



表面展示表达果胶酯酶的重组酿酒酵母构建及乙醇发酵

陈献忠^{1,2*}, 肖艳^{1,2}, 沈微^{1,2}, 樊游^{1,2}

¹ 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

² 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】以淀粉为原料的乙醇发酵工艺仍然是当前燃料乙醇的主要生产方式。然而, 一些原料中含有的果胶物质不仅降低了乙醇产率, 而且会导致醪液粘度增大, 从而会进一步影响传质和传热、增加设备负担等。构建能够自主降解果胶质的重组酿酒酵母并应用于燃料乙醇生产是值得探索的领域。【方法】论文将来源于黑曲霉的果胶酯酶基因克隆于 α 因子信号肽下游并通过酵母 α -凝集素C-端蛋白的介导构建了在细胞表面锚定表达果胶酯酶的重组酿酒酵母PE。【结果】重组酵母的果胶酯酶表达水平达到2.6 U/g (菌体湿重), 并进一步鉴定了重组果胶酯酶性质。以甘薯粉为原料的同步糖化发酵实验中, 重组酵母PE的乙醇浓度和乙醇转化率分别达到95 g/L和88.1%, 与出发菌株相比提高了2.2%。更重要的是, 表面展示果胶酯酶能够显著降低发酵过程中的发酵液粘度。【结论】通过在工业酿酒酵母表面展示表达果胶酯酶不仅能够提高糖化酶等的作用效果和酿酒酵母的代谢能力, 而且能够显著降低乙醇生产过程中发酵液的粘度, 将对工业规模乙醇生产在降低设备负担、节约能耗方面具有一定的潜在价值。

关键词: 生物燃料, 酿酒酵母, 果胶酯酶, 粘度, 乙醇, 表面展示

化石燃料的日渐枯竭和全球范围内的环境保护要求, 为燃料乙醇产业带来了很好的发展机遇^[1-2]。燃料乙醇是一种可再生的清洁能源, 在汽油中添加一定比例的乙醇, 能够显著降低汽车尾气对环境的污染^[3]。我国是继美国、巴西后的世界第三大燃料乙醇生产国, 年产量达151.8万吨, 并逐年增产。尽管纤维素是来源丰富、最有潜力的乙醇生产原料, 然而由于预处理成本较高, 工

艺不成熟等限制了其工业化应用^[4]。目前, 淀粉质原料仍然是燃料乙醇生产的主要原料, 但是原料中胶体、果胶质等粘性物质较多, 在进行浓醪发酵时导致醪液的粘度很大, 发酵液传质传热能力差, 严重影响酶的作用效果、细胞代谢活动和乙醇产率和产量^[5]。同时, 醪液粘度高还会堵塞输送管道、增加设备运转负担, 提高后期固液分离的处理难度, 给乙醇的浓醪发酵带来困难。

基金项目: 江苏省科技支撑计划(BE2012618)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-08-18; 修回日期: 2015-10-22; 网络出版日期: 2015-12-30

果胶质是植物细胞壁的重要组成部分,与纤维素、半纤维素以及某些伸展蛋白相互交联,起着支撑细胞结构的作用。它也是细胞间质的填充剂,影响细胞间的粘连和组织的硬度。果胶酶是一系列分解果胶质的酶的总称,可分为两大类,去酯酶类和解聚酶类^[6]。去酯酶类以果胶酯酶为代表,能够将果胶主链上的半乳糖醛酸甲酯脱去甲氧基,把果胶质分解成果胶酸和甲醇,从而降低果胶的酯化度。解聚酶类包括聚半乳糖醛酸酶、果胶裂解酶等,能够降解酯化度不高的果胶。果胶酯酶在纺织、造纸、污水处理等行业都有应用,在食品工业特别是果蔬加工中应用较多^[7-8],还可以用于酶法制备低甲基果胶。

尽管纤维素是乙醇生产最具潜力的原料,然而由于在纤维预处理存在一些较难克服的问题,目前的燃料乙醇生产原料仍然以玉米、甘薯为主。相比于玉米等其他原料,甘薯中的果胶含量显著较高,可达3.6%左右,并且甘薯渣的果胶物质含量更高,可达干渣重量的20%左右^[9]。由于果胶是一种线性的多糖聚合物,因此,在乙醇发酵过程中,果胶物质不仅影响乙醇转化率,更重要的是还增加了醪液粘度,从而提高了设备能耗。乙醇发酵过程中通过外源添加果胶酶改善乙醇发酵性能已有报道。王晓霞等在以甘薯粉为原料的浓醪发酵过程中,在液化前添加果胶酶,醪液粘度明显降低^[10]。甘明哲等研究了利用果胶酶和纤维素酶快速糖化鲜甘薯发酵醪的方法,降低了醪液粘度,提高了糖化效率,糖化后的醪液DE最高可达99.3%^[11]。黄玉红等探索了鲜甘薯燃料乙醇生产中木聚糖酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶和果胶酶的降黏效果,4种酶都可以有效降低发酵液粘度,其中纤维素酶的降黏效果最好,粘度由 1.7×10^4 mPa.s降到 8.8×10^2 mPa.s,降低了生产成本^[12]。Edwards等^[13]考察了利用果胶裂解酶代替商品化果胶酶混合剂处理腐烂桃子进行同步糖化发酵生产乙醇的可行性,结果表明利用重组大肠杆菌生产

的果胶裂解酶尽管不能完全降低底物中的果胶,但依然能够满足酵母的同步糖化发酵,乙醇的理论转化率超过90%。并且相较于商业果胶酶的乙醇浓度提高了12%。然而,尽管外源添加果胶酶能够提高乙醇生产效率,但添加商业化的酶制剂不仅增加了生产工艺的繁琐性,而且会提高生产成本。

本研究通过在工业酿酒酵母表面展示果胶酯酶构建了1株在乙醇发酵同时能够自主降解果胶物质的重组酿酒酵母,基于该酵母的发酵工艺不仅能够提高乙醇生产性能,而且能够显著降低发酵液粘度,促进酵母代谢。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌*Escherichia coli* JM109用于质粒构建,工业酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* CICIMY0086用于酵母转化宿主,以上菌种均由江南大学中国高校工业微生物资源与信息中心保藏。含有果胶酯酶基因的重组质粒pPIC9K-PE(利用RT-PCR克隆来源于黑曲霉的果胶酯酶基因An03g06310,去除自身信号肽后插入到pPIC9K的*SnaB* I位点)和酵母表面展示载体pMGK-AG为实验室前期构建,用于目的基因在酿酒酵母表面的展示。

1.2 酶和试剂

用于扩增果胶酯酶基因的引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,如表1所示;核酸内切酶、连接酶、DNA聚合酶等分子克隆工具酶均为大连宝生物工程公司产品;G418购自生工生物工程(上海)有限公司;酶特异性底物果胶为Sigma公司产品;发酵用甘薯粉为市售,淀粉含量70%左右;耐高温 α -淀粉酶及糖化酶为江苏锐阳生物科技有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯试剂。

表1. 实验所用引物和序列
Table 1. Primers and sequence used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
PE1	CCGGAATTCCGATGAGATTTCCTTCAA
PE2	CCGGAATTCTTAGTTGATGTAGCTAG

The underlined sequences correspond to the *EcoR* I restriction site in P1 and Phyl.

1.3 培养基和培养条件

LB培养基(g/L): 酵母粉5, 蛋白胨10, 氯化钠10, 37 °C用于*E. coli*的培养。添加100 μg/mL的氨苄青霉素用于重组菌的筛选。

YPD培养基(g/L): 酵母粉10, 蛋白胨20, 葡萄糖20, 30 °C用于*S. cerevisiae*的培养。添加300 μg/mL的G418用于重组酵母的筛选。

种子培养基(g/L): 葡萄糖20, 酵母粉8.5, 氯化铵1.3, 硫酸镁0.1, 氯化钙0.06, 30 °C用于酿酒酵母发酵前的种子培养。

发酵培养基: 按1:3 (W/V)的比例将甘薯粉与去离子水混合, 调pH至6.0, 加入耐高温α淀粉酶(10 U/g)。加热料液至95 °C, 维持2 h。降至室温后调pH至4.5, 添加去离子水以弥补水分损失。高压蒸汽灭菌, 降温后加入糖化酶(130 U/g)和尿素(终浓度0.05%)。

1.4 重组质粒的构建

重组质粒构建流程如图2所示。表面展示载体pMGK-AG为先期构建, 含有α-凝集素C-端蛋白的编码序列和酿酒酵母16S rRNA序列作为整合位点。以重组质粒pPIC9K-PE为模板, PCR扩增得到含信号肽的PE基因, 分别用限制性内切酶*EcoR* I酶切PCR产物和表面展示载体pMGK-AG, DNA片段经纯化后在T4 DNA连接酶作用下16 °C过夜连接, 转化大肠杆菌JM109, 构建表达载体pMGK-AG-PE。

1.5 工业酿酒酵母的转化及转化子筛选

重组质粒用*Sac* II酶切线性化, 电转化法转化

工业酿酒酵母^[14], 转化液涂布含有300 μg/mL G418的YPD平板, 30 °C培养48 h。随机挑取转化子提取染色体DNA, PCR扩增挑选阳性转化子。

1.6 酶活力测定方法

将筛选到的阳性转化子与出发菌株分别接种10 mL YPD培养基, 30 °C、200 r/min培养2 d, 12000 r/min离心30 s收集菌体, 用乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.0)洗涤2次, 重悬菌体, 进行果胶酯酶活力测定。为进一步判断果胶酯酶的表达位置, 分别取上清液和超声波破碎后的细胞重悬液进行酶活力测定。

果胶酯酶酶活测定参考文献[15], 采用碱滴定法, 具体操作: 将2.5 mL 1%的果胶溶液37 °C预热10 min, 加入500 μL待测酶液, 37 °C反应30 min, 煮沸15 min灭活, 以0.02 mol/L NaOH滴定至pH 8.0。酶活定义为: 在37 °C、pH 5.0条件下, 每分钟作用果胶产生1 μmol羧基所需的酶量定义为1个酶活力单位。

为评价重组果胶酯酶的最适pH, 分别在pH 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0和7.5 (0.1 mol/L乙酸-乙酸钠作为pH缓冲液), 7.0、7.5、8.0、8.5和9.0 (50 mmol/L Tris-HCl作为pH缓冲液)条件下, 37 °C反应30 min, 测定果胶酯酶酶活力。

1.7 重组工业酿酒酵母发酵实验

将筛选到的重组工业酿酒酵母与出发菌株分别接种10 mL YPD培养基, 30 °C、200 r/min培养12 h, 1%接种量转接50 mL YPD培养基, 每隔2 h取样, 在波长600 nm下测吸光值, 测定其生长曲线。

将重组工业酿酒酵母和出发菌株分别接种于20 mL种子培养基, 30 °C、200 r/min培养12 h, 以1%的接种量转接新的种子培养基, 30 °C、200 r/min培养18 h, 作为发酵实验的种子液。发酵培养基装液量为135 mL, 接种量为10%, 30 °C静止发

酵, 每隔8 h取样, 发酵56 h。为保证数据可靠性, 每组实验做3个平行。

为进一步验证果胶酯酶在乙醇发酵中的作用, 进行了外源添加果胶酯酶的工业酿酒酵母发酵实验, 发酵方法同上。

用高效液相色谱分析发酵过程中葡萄糖的消耗和乙醇的产生^[14], 色谱柱为Aminex HPX-87H离子交换柱, 流动相为10 mmol/L H₂SO₄, 流速0.8 mL/min, 柱温65 °C; 发酵初始的总糖采用酸水解法测定, DNS法测还原糖, 以公式计算乙醇转化率: 乙醇转化率=实测发酵乙醇浓度/(初始总糖浓度×0.511)×100%。

实验所用发酵培养基中不溶物较多, 不能直接测定OD₆₀₀来衡量菌体生长情况。使用血球计数板对发酵液中的菌体直接计数, 计数前800 r/min低速离心30 s, 去除部分不溶物。

2 结果和分析

2.1 表面展示载体pMGK-AG-PE的构建

表面展示表达果胶酯酶的重组质粒pMGK-AG-PE构建流程见图1。以重组质粒pPIC9k-PE为模板, PE1和PE2为引物扩增得到大小为1268 bp的含信号肽的sPE基因。将该片段与表面展示载体pMGK-AG连接, 转化大肠杆菌JM109, 构建表达载体pMGK-AG-PE。用限制性内切酶Hind III进行酶切, 得到大小1062、3694、5729 bp的片段, 酶切验证正确, 如图2所示。

2.2 重组酵母*S. cerevisiae*/pMGK-AG-PE的构建与筛选

将重组质粒pMGK-AG-PE电转化法转化酿酒酵母CICIMY0086, 挑取3个转化子提取染色体

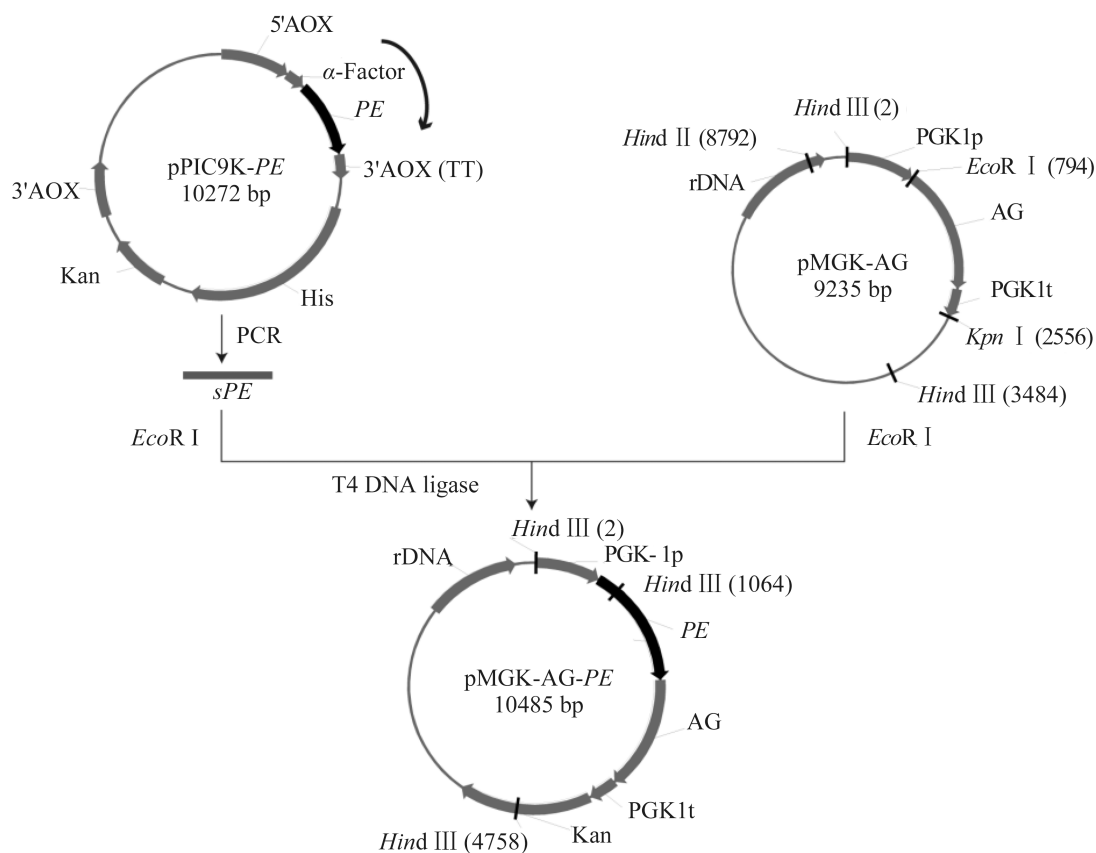


图 1. 重组质粒pMGK-AG-PE的构建

Figure 1. Construction of recombinant plasmid pMGK-AG-PE.

DNA, 以PE1和PE2为引物进行PCR验证。转化子在1268 bp处出现条带, 经DNA测序鉴定为含有PE基因的正确片段, 以出发菌株染色体DNA为模板PCR不能得到任何片段, 说明果胶酯酶基因成功插入到酿酒酵母染色体上, 电泳结果见图3。

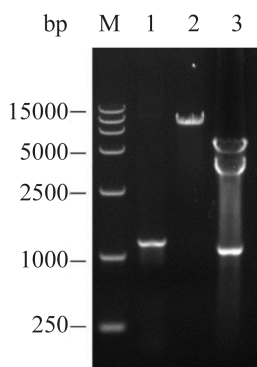


图 2. 重组质粒pMGK-AG-PE的酶切电泳图

Figure 2. Identification of recombinant plasmid pMGK-AG-PE by restriction enzyme. Lane 1: PCR product of *sPE* gene; lane 2: pMGK-AG/*SnaB* I; lane 3: pMGK-AG-PE/*Hind* III; M: DL15000 DNA marker.

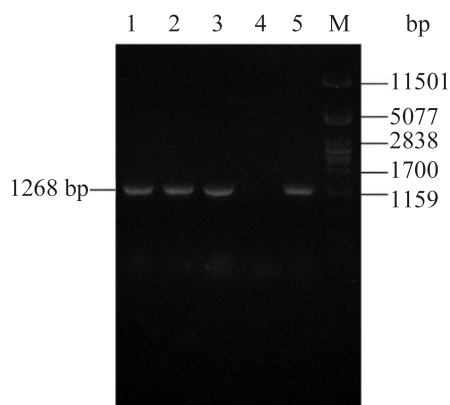


图 3. 酿酒酵母转化子的PCR验证

Figure 3. Verification for yeast transformants by PCR. Lane 1-3: PCR products using PE1 and PE2 as primers and yeast transformants as template; lane 4: PCR products using PE1 and PE2 as primers and parent *S. cerevisiae* as template; lane 5: PCR products using PE1 and PE2 as primers and plasmid pMGK-AG-PE as template; M: λ DNA/*Pst* I marker.

2.3 重组酵母*S. cerevisiae*/pMGK-AG-PE的果胶酯酶活性检测

挑取阳性转化子与出发菌株分别接种于YPD培养基, 培养16 h后, 收集细胞, 用pH 5.0缓冲液重悬, 分别测定菌悬液和发酵上清液的果胶酯酶酶活。出发菌株的菌悬液和上清液中均不能检测到酶活; 转化子菌悬液有酶活, 而其上清液中均没有酶活。1#转化子的酶活最高, 为2.6 U/g (菌体湿重), 该菌株命名为PE。超声波破碎重组酵母PE的菌悬液, 测定果胶酯酶酶活。破碎后的菌悬液酶活为2.2 U/g, 说明果胶酯酶在酵母细胞表面锚定表达。

2.4 重组果胶酯酶的酶学性质分析

2.4.1 重组果胶酯酶的最适温度和热稳定性: 测定重组果胶酯酶在不同温度下反应的酶活变化情况。由图4-A可知, 重组酶的最适温度为60 °C,

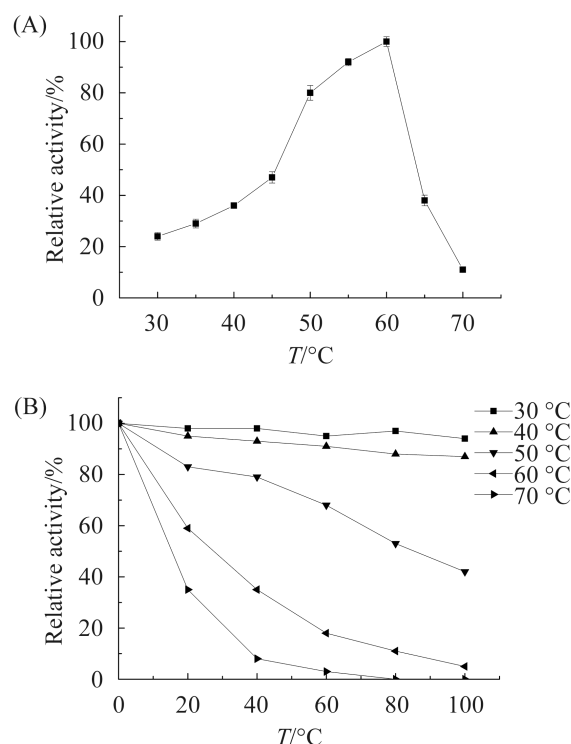


图 4. 表面展示果胶酯酶的最适温度(A)和热稳定性(B)

Figure 4. Optimal temperature (A) and thermostability (B) of recombinant pectinesterase displayed on yeast cell surface.

温度在50–60 °C之间, 酶活保持在80%以上, 当温度高于60 °C时, 酶活迅速下降, 65 °C时仅保留有38%的酶活。

为进一步考察重组果胶酯酶的热稳定性, 将制备的菌悬液在30、40、50、60、70 °C分别保温20、40、60、80、100 min, 测定残余果胶酯酶酶活, 结果如图4-B所示。样品30 °C和40 °C时稳定性较好, 保温100 min, 保持90%以上的酶活; 50 °C和60 °C保温过程中, 酶活逐渐下降, 保温60 min, 比酶活分别降至68%和18%; 样品在70 °C保温过程中酶活下降较快, 保温20 min, 仅保持35%的酶活。酿酒酵母CICIMY0086的最适发酵温度在30 °C左右, 重组果胶酯酶在此温度下比酶活不高, 但是稳定性好, 在酵母的发酵过程中可以逐渐水解果胶。

2.4.2 重组果胶酯酶的最适pH和pH稳定性: 在不同pH条件下测定重组果胶酯酶的最适pH和pH稳定性。由图5-A可知, 重组酶在酸性条件下酶活较高, 在pH 4.0–5.5之间酶活力较高, 保持在85%以上, pH 5.0时酶活力达到最高; 当pH低于4.5或高于5.5时酶活力下降较快, 当pH为碱性条件时酶活力几乎全部丧失。

重组果胶酯酶在不同pH条件下的稳定性情况如图5-B所示, 重组酶在酸性及中性条件下稳定性较好, pH 4.5–7.5条件下30 °C处理24 h, 仍保留

90%以上的酶活; pH高于7.5时稳定性较差, pH 8.0时, 仅保留45%的酶活。酿酒酵母适宜在酸性环境中生长, 最适发酵pH为4.0–5.0^[4,16], 重组果胶酯酶在此pH条件下酶活高, 稳定性好, 适合酿酒酵母的酒精发酵。

2.5 重组酵母PE甘薯粉培养基发酵实验

甘薯中的果胶类黏性物质含量较高, 在乙醇发酵过程中会造成醪液粘度增大, 同时果胶质还是构成细胞壁的重要成分。重组酵母PE在其细胞表面展示表达果胶酯酶, 为考察该重组酵母的发酵性能, 进行了甘薯粉培养基的乙醇发酵实验。

分别接种出发菌株和重组酵母PE于甘薯粉发酵培养基, 在三角瓶中静置发酵。为进一步验证果胶酯酶在乙醇发酵中的作用, 进行了外源添加果胶酯酶的出发菌株发酵实验, 果胶酯酶添加的终浓度为0.1 U/mL。

使用血球计数板对发酵液中的菌体直接计数, 结果如图6所示。发酵前期, 菌体数量呈对数增长, 12 h时, 基本达到峰值; 12 h后由于乙醇浓度的上升, 菌体的繁殖受到抑制, 数量趋于稳定; 发酵30 h后, 随着营养物质的消耗以及代谢废物的积累, 尤其是乙醇的积累, 菌体开始裂解, 菌体数量开始下降。发酵过程中, 重组酵母PE及外源添加果胶酯酶的出发菌株的菌体数量基本相同, 最大细胞生物量在 4×10^8 个/mL左右。

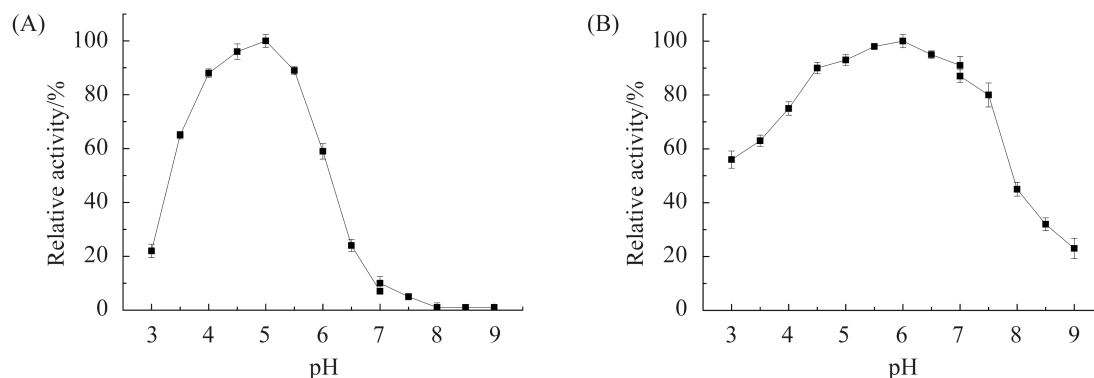


图 5. 表面展示果胶酯酶的最适pH (A)和pH稳定性(B)

Figure 5. Optimal pH (A) and pH stability (B) of recombinant pectinesterase displayed on yeast cell surface.

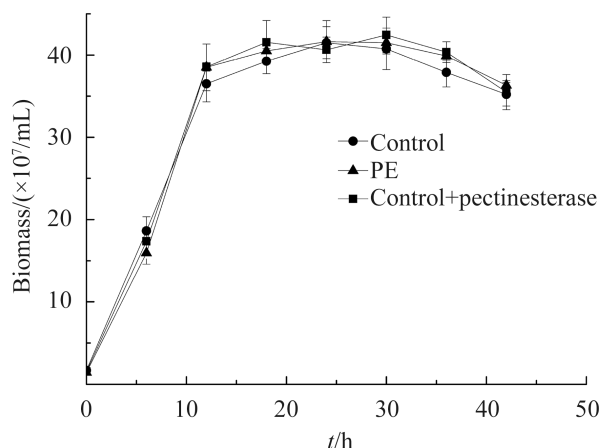


图 6. 出发菌株、重组酵母PE及外源添加果胶酯酶的发出发菌株在甘薯粉培养基中发酵的生物量

Figure 6. Biomass of *S. cerevisiae* (●), recombinant yeast PE (▲) and *S. cerevisiae* added pectinesterase in the fermentation medium (■).

进一步分析发酵过程中葡萄糖的消耗和乙醇的产生, 结果见图7。重组酵母PE乙醇生产速率与出发菌株基本相同, 发酵36 h, 乙醇浓度最高为95 g/L, 略高于对照菌株的乙醇浓度(93 g/L), 而外源添加果胶酯酶的发酵结果与重组酵母PE相似。发酵初始的总糖浓度为211 g/L, 重组酵母PE及出发菌株的乙醇转化率分别为88.11%和86.25%; 重组酵母PE发酵过程中的葡萄糖消耗速率略快于出发菌株。外源添加果胶酯酶的发出发菌株发酵情况与果胶酯酶重组酵母表现相似, 乙醇产量和葡萄糖消耗速率略快于出发菌株, 但差距不大。

甘薯粉中的果胶含量高, 发酵液粘度大, 会对传质和传热造成一定影响, 不利于糖化酶的作用和酿酒酵母的代谢, 还会影响CO₂的溢出。测定发酵过程中的粘度变化情况, 结果如图8所示。发酵前期, 由于糖的消耗, 发酵液粘度都有所下降, 相同发酵时间, 重组酵母PE的发酵液粘度明显低于出发菌株, 外源添加果胶酯酶的发出发菌株的发酵液粘度同样处于较低水平, 说明果胶酯酶能在甘薯乙醇发酵过程起到降粘的作用。粘度的降低有利于糖化酶与底物的充分接触, 这可能是

发酵6 h时重组酵母PE发酵液中糖浓度略高的原因; 粘度的降低也有利于酵母的代谢, 因此重组酵母PE的糖消耗和乙醇生产在发酵后期都略快于出发菌株, 乙醇转化率也稍高一些。

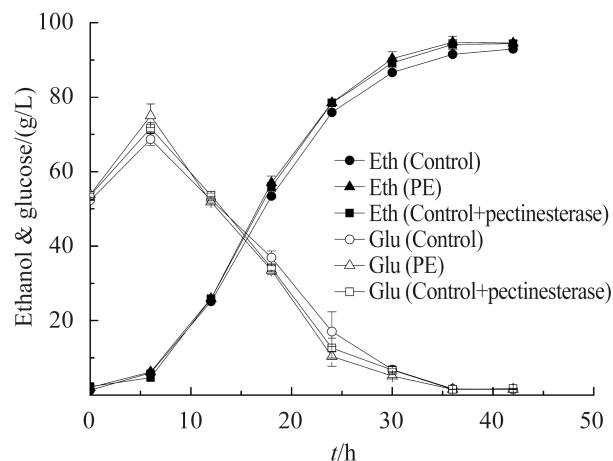


图 7. 出发菌株、重组酵母PE及外源添加果胶酯酶的发出发菌株在甘薯粉培养基中发酵的葡萄糖和乙醇变化

Figure 7. Glucose and ethanol concentrations of *S. cerevisiae* (○, ●), recombinant yeast PE (△, ▲) and *S. cerevisiae* added pectinesterase in the fermentation medium (□, ■).

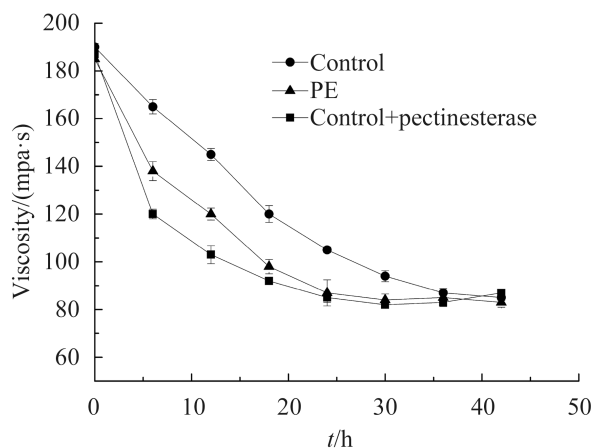


图 8. 重组酵母PE及对照菌株乙醇发酵过程中的粘度变化

Figure 8. Viscosity changes of *S. cerevisiae* (●), recombinant yeast PE (▲) and the control strain supplemented pectinesterase in the fermentation medium (■).

3 讨论

表面展示表达系统是利用基因工程技术, 将外源靶蛋白的基因序列与载体蛋白的基因序列融合, 导入宿主细胞, 融合蛋白在宿主体内诱导表达后, 在信号肽的引导下向胞外分泌, 借助细胞内膜蛋白转运到细胞表面机制, 在细胞表面表达^[17]。定位表达的靶蛋白具有相对独立的空间结构, 可保持生物活性。酿酒酵母表面展示系统相对比较成熟, 在全细胞催化、蛋白纯化、细胞吸附、抗体工程等领域广范应用^[18-19]。近年来, 利用表面展示技术改良酿酒酵母, 拓展底物利用范围, 提高乙醇发酵性能等方面取得了显著的进步, 已有包括纤维素酶、糖化酶、植酸酶等在酿酒酵母表面成功展示表达并应用于乙醇发酵的报道^[14,20-21]。

玉米、甘薯等淀粉原料是目前乙醇发酵的常用底物, 然而甘薯原料中含量较高的胶体、果胶质等粘性物质不仅在同步糖化发酵时会影响淀粉酶和糖化酶的作用效果, 而且在高浓度醪液发酵过程中阻碍酿酒酵母与可发酵性糖的接触, 影响发酵副产物CO₂的溢出, 降低乙醇转化率。同时, 传热差引起局部温度过高, 酵母代谢活性下降, 导致发酵时间延长以及乙醇产量下降。在大规模乙醇发酵生产中, 醪液粘度高还会堵塞输送管道、增加设备运转负担, 提高后期固液分离的处理难度, 给乙醇的浓醪发酵带来困难。近年来, 乙醇发酵过程中通过外源添加商品化果胶酶降解原料中的果胶物质, 降低醪液粘度的研究常有报道^[13,22]。然而, 外源添加果胶酶系导致生产成本进一步提高, 对于乙醇产业而言是不利的。

本研究利用整合载体将来源于黑曲霉的果胶酯酶基因整合于工业酿酒酵母染色体DNA中并通过 α -凝集素蛋白介导成功地在重组酵母的细胞表面展示表达, 重组酵母PE果胶酯酶酶活力达到2.6 U/g (湿菌体)。表面展示的果胶酯酶最适温度

为60 °C, 最适pH 5.0, 在pH 4.0-5.5范围内具有较高的活性和稳定性, 符合酿酒酵母的发酵要求。重组酵母PE在甘薯粉培养基中静置发酵, 发酵过程中发酵液的粘度明显低于出发菌株, 乙醇生产速度和葡萄糖消耗速度快于出发菌株。本文仅评价了表面展示表达果胶酯酶在摇瓶发酵水平对发酵醪液粘度的影响, 而对糖化酶和液化酶活性的影响、酿酒酵母细胞活性的影响以及工艺节能降耗的影响值得进一步研究, 也是本文后续的主要研究内容。

参考文献

- [1] Cai H, Dunn JB, Wang ZC, Han J, Wang MQ. Life-cycle energy use and greenhouse gas emissions of production of bioethanol from sorghum in the United States. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 141.
- [2] Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(12): 549-556.
- [3] Tamburini E, Bernardi T, Castaldelli G, Tumiatto G, Ferro S. Green electrochemical approach for delignification of wheat straw in second-generation bioethanol production. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(2): 551-557.
- [4] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 627-642.
- [5] Bothast RJ, Schlicher MA. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(1): 19-25.
- [6] Tu T, Bai YG, Luo HY, Ma R, Wang YR, Shi PJ, Yang PL, Meng K, Yao B. A novel bifunctional pectinase from *Penicillium oxalicum* SX6 with separate pectin methylesterase and polygalacturonase catalytic domains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 5019-5028.
- [7] Liu MQ, Dai XJ, Bai LF, Xu X. Cloning, expression of *Aspergillus niger* JL-15 endo-polygalacturonase A gene in *Pichia pastoris* and oligo-galacturonates production. *Protein Expression and Purification*, 2014, 94: 53-59.
- [8] Liu HS, Ding YC, Zhou JP, Shao WP. Studies on screening of pectinase-producing strain and fermentation conditions. *Acta*

- Microbiologica Sinica*, 1993, 33(3): 199–203. (in Chinese)
- 刘海森, 丁雨辰, 周剑平, 邵威平. 产果胶酶的菌种选育及发酵条件. *微生物学报*, 1993, 33(3): 199–203.
- [9] Takamine K, Abe J, Shimono K, Sameshima Y, Morimura S, Kida K. Physicochemical and gelling characterization of pectin extracted from sweet potato pulp. *Journal of Applied Glycoscience*, 2007, 54: 211–216.
- [10] Wang XX, Zhang KC, Zhang LX, Xu R. Study on the application of pectinase in ethanol high-gravity-fermentation. *Food and Fermentation Industries*, 2001, 27(3): 44–47. (in Chinese)
- 王晓霞, 章克昌, 张礼星, 徐柔. 酒精高浓发酵过程中果胶酶应用的研究. *食品与发酵工业*, 2001, 27(3): 44–47.
- [11] Gan MZ, Jin YL, Zhou LL, Qi TS, Zhao H. Low viscosity and rapid saccharification pretreatment of fresh sweet potato for ethanol production. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2009, 15(2): 262–266. (in Chinese)
- 甘明哲, 靳艳玲, 周玲玲, 戚天胜, 赵海. 适合鲜甘薯原料乙醇发酵的低粘度快速糖化预处理. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(2): 262–266.
- [12] Huang YH, Jin YL, Zhao Y, Li YH, Fang Y, Zhang GH, Zhao H. Viscosity reduction during fuel ethanol production by fresh sweet potato fermentation. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2012, 18(4): 661–666. (in Chinese)
- 黄玉红, 靳艳玲, 赵云, 李宇浩, 方扬, 张国华, 赵海. 鲜甘薯发酵生产燃料乙醇中的降粘工艺. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(4): 661–666.
- [13] Edwards MC, Williams T, Pattathil S, Hahn MG, Doran-Peterson J. Replacing a suite of commercial pectinases with a single enzyme, pectate lyase B, in *Saccharomyces cerevisiae* fermentations of cull peaches. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(4): 679–686.
- [14] Guo ZP, Zhang L, Ding ZY, Wang ZX, Shi GY. Improving the performance of industrial ethanol-producing yeast by expressing the aspartyl protease on the cell surface. *Yeast*, 2010, 27(12): 1017–1027.
- [15] Fries M, Ihrig J, Brocklehurst K, Shevchik VE, Pickersgill RW. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *The EMBO Journal*, 2007, 26(17): 3879–3887.
- [16] Zhang BL, Yunianta, Vallet C, Martin YL, Martin ML. Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: influence of the fermentation medium. *Bioorganic Chemistry*, 1997, 25(2): 117–129.
- [17] Lee SY, Choi JH, Xu ZH. Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(1): 45–52.
- [18] Blaise L, Wehnert A, Steukers MPG, van den Beucken T, Hoogenboom HR, Hufton SE. Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene*, 2004, 342(2): 211–218.
- [19] Gai SA, Wittrup KD. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(4): 467–473.
- [20] Tanaka T, Yamada R, Ogino C, Kondo A. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(3): 577–591.
- [21] Wen F, Sun J, Zhao HM. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 1251–1260.
- [22] Nwobi A, Cybulska I, Tesfai W, Shatilla Y, Rodríguez J, Thomsen MH. Simultaneous saccharification and fermentation of solid household waste following mild pretreatment using a mix of hydrolytic enzymes in combination with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 929–938.

Surface display of pectinesterase on *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol production from sweet potato starch

Xianzhong Chen^{1,2*}, Yan Xiao^{1,2}, Wei Shen^{1,2}, You Fan^{1,2}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Bioethanol is a new type of green energy, and predominantly produced currently from starch such as corn and sweet potato. However, pectin contained in the substrates will increase the viscosity of ethanol fermentation broth, which will affect the mass transfer and increase the burden of equipment. In this study, we expressed pectinesterase on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface and evaluated its effect on fermentation viscosity decrease. [Methods] Pectinesterase gene was fused with the C-terminal-half region of α -agglutinin and then inserted into the downstream of the secretion signal gene, to generate a yeast surface-display expression vector pMGK-AG-PE, which was then transformed into the industrial *S. cerevisiae*. [Results] Recombinant yeast strain PE successfully displayed pectinesterase on the surface of cells with 2.6 U/g wet cells. The recombinant enzyme performed the maximal activity at 60 °C, pH 5.0, and this enzyme had high activity and stability from pH 4.0 to 5.5. In the simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato, the ethanol production of the PE strain was 95 g/L. The viscosity of fermentation broth using the PE strain was lower than that of the parent strain, 120 mPa.s compared to 145 mPa.s after 12 h of fermentation. [Conclusion] Expressing pectinesterase on yeast cells surface decreased viscosity of fermentation broth, which is beneficial to starch degradation and ethanol production.

Keywords: biofuel, *Saccharomyces cerevisiae*, pectinesterase, viscosity, ethanol, surface-displaying

(本文责编: 李磊)

Supported by the Jiangsu Province Science and Technology Support Program (BE2012618)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

Received: 18 August 2015; Revised: 22 October 2015; Published online: 30 December 2015