

# 细菌细胞表面展示技术及其在环境修复领域的应用研究进展

王旭<sup>1</sup>, 徐微<sup>1</sup>, 周宁一<sup>2</sup>, 丁俊美<sup>\*1</sup>

1 云南师范大学生命科学学院 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南 昆明 650500

2 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

王旭, 徐微, 周宁一, 丁俊美. 细菌细胞表面展示技术及其在环境修复领域的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1854-1872.

WANG Xu, XU Wei, ZHOU Ningyi, DING Junmei. Bacterial surface display and research progress in applications of this technology in environmental remediation[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1854-1872.

**摘要:** 细菌细胞表面展示是一项重要的生物工程技术, 其将外源靶标蛋白、多肽或其他生物大分子表达于细菌表面, 以更好地实现其功能。该技术在生物催化、生物修复、生物传感器和疫苗设计等多个领域得到广泛应用。本文首先对革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的表面展示系统进行介绍, 概括了目前已知的主要宿主菌和锚定蛋白种类; 然后重点阐述了细菌表面展示技术在生物修复领域的最新应用研究进展; 最后总结了细菌表面展示技术在应用中存在的局限性, 并展望了未来可能的发展方向, 以期深入扩大和拓展该技术在生物修复实践中的具体应用。

**关键词:** 细菌; 细胞表面展示; 锚定蛋白; 生物修复; 全细胞催化剂

资助项目: 国家自然科学基金(32070106); 云南省应用基础研究计划重点项目(202301AS070012); 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才项目(YNWR-QNBJ-2019-001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070106), the Applied Basic Research Foundation of Yunnan Province (202301AS070012), and the Ten Thousand Talent Plans for Young Top-notch Talents of Yunnan Province (YNWR-QNBJ-2019-001).

\*Corresponding author. E-mail: djm@ynnu.edu.cn

Received: 2023-12-31; Accepted: 2024-03-04; Published online: 2024-03-28

# Bacterial surface display and research progress in applications of this technology in environmental remediation

WANG Xu<sup>1</sup>, XU Wei<sup>1</sup>, ZHOU Ningyi<sup>2</sup>, DING Junmei<sup>\*1</sup>

1 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy of Ministry of Education, School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** Bacterial surface display is an important biotechnology that involves expressing exogenous target proteins, peptides, or other biomolecules on the surface of bacterial cells to better realize their functions. This technology has been applied in various fields such as biocatalysis, bioremediation, biosensors, and vaccine design. This article first introduces the surface display systems of both Gram-negative and Gram-positive bacteria and summarizes the main host bacteria and anchored proteins currently known. It then reviews the latest research progress in the applications of bacterial surface display in bioremediation. Finally, this paper summarizes the limitations of bacterial surface display in application and makes an outlook on the future research directions, aiming to expand the specific applications of this technology in bioremediation practice.

**Keywords:** bacteria; cell surface display; anchor protein; bioremediation; whole-cell biocatalyst

微生物细胞表面展示(microbial cell surface display)技术是将外源蛋白与锚定蛋白融合后导入宿主细胞,实现外源蛋白或肽在噬菌体、细菌或酵母等微生物细胞表面的表达,构建全细胞催化剂<sup>[1]</sup>。这一系统的组成包括靶标蛋白或乘客蛋白(target protein or passenger protein)、锚定蛋白或载体蛋白(anchor protein or carrier protein)以及宿主细胞(host cell)<sup>[2]</sup>。相较于蛋白的胞内表达,利用细胞表面展示技术构建的全细胞催化剂具有多方面的优势:首先,直接培养微生物细胞即可实现蛋白或多肽的表达,且可以通过离心或过滤获得全细胞催化剂,无须进行细胞破壁及蛋白纯化等烦琐操作;其次,与纯化的胞内或胞外分泌表达的酶相比,全细胞催化剂对有机溶剂、温度和 pH 变化具有较好的稳定性,能长期保存且可被反复利用;最后,全细胞催化剂具有较高的催化活性,反应

直接在细胞表面发生,避免了大分子底物无法通过细胞膜进入细胞内部的问题,并且避免了外源蛋白的积累对宿主细胞的毒害<sup>[3]</sup>。

1985年,Smith首次报道了噬菌体表面展示技术,通过将外源基因插入丝状噬菌体(filamentous bacteriophage)的基因组,成功实现了目的基因编码的多肽以融合蛋白的形式表达在细胞表面<sup>[4]</sup>。由于在噬菌体表面展示技术领域的杰出贡献,Smith共享了2018年诺贝尔化学奖。然而,噬菌体表面展示技术存在一定的局限性。例如,噬菌体展示过程中必须经过细菌转化和噬菌体包装,某些展示系统还需要进行跨膜分泌,这限制了建库的容量和分子多样性,同时对于分子量较大的蛋白质展示也较为困难。因此,基于其他微生物宿主细胞如细菌(革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌)和酵母的细胞表面展示系统也逐渐被开发及应用<sup>[1]</sup>。外源靶标蛋白与细菌

内源的锚定蛋白可以通过三种方式融合(N端、C端或插入N端和C端中间),实现靶标蛋白的转录、翻译以及锚定在细菌的细胞表面(图1)<sup>[2]</sup>。由于高效的转化效率和易于操作的遗传转化体系,革兰氏阴性细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)是细菌表面展示技术中应用最广的微生物宿主细胞<sup>[5]</sup>。此外,肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)<sup>[6]</sup>、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)<sup>[7]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)及芽孢(spore)<sup>[8]</sup>、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)<sup>[9]</sup>、乳酸菌(lactic acid bacteria)<sup>[10]</sup>等也常用作细菌细胞表面展示的宿主细胞。细菌细胞表面展示技术在全细胞催化剂和疫苗制备、抗体筛选和生产、环境污染修复、生物传感器以及活细菌疫苗递送等领域得到了广泛应用。本文基于细菌(包括革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌)表面展示系统的种类和展示机理,重点阐述了细菌细胞表面展示技术在生物修复领域的应用,并对该系统在应用中出现的问题及未来发展方向进行了讨论。

## 1 细菌细胞表面展示系统的种类和原理

### 1.1 革兰氏阴性细菌的细胞表面展示

革兰氏阴性细菌如大肠杆菌(*E. coli*)具有

清晰的遗传背景,遗传操作简单和快捷。细胞膜结构主要由内膜(inner membrane, IM)、外膜(outer membrane, OM)及内外膜之间的周质空间(periplasm)组成,相较于革兰氏阳性细菌,革兰氏阴性细菌的细胞壁结构中肽聚糖含量较低。因此,大多数关于原核细胞表面展示的研究集中在利用革兰氏阴性细菌尤其是大肠杆菌作为表面展示宿主菌;在这种展示系统中,外源蛋白(即靶标蛋白)与细菌内源的锚定蛋白融合表达后穿过细胞质内膜及周质空间,最终在细胞外膜表达<sup>[2-3,5]</sup>。目前,基于不同的锚定蛋白(细胞表面附着物、外膜蛋白、冰核蛋白、自转运蛋白等)开发出多种展示系统,用于不同外源蛋白的细胞表面表达(表1)。

#### 1.1.1 细胞表面附着物表面展示系统

细胞表面附着物(鞭毛、菌毛和性菌毛)存在于特定细菌的表面。鞭毛蛋白FliC和FliD是鞭毛杆和鞭毛帽的主要组成成分,它们的N端和C端结构域相对较保守,而中间可变结构域可用作外源蛋白/多肽的插入区域,因此,FliC和FliD可被用来作为细菌表面展示的载体蛋白<sup>[12,21-22]</sup>。菌毛蛋白中的两个主要亚基FimA和FimH,以及性菌毛中的F菌毛亚基,均可作为锚定蛋白用于外源靶标蛋白/肽的细菌细胞表面展示(图2)。然而,基于细胞表面附着物相关蛋白的细胞表面展

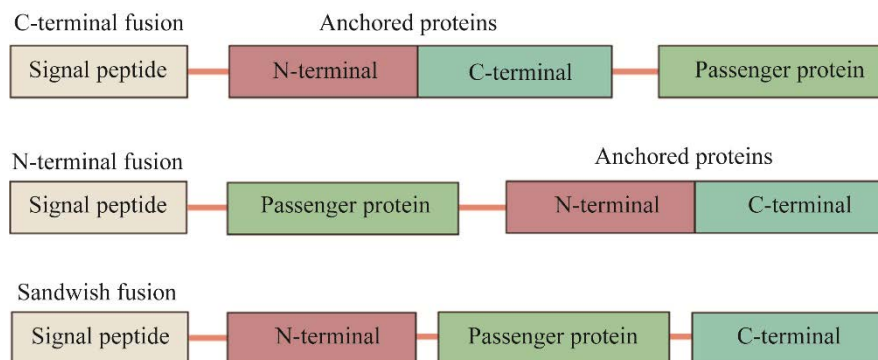


图1 细菌细胞表面展示系统目的蛋白与锚定蛋白的3种融合方式(改编自参考文献[2,5])

Figure 1 Three fusion methods of the target proteins with anchor proteins in bacterial surface display systems (adapted from references [2,5]).

表 1 革兰氏阴性细菌典型的细胞表面展示系统及应用

Table 1 Typical cell surface display system and its applications of Gram-negative bacteria

Anchor protein, fusion method, Host strain	Target protein, source and size (kDa)	Result and application	Reference
FimH, N-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Luciferase (GLuc, 18.5 kDa) from <i>Gaussia princeps</i> ; Human epidermal growth factor (EGF, 5.8 kDa)	GLuc and EGF were separately fused to FimH and functionally expressed on the surface of <i>E. coli</i> cells. The FimH-EGF fusion protein can bound to the EGFR on cancer cells inducing EGFR phosphorylation and GLuc was used to track tumors	[11]
FliC, N-terminal fusion, <i>L. plantarum</i>	Profilin (19.6 kDa) from <i>Eimeria tenella</i>	A recombinant <i>L. plantarum</i> constructed by fusion of profilin with FliC from <i>Salmonella enterica</i> , the engineered strain could induce T-cell differentiation and also significantly attenuate pathological damage in the cecum	[12]
OmpC, C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Pesticide-binding peptide monomer (SPPWPPRP) and dimer from <i>Sphingomonas</i> sp. TFEE	The recombinant <i>E. coli</i> strain with surface-displayed pesticide binding dimers using OmpC could adsorb fenitrothion more efficiently than strain containing monomer binding peptide and both were higher than the control	[13]
OmpC, C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Manganese (Mn) and cobalt (Co) binding peptide (MCBP, 3.3 kDa)	MCBP was fused with loop 2, loop 6 or loop 8 of OmpC and displayed on the surface of <i>E. coli</i> cells, respectively. MCBP fused with loop 6 showed the highest metal recovery for Mn (1 235.14 $\mu\text{mol/g}$ dry cell weight) and Co (379.68 $\mu\text{mol/g}$ dry cell weight), respectively	[14]
MipA MV <sup>140</sup> , C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Thermostable lipase (49.9 kDa) from <i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1; $\alpha$ -amylase (47.3 kDa) from <i>B. subtilis</i>	The lipase was expressed on the surface of <i>E. coli</i> cells through fusion with C-terminal of <i>mipA</i> gene. The activity of whole-cell catalyst was found to be about 20-fold higher than that of previous whole-cell catalysts constructed using FadL and OprF as anchors	[15]
FadL, C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	PET hydrolase (PETase, 30 kDa) from <i>Ideonella sakaiensis</i> 201-F6	PETase and a hydrophobic protein HFBII fusion with FadL were displayed on the surface of <i>E. coli</i> cells. The engineered strain displayed good stability, maintaining 73% of its initial activity after 7 days of incubation at 40 °C and retaining 70% of its initial activity after seven cycles	[16]
InaQ-N, C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Chitosanase (CSN46A, 26.7 kDa) from <i>Bacillus</i> sp. MD-5	CSN46A was displayed on surface of <i>E. coli</i> cells through fusion with InaQ-N. The specific enzyme activity of recombinant strain containing two copies of InaQ-N was 45.6% higher than that of containing a single copy	[17]
INPN, C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Carboxylesterase (CarCby, 52.8 kDa) from <i>B. velezensis</i>	The engineered strain constructed by surface-displayed CarCby on <i>E. coli</i> cells showed better activity and long-term stability than free CarCby, while it could completely hydrolyze 30 mg/L of carbaryl within 12 h	[18]
Lpp-OmpA, C-terminal fusion, <i>E. coli</i>	Metallothionein (MT, 26.7 kDa) from <i>Tetrahymena hemophilia</i>	The recombinant strain constructed by displaying MTT5 on <i>E. coli</i> cells through fusion with Lpp-OmpA exhibited a 4.9-fold higher adsorption capacity for Cd than <i>E. coli</i>	[19]
ATs (AIDA), N-terminal fusion, <i>E. coli</i>	The endo $\beta$ -1,4-xylanase (XynA, 54 kDa) from <i>Clostridium cellulovorans</i>	XynA fused with AIDA was displayed on the surface of <i>E. coli</i> . The optimal enzyme activity of whole-cell catalyst was observed at 55 °C and pH 6.5. The activity of XynA could be activated by CaCl <sub>2</sub> , with 2.4-fold increase with the addition of 5 mmol/L CaCl <sub>2</sub>	[20]

示具有一些应用上的局限性,如展示分子量较大的蛋白或具有特殊构象的蛋白可能会影响鞭毛、菌毛或性菌毛本身的结构组成和功能<sup>[2,11]</sup>。

### 1.1.2 外膜蛋白表面展示系统

外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)是一类膜整合蛋白,不含 $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helices)结构,主要以 $\beta$ 桶( $\beta$ -barrel)折叠形式存在于外膜中;它们在周质空间中通过短转角(turn)和膜外长环区(loop)连接。外源蛋白可以插入锚定蛋白所在的外膜环区,而不会破坏细胞膜的完整性和稳定性(图2),也可以与外膜蛋白的N端或C端融合,表达后定位于细胞表面。因此,基于外膜蛋白的表面展示系统通常用于展示分子量相对较小的外源靶标蛋白,并需要信号肽引导其定位于细胞膜外,此系统常用于多肽文库或抗体的筛选。革兰氏阴性细菌,特别是大肠杆菌,拥有多种外膜蛋白,如PhoE (protein pore E precursor)<sup>[24]</sup>、LamB<sup>[24]</sup>、OmpA/C/F/S/T/X (outer membrane protein A/C/F/S/T/X)<sup>[3,13-14,25]</sup>、MipA<sup>[15]</sup>、FadL (48.8 kDa)<sup>[26]</sup>、OprF<sup>[27]</sup>和YiaT<sup>[28]</sup>等。这些蛋白均已成功展示过各种外源靶标蛋白,包括酶、多肽和抗体。展示不同的外源蛋白需要选择合适的外膜锚定蛋白。结合外源蛋白的结构特征,通过优化锚定蛋白的选择,也有成功展示分子量较大靶标蛋白的报道。例如,Narita等<sup>[29]</sup>利用来自枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中的膜蛋白PgsA作为锚定蛋白,通过与其C端融合,将来自*Streptococcus bovis*的 $\alpha$ -淀粉酶(77 kDa)和来自*Candida antarctica*的脂肪酶B(34 kDa)分别展示到了*E. coli*的细胞表面。Baek等<sup>[30]</sup>利用截短的OmpC作为锚定蛋白,将来自*Pseudomonas fluorescens* SIK的脂肪酶(50 kDa)展示到了*E. coli*细胞表面。YiaT是大肠杆菌中的一种外膜蛋白,包含5个定位于细胞外膜外的Loop环<sup>[28]</sup>。Han等利用YiaT作为锚定蛋白,在大肠杆菌XL10-Gold的细胞表面成功展示了

76 kDa的脂肪酶和73 kDa的 $\alpha$ -淀粉酶,其酶活性比利用OprF和FadL作为锚定蛋白构建的全细胞催化剂分别提高了10倍和20倍<sup>[28]</sup>。

### 1.1.3 冰核蛋白表面展示系统

冰核蛋白(ice nucleation protein, INP)是一种存在于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)等微生物中的外膜蛋白,是原核表面展示系统中最典型的锚定蛋白之一,其中,丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)来源的INP是目前细菌细胞表面展示系统中应用最广泛的锚定蛋白<sup>[2]</sup>。INP包含三个部分结构:N端(N-terminal)结构域、C端(C-terminal)结构域及中间圆柱形重复(central cylindrical repeating)结构域<sup>[2]</sup>。N端结构域具有较强的疏水性,通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)结合在细菌外膜上,而C端结构域则具有良好的亲水性并暴露于细胞外,中间重复结构域为冰晶形成的模板<sup>[2]</sup>。外源靶标蛋白(包括分子量较大的蛋白)可以通过与INP的C端结构域融合,实现其在细胞膜上定位表达;除了使用全长INP(C端)与目的蛋白融合以实现细胞外膜定位外,还可以对INP截短,去除其中间重复结构域,保留N和C端结构域,将外源靶标蛋白与C端结构域融合;或去除中间重复结构域和C端结构域,仅保留N端结构域并与外源蛋白融合,从而实现外源靶标蛋白在细胞表面的表达<sup>[31]</sup>,这表明中间重复序列结构域和C端结构域并非INP的膜定位功能所必需(图2)。同时,还可以增加2-3个N端的结构域(InaQ-N),以提高外源靶标蛋白的跨膜运输活性和展示效率<sup>[17]</sup>。INP独特的蛋白结构组成使其在细菌细胞表面展示系统的应用中具有多方面的优势:(1)仅保留INP的N端结构域可以实现目的蛋白在细胞表面的功能性表达,对表面展示分子量较大的靶标蛋白具有优势;(2)外源靶标蛋白可以在胞内或胞外

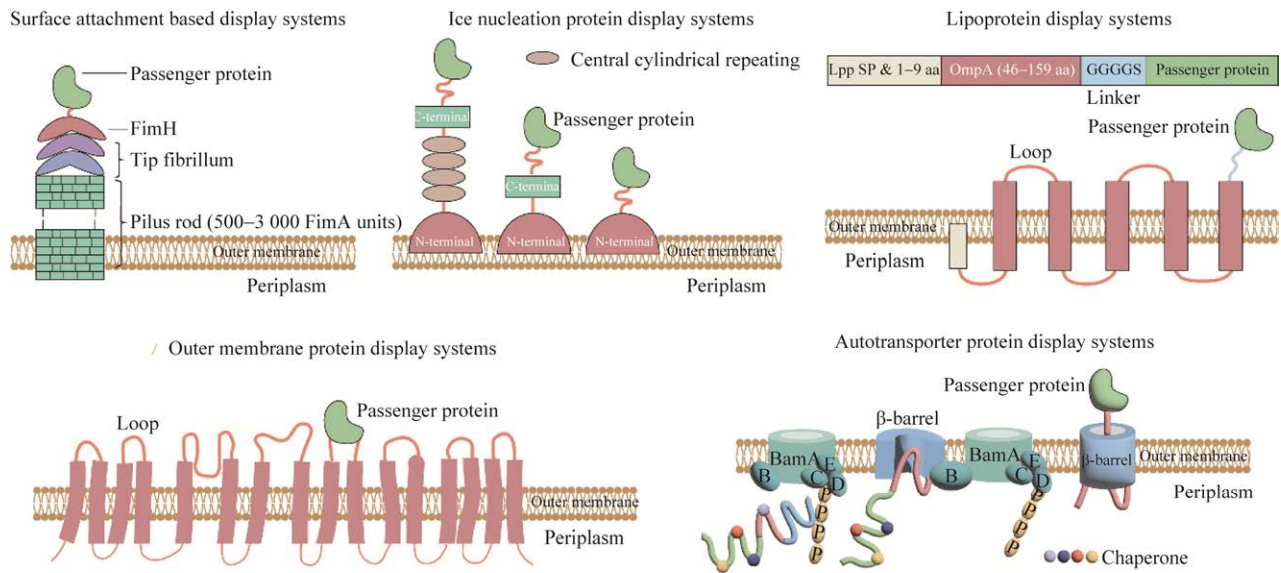


图 2 革兰氏阴性细菌 5 种表面展示系统示意图(改编自参考文献[2,5,14,23])

Figure 2 Schematic diagrams of five surface display systems in Gram-negative bacteria (adapted from references [2,5,14,23]).

稳定表达,不会被蛋白酶降解;(3)与基于外膜蛋白的表面展示系统不同,基于 INP 的表面展示系统不会破坏细胞(膜)的完整性;(4) INP 具有分泌、引导及定位功能,通过与靶标蛋白的融合可以实现其在细胞表面的定位,无需其他蛋白的协助<sup>[32]</sup>,基于 INP 构建的细菌细胞表面展示系统在环境污染修复和生物传感器等领域均得到了广泛的应用<sup>[18,33-35]</sup>。

#### 1.1.4 脂蛋白表面展示系统

脂蛋白(lipoprotein)是另一类细菌膜蛋白,其 N 端含有一个疏水脂结构域。在革兰氏阴性细菌中, TraT 和 peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)是 2 个主要的锚定脂蛋白,靶标蛋白可以与 PAL 进行 N 端融合,从而实现其在细胞表面的表达;然而,关于 PAL 作为锚定蛋白的报道较少,推测融合蛋白可能会影响细胞膜的完整性。相反,靶标蛋白可以与 TraT 锚定蛋白的中间结构域或 C 端融合,实现蛋白的膜定位<sup>[21]</sup>。布氏脂蛋白 Lpp 是大肠杆菌中数量最多的蛋白,将 Lpp 信号肽及 N 端 9 个氨基酸与 OmpA 的第 46-159 个氨基酸融合,可以构建嵌

合杂交的展示系统(Lpp-OmpA)(图 2);利用 Lpp-OmpA 系统,成功实现了有机磷水解酶<sup>[36]</sup>以及来源于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的致病因子 SpA 蛋白在细胞表面的表达<sup>[37]</sup>。

#### 1.1.5 自转运蛋白表面展示系统

自转运蛋白(autotransporters, ATs)能够自主介导自身跨外膜的转运过程,大多数 ATs 是革兰氏阴性细菌中的致病因子。由于其构造简单及分泌途径(type V 分泌系统)的便捷性,ATs 逐渐成为多用途的细胞表面展示工具;Ats 包含有 3 个主要的功能结构域:N 端信号肽、外源靶标蛋白结合结构域以及锚定在外膜的 C-端  $\beta$ -桶状结构域<sup>[3,32]</sup>。自转运蛋白完成转录翻译后,在信号肽引导下与内膜上的 Sec 易位子相互作用,从而跨越内膜转运至周质空间。随后,信号肽被信号肽酶切除,自转运蛋白穿过内膜,并在周质空间多种分子伴侣的作用下,最终到达外膜(图 2)<sup>[23,32]</sup>。与其他细菌细胞表面展示系统相比,基于 ATs 构建的系统具有一系列优势<sup>[20,23,38]</sup>:(1)易于蛋白纯化。ATs 将靶标蛋白转运至细胞表面后,自切酶位点处发生自切,释放出靶标蛋白,或者通过突

变自切酶位点, ATs 不再自切, 靶标蛋白可以锚定在细胞表面形成全细胞催化剂。(2) 可以展示分子量较大的外源蛋白, 并且表达量较高。(3) 应用性广。由于 ATs 具有相似的结构和跨膜转运过程, 基于 ATs 构建的细菌细胞表面展示系统可以在多种宿主菌中实现外源目的蛋白的功能性表达。

## 1.2 革兰氏阳性细菌的细胞表面展示

与革兰氏阴性细菌不同, 革兰氏阳性细菌缺乏细胞外膜结构, 其具有一层细胞内膜和膜外由较厚的肽聚糖构成的细胞壁, 由于这种特

性, 外源靶标融合蛋白易于锚定在细胞表面, 避免穿过内膜和周质空间而对蛋白的三维结构和活性产生影响; 然而, 由于革兰氏阳性细菌细胞壁较厚导致外源基因或者文库的转化效率较低。目前, 常用于革兰氏阳性细菌表面展示的宿主菌包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococci*)、链球菌属(*Streptococci*)以及分枝杆菌属(*Mycobacteria*)<sup>[3]</sup>。用于革兰氏阳性细菌的锚定蛋白包括 SpA 蛋白、S-Layer 蛋白以及芽孢的衣壳蛋白等(表 2)。

表 2 革兰氏阳性细菌典型的细胞表面展示系统及应用

Table 2 Typical cell surface display system and its applications of Gram-positive bacteria

Anchor protein, fusion method, Host strain	Passenger protein, source and size (kDa)	Result and application	Reference
YhcS, C-terminal fusion, <i>B. subtilis</i>	Protein A from <i>S. aureus</i> (SpA, 50 kDa)	SpA was displayed on the surface of <i>B. subtilis</i> cells using YhcS as anchor proteins. The binding capacity of IgG from rabbit serum per 1 mg of cells using this engineered <i>B. subtilis</i> strain was 100 µg under optimal experimental conditions	[39]
LcsB, N-terminal fusion, lactic acid bacteria	Carcinoembryonic antigen (CEA, 69 kDa) from the cDNA of HT-29 cells	A lactic acid bacteria display system was constructed and an oral vaccine against carcinoembryonic antigen CEA was developed. The recombinant strain activated spleen-induced immune response efficiently and enhanced the immune function of the gastrointestinal mucosa	[40]
CotC and CotG, C-terminal fusion, <i>B. subtilis</i>	Trehalose synthase (CotC-TreS: 99.5 kDa and CotG-TreS: 84.4 kDa) from <i>Pseudomonas stutzeri</i> CJ38	TreS was successfully surface-displayed on the spores of <i>B. subtilis</i> , which showed elevated and stable specific activity with the bioconversion (biotransformation of D-maltose into D-trehalose) rate of 73% after four cycles	[41]
CotG, C-terminal fusion, <i>B. subtilis</i>	Phytase (AppA, 47 kDa) from <i>E. coli</i>	AppA was displayed on the surface of <i>B. subtilis</i> spores using CotG, and the phytase activity remained above 50% after 12 h of incubation at four different pH values, with the optimal pH and temperature of 4.5 and 55 °C, respectively	[42]
CotZ and CotY, C/N-terminal fusion, <i>B. subtilis</i>	Receptor-binding domain (RBD, 29.5 kDa) of SARS-CoV-2	RBD was attached to the N-terminus or C-terminus of CotZ and CotY, and all four types of fusion proteins were successfully displayed on the surface of <i>B. subtilis</i> spores which could be used as an oral vaccine against SARS-CoV-2 virus	[43]
CotE, C-terminal fusion, <i>B. subtilis</i>	Tyrosinases (BMT, 31 kDa) from <i>B. megaterium</i>	BMT fused with CotE was displayed on the surface of <i>B. subtilis</i> spores, and no significant decrease of enzyme activity was observed after 15 days of storage at room temperature. In addition, the recombinant spores could be reused after 6 washes with Tris-HCl buffer and 62% of the enzyme activity was retained	[44]
BclA, C-terminal fusion, <i>B. thuringiensis</i>	Atrazine chlorohydrolase (AtzA) from <i>Pseudomonas</i> sp. strain ADP	AtzA was surface-displayed on <i>B. thuringiensis</i> cells through fusion with BclA. The engineered strain showed more than 58% of ATR was degraded to HA in the aqueous environment within 192 h, while no HA production was observed in the control. In the soil environment, more than 80% of ATR was degraded by AtzA-carrying spores within 48 h, while less than 20% of ATR was degraded by the purified AtzA	[45]

### 1.2.1 基于 SpA 蛋白的表面展示系统

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)是一种条件致病菌,其来源的 SpA 蛋白,大小为 40–60 kDa, N 端包括信号肽以及 4–5 个同源的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)的结合结构域;C 端是表面展示蛋白的结合结构域,含有 LPXTG (X 代表任何氨基酸)重复基序、疏水区域以及带正电的短的氨基酸残基(RREL)<sup>[32,39]</sup>。因此,利用 SpA 蛋白的 C 端蛋白锚定结构域,可以将外源靶标蛋白插入或取代 N 端的 IgG 结合结构域,实现外源蛋白的细胞表面展示(图 3)。

### 1.2.2 基于 S-Layer 蛋白的表面展示系统

S-层(S-layers)蛋白(40–71 kDa)是一种存在于细菌和古菌中的特殊表层结构,由单一的蛋白或糖蛋白亚基组成,规则地排列在细胞壁或细胞膜的表面。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的 S-层蛋白含有: N 端结构域(30 个氨基酸),主要负责蛋白的自组装及细胞

的黏附;C 端结构域(123 个氨基酸),可以将外源目的蛋白锚定在细胞表面;这 2 个结构域之间是可变区,参与 S-层蛋白的折叠和结晶(图 3),鉴于 S-层蛋白的表达和分泌效率,被广泛应用于高效表达载体和分泌载体的构建<sup>[40,47]</sup>。

### 1.2.3 基于芽孢衣壳蛋白的表面展示系统

目前常用的芽孢表面展示宿主菌包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*, Bs)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)和炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*, Ba)。相较于 Bt 和 Ba, Bs 菌株具有遗传背景更清晰、是非致病性益生菌(不含毒素)且可直接食用的特点,因此成为芽孢(spore)表面展示系统中应用最广泛的宿主细胞<sup>[48-49]</sup>。芽孢的结构由外向内依次为芽孢外壁(exosporium)、芽孢衣(spore coat)、皮层(cortex)和核心(core, 包括细菌基因组 DNA 和相关蛋白);芽孢衣的主要成分为蛋白质,包括 70 种不同的蛋白,其中最常用于芽孢表面展示系统的锚定蛋白有芽

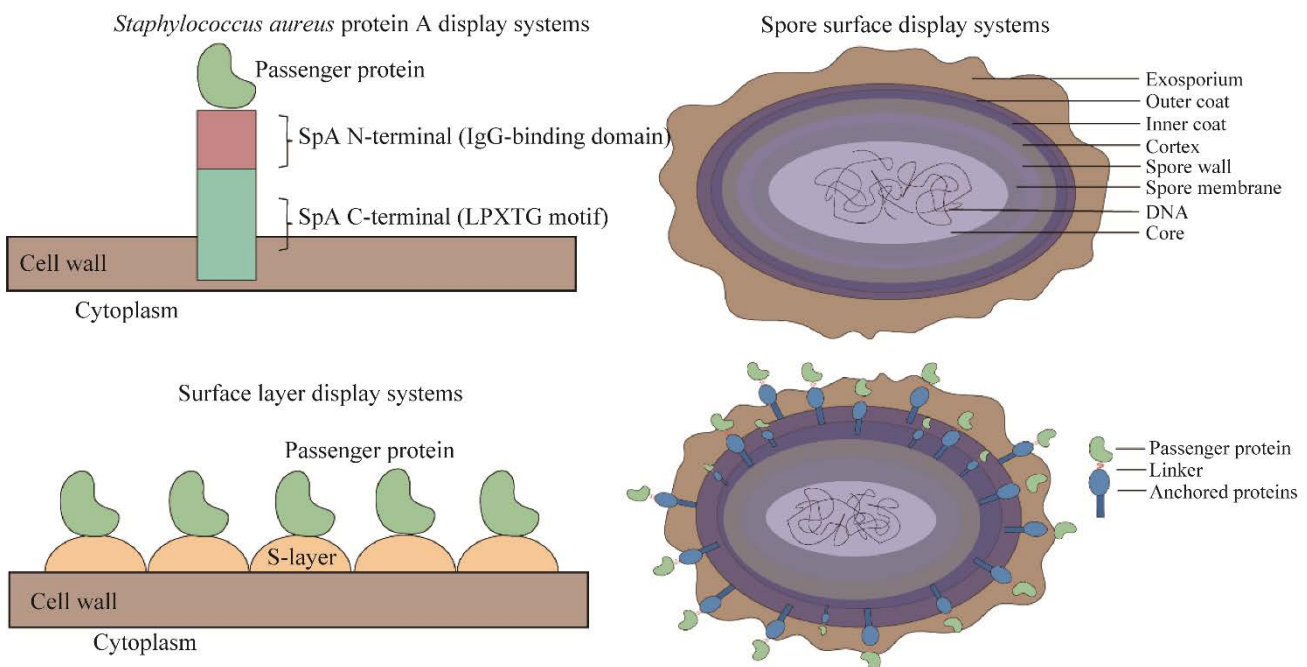


图 3 革兰氏阳性细菌中两种表面展示系统和芽孢表面展示示意图(改编自参考文献[31,46])

Figure 3 Schematic diagrams of two surface display systems in Gram-positive bacteria and spore surface display (adapted from references [31,46]).



孢的衣壳蛋白 CotB、CotC、CotE、CotG、CotY 和 CotZ<sup>[50]</sup>。外源蛋白可与衣壳蛋白的 C 端、N 端及中间结构域融合, 实现其在芽孢表面的功能性表达, GGGGS 和 EAAAK 是用于锚定蛋白和外源蛋白之间的连接肽, 有助于两者正确的空间折叠, 保证外源蛋白的活性<sup>[41-44]</sup>。由于芽孢具有抗脱水、耐热、抗酸碱以及耐辐射等抗逆性, 同时, 一些芽孢表面展示系统中, 外源蛋白与衣壳蛋白融合后, 其定位于内衣壳蛋白或芽孢外壁与芽孢衣之间, 为外源蛋白提供了保护和屏障, 极大提高了外源蛋白在恶劣环境条件下的稳定性和活性<sup>[8,46,49-52]</sup>(图 3)。由于芽孢可展示分子量较大的外源蛋白、无需蛋白的跨膜运输及分泌、不会影响芽孢的正常结构和功能等优势, 基于芽孢的表面展示技术在污染物的修复等领域得到了广泛应用。

## 2 细菌细胞表面展示技术的应用

### 2.1 生物修复

污染物的修复方法主要包括: 物理、化学和生物修复。物理修复方法一般包括: 使用吸附剂(如活性炭、硅胶等)吸附污染物、挖掘和土壤移除(适用于局部、污染程度较严重场景)、热解和热处理(将污染物分解、气化或固化)、过滤和筛选(处理水体中大颗粒污染物)等。虽然物理方法也能达到减轻或消除污染的目的, 但存在局限性: 成本较高(耗能高, 需要大量的设备、能源和人力投入)、环境影响大(土壤移除会导致土地资源破坏及生态系统扰动)、可能产生二次污染(土壤移除导致土壤侵蚀或土壤质量下降)、难以处理深层污染(只能处理表层或局部区域污染, 难以处理深层土壤或地下水中的污染物)等。化学修复方法主要通过化学反应(氧化还原反应、酸碱中和、络合沉淀等)将污染物转化为无害或低毒物质, 或将其固化、稳定化, 达到

减轻或消除污染物的方法。其也存在一些局限性, 如: 对环境产生二次污染(具有毒性或环境危害性副产物的产生)、修复效率受限、成本较高、难以持续(污染物可能在修复后重新释放或迁移)等<sup>[53-55]</sup>。生物修复技术利用植物、原生动物和微生物, 通过吸收、转化、清除或对污染物进行彻底分解, 以达到去除污染物, 修复生态的目的, 具有成本低、环保、可持续等优势, 是污染物修复的主要手段。微生物种类多、分布广、代谢方式多样、环境适应性强, 其可以通过代谢活动和酶系统将污染物转化为无害或低毒物质且不会引入大量化学物质或产生有毒副产物, 是实现污染物修复的主要手段。将对污染物具有特定降解能力的酶或蛋白质直接展示在细菌表面构建全细胞催化剂, 在降解污染物方面具有显著优势, 包括: 高效性和特异性(降解酶无须纯化, 特异性识别特定污染物并进行高效降解)、较好的环境适应性(将目标蛋白展示在环境适应性强的细菌表面, 使其在不同污染环境中生存及降解目标污染物)、成本低、环境友好(不会产生二次污染, 对环境和生态系统造成额外负面影响)。因此, 基于细菌细胞表面展示技术构建的全细胞催化剂在农药、塑料、抗生素、重金属及其他污染物如塑化剂和染料等的降解和修复中得到了广泛的应用<sup>[56-58]</sup>(图 4)。

#### 2.1.1 农药降解

农药在全球一直被广泛和长期使用, 虽然促进了农业生产, 但其残留对土壤、水等环境以及人类健康造成了威胁, 且农药的过度使用还会导致害虫产生耐药性。同时, 仅有约 1% 的农药在使用过程中作用于靶标害虫, 其余会进入土壤、空气和水中, 最终进入食物链, 影响包括人类在内的非目标物种<sup>[58]</sup>。因此, 迫切需要在环境中进行农药的生物降解。微生物能够

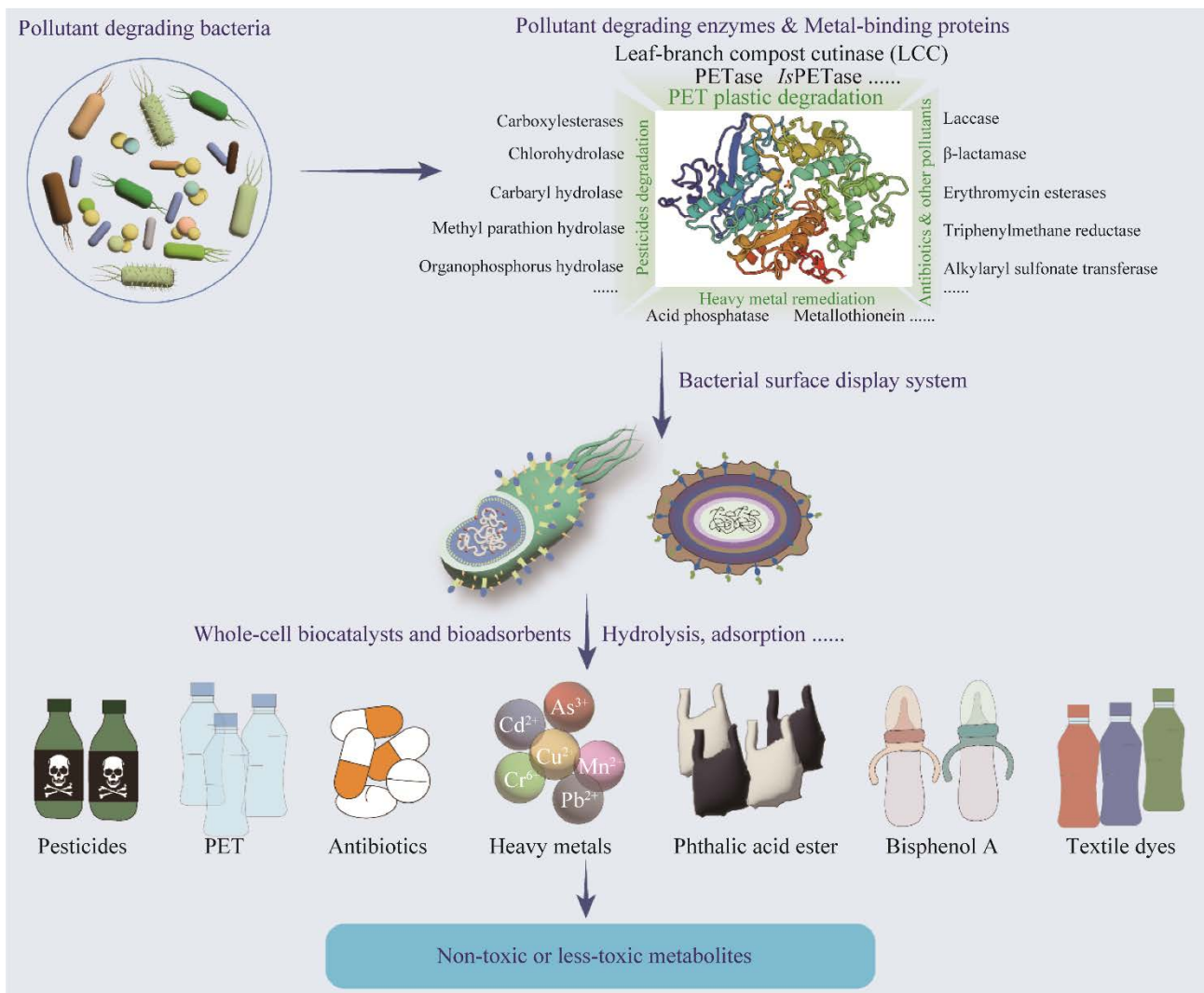


图 4 细菌表面展示技术在环境污染物修复领域的应用(改编自参考文献[55,59-65])

Figure 4 Applications of bacterial surface display technology in environmental pollutant remediation (adapted from references [55,59-65]).

利用自身分泌的胞外酶或胞内酶将农药分解为毒性较小或无毒的代谢产物。细菌表面展示技术通过将农药降解酶如羧酸酯酶、有机磷水解酶及其他水解酶等锚定在细菌细胞表面,构建全细胞催化剂,能够直接与农药底物接触并实现农药的有效降解。Yang 等<sup>[66]</sup>将有机磷水解酶(organophosphorus hydrolase, OPH)和甲基对硫磷水解酶(methyl parathion hydrolase, MPH)对应的基因分别与冰核蛋白(INP 的 N/C 端融合)

和三甲胺 N-氧化物还原酶(trimethylamine N-oxide reductase, TorA)的双精氨酸信号肽融合,将两个相容质粒共转化大肠杆菌,实现了 MPH 在周质空间以及 OPH 在细胞表面的表达,并且共表达菌株的酶活性比胞内表达任何一种水解酶的菌株高 6 倍,为有机磷农药的水解提供了新思路。Yang 等<sup>[59]</sup>利用来源于丁香假单胞菌(*P. syringae*)INA5 的冰核蛋白 INPNC 作为锚定蛋白,将西维因水解酶(carbaryl hydrolase,

CH)展示到了能够降解毒死蝉的菌株窄食单胞菌 YC-1 的细胞表面, 获得的重组 YC-1 菌株能够同时降解西维因和毒死蝉。Hsieh 等<sup>[45]</sup>将来自假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) ADP 中的阿特拉津氯水解酶(chlorohydrolyase, ATR)基因与苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)的芽孢外膜蛋白 BclA 对应的基因融合, 实现了 ATR 蛋白在 *B. thuringiensis* 芽孢表面的表达; 同时, 获得的孢子全细胞催化剂具有较好的稳定性且对水中或土壤中的阿特拉津均具有脱毒效果。近年来, Liu<sup>[18]</sup>、Ding 等<sup>[34]</sup>利用冰核蛋白作为锚定蛋白, 将来源于贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) sd 菌株中的羧酸酯酶基因 *carCB2* 和 *carCby* 展示到大肠杆菌的细胞表面, 获得的全细胞催化剂比纯化的酶稳定性好, 并且分别对农药  $\lambda$ -氯氟氰菊酯和西维因具有降解效果。

### 2.1.2 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 塑料降解

塑料污染问题备受全球关注。预计到 2050 年, 全球塑料累积产量将增至 340 亿 t, 每年塑料废弃物产生量约 3 亿 t<sup>[67]</sup>。聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate, PET) 是对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA) 与乙二醇 (ethylene glycol, EG) 通过酯键连接而成的人造聚合物, 是塑料中最重要的一种, 广泛用于一次性产品制造, 如饮料瓶和食品盒等; 仅 2020 年, 全球瓶级 PET 市场需求即达 2 876 万 t, 然而, 全球仅不到 10% 的 PET 塑料被回收再利用; 目前处理 PET 塑料废弃物的主要方式包括焚烧和填埋, 但这些方式会造成大气、土壤和地下水的二次污染, 对人体健康也会造成潜在的巨大危害, 不具有可持续性。基于酶降解策略的 PET 塑料生物降解技术绿色无毒、无污染, 能够在相对温和的反应条件下分解 PET 并实现原料的再回收和重复利用<sup>[60,68]</sup>。Heyde 等<sup>[69]</sup>将来源于大阪

堺菌(*Ideonella sakaiensis*) 201-F6 中的 PET 水解酶突变体 (IsPETase) 与 Lpp-OmpA 融合, 将其展示在大肠杆菌的细胞表面, 构建全细胞催化剂; 利用对硝基酚乙酸为底物, PETase 将其分解为对硝基酚, 通过 405 nm 吸光度变化筛选到了活性提高 14 倍的 PETase 突变体酶。Jia 等<sup>[16]</sup>在 2022 年将 *I. sakaiensis* 201-F6 中的 PET 水解酶 (IsPETase) 与外膜蛋白 FadL 和疏水蛋白 HFBII 融合展示在 *E. coli* 的细胞表面, 构建的全细胞催化剂比纯化的 IsPETase 酶显示出更高的 PET 降解酶活性和稳定性; 在 40 °C 条件下放置 7 d 后, 全细胞仍能保持原始酶活性的 73%, 且经过 7 个循环的反复使用后仍能保持 70% 的活性。Han 等<sup>[70]</sup>采用了 3 种锚定蛋白 [冰核蛋白的 N 端结构域 (ianXN)、外膜自转运蛋白 *estA* 和聚谷氨酸合酶 A (poly- $\gamma$ -glutamate synthetase A protein, pGSA)] 构建细胞表面展示平台, 将 IsPETase (*I. sakaiensis* 201-F6)<sup>[71]</sup>、PE-H (*Pseudomonas aestusnigri*)<sup>[72]</sup>、FAST-PETase (含有 5 个突变位点 N233K/R224Q/S121E/D186H/R280A 的 IsPETase)<sup>[73]</sup> 和叶枝堆肥角质酶 (leaf-branch compost cutinase, LCC-ICCG, 含有 4 个突变位点的角质酶)<sup>[74]</sup> 这 4 种 PETase 对应的基因通过 Linker G4S 序列 (GGGGSGGGGS) 分别与锚定蛋白连接, 构建全细胞催化剂, 结果显示 PET 水解酶的类型比锚定蛋白对于底物的水解作用更为关键。利用 pGSA 锚定蛋白展示 FAST-PETase 获得了最高的水解酶活性, 在 24 h 内对 PET 的水解效率达到了 71.3% 且共同展示 FAST-PETase 和 MHETase 对 PET 的水解具有促进作用<sup>[70]</sup>。然而, 目前已鉴定到的 PET 水解酶或其改造的突变体大多需要在比较高的温度条件下才能展现出较为明显的 PET 的解聚效果, 这与全细胞催化剂策略不兼容 (大多数细菌最适生长温度为 37 °C)。因此, 挖掘或改造能够展示嗜热酶的嗜热宿主菌或在

中温条件下能够对 PET 解聚起作用的 PETase 具有重要意义<sup>[75]</sup>。

### 2.1.3 抗生素降解

抗生素(antibiotics)是一类次级代谢产物,由微生物(包括细菌、真菌、放线菌)或高等动植物在生活过程中产生,具有抗病原体或其他活性,能够干扰其他活细胞的发育功能;作为抑菌或杀菌药物,抗生素被广泛应用于人类疾病治疗、畜禽及水产养殖等领域。然而,抗生素的过度使用导致细菌迅速产生耐药性,成为一种新型的环境污染物(人和动物服用的抗生素 50%–90%不能被完全吸收和代谢,随粪便和尿液排出体外);抗生素耐药的最常见机制是  $\beta$ -内酰胺酶的产生,它能与抗生素的  $\beta$ -内酰胺环结合使其裂解而被破坏,使抗生素失效<sup>[61]</sup>。在畜禽养殖中大量使用抗生素导致高浓度抗生素残留于牲畜粪便中,抑制后续沼气厌氧发酵中微生物的活性,因此,抗生素的生物修复具有重要意义。2019 年, Liu 等<sup>[76]</sup>利用冰核蛋白作为锚定蛋白将  $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla* (NCBI 序列号为 AY590118)展示在大肠杆菌 BL21 的细胞表面,构建的工程菌株能高效降解  $\beta$ -内酰胺类抗生素,在 1 h 内将 100 mg/L 的青霉素、头孢唑啉和阿莫西林彻底降解;使用全细胞催化剂前处理含有  $\beta$ -内酰胺类抗生素的猪粪,其厌氧发酵产甲烷的效率提高到 93.2%。红霉素是大环内酯类抗生素之一,广泛用于畜禽行业,也是环境中检出率较高的抗生素之一。Liu 等<sup>[77]</sup>利用冰核蛋白将红霉素酯酶基因 *ereA* (NCBI 序列号为 AY183453)展示在大肠杆菌 BL21 的细胞表面,获得的全细胞催化剂能在 24 h 内将 50 mg/L 的红霉素彻底降解,在室温(25 °C)放置 40 d 后,全细胞催化剂的酶活性仍能保持初始酶活的 86.7%。磺胺类抗生素也是被广泛用于畜禽养殖的抗菌药物,其长期滥用及在人和动

物肠道中可降解性较差,通过人和畜禽粪便和尿液排出,导致较高浓度的抗生素残留。Li 等<sup>[78]</sup>将来源于平菇(*Pleurotus ostreatus*) HAUCC 162 中的漆酶基因 *lacc6* 利用冰核蛋白将其展示到大肠杆菌 Nissle 1917 的细胞表面,构建的工程菌株在体外 40 °C、pH 5.0 的条件下,3 h 内对磺胺嘧啶的降解率为 37%±1%,且将全细胞催化剂制备成冻干粉喂给肉鸡,0.07%的全细胞能在肉鸡肠道中成功定殖且可以使鸡粪中磺胺嘧啶减少 58%±2%。以上均为环境中抗生素的去除提供了一种有效方案。

### 2.1.4 重金属污染修复

重金属污染是指环境中由汞(Hg)、铅(Pb)、锌(Zn)、镉(Cd)、铜(Cu)、铬(Cr)、锰(Mn)等重金属或其化合物引起的污染。矿质资源的开采与冶炼是产生重金属废弃物排放和污染的主要途径。重金属具有生物累积性,通过食物链最终在人和动物体内富集,对环境和人类健康带来严重危害。与有机污染物不同,重金属不可降解,必须通过吸附、富集等方式进行处理。传统的重金属修复方法包括:化学还原、化学沉淀、离子交换、膜分离等,但这些方法缺乏对重金属的特异性、处理成本高、易产生二次污染,并且对微量的重金属离子不敏感。生物修复方法包括:动植物修复和微生物修复,而微生物由于其代谢能力强、生长繁殖快及适应性强、易培养等特点成为研究热点。微生物能对重金属污染物进行生物吸附、富集、沉淀从而固定重金属离子,或将有毒重金属离子转化为无毒或低毒价态<sup>[56-57]</sup>。通过构建细菌细胞表面展示系统,将具有重金属结合和沉淀能力的蛋白质(如金属硫蛋白)或肽展示在细胞表面,能够实现重金属的特异性吸附和修复。Jia 等<sup>[62]</sup>利用冰核蛋白 N 端结构域作为锚定蛋白,将来自耐重金属铜菌(*Cupriavidus metallidurans*) CH34

中的能够与  $Pb^{2+}$  特异性结合的蛋白 PbrR、PbrR691 和 PbrD 的对应基因分别展示到了大肠杆菌 BL21 的细胞表面, 结果显示: 工程菌株对  $Pb^{2+}$  的吸附效果显著, 并对含  $Pb^{2+}$  土壤中烟草种子的萌发起到促进作用。Chen 等<sup>[79]</sup>利用冰核蛋白将 pbBD 蛋白(截短 PbrR 蛋白的 N 端 DNA 结合结构域和 C 端冗余的氨基酸)展示在 *E. coli* BL21 的细胞表面, 将构建的工程菌株喂食暴露于  $Pb^{2+}$  的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*), 结果显示: 工程菌能够吸附草鱼肠道中的  $Pb^{2+}$  并随粪便排出体外, 使粪便中  $Pb^{2+}$  含量增加 76% (与对照组 *E. coli* BL21 相比)。此外, Liu 等<sup>[80]</sup>将  $Hg^{2+}$  的结合肽 CysLysCysLysCysLysCys 展示在大肠杆菌 W-1 的细胞表面, 构建的工程菌株对甲基汞的吸附效率达到 96%, 且将工程菌株喂养于含  $Hg^{2+}$  水体中的金鱼(*Carassius auratus*), 其可以在金鱼肠道中定殖并吸附肠道中的  $Hg^{2+}$ , 减少  $Hg^{2+}$  在肌肉中的累积。利用耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)膜表面的蛋白 Hpi 和 SlpA 作为锚定蛋白, 将来自细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*)中编码金属硫蛋白的 *smtA* 基因展示在 DR 菌株细胞表面, 构建的工程菌株去除  $Cd^{2+}$  的能力比胞质表达 SmtA 蛋白高 1.5–3.0 倍; 将酸性磷酸酶 PhoN 通过 Hpi 和 SlpA 展示, 全细胞催化剂显示 446 mg/g 和 160 mg/g (全细胞干重)的铀沉淀效果<sup>[81]</sup>。2023 年, Lu 等<sup>[19]</sup>报道了一株大肠杆菌工程菌, 利用外膜展示系统 Lpp-OmpA 将来自嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)中的金属硫蛋白 MTT5 展示在大肠杆菌 C43(DE3)的表面, 结果显示: 工程菌株对于  $Cd^{2+}$  的吸附能力是野生菌株的 4.9 倍, 并且胞内或胞外表达 MTT5 能够保护细胞免受  $Cd^{2+}$  的毒性, 减少蛋白质的错误折叠及避免  $Cd^{2+}$  在细胞中的累积。此外, Zhu 等<sup>[82]</sup>报道了一种新的重金属修复思路: 通过将

表面展示系统与磁性纳米颗粒结合, 实现重金属的吸附和回收。将人工合成的金属结合蛋白 SynHMB (含有 3 个金属结合肽: HisHisHisHisHisHisHis、GCGCPCGCG 和 CGCCG) 与膜蛋白 OpmA 的 N 端分泌结构域和 C 端跨膜结构域融合, 通过引入恶臭假单胞菌(*P. putida*)的 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS), 将 SynHMB 展示在细菌细胞表面构建工程菌; 同时, 在磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs)上修饰聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)和二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA), 形成 MNP@SiO<sub>2</sub>-PEI-DTPA; 在 SynHMB 表面展示的工程菌吸附  $Cd^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  后, 加入 MNP@SiO<sub>2</sub>-PEI-DTPA, 细胞被吸附沉淀, 在磁场的作用下实现了重金属的回收。未来, 更高亲和力及更强专一性重金属结合蛋白的筛选、对于重金属具有较强耐受性宿主菌的筛选以及结合生物/非生物联合修复平台的建立将具有重要意义。

### 2.1.5 其他污染物的生物修复

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs), 是常见的塑料增塑剂, 它们与聚合材料形成氢键或范德华力结合, 以增加材料的延展性和柔韧性。然而, PAEs 是一种新型污染物, 具有潜在的毒性, 可能导致内分泌系统受损和发育障碍, 因此被称为内分泌干扰物<sup>[83]</sup>。羧酸酯酶是一种  $\alpha/\beta$  水解酶, 能够催化酯键水解, 可用于降解 PAEs。Ding 等<sup>[33]</sup>将来源于 *Bacillus* sp. K91 中的羧酸酯酶基因 *carW* 通过冰核蛋白将其展示在 *E. coli* BL21 的细胞表面, 构建的全细胞催化剂(10 U)具有较好的温度稳定性, 能够在 120 min 内将 1.5 mg/mL 的邻苯二甲酸二异丁酯分解。双酚 A (bisphenol A)是另一种内分泌干扰物, 芳基磺基转移酶(alkylaryl sulfonate transferase,

ASTB)可以将双酚 A 转化为非雌激素双酚 A 硫酸酯, Nanudorn 等<sup>[63]</sup>利用细菌外膜蛋白 OprF 和 Lpp-OmpA 将来自脱亚硫酸菌 (*Desulfitobacterium hafniense*)中的 ASTB 展示在 *E. coli* 的细胞表面,获得的 OprF-ASTB 全细胞催化剂可以在 6 h 内将 5 mmol/L 的双酚 A 硫酸化,且全细胞催化剂在室温放置 7 d 后仍能保持 70%的酶活性。染料主要用于纺织品印染,但染料生产产生的废水中含有的大多数合成染料具有毒性,对环境和人类健康构成严重威胁,三苯基甲烷染料由于不能进入细胞导致细胞内染料降解酶无法发挥作用<sup>[84]</sup>。Gao 等<sup>[64]</sup>利用冰核蛋白作为锚定蛋白,将柠檬酸杆菌 (*Citrobacter* sp. KCTC 18061P)中的三苯基甲烷还原酶(triphenylmethane reductase, TMR)基因 *tmr* 展示在大肠杆菌的细胞表面,构建的工程菌具有较高的酶活性和稳定性,每分钟可降解孔雀绿 640  $\mu\text{mol/g}$  全细胞干重,为染料的降解提供了新思路。TMR 降解染料过程需要 NAD(P)H 的偶联氧化,葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH)能催化  $\beta$ -D-葡萄糖氧化为 D-葡萄糖-1,5-内酯,同时将 NAD(P)转化为 NAD(P)H, Gao 等<sup>[65]</sup>利用 CotG 作为锚定蛋白,将 *tmr* 和 *gdh* 同时展示到了枯草芽孢杆菌孢子表面,构建了可再生辅因子的染料降解系统。

### 3 总结与展望

细菌细胞表面展示技术可以将外源蛋白或肽通过 C 端或 N 端与锚定蛋白融合,实现其在革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌或芽孢细胞表面的功能性表达。革兰氏阴性细菌 *E. coli* 由于其遗传背景清晰、转化效率高、遗传操作简单,是细菌细胞表面展示最常用的宿主菌。对于革兰氏阴性细菌的细胞表面展示系统的构建,合适的锚定蛋白的选择对于保持细胞膜的

完整性和稳定性很重要。外源蛋白需穿过细胞内膜和外膜进行细胞的表面展示,此过程经常会引起细胞外膜的泄漏,影响细胞外膜的完整性及细菌的正常生长,尤其是对于分子量较大的外源蛋白的展示相对困难。然而,细菌细胞表面展示系统种类多样、操作简单,能够应对不同需求,为该技术的广泛应用提供了诸多可能性。目前,细菌细胞表面展示系统在多领域实现了成功应用,如全细胞催化剂、生物传感器、疫苗制备和抗体筛选、生物修复等。但现有的细菌细胞表面展示系统仍存在诸多局限性,如目标蛋白的选择,细菌表面展示技术对目的蛋白的大小存在一定的限制,对于分子量大的蛋白与锚定蛋白融合后,往往对蛋白的跨膜运输及展示效率产生较大影响。因此,可通过蛋白质工程技术对目标蛋白质进行优化,如截短、分段、结构重组等,以减小其分子量或简化其结构,使其更易于表达和展示。同时,使用分子伴侣或共表达折叠因子辅助目标蛋白质的正确折叠和稳定。此外,对于展示需要经转录后修饰包括糖基化和二硫键异构化后才能显示活性的真核生物来源的蛋白具有局限性。可将翻译后修饰相关的因子如糖基转移酶等共表达宿主细胞中,促进蛋白的正确糖基化修饰过程;或通过蛋白质工程技术对目标蛋白进行优化,设计合适的信号肽序列及修饰位点等,促进蛋白质的正确修饰。

细菌细胞表面展示系统对于环境污染物的修复具有重要的应用价值和优势:(1) 细菌环境适应性强。其能在土壤、水体和空气等不同类型的污染环境中生存,可以实现对多种污染物的协同修复。(2) 高效的降解能力及可控性强。细菌细胞表面展示系统将具有降解能力的酶展示在细胞表面,实现对特定污染物的高效识别,通过与污染物的直接接触将其转化为无害或低

毒物质, 实现污染物的去除和降解, 修复过程精确有效, 减少了对环境不必要的干扰。(3) 成本低且可持续性强。细菌细胞表面展示系统制备和应用成本低、易大规模生产和应用且全细胞催化剂可重复使用, 不会对环境造成二次污染, 在实际工程应用中具有可行性和经济性。然而, 细菌细胞表面展示系统在实际污染环境的修复领域中的应用仍存在一定的局限性, 如生存环境的适应性: 实际环境条件复杂, 土壤中的 pH、温度、湿度等都有可能影响全细胞催化剂的生存和活性; 同时, 污染环境中可能同时存在多种污染物, 对修复全细胞菌株可能具有细胞毒性。未来需要: 一方面可以筛选环境适应性强的宿主菌株(良好的生存能力、耐受性和适应性)并构建其表面展示系统; 另一方面, 根据实际污染环境条件, 设计及构建多种特异针对环境中污染物的全细胞催化剂, 使用“一锅法(one-pot)”实现多种全细胞催化剂对污染物的协同修复。此外, 利用多学科、多领域交叉, 如融合纳米技术和材料科学, 设计和构建具有保护、支持和调控表面展示系统的纳米材料, 增强表面展示系统的环境适应性、抗污染能力以及稳定性。同时, 细菌细胞表面展示系统的构建需通过带有抗性基因(如氨苄霉素、卡那霉素、氯霉素抗性基因等)的载体来实现, 该过程会引入抗性基因, 因此, 细菌表面展示全细胞催化剂在实际应用前需进行抗生素的消除避免细菌产生耐药性导致超级细菌出现。总之, 尽管细菌表面展示技术目前仍存在应用的局限性, 但随着研究的不断深入, 原有系统的不断优化以及新展示系统的不断开发, 细菌表面展示技术在各领域中的应用也将愈加广泛。

## REFERENCES

- [1] JAROSZEWICZ W, MORCINEK-ORŁOWSKA J, PIERZYŃSKA K, GAFFKE L, WĘGRZYN G. Phage display and other peptide display technologies[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2022, 46(2): 1-25.
- [2] van BLOOIS E, WINTER RT, KOLMAR H, FRAAIJE MW. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(2): 79-86.
- [3] MAHDAVI SZB, OROOJALIAN F, EYVAZI S, HEJAZI M, BARADARAN B, POULADI N, TOHIDKIA MR, MOKHTARZADEH A, MUYLDERMANS S. An overview on display systems (phage, bacterial, and yeast display) for production of anticancer antibodies; advantages and disadvantages[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 208: 421-442.
- [4] SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [5] LEE SY, CHOI JH, XU Z. Microbial cell-surface display[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(1): 45-52.
- [6] LILJEQVIST S, SAMUELSON P, HANSSON M, NGUYEN TN, BINZ H, STÅHL S. Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2481-2488.
- [7] NGUYEN HM, PHAM ML, STELZER EM, PLATTNER E, GRABHERR R, MATHIESEN G, PETERBAUER CK, HALTRICH D, NGUYEN TH. Constitutive expression and cell-surface display of a bacterial  $\beta$ -mannanase in *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-12.
- [8] LIN P, YUAN H, DU J, LIU K, LIU H, WANG T. Progress in research and application development of surface display technology using *Bacillus subtilis* spores[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2319-2331.
- [9] LEE SH, LEE SY, PARK BC. Cell surface display of lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 using OprF as an anchoring motif and its biocatalytic applications[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8581-8586.
- [10] MICHON C, LANGELLA P, EIJSINK VGH, MATHIESEN G, CHATEL JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-16.
- [11] CHMIELEWSKI M, KUEHLE J, CHROBOK D, RIET N, HALLEK M, ABKEN H. FimH-based display of functional eukaryotic proteins on bacteria surfaces[J].

- Scientific Report, 2019, 9(1): 1-10.
- [12] PAN TX, HUANG HB, ZHANG JL, LI JY, LI MH, ZHAO DY, LI YN, ZHENG W, MA RG, WANG N, SHI CW, WANG CF, YANG GL. *Lactobacillus plantarum* surface-displayed *Eimeria tenella* profilin antigens with FliC flagellin elicit protection against coccidiosis in chickens[J]. Poultry Science, 2023, 102(10): 102945.
- [13] WANG Y, MARUTHAMUTHU MK, JEONG J, YOO IK, KIM TW, HONG SH. Development of fenitrothion adsorbing recombinant *Escherichia coli* by cell surface display of pesticide-binding peptide[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 322: 90-95.
- [14] MARUTHAMUTHU MK, SELVAMANI V, NADARAJAN SP, YUN H, OH YK, EOM GT, HONG SH. Manganese and cobalt recovery by surface display of metal binding peptide on various loops of OmpC in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2018, 45(1): 31-41.
- [15] HAN MJ. Novel bacterial surface display system based on the *Escherichia coli* protein MipA[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(7): 1097-1103.
- [16] JIA Y, SAMAK NA, HAO X, CHEN Z, WEN Q, XING J. Hydrophobic cell surface display system of PETase as a sustainable biocatalyst for PET degradation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1-11.
- [17] LI Q, WANG T, YE Y, GUAN S, CAI B, ZHANG S, RONG S. A temperature-induced chitosanase bacterial cell-surface display system for the efficient production of chitoooligosaccharides[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(8): 1625-1635.
- [18] LIU Y, WANG X, NONG S, BAI Z, HAN N, WU Q, HUANG Z, DING J. Display of a novel carboxylesterase CarCby on *Escherichia coli* cell surface for carbaryl pesticide bioremediation[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 97.
- [19] LU CW, HO HC, YAO CL, TSENG TY, KAO CM, CHEN SC. Bioremediation potential of cadmium by recombinant *Escherichia coli* surface expressing metallothionein MTT5 from *Tetrahymena thermophila*[J]. Chemosphere, 2023, 310: 136850.
- [20] BALDERAS HERNANDEZ VE, SALAS-MONTANTES CJ, BARBA-DE LA ROSA AP, DE LEON-RODRIGUEZ A. Autodisplay of an endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Clostridium cellulovorans* in *Escherichia coli* for xylans degradation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 149: 109834.
- [21] SAMUELSON P, GUNNERIUSSON E, NYGREN PÅ, STÅHL S. Display of proteins on bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 96(2): 129-154.
- [22] MAJANDER K, KORHONEN TK, WESTERLUND-WIKSTRÖM B. Simultaneous display of multiple foreign peptides in the FliD capping and FliC filament proteins of the *Escherichia coli* flagellum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4263-4268.
- [23] NICOLAY T, VANDERLEYDEN J, SPAEPEN S. Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2015, 41(1): 109-123.
- [24] LÅNG H. Outer membrane proteins as surface display systems[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2000, 290(7): 579-585.
- [25] CHEN T, WANG K, CHI X, ZHOU L, LI J, LIU L, ZHENG Q, WANG Y, YU H, GU Y, ZHANG J, LI S, XIA N. Construction of a bacterial surface display system based on outer membrane protein F[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-13.
- [26] LEE SH, CHOI J IL, PARK SJ, LEE SY, PARK BC. Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5074-5080.
- [27] LEE SH, CHOI J IL, HAN MJ, CHOI JH, LEE SY. Display of lipase on the cell surface of *Escherichia coli* using OprF as an anchor and its application to enantioselective resolution in organic solvent[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90(2): 223-230.
- [28] HAN MJ, LEE SH. An efficient bacterial surface display system based on a novel outer membrane anchoring element from the *Escherichia coli* protein YiaT[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(1): 1-7.
- [29] NARITA J, OKANO K, TATENNO T, TANINO T, SEWAKI T, SUNG MH, FUKUDA H, KONDO A. Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(5): 564-572.
- [30] BAEK JH, HAN MJ, LEE SH, LEE SY. Enhanced display of lipase on the *Escherichia coli* cell surface, based on transcriptome analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(3): 971-973.
- [31] FENG X, JIN M, HUANG W, LIU W, XIAN M. Whole-cell catalysis by surface display of fluorinase on



- Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-9.
- [32] HAN L, ZHAO Y, CUI S, LIANG B. Redesigning of microbial cell surface and its application to whole-cell biocatalysis and biosensors[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 185(2): 396-418.
- [33] DING J, ZHOU Y, WANG C, PENG Z, MU Y, TANG X, HUANG Z. Development of a whole-cell biocatalyst for diisobutyl phthalate degradation by functional display of a carboxylesterase on the surface of *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 1-11.
- [34] DING J, LIU Y, GAO Y, ZHANG C, WANG Y, XU B, YANG Y, WU Q, HUANG Z. Biodegradation of  $\lambda$ -cyhalothrin through cell surface display of bacterial carboxylesterase[J]. *Chemosphere*, 2022, 289: 1-9.
- [35] ZHANG Z, LIU J, FAN J, WANG Z, LI L. Detection of catechol using an electrochemical biosensor based on engineered *Escherichia coli* cells that surface-display laccase[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1009: 65-72.
- [36] YANG C, ZHAO Q, LIU Z, LI Q, QIAO C, MULCHANDANI A, CHEN W. Cell surface display of functional macromolecule fusions on *Escherichia coli* for development of an autofluorescent whole-cell biocatalyst[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(16): 6105-6110.
- [37] VAHED M, RAMEZANI F, TAFAKORI V, MIRBAGHERI VS, NAJAFI A, AHMADIAN G. Molecular dynamics simulation and experimental study of the surface-display of SPA protein via Lpp-OmpA system for screening of IgG[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 1-9.
- [38] van ULSEN P, ZINNER KM, JONG WSP, LUIRINK J. On display: autotransporter secretion and application[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(18): 1-10.
- [39] GHAEDMOHAMMADI S, AHMADIAN G. The first report on the sortase-mediated display of bioactive protein a from *staphylococcus aureus* (SpA) on the surface of the vegetative form of *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 212.
- [40] ZHANG X, HU S, DU X, LI T, HAN L, KONG J. Heterologous expression of carcinoembryonic antigen in *Lactococcus lactis* via LcsB-mediated surface displaying system for oral vaccine development[J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2016, 49(6): 851-858.
- [41] LIU H, YANG S, WANG X, WANG T. Production of trehalose with trehalose synthase expressed and displayed on the surface of *Bacillus subtilis* spores[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 100.
- [42] MINGMONGKOLCHAI S, PANBANGRED W. Display of *Escherichia coli* phytase on the surface of *Bacillus subtilis* spore using CotG as an anchor protein[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 187(3): 838-855.
- [43] VETRAKOVA A, CHOVANOVA RK, RECHTORIKOVA R, KRAJCIKOVA D, BARAK I. *Bacillus subtilis* spores displaying RBD domain of SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Computational and Structural Biotechnology*, 2023, 21: 1550-1556.
- [44] HOSSEINI-ABARI A, KIM BG, LEE SH, EMTIAZI G, KIM W, KIM JH. Surface display of bacterial tyrosinase on spores of *Bacillus subtilis* using CotE as an anchor protein[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56(12): 1331-1337.
- [45] HSIEH H, LIN C, HSU S, STEWART G. A *Bacillus* spore-based display system for bioremediation of atrazine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(18): e01230-20.
- [46] RICCA E, BACCIGALUPI L, ISTICATO R. Spore-adsorption: mechanism and applications of a non-recombinant display system[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 47: 107693.
- [47] RAVI J, FIORAVANTI A. S-layers: the proteinaceous multifunctional armors of gram-positive pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 1-8.
- [48] ZHANG X, AL-DOSSARY A, HUSSAIN M, SETLOW P, LI J. Applications of *Bacillus subtilis* spores in biotechnology and advanced materials[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(17): e01096-20.
- [49] MOHSIN MZ, OMER R, HUANG J, MOHSIN A, GUO M, QIAN J, ZHUANG Y. Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(3): 180-191
- [50] UGWUODO CJ, NWAGU TN. Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: a review of literature[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 238-250.
- [51] DONADIO G, LANZILLI M, SIREC T, RICCA E, ISTICATO R. Localization of a red fluorescence protein adsorbed on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 153.
- [52] LANZILLI M, DONADIO G, FUSCO FA, SARCINELLI C, LIMAURO D, RICCA E, ISTICATO

- R. Display of the peroxiredoxin Bcp1 of *Sulfolobus solfataricus* on probiotic spores of *Bacillus megaterium*. *New Biotechnology*, 46: 38-44.
- [53] ALI M, SONG X, DING D, WANG Q, ZHANG Z, TANG Z. Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: challenges and enhancement strategies[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 295: 118686.
- [54] MASOTTI F, GARAVAGLIA BS, GOTTIG N, OTTADO J. Bioremediation of the herbicide glyphosate in polluted soils by plant-associated microbes[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2023, 73: 102290.
- [55] SAEED MU, HUSSAIN N, SUMRIN A, SHAHBAZ A, NOOR S, BILAL M, ALEYA L, IQBAL HMN. Microbial bioremediation strategies with wastewater treatment potentialities: a review[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 818: 151754.
- [56] NARAYANAN M, ALI SS, EL-SHEEKH M. A comprehensive review on the potential of microbial enzymes in multipollutant bioremediation: mechanisms, challenges, and future prospects[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 334: 117532.
- [57] ELIZABETH GEORGE S, WAN Y. Microbial functionalities and immobilization of environmental lead: biogeochemical and molecular mechanisms and implications for bioremediation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 457: 131738.
- [58] RAVULA AR, YENUGU S. Pyrethroid based pesticides—chemical and biological aspects[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2021, 51(2): 117-1140.
- [59] YANG C, XU X, LIU Y, JIANG H, WU Y, XU P, LIU R. Simultaneous hydrolysis of carbaryl and chlorpyrifos by *Stenotrophomonas* sp. strain YC-1 with surface-displayed carbaryl hydrolase[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-8.
- [60] SHI L, LIU P, TAN Z, ZHAO W, GAO J, GU Q, MA H, LIU H, ZHU L. Complete depolymerization of PET wastes by an evolved PET hydrolase from directed evolution[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(14): e202218390.
- [61] COOK MA, WRIGHT GD. The past, present, and future of antibiotics[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(657): eabo7793.
- [62] JIA X, LI Y, XU T, WU K. Display of lead-binding proteins on *Escherichia coli* surface for lead bioremediation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(12): 3820-3834.
- [63] NANUDORN P, THIENGMAG S, WHANGSUK W, MONGKOLSUK S, LOPRASERT S. Potential use of two aryl sulfotransferase cell-surface display systems to detoxify the endocrine disruptor bisphenol A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 528(4): 691-697.
- [64] GAO F, DING H, FENG Z, LIU D, ZHAO Y. Functional display of triphenylmethane reductase for dye removal on the surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169: 181-187.
- [65] GAO F, DING H, XU X, ZHAO Y. A self-sufficient system for removal of synthetic dye by coupling of spore-displayed triphenylmethane reductase and glucose 1-dehydrogenase[J]. *Environmental Science Pollution Research*, 2016, 23(21): 21319-21326.
- [66] YANG C, FREUDL R, QIAO C, MULCHANDANI A. Cotranslocation of methyl parathion hydrolase to the periplasm and of organophosphorus hydrolase to the cell surface of *Escherichia coli* by the Tat pathway and ice nucleation protein display system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 434-440.
- [67] BORRELLE SB, RINGMA J, LAW KL, MONNAHAN CC, LEBRETON L, MCGIVERN A, MURPHY E, JAMBECK J, LEONARD G, HILLEARY M, ERIKSEN M, POSSINGHAM H, FROND H, GERBER L, POLIDOROL B, TAHIR A, BERNARD M, MALLOS N, BARNES M, ROCHMAN C. Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution[J]. *Science*, 2020, 369: 1515-1518.
- [68] BELL EL, SMITHSON R, KILBRIDE S, FOSTER J, HARDY FJ, RAMACHANDRAN S, TEDSTONE A, HAIGH S, GARFORTH A, DAY P, LEVY C, SHAVER M, GREEN A. Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(8): 673-681.
- [69] HEYDE SAH, ARNLING BÄÄTH J, WESTH P, NØRHOLM MHH, JENSEN K. Surface display as a functional screening platform for detecting enzymes active on PET[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-9.
- [70] HAN W, ZHANG J, CHEN Q, XIE Y, ZHANG M, QU J, TAN Y, DIAO Y, WANG Y, ZHANG Y. Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) through PETase surface-display: from function to structure[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 461: 132632.
- [71] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, TANIGUCHI I, YAMAJI H, MAEDA Y, TOYOHARA K, MIYAMOTO K, KIMURA Y, ODA K. A bacterium

- that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [72] BOLLINGER A, THIES S, KNIEPS-GRÜNHAGEN E, GERTZEN C, KOBUS S, HÖPPNER A, FERRER M, GOHLKE H, SMITS SHJ, JAEGER KE. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestuvaria*—structural and functional insights[J]. *Frontier in Microbiology*, 2020, 11: 1-16.
- [73] LU H, DIAZ DJ, CZARNECKI NJ, ZHU C, KIM W, SHROFF R, ACOSTA D, ALEXANDER B, COLE H, ZHANG Y, LYND N, ELLINGTON A, ALPER H. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization[J]. *Nature*, 2022, 604(7907): 662-667.
- [74] TOURNIER V, TOPHAM CM, GILLES A, DAVID B, FOLGOAS C, MOYA-LECLAIR E, KAMIONKA E, DESROUSSEAU ML, TEXIER H, GAVALDA S, COT M, GUÉMARD E, DALIBEY M, NOMME J, CIOCI G, BARBE S, CHATEAU M, ANDRÉ I, DUQUESNE S, MARTY A. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles[J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 216-219.
- [75] YAN F, WEI R, CUI Q, BORNSCHEUER U, LIU Y. Thermophilic whole-cell degradation of polyethylene terephthalate using engineered *Clostridium thermocellum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 374-385.
- [76] LIU M, NI H, YANG L, CHEN G, YAN X, LENG X, LIU P, LI X. Pretreatment of swine manure containing  $\beta$ -lactam antibiotics with whole-cell biocatalyst to improve biogas production[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 240: 118070.
- [77] LIU M, FENG P, KAKADE A, YANG L, CHEN G, YAN X, NI H, LIU P, KULSHRESHTHA S, ABOMOHR A, LI X. Reducing residual antibiotic levels in animal feces using intestinal *Escherichia coli* with surface-displayed erythromycin esterase[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122032.
- [78] LI R, ZHOU T, KHAN A, LING Z, SHARMA M, FENG P, ALI G, SAIF I, WANG H, LI X, LIU P. Feed-additive of bioengineering strain with surface-displayed laccase degrades sulfadiazine in broiler manure and maintains intestinal flora structure[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 406: 124440.
- [79] CHEN X, YANG J, LING Z, ZHOU T, ZHOU B, WANG H, LI X, LIU P. Gut *Escherichia coli* expressing  $Pb^{2+}$ -adsorption protein reduces lead accumulation in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 276: 116634.
- [80] LIU M, LU X, KHAN A, LING Z, WANG P, TANG Y, LIU P, LI X. Reducing methylmercury accumulation in fish using *Escherichia coli* with surface-displayed methylmercury-binding peptides[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 367: 35-42.
- [81] MISRA CS, SOUNDERAJAN S, APTE SK. Metal removal by metallothionein and an acid phosphatase PhoN, surface-displayed on the cells of the extremophile, *Deinococcus radiodurans*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 419: 126477.
- [82] ZHU N, ZHANG B, YU Q. Genetic engineering-facilitated assembly of synthetic bacterial cells and magnetic nanoparticles for efficient heavy metal removal[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(20): 22948-22957.
- [83] WANG Z, MA J, WANG T, QIN C, HU X, MOSA A, LING W. Environmental health risks induced by interaction between phthalic acid esters (PAEs) and biological macromolecules: a review[J]. *Chemosphere*, 2023, 328: 138578.
- [84] LIN J, YE W, XIE M, SEO D, LUO J, WAN Y, VAN DER BRUGGEN B. Environmental impacts and remediation of dye-containing wastewater[J]. *Nature Reviews Earth & Environment*, 2023, 4: 785-803.