B(Hygromycin B)用于重组子筛选。

YEPX 培养基: 胰蛋白胨 20 g, 酵母粉 10 g, 木糖 50 g, 定容至 1 L。用于酵母培养。

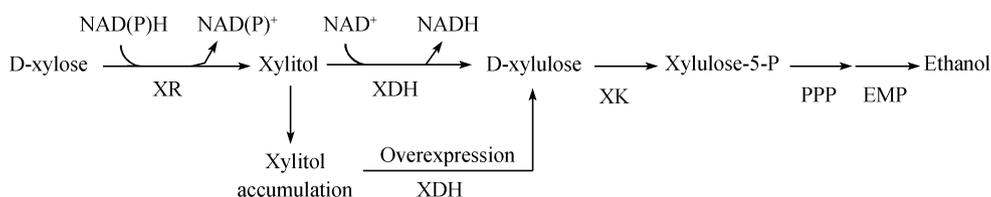


图 1 热带假丝酵母木糖代谢途径^[8]及代谢工程育种策略

Fig. 1 Xylose metabolic pathway^[8] in *C. tropicalis* and metabolic engineering breeding strategy

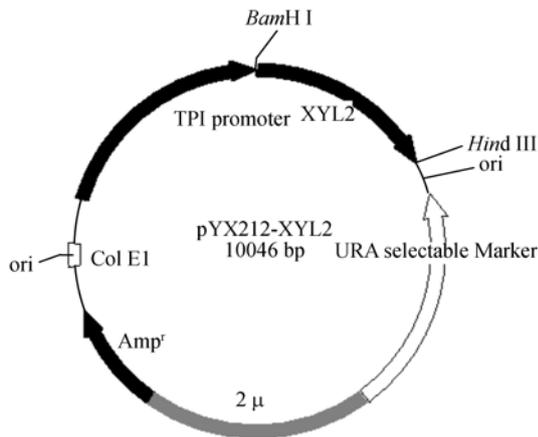


图 2 质粒 PYX212-XYL2 的物理图谱

Fig. 2 Physical map of plasmid PYX212-XYL2

1.2 方法

1.2.1 采样与分离

称取 5 g 样品, 加到含 100 mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 在 30°C 下, 150~200 r/min 振荡培养 25 min; 菌悬液用无菌生理盐水进行系列稀释, 选择合适的稀释度, 分别涂布于 YEPD 平板, 30°C 培养 5~7 d, 观察菌落生长情况, 并将新长出的形态上有差异的单菌落挑出。

从初筛 YEPD 固体平板上挑取典型特征的酵母单菌落接种在木糖固体培养基上, 30°C 培养 48 h。挑取生长快速的典型酵母单菌落在木糖固体培养基试管斜面上划线, 4°C 保存。

1.2.2 酵母筛选

种子培养采用 250 mL 三角瓶装 20 mL YEPX 培养基, 置回转式摇床, 30°C, 100 r/min, 培养 24 h。摇瓶发酵采用 YEPX 培养基, 置回转式摇床, 30°C, 100 r/min 培养至所需时间。

1.2.3 分类鉴定

(1) 形态与生理生化特征

分离物的形态与生理生化特征鉴定, 按照文献[6]的方法进行。

(2) 分子特征

酵母菌 DNA 的提取方法参照分子克隆实验手册。所用引物为真菌 ITS 通用引物。PCR 扩增产物经电泳检测后测序。在核酸序列数据(GenBank)中进行同源序列搜索, 根据同源序列搜索结果, 确定菌株的分类地位。

1.2.4 分析方法

(1) 生长量测定

取不同发酵时间的发酵液, 用 721 型分光光度

计于 600 nm 处测其吸光度。

(2) 残糖及发酵产物的分析

液相色谱: 检测分析用 HPLC 法(DIONEX P680 泵; Agilent 1100 示差折光检测器; SUGAR SH1011 色谱柱; 流动相为 0.01 mol/L H₂SO₄、1 mL/min; 柱温 50°C)。

1.2.5 常规基因克隆操作方法

大肠杆菌感受态制备, 外源基因片段与载体连接, 简易转化操作, 大肠杆菌质粒快速提取, 酵母基因组 DNA 制备等操作参见文献[10]。

1.2.6 质粒构建

以 pXY212-XYL2 为基础载体, 该质粒还有酵母 TPI 启动子, 木糖醇脱氢酶基因 XYL2, 不含潮霉素抗性片段。由于转化子要进行抗性筛选, 必须在该质粒中添加潮霉素抗性片段。具体质粒构建见图 3。

1.2.7 潮霉素 B 的敏感测定

收集热带假丝酵母菌体, 双蒸水洗涤两次后悬浮, 30°C 进行饥饿培养 2~3 h。培养后的细胞经适当稀释后涂布于含不同浓度潮霉素 B 的 YEPD 平板, 30°C 培养 3~4 d, 观察生长情况。

1.2.8 转化方法

酵母转化采用电穿孔转化法, 转化后涂布于含潮霉素抗性的 YEPD 平板, 挑选阳性转化子。

1.2.9 细胞裂解液的制备

接种划线分离的酵母转化子单菌落挑入 50 mL YEPX 液体培养基, 30°C, 200 r/min 摇床培养至静止期。离心收集菌体, 用磷酸钾缓冲液洗涤一次, 离心后用适量柠檬酸缓冲液重悬菌体。用超声破碎仪(VCX400 系列)破碎 5 min (工作 1 s 停 5 s), 破壁后高速离心, 上清液即为细胞裂解物, 用于酶活测定。

1.2.10 木糖醇脱氢酶酶活测定^[11]

木糖醇脱氢酶需要 NAD⁺作为辅助因子, 催化木糖醇生成木酮糖以及 NADH, 由于 NADH 在 340 nm 有最大吸收峰, 故可通过测量单位时间内酶催化反应体系在 340 nm 处吸光度的增量从而计算出木糖醇脱氢酶的酶活。酶活单位定义为 25°C 时, 每分钟还原 1 μmol 的 NAD⁺ 所需的酶量。

以牛血清蛋白为标准样, 用 Bradford^[12] 法测定蛋白含量。

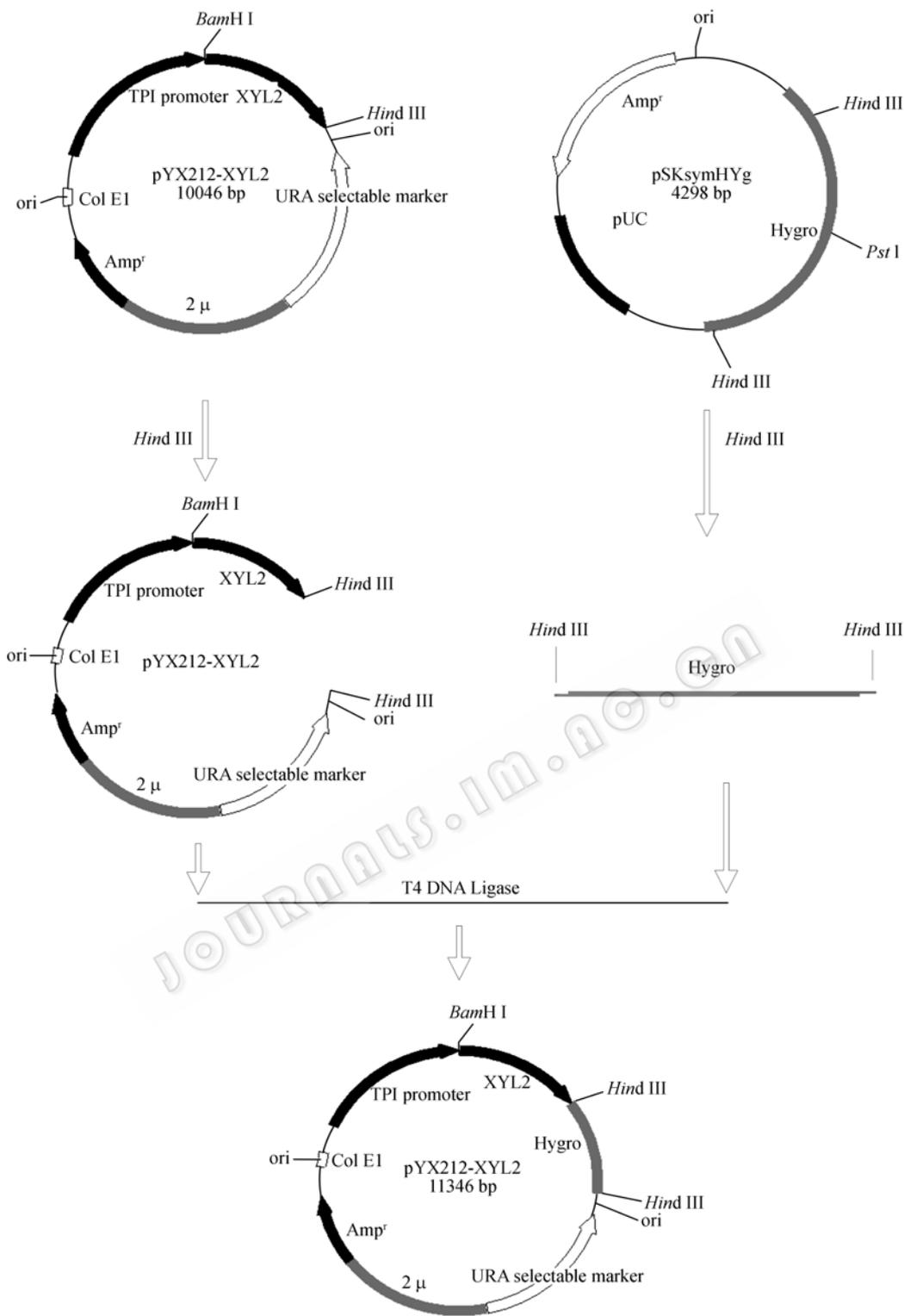


图3 表达载体 pYX212-XYL2-Hygro 的构建
 Fig.3 Construction of the expression vector pYX212-XYL2-Hygro

2 结果与分析

2.1 酵母的分离筛选

从自然界中筛选出 256 株典型酵母菌, 其中 61

株能够以木糖作为唯一碳源生长。逐一经摇瓶发酵初筛, 以利用木糖利用效率为指标进一步复筛。对多个批次的酵母反复比较之后, 确定一株编号为 441-28-1 的菌株能高效利用木糖。

2.2 分类鉴定

2.2.1 形态与生理生化特征

菌株 441-28-1 有典型的酵母菌落形态, 细胞短卵形至球形, 多边芽殖, 所表现出的形态及生理生化特征(表 1)与文献[9]的相同。

2.2.2 分子生物学特征

ITS 区域核酸序列的相似性, 已经作为确定酵母菌分类地位的重要分子生物学依据。对核酸序列

数据库进行同源序列搜索的结果表明, 菌株 441-28-1 ITS 的核酸序列, 与数据库中已有的 (*Candida tropicalis*) 中序列号为 EF196807 核酸序列相似性达到了 98%。生理生化特征及其分子生物学特征均表明, 菌株 441-28-1 的分类地位应属于 *Candida tropicalis*。在中国高校工业微生物资源数据平台保藏编号为 CICIM Y0092, 它的 ITS rDNA 基因的核苷酸序列, 在 GenBank 的登记号为 EU121523。

表 1 菌株 441-28-1 的生理与生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of 441-28-1 isolate

Nitrogen-carbon sources	Utilization	Nitrogen-carbon sources	Utilization	Nitrogen-carbon sources	Utilization
Glucose	+	D-mannose	+	Galactitol	-
L-Sorbose	+	Galactose	+	Adonitol	-
Maltose	+	Lactose	-	Glycerol	+
Trehalose	+	Sucrose	+	D-sorbitol	+
Melibiose	-	L-rhamnose	-	Erythritol	-
Melezitose	-	D-xylose	+	DL-lactic acid	+
Soluble Starch	+	Cellobiose	+	Citric acid	-
L-arabinose	-	Inulin	-	Succinic acid	+
D-arabinose	-	Methanol	-	Potassium nitrate	-
Raffinose	-	Ethanol	+	Urea	+
D-ribose	-	Inositol	-		

2.2.3 *C. tropicalis* CICIM Y0092 代谢产物分析

从图 4 可以看出, 该株酵母菌代谢木糖的主要产物为木糖醇, 并产生微量的酒精。说明该菌株具备酒精代谢途径。

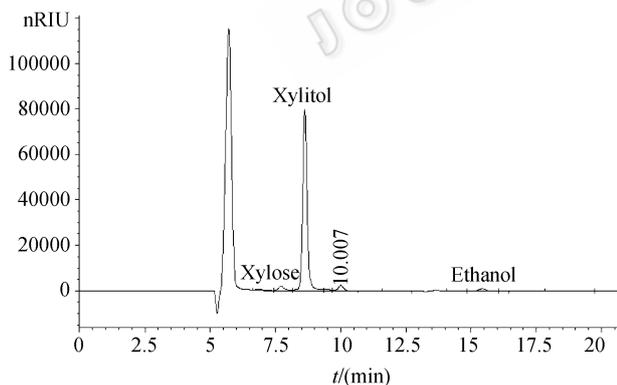


图 4 *Candida tropicalis* CICIM Y0092 木糖发酵液相图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of the broth from *Candida tropicalis* CICIM Y0092

2.3 代谢工程育种

通过分析木糖代谢产物以及代谢途径可知, 中间产物木糖醇积累, 代谢流不能很好地向下进行, 可能是导致酒精产率低的原因。因此, 以筛选到热带假丝酵母为出发菌株, 增加细胞内木糖醇脱氢酶

的表达量, 试图将代谢流引向乙醇形成方向, 以达到提高乙醇产量的目的。

2.3.1 质粒构建

用 *Hind* III 酶切 pSKsymHyg 质粒, 获得 1.3 kb 的 Hygro 片段和 2.9 kb 的质粒片段。电泳后胶回收 1.3 kb 的 Hygro 片段。将该片段与 *Hind* III 酶切 pYX212-XYL2 质粒相连接, 获得片段大小为 11 kb 的质粒 pYX212-XYL2-Hygro。

2.3.2 质粒酶切验证

将表达载体 pYX212-XYL2-Hygro 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 应释放出不含启动子的 1.7 kb 的 XYL2 片段, 1.3 kb 的潮霉素抗性片段, 以及 8.3 kb 的 pXY212 片段。电泳结果与分析结果相同, 证明质粒构建成功。

2.3.3 潮霉素敏感性实验

酵母能表达细菌抗生素的抗性基因, 它对 β -内酰胺和其他类似青霉素的抗生素不敏感, 但对于氨基糖苷类抗生素敏感, 如潮霉素 B, 艮他毒素(G418) 抗性。菌株对潮霉素的抗性与 pH 相关。试验比较发现, 当 pH 8.0 的时候, 酵母的生长情况与 pH 7.0, 相

差不多;但对潮霉素 B 的最低抑菌浓度下降为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 仅需 pH 7.0 下的 40%。在 pH 8.0 的条件下, 可以提高敏感度, 降低药物使用剂量。

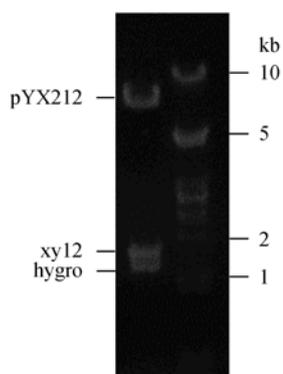


图 5 重组表达载体 pYX212-XYL2-Hygro 的酶切验证
Fig. 5 Restriction enzyme analysis of recombinant expression vector pYX212-XYL2-Hygro

表 2 热带假丝酵母对潮霉素 B 的最低敏感浓度
Table 2 Hygromycin B inhibition concentration of industrial *C. tropicalis*

Strain	Hygromycin B inhibition concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
<i>C. tropicalis</i>	pH 7.0	pH 8.0
	250	100

2.3.4 木糖醇脱氢酶酶活的测定

将重组载体 pYX212-XYL2-Hygro 电穿孔转化法转化进入野生型热带假丝酵母中, 通过潮霉素抗性平板筛选转化子, 重新划线分离后, 选取 *C. tropicalis* XYL2-1, *C. tropicalis* XYL2-7 测定酶活(表 3)。

表 3 重组子木糖醇脱氢酶比酶活
Table 3 Specific XDH activities of *C. tropicalis* and *C. tropicalis* transformants

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> XYL2-1	<i>C. tropicalis</i> XYL2-7
XDH/(u/mg protein)	0.13	0.3	0.5
Protein/(mg/mL)	6.76	2.13	2.4

从酶活测定可以看出, 原始菌株木糖醇脱氢酶(XDH)的比活为 0.13 u/mg 蛋白, 两个重组菌株 *C. tropicalis* XYL2-1 和 *C. tropicalis* XYL2-7 的酶活则分别达到 0.3 u/mg 蛋白、0.5 u/mg protein, 分别是原始菌株的 2.3 倍和 3.8 倍。

2.3.5 重组酵母与原始菌株发酵实验比较

热带假丝酵母 *C. tropicalis* 与重组酵母 *C. tropicalis* XYL2-7 进行发酵实验, 并对木糖醇, 乙醇

生成情况进行对比。

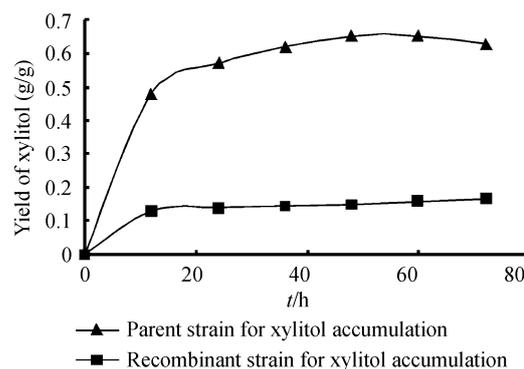


图 6 木糖醇得率曲线
Fig. 6 Xylitol yield curves

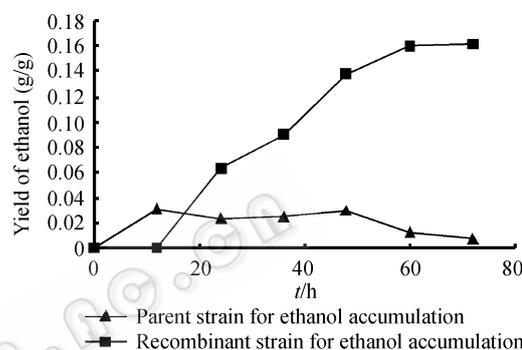


图 6 乙醇得率曲线
Fig. 6 Ethanol yield curves

从上图可以看出, 原始菌株木糖代谢的主要产物是木糖醇, 木糖醇得率为 0.6 g/g, 同时产生微量的乙醇, 乙醇得率为 0.03 g/g。重组菌株与原始菌株相比, 木糖醇积累量只有原始菌株的 10%, 木糖醇得率仅为 0.17 g/g, 乙醇生成量是原始菌株的 2 倍, 乙醇得率为 0.16 g/g, 提高了 5 倍。

上述实验表明增加了细胞内木糖醇脱氢酶的表达量重组菌株, 能够明显减少木糖醇的积累量, 同时乙醇得率也有了一定的提高。

3 讨论

以纤维质农业废弃物为原料生产乙醇, 其关键之一就是具有能有效利用各种糖底物, 且高效产生乙醇的微生物菌种。由于这样的菌种在自然界中并不存在, 所以人们转向利用代谢工程原理, 通过分子遗传改造相关菌株来获得能在厌氧条件下高效代谢发酵葡萄糖、木糖及其他各种戊糖的工程菌株^[13]。

本文从自然界中筛选出一株能高效利用木糖,

大量积累中间代谢产物木糖醇, 并产生微量乙醇的酵母, 菌落外观、细胞形态、生理生化特征及其分子生物学特征均表明, 菌株 441-28-1 的分类地位应属于 *C. tropicalis*。在中国高校工业微生物资源数据平台保藏编号为 CICIM Y0092, 它的 ITS rDNA 基因的核苷酸序列, 在 GenBank 的登记号为 EU121523。

以 *C. tropicalis* CICIM Y0092 为出发菌株, 采用代谢工程育种策略, 增加细胞内木糖醇脱氢酶的表达量, 试图使代谢流流向乙醇形成方向, 以提高酒精产量。实验结果表明, 重组菌株 *C. tropicalis* XYL2-1 和 *C. tropicalis* XYL2-7 木糖醇脱氢酶的比酶活比原始菌株分别提高了 2 倍、3 倍, 说明木糖醇脱氢酶基因在 *C. tropicalis* 中成功的得到了表达; 发酵实验表明重组菌株 *C. tropicalis* XYL2-7 的中间代谢产物木糖醇积累明显减少了, 木糖醇的得率降低了 70%, 同时乙醇产量有了一定的提高。

本文以从自然界筛选出的野生酵母为出发菌株, 在国内首次尝试将天然底物利用策略应用到酵母中, 并达到了预期效果, 即木糖醇积累明显减少, 乙醇的产量也有了一定的提高。初步证明了天然底物利用策略在酵母基因工程菌构建中的可行性。由于 pYX212-XYL2-Hygro 质粒是游离于染色体外存在的, 在没有选择压的情况下, 质粒很容易丢失。进一步的工作将通过做外源木糖醇脱氢酶基因在 *Candida tropicalis* 染色体上多拷贝整合, 以获得稳定的重组菌。本文构建的菌株乙醇产量虽有所提高, 但提高幅度有限, 可以在本文构建的菌株的基础上深入研究中间代谢产物积累与酒精积累之间的关系, 并确定其它可能的限速因素, 如木酮糖激酶, 辅酶^[14] (NAD⁺和 NADPH 之间的平衡) 等对酵母木糖代谢的影响, 最终解决由于中间代谢产物的积累而导致乙醇产量较低的问题。这对于利用纤维质农业废弃物生产燃料乙醇具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] Hong JH, Zhang L, Shi GY, *et al.* Construction of recombinant yeast strain using cellobiose as sole carbon source. *Chin J Appl Environ Biol*, 2006, **12**(3): 391–394. 洪剑辉, 张梁, 石贵阳, 等. 利用纤维二糖的酵母工程菌构建. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(3): 391–394.
- [2] Zhang L, Shi GY, Wang ZX, *et al.* Ethanol fermentation from cellulose by expression of cellobiase gene and disruption of *GPD 1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J*

Northwest Sci Tech Univ of Agri and For (Nat Sci Ed), 2006, **34**(10): 164–177.

- 张梁, 石贵阳, 王正祥, 等. 酿酒酵母 *GPD1* 中整合表达纤维二糖酶基因用于纤维素酒精发酵的研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, **34**(10): 164–177.
- [3] Jeewon L. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol*, 1997, **56**: 21–24.
- [4] Lisbeth O, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **18**: 312–331.
- [5] Gefferies TW. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeast. *Adv Appl Microbiol*, **47**: 222–268.
- [6] Guo T, Liang DF, Bao XM. Establishment and ethanol fermentation of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Sugarcane and Canesugar*, 2007, **3**: 26–29. 郭婷, 梁达奉, 鲍晓明. 工业酿酒酵母木糖代谢途径的建立以及酒精发酵初步研究. 甘蔗糖业, 2007, **3**: 26–29.
- [7] Pitkanen JP, Rintala E, Aristidou A, *et al.* Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**: 827–837.
- [8] Qu YB. Industrialization of cellulosic ethanol. *Progress in Chemistry*, 2007, **19**(7): 1098–1108. 曲音波. 纤维素乙醇产业化. 化学进展, 2007, **19**(7): 1098–1108.
- [9] Barnett JA, Payne RW. Characteristics and Identification. Qingdao: Qingdao Ocean university Press, 1991. 巴尼特 JA, 佩恩著 RW. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [10] 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, 1998.
- [11] Ehrensberger AH, Elling RA, Wilson DK. Structure guided engineering of xylytol dehydrogenase cosubstrate specificity. *Structure*, 2006, **14**: 567–675.
- [12] Frederick MO, Robert EK, *et al.* Short Protocol in Molecular Biology. Translated by: Yan ZY, Wang HL. Bei Jing: Science Press, 1998. 奥斯博 FM, 金士顿 RE, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [13] Liu WF, Zhang XM, Chen GJ, *et al.* Metabolic engineering for improving ethanol fermentation of xylose by yeasts and bacteria. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2006, **6**(1): 138–143. 刘巍峰, 张晓梅, 陈冠军, 等. 木糖发酵酒精代谢工程的研究进展. 过程工程学报, 2006, **6**(1): 138–143.
- [14] Hou J, Shen Y, Bao XM. Research progress in cofactor engineering of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *China Biotechnology*, 2006, **26**(2): 89–94. 侯进, 沈煜, 鲍晓明. 酿酒酵母木糖代谢工程中辅酶工程的研究进展. 中国生物工程杂志, 2006, **26**(2): 89–94.