

UdhA 和博伊丁假丝酵母 *xyII* 基因共表达对木糖醇发酵的影响

唐梅, 蔡松, 付声亮, 王金华, 王永泽* (湖北工业大学工业微生物教育部重点实验室, 湖北武汉 430068)

摘要 [目的]研究可溶性吡啶核苷酸转氢酶基因(*UdhA*)和醛糖还原酶基因(*xyII*)共表达对木糖醇发酵的影响。[方法]将来源于博伊丁假丝酵母醛糖还原酶 *xyII* 基因克隆到 pET28a(+) 上,并在 BL21(DE3) 中表达,通过 SDS-PAGE 对表达产物的分子量和酶活进行测定。随即将 *xyII* 基因连接 *lacP* 启动子,构建 pWYZ-2 质粒并将其转化到 *E. coli* AI07 菌株。进一步将来源于 *E. coli* W3110 的 *UdhA* 基因克隆到 pWYZ-2 质粒实现与 *xyII* 共表达,所构建 pWYZ-4 质粒转化到 *E. coli* AI07 菌株,比较了 *E. coli* AI07/pWYZ-2 和 *E. coli* AI07/pWYZ-4 木糖醇发酵结果。[结果]在 BL21(DE3)/pET28a(+) 体系诱导表达的醛糖还原酶分子量为 39 kD,木糖还原酶酶活为 3.30 U/mL。*E. coli* AI07/pWYZ-2 菌株发酵 48 h,木糖醇产量为 19.90 g/L;*E. coli* AI07/pWYZ-4 发酵 36 h,木糖醇产量达到 19.91 g/L,较菌株 AI07/pWYZ-2 生产强度提高了 33.25%。[结论]通过将 *UdhA* 基因与 *xyII* 基因进行共表达,提高了重组大肠杆菌(*E. coli* AI07/pWYZ-4)合成木糖醇的生产强度。

关键词 博伊丁假丝酵母;*xyII* 基因;*UdhA* 基因;共表达;木糖醇

中图分类号 Q812 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)01-0106-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.01.027

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The Effect of Co-expression of *UdhA* and *Candida boidinii xyII* Gene on Xylitol Fermentation

TANG Mei, CAI Song, FU Sheng-liang et al (Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068)

Abstract [Objective] The effect of co-expression of soluble pyridine nucleotide transhydrogenase gene (*UdhA*) and aldose reductase gene (*xyII*) on xylitol fermentation was investigated. [Method] *xyII* gene from *Candida boidinii* encoding aldose reductase was cloned into pET28a(+) and expressed in BL21(DE3). The enzyme molecular weight was detected by SDS-PAGE and enzyme activity was assayed. *xyII* gene was ligated to the *lacP* promoter for construction of plasmid pWYZ-2 and then the plasmid was transformed into *E. coli* AI07. The *UdhA* gene derived from *E. coli* W3110 was further cloned into pWYZ-2 plasmid to achieve co-expression with *xyII* for pWYZ-4 plasmid construction and then pWYZ-4 was transformed into *E. coli* AI07. *E. coli* AI07/pWYZ-2 was compared with *E. coli* AI07/pWYZ-4 for xylitol fermentation. [Result] The molecular weight of xylose reductase expressed in BL21(DE3)/pET28a(+) system was 39 kD, and the enzymatic activity of aldose reductase was 3.3 U/mL. The *E. coli* AI07/pWYZ-2 strain was fermented for 48 hours, the xylitol output was 19.90 g/L. *E. coli* AI07/pWYZ-4 was fermented for 36 hours, xylitol production reached 19.91 g/L, xylitol productivity of *E. coli* AI07/pWYZ-4 was 33.25% higher than that of strain *E. coli* AI07/pWYZ-2. [Conclusion] Xylitol productivity of recombinant *Escherichia coli* was improved using co-expression of *UdhA* gene and *xyII* gene.

Key words *Candida boydii*; *xyII* gene; *UdhA* gene; Co-expression; Xylitol

木糖醇广泛存在于各种果蔬食物中,含量却很低^[1],其应用范围广,且由于木糖醇在人体内的代谢与胰岛素无关^[2-3],故适用于生产糖尿病患者食品。近年来,木糖醇的市场需求不断扩大,国内木糖醇年产值已超过 13 亿元,预计今后国际市场上木糖醇总需求量将达 10 万 t 以上^[4]。

通过微生物发酵或者催化获得木糖醇正成为木糖醇合成的热点,醛糖还原酶(也称为木糖还原酶)作为生物合成法中的关键因子,主要存在于酵母和丝状真菌中^[4]。目前发现的醛糖还原酶都需要辅酶,其中一类是辅酶 NADH 依赖型,如来源于近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)^[5]的木糖还原酶;另外一类是辅酶 NADPH 依赖型,如来源于热带假丝酵母(*Candida boydii*)^[6]、埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*)^[7]和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)等^[8]微生物的醛糖还原酶。对于辅酶 NADPH 依赖型的木糖还原酶,要提高木糖醇的产量,需要更多的 NADPH 来满足酶催化的需要。

通常通过表达磷酸戊糖途径的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶编码基因 *zuf* 和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶编码基因 *gnd* 来强化

NADPH 的产出^[9];也有敲除 EMP 途径中编码磷酸果糖激酶的 *pfkA* 和 *pfkB* 基因,使碳源更多地流向磷酸戊糖途径,从而实现 NADPH 的供给^[10]。

可溶性吡啶核苷酸转氢酶能催化 NADH 和 NADPH 相互转化^[11],改变了细胞内 NADH/NAD⁺ 的比例。考虑到糖酵解途径不依赖氧气也能产生大量的 NADH,如果将这部分辅因子转化成 NADPH 形式,将为 NADPH 的供给提供一个新的途径。在前期产丙酮酸大肠杆菌工程菌构建的工作中,成功将大肠杆菌 W3110 自身的 *UdhA* 基因克隆到载体上,通过诱导表达发现,*UdhA* 的克隆有效地促进了丙酮酸发酵的生产强度^[12]。

考虑到博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)在木糖醇合成中也存在辅酶 NADPH 依赖的难题,笔者借鉴丙酮酸工程菌构建的结果,将博伊丁假丝酵母的醛糖还原酶基因 *xyII* 进行克隆、表达及酶活测定,并探讨可溶性吡啶核苷酸转氢酶 *UdhA* 和 *xyII* 共表达对木糖醇发酵的影响,以期为解决 NADPH 依赖型醛糖还原酶辅因子不足的问题提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒。所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 引物。引物序列列表 2,均由南京金斯瑞生物科技有

基金项目 国家“十二五”支撑计划项目(2012BAD27B03);山东创新计划项目(201720311004)。

作者简介 唐梅(1993—),女,湖北广水人,硕士,从事代谢工程及发酵技术研究。*通信作者,副教授,从事生物能源与生物材料研究。

收稿日期 2021-04-22

限公司合成。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Stains and plasmid

菌株和质粒 Strains and plasmid	相关特点 Relevant characteristic	来源 Source
<i>E. coli</i> W3110	Wild type	实验室保存
<i>E. coli</i> DH5 α	F^- , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA - argF</i>) <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk^- , mk^+), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	实验室保存
<i>E. coli</i> AI05	<i>E. coli</i> W3110, Δ <i>frdBC</i> Δ <i>ldhA</i> Δ <i>dackA</i> Δ (<i>focA</i> $-pflB$) Δ <i>adhE</i> Δ <i>ptsG</i> Δ <i>pdhR</i> :: <i>pflB - p6 -</i> (<i>aceEF-lpd</i>)	实验室保存
<i>E. coli</i> AI06	<i>E. coli</i> AI05, Δ <i>xyIA</i>	实验室保存
<i>E. coli</i> AI07	<i>E. coli</i> AI05, Δ <i>xyIA</i> Δ <i>xyIB</i>	实验室保存
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F^- <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm(DE3)</i>	实验室保存
pUC19	bla cloning vector	实验室保存
pBR322	bla cloning vector	实验室保存
pWYZ-1	pUC19- <i>lacZ</i> :: <i>lacP-xyII</i>	实验室保存
pET28a(+)- <i>xyII</i>	bla expression vector	该研究合成
pWYZ-2	pBR322- <i>Tcr</i> :: <i>lacP-xyII</i>	该研究合成
pWYZ-4	pBR322- <i>Tcr</i> :: <i>lacP-xyII-udhA</i>	该研究合成

表 2 引物及其序列

Table 2 Primers and sequences

序号 No.	引物 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence
1	pBR322- <i>lacP-xyII</i> P1	cttctgcttcaagaattctcatgt - caggttccgc- actggaag
2	pBR322- <i>lacP-xyII</i> P2	ttagc-gaggtgcgccggcttccat - ttaataaaat- gttgaatattgtaacccc
3	pBR322- <i>F-P1</i>	atggaagccggcggcaccctc
4	pBR322- <i>F-P2</i>	acatgagaattcttgaagac
5	UdhA-P1	ggagccaatcaattcttgcggagaa - atgccacat- tctcagatta
6	UdhA-P2	caagggttggtttgcgcatttcacag - ttaaaaca- ggcggtttaaac
7	pWYZ-2-P1	ctgtgaatgcccacaaccaac
8	pWYZ-2-P2	ttctccgcaagaattgattg
9	pET28a(+)-p-F-P1	ggatccgcggaccatttttgc
10	pET28a(+)-p-F-P2	ctcgaccaccaccaccacca
11	pET28a(+)- <i>xyII(AR)</i> -p1	ttaaagttaaagtggttgcattgacat - ggatccgcga- cccatttgc
12	pET28a(+)- <i>xyII(AR)</i> -p2	ttacaattttccaacattttatttaa - ctcgaccac- caccaccacca

1.1.3 主要试剂与仪器。主要试剂:木糖醇对照品(含量>99.9%), $2\times$ Taq polymerase, PrimerSTAR Max DNA Polymerase,其他试剂均为市售分析纯;主要仪器:e2695液相色谱、蛋白电泳仪、凝胶自动成像仪、PCR仪、电转仪。

1.1.4 培养基。LB液体培养基:酵母粉5g/L、蛋白胨1g/L、NaCl5g/L。抗性平板培养基:酵母粉5g/L、蛋白胨1g/L、NaCl5g/L、琼脂粉20g/L,根据用途加入50mg/L氨苄青霉素或者卡那霉素。摇瓶种子培养基:葡萄糖20g/L、木糖1g/L、酵母粉5g/L、蛋白胨1g/L、NaCl5g/L、氨苄青霉素50mg/L。摇瓶发酵培养基:葡萄糖20g/L、木糖20g/L、酵母粉5g/L。

1.2 方法

1.2.1 将 *xyII* 基因克隆到载体 pET28a(+)

(1)以质粒 pAG102 作为模板,采用引物 pET28a(+)-

xyII(AR)-p1 和 pET28a(+)-*xyII(AR)*-p2 扩增出理论长度为 1 016 bp 的 *xyII* 核酸序列。

(2)以 pET28a(+)-*xyII(AR)*-p1 和 pET28a(+)-*xyII(AR)*-p2 扩增出理论长度为 1 016 bp 的 *xyII* 核酸序列。

(3)采用 T5 外切酶^[13]的方法处理 *xyII* 核酸序列和 pET28a(+)-*xyII(AR)*-p1 线性化的核酸序列,处理后的产物用氯化钙法转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,30℃ 150 r/min 复苏 40 min 后取 100 μ L 菌液涂布于卡那抗性平板上,待卡那抗性平板上长出单菌落后,挑取单菌落提取重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司武汉分公司测序,将测序无误的重组质粒命名为 pET28a(+)-*xyII*。

(4)将重组质粒 pET28a(+)-*xyII* 采用氯化钙法转化到 *E. coli* BL21 中,得到菌株 BL21/pET28a(+)-*xyII*。

1.2.2 将 *xyII* 基因克隆到载体 pBR322。

(1)以质粒 pBR322 作为模板,采用反向引物 pBR322-*F-P1* 和 pBR322-*F-P2* 将 pBR322 线性化(线性化序列为除去 *tetP* 和 *Tcr* 部分的序列),得到理论长度为 3 094 bp 的核酸序列。

(2)以 pWYZ-1 质粒作为模板,设计引物 pBR322-*lacP-xyII* P1 和 pBR322-*lacP-xyII* P2,从 pWYZ-1 质粒上扩增出 *lacP-xyII* 核酸序列,大小为 1 168 bp。

(3)用 T5 外切酶的方法^[13]处理 *lacP-xyII* 核酸序列和 pBR322 载体线性化的核酸序列,处理后的产物用氯化钙法转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,30℃ 150 r/min 复苏 40 min 后取 100 μ L 菌液涂布于氨苄抗性平板上,待氨苄抗性平板上长出单菌落后,挑取单菌落提取重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司武汉分公司测序,将测序无误的重组质粒命名为 pWYZ-2。

(4)将重组质粒 pWYZ-2 采用氯化钙法转化到 *E. coli* AI07 中,得到菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-2。

1.2.3 将 *UdhA* 基因克隆到载体 pWYZ-2。

(1)以 pWYZ-2 质粒为模板,采用反向引物 pWYZ-2-P1 和 pWYZ-2-P2 将 pWYZ-2 线性化,得到理论长度为 4 212 bp 的核酸序列。

(2)以 *E. coli* W3110^[14]为模板,使用引物 UdhA-P1 和 UdhA-P2 扩增出理论长度为 1 401 bp 的 UdhA 核酸序列。

(3)用 T5 外切酶的方法将扩增出的 *UdhA* 核酸序列与 pWYZ-2 线性化的核酸序列进行外切处理,处理后的产物用氯化钙法转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,30℃ 150 r/min 复苏 40 min 后取 100 μ L 菌液涂布于氨苄抗性平板上,待氨苄抗性平板上长出单菌落后,挑取单菌落提取重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司武汉分公司测序,将测序无误的重组质粒命名为 pWYZ-4。

(4)将重组质粒 pWYZ-4 采用氯化钙法转化到 *E. coli* AI07 中,得到菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-4。

1.2.4 SDS-PAGE 分析粗酶液中重组蛋白的分子量。从甘油管中将菌株 BL21(DE3)/pET28a(+)-*xyII* 转接到固体平

板,于 37 ℃ 培养箱过夜培养;从卡那平板挑取单克隆 BL21 (DE3)/pET28a(+)-*xyII* 接种于含卡那的 50 mL LB 液体培养基中,于 37 ℃ 200 r/min 培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$,再将菌液温度降至 25 ℃ 以下,加入诱导剂 IPTG 至最终浓度为 1 mmol/L,25 ℃ 诱导 15 h,取 2 mL 菌液于 2 mL 离心管中,12 000 r/min 4 ℃ 离心 5 min,使用 1 mL 预冷的低盐 PBS 清洗菌体 3 遍。每管加入 1 mL 预冷的裂解液重悬细菌,冰浴超声 400 W,超 10 s 停 10 s,超声 10 min 直至变清,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清即为粗酶液作为样品进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 菌株 BL21(DE3)/pET28a(+)-*xyII* 表达产物的酶活测定。酶活测定参照张哲等^[10]的方法。对于醛糖还原酶,1 个酶活性单位(U)定义为在 35 ℃ 反应条件下 1 min 消耗 1 μmol NADPH 所需的酶量。

1.2.6 重组大肠杆菌摇瓶发酵试验。分别从甘油管将 *E. coli* AI07/pWYZ-2 和 *E. coli* AI07/pWYZ-4 菌株转接到氨苄抗性平板上,并转接数代;然后从抗性平板上挑取 3 个菌落到 50 mL 摇瓶种子培养基中。30 ℃ 200 r/min 过夜培养,然后按照 2% 接种量接种于含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 100 mL 发酵培养基中,30 ℃ 200 r/min 条件下进行发酵,当摇瓶中菌液 OD_{600} 达到 0.8~1.0 时,添加 0.1 mmol/L IPTG 开始诱导。每 12 h 向发酵摇瓶中补加氨苄青霉素 100 μL (100 mg/L);每 12 h 从摇瓶取出 2 mL 发酵液。

1.2.7 产物检测。用可见分光光度计测定“1.2.6”中取出的发酵液中菌的 OD_{600} 吸光值,用来评价菌的生物量。

将“1.2.6”中取出的发酵液 12 000 r/min 离心 5 min,取上清用超纯水稀释合适倍数后,用 0.22 μm 滤膜过滤。采用高效液相色谱 waters e2695 测定发酵液的木糖醇、D-木糖和葡萄糖。色谱柱为 Bio-Rad HPX 87H,检测器为示差检测器 (2414 RI Detector),流动相 4 mmol/L H_2SO_4 ,流速 0.5 mL/min,柱温 40 ℃。

2 结果与分析

2.1 pET28a(+)-*xyII*、pWYZ-2 和 pWYZ-4 目标载体的成功构建 图 1~3 为 3 个质粒构建的示意图,并将测序正确的质粒分别命名为 pET28a(+)-*xyII*、pWYZ-2 和 pWYZ-4。

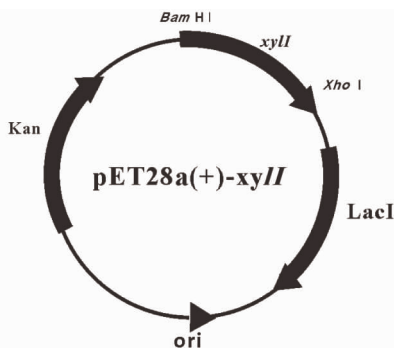


图 1 pET28a(+)-*xyII* 质粒图谱

Fig. 1 Plasmid profile of pET28a(+)-*xyII*

2.2 质粒 pET28a(+)-*xyII* 中 *xyII* 基因的诱导表达 将重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-*xyII* 进行 IPTG 诱导表

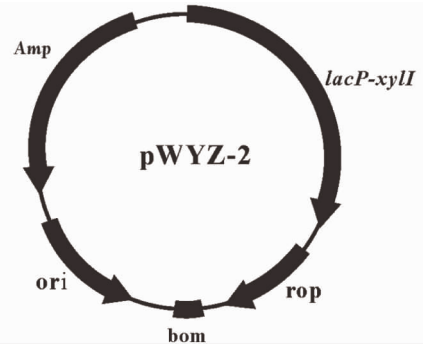


图 2 pWYZ-2 质粒图谱

Fig. 2 Plasmid profile of pWYZ-2

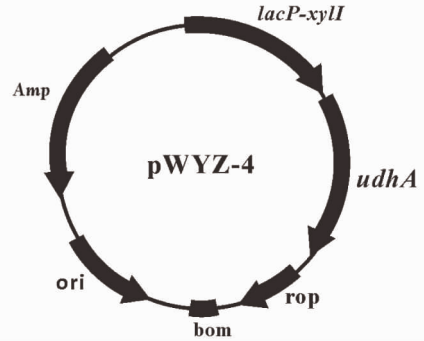
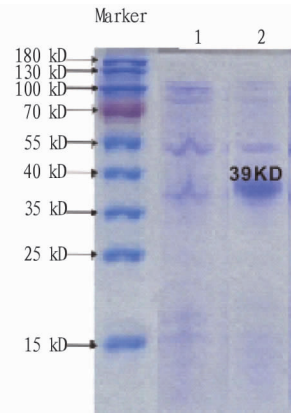


图 3 pWYZ-4 质粒图谱

Fig. 3 Plasmid profile of pWYZ-4

达,将诱导表达后的发酵液进行超声波破胞后离心,以离心后的上清液作为样品,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳(胶浓度为 12%),结果见图 4。从图 4 可见,重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-*xyII* 经过 IPTG 诱导表达后,在 39 kD 处出现明显的蛋白表达条带(泳道 2),而未添加 IPTG 诱导表达的对照组(泳道 1)在相应的位置蛋白表达条带很淡,可初步推断醛糖还原酶分子量约为 39 kD,这也与 *xyII* 基因预测表达产物分子量大小相符。



注:1. 无 IPTG 诱导;2. 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导

Note: 1. No IPTG induction; 2. 0.1 mmol/L IPTG induction

图 4 重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-*xyII* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant BL21 (DE3)/pET28a(+)-*xyII* expression products

2.3 醛糖还原酶酶活测定结果 将重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET28a(+)-*xyII* 进行 IPTG 诱导表达,将诱导表达后的

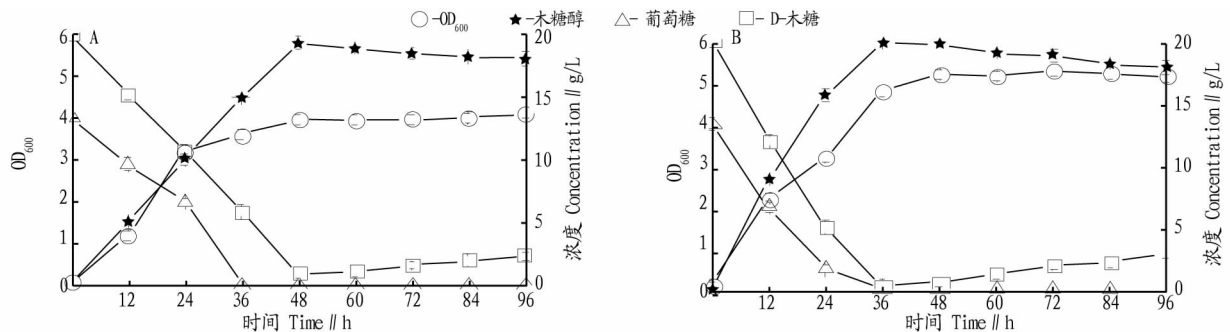
发酵液进行超声波破胞后离心,以离心后的上清液作为样品,测定醛糖还原酶的酶活,结果表明,BL21(DE3)/pET28a(+)-*xyII* 不添加 IPTG 的酶活为 (0.04 ± 0.03) U/mL, BL21(DE3)/pET28a(+)-*xyII* 添加 IPTG 的酶活为 (3.30 ± 0.06) U/mL。

2.4 *E. coli* AI07/pWYZ-2 和 *E. coli* AI07/pWYZ-4 菌株发酵结果 在大肠杆菌 BL21(DE3) 验证了 *xyII* 基因表达产物及测定了相应醛糖还原酶酶活后,将 *xyII* 基因连接上 *lacP* 启动子,重新构建了质粒 pWYZ-2,以强化菌株 *E. coli* AI07 产木糖醇的能力。在 pWYZ-2 基础上,进一步共表达 *xyII* 基因和 *UdhA* 基因,得到了质粒 pWYZ-4。通过对比菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-2 和 *E. coli* AI07/pWYZ-4 发酵产木糖醇的结果,评价 *UdhA* 基因对木糖醇发酵的影响。

由图 5 可知,在整个发酵过程中,*E. coli* AI07/pWYZ-4 菌株的生物量(OD_{600} 值)始终高于菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-2;在利用葡萄糖方面,菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-2 在发酵 24 h 后葡萄糖剩余量为 7.2 g/L,而菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-4

发酵 24 h 后,葡萄糖剩余量为 2.1 g/L,表明 *E. coli* AI07/pWYZ-4 对葡萄糖消耗较快,也解释了其在发酵过程中较高的生物量;在利用木糖方面,当初始 D-木糖的量为 20 g/L 时,*E. coli* AI07/pWYZ-2 菌株 48 h,木糖醇的产量为 19.90 g/L;而菌株 *E. coli* AI07/pWYZ-4 36 h,木糖醇的产量为 19.91 g/L。*E. coli* AI07/pWYZ-4 菌株较 *E. coli* AI07/pWYZ-2 生产木糖醇的强度提高了 33.25%。

UdhA 基因能够催化 NADH 与 NADPH 相互转化,进而调控胞内还原力^[15],而 NADPH 是很多菌属包括该研究所用的博伊丁假丝酵母醛糖还原酶的辅酶^[16],由此推断,共表达 *UdhA* 能调动糖酵解产生的 NADH 生成 NADPH,从而提高木糖醇的产量。但从已有的发酵数据来看,共表达 *UdhA* 基因的 *E. coli* AI07/pWYZ-4 菌株并未形成更高的木糖醇产量,只是有较高的木糖醇生产强度,推测可能原因在于 *UdhA* 基因并不仅仅影响辅酶含量,而是通过一些途径影响细胞生长或相关酶的酶活,从而提高木糖醇的生产强度。



注: A. *E. coli* AI07/pWYZ-2; B. *E. coli* AI07/pWYZ-4

图 5 *E. coli* AI07/pWYZ-2 和 *E. coli* AI07/pWYZ-4 发酵产木糖醇比较

Fig. 5 Comparison of *E. coli* AI07/pWYZ-2 and *E. coli* AI07/pWYZ-4 for xylytol fermentation

3 结论

(1) 博伊丁假丝酵母醛糖还原酶(*xyII*) 基因在 BL21(DE3)/pET28a(+)-体系诱导表达后的蛋白产物分子量为 39 kD,醛糖还原酶酶活为 3.30 U/mL。

(2) 将博伊丁假丝酵母醛糖还原酶(*xyII*) 基因接 *lacP* 启动子,克隆到 pWYZ-2 质粒并转化到 *E. coli* AI07 菌株后发酵 48 h,木糖醇的产量为 19.90 g/L。

(3) 共表达来自 *E. coli* W3110 的可溶性吡啶核苷酸转氨酶基因(*UdhA*) 对于 *Candida boidinii* 这类醛糖还原酶依赖 NADPH 辅因子的菌属来说,具有提高生产强度的作用,该研究中木糖醇的生产强度提高了 33.25%。

参考文献

- [1] 王蒙,张全,高慧鹏,等. 生物发酵法制备木糖醇的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2020,40(3):144-153.
- [2] 王栋兵. 浅析木糖醇的应用[J]. 中国科技博览,2015(46):254.
- [3] 杨柳,赵聪,姚默,等. 木糖醇应用及毒副作用研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(34):21355-21356.
- [4] 杨波,许伟,贾东旭,等. 生物法制备木糖醇的研究进展[J]. 发酵科技通讯,2017,46(2):113-117,120.
- [5] 王凤梅,张邦建,岳泰新,等. 转木糖还原酶基因 *XYL1* 酿酒酵母的构建及产木糖醇能力研究[J]. 中国酿造,2018,37(12):66-70.
- [6] WEEMS J J JR. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility[J]. Clinical infectious diseases, 1992,14(3):756-766.

- [7] ZHANG F W, QIAO D R, XU H, et al. Cloning, expression, and characterization of xylose reductase with higher activity from *Candida tropicalis* [J]. Journal of microbiology, 2009,47(3):351-357.
- [8] FERNANDES S, TUOHY M G, MURRAY P G. Xylose reductase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*; Cloning and heterologous expression of the native gene (*Texr*) and a double mutant (*Texr*^{K271R+N273D}) with altered coenzyme specificity [J]. Journal of biosciences, 2009,34(6):881-890.
- [9] 孙莹,张荣珍,徐岩. (R)-专一性羧基还原酶与甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达[J]. 微生物学报,2008,48(12):1629-1633.
- [10] 张哲,焦静雨,陈姣,等. 重组大肠杆菌的构建及利用木糖生产木糖醇的研究[J]. 高校化学工程学报,2016,30(4):864-870.
- [11] SU B L, ZHANG Z, WU M B, et al. Construction of plasmid-free *Escherichia coli* for the production of arabinol-free xylytol from corncob hemicellulosic hydrolysate[J]. Scientific reports, 2016,6(1):1-11.
- [12] 赵昆军,黄恩启,龚仁敏,等. 吡啶核苷酸转氨酶的结构及功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2007,23(10):797-803.
- [13] BOONSTRA B, FRENCH C E, WAINWRIGHT I, et al. The *UdhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [J]. Journal of bacteriology, 1999,181(3):1030-1034.
- [14] 廖翀,白林含,阮琨,等. 热带假丝酵母 *XYL1* 基因的克隆及序列分析[J]. 四川大学学报(自然科学版),2006,43(1):228-231.
- [15] YANG D C, TANG M, CAI S, et al. Effect of overexpression *UdhA* on the production of pyruvate in the *E. coli* HBUT-P2[C]// 2nd International Conference on Frontiers of Biological Sciences and Engineering (FSBE 2019). Chongqing, China: AIP Conference Proceedings, 2020.
- [16] 李春雷,邓小昭,董莉莉,等. 一种基因工程改造的 NADH 高亲和木糖还原酶突变基因可促进酿酒酵母发酵木糖生成乙醇[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2011,27(3):282-286.