

利用木质纤维素类生物质发酵生产乙醇重组菌株研究进展*

何明雄^{1,2} 祝其丽^{1,2} 潘科^{1,2} 胡启春^{1,2**}

(¹农业部沼气科学研究所生物质能技术研究中心 成都 610041)

(²农业部能源微生物与利用重点开放实验室 成都 610041)

摘要 要实现木质纤维素类生物质的有效利用,当前还面临很多瓶颈问题亟待解决,而缺乏能够同时高效利用纤维素类水解物的发酵菌株是制约纤维素乙醇生产的最关键因素。目前对发酵菌种的研究主要集中在酿酒酵母、运动发酵单胞菌、大肠杆菌和克雷白氏杆菌这4种菌上,已取得大量研究进展,为纤维素乙醇的产业化奠定了一定的基础。本文综述了这4种菌发酵纤维素水解物的基因工程改造研究进展,并对组学时代进一步优化发酵菌株进行了展望。图2表2参51

关键词 木质纤维素; 生物质; 燃料乙醇; 酿酒酵母; 运动发酵单胞菌; 大肠杆菌; 克雷白氏杆菌

CLC Q936 : TK6

Progress in Ethanol Production with Lignocellulosic Biomass by Different Recombinant Strains*

HE Mingxiong^{1,2}, ZHU Qili^{1,2}, PAN Ke^{1,2} & HU Qichun^{1,2**}

(¹Research Centre of Biomass Energy Technology, Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China)

(²Key Laboratory of Energy Microbiology and Application, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China)

Abstract Ethanol fermentation with lignocellulosic biomass involves significantly great challenges, owing to lack of industrially suitable microorganisms for converting cellulose hydrolysates into fuel ethanol, which has traditionally been considered as a major technical roadblock to the development of bioethanol industry. Currently, different recombinant strains have been engineered to produce ethanol from lignocellulosic biomass. The greatest successes have been made in the engineering of *Saccharomyces cerevisiae* and some other bacteria, including *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Zymomonas mobilis*, which provide a basis for constructing industrially suitable engineered strains for cellulose ethanol industrialization. This review summarizes recent progress in this filed, and also prospect it in the Omic era. Fig 2, Tab 2, Ref 51

Keywords lignocellulose; biomass; bioethanol; *Saccharomyces cerevisiae*; *Zymomonas mobilis*; *Escherichia coli*; *Klebsiella oxytoca*

CLC Q936 : TK6

以木质纤维素为原料的第二代生物质燃料开发既是全球研发的热点也是难点。欧盟国家和美国的中长期生物质能源发展路线图中均将木质纤维素生产燃料乙醇作为2010年后生物质燃料产业化的主要目标,但是目前整体水平尚处于中试阶段。我国的纤维素类生物质原料非常丰富,将其转化成燃料乙醇有着很大的潜力,但当前要想实现工业化生产,还面临着很多瓶颈问题亟待解决,主要体现在:1)对于原料的生物质能转化特性和转化机制尚缺乏充分的基础研究;2)还没有形成高效的组分分离技术(预处理技术);3)生物炼制技术尚处于起步阶段,还需要大量基础性实验和理论研究。4)缺乏能够同时高效利用纤维素类水解物(主要为葡萄糖和木糖混合物)的发酵菌株,这是制约纤维素乙醇生产的关键因

素^[1]。李科等对木质纤维素生物质制取乙醇的预处理、酶解和发酵等三大关键制约因素进行了较为全面的综述,为木质纤维素生产乙醇提供了新的研究思路^[2],在此不再赘述。孙宪昀等就国内外对青霉菌木质纤维素降解酶系研究的最新动态,包括菌株的选育、纤维素酶系的特性与合成调控,以及基因分析与克隆等方面对木质纤维素的生物降解进行了综述^[3]。本文主要针对高效利用纤维素水解物的重组发酵菌株这一关键因素进行探讨。

目前对于利用木质纤维素生产乙醇的菌种研究主要集中在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)等。在乙醇工业中通常使用酿酒酵母来发酵生产乙醇,但酿酒酵母不能发酵大量存在于纤维素水解物中的五碳糖;革兰氏阴性细菌运动发酵单胞菌由于其本身所具有的优点也被作为一种候选的燃料乙醇生产菌株,但也不能直接发酵五碳糖。所以研究者一直致力于通过基因工程的手段来解决发酵菌株对

收稿日期: 2008-12-12 接受日期: 2009-03-02

*中国农业科学院科技经费项目(2009)资助 Supported by the Sci & Tech Project of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (2009)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: Qichun204@163.com)

五碳糖(特别是木糖)的发酵问题,大肠杆菌和克雷白氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*)由于具有较宽的底物利用范围引起了研究者的关注. 本文主要对这几种目前用于木质纤维素生物质发酵产生乙醇的菌种进行较为全面的综述.

1 重组酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

传统的乙醇发酵生产菌株酿酒酵母由于缺少木糖利用的最初代谢途径,不能直接利用木糖,而只能利用其异构体——木酮糖. 自然界中由木糖转化为木酮糖的代谢途径有2条(图1). 在真菌中,木糖通过木糖还原酶(Xylose reductase, XR或XYL1)和木糖醇脱氢酶(Xylitol dehydrogenase, XDH或XYL2)的共同作用来完成木糖到木酮糖的代谢转化过程;而在细菌中,则是通过木糖异构酶(Xylose isomerase, XI)一步转化为木酮糖^[4]. 目前主要通过以下2种思路构建直接利用木糖的重组酵母菌: 1) 将来自木糖利用酵母(目前主要是*Pichia stipitis*)的XR和XDH基因在酿酒酵母中表达; 2) 将来源于细菌的木糖异构酶(XI)在酿酒酵母中表达.

1.1 XR-XDH代谢途径的运用

将毕赤酵母的木糖还原酶基因XYL1和木糖醇脱氢酶基

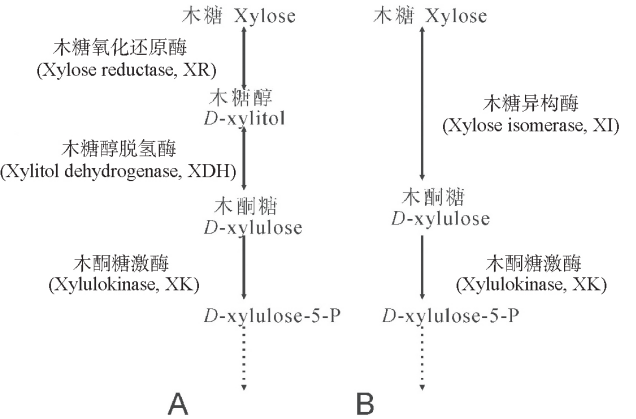


图1 真菌(A)和细菌(B)中的木糖代谢途径
Fig. 1 Metabolic pathway of xylose in fungus (A) and bacterium (B)

因XYL2克隆到酿酒酵母中,转化子能在以木糖为唯一碳源的培养基上缓慢生长,但所利用的木糖全部被氧化形成木糖醇,乙醇产率相当低^[5]. 将木酮糖激酶基因XKS1 (XYL3)克隆到已含有XYL1和XYL2基因的酿酒酵母转化子中,可使木糖醇的产率降低,乙醇产率明显提高^[6, 7]. 副产物木糖醇的形成原因可能是木糖代谢途径下游不畅及氧化还原不平衡,目前也通过改变下游代谢途径的氧化还原平衡来增加乙醇的产率^[8, 9]. 另一方面也可通过敲出某些关键基因(如GRE3等)^[10]来实现这一目标. 国内袁振宏和杨秀山等也通过代谢途径过程构建了重组木糖利用酵母,并就木糖运输途径的改造、木糖代谢途径的引入、增强其对发酵抑制剂的耐受性等方面进行了全面综述,提出了酿酒酵母的木糖代谢工程还有待于进一步深入研究^[11].

此外, Walfridsson等在木糖酵母中超表达磷酸戊糖途径的转酮酶(Transketolase, TKL)和转醛酶(Transaldolase, TAL)可以增加木糖转化为乙醇的量^[12]. 目前较为成熟的菌种有*S. cerevisiae* TMB3400、*S. cerevisiae* RWB218和*S. cerevisiae* RE700A (pKDR)等(表2).

1.2 细菌XI代谢途径的运用

多种细菌来源的XI被引入酿酒酵母中^[13], 沈煜等也将来源于嗜热细菌*Thermus thermophilus*的木糖异构酶基因xylA引入酿酒酵母^[14], 但来源于*Piromyces* sp.的XI所得到的活性最高^[15], 只有通过适应性进化^[16]或其他的遗传改造^[17]方能使其代谢木糖的能力得到提高. 从整体上看,采用细菌木糖代谢途径还存在着重组酶表达活性较低和细菌木糖异构酶的最适反应温度与发酵温度不同等问题,也有研究者通过突变的方式来解决这一问题. 并且该途径与XR-XDH的发酵比较研究表明,采用XR-XDH代谢途径所构建的重组菌株*S. cerevisiae* TMB3400较细菌XI代谢途径发酵效率高,且在发酵纤维素水解物时没有副产物木糖醇的生成^[13].

1.3 细胞表面展示技术的应用

近年来发展起来的酵母表面展示技术也被用于构建酵母基因工程菌上,如Yasuya Fujita等应用酵母展示系统展示

表1 纤维素水解酶基因和五碳代谢途径相关基因在运动发酵单胞菌中的表达
Table 1 Expression of cellulase gene and pentose metabolic pathway of *Z. mobilis*

底物 Substrate	基因 Gene	基因来源 Source of gene	参考文献 Reference
纤维素 Cellulose	内切葡聚糖酶 Endoglucanase	菊欧文菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>	[21]
	内切葡聚糖酶 Endoglucanase	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	
	内切葡聚糖酶 Endoglucanase	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	β -(葡萄糖)糖苷酶 β -glucosidase	白纹黄单胞菌 <i>Xanthomonas albilineans</i>	
	羧甲基纤维素酶 Carboxymethyl cellulase	醋酸杆菌 <i>Acetobacter xylinum</i>	
木糖 Xylose	木糖异构酶 Xylose isomerase	野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	[27]
	木酮糖激酶 Xylulokinase		
	透明质酸酶 Alidase		[28]
	木糖异构酶 Xylose isomerase		
	木酮糖激酶 Xylulokinase	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	
阿拉伯糖 (Arabinose)	转二羟丙酮基酶 Transaldolase	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	[25]
	酮糖转移酶 Transketolase		
	L-阿拉伯糖异构酶 L-arabinose isomerase		
	核酮糖激酶 Ribulokinase		
	转二羟丙酮基酶 Transaldolase		
	5-磷酸核酮糖异构酶 5-phosphoribuose isomerase		
	酮糖转移酶 Transketolase		

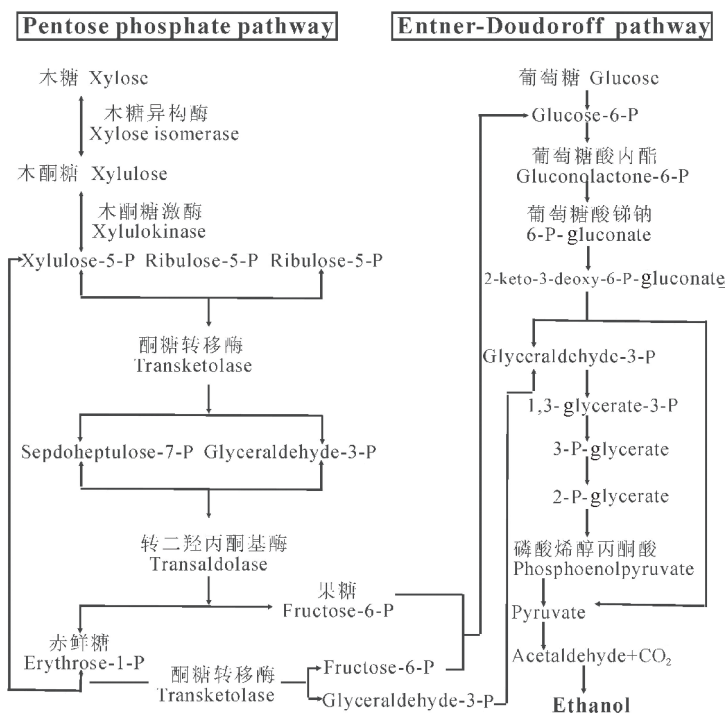


图2 运动发酵单胞菌戊糖代谢途径的构建
Fig. 2 Construction of metabolic pathway of pentose in *Z. mobilis*

两种纤维素酶, 构建了一株不经过前处理而直接发酵 β -葡聚糖生产乙醇的重组酵母菌基因工程菌, 通过此系统构建的重组酵母工程菌, 糖化作用和发酵同时发生, 在以 β -葡聚糖为唯一碳源的培养基中, 能在50 h直接发酵45 g β -葡聚糖生产乙醇16.5 g/L^[18]. Hisayori Shigechi等应用酵母展示系统展示葡萄糖糖化酶和 α -淀粉酶, 成功构建了一株能直接利用玉米淀粉发酵生产乙醇的酵母基因工程菌, 在72 h内, 该菌株能生产乙醇61.8 g/L, 达到其理论产量的86.5%^[19]. 侯进等也利用利用 α -型酿酒酵母表面展示系统的载体将来源于嗜热细菌*Thermus thermophilus*的木糖异构酶基因*xylA*在酿酒酵母H158中表达, 得到了一株木糖利用率提高17.18%的重组菌株H158-SXI^[20].

2 重组运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)

运动发酵单胞菌最早发现于非洲等热带地区的果酒中. 19世纪50年代早期, 人们发现运动发酵单胞菌在厌氧条件下主要通过ED途径代谢葡萄糖, 它可以发酵葡萄糖、果糖、蔗糖等六碳糖产乙醇, 但不能利用五碳糖生产乙醇. 迄今为止, 运动发酵单胞菌是唯一一种通过ED途径厌氧发酵葡萄糖的微生物, 其独特的代谢途径使其成为构建产乙醇工程菌的优选宿主之一. 多年来, 研究者已就其生理生化特性、菌种改造、遗传操作和发酵工艺学等方面作了大量的研究. 同酿酒酵母相比, 运动发酵单胞菌具有如下一些优点: 较高的糖吸收率, 较高的乙醇产率; 生物量少; 较高的乙醇耐受性等. 但该菌底物利用范围过窄, 一般野生型*Z. mobilis*菌株只能以葡萄糖、果糖和蔗糖作为生产乙醇的底物, 不能将复杂的碳水化合物代谢为乙醇. 为拓宽其底物利用范围, 研究者将其他

微生物中相关的水解酶基因如阿拉伯糖或者纤维素代谢的相关基因转移到*Z. mobilis*中, 使其具有利用其他底物的能力^[21](表1). 尽管如此, 该菌目前仍然没有商业化生产中得到应用, 但随着2005年其全基因组序列的公布^[22]和2006年杜邦公司宣布对该菌进行玉米秸秆燃料乙醇的研究^[23], 其产业化应用前景仍值得我们关注.

为拓展运动发酵单胞菌的底物利用范围, 研究者前期也进行了大量的工作, 如将来自菊欧文菌(*Erwinia chrysanthemi*)的内切葡聚糖酶基因、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的内切葡聚糖酶基因、醋酸杆菌(*Acetobacter xylinum*)的羧甲基纤维素酶基因和野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)的木糖代谢相关基因^[21]. 这些工作为构建能直接发酵木糖的重组运动发酵单胞菌奠定了基础. 美国可再生能源实验室Zhang等基于前人的研究结果, 通过同时表达来自大肠杆菌的木糖异构酶(XI)、木酮糖激酶(XK)、TKT和TAL(图2), 得到重组菌株*Z. mobilis* CP4 (pZB5), 该重组菌株能直接发酵木糖产生乙醇, 其乙醇产率为其理论值的86%^[24]; Deanda等又通过表达来自大肠杆菌阿拉伯糖代谢途径的5个基因, L-阿拉伯糖异构酶(*araA*)、核酮糖激酶(*araB*)、5-磷酸核酮糖异构酶(*araD*)、转二羟丙酮基酶(*talB*)和酮糖转移酶(*tktA*)基因, 得到了能直接发酵阿拉伯糖的重组菌株*Z. mobilis* ATCC39678 (pZB206), 该重组菌株能直接发酵阿拉伯糖(25 g/L)生产乙醇, 达其理论产率的98%^[25]; Rogers等将质粒pZB5转入ATCC31281(ZM4)中, 得到重组菌株ZM4(pZB5), 在发酵葡萄糖和木糖混合糖产乙醇时显示出了比CP4 (pZB5)更高的乙醇耐受性^[26]. 但这些菌种有一个共同的缺点, 就是其木糖代谢基因在质粒载体中, 因此不得不在培养基中加入一定量的抗生素, 以防止质粒的丢失, 这将导致生产成本

表2 4种重组菌株发酵木糖产乙醇的比较
Table 2 Comparison of four recombinant strains for ethanol production from xylose

重组菌株 Recombinant strain	木糖 Xylose ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	乙醇产率 Ethanol yield ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	理论产率 Theoretical yield ($r/\%$)	References 参考文献
<i>E. coli</i> KO11	90	41.0	89	[44]
<i>E. coli</i> FBR5	95	41.5	90	[36]
<i>E. coli</i> LY01	140	63.2	88	[44]
<i>K. oxytoca</i> M5A1 (pLOI555)	100	46.0	95	[41]
<i>Z. mobilis</i> AX101	Ara : Glc : Xyl 20 : 40 : 40	42	84	[29]
<i>Z. mobilis</i> CP4 pZB5	60	23.0	94	[45]
<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	50	13.3	67	[17]
<i>S. cerevisiae</i> RWB218	20	8.4	85	[17]
<i>S. cerevisiae</i> RE700A(pKDR)	45	19	74	[17, 46]

的增加。所以该研究小组又通过构建整合型表达载体,将木糖代谢和阿拉伯糖代谢相关基因整合于运动发酵单胞菌基因组上,得到木糖发酵菌株和阿拉伯糖发酵菌株 *Z. mobilis* ATCC39676 (AX101),该工程菌能共发酵葡萄糖、木糖和阿拉伯糖,优先利用葡萄糖,其次为木糖,最后利用阿拉伯糖^[29]。为提高该菌对木糖的利用效率,Jeon等还通过增加木酮糖激酶基因(XK)的表达水平,但未能得到预期结果。

3 重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)

大肠杆菌等具有较广的底物利用范围,可以代谢六碳糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖和果糖)、五碳糖(木糖和阿拉伯糖)以及糖醛酸(半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸)生成代谢中间产物——丙酮酸。大肠杆菌的糖代谢途径和生理机制比较复杂,六碳糖主要经糖酵解途径代谢,五碳糖主要是通过磷酸戊糖途径并与ED途径相偶联进行代谢。一般情况下,发酵条件为pH=7.0,发酵温度为30℃或35℃。大肠杆菌糖代谢的复杂性决定了它的代谢产物的复杂性,其代谢产物包括一些醛类、醇类和有机酸,乙醇并不是其主要的代谢产物,只是其中很小的一部分,因此传统上一般不用它来生产乙醇。但是大肠杆菌含有代谢五碳糖的磷酸戊糖途径中的整套基因和酶,因此在木糖发酵和混合糖发酵产乙醇的研究中也有一定的研究价值。大肠杆菌缺少高活力的乙醇产生酶系,而且在糖酵解过程产生的副产物较多。在20世纪80年代,Ingram等利用运动发酵单胞菌中的高活力丙酮酸脱氢酶(pdc)和乙醇脱氢酶基因(adhB)构建了PET操纵子——pLOI297,并将该操纵子导入大肠杆菌中表达,结果大肠杆菌工程菌株能发酵葡萄糖产生乙醇^[30];为寻找更适合的宿主菌,Ingram等通过对9种不同大肠杆菌工程菌株的乙醇耐受性、质粒稳定性和乙醇产率等方面的比较研究发现, *E. coli* ATCC11303 (pLOI297)为最理想的菌株^[31];Beall等对ATCC11303 (pLOI297)进行了发酵评估^[32];为提高工程菌的遗传稳定性,Ingram研究组又将这2个基因整合至大肠杆菌ATCC 11303染色体Pyruvate formate lyase (*pfl*)基因位点上,但该重组菌株乙醇产率较质粒型ATCC11303 (pLOI297)菌株低,通过高浓度氯霉素抗性筛选,得到乙醇产率较高的菌株;为了进一步提高该菌株的乙醇产量,通过将琥珀酸合成途径中的延胡索酸合成酶*frd*基因打断,阻断琥珀酸的合成,提高了乙醇产量,该菌株被定名为*E. coli* KO11^[33]。研究表明,在厌氧条件下, *E. coli* KO11可发酵半纤维素水解产物中几乎所有的糖生产乙醇,其乙醇生产能力较高,并且对木质纤维素水解产物中的抑制剂具有

相对高的耐受性。对KO11的基因芯片分析结果表明,在KO11中,大部分与木糖代谢相关的酶基因表达水平较出发菌株高,其中木糖异构酶基因(*xylA*)的表达水平是出发菌株的3倍多,木酮糖激酶(*xylB*)是出发菌株的2倍多^[34]。Dien等还通过突变大肠杆菌*pfl*和*ldh*基因,然后将质粒pLOI297转化该宿主菌,得到FBR5菌株,并对其进行了发酵研究^[35, 36]。Yomano等通过KO11的长期适应性进化研究,得到一株乙醇耐受性为10%的菌株LY01,该菌株使发酵140 g/L木糖的时间由120 h缩短为96 h^[37],并且对木质纤维素水解产物中的抑制剂具有比KO11相对高的耐受性^[38-40]。

4 重组克雷白氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*)

*K. oxytoca*是一种肠道细菌,具有较宽的底物利用范围,如己糖、戊糖、纤维二糖和纤维三糖等,特别是对纤维二糖的利用特点可减少纤维素酶的使用。但野生型的*K. oxytoca*发酵产物主要为有机酸。乙醇的形成主要通过PFL代谢途径。将PET操纵子转入*K. oxytoca* M5A1,发酵液中90%的发酵产物为乙醇,低拷贝质粒pLOI555比高拷贝质粒pLOI297具有更高的乙醇产率^[41];并且该菌株更适合木糖的发酵,其木糖代谢速率在前24 h与葡萄糖一样,达2 g/L/h,是KO11的2倍。该重组菌株与其他重组菌相比,具有最高的理论产率(表2)。同样,为提高PET操纵子的遗传稳定性,将其整合至*K. oxytoca* M5A1染色体Pyruvate formate lyase (*pfl*)基因位点上,但该重组菌株乙醇产率较低,通过高浓度氯霉素抗性筛选,得到乙醇产率较高的菌株^[42],其中菌株P2能在48 h内发酵葡萄糖(100 g/L)或纤维二糖(100 g/L),乙醇产率达44~45 g/L,与质粒型工程菌株基本一致。对P2菌株也进行了不同底物的发酵评估研究。Zhou和Ingram等还通过将来源于*E. chrysanthemi*的内切葡聚糖酶基因转入P2菌株中进行整合型表达,得到重组菌株SZ21,但其酶活性较低,为20 U/mL,仅为商业化酶的1%,其发酵纤维素的能力较低,但若加入一定的商业化纤维素酶,其乙醇产率较P2高7~16%左右^[43]。

5 展望

综上所述,目前对纤维素发酵的菌种进行了大量的工作,也得到了具有一定效率的重组菌株,但这些工作基本上是基于单个基因或是某个代谢途径的几个基因的改造,只是改变了细胞的局部,部分改变了细胞的代谢平衡,虽然得到了新的表型,但这种改变是有限的,并没有解决木糖代谢途径中的复杂问题,致使构建得到的重组菌株未能在商业化生

产中得到应用。因此,可以在木糖代谢途径的基因组层面上定向进化或同时改变多个相关基因群,使细胞在整体水平上适应木糖的代谢或利用。目前这些菌株的基因组序列已经测定,但在基因组水平上的菌种改造主要集中在酿酒酵母上。对重组木糖酵母的代谢组学和蛋白质组学已经展开,这对了解重组酵母的木糖代谢调控机制具有十分重要的意义^[47]。而毕赤酵母基因组序列的测定^[48],其基因组特点和基因调控模式等也会对构建工程酵母起重要作用;代谢建模、代谢流量分析、表达谱分析、突变和适应性进化等方法也为构建高效率的木糖发酵菌种提供了重要的方法学依据^[49];Alper通过gTME技术对酿酒酵母的改造工作为改造木糖酵母提供了有益的借鉴^[50],该技术在系统生物学的层面通过改造全局转录调控因子使整个转录调控过程发生变化从而改变或提高目标基因的转录及表达,获得需要的表型^[51]。随着基因组学、蛋白质组学、代谢组学、转录组学和生物信息学等方面的发展,在系统生物学的层次上进行乙醇发酵菌种的改造,从基因调控的水平上将新加入的代谢途径与原有的代谢途径协调,提高外源基因的表达水平,将会得到高效率的乙醇发酵菌种。

References

- Chen HZ (陈洪章) ed in chief. 秸秆资源生态高质化理论与应用. 北京: 化学工业出版社, 2006
- Li K (李科), Jin YL (靳艳玲), Gan MZ (甘明哲), Liu XF (刘晓凤), Zhao H (赵海). Progress in research of key techniques for ethanol production from lignocellulose. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (6): 877-884
- Sun XY (孙宪鸣), Qu YB (曲音波), Liu ZY (刘自勇). Progress in research of lignocellulose degrading enzymes from *Penicillium*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (5): 736-740
- Jeffries TW. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1983, **27**: 1-32
- Kötter P, Amore R, Hollenberg CP, Ciriacy M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Curr Genet*, 1990, **18**: 493-500
- Ho NW, Chen Z, Brainard AP. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 1852-1859
- Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, Hahn-Hagerdal B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3381-3386
- Jeppsson M, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 1604-1609
- Verho R, Londeborough J, Penttilä M, Richard P. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 5892-5897
- Träff KL, Otero Cordero RR, van Zyl WH, Hahn-Hagerdal B. Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xyIA* and *XKS1* genes. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 5668-5674
- Yuan ZH (袁振宏), Pan YP (潘亚平), Liu JK (刘继开), Yan YJ (颜涌捷), Yang XS (杨秀山). Construction of recombinant yeast converting xylose and glucose to ethanol. *Microbiology* (微生物学通报), 2006, **33** (3): 104-108
- Walfridsson M, Hallborn J, Penttilä M, Keranen S, Hahn-Hagerdal B. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 4184-4190
- Karhumaa K, Sanchez RG, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund M-F. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2007, **66**: 5 doi:10.1186/1475-2859-6-5
- Shen Y (沈煜), Zheng HJ (郑华军), Wang Y (王颖), Bao XM (鲍晓明), Qu YB (曲音波), Bai FW (白凤武). Effect of xylulokinase expression-level in the xylose-utilizing recombinant *Sacchaomyces cerevisiae* on the metabolic pathway of xylose. *Progr Biochem & Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2004, **31**: 746-751
- Kuyper MHH, Stave AK, Winkler AA, Jetten MS, de Laat, WT dRJ, Op den Camp HJ, van Dijken JP, Pronk JT. High level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res*, 2003, **4**: 69-78
- Kuyper MWA, Van Dijken JP, Pronk JT. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res*, 2004, **4**: 655-664
- Kuyper M HM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**: 399-409
- Fujita Y, Takahashi S, Ueda M. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes to ferment cellulose to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 5136-5141
- Shigechi H, Koh J, Fujita Y. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 5037-5040
- Hou J (侯进), Shen Y (沈煜), Bao XM (鲍晓明). Expression xylose isomerase on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface and its influence on xylose metabolism. *Chin J Bioproc Engin* (生物过程加工), 2006, **4**: 30-34
- Panesar PS, Marwaha SS, Kennedy JF. *Zymomonas mobilis*: An alternative ethanol producer. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, **81**: 623-635
- Seo JS, Chong H, Park HS, Yoon KO, Jung C, Kim JJ, Hong JH, Kim H, Kim JH, Kil JI, Park CJ, Oh HM, Lee JS, Jin SJ, Um HW, Lee HJ,

- Oh SJ, Kim JY, Kang HL, Lee SY, Lee KJ, Kang HS. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 63~68
- 23 Reisch MS. Fuels of the future. *Chem Eng News*, 2006, **84**: 30~32
- 24 Liu C, Goodman A, Dunn N. Expression of cloned *Xanthomonas* D-xylase catabolic genes in *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol*, 1988, **7**: 61~70
- 25 Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, **267**: 240~243
- 26 Deanda K, Zhang M, Eddy C, Picataggio S. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 4465~4470
- 27 Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995a, **267**: 240~243
- 28 Joachimsthal EL, Rogers PL. Characterization of a highproductivity recombinant strain of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, **84**: 343~356
- 29 Mohagheghi A EK, Chou YC, Zhang M. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **98**: 885~898
- 30 Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 2420~2425
- 31 Alterthum F, Ingram LO. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 1943~1948
- 32 Beall DS, Ohta K, Ingram LO. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **38**: 296~303
- 33 Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 893~900
- 34 Tao H, Gonzalez R, Martinez A, Rodriguez M, Ingram L, Preston JF, Shanmugam KT. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 2879~2988
- 35 Dien BS, Hespell RB, Wyckoff HA, Bothast RJ. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **23**: 366~371
- 36 Dien BS, Nichols NN, OBryan PJ, Bothast RJ. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, **84**: 181~196
- 37 Yomano LP, York SW, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, **20**: 132~138
- 38 Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **66**: 203~210
- 39 Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **65** (1): 24~33
- 40 Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **68**: 524~530
- 41 Ohta KBD, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanolproduction from xylose and glucose. *Appl Environ Microbiol*, 1991b, **57**: 2810~2815
- 42 Wood BE, Ingram LO. Ethanol-production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol-production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2103~2110
- 43 Zhou SD, Davis FC, Ingram LO. Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (celY) and CelZ (celZ) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 6~14
- 44 Yomano LPYS, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, **20**: 132~138
- 45 Lawford HG, Rousseau JD. The effect of glucose on hih-level xylose fermentations by recombinant *Zymomonas* in batch and fed-batch fermentations. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, **77~79**: 235~249
- 46 Sedlak M, Ho NWY. 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
- 47 Salusjärvi L, Kankainen M, Soliymani R, Pitkänen J-P, Penttilä M, Ruohonen L. Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2008, **7**: 18. doi:10.1186/1475-2859-1187-1118
- 48 Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Schmutz J, Lindquist E, Dehal P, Shapiro H, Jin YS, Passoth V, Richardson PM. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**: 319~326
- 49 Jeffries TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**: 320~326
- 50 Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**: 1565~1568
- 51 Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engin*, 2007, **9**: 258~267