

효모내로의 Xylose 운반 기작

한지혜¹ · 최기욱² · 정봉우^{1,3*} · 민지호^{1,3*}

¹전북대학교 생물공정공학과, ²(주) 창해에탄올 창해연구소, ³전북대학교 화학공학부

The Mechanisms for Xylose Transport into Yeasts. Han, Ji-Hye¹, Gi-Wook Choi², Bong-Woo Chung^{1,3*}, and Jiho Min^{1,3*}. ¹Department of Bioprocess Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea, ²Changhae Institute of Cassava and Ethanol Research, Changhae Ethanol Co., Ltd., Jeonju 561-203, Korea, ³Division of Chemical Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea – The biochemical study of sugar uptake in yeasts started five decades ago and led to the early production of abundant kinetic and mechanistic data. However, the first accurate overview of the underlying sugar transporter genes was obtained relatively late, due mainly to the genetic complexity of hexose uptake in the model yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. The genomic era generated in turn a massive amount of information, allowing the identification of a multitude of putative sugar transporter and sensor-encoding genes in yeast genomes, many of which are phylogenetically related. This review aims to briefly summarize our current knowledges on the biochemical and molecular features of the transporters of pentoses in yeasts, when possible establishing links between previous kinetic studies and genomic data currently available. Emphasis is given to recent developments concerning the identification of D-xylose transporter genes, which are thought to be key players in the optimization of *S. cerevisiae* for bioethanol production from lignocellulose hydrolysates.

Key words: Sugar transporter, pentose transporter, xylose uptake, yeast

서 론

Hemicellulose 가수분해물로부터의 연료용 에탄올 생산은 환경적, 경제적으로 큰 장점을 가진다[11, 15]. *Saccharomyces cerevisiae*는 바이오매스 가수분해물로부터 에탄올 생산이 가장 효율적인 균주로 알려져 있고, 바이오에탄올 생산을 위한 최적의 균주로 평가되고 있다. 하지만 자연계에 존재하는 *S. cerevisiae*는 오탄당을 탄소원이나 에너지원으로 이용할 수 없기 때문에 오탄당인 xylose 및 arabinose가 5~20% 이상을 차지하는 hemicellulose 가수분해물을 이용한 에탄올 발효에 효율적으로 사용되지 못했다[13, 26]. 이를 극복하기 위해 lignocelluloses 원료로부터 얻어지는 육탄당과 오탄당의 동시 발효가 가능한 *S. cerevisiae* 대사공학적인 연구가 활발하게 이루어지고 있다[22]. 특히 이들 육탄당과 오탄당의 혼합당 발효를 위해서 자연계에 존재하는 대표적인 xylose 발효 효모인 *Pichia stipitis*로부터 분리한 xylose를 xylulose로 전환시키는 효소인 xylose reductase와 xylitol

dehydrogenase를 활용하거나, 또는 사상 곰팡이인 *Piromycesm sp*로부터 분리한 xylose isomerase를 *S. cerevisiae*에 도입하여 xylose 발효 재조합 *S. cerevisiae* 균주를 개발하였고, 에탄올 발효능을 향상시키기 위해 이들 효소의 활성을 조절하는 연구들이 활발히 진행되고 있다[11, 18, 28].

현재 개발된 재조합 *S. cerevisiae*에서 xylose는 육탄당 촉진기(Facilitator, Hxt protein, Gal2)를 통해 단독으로 섭취되지만, 육탄당 촉진기가 가지는 xylose에 대한 친화력(Km>100 mM)이 glucose 친화력에 비해 매우 낮기 때문에 [14] xylose 소모는 매우 느리고 배지에 존재하는 glucose의 농도에 의존적이다[28]. 특히 효율적인 xylose 발효능을 가진 선별된 *S. cerevisiae* 균주들은 xylose 이동 효율이 확연히 증가된 것이 관찰되었다[8, 17, 19, 26, 28].

Xylose 대사경로

산업용 에탄올 생산에 이용되는 *S. cerevisiae*는 xylose를 이용하지 못하지만 그 이성질체인 D-xylulose를 이용하여 에탄올로 발효하므로[12], xylose를 xylulose으로 전환시키는 외래 경로를 도입하는 것이 *S. cerevisiae*내에서 xylose 대사를 위한 첫 번째 단계이다. 따라서 자연에 존재하는 박테리아 또는 곰팡이의 오탄당 대사경로를 *S. cerevisiae*에 도입하여 효율적으로 발현시키고자 하는 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

Xylose 이용 박테리아는 xylose isomerase(XI)(EC 5.3.1.5)

*Corresponding author

J. Min

Tel: 82-63-270-2436, Fax: 82-63-270-2306

E-mail: jihomin@chonbuk.ac.kr

B.-W. Chung

Tel: 82-43-270-2309, Fax: 82-43-270-2306

E-mail: bwchung@chonbuk.ac.kr

를 이용해 D-xylose를 D-xylulose로 변환시키며, xylulose는 다시 xylulokinase(XK) (EC 2.7.1.17)에 의해 xyulose-5-phosphate로 인산화되고, 인산화 된 당은 pentose phosphate pathway(PPP)를 통해 다시 대사된다[12]. 박테리아에 비해 자연계에 존재하는 xylose 대사 곰팡이는 조효소 NAD(P)H와 NAD(P)⁺를 포함하는 산화환원반응으로 구성되어 있는 좀더 복잡한 대사경로를 가지고 있다(Fig. 1)[12]. Xylose는 NAD(P)H에 의존하는 xylose reductase(XR)(EC 1.1.1.21)에 의해 xylitol로 환원되며, xylitol은 NAD⁺ 의존 xylitol dehydrogenase(XDH) (EC 1.1.1.21)에 의해 xylulose로 산화된 후 박테리아에서와 마찬가지로 xylulose는 xylulokinase(XK)에 의해 xylulose-5-phosphate로 인산화된다[12]. *S. cerevisiae*는 자체적으로 xylose 대사 경로에 이용되는 효소들(XR, XDH, XK)을 암호화하는 유전자를 가지고 있지만 xylose를 활용하기엔 그 발현량이 너무 적고, 그 유전자들을 과발현해도 xylose만 존재하는 배지 조건하에서는 *S. cerevisiae*는 성장하지 않는 것으로 관찰되었다[12]. *S. cerevisiae*에 존재하는 xylose 대사 효소로 암호화되는 이들 유전자들의 발현 개선만으로는 xylose 발효가 불가능하므로, 박테리아나 곰팡이의 xylose 대사 경로를 *S. cerevisiae*에 도입하여 발현시키는 연구가 이루어지고 있다. 하지만 단순히 *S. cerevisiae*에 xylose 대사 경로만 도입시킨 재조합 균주는 산업적으로 에탄올 발효에 이용하기에는 에탄올 발효 능력이 부족하다[12, 26]. 따라서 재조합 *S. cerevisiae*의 xylose 발효를 통하여 에탄올 생산을 증가시키고자 xylose 초기 이용단계에서의 세포의 산화환원대사와 중심 탄소대사의 흐름 등의 여러 가지 전략적인 대사공학적인 연구가 필요하다[12, 24].

당 운반기(sugar transporter)와 xylose 관계

당은 *S. cerevisiae*의 탄소원 및 중요 에너지원으로써, 대사적 흐름을 조절하여 세포내로 당 섭취를 증가시키는 연구가 꾸준히 진행되었다[27]. *S. cerevisiae*에서 오탄당은 육탄당보다 1-2배 낮은 친화력으로 육탄당 운반기를 통해 이동

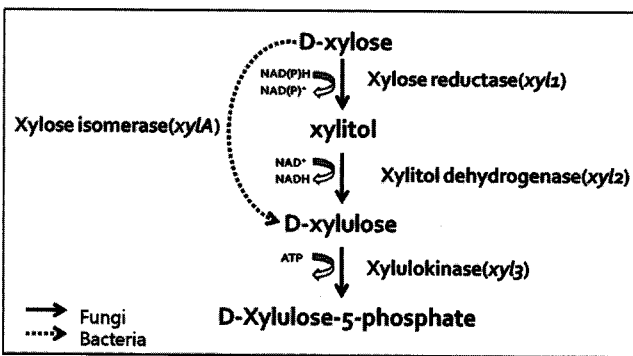


Fig. 1. The initial xylose utilization pathway in bacteria and fungi.

한다고 알려져 있다[12, 22]. 오탄당 운반은 오탄당을 이용한 바이오에탄올 발효에 있어서 중요한 초기 조절 단계이지만, xylose 운반은 극히 낮은 농도의 xylose에서 xylose reductase의 활성이 높은 균주에서만 xylose 전환을 조절하는 것이 대사단계 조절 연구에 의해 증명되었다[8, 12]. 오탄당의 이용이 가능한 재조합 *S. cerevisiae*에서 오탄당 운반기의 발현에 관한 연구는 거의 보고되어있지 않으며[14, 34], 사실상 재조합 arabinose 발효 *S. cerevisiae*에서 galactose permease(Gal2)의 과발현만이 보고되어[1], 외래 막 단백질을 활발하게 발현하는데 어려움이 있음을 보여주고 있다[8, 23]. 최근 괄목할 만한 성과로, *S. cerevisiae*에서 *Candida intermedia* 유래의 glucose/xylose의 확산을 용이하게 하는 운반기와 공동수송기(Symporter)의 이중발현이 처음으로 활성화 되었음이 보고 되었다[8, 11]. 아직 균주의 발효성능은 보고되지 않았지만 외래 xylose 운반기의 발현은 xylose 발효 *S. cerevisiae* 균주의 xylose 활용률을 증가시킬 수 있는 새로운 대사공학 전략을 열었다고 할 수 있다.

당 운반기(sugar transporter)의 일반적인 특성

Sugar porter(SP) 계열은 major facilitator superfamily(MFS) 내의 최대 계열로서, 박테리아, 고세균과 진핵생물에 존재하는 다양한 서열의 단백질로 구성되어 있으며, 기능 역시 매우 다양한 것으로 알려져 있다[5, 27]. Transporter Classification(TC) 시스템은 기능과 계통발생적 데이터에 따라 막 이동 운반 단백질을 분류하는데 사용되며, 사실상 특성이 밝혀진 모든 효모내 당 운반기는 이 시스템에 의해 분류된다[27]. 최근, *Candida albicans*로부터 분리된 95개의 잠재적 MSF 단백질은 포괄적인 생물 정보학을 기반으로 17개의 다른 TC계열로 정의 분류되었다[10, 27]. Yeast Transport Protein Database(<http://rsat.ulb.ac.be/ytpdb/>)는 최근까지 확인되거나 예측된 생물막 운반기로 분류되는 효모의 단백질에 대한 유용한 자료를 제공한다[27].

일반적으로 MSF 계열에 속하는 막투과 효소는 친수성 아미노산 고리에 의해 연결되는 여섯 개의 소수성 transmembrane-spanning(TMS) α-helix가 2개의 세트에 이루어진 필수 막 단백질로, 그들이 비록 서열의 유사성은 낮을지라도 그 구조의 보존은 강하게 나타난다[35]. 효모에서 대부분의 단당류 운반기는 확산 촉진(facilitated diffusion)에 의해 작동하는데, 이는 막을 통해 저농도로 이동하는 단일 용질 분자의 이동을 촉진하여 에너지를 필요로 하지 않는 메커니즘이다. 반면, 배지 내의 당의 농도가 매우 낮을 때 작동하는 다른 효모 단당류 운반기는 그것의 농도 변화에 대하여 용질을 운반시킬 수 있는 에너지 소비 시스템이며, 전자의 동시 다발적인 이동으로 연결된다(Fig. 2). 마지막으로 SP subfamily(Snf3p 등)의 몇몇 효모 세포막은 당을 이동시킬 수 없고, 세포 표면에서 당질의 존재를 신호화하면서, 수용체 역할을 하는 것으로 보여지며, 그로 인해 유전자 발현의

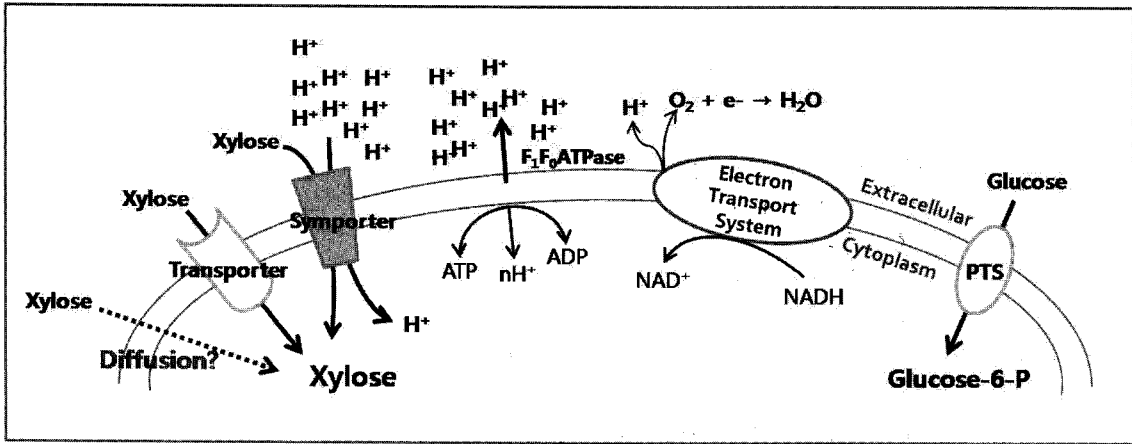


Fig. 2. Topology of yeast sugar transporters.

수준에 영향을 끼친다[24, 27].

5가지의 구조적으로 유사한 motif가 그들의 메커니즘 또는 기질 특이성에 상관없이 당 운반기에서 발견되었고[15, 27], 그것은 추정된 신규 당 운반기 유전자의 확인을 상당히 용이하게 했다[27]. 효모에서 SP subfamily는 *S. cerevisiae*에서는 34개, *Candida glabrata*에서는 17개, *Kluyveromyces lactis*에서는 20개, *Debaryomyces hansenii*에서는 48개, *Yarrowia lipolytica*에서는 27개의 운반기를 가지는 가장 가변성 있는 변수이다[5, 27].

효모내 D-xylose와 L-arabinose 운반기의 생화학적 특성과 조절

Xylose와 arbinose는 lignocelluloses 가수분해물에 상당량

존재하며, 연료용 바이오에탄올의 생산을 위한 기질로서 농림, 산림잔여물로부터 얻을 수 있다. 불완전하지만 곰팡이 내에서의 오타당 운반기에 대한 연구 내용은 xylose와 arbinose 발효를 위하여 개발된 *S. cerevisiae*의 개선에 큰 영향을 주는 매우 중요한 자료가 된다[11]. Table 1은 다른 자낭균 효모의 xylose와 arabinose 흡수와 조절의 특성에 관해 요약한 자료이다. 효율적으로 xylose 이용하는 효모는 보통 낮은 친화력과 높은 친화력의 xylose 섭취 시스템을 가지고 있다. 일반적으로, 낮은 친화력 시스템은 확산 촉진 기작에 의해 xylose를 운반하고, 반면에 높은 친화력 시스템은 xylose/H⁺ 공동수송기에 의해 xylose를 운반한다[9]. 드문 예로, 당이 풍부할 때 낮은 친화력의 촉진기가 발현되는 동안 낮은 농도의 당에서 공동운반기가 발현되기도 한다[27].

Table 1. Biochemical properties of pentose transport systems characterized in yeasts.

Yeast	Growth substrate	Sugar (gL ⁻¹)	Substrate uptake	Characteristics			References
				Mechanism ¹	K _m (mM)	V _{max} ²	
<i>C. intermedia</i>	Xylose	20	Xylose	FD	51.5	10	[9]
				SYMP	0.4	1	
	Glucose	20	Xylose	FD	51.9	11	
<i>P. stipitis</i> PYCC4374	Xylose	20	Xylose	SYMP	2.26	3.4	[20]
				SYMP	0.079	0.8	
	Glucose	20	Xylose	SYMP	3.69	2.6	
				SYMP	0.38	0.4	
<i>P. stipitis</i> CBS5774	Xylose	20	Xylose	FD	19-21	2	[37]
				FD	0.2-2.8	0.4-1	
	Glucose	20	Xylose	FD	43-80	1-6	
				FD	3.2	0.5	
<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	20	Xylose	FD	92-175	ND	[21]
		20			120	4.8	[16]
		20		FD	190	6.0	[22]
				FD	1500	ND	

¹Transport mechanism: FD, facilitated diffusion; SYMP, proton symport; NC, not characterized.

²V_{max} (mmol h⁻¹g⁻¹dw); ND not determined.

비록 arabinose 이화작용이 xylose와 매우 유사 하더라도 두 당은 분명히 구별되는 흡수 체계를 이용한다[7, 30, 35]. *Pichia guilliermondii*와 *Candida arabinofermentans* 경우에서 보면, 최근 두 개의 낮은 친화력과 높은 수용력 arabinose 운반 체계가 생화학적으로 특징화되었으며[7], 이 두 운반기는 arabinose에 대하여 크게 특이적이지만 glucose와 xylose는 흡수하지 않는 것은 매우 흥미롭다[7]. Arabinose 이용 효모는 이 낮은 친화력-확산 촉진 이외에도 덜 특이적 arabinose/H⁺ 공동운반기 뿐만 아니라 높은 친화력을 가지고 있다. 이러한 운반기의 조절은 glucose/xylose 운반기와 비슷하다. D-xylose와 L-arabinose는 wild type 균주에 의해 대사작용을 못하지만 Hxt 운반기를 도입한 *S. cerevisiae*에서는 이용될 수 있다. 비록 D-xylose는 glucose와 비교할때 그 이용이 100배 정도 낮은 기질이지만(Table 1)[21, 22, 27, 34], 알려진 18개의 육탄당 운반기 중 높거나 중간 친화력을 가지는 Hxt4p, Hxt5p, Hxt7p, Gal2p는 D-xylose 섭취에 가장 관련이 있는 운반기이다[14, 27]. 하지만 D-xylose와 L-arabinose는 galactose 운반기인 Gal2p에게는 부적절한 기질이다[4].

효모로부터 분리된 오탄당 운반기관련 유전자

곰팡이 xylose 운반기의 분리에 관한 많은 연구 노력이 있었지만, *S. cerevisiae*에서의 기능적 상보성을 기본으로 하는 유전학적인 접근은 낮은 친화력에 의존하는 운반기에 대한 것에만 머물고 있다[27, 37]. 예를 들어, 기능적 보완에 의한 *P. stipitis* 5774로부터 xylsoe 운반기의 분리 시도는 앞에서 언급한대로 낮은 친화력의 glucose/xylose 공동수송기인 Sut1-3는 얻었지만(Table 1)[27, 28], 최근에 *P. stipitis* 5774의 유전자 염기서열 밝혀졌음에도[17] 높은 친화력을 가지는 xylsoe 공동수송기를 암호화하는 유전자들은 분리하지 못하였다[27, 29].

최근 Leandro 등은 *C. intermedia*로부터 분리된 2가지의 glucose/xylose 운반기인 GXF1과 GXS1을 *S. cerevisiae*내로 도입하고, xylsoe 발효 특성을 연구하였다[28, 29]. GXF1과 GXS1은 각각 glucose/xylose 촉진기와 공동수송기를 암호화하며, 각각의 Km값은 50 mM과 0.4 mM이다[27, 29]. GXS1은 분자수준에서 특징화된 첫번째 곰팡이 glucose/xylose 공동수송기이다. 그러나 재조합 *S. cerevisiae*에서 GXF1은 활발하게 기능하는 반면, GXS1 단백질은 활성이 매우 약하였다[27, 28]. 게다가 일정한 조건 하에서 GXS1과 GXF1의 동시발현은 GXS1의 mRNA를 크게 감소시켰다[27]. 앞서 설명한 대로 GXF1은 HXT가 없는 *S. cerevisiae*의 기능적 보완을 위하여 활용이 가능하였지만, GXS1의 경우는 극히 낮은 활성이 관찰되어 *S. cerevisiae*로 도입할 경우 더욱 정교한 과정이 요구된다. GXS1과 GXF1의 서로 다른 현상은 공동수송기의 기능적인 발현을 저해하는 요인이 숙주 균주의 환경에 존재하는지의 의문을 제기시켰다[27].

S. cerevisiae 내에서 원형질막으로의 이중 운반기의 표적화(targeting) 효율 저해는 종종 관찰되었다[38]. 게다가 낮은 친화력과 높은 친화력의 명백한 관계는 다른 효모에서도 관찰되었고[2, 30, 35], 이들 연구에서는 운반기 단백질의 발현은 엄격하게 조절된다고 제시하였다[28]. 이와 같은 *S. cerevisiae*에서의 복잡한 현상은 육탄당 운반기에 포함되는 광범위한 HXT 유전자들의 발견 후에 알려졌다[28]. 규제 메커니즘은 전사단계 조절과 운반기의 표적화 효율 저해를 모두 포함하는 가장 중요한 요소의 활성을 지배하고, 성장배지 내의 당의 농도에 의해 주로 지시받는다[23, 32].

요 약

*S. cerevisiae*의 치명적인 약점인 xylose 또는 arabinose가 상당부분을 차지하는 hemicellulose 가수분해물인 오탄당 발효의 극히 낮은 효율은 유전자 변형 및 대사적 흐름을 조절하여 세포 내로의 오탄당 섭취 및 활용 증가를 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. *S. cerevisiae*에서 오탄당은 육탄당보다 1-2 배 낮은 친화력을 가지고 있어, 오탄당 운반은 이를 이용한 바이오에탄올 발효에 있어서 중요한 초기 조절 단계이다. 오탄당 이용가능 *S. cerevisiae*에서 오탄당 운반기의 발현 관련 소수의 연구가 보고되고는 있으나 아직까지 눈에 띄는 효율 증가는 보고되지 않았다. 최근 보고된 *S. cerevisiae*에서 *C. intermedia* 유래의 glucose/xylose의 확산을 용이하게 하는 운반기와 공동수송기의 이중발현이 처음으로 활성화 되었음이 보고 되었다. 따라서 그러므로 높은 친화력의 xylose 운반기의 발현은 이미 xylose로부터 바이오에탄올 발효공정은 최적화되어 있지만 여전히 몇 가지 제한 요소들을 가지고 있는 *S. cerevisiae* 균주들의 xylsoe 발효공정 효율 향상에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 산업자원부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신 인력양성사업으로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Becker, J. and E. Boles. 2003. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4144-4150.
2. Cason, D. T., I. Spencer-Martins, and N. van Uden. 1986. Transport of fructose by a proton symport in a brewing yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 307-309.
3. Chin, J. W., R. Khankal, C. A. Monroe, C. D. Maranas, and P. C. Cirino. 2008. Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol.*

- Bioeng.* **102**: 209-220.
4. Cirillo, V. P. 1968. Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Nonmetabolized sugars as substrates and inducers of the galactose transport system. *J. Bacteriol.* **95**: 1727-1731.
 5. De Hertogh, B., F. Hancy, A. Goffeau, and P. V. Baret. 2006. Emergence of species-specific transporters during evolution of the *Hemiascomycete* phylum. *Genetics.* **172**: 771-781.
 6. Does, A. L. and L. F. Bisson. 1989. Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microb.* **55**: 159-164.
 7. Fonseca, C., R. Romão, H. Rodrigues de Sousa, B. Hahn-Hägerdal, and I. Spencer-Martins. 2007. L-Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS J.* **274**: 3589-3600.
 8. Gárdonyi, M., M. Jeppsson, G. Lidén, M.F. Gorwa-Grauslund, and B. Hahn-Hägerdal. 2003a. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **82**: 818-824.
 9. Gárdonyi, M., M. Österberg, C. Rodrigues, I. Spencer-Martins, and B. Hahn-Hägerdal. 2003b. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Res.* **3**: 45-52.
 10. Gaur, M., N. Puri, R. Manoharlal, V. Rai, G. Mukhopadhyay, D. Choudhury, and R. Prasad. 2008. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics.* **9**: 579-590.
 11. Hahn-Hägerdal, B., K. Karhumaa, C. Fonseca, I. Spencer-Martins, and M. F. Gorwa-Grauslund. 2007. Towards industrial pentosefermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 937-953.
 12. Hahn-Hägerdal, B., K. Karhumaa, M. Jeppsson, and M. F. Gorwa-Grauslund. 2007. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **108**: 147-177.
 13. Hahn-Hägerdal, B., N. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, and G. Zacchi. 2006. Biol-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trend Biotechnol.* **24**: 549-556.
 14. Hamacher, T., J. Becker, M. Gárdonyi, B. Hahn-Hägerdal, and E. Boles. 2002. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **148**: 2783-2788.
 15. Henderson, P. J. F., and M. C. J. Maiden. 1990. Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. Land B.* **326**: 391-410.
 16. Heredia, C. F., A. Sols, and G. Delafuente. 1968. Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* **5**: 321-329.
 17. Jeffries, T. W., I. V. Grigoriev, J. Grimwood, J. M. Laplaza, A. Aerts, A. Salamov, J. Schmutz, E. Lindquist, P. Dehal, H. Shapiro, Y.-S. Jin, V. Passoth, and P.M. Richardson. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.* **25**: 319-326.
 18. Jeffries, T. W. 2006. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 320-326.
 19. Karhumaa, K., B. Wiedemann, B. Hahn-Hägerdal, E. Boles, and M. F. Gorwa-Grauslund. 2006. Co-utilization of L-arabinose and Dxylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microb. Cell Fact.* **5**: 18.
 20. Kilian, S. G. and N. van Uden. 1988. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 545-548.
 21. Kotyk, A. and C. Haškovec. 1967. Properties of the sugar carrier in baker's yeast. II. Specificity of transport. *Folia Microbiol (Praha)* **12**: 121-131.
 22. Kötter, P. and M. Ciriacy. 1993. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 776-783.
 23. Kresnowati, M. T. A. P., W. A. van Winden, M. J. H. Almering, A. ten Pierick, C. Ras, T. A. Knijnenburg, P. Daran-Lapujade, J. T. Pronk, J. J. Heijnen, and J. M. Daran. 2006. When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 49.
 24. Kruckeberg, A. L., M. C. Walsh, and K. van Dam. 1998. How do yeast cells sense glucose? *Bioessays* **20**: 972-976.
 25. Kruckeberg, A. L., L. Ye, J. A. Berden, and K. van Dam. 1999. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem. J.* **339**: 299-307.
 26. Kuyper, M., M. J. Toirkens, J. A. Diderich, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **5**: 925-934.
 27. Leandro, M. J., C. Fonseca, and P. Concalves. 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res.* **9**: 511-525.
 28. Leandro, M. J., I. Spencer-Martins, P. Concalves. 2008. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. *Microbiology* **154**: 1646-1655.
 29. Leandro, M. J., P. Goncalves, and I. Spencer-Martins. 2006. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochem. J.* **395**: 543-549.
 30. Lucas, C. and N. van Uden. 1986. Transport of hemicelluloses monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biot.* **23**: 491-495.
 31. Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Jr Saier. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **62**: 1-34.
 32. Rolland, F., J. Winderickx, and J. M. Thevelein. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **2**: 183-201.
 33. Runquist, D., C. Fonseca, P. Radström, I. Spencer-Martins, and B. Hahn-Hägerdal. 2009. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation

- performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 123-130.
34. Saloheimo, A., J. Rauta, and O. V. Stasyk. 2007. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1041-1052
35. Spencer-Martins, I. and N. van Uden. 1985. Catabolite interconversion of glucose transport systems in the yeast *Candida wickerhamii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**, 168-172.
36. Vardy, E., I. T. Arkin, K. E. Gottschalk, H. R. Kaback, and S. Schuldiner. 2004. Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. *Protein Sci.* **13**: 1832-1840.
37. Weierstall, T., C. P. Hollenberg, and E. Boles. 1999. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol. Microbiol.* **31**: 871-883.
38. Wieczorke, R., S. Dlugai, S. Krampe, and E. Boles. 2003. Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell Physiol. Biochem.* **13**, 123-134.

(Received Feb. 27, 2010/Accepted March 15, 2010)