

## 纤维素乙醇统合加工过程中的酵母多酶共展示体系 研究进展

陈宁 莫春玲 杜济良 李春美 田沈\*

(首都师范大学 生命科学学院 北京 100048)

**摘要:** 利用统合生物加工过程(Consolidated bioprocessing, CBP)生产纤维素乙醇是目前国内外的研究热点。CBP 需要一种“集成化”微生物,既能生产水解木质纤维素的多种酶类又能利用水解木质纤维素产生的糖类发酵产乙醇。以酿酒酵母表面展示技术为依托,建立 CBP 菌株多酶共展示体系的研究主要分为以下两个方向:一是直接将纤维素酶展示在细胞表面,即非复合型纤维素酶体系;另一种是通过表面展示纤维小体(Cellulosome)将纤维素酶间接地锚定在细胞表面,即复合型纤维素酶体系,本文主要从以上两个方向阐述了近几年对于纤维素乙醇生物统合加工过程的研究进展。因纤维小体对纤维素的降解能力比非复合型纤维素酶体系更强,所以其在酿酒酵母细胞表面的组装研究受到越来越多的关注,为了更深入透彻地了解纤维小体的酵母展示技术,文中对纤维小体的结构与功能及其在纤维素乙醇发酵中的应用研究进行重点论述,并对该领域的发展方向进行展望。

**关键词:** 纤维小体, 生物统合加工, 酿酒酵母, 纤维素乙醇

## Research advances on yeast co-displaying multi-enzyme system in consolidated bioprocessing of cellulosic ethanol

CHEN Ning MO Chun-Ling DU Ji-Liang LI Chun-Mei TIAN Shen\*

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** Consolidated bioprocessing (CBP), combining cellulose production, saccharification, and fermentation into one step, has been proposed as the most efficient way to reduce the production cost of ethanol from cellulosic biomass. Based on *Saccharomyces cerevisiae* surface display technology, cellulases are displayed on the cell surface using two approaches (1) noncomplexed cellulases, (2) multicellulase complex (cellulosome). The assembly of cellulosome on *Saccharomyces cerevisiae* has becoming a new hot spot in cellulosic ethanol CBP research because of its high cellulose hydrolytic activity than noncomplexed cellulases. In this paper, the basic structure of cellulosome and their applications in cellulosic ethanol production are reviewed. Also, the prospects of this research field are given based on our analysis of the problems that still have not solved by the previous studies.

**Keywords:** Cellulosome, Consolidated bioprocessing, *Saccharomyces cerevisiae*, Cellulosic ethanol

基金项目: 北京市教育委员会科技计划重点项目(No. KZ201310028034); 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAD22B03)

\*通讯作者: Tel: 86-10-68902330; 邮箱: cnu\_tianshen@sina.com

收稿日期: 2014-09-21; 接受日期: 2015-03-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-24

随着人类对可再生清洁能源的需求逐渐增加, 生物质能源的优势和潜在价值逐步显现, 以木质纤维素为原料的生物乙醇的生产对解决现阶段存在的能源和资源短缺, 环境污染问题具有重要的意义<sup>[1]</sup>。与第一代以粮食类淀粉为原料生产的燃料乙醇相比, 第二代燃料乙醇的生产是利用统合生物加工过程(Consolidated bioprocessing, CBP)将纤维素酶和半纤维素酶产生、纤维素水解和乙醇发酵组合在一起, 以木质纤维素为原料来高效生产燃料乙醇, 这是实现木质纤维素转化生物乙醇的有效途径之一<sup>[2-4]</sup>。CBP 有利于降低生物转化过程的成本, 简化生产工艺, 因此受到研究者的普遍关注<sup>[5-6]</sup>。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)遗传背景清晰, 基因水平的改造可操作性强, 并且具有生长速率快、对抑制剂耐受性强等优势, 被公认为是最具潜力的 CBP 乙醇生产菌株<sup>[7-9]</sup>。

以酿酒酵母为宿主菌的纤维素乙醇生物统合工艺研究主要集中在以下两个方面<sup>[10]</sup>: 一方面是利用酿酒酵母表面展示技术, 借助甘露糖蛋白(主要包括凝集素、絮凝素等)对酵母细胞壁的锚定作用直接将纤维素酶类锚定在细胞壁表面, 统称为非复合型纤维素酶体系; 另一方面是以酵母展示表达系统为基础, 纤维素酶组分与无催化活性的支架蛋白(Scaffoldin), 通过黏合域(Cohesin)-锚定域(Dockerin)之间的亲和作用, 借助  $\alpha$ -凝集素或  $\alpha$ -凝集素固定于酵母细胞表面, 组装成复合型纤维素酶体系, 即人工纤维小体。

## 1 酿酒酵母表面展示非复合型纤维素酶体系

在纤维素乙醇的研究过程中, 由于酿酒酵母不能直接利用纤维素类物质, 人们利用酵母展示表达系统将不同的纤维素酶展示表达在酵母细胞表面, 取得了一些突破性的进展。纤维素酶来源非常广泛, 目前普遍使用于纤维素乙醇生产的是来自真菌源的酶, 传统上认为主要由以下 3 种类型协同作用: 内切葡聚糖酶(Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EG); 外

切葡聚糖酶(Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, CBH), 即纤维二糖水解酶;  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -1,4-D-glucosidase, BGL)。利用酿酒酵母表面展示技术建立非复合型纤维素酶体系主要是将最基本的这 3 种纤维素酶通过甘露糖蛋白的锚定作用固定在细胞壁表面促进酶与底物的接触, 进而发挥酶的活性作用降解纤维素生产乙醇。

根据甘露糖蛋白类型的不同, 常见的酵母展示表达系统包括: 凝集素展示表达系统和絮凝素展示表达系统, 其中凝集素展示表达系统还分为  $\alpha$ -凝集素展示系统与  $\alpha$ -凝集素展示系统<sup>[11-12]</sup>。对于凝集素展示系统, 在酵母表面展示纤维素酶的众多研究中, 采用  $\alpha$ -凝集素展示系统的研究居多; 另一方面, 已有多种酶通过絮凝素展示表达系统实现了在酵母的表面展示, 如脂肪酶、淀粉酶、葡聚糖酶、有机磷水解酶等<sup>[13-15]</sup>, 但是对于纤维素酶类的展示表达鲜有报道。

2002 年, Fujita 等利用  $\alpha$ -凝集素展示系统在一株酿酒酵母 MT8-1 中将 EG 和 BGL 两种纤维素酶共展示在细胞表面<sup>[16]</sup>; 2004 年, 他们在酿酒酵母 MT8-1 中实现了 EG、CBH、BGL 三种纤维素酶在细胞表面的共展示, 纤维素酶可稳定地展示在细胞表面, 对酵母的正常生长及乙醇产生无任何影响<sup>[17]</sup>。为了证明固定化酶系相对于游离酶系的优势, 2010 年 Yanase 等将展示 EG、CBH、BGL 三种纤维素酶的 MT8-1/AGEGII-AGCBHII-AGBGL 菌株与 EG、CBH 分泌, BGL 表面展示的 MT8-1/EGII-CBHII-AGBGL 菌株进行了比较, 以 10 g/L 磷酸膨胀纤维素(Phosphoric acid swollen cellulose, PASC)为底物, 前者的乙醇产量达到 2.1 g/L, 而后者分泌型菌株的乙醇产量只有 1.6 g/L<sup>[18]</sup>。2011 年, Yamada 等利用  $\delta$ -整合的方法提高目的基因的拷贝数, 在二倍体酵母 MNII/coc $\delta$ BEC3 中实现了 3 种纤维素酶的最优表达量, 该菌株对底物磷酸膨胀纤维素的降解活性(381.4 mU/g wet cell)是其亲本单倍体菌株(63.5 mU/g wet cell)的 6 倍<sup>[19]</sup>。2013 年, Nakatani

等在展示 3 种纤维素酶的基础上, 还在细胞表面展示了来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的膨胀素类似物蛋白, 这种蛋白可以使纤维素的结构变得疏松, 有利于纤维素酶对底物的降解。这种共展示膨胀素类似物和纤维素酶的菌株以磷酸膨胀纤维素为底物经过 96 h 发酵, 乙醇产量(3.4 g/L)是纤维素酶展示菌株(2.5 g/L)的 1.6 倍<sup>[20]</sup>。Kondo 等<sup>[14]</sup>创造性地在酿酒酵母细胞表面展示 3 种纤维素酶, 并利用各种技术手段优化纤维素酶在细胞内的表达效率来开发纤维素乙醇微生物菌种的研究策略, 为构建全能型 CBP 菌株作出了杰出的贡献。

Yang 等一直致力于纤维素乙醇生产菌种的构建, 以本实验室专利菌种野生型二倍体工业菌株酿酒酵母 Y5 作为宿主菌, 已经成功地基于  $\alpha$ -凝集素在 Y5 细胞表面展示了来自棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的  $\beta$ -葡糖苷酶 I (BGL), 以 20 g/L 纤维二糖为底物, 乙醇产量为 5.07 g/L, 相当于理论值的 50.2%<sup>[21]</sup>。此外, 莫春玲等利用絮凝素(Flo1p)锚定方式, 将来自丝状真菌里氏木霉 *Trichoderma reesei* 的内切葡聚糖酶 II (EGII)、纤维二糖水解酶 II (CBHI II)以及来自棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus* 的  $\beta$ -葡糖苷酶 I (BGLI)展示在细胞表面, 构建同时表达 3 种纤维素酶的酵母菌群系统, 3 种纤维素酶具有良好的稳定性和功能活性; 在 EGII、CBHI 和 BGLI 协同作用下重组酵母菌株能够降解磷酸膨胀纤维素产乙醇的浓度达到 0.77 g/L, 乙醇产量为 0.35 g/g, 相当于理论值的 68.6%<sup>[22]</sup>。目前, 通过酵母表面展示系统实现木质纤维素直接发酵产乙醇的研究已经取得了一些里程碑式的进展, 在底物利用等方面取得了一定的突破, 但是现阶段来看, 表面展示的菌株仍然停留在实验室阶段, 其展示的酶活大多偏低, 导致底物利用率较低, 且底物应用范围较窄, 乙醇产量不高, 离工业生产的目标仍然有一段距离。分析来看: (1) 单纯展示几种纤维素酶类并不能满足木质纤维素物质降解的需求, 多酶间协同作用不足, 酶解效率低; (2) 底物利用不充分, 由于酵母展示表达系统自身的局限性, 及菌株代谢

负担承受能力的限制, 还不能够在一个细胞中实现纤维素酶和半纤维素酶的共展示, 半纤维素没有得到利用。今后, 此领域的研究需要进一步发展和完善。

## 2 酿酒酵母表面展示复合型纤维素酶体系(人工纤维小体)

要真正实现木质纤维素乙醇的 CBP 过程, 需要一株功能强大的宿主菌, 既能同时表达纤维素酶和半纤维素酶, 又可获得高的乙醇产量。一直以来, 人们都在不断尝试开发新系统来提高所展示酶的催化效率, 以期实现木质纤维素物质的更充分降解。其中模拟细菌纤维小体骨架建立起的酿酒酵母细胞表面展示的纤维小体结构表现出较高的纤维素降解活性和效率<sup>[23]</sup>。

天然的纤维小体是一种空间结构高度有序化的多酶复合体, 由支架蛋白、锚定元件、黏合蛋白、纤维素结合域和催化单位组成的复合体, 其独特的结构, 使得它可以更紧密地结合到底物表面<sup>[24-25]</sup>。纤维小体的脚手架蛋白(Scaffoldin)上存在纤维素结合结构域(Cellulose binding domain, CBD 或 CBM)以及 S-层同源结构域(S-layerhomology, SLH), SLH 可以把整个多酶复合体固定在细胞表面<sup>[26]</sup>。酶组分与脚手架蛋白通过黏附模块(Cohesin)和锚定模块(Dockerin)的亲合作用组装成多酶复合体<sup>[27]</sup>, 这种复合型纤维素酶体系相对于非复合型纤维素酶体系的优势在于除了纤维素酶之间本身存在的催化协同效应外, 纤维小体还会促发酶-酶邻近协同效应和酶-底物-细胞复合协同效应, 从而使纤维小体具有比非复合型纤维素酶系更强大的纤维素降解能力<sup>[28]</sup>。但是, 由于天然的纤维小体普遍存在于厌氧菌中<sup>[29-30]</sup>, 如热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)、解热纤梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)、食纤维梭菌(*Clostridium cellulovorans*)和生黄瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)等, 在实际的生产应用中存在着一定的局限性, 例如纤维素降解反应需在厌氧环境中进行, 与工业化生物乙醇发酵不匹配、

细菌对于乙醇及其他的发酵抑制剂耐受性不高等。为了解决这些问题, 将不同细菌种属来源的纤维小体的催化和非催化模块进行杂合组装, 并在传统的乙醇发酵工程菌中表达, 进行发酵研究, 形成人工纤维小体又称为嵌合纤维小体 (Cherimic cellulosome)<sup>[31]</sup>。人工纤维小体是利用黏附模块与锚定模块的种间特异性, 分别从不同纤维小体菌株中选择它们的一对黏附-锚定模块, 所有黏附模块与 CBD 组成无催化活性的脚手架蛋白, 锚定模块与外源酶类的 C 端相连组成的融合蛋白和脚手架蛋白上的黏附模块特异性的结合<sup>[32-34]</sup>。这种多酶复合体通过酵母细胞表面锚定蛋白凝集素替代细菌的 SLH 固定在细胞表面, 其中  $\alpha$ -凝集素较为常用, 多酶复合体与 AGA2 亚基相连通过二硫键与 AGA1 亚基结合实现人工纤维小体的表面展示<sup>[35]</sup>。近几年来, 这种人工纤维小体的研究越来越受到生物质能源科学家关注, 并且研究成果丰硕。

2009 年 Tsai 等通过酿酒酵母-大肠杆菌协同配合组装成微型纤维小体共展示表达 3 种真菌源的纤维素酶。单支架的脚手架蛋白通过酿酒酵母  $\alpha$ -凝集素展示系统锚定在细胞表面, 而重组的纤维素酶在大肠杆菌中异源表达, 通过大肠杆菌的细胞裂解液与酵母菌株孵化非完全自组装成微型纤维小体。10 g/L 的磷酸酸膨胀纤维素为底物进行发酵性能检测, 最终的乙醇浓度达到 3.5 g/L, 是添加等量纯化纤维素酶的 2.6 倍。消耗每克碳水化合物乙醇产量是 0.49 g, 到达理论值的 95%<sup>[36]</sup>。2010 年 Tsai 等在脚手架蛋白不变的情况下, 将 3 种重组的纤维素酶在酵母菌株中表达并分泌到细胞外。通过 4 种菌群混合培养的方式实现微型纤维小体的自组装。消耗每克纤维素乙醇产量是 0.475 g, 到达理论值的 93%<sup>[37]</sup>。2012 年, Tsai 等改进了纤维小体的脚手架结构, 形成具有 2 个二级骨架结构和 4 个催化模块及 2 个独立 CBM 模块的“四价”纤维小体结构。以磷酸膨胀纤维素为底物, 这个四价纤维小体水解活性是游离酶的 4.2 倍, 发酵 72 h, 乙醇浓度为

1.9 g/L<sup>[38]</sup>。以上实验结果说明纤维小体能够提升酶分子之间的临近效应, 增加空间协同作用, 明显提高了纤维素酶对底物的降解效率。同时, 也表明纤维小体空间结构复杂, 通过合理优化脚手架骨架的组成和空间结构, 增强纤维小体催化模块分子间协同效应与纤维小体之间协同效应的综合结果, 纤维小体的水解活性也就越高。

在研究酿酒酵母细胞自组装并表达纤维小体的过程中, 除了优化纤维小体模块分子的空间结构和骨架的组成, 优化催化模块上的纤维素酶的比例往往也能够提升纤维小体的最终酶活性。2013 年, Kim 等调节支架蛋白和纤维素酶的比例为 miniCipA:CelA:CBHII:BGLI=2:3:3:0.53 时, 经 94 h 乙醇产率在为 1.80 g/L, 而等量比例组装的纤维小体, 其纤维素乙醇产率仅为 1.48 g/L, 前者较后者酶活提升 20%<sup>[39]</sup>。2012 年, Fan 等在酿酒酵母细胞表面上构建了具有两个独立纤维小体骨架的纤维小体, 首次成功实现了重组酿酒酵母对结晶型纤维素(Avicel)的直接降解。其中纤维素内切酶 celCCA 和纤维二糖水解酶 celCCE 及  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Ccel\_2454 均来源于解纤维梭菌, 这样能够提升纤维素水解和酿酒酵母发酵过程中纤维小体的热稳定性。在酿酒酵母细胞表面表达并组装纤维小体后, 研究人员分析了纤维小体结构对于纤维素酶的酶-酶协同效应的作用影响。分别单独以游离状态的 CelCCA、CelCCE 和 Ccel\_2454 降解 Avicel, 得到的乙醇产率仅为 0.314 g/L, 而以两种酶共表达在纤维小体上时, 乙醇产率提高了 3.2 倍, 平均达到 1.004 g/L, 而当 3 种酶同时表达在纤维小体上时, 乙醇产率达到 1.412 g/L, 较之单酶纤维小体活性又提升了 3.6 倍之多<sup>[40]</sup>。该结果证明, 纤维小体上功能相关的催化模块之间的空间邻近效应促进了纤维素酶之间的协同效应, 进而增强了酵母细胞对底物的降解及利用能力, 提高了乙醇产量。

木质纤维素的主要成分是纤维素和半纤维素, 若将半纤维素酶类也通过人工纤维小体展示在酵

母细胞表面不仅能拓展底物的利用范围,也避免了底物利用不完全存在的资源浪费的缺陷。只是现阶段这方面的研究报道较少,仍有待开发完善。2012年, Sun 等在一株酿酒酵母 EBY100 细胞中表达并组装纤维小体,他们成功地在热纤梭菌脚手架蛋白上组装木聚糖内切酶(Endo-xylanase, XynII)、阿拉伯糖呋喃酶(Arabino furanosidase, AbfB)和  $\beta$ -木糖苷酶(Xylosidase XylA),该重组酵母能够用于同步糖化半纤维素并产乙醇,最终产率为 0.31 g/g 木糖<sup>[41]</sup>。但利用半纤维素产乙醇的能力明显不足。此部分研究工作依旧面临着很多的问题与挑战,但该实验为今后开发利用半纤维素指出了一条出路。

目前,利用纤维小体骨架在酵母细胞表面展示木质纤维素酶类并用于纤维素乙醇发酵的研究,无论构建的是完整纤维小体还是非完整的纤维小体,展示的是单一酶类还是多种酶类,均取得了一定的进展,虽然现阶段局限于实验室阶段,但相比较而言,在增强展示酶类的酶活性、拓宽底物利用的利用范围、提高底物的利用率等方面均已经取得了一定的突破。

所以,在今后的研究工作中,为了提高展示酶类的活性及纤维素乙醇的产量,将从以下几点着手进行人工纤维小体的优化:增加纤维小体的复杂程度;增强纤维小体的 3D 立体结构,改善纤维小体间相互作用;优化纤维小体酶的组成比例;优化纤维小体脚手架蛋白与纤维小体酶的比例等方面入手,通过消除或减少添加纤维素酶来完成的生物乙醇生产工艺中的糖化步骤,努力实现全细胞催化纤维素乙醇的生物转化过程。

### 3 结果与展望

利用酵母表面展示技术展示非复合型纤维素酶体系已取得一定的研究成果,酿酒酵母细胞表面外源酶能够在细胞表面实现自我固定化,展示在酵母表面的酶能够反复利用,避免了复杂的人工纯化酶的过程,但是在细胞表面的纤维素酶活性与游离酶相比有所下降,成功展示的纤维素酶稳定性也有

待提高,乙醇产量不理想。

纤维小体的研究近几年来发展迅速,该系统已经得到成功开发,并取得了十分重要的研究成果,纤维小体复杂的立体空间结构促发酶-酶邻近协同效应和酶-底物-细胞复合协同效应,从而使纤维小体具有比非复合型纤维素酶系更强大的纤维素降解能力,但是在这一领域里仍有许多亟待解决的问题,如:(1) 现有重组酶的组分单一,纤维素酶和半纤维素酶的展示分别单独进行,纤维小体的酶种类及各种酶的比例对于提高酶分子间的协同作用和底物的利用范围有决定性影响,未来可以将纤维素酶和半纤维素等木质纤维素酶整合到一个纤维小体中,整体提高底物的利用率。(2) 纤维小体的组装和发酵产乙醇是两个独立的过程,半乳糖诱导纤维小体的组装,经过离心分离后进行发酵,造成半乳糖的浪费,而且使加工工艺变得复杂<sup>[42-43]</sup>。(3) 纤维小体的结构复杂且分子量大,单一宿主菌纤维小体的自组装势必造成宿主菌的代谢压力过大,可以通过菌群混合培养的方法解决,但是菌群的混合比例,需根据具体情况进一步研究。

利用酵母表面展示技术将复合和非复合酶系表达在细胞表面具有表达偏差小,融合蛋白相对分子质量范围大,分子数量多,筛选、纯化、活性测定方便等优点,但是也存在一些隐患,如复合酶系中纤维素酶蛋白和锚定模块在形成融合基因时,由于活性区域受到空间位阻的影响无法与底物接近,使得酶活性降低或者缺乏生物活性;纤维素酶表达效率不高,无法完全将表达的蛋白固定在细胞壁上,存在蛋白向培养基中扩散的问题;多拷贝载体在酿酒酵母中不稳定,容易丢失;整合载体则由于拷贝数低导致表达的蛋白量较少,不能达到工业化生产乙醇的要求,有待进一步完善。

### 参考文献

- [1] Kerr RA. World oil crunch looming[J]. Science, 2008, 322(5905): 1178-1179
- [2] Hasunuma T, Kondo A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains[J]. Process

- Biochemistry, 2012, 47(9): 1287-1294
- [3] La Grange DC, den Haan R, van Zyl WH. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1195-1208
- [4] Zhang XZ, Zhang YH. One-step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*: opportunities and challenges[J]. Engineering in Life Sciences, 2010, 10(5): 398-406
- [5] Olson DG, McBride JE, Shaw AJ, et al. Recent progress in consolidated bioprocessing[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(3): 396-405
- [6] van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, et al. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*[A]/Olsson L. Biofuels[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007: 205-235
- [7] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1207-1218
- [8] Lau MW, Gunawan C, Balan V, et al. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2010, 3: 11
- [9] Olsson L, Hahn-Hägerdal B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 1993, 28(4): 249-257
- [10] Huang GL, Anderson TD, Clubb RT. Engineering microbial surfaces to degrade lignocellulosic biomass[J]. Bioengineered, 2013, 5(2): 96-106
- [11] Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries[J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(6): 553-557
- [12] Gai SA, Wittrup KD. Yeast surface display for protein engineering and characterization[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17(4): 467-473
- [13] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, et al. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4517-4522
- [14] Kondo A, Shigechi H, Abe M, et al. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(3): 291-296
- [15] Fukuda T, Tsuchiyama K, Makishima H, et al. Improvement in organophosphorus hydrolase activity of cell surface-engineered yeast strain using Flo1p anchor system[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(5): 655-659
- [16] Fujita Y, Takahashi S, Ueda M, et al. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5136-5141
- [17] Fujita Y, Ito J, Ueda M, et al. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1207-1212
- [18] Yanase S, Yamada R, Kaneko S, et al. Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(5): 449-455
- [19] Yamada R, Taniguchi N, Tanaka T, et al. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression[J]. Biotechnol Biofuels, 2011, 4: 8
- [20] Nakatani Y, Yamada R, Ogino C, et al. Synergetic effect of yeast cell-surface expression of cellulase and expansin-like protein on direct ethanol production from cellulose[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 66
- [21] Yang F, Cao M, Jin Y, et al. Construction of a novel a-Agglutinin expression system on the surface of wild-type *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and genetic immobilization of  $\beta$ -glucosidase1[J]. Bioenergy Research, 2013, 6(4): 1205-1211
- [22] Mo CL, Yang YY, Chen N, et al. Display cellulolytic enzymes on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface by using Flo1p as an anchor protein for cellulosic ethanol production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(9): 1401-1413 (in Chinese) 莫春玲, 杨越悦, 陈宁, 等. 利用 Flo1p 锚定蛋白在酿酒酵母表面展示三种纤维素酶的纤维素乙醇发酵[J]. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1401-1413
- [23] Garvey M, Klose H, Fischer R, et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(10): 581-593
- [24] Lamed R, Bayer EA. The Cellulosome of *Clostridium thermocellum*[J]. Advances in Applied Microbiology, 1988, 33: 1-46
- [25] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577
- [26] Leibovitz E, Ohayon H, Gounon P, et al. Characterization and subcellular localization of the *Clostridium thermocellum* scaffoldin dockerin binding protein SdbA[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(8): 2519-2523
- [27] Park JS, Matano Y, Doi RH. Cohesin-dockerin interactions of cellulosomal subunits of *Clostridium cellulovorans*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5431-5435
- [28] Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, et al. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 521-554
- [29] Ponpium P, Ratanakhanokchai K, Kyu KL. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(5/6): 459-465
- [30] Felix CR, Ljungdahl LG. The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1993, 47: 791-819
- [31] Mingardon F, Chanal A, Tardif C, et al. Exploration of new geometries in cellulosome-like chimeras[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7138-7149
- [32] Wieczorek AS, Martin VJ. Engineering the cell surface display of cohesins for assembly of cellulosome-inspired enzyme

- complexes on *Lactococcus lactis*[J]. Microbial cell Factories, 2010, 9: 69
- [33] Mingardon F, Chanal A, López-Contreras AM, et al. Incorporation of fungal cellulases in bacterial minicellulosomes yields viable, synergistically acting cellulolytic complexes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(12): 3822-3832
- [34] Fierobe HP, Mingardon F, Mechaly A, et al. Action of designer cellulosomes on homogeneous versus complex substrates controlled incorporation of three distinct enzymes into a defined trifunctional scaffoldin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(16): 16325-16334
- [35] Lilly M, Fierobe HP, van Zyl WH, et al. Heterologous expression of a Clostridium minicellulosome in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(8): 1236-1249
- [36] Tsai SL, Oh J, Singh S, et al. Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6087-6093
- [37] Tsai SL, Goyal G, Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7514-7520
- [38] Tsai SL, DaSilva NA, Chen W. Functional display of complex cellulosomes on the yeast surface via adaptive assembly[J]. ACS Synthetic Biology, 2013, 2(1): 14-21
- [39] Kim S, Baek SH, Lee K, et al. Cellulosic ethanol production using a yeast consortium displaying a minicellulosome and  $\beta$ -glucosidase[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 14
- [40] Fan LH, Zhang ZJ, Yu XY, et al. Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(33): 13260-13265
- [41] Sun J, Wen F, Si T, et al. Direct conversion of xylan to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying an engineered minihemicellulosome[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(11): 3837-3845
- [42] van der Vaart JM, te Biesebeke R, Chapman JW, et al. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(2): 615-620
- [43] Goyal G, Tsai SL, Madan B, et al. Simultaneous cell growth and ethanol production from cellulose by an engineered yeast consortium displaying a functional mini-cellulosome[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 89

## 科技信息摘录

### 揭示土壤微生物多样性维持机制

长期施用化学肥料常常会导致土壤退化,有机肥与化肥的联合施用可以缓解土壤退化,提升土壤生产力,然而其中内在的土壤微生物学机制并不清楚。日前,中科院南京土壤所揭示了土壤微生物多样性的维持机制,相关成果发布在“*Soil Biology and Biochemistry*”上。

砂姜黑土主要分布在黄淮海平原南部地区,这里是我国重要的粮食及棉、油、菜等作物产区。土壤所褚海燕课题组以安徽省农业科学研究所砂姜黑土长期施肥试验为研究平台,研究了不同施肥措施对砂姜黑土细菌群落结构与多样性的影响。

科研人员发现,长期单施化肥导致了土壤细菌群落结构的显著改变与多样性的大幅降低;粪肥的添加极大地缓解单施化肥对细菌群落的不利影响,而秸秆的添加对细菌群落的影响较小。进一步研究发现,粪肥主要通过改变土壤环境影响土壤细菌群落,而不是粪肥带入的外源细菌的直接输入。

这些结果表明,有机粪肥与化肥的联合施用,能促进土壤微生物群落结构的稳定与多样性的维持,为保持土壤生物活性、提升土壤生产力奠定了基础。

——摘自《科学网》2015-06-29

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/20156291311886436523.shtml>