

酿酒酵母转化半乳糖醇的工程菌株构建及优化

邓连妹^{1,2}, 李娇², 门燕², 孙媛霞², 贾士儒¹, 朱玥明^{2*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家重点实验室, 天津 300308

邓连妹, 李娇, 门燕, 孙媛霞, 贾士儒, 朱玥明. 酿酒酵母转化半乳糖醇的工程菌株构建及优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1909-1923.

DENG Lianmei, LI Jiao, MEN Yan, SUN Yuanxia, JIA Shiru, ZHU Yueying. Construction and culture condition optimization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for production of galactitol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1909-1923.

摘要: 半乳糖醇是一种稀少糖醇, 广泛应用于食品工业与医药领域。工业上一般通过化学氢化法生产半乳糖醇, 但反应条件苛刻、生产成本低、对环境不友好, 亟须开发更有效的“绿色”生物合成技术。本研究挖掘了来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS 513.88 的木糖还原酶(*Aspergillus niger* xylose reductase, AnXR), 该酶属于 NADPH 依赖的醛酮还原酶家族。对 AnXR 的酶学性质进行研究, 发现其最适温度和 pH 分别为 25 °C 和 8.0。以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为底盘细胞, 利用基因重组技术敲除半乳糖激酶(galactokinase, GAL1)基因, 使得宿主细胞对半乳糖的分解代谢利用大幅降低, 并在此底盘菌株中引入 AnXR 基因构建了催化 D-半乳糖生成半乳糖醇的工程菌株。对工程菌株全细胞转化的条件进行优化, 半乳糖醇的最高产量达到 12.10 g/L。同时, 该菌株对其他单糖的还原能力也进行了测试, 可生成木糖醇、阿拉伯糖醇等功能性糖醇。利用本研究构建的工程菌株可以实现半乳糖醇等多种功能糖醇的高效生物转化, 对稀少糖醇的绿色制造具有借鉴意义。

关键词: 半乳糖醇; 木糖还原酶; 酿酒酵母; 工程菌株; 全细胞转化

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910604); 山东省重点研发计划(2022SFRC0101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910604) and the Key Research and Development Program of Shandong Province (2022SFRC0101).

*Corresponding author. E-mail: zhu_ym@tib.cas.cn

Received: 2023-10-26; Accepted: 2024-03-13; Published online: 2024-03-18

Construction and culture condition optimization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for production of galactitol

DENG Lianmei^{1,2}, LI Jiao², MEN Yan², SUN Yuanxia², JIA Shiru¹, ZHU Yueming^{2*}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 State Key Laboratory of Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Galactitol, a rare sugar alcohol, has promising potential in the food industry and pharmaceutical field. The available industrial production methods rely on harsh hydrogenation processes, which incur high costs and environmental concerns. It is urgent to develop environmentally friendly and efficient biosynthesis technologies. In this study, a xylose reductase named AnXR derived from *Aspergillus niger* CBS 513.88 was identified and characterized for the enzymatic properties. AnXR exhibited the highest activity at 25 °C and pH 8.0, and it belonged to the NADPH-dependent aldose reductase family. To engineer a strain for galactitol production, we deleted the galactokinase (GAL1) gene in *Saccharomyces cerevisiae* by using the recombinant gene technology, which significantly reduced the metabolic utilization of D-galactose by host cells. Subsequently, we introduced the gene encoding AnXR into this modified strain, creating an engineered strain capable of catalyzing the conversion of D-galactose into galactitol. Furthermore, we optimized the whole-cell catalysis conditions for the engineered strain, which achieved a maximum galactitol yield of 12.10 g/L. Finally, we tested the reduction ability of the strain for other monosaccharides and discovered that it could produce functional sugar alcohols such as xylitol and arabinitol. The engineered strain demonstrates efficient biotransformation capabilities for galactitol and other functional sugar alcohols, representing a significant advancement in environmentally sustainable production practices.

Keywords: galactitol; xylose reductase; *Saccharomyces cerevisiae*; engineered strains; whole-cell catalysis

随着健康意识不断提高,人们对低热量天然甜味剂和含有这类甜味剂食品的需求逐渐增加。半乳糖醇(卫矛醇)作为一种稀少糖醇,具有一定甜度,且热值低、不被人体胰岛素识别利用,可作为新型甜味剂应用于糖果、面包等食品中^[1-2]。此外,半乳糖醇可作为生产二去水半乳糖醇、二乙酰二去水半乳糖醇等抗癌药物的前体物质^[3-5],生产具有医学用途的聚合物^[6],在药物递送和组织工程方面具有潜在的应用价值^[7]。目前,工业

生产半乳糖醇主要通过半乳糖化学氢化法,存在生产条件苛刻、生产成本高及环境污染严重等问题,促使人们探索和开发更有效的“绿色”生物催化工艺过程。1994年Muniruzzaman等^[8]构建了一种利用乳糖生产半乳糖醇的新方法,乳糖首先被 β -D-半乳糖苷酶分解为半乳糖和葡萄糖,随后耻垢分枝杆菌(*Mycolicibacterium smegmatis*)将半乳糖转化为半乳糖醇。酵母具有以单糖为底物合成糖醇的能力,作为底盘细胞进行生物催化生

成半乳糖醇相比化学氢化途径更安全、更具可持续性^[9]。Masuda 等^[10]通过在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中过表达醛糖还原酶基因 *gre3* 构建工程菌株,转化 5 g/L D-半乳糖产生 9 mg/L 半乳糖醇。Jagtap 等^[11]在圆红冬孢酵母菌(*Rhodospiridium toruloides*) IFO0880 的富氮培养基中添加 40 g/L D-半乳糖可产生 8.4 g/L 半乳糖醇,在贫氮培养基中产生 5.2 g/L 半乳糖醇。

酿酒酵母长期应用于食品加工工业,具有很高的食品安全性,同时具备大规模发酵生产的能力,因此本研究选用酿酒酵母作为底盘细胞,构建生物转化 D-半乳糖生成半乳糖醇的工程菌株。首先,挖掘多种不同来源的木糖还原酶基因,构建表达质粒转入酿酒酵母进行全细胞反应,通过半乳糖醇产量的比较,确定适合 D-半乳糖转化的最佳木糖还原酶。然后,将该酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行表达并纯化,详细研究该酶的酶学性质。同时,为了阻断酿酒酵母通过 Leloir 途径代谢消耗 D-半乳糖,采用基因重组技术对底盘细胞 Leloir 途径中的关键基因进行敲除^[12],最终构建了高效转化 D-半乳糖生产半乳糖醇的工程菌株。通过对工程菌株全细胞转化过程中底物添加量、菌体浓度等关键因素的优化,大幅提升了半乳糖醇的产量以及转化效率,从而实现了半乳糖醇等功能糖醇的绿色生物制备。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

以本实验室保藏的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) CEN.PK2-1C 作为底盘细胞(SC-1),构建生物转化生成半乳糖醇的工程菌株;本实验室保藏的大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 用于质粒构建和保存,大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)作为木糖还原酶的表达宿主以研究酶学性质。木糖还原酶基

因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。本研究涉及的菌株、质粒及基因如表 1 所示。

1.2 酶、试剂及主要仪器

Phanta 高保真聚合酶扩增试剂盒、ClonExpress II One Step 克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒小提试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司;胰蛋白酶、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司;氯化钠(NaCl)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;咪唑购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、氨苄青霉素、三羟甲基氨基甲烷 [tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride, Tris]、还原型辅酶 II 四钠(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)、D-无水葡萄糖、D-半乳糖、D-阿拉伯糖、D-赤藓糖购自北京索莱宝科技有限公司;无氨基酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acids, YNB)、选择性氨基酸混合粉末(dropout supplement-His)购自 Sigma-Aldrich 公司。

PCR 仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;大型高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技公司;超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;高效液相色谱系统,安捷伦科技有限公司;恒温空气摇床,上海一恒科学仪器有限公司;超微量分光光度计,通用电气医疗保健技术公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白酶 10.0, NaCl 10.0, 固体培养基添加琼脂粉 15.0。本文涉及使用 LB 培养基添加氨苄青霉素溶液终浓度均为 100 μ g/mL。

酵母 SD 培养基(SD-His) (g/L): YNB 6.7, 选择性氨基酸混合粉末 1.3, D-无水葡萄糖 20.0, 固体培养基添加琼脂粉 15.0。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study.

Strains/Plasmids	Phenotype	Source
Strains		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C (SC-1)	MAT α <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Laboratory store
SC-2	SC-1 with vector pRS313	This study
SC-1/pRS313- <i>anxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>anxr</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>ssxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>ssxr</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>hjxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>hjxr</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>pbxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>pbxr</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>lrx</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>lrx</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>roxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>roxr</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>scxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>scxr</i>	This study
SC-1/pRS313- <i>ypxr</i>	SC-1 with vector pRS313- <i>ypxr</i>	This study
SC-3	SC-1 with vector pRS313- <i>anxr</i>	This study
SC-4	SC-1 Δ <i>gal1</i>	This study
SC-5	SC-3 Δ <i>gal1</i> with vector pRS313- <i>anxr</i>	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA</i> , <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Laboratory store
<i>E. coli</i> DH5 α /pET-32(a)- <i>anxr</i>	<i>E. coli</i> DH5 α with vector pET-32(a)- <i>anxr</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i>	Laboratory store
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-32(a)- <i>anxr</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with vector pET-32(a)- <i>anxr</i>	This study
Plasmids		
pET-32(a)- <i>anxr</i>	pET-32(a) carrying <i>anxr</i> from <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	This study
pCMV- <i>neo</i> -Bam		Laboratory store
pRS313- <i>anxr</i>	pRS313 carrying <i>anxr</i> from <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	This study
pRS313- <i>ssxr</i>	pRS313 carrying <i>ssxr</i> from <i>Scheffersomyces stipitidis</i>	This study
pRS313- <i>hjxr</i>	pRS313 carrying <i>hjxr</i> from <i>Hypocrea jecorina</i>	This study
pRS313- <i>pbxr</i>	pRS313 carrying <i>pbxr</i> from <i>Pseudozyma brasiliensis</i>	This study
pRS313- <i>lrx</i>	pRS313 carrying <i>lrx</i> from <i>Aspergillus awamori</i>	This study
pRS313- <i>roxr</i>	pRS313 carrying <i>roxr</i> from <i>Rhizopus oryzae</i>	This study
pRS313- <i>scxr</i>	pRS313 carrying <i>scxr</i> from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	This study
pRS313- <i>ypxr</i>	pRS313 carrying <i>ypxr</i> from <i>Yarrowia lipolytica</i>	This study

1.4 基因的挖掘

以来源于树干毕赤酵母(*Scheffersomyces stipitidis*)的 SsXR 的氨基酸序列作为模板, 使用 BLASTp 功能在 GenBank 数据库中筛选不同丝状真菌和酵母来源的木糖还原酶基因, 使用 MEGA 软件中 Clustalw 比对序列, 去除不合群的序列, 整理含有空位的序列, 并采用邻近法将剩余序列构建系统发育树。构建系统发育树

进行检验的次数为 1 000, 距离模型为 p-distance。构建得到的系统发育树, 考虑分支、来源以及木糖还原酶的相似性等选择得到 8 条木糖还原酶基因, 即 *scxr*、*ypxr*、*roxr*、*hjxr*、*anxr*、*ssxr*、*pbxr*、*lrx*。

1.5 重组菌株构建

1.5.1 酿酒酵母重组菌株构建

重组质粒构建: 重组质粒的构建采用 DNA

无缝克隆技术, 将木糖还原酶基因片段定向克隆至载体 pRS313 的 TEF1 启动子和 CYC1 终止子之间。以本实验室保存的载体 pRS313 为模板, 设计引物(表 2)扩增引入木糖还原酶基因两端各 15 bp 序列的 pRS313 线性化片段, 以合成的木糖还原酶基因为模板扩增含有载体 pRS313 两端各 15 bp 序列的木糖还原酶基因片段, 利用 ClonExpress II One Step 克隆试剂盒将载体 pRS313 线性化片段与木糖还原酶基因片段重组连接, 重组产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态中并涂布于含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板。挑取单克隆送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序验证, 测序验证成功后, 提取重组质粒。采用醋酸锂化学转化法将重组质粒转化至酿酒酵母感受态中, 等待发酵验证^[13]。

敲除半乳糖激酶(GAL1)基因 *gal1*: 设计引物(表 2), 通过重叠 PCR 方法拼接 *gal1* 基因上游、抗性基因 *neo* 表达盒、*gal1* 基因下游, 以获得同源重组片段。第一轮 PCR: 以 SC-1 基因组为模板, 设计引物 up-F、up-R 扩增 *gal1* 基因上游 500 bp 的上游同源臂(upstream), down-F、down-R 扩增 *gal1* 基因下游 500 bp 的下游同源臂(downstream)。以载体 pCMV-*neo*-Bam 为模板, 设计引物 neo-F、neo-R 扩增 *neo* 基因表达盒。第二轮 PCR: 以引物 up-F、neo-R 重叠 PCR 方法扩增 upstream-*neo* 片段, 以 neo-F、down-R 重叠 PCR 方法扩增 *neo*-downstream 片段。第三轮 PCR: 以引物 up-F、down-R 重叠 PCR 方法扩增整个同源重组片段 upstream-*neo*-downstream。采用醋酸锂化学转化法将同源重组片段转化至酿酒酵母感受态中, 并涂布于含有终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的抗性平板, 挑取单克隆进行验证。

1.5.2 大肠杆菌重组菌株构建

将来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS

513.88 的木糖还原酶(AnXR)基因连接至 pET-32(a)质粒的 *EcoR* I/*Not* I 位点之间。以本实验室保存的载体 pET-32(a)为模板, 如表 2 所示, 设计引物 p32-anxr-F、p32-anxr-R 对其进行线性化, 设计引物 an-F、an-R 扩增 *anxr* 基因。利用同源重组试剂盒将 pET-32(a)载体线性化片段与 *anxr* 基因片段进行重组反应, 重组产物转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态, 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 抗性平板筛选重组菌株。挑取单克隆进行测序, 验证成功后将重组质粒 pET-32(a)-*anxr* 转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)。

1.6 酶的诱导表达与优化

诱导表达: 将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保藏的携带重组质粒 pET-32(a)-*anxr* 的大肠杆菌重组菌株于 LB 氨苄青霉素抗性平板划线活化。挑取单克隆过夜培养作为种子液, 以 1% 接种量转接至 200 mL 含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基, 培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$ 时添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导 20 h。离心收集菌体, 加入 5 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬菌体, 使用超声波细胞破碎机冰上破碎菌体, 5 000 r/min 离心 20 min, 收集上清即为粗酶液。

纯化与超滤: 通过 Ni-NTA 亲和层析对粗酶液进行蛋白纯化。用含有 50 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑的结合缓冲液(pH 8.0)洗涤杂蛋白, 用含有 50 mmol/L Tris-HCl、120 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液(pH 8.0)洗脱蛋白获得纯酶液。为了降低高浓度咪唑对蛋白的影响, 将纯酶液移入截留分子量为 10 kDa 的超滤管内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 20 min 进行脱盐处理, 以 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)作为稀释液重复 3 次, 除去咪唑后采用超微量分光光度计测定蛋白浓度。

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>Escherichia coli</i>		
p32-anxr-F	GATTTTTGCATAAGCGGCCGCACTCGAGCACCACC	35
p32-anxr-R	GGGTGAAGCCATGAATTCGGATCCGATATCAGCCA	35
an-F	GGATCCGAATTCATGAGCAACCTGGAACATACCAA	35
an-R	GAGTGCGGCCGCTTACTCGAGTTCATCATCGCCAA	35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
p313-anxr-F	GAACTCGAGGCGGCCGCACTAGTATCGATGGATTA	35
p313-anxr-R	GTTGCTCATGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTAC	35
p313-ssxr-F	GTGCTCGAGGCGGCCGCACTAGTATCGATGGATTA	35
p313-ssxr-R	GCTCGGCATGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTAC	35
p313-hjxr-F	GGCCTCGAGGCGGCCGCACTAGTATCGATGGATTA	35
p313-hjxr-R	GCTCGCCATGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTAC	35
p313-roxr-F	ACTATCTGGGCGGCCGCACTAGTATCGATGGATTA	35
p313-roxr-R	GAATGGCATGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTAC	35
p313-pbxr-F	TATCTGGTAAGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC	35
p313-pbxr-R	CGAATGGCATGAATTCGGATCCGATATCAGCCATG	35
p313-lxr-F	GTTACCTAAGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC	35
p313-lxr-R	AGCGGGACATGAATTCGGATCCGATATCAGCCATG	35
p313-scxr-F	TTTGCTGAGCGGCCGCACTAGTATCGATGGATTA	35
p313-scxr-R	TGAAGACATGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTAC	35
p313-ybxr-F	TTGCCTAAGCGGCCGCACTAGTATCGATGGATTA	35
p313-ypxr-R	GAAGGACATGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTAC	35
anxr-F	ATTCGAATTCATGAGCAACCTGGAACATAC	30
anxr-R	TGCGGCCGCTCGAGTTCATCATCGCCAAA	30
ssxr-F	TTCGAATTCATGCCGAGCATTAACTGAAC	30
ssxr-R	TGCGGCCGCTCGAGCACAAAATCGGAAT	30
hjxr-F	TTCGAATTCATGGCGAGCCCCGACCCTGAAA	30
hjxr-R	GCGGCCGCTCGAGGCCAAAACAGATACAGT	30
roxr-F	TTCGAATTCATGCCATTCGTTATCGACTTG	30
roxr-R	TGCGGCCGCCCAGATAGTAGCACCACCGTC	30
pbxr-F	ATCCGAATTCATGCCATTCGTTATCGACTT	30
pbxr-R	CGGCCGCTTACCAGATAGTAGCACCACCGT	30
lxr-F	ATCCGAATTCATGTCCCCTCCCTCGAGGG	30
lxr-R	GTGCGGCCGCTTAGGTGAACTTGAGACCAC	30
scxr-F	TTCGAATTCATGTCTTCACTGGTTACTCTT	30
scxr-R	TGCGGCCGCTCAGGCAAAAAGTGGGAATTT	30
ypxr-F	TTCGAATTCATGTCTTCAAGCTCGCCTCC	30
ypxr-R	TGCGGCCGCTTAGGCCGAAAATGGGAAGGTT	30
up-F	TGGAACCTTCAGTAATACGCTTAACTGCTCATTGCTATAT	40
up-R	CGGGGTTTGTGTCATTATAGTTTTTTCTCCTTGACGTTAA	40
down-F	TTGGGTCGTTTGTTCGTATACTTCTTTTTTTACTTTGTT	40
down-R	ATTTCTTTTCTCCTCGCGCTTGTCTACTAAAATCTGAAT	40
neo-F	TGGAACCTTCAGTAATACGCTTAACTGCTCATTGCTATAT	40
neo-R	AAAAAGAAGTATACGAACAACGACCCAACACCGTGCCT	40

1.7 酶活检测方法

酶活力测定的标准方法为：在 300 μL 含有 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、10 mmol/L D-半乳糖、5 mmol/L NADPH 的反应体系中加入纯酶 100 μg 混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后，煮沸 3 min 以终止反应。

检测方法：使用安捷伦高效液相色谱系统检测酶活。Waters Sugar-Pak 色谱柱分离样品，柱温 80 $^{\circ}\text{C}$ ，示差检测器，检测温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ ，流动相为超纯水，流速 0.4 mL/min，进样量 10 μL ，单个样品运行时间为 25 min。

1.8 酶学性质研究

最适反应温度：分别在 20、25、30、35、40、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$ 温度下测定 AnXR 的酶活力，以确定 AnXR 最适反应温度。以最适反应温度下测定的酶活为 100%，计算各反应温度下的相对酶活力。

最适反应 pH：在最适反应温度下，分别在 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的 50 mmol/L 缓冲液下测定 AnXR 的酶活力，以确定 AnXR 最适反应 pH。以最适反应 pH 下测定的酶活力为 100%，计算各反应 pH 下的相对酶活力。

金属离子对 AnXR 酶活力的影响：在最适反应温度和最适反应 pH 的条件下，研究金属离子对 AnXR 酶活力的影响。在酶反应体系中加入终浓度为 5 mmol/L 的金属离子(Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+})，以加入相同浓度 EDTA 的反应组作为空白对照。以空白对照组的酶活力为 100%，计算添加金属离子反应组的相对活性。

AnXR 的平衡转化率的测定：在 1.5 mL 反应体系中含有 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)、5 mmol/L D-半乳糖、5 mmol/L NADPH、酶液 0.5 mg/mL，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应，每隔 2 h 取样，直

至转化率达到平衡。反应结束后，按照 1.7 条件中液相检测条件检测 D-半乳糖消耗量和半乳糖醇的产量，并计算转化率。

表观动力学常数测定：在最适的反应条件下，分别以四碳糖(D-赤藓糖)、五碳糖(D-木糖)、六碳糖(D-半乳糖)为底物，测定 AnXR 对不同底物的亲和力、催化效率，并使用 GraphPad Prism 软件对动力学曲线进行拟合和分析。

以上酶活力测定均按照 1.7 中的方法，设置 3 组平行实验。

1.9 全细胞催化反应

酿酒酵母的发酵及全细胞制备：将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保藏的酿酒酵母重组菌株于 SD-His 平板划线活化，挑取单菌落接入 SD-His 培养基中过夜培养用作种子液。以 1% 接种量将种子液转接入 100 mL SD-His 培养基中，30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 发酵 48 h。5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体，弃上清培养基。使用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤菌体，再次离心弃上清，使用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液调整菌体浓度。

全细胞反应：在酿酒酵母重组菌悬浊液中加入一定浓度的 D-半乳糖，于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下进行全细胞反应，每间隔 12 h 取样 500 μL ，14 000 r/min 高速离心 10 min 收集上清以终止反应。使用 0.22 μm 过滤器过滤上清样品，通过高效液相色谱系统分析 D-半乳糖消耗和半乳糖醇产量。

2 结果与分析

2.1 基因挖掘

本研究从 GenBank 数据库中筛选了 8 条来源于丝状真菌和酵母的木糖还原酶基因，并根据氨基酸序列构建系统发育进化树，如图 1 所示，来源于丝状真菌和酵母的木糖还原酶都位于不同的分支，序列相似性范围为 16.94%–44.85% (表 3)。

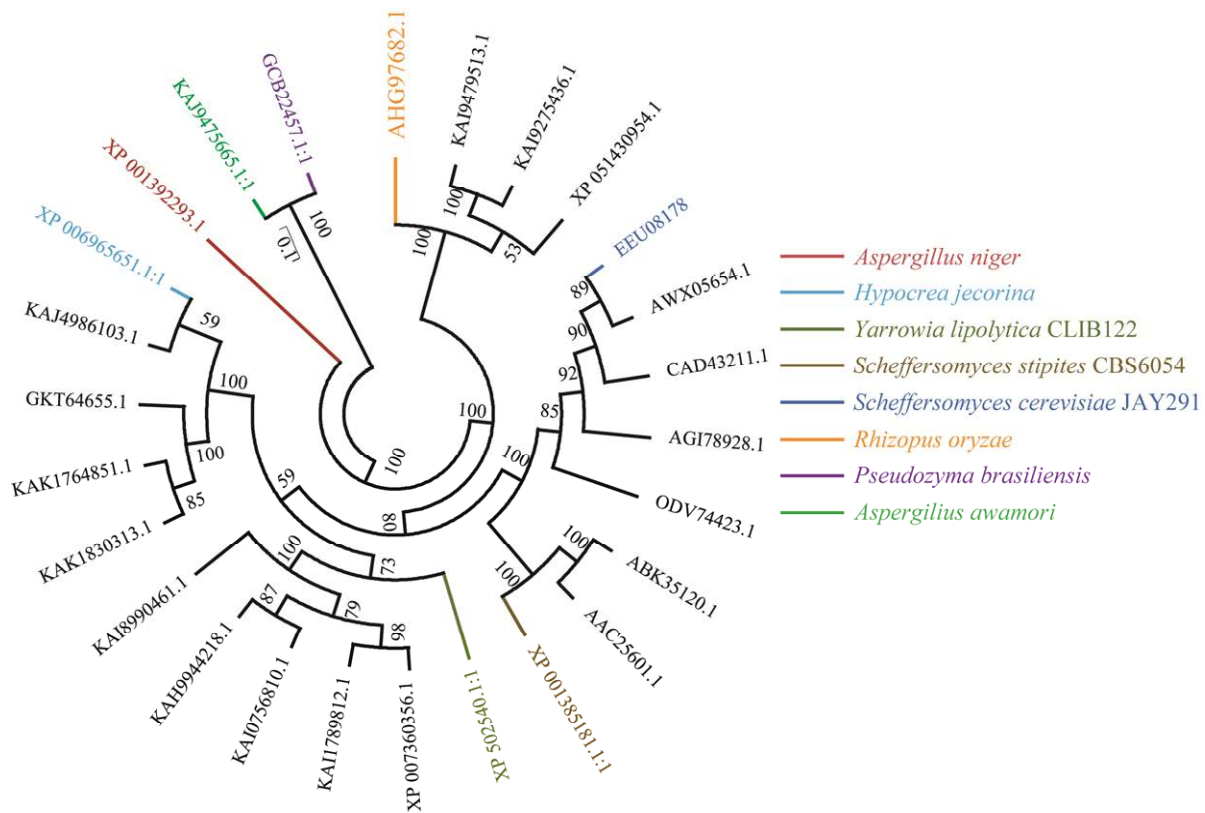


图 1 基于 GenBank 数据库筛选的木糖还原酶系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree constructed based on xylose reductase amino acid sequences screened by GenBank.

表 3 不同木糖还原酶的氨基酸序列相似性(%)

Table 3 Amino acid sequences similarity of different xylose reductases (%)

	AnXR	RoXR	SsXR	HjXR	ScXR	YpXR	LXR	PbXR
AnXR	100.00							
RoXR	24.58	100.00						
SsXR	22.26	21.93	100.00					
HjXR	18.27	39.20	17.61	100.00				
ScXR	24.58	21.26	44.85	16.94	100.00			
YpXR	21.26	19.93	21.26	22.92	21.93	100.00		
LXR	21.59	24.25	23.59	23.26	23.26	21.59	100.00	
PbXR	19.93	19.60	24.92	19.27	24.25	18.60	19.60	100.00

将筛选得到的木糖还原酶基因与载体 pRS313 连接构建重组质粒，并转入酿酒酵母 SC-1 中进行全细胞反应，以转入 pRS313 空质粒的菌株 SC-2 作为对照。结果显示，本研究挖掘得到的 8 个木糖还原酶基因转入酿酒酵母 SC-1 进行全细胞反应，均能转化 D-半乳糖生

成半乳糖醇，其中转入来源于黑曲霉的木糖还原酶基因 *anxr* 的重组菌株转化 D-半乳糖生成半乳糖醇产量最高，为 2.88 g/L，转化率为 7.2% (图 2)。因此，本研究选择 AnXR 作为转化 D-半乳糖生产半乳糖醇的优势酶进行酶学性质研究。

2.2 AnXR 的酶学性质研究

2.2.1 木糖还原酶 AnXR 的异源表达分析

构建重组质粒 pET32(a)-*anxr* 转入 *E. coli* BL21(DE3) 进行 AnXR 的异源表达, 取少量粗酶液、纯酶进行 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示, AnXR 在 *E. coli* BL21(DE3) 能够正常进行表达, 可溶性表达相对较高, 进一步通过 Ni-NTA 纯化, 可获得纯度较高的蛋白, 分子量约为 28 kDa, 具有明显的蛋白二聚体条带。

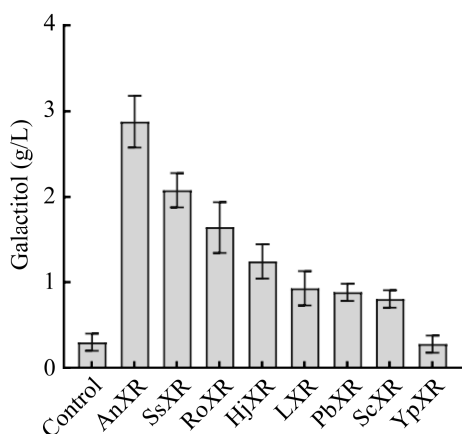


图 2 携带不同木糖还原酶基因的酿酒酵母生成半乳糖醇产量比较

Figure 2 Comparison of galactitol production by *Saccharomyces cerevisiae* harboring different xylose reductase genes.

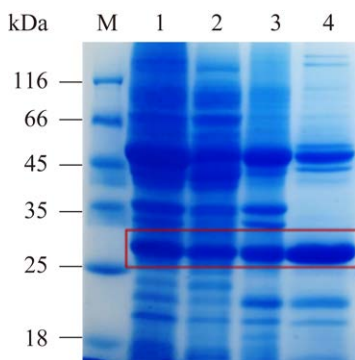


图 3 大肠杆菌表达 AnXR 的 SDS-PAGE 图

Figure 3 SDS-PAGE analysis of AnXR. The box is the target protein band; M: Protein marker; 1: Crude enzyme; 2: Supernatant; 3: Precipitate; 4: Purified enzyme.

2.2.2 木糖还原酶 AnXR 的酶学性质

在 20–60 °C 下测定酶活力, 以确定最适反应温度。如图 4A 所示, AnXR 的最适反应温度为 25 °C, 随着温度升高, AnXR 的酶活力呈下降趋势, 在 60 °C 时无催化活性。

在最适反应温度 25 °C 下, 测定 pH 4.0–11.0 条件下酶活力, 以确定最适反应 pH。如图 4B 所示, 发现 AnXR 在 pH 8.0 时表现出最佳的催化活性, 在 pH 7.0、pH 9.0 时催化活性保持在 80% 以上, pH 低于 6.0 或高于 9.0, 酶活力急剧下降, 由此可知 AnXR 在偏碱性环境下进行催化反应更适宜。

在 25 °C、pH 8.0 下测定了二价金属离子对 AnXR 酶活的影响, 以加入 EDTA 对照组的酶活力为 100%。如图 4C 所示, 二价金属离子对 AnXR 均有一定的抑制作用, 会使得酶活力有不同程度的降低, 其中 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 的抑制效果更为明显。由此可知, AnXR 是一种不依赖于金属离子的还原酶。

在最优反应条件(最适反应温度 25 °C、最适反应 pH 8.0)下, 测定 AnXR 的平衡转化率。如图 4D 所示, AnXR 在反应 6 h 后达到平衡, 反应时间延长, 转化率不再增加, 因此 AnXR 的平衡转化率为 35.0%。

2.2.3 表观动力学常数测定

最适的反应条件下, 选择 D-半乳糖、D-木糖和 D-赤藓糖作为底物, 对 AnXR 进行表观动力学常数的测定, 研究 AnXR 对不同大小底物的亲和力、催化效率。通过 GraphPad Prism 软件对动力学曲线进行拟合, 计算 AnXR 对不同底物的动力学常数, 结果如表 4 所示。AnXR 对 D-半乳糖、D-木糖和 D-赤藓糖的 K_m 值显示该酶对 3 种单糖的亲和力无明显区别, k_{cat} 值显示该酶对四碳糖 D-赤藓糖的催化效率最高, 五碳糖 D-木糖次之, 六碳糖 D-半乳糖最低, 但三者之间差异较小。

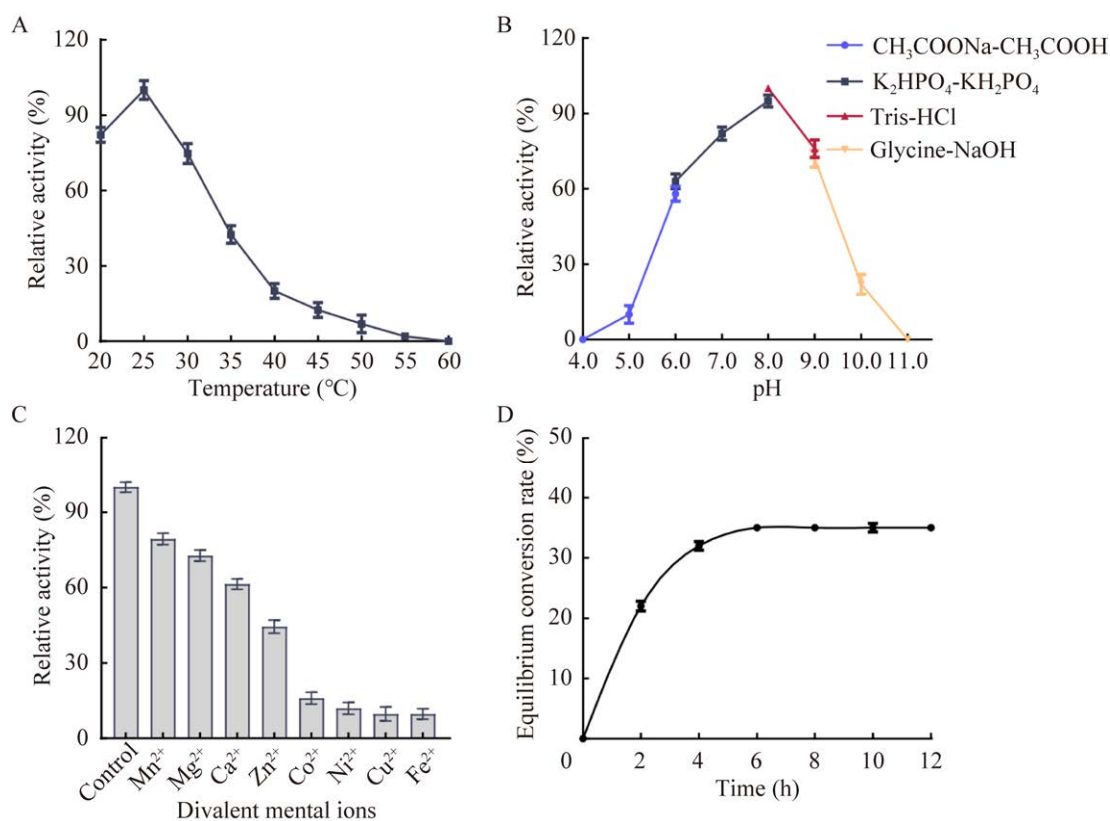


图4 AnXR的酶学性质 A: AnXR的最适温度曲线. B: AnXR的最适pH值曲线. C: 二价金属离子对AnXR酶活力的影响. D: AnXR在最适的反应条件下测定的平衡转化率

Figure 4 Enzymatic characterization of AnXR. A: Optimum temperature curve of AnXR. B: Optimum pH curve of AnXR. C: Effects of different metal ions on activity of AnXR enzyme. D: Equilibrium conversion rate determined for AnXR under the optimum reaction conditions.

表4 AnXR的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of AnXR

Substrate	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/(L·s))
D-galactose	0.33	314.70	953.64
D-xylose	0.34	367.30	1 080.29
D-erythrose	0.33	373.50	1 131.82

2.3 酿酒酵母全细胞转化D-半乳糖生成半乳糖醇

2.3.1 酿酒酵母底盘细胞敲除半乳糖激酶基因

酿酒酵母主要通过Leloir途径代谢D-半乳糖，半乳糖激酶GAL1将D-半乳糖磷酸化为半乳糖-1-磷酸，然后进入Leloir途径。为了阻断D-半乳糖在Leloir途径的消耗，需要敲除GAL1

编码基因 $gal1$ ，使D-半乳糖不被磷酸化，而主要被还原为半乳糖醇。通过同源重组方式将抗性基因 neo 表达盒替代酿酒酵母基因组上 $gal1$ 达到敲除的目的，在含有G418抗性的平板上筛选重组菌株并进行验证，验证成功敲除基因 $gal1$ 的重组菌株命名为SC-4。在重组菌株SC-4中转入重组质粒pRS313- $anxr$ ，构建的菌株命名为工

程菌株 SC-5, 进行全细胞转化 D-半乳糖生成半乳糖醇。如图 5A 所示, 野生型菌株 SC-1 快速消耗 D-半乳糖, 在 12 h 时底物仅剩 10.0%, 重组菌株 SC-5 在整个转化过程中消耗 D-半乳糖速率较慢, 培养 72 h 后 D-半乳糖仍剩余 80.0%, 由此可知敲除编码半乳糖激酶基因 *gal1* 可极大减缓 D-半乳糖消耗。如图 5B 所示, 与野生型菌株 SC-1、重组菌株 SC-3 相比, 工程菌株 SC-5 半乳糖醇产量提高至 4.32 g/L, 因此敲除酿酒酵母底盘细胞基因 *gal1* 可有效减少 D-半乳糖在 Leloir 途径的消耗, 有利于 D-半乳糖生成半乳糖醇。

2.3.2 全细胞转化反应的菌体浓度优化

为研究工程菌株 SC-5 全细胞转化反应的最适菌体浓度, 在不同菌体浓度 ($OD_{600}=20$ 、40、60、80、100) 下进行全细胞转化。如图 6A 所示, 随着反应体系中菌体浓度的升高, 半乳糖醇的产量逐渐上升, 在 $OD_{600}=100$ 时半乳糖醇的产量增加至 10.80 g/L。若再增加菌体浓度可能会导致反应体系中菌体过多, 反应溶液浓稠导致转化速度减慢, 半乳糖醇产量下降, 因此在

本实验中最适反应菌体浓度为 $OD_{600}=100$ 。

2.3.3 全细胞转化反应的底物浓度优化

在最适反应菌体浓度的条件下, 研究工程菌株 SC-5 全细胞转化反应的 D-半乳糖添加量对半乳糖醇产量的影响。在不同的 D-半乳糖浓度 (10、20、30、40、60 g/L) 下进行全细胞反应。如图 6B 所示, D-半乳糖添加量为 10 g/L 时, 半乳糖醇产量为 3.50 g/L, 此时质量转化率最高为 35.0%, 达到理论转化率 (AnXR 的平衡转化率为 35.0%); 增加 D-半乳糖添加量, 半乳糖醇的产量随之提高, 当半乳糖浓度为 60 g/L 时, 半乳糖醇产量提高至 12.10 g/L, 质量转化率约为 20.2%。

2.3.4 酿酒酵母全细胞反应

在最适菌体浓度和最佳 D-半乳糖添加量的条件下利用工程菌株 SC-5 全细胞催化方式转化半乳糖生成半乳糖醇, 如图 6C 所示, 在 72 h 的反应过程中随 D-半乳糖的消耗, 半乳糖醇的产量随之提高, 在 72 h 时 D-半乳糖消耗至 40 g/L, 半乳糖醇产量提高至 12.10 g/L。与重组菌株 SC-3 催化半乳糖生成半乳糖醇 2.88 g/L 相比, 通过

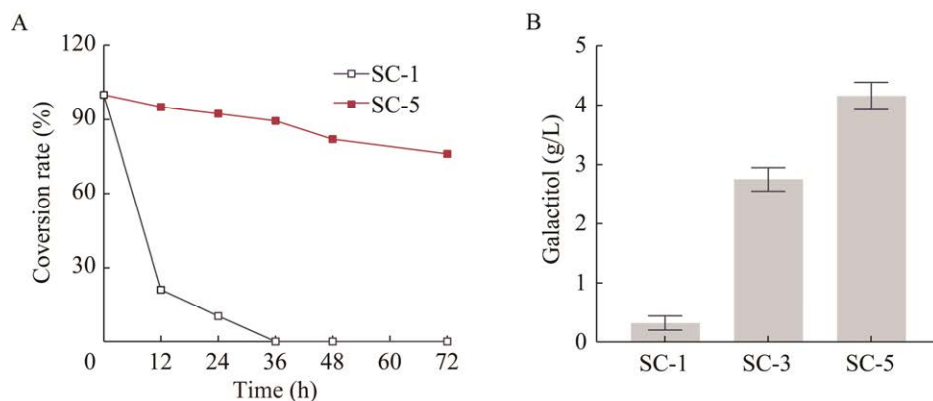


图 5 敲除半乳糖激酶基因对酿酒酵母底盘细胞全细胞生成半乳糖醇的影响 A: 工程菌株 SC-5 消耗 D-半乳糖时间曲线. B: 重组菌株全细胞转化生成半乳糖醇产量

Figure 5 Effect of $\Delta gal1$ on whole cell production of galactitol in *Saccharomyces cerevisiae* chassis cells. A: Curve of whole-cell consumption of D-galactose by *Saccharomyces cerevisiae* SC-5. B: Bar graph of whole cell transformation of recombinant strains produced galactitol yield. SC-1: Original strain; SC-3: SC-1 with vector pRS313-*anxr*; SC-5: SC-3 $\Delta gal1$ with vector pRS313-*anxr*.

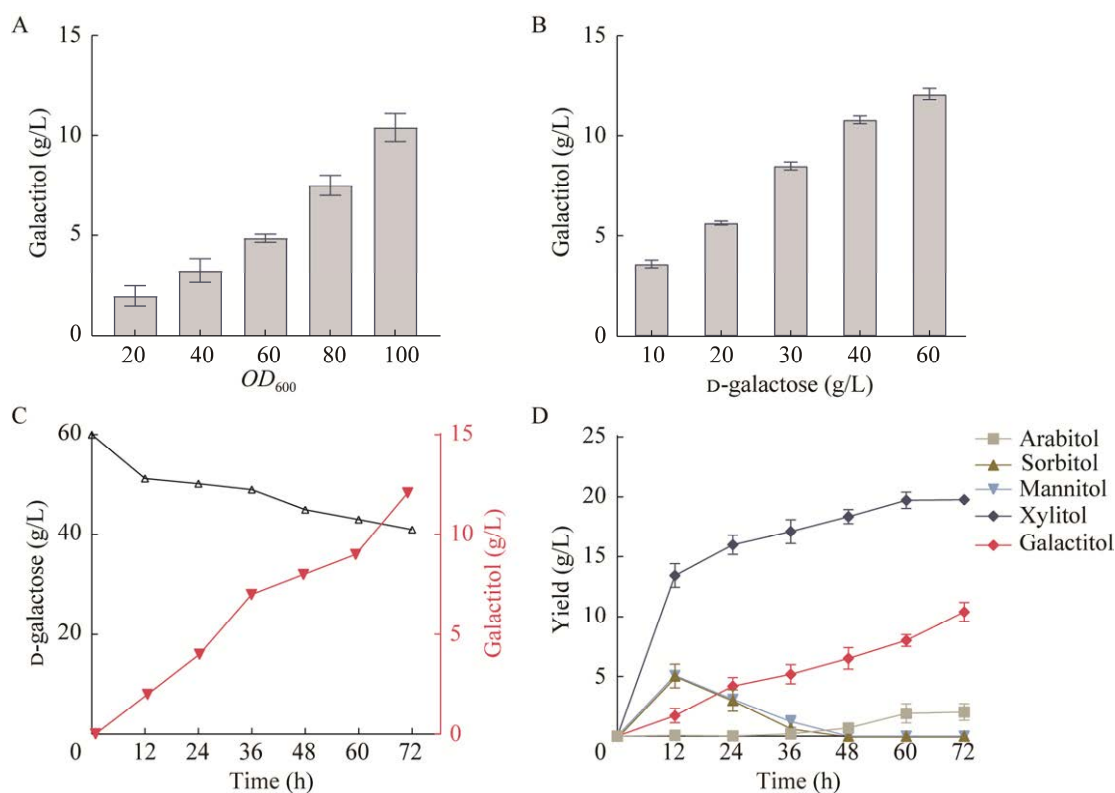


图6 全细胞条件优化及底物扩展 A: 菌体浓度对工程菌株 SC-5 全细胞转化生成半乳糖醇的影响. B: 底物浓度对工程菌株 SC-5 全细胞生成半乳糖醇的影响. C: 工程菌株 SC-5 全细胞转化 D-半乳糖生成半乳糖醇时间曲线. D: 工程菌株 SC-5 全细胞转化生成稀少糖醇

Figure 6 Optimization of conditions for whole cell transformation of D-galactose to galactitol and substrate expansion. A: Effect of cell concentration on whole-cell conversion of engineered strain SC-5 to produce galactitol. B: Effect of substrate concentration on whole-cell conversion of engineered strain SC-5 to produce galactitol. C: The curves of whole-cell conversion of D-galactose to galactitol in SC-5 under optimal reaction conditions. D: Whole cell transformation of engineered strain SC-5 to produce rare sugar alcohols.

全细胞反应条件的优化大幅提升了半乳糖醇的产量。

2.4 酿酒酵母全细胞生成稀少糖醇

木糖还原酶是一种底物谱较广泛的醛酮还原酶,对多种单糖具有还原能力^[14]。本研究以酿酒酵母 SC-1 作为对照,进一步测试了酿酒酵母工程菌株 SC-5 全细胞催化多种天然单糖合成相应的糖醇的能力。结果发现未转入木糖还原酶基因的野生型菌株 SC-1 不具有单糖生成糖醇的能力,构建的工程菌株 SC-5 可转化葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、木糖分别生成山梨糖醇、甘露糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇,但山梨糖醇和甘露糖醇会被菌株代谢消耗,无法积累;另外两种糖醇不会被菌株利用,阿拉伯糖醇最高产量为 2.0 g/L、质量转化率为 3.4%,木糖醇最高产量为 19.1 g/L、质量转化率为 31.8% (图 6D)。

醇、阿拉伯糖醇、木糖醇,但山梨糖醇和甘露糖醇会被菌株代谢消耗,无法积累;另外两种糖醇不会被菌株利用,阿拉伯糖醇最高产量为 2.0 g/L、质量转化率为 3.4%,木糖醇最高产量为 19.1 g/L、质量转化率为 31.8% (图 6D)。

3 讨论与结论

根据文献报道,来源于丝状真菌和酵母的木糖还原酶具有催化 D-半乳糖还原为半乳糖醇的能力^[14-16],是本研究筛选对 D-半乳糖具有高催化活性木糖还原酶基因的重要来源。因此,本研

究首先通过对 8 个来源于丝状真菌和酵母的木糖还原酶对 D-半乳糖的还原能力进行测定, 筛选出催化活性最高的来源于黑曲霉(*A. niger*) CBS 513.88 的 AnXR。将该酶的基因转入酿酒酵母构建重组菌株 SC-3 进行全细胞反应, 生成半乳糖醇产量为 2.88 g/L, 质量转化率为 7.2%。将 AnXR 在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异源表达, 研究 AnXR 的酶学性质, 发现该酶的最适温度和 pH 分别为 25 °C、8.0, 且 AnXR 的催化活性不依赖二价金属离子。为了进一步提高重组菌株 SC-3 生成半乳糖醇的产量, 采用同源重组(图 7)的方式将该菌株 Leloir 途径中的关键基因 *gal1* 进行敲除, 成功构建工程菌株 SC-5, 大幅降低了酿酒酵母自身对 D-半乳糖的代谢利用, 使得 D-半乳糖主要被 AnXR 还原, 生成半乳糖醇的产量较未敲除半乳糖激酶的重组菌株 SC-3 提高 1.5 倍。由于 AnXR 的最适反应温度(25 °C)较酿酒酵母最适生长温度(30 °C)

低, 分别测定了在 25 °C 和 30 °C 下工程菌株 SC-5 的半乳糖醇产量。本课题组在前期实验摸索结果发现, 反应温度为 25 °C 时半乳糖醇产量为 30 °C 下产量的 70.0%, 推测原因是较低温度下酵母细胞内还原力供给水平较低。在此基础上, 对全细胞反应体系中菌体浓度(OD_{600})、D-半乳糖添加量进行优化, 当菌株浓度为 100、D-半乳糖添加量为 60 g/L 时, 半乳糖醇的产量提升至 12.10 g/L, 质量转化率提升至 20.2%, 与优化前相比提升 2.8 倍。根据文献报道, 目前已有 4 种酵母被应用于转化 D-半乳糖生产半乳糖醇(表 5), 其中多形假丝酵母(*Candida polymorpha*)生产半乳糖醇产量最高, 从 110.00 g/L D-半乳糖中产生 18.00 g/L 半乳糖醇^[17], 尽管其产量比本研究的菌株 SC-5 高, 但 D-半乳糖的添加量非常高, 导致转化率较低。本研究构建的工程菌株 SC-5 采用全胞方式转化生成半乳糖醇的转化率较 *S. cerevisiae*、*C. polymorpha*、*R. toruloides* IFO0880 (贫氮培养基

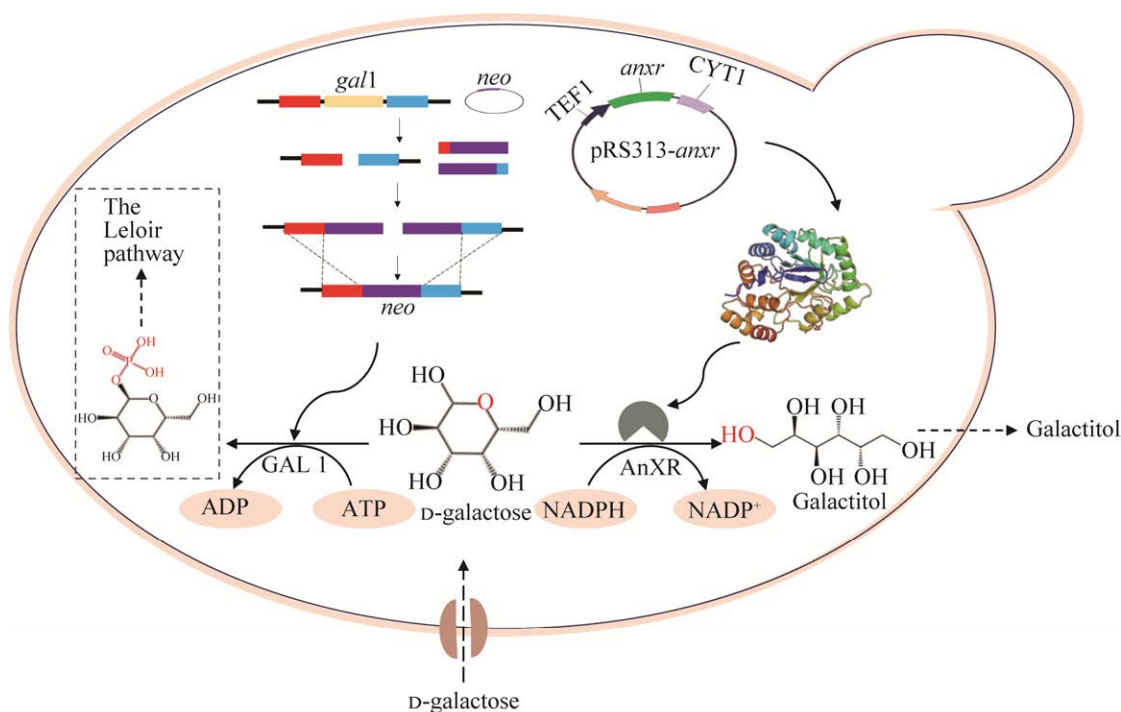


图 7 工程菌株 SC-5 全细胞转化 D-半乳糖生成半乳糖醇模式图

Figure 7 Schematic diagram of SC-5 whole-cell catalysis of D-galactose to galactitol.

表5 不同酵母生成半乳糖醇产量比较

Table 5 Comparison of galactitol yields produced by different yeasts

Strain	Strain-building	Initial D-galactose (g/L)	Final D-galactose (g/L)	Galactitol (g/L)	Conversion rate (%)	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Overexpressed gene <i>gre3</i>	5.00	0.00	9.0 mg/L	0.18	[10]
<i>Candida polymorpha</i>	Original strain	110.00	50.93	18.00	16.00	[17]
<i>Rhodosporidium toruloides</i> IFO0880	Original strain	40.00	4.80	5.20	13.00	[11]
<i>R. toruloides</i> IFO0880	Original strain	40.00	0.00	8.40	21.00	[11]
<i>S. cerevisiae</i> (SC-5)	Overexpressed gene <i>anxr</i>	60.00	40.00	12.10	20.20	This study

转化)高, 稍低于 *R. toruloides* IFO0880 (富氮培养基转化)的转化率, 但菌株 *R. toruloides* IFO0880 在富氮培养基转化时会完全消耗 D-半乳糖, 而工程菌株 SC-5 转化剩余较多的 D-半乳糖, 经纯化^[18]后可进入下一轮转化, 原料利用率更高。

近年来, 随着人们生活的改善, 健康饮食成为大众关注的焦点。因此, 具有特殊生理功能的低热量糖醇已广泛应用于食品工业中。本研究同时测试了工程菌株 SC-5 对其他单糖的还原能力, 结果显示该菌株可以实现山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、阿拉伯糖醇等多种功能性糖醇的生物转化, 为稀少糖醇的绿色制造提供一种新思路。酿酒酵母可以在简易、廉价的培养基中生长, 适合高密度发酵, 对苛刻发酵条件的耐受性高, 加工条件温和且对环境友好^[19-22]。此外, 酿酒酵母具有很高的食品安全性, 已被多国批准可应用于食品和医药工业^[23-24], 因此本研究利用酿酒酵母作为宿主菌进行生物转化生产稀少糖醇更具安全性和可持续性。与纯酶催化相比, 全细胞催化的方式能更好保证酶的稳定性, 且无须额外添加昂贵的辅因子, 同时也避免了酶制剂制备工艺的繁琐步骤, 具有更明显的优势^[25]。

木糖还原酶依赖 NADPH 进行催化反应, 而 NADPH 的生成通常是一个限制步骤^[26]。本研究中构建的工程菌株利用了宿主菌自身产生的 NADPH 辅酶因子, 长时间进行全细胞反应可能导致细胞内源性辅因子失衡, 影响半乳糖醇的产量。未来研究将聚焦 NADPH 再生系统的构建, 实现细胞内辅酶因子高效且经济的循环再生, 有助于进一步提升糖醇产量。

REFERENCES

- [1] GREMBECKA M. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review[J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 241(1): 1-14.
- [2] ZHANG WL, CHEN JJ, CHEN QM, WU H, MU WM. Sugar alcohols derived from lactose: lactitol, galactitol, and sorbitol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(22): 9487-9495.
- [3] JIANG X, HUANG YM, WANG XJ, LIANG QF, LI YJ, LI FJ, FU XH, HUANG CH, LIU HG. Dianhydrogalactitol, a potential multitarget agent, inhibits glioblastoma migration, invasion, and angiogenesis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 91: 1065-1074.
- [4] ZHANG XY, YAN XL, GUO W, XU B, LI M, ZHOU Y, CUI JR. Anticancer activity and mechanisms of diacetyldianhydrogalactitol on hepatoma QGY-7703 cells[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2009, 20(10): 926-931.
- [5] KAMADA M, SATOH T, YOKOTA K, KAKUCHI T. Regio- and stereoselective cyclopolymerization of 1,2:5,6-dianhydroallitol and 1,2:5,6-dianhydrogalactitol

- leading to a novel carbohydrate polymer of (2→6)-1,5-anhydro-DL-galactitol[J]. *Macromolecules*, 1999, 32(18): 5755-5759.
- [6] NATARAJAN J, MADRAS G, CHATTERJEE K. Development of graphene oxide/galactitol polyester-based biodegradable composites for biomedical applications[J]. *ACS Omega*, 2017, 2(9): 5545-5556.
- [7] NATARAJAN J, MOVVA S, MADRAS G, CHATTERJEE K. Biodegradable galactitol based crosslinked polyesters for controlled release and bone tissue engineering[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 77: 534-547.
- [8] MUNIRUZZAMAN S, ITOH H, YOSHINO A, KATAYAMA T, IZUMORI K. Biotransformation of lactose to galactitol[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1994, 77(1): 32-35.
- [9] ERIAN AM, SAUER M. Utilizing yeasts for the conversion of renewable feedstocks to sugar alcohols—a review[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346: 126296.
- [10] MASUDA CA, PREVIATO JO, MIRANDA MN, ASSIS LJ, PENHA LL, MENDONÇA-PREVIATO L, MONTERO-LOMELÍ M. Overexpression of the aldose reductase GRE3 suppresses lithium-induced galactose toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(8): 1245-1253.
- [11] JAGTAP SS, BEDEKAR AA, LIU JJ, JIN YS, RAO CV. Production of galactitol from galactose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 250.
- [12] CAPUTTO R, LELOIR LF, TRUCCO RE, CARDINI CE, PALADINI AC. The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1949, 179(1): 497-498.
- [13] GIETZ RD, SCHIESTL RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2: 31-34.
- [14] TEREBIENIEC A, CHROUMPI T, DILOKPI MOL A, AGUILAR-PONTES MV, MÄKELÄ MR, de VRIES RP. Characterization of D-xylose reductase, XyrB, from *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 30: e00610.
- [15] LIU GT, HALE GE, HUGHES CL. Galactose metabolism and ovarian toxicity[J]. *Reproductive Toxicology*, 2000, 14(5): 377-384.
- [16] HONG KK, NIELSEN J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 69(16): 2671-2690.
- [17] ONISHI H, SUZUKI T. Formation of dulcitol in aerobic dissimilation of D-galactose by yeasts[J]. *Journal of Bacteriology*, 1968, 95(5): 1745-1749.
- [18] 李良玉, 孙蕊, 李朝阳, 王学群, 李洪飞, 贾鹏禹. 顺序式模拟移动色谱纯化木糖醇母液[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(10): 1789-1793.
- LI LY, SUN R, LI CY, WANG XQ, LI HF, JIA PY. Purification of xylitol mother liquid using sequential simulated moving bed chromatography[J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27(10): 1789-1793 (in Chinese).
- [19] FISCHER CR, KLEIN-MARCUSCHAMER D, STEPHANOPOULOS G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 295-304.
- [20] KURODA K, UEDA M. Cellular and molecular engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biobutanol production[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(3): fmv247.
- [21] PEÑA A, SÁNCHEZ NS, ÁLVAREZ H, CALAHORRA M, RAMÍREZ J. Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(2): fou005.
- [22] YE MQ, YE YQ, DU ZJ, CHEN GJ. Cell-surface engineering of yeasts for whole-cell biocatalysts[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(6): 1003-1019.
- [23] LAZO-VÉLEZ MA, SERNA-SALDÍVAR SO, ROSALES-MEDINA MF, TINOCO-ALVEAR M, BRIONES-GARCÍA M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(4): 943-951.
- [24] SANTOS LO, SILVA PGP, LEMOS JUNIOR WJF, de OLIVEIRA VS, ANSCHAU A. Glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(5): 1879-1894.
- [25] LIN BX, TAO Y. Whole-cell biocatalysts by design[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 106.
- [26] YUAN XS, WANG JP, LIN JP, YANG LR, WU MB. Efficient production of xylitol by the integration of multiple copies of xylose reductase gene and the deletion of Embden-Meyerhof-Parnas pathway-associated genes to enhance NADPH regeneration in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(8): 1061-1069.

(本文责编 郝丽芳)