

# 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

莫春玲, 杨越悦, 陈宁, 杨秀山, 田沈

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

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. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1401-1413.

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. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1401-1413.

**摘要:** 为了简化纤维素乙醇生产工艺, 实现纤维素利用与乙醇发酵的同步进行, 通过酵母细胞表面展示技术, 以酿酒酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* Y5 为受体, 通过絮凝素 (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 (CBHII) 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。经过免疫荧光验证展示酶的细胞蛋白定位, 酶活测定, 乙醇发酵性能验证, 结果表明: 展示表达的 3 种纤维素酶具有良好的稳定性和功能活性; 在 EGII、CBHII 和 BGLI 协同作用下重组酵母菌株能够水解溶胀磷酸纤维素 (Phosphoric acid swollen cellulose, 简称 PASC) 并产生乙醇, 乙醇浓度达到最大值 0.77 g/L, 乙醇产量为 0.35 g/g, 相当于理论值的 68.6%。本研究成功构建了利用 Flo1p 作为锚定蛋白的絮凝素展示系统, 初步实现了纤维素利用与乙醇发酵的同步进行, 为利用酿酒酵母表面展示技术固定并表达纤维素酶提供了一定的理论依据。

**关键词:** 细胞表面展示, Flo1 锚定蛋白, 酵母菌群, 纤维素乙醇

**Received:** December 3, 2013; **Accepted:** January 7, 2014

**Supported by:** National Science and Technology Support Plan (No. 2013BAD22B03), National Natural Science Foundation of China (No. 31100578), Key Project of Beijing Scientific Research Plan (No. KZ201310028034).

**Corresponding author:** Shen Tian. Tel: +86-10-68902330; E-mail: cnu\_tianshen@sina.com

国家科技支撑计划 (No. 2013BAD22B03), 国家自然科学基金 (No. 31100578), 北京市教育委员会科技计划重点项目 (No. KZ201310028034) 资助。

# Display cellulolytic enzymes on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface by using Flo1p as an anchor protein for cellulosic ethanol production

Chunling Mo, Yueyue Yang, Ning Chen, Xiushan Yang, and Shen Tian

College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China

**Abstract:** In this study, we constructed a yeast consortium surface-display expression system by using Flo1 as an anchor protein. Endoglucanase II (EGII) and cellobiohydrolase II (CBHII) from *Trichoderma reesei*, and  $\beta$ -glucosidase 1 (BGLI) from *Aspergillus aculeatus* were immobilized on *Saccharomyces cerevisiae* Y5. We constructed the cellulose-displaying expression yeast consortium (Y5/fEGII:Y5/fCBHII:Y5/fBGLI=1:1:1) and investigated the enzymatic ability and ethanol fermentation. The displayed cellulolytic enzymes was stable during the 96-h fermentation. The yeast consortium produced 0.77 g/L ethanol from 10 g/L phosphoric acid swollen cellulose (PASC) within 96 h. The yield (in grams of ethanol produced per gram of carbohydrate consumed) was 0.35 g/g, which correspond to 68.6% of the theoretical yield.

**Keywords:** cell surface display, Flo1 protein, yeast consortium, cellulosic ethanol

以石油等不可再生资源为基础的现代工业化社会的发展模式正面临能源枯竭的严重威胁,作为一种安全的液体燃料和石油添加剂,燃料酒精是公认为最具发展前景的可再生清洁能源之一<sup>[1]</sup>。以农作物秸秆、垃圾纤维等纤维素类物质为代表的生物质物质具有来源广泛、价格低廉、可再生等诸多优点,因此研究开发木质纤维素类物质的生物转化技术对于开发新能源,保护环境具有重要的现实意义<sup>[2]</sup>。

目前,酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 是工业上生产乙醇的优良菌株。然而,在利用纤维素物质进行乙醇生产的过程中,酵母不能直接利用纤维素类物质,同时由于纤维素酶制剂的生产成本过高也制约纤维素乙醇的大规模应用。为了简化加工过程,降低能耗,酵母表面展示技术应运而生,该项技术是近年来随着基因工程的发展而兴起的可将外源蛋白锚定在细胞壁上并表达的重要生物技术,近年来颇受

关注<sup>[3]</sup>,酵母表面展示系统以酿酒酵母表面展示系统发展较为完善。根据外源目的蛋白与酵母细胞壁蛋白的融合部位不同,酿酒酵母表面展示系统主要分为凝集素系统和絮凝素系统。絮凝素 Flo1p 是一种在絮凝中起重要作用的酵母细胞壁蛋白,由 *Flo1* 基因编码, Flo1p 的功能结构域包括两部分,一部分是 C-端的 GPI 锚定区,可以与细胞膜、细胞壁结合;另一部分是 N-端的絮凝结构域,可以与胞壁糖类相结合。以絮凝素为锚定蛋白,外源靶蛋白酶分子可实现在酿酒酵母表面 C-端和 N 端锚定两种截然不同的展示方式<sup>[4]</sup>。一些大小在 0.93–136 kDa 的外源蛋白已经成功地利用絮凝素展示系统固定在酵母细胞表面,如淀粉酶、脂肪酶等<sup>[5-7]</sup>。

在酵母表面展示纤维素酶的众多研究中,采用凝集素展示系统的研究居多<sup>[8-10]</sup>,而利用絮凝素展示系统的鲜有报道。絮凝素展示系统作为后续发展系统,已被证实具有更多的展示方

式和更好的展示能力<sup>[11]</sup>。通过构建酿酒酵母絮凝素展示系统将纤维素酶展示在酵母细胞表面,以固定化酶的方式来实现纤维素水解和乙醇发酵同步进行,从而大大简化了乙醇生产工艺流程,降低生产成本,提高纤维素的利用效率;同时该展示系统可以依据不同的目的蛋白来选择不同的展示方式,被展示的外源蛋白能够保持相对独立的空间结构和生物活性,推动了纤维素酶固定化的进一步研究和开发。

在前期的研究中,已成功构建基于  $\alpha$ -凝集素的 *S. cerevisiae* Y5 表面展示系统并成功使 EGII、CBHII 及 BGLI 在 Y5 细胞表面得以展示<sup>[12]</sup>。*S. cerevisiae* Y5 为实验室专利授权菌株,它具有较高的乙醇产率,代谢副产物少,耐受乙醇及其他抑制剂能力强等优点。因此本研究利用 *S. cerevisiae* Y5 絮凝素为锚定蛋白构建絮凝素展示系统,将 3 种纤维素酶都以较优良的活性形式展示在宿主细胞表面。通过这一安全无污染、环境友好型的改造,很大程度上简化燃料乙醇的生产流程,降低能耗,同时为实现全细胞催化纤维素乙醇的生物转化提供基础,所以此系统具有较广的应用前景<sup>[13-14]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

*S. cerevisiae* Y5<sup>[15]</sup>作为纤维素酶展示的宿主菌;大肠杆菌 *Escherichia coli* Top 10 (Tiangen 生化)用于亚克隆;里氏木霉 *Trichoderma reesei* 40358 和棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus* 2193 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC),作为纤维素酶基因的来源。

酵母表面展示载体 pYD1 购自 Invitrogen;

酵母整合载体 YIP5-KanR 由本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基及培养条件

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, pH 7.0, 添加 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 条件下用于 *E. coli* 转化子的筛选。

YPD 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 添加 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 G418 于 30  $^{\circ}\text{C}$ , 150 r/min 条件下筛选酵母转化子。

YPG 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 半乳糖 20, 20  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 条件下用于酵母转化子的诱导。

YP-PASC 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 磷酸膨胀纤维素<sup>[16]</sup> 10, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下用于纤维素水解及乙醇发酵。

表 1 总结了本研究涉及的相关展示载体及重组菌株的特性。

#### 1.1.3 工具酶和化学试剂

限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; DNA 连接酶购自 Fermentas; *Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量标准、质粒提取试剂盒、琼脂凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 微晶纤维素 Avicel PH-101 及羧甲基纤维素 (CMC) 购自 Sigma; 其他抗生素与生化试剂均为国产或进口分析纯; 引物合成和基因序列测定均由北京三博远志生物技术有限公司完成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 絮凝素展示系统基因的获得及表达载体的构建

根据 *S. cerevisiae* Y5 基因组的相关基因序列设计引物,以 *S. cerevisiae* Y5 的 cDNA 为模板,分别扩增得到絮凝素展示系统的信号肽基因片段(MF.SS)和絮凝素 C 端锚定的基因片段

表 1 重组菌株及展示载体特征

Table 1 Relevant features of recombinant strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Relevant features	Source
<b><i>S. cerevisiae</i> strains</b>		
Y5	Diploid, flocculation ability	Our lab
Y5/fEGII	Display of EGII of <i>T. reesei</i>	This study
Y5/fCBHII	Display of CBHII of <i>T. reesei</i>	This study
Y5/fBGLI	Display of BGLI of <i>A. aculeatus</i>	This study
<b>Plasmids</b>		
pYD1	No expression	Invitrogen
pBGLI (NS)	Surface expression of $\beta$ -glucosidase I	This study
pEGII (KB)	Surface expression of endoglucanase II	This study
pCBHII (KB)	Surface expression of cellobiohydrolase II	This study

(*FLO1*)。MF.SS 片段经 *Sac* I /*Nhe* I 双酶切后插入 pYD1 质粒的 GAL1 启动子下游, *FLO1* 片段经 *Sph* I /*Sal* I 双酶切后插入 pYD1 质粒的多克隆位点的下游; 根据已知的 *kanr* 基因序列设计引物, 以质粒 YIP5-KanR 为模板扩增获得 *kanr*.ORF 片段, 经 *Spe* I /*Sal* I 双酶切得到 *kanr* 基因的 ORF 片段, 插入质粒 pYD1 的相应位点。以上构建所得中间载体称为 pFlo1。

根据 *T. reesei* 的 *EGII* 与 *CBHII* 基因序列和 *A. aculeatus* 的 *BGLI* 基因序列设计引物, 分别以已构建好的质粒 pEGII (EBNA)、pCBHII (EBNA)、pBGLI (NB) 为模板, 通过 PCR 的方法扩增获得 *egl2* 与 *cbh2* 及 *bgl1* 去除本身信号肽的成熟区域。将由 *Kpn* I /*Bam*H I 双酶切得到的 *egl2* 片段插入到 pYD1 的相应位点之间, 获得的最终表达载体命名为 pEGII (KB); 将由 *Kpn* I /*Bam*H I 双酶切的 *cbh2* 片段替换掉 pEGII (KB) 的 *egl2* 得到表达载体 pCBHII (KB); 将 *Not* I /*Sph* I 双酶切得到的 *bgl1* 片段插入到 pYD1 的相应位点之间, 获得表达载体 pBGLI

(NS)。筛选获得重组质粒阳性克隆, 并进行测序和鉴定。

本研究中使用的引物序列及对应酶切位点见表 2。

### 1.2.2 酵母转化及筛选

将测序结果正确的表面展示载体 pEGII(KB)、pCBHII(KB)、pBGLI(NS) 利用 LiAc 完整细胞法<sup>[17]</sup> 分别转化 Y5, 转化后在含不同浓度 G418 (500  $\mu$ g/mL、600  $\mu$ g/mL 和 700  $\mu$ g/mL) 的 YPD 平板上筛选得到转化子。挑取单克隆进行细胞的扩大培养, 分别提取酵母质粒作为模板, 进行 PCR 验证, PCR 产物经测序正确后, 将阳性转化子分别命名为 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGLI。

### 1.2.3 表面展示蛋白的定位验证

参照文献[18]进行: 取经半乳糖诱导 48 h 的重组酵母菌株 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGLI, 以 Y5 为阴性对照, 进行免疫荧光检测。样品经 1 $\times$ PBS 溶液洗涤后, 取沉淀悬浮于 250  $\mu$ L 的 1 $\times$ PBS、1 mg/mL BSA 中, 抗 Xpress

表 2 引物序列及相应酶切位点

Table 2 Primer sequences and restriction sites used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
F: <i>egl2</i> ( <i>Kpn</i> I)	GGGGT <u>ACCC</u> CAGCAGACTGTCTGGGGCCA	28
R: <i>egl2</i> ( <i>Bam</i> H I)	CGGGAT <u>CCG</u> GCTACTTTCTTGCGAGACACGAG	31
F: <i>cbh2</i> ( <i>Kpn</i> I)	GCGGT <u>ACCCA</u> AGCTTGCTCAAGCGTCT	27
R: <i>cbh2</i> ( <i>Bam</i> H I)	GCGGAT <u>CCTT</u> ACAGGAACGATGGGTTTGCG	30
F: <i>bgl1</i> ( <i>Not</i> I)	TTGCGG <u>CCGCG</u> GATGAACTGGCGTTCTCTCCTCCT	34
R: <i>bgl1</i> ( <i>Sph</i> I)	ACATG <u>CATGCT</u> CATTGCACCTTCGGGAG	28
F: <i>kanr. ORF</i> ( <i>Spe</i> I)	GCCG <u>ACTAGT</u> TAGAAAACTCATCGAGCATCA	32
R: <i>kanr. ORF</i> ( <i>Sal</i> I)	TAG <u>TCCGACG</u> AAACGCGGAGGCAGCTGTAATC	32
F: <i>FLO1</i> ( <i>Not</i> I - <i>Sph</i> I)	ATTTGCGG <u>CCGCG</u> GCATGCATTACCACCTGCTAC	33
R: <i>FLO1</i> ( <i>Spe</i> I - <i>Sal</i> I)	CCG <u>ACTAGT</u> GTCGACAATTCTCTTAGGATTGCA	33
F: <i>MF.SS</i> ( <i>Sac</i> I)	GGCCG <u>GAGCTC</u> ATGAGATTTCTTCAATTTTAC	34
R: <i>MF.SS</i> ( <i>Nhe</i> I)	GCG <u>CTAGCT</u> CTTTTATCCAAAGATACCCCTTCTT	34

Restriction sites are underlined.

标签的小鼠单克隆抗体 (Invitrogen anti-Xpress mouse monoclonal IgG 按体积比 1 : 1 000 稀释加入), 室温放置 1.5 h, 每隔 15 min 轻微振荡 1 次。1×PBS 离心洗涤若干次后, 加入 1×PBS、1 mg/mL BSA 和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗鼠源的二抗 (Jackson, FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(H+L)), 按体积比 1 : 200 稀释加入), 在黑暗处放置 1 h。离心, 1×PBS 洗涤 2 次后, 在免疫荧光显微镜下观察。

#### 1.2.4 重组菌株酶活测定

菌株 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGLI 经预培养后在 YPG 中诱导 48 h, 将 1 mL 菌液离心后取细胞沉淀用于酶活测定。酶活性测定采用 DNS 显色法与 pNPG 显色法<sup>[19]</sup>。

EGII 活性测定方法如下: 以 2 mL 1% (W/V) 的 CMC (50 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 5.0) 配制) 为底物, 50 °C 保温 3 min 后, 加入 0.5 mL 适当稀释的酶液 50 °C 反应 30 min, 再加入

2.5 mL DNS 沸水浴 5 min, 最后加蒸馏水定容至 10 mL, 在 540 nm 处测吸光值。对于 CBHII 活性测定, 是以 2 mL 0.4% (W/V) 的 PASC (50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 配制) 为底物, 其他条件同 EGII 活性测定过程。一个 EGII/CBHII 活性单位定义为: 每分钟水解底物产生 1 μmol/L 还原糖所需要的酶量<sup>[16]</sup>。

BGLI 活性的测定方法如下: 1 mL 适当稀释的酶液与 1 mL 1.7 mmol/L 的对硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)溶液 (0.1 mmol/L 醋酸钠溶液配制, pH 5.0) 混合后, 于 37 °C 下保温 10 min 后, 立即加入 2 mL 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 添加蒸馏水定容至 10 mL, 摇匀, 在 400 nm 下测定吸光度。一个 BGLI 活力单位定义为: 每分钟水解生成 1 μmol/L 对硝基苯酚所需要的酶量<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.5 单展示菌群的纤维素乙醇发酵

重组菌株经预培养, 诱导 48 h 后, 将菌株 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGLI 按 1 : 1 : 1

混合为单展示酵母菌群，重悬于 100 mL YP-PASC 培养基中，总的酵母菌群细胞量为 30 g/L 湿重，于 30 °C、150 r/min 条件下进行纤维素乙醇发酵。发酵起初每隔 4 h 取样 1 次，12 h 后每隔 12 h 取样 1 次，连续取样 108 h。测定发酵样品总糖、葡萄糖和乙醇浓度。总糖测定采用苯酚-硫酸法<sup>[18]</sup>；葡萄糖浓度以高效液相色谱 (HPLC, 安捷伦 1260) 测定，条件: H(Hi-Plex H) 柱 (300 mm×7.7 mm), 柱 60 °C, 示差检测器 RID, 检测器温度 40 °C, 流动相稀硫酸 (0.005 mol/L), 流速 0.6 mL/min, 进样量 5 μL。乙醇浓度以气相色谱 (GC, 安捷伦 7890A GC; HS, model Agilent 7694E) 测定，条件: 色谱柱为 HJ-PEG-20M, 柱温 120 °C, 检测器温度 200 °C, N<sub>2</sub> 为载气, 流速 4 mL/min, 样品离心后过滤除菌 (滤头规格 13 mm、0.22 μm), 自动进样 1 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 絮凝素系统所需基因的获得

以 *S. cerevisiae* Y5 的 cDNA 为模板，利用

设计的引物扩增 *MFSS* 和 *FLO1* 基因 (含 MAT 终止子) 的有效编码序列，大小分别为 282 bp 和 1 351 bp。PCR 产物经电泳验证，分别在 282 bp 与 1 351 bp 处显示清晰明亮条带 (图 1A, B); 根据质粒 YIP5-KanR 的序列特点, *kanr* 两端的启动子和终止子序列互补性较高, 较难一步扩增得到 *kanr* 的全长序列, 设计引物时人工去除 *kanr* 基因的终止子部分, 只扩增该基因的 ORF 片段, 大小为 1 293 bp, *kanr*.ORF 的 PCR 产物经电泳验证, 在 1 293 bp 处显示正确条带 (图 2C); 分别以 *T. reesei* 及 *A. aculeatus* 的 cDNA 为模板扩增到 EGII、CBHII 与 BGLI 去除信号肽的编码序列, 大小分别为 1 194 bp、1 341 bp 和 2 526 bp (图 1D, E, F), 经电泳验证, PCR 产物均在相应位置显示正确条带。以上基因的测序结果表明, 与 NCBI 公布的序列同源性均达到 100%。

### 2.2 表面展示载体的构建

表达载体 pEGII (KB)、pCBHII (KB) 和 pBGLI (NS) 的构建流程见图 2。

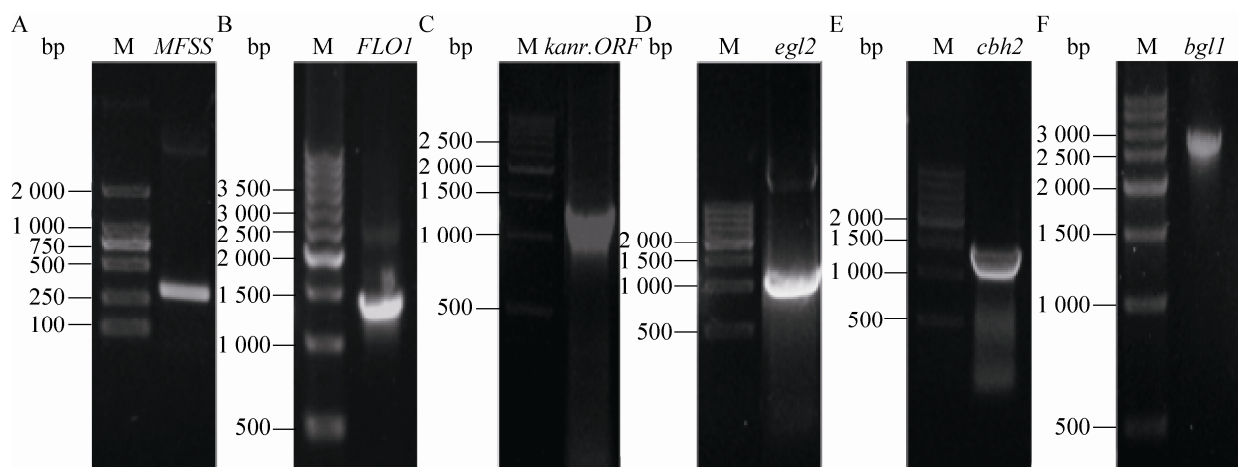


图 1 本研究所需的 DNA 片段

Fig. 1 DNA fragments used in this study. Gene encoding for *MFSS* (A), *FLO1* (B), open reading frame of *kanr* (C), *egl2* (D), *cbh2* (E), *bglI* (F).

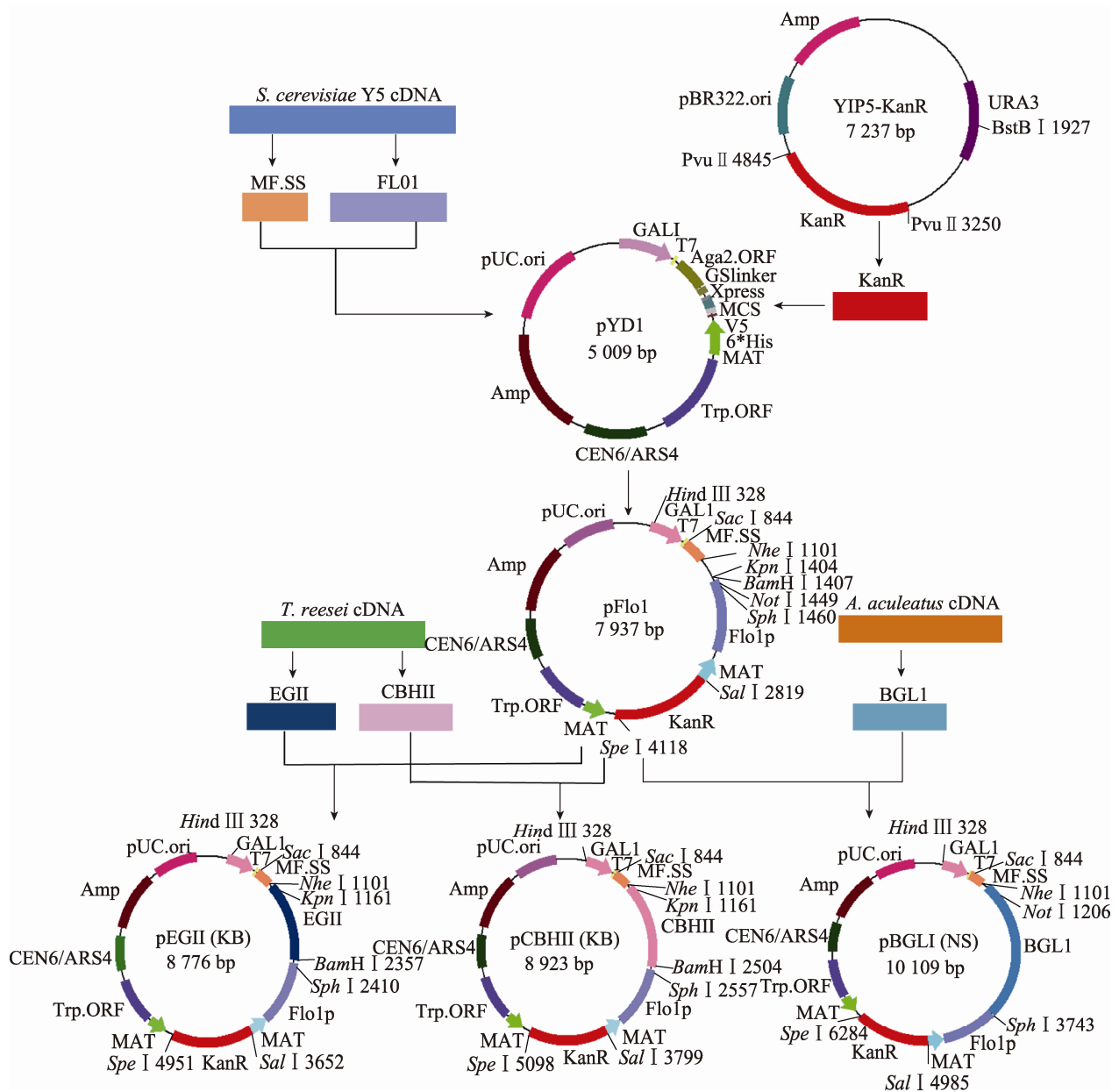


图 2 展示载体构建示意图

Fig. 2 Plasmids for cell surface display.

将经 *Kpn* I / *Bam* H I 双酶切的 *egl2* 片段与 *cbh2* 片段分别插入到酵母展示中间载体 pFLO1 相应位点, 获得载体 pEGII (KB) 与 pCBHII (KB); 再利用 *Not* I / *Sph* I 双酶切得到 *bgl1* 片

段, 该片段插入中间载体 pFLO1 相应位点获得载体 pBGLI (NS)。以 *Kpn* I 单酶切验证, pEGII (KB) 与 pCBHII (KB) 大小分别为 8 776 bp 和 8 923 bp, 以 *Not* I 单酶切验证, pBGLI (NS) 的

大小为 10 109 bp, 以上单酶切结果均与理论值相符 (图 3A); 再以 *Kpn* I /*Bam*H I 双酶切验证, 分别切下大小为 7 937 bp 的 pFLO1 片段和 1 194 bp 的 *egl2* 片段与 1 341 bp 的 *cbh2* 片段, 以

*Not* I /*Sph* I 双酶切验证, 分别切下大小为 7 937 bp 的 pFLO1 片段和 2 526 bp 的 *bgl1*, 以上双酶切结果均符合理论值 (图 3B)。测序结果表明所有插入片段在表达载体中均有正确的阅读框。

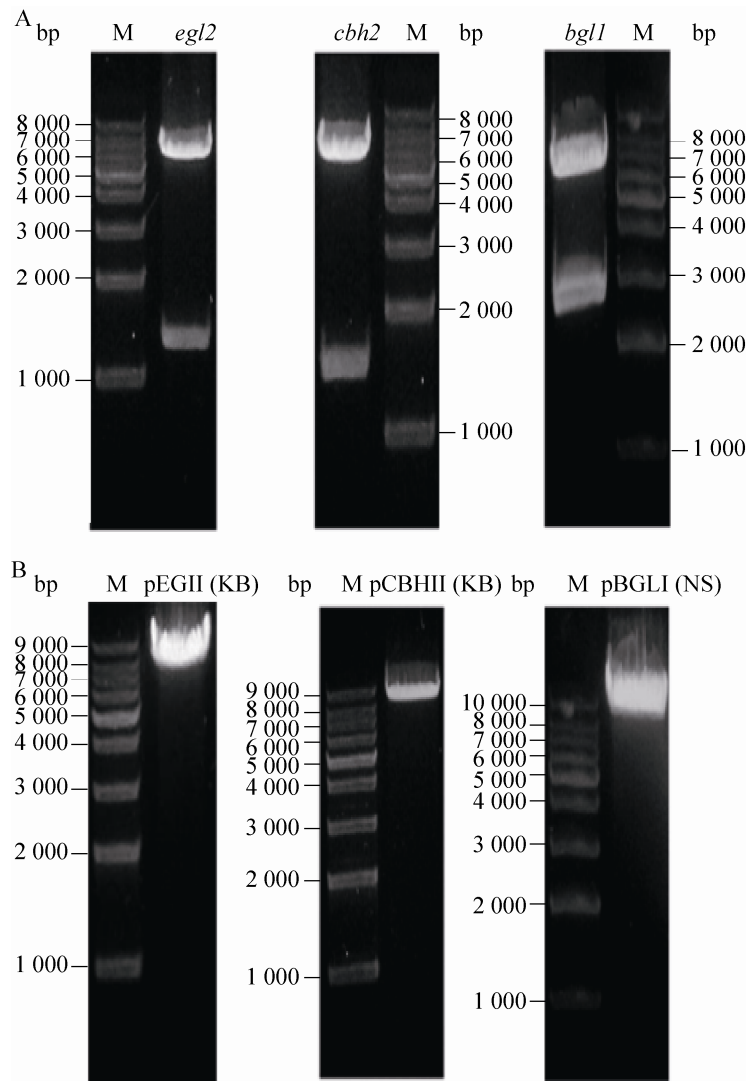


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Recombinant plasmids digested with restriction enzyme. (A) *Kpn* I, *Not* I. (B) *Kpn* I /*Bam*H I, *Not* I /*Sph* I.



### 2.3 酵母转化及转化子验证

表达载体 pEGII (KB)、pCBHII (KB)与 pBGII (NS)通过 LiAc 完整细胞转化法转化到 *S. cerevisiae* Y5 中,涂布于含 G418 的 YPD 固体培养基上得到转化子。随机挑取筛选得到的转化子单菌落预培养 24 h 后依次进行质粒提取,分别以质粒作为模板进行 PCR,通过琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物的正确性。结果如图 4 所示,重组菌株 Y5/fEGII 的质粒扩增出大小为 1 194 bp 的特异性条带;菌株 Y5/fCBHII 的质粒扩增出大小为 1 341 bp 的特异性条带;菌株 Y5/fBGII 的质粒扩增出大小为 2 526 bp 的特异性条带。三株重组菌株均扩增得到目的基因片段 *egl2*、*cbh2*、*bgl1*。测序结果表明,三段 PCR 产物的序列正确性均达 100%,表明纤维素酶表达载体已成功导入到酵母中。

### 2.4 表面展示蛋白定位验证

挑取经鉴定正确的重组菌株 Y5/fEGII、Y5/fCBHII、Y5/fBGII 和对照菌株 Y5 分别接种至中预培养 24 h,收集菌体后,转接 YPG 培养基进行诱导表达。重组菌株诱导表达 48 h 后,

采用免疫荧光显微镜 (FITC, 激发波长 488 nm)观察表面展示重组酵母菌株在半乳糖的诱导下是否能够表达纤维素酶与 Xpress 标签形成融合蛋白展示在细胞表面。由图 5 观察结果显示,在 488 nm 通道下,表面展示重组酵母菌株 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGII 在诱导表达 48 h 后均可以检测到绿色免疫荧光,野生菌株 Y5 没有观察到荧光。该结果表明来自酿酒酵母 Y5 的 GPI 蛋白可作为表面展示的锚定蛋白,带有 Xpress 标签的外源蛋白 EGII、CBHII 及 BGII 均已经成功被锚定在细胞壁上。尽管重组菌株的表面展示蛋白分布是不均匀的,这可能是由于蛋白的表达水平不同造成的。

### 2.5 表面展示纤维素酶的酶活分析

对照菌株 Y5 与单展示纤维素酶的 3 株重组菌 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGII 经预培养 24 h 后接种于 YPG 培养基诱导 48 h。Y5 为对照组,3 株重组菌为实验组。经诱导后,取一定量菌液进行酶活测定。测定结果如表 3 所示,对照菌株 Y5 酶活性不足 0.1 U/mL;实验组菌株均表现出一定酶活性,证明纤维素酶成功展

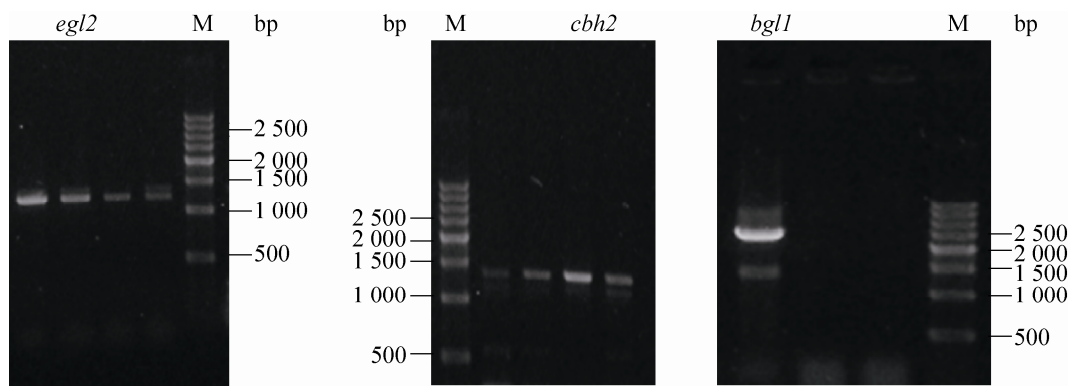


图 4 重组菌株的质粒 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant strains by plasmid PCR.

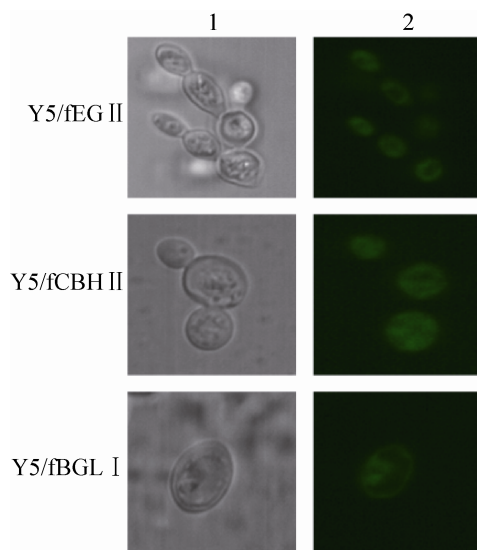


图5 重组菌株 Y5/fEG II、Y5/fCBH II 和 Y5/fBGL I 免疫荧光验证 (100×)

Fig. 5 Immunofluorescence labeling of transformants ZEISS Laser Scan Confocal micrographs (column 1) and immunofluorescence micrograph (column 2) of *S. cerevisiae* Y5/fEG II, Y5/fCBH II and Y5/fBGL I (100×).

表3 展示在 Y5 细胞表面的纤维素酶活性测定

Table 3 Activity of enzymes displayed on cell surface of Y5 strain

Strains	Cellulase	Substrate (W/V)	Enzyme activity (U/mL)
Y5	NO	PASC	0.052 ± 0.007
Y5/EGII	EGII	CMC	1.401±0.012
Y5/CBHII	CBHII	PASC	1.845±0.006
Y5/BGLI	BGLI	pNPG	0.810±0.011

示在 Y5 表面。EGII 和 CBHII 活性较高, 分别为 1.401 U/mL 和 1.845 U/mL, 絮凝素表面展示系统中这两种纤维素酶的活性均比本实验室已构建的絮凝素表面展示系统的重组菌株 Y5/EGII 的 EGII 酶活 (1.144 U/mL) 和 Y5/CBHII 的 CBHII

酶活 (1.265 U/mL) 稍高, 菌株 Y5/fBGLI 的活性较低, 为 0.81 U/mL, 与絮凝素表面展示系统的重组菌株 Y5/BGLI 的 BGLI 酶活 0.722 U/mL 相近<sup>[15]</sup>。分析原因是絮凝素表面展示系统可根据酶活性末端来调节锚定区域以发挥展示酶类的最优活性, 所以纤维素酶在絮凝素展示系统中较絮凝素展示系统稍高。这些结果表明絮凝素展示系统中的纤维素酶 EGII、CBHI 和 BGLI 都已成功展示酿酒酵母 Y5 表面, 并且具有一定的功能活性。

## 2.6 重组酵母菌群的纤维素乙醇发酵

以 10 g/L PASC 为唯一碳源, 对照菌群 Y5 为对照组, 混合菌群 (Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGLI 按 1 : 1 : 1 组合) 为实验组进行纤维素乙醇发酵实验。菌株经预培养 24 h 后接种于 100 mL 的 YP-PASC 发酵培养基中 30 °C 连续发酵 108 h。结果如图 6 所示, 对照组不能降解 PASC, 体系中的总糖基本不消耗, 没有乙醇的产生; 实验组能水解 PASC 并产生一定量的乙醇, 前 48 h 菌群生长较快 (数据未展示), 体系中的总糖消耗迅速, 乙醇产量快速上升, 48 h 后菌群生长速度减慢, 总糖消耗速度下降, 乙醇产量积累也减缓, 在发酵 96 h 后达到最高乙醇浓度 0.77 g/L, 以消耗每克糖生成的乙醇量计算, 产量为 0.35 g/g, 相当于理论值的 68.6%。尽管最终的乙醇产量并不理想, 最高仅达到了理论值的 68.6%, 与本实验室已构建的絮凝素系统的单展示混合菌群 (Y5/EGII、Y5/CBHII 和 Y5/BGLI 按 1 : 1 : 1 组合) 的乙醇产量 0.32 g/g, 相当于理论值的 62.6% 这个结果相比, 基于絮凝素系统的纤维素乙醇发酵的产量有所上升, 取得了一定的进步。

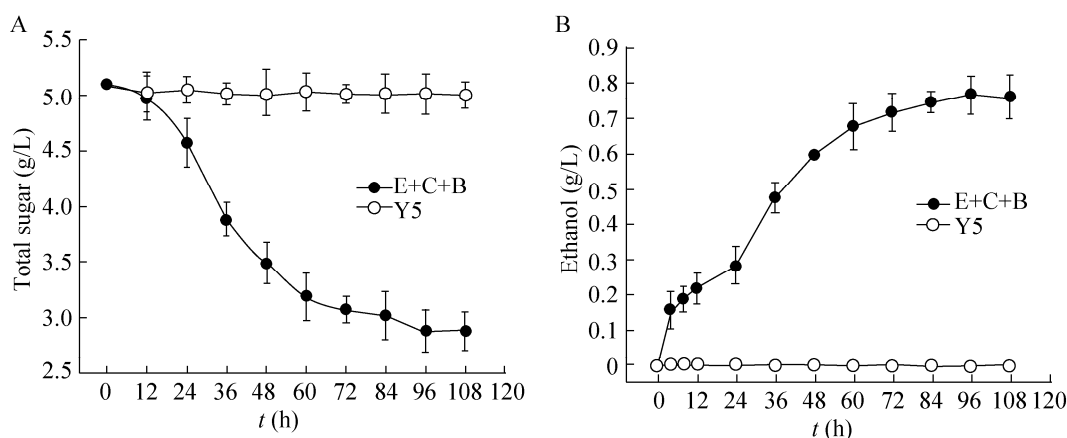


图 6 不同酵母菌群以 PASC 为唯一碳源的乙醇发酵

Fig. 6 Ethanol production from PASC by different yeast consortium. The concentrations of total sugar (A) and ethanol (B). Data are averages from three independent experiments.

### 3 讨论

本研究基于酿酒酵母絮凝素表面展示系统,利用 *S. cerevisiae* Y5 内源蛋白 Flo1p 作为锚定蛋白,将外源纤维素酶 EGII、CBHII 和 BGLI 以较优的活性形式分别固定在 *S. cerevisiae* Y5 细胞表面,并以 PASC 为唯一碳源进行了纤维素乙醇生物统合加工的初步研究。研究结果显示,基于 Y5 的重组菌株均具有相应的纤维素催化活性,酶活测定结果与本实验室前期  $\alpha$ -凝集素表面展示纤维素酶活性相比,有了较为明显的提升。分析原因, Y5 本身具有自絮凝的工业化生产特性,使得细胞之间接触紧密,空间位阻较大,一定程度上阻碍了纤维素酶与底物的接触吸附<sup>[22]</sup>,而新型的絮凝素表面展示系统利用 Flo1p 进行纤维素酶的锚定,一定程度上减轻了酵母的自絮凝现象,增大了细胞间隙,从而增加了酶与底物的接触面积,提高了酶的催化效率。此外,发酵结果显示,絮凝素系统的重组酵母菌株 Y5/fEGII、Y5/fCBHII 和 Y5/fBGLI 以

1 : 1 : 1 的比例组成菌群后,对 PASC 具有明显的降解利用能力,反应体系中未检测出葡萄糖积累,说明降解得到的葡萄糖迅速被酵母吸收利用产生乙醇,最高乙醇浓度达到 0.77 g/L,乙醇产量为 0.35 g/g,相当于最高理论值的 68.6%,与本实验室前期构建的  $\alpha$ -凝集素表面展示纤维素酶菌群最优发酵结果(菌群比例 2 : 1 : 1,最高乙醇浓度达到 0.76 g/L,乙醇产量为 0.33 g/g,相当于理论值的 64.9%)相比,絮凝素表面展示系统体现出了一定的优势。这是本实验室首次尝试基于专利菌株 Y5 构建絮凝素表面展示系统进行纤维素水解与乙醇发酵生物联合加工研究,以上结果说明,利用絮凝素展示系统表达外源纤维素酶进行纤维素乙醇发酵具有一定的发展前景,为开发生物统和加工 (Consolidated bioprocess, CBP) 菌种提供了理论依据,具有一定的应用价值。此外,本研究构建的酵母菌群系统通过调节菌群中不同组分比例对纤维素水解及乙醇产量的影响来探究不同纤维素酶间的协同作用,该菌群系统可作为研究纤维素

酶降解效率的有效工具。

即使如此,利用酵母表面展示技术表达纤维素酶的新型酵母菌群进行纤维素乙醇发酵效果还不是很理想,乙醇产率较低,难以满足实际生产需求,因此在今后的工作中,我们主要在以下两个方面进行改进:1)开发基于N-端锚定的表面展示工作<sup>[23]</sup>,完善酿酒酵母絮凝素表面展示系统,实现针对不同外源酶类灵活选择锚定方式的目标,尽可能降低对酶类的束缚,实现酶催化效率的最大化;2)调控3种酵母菌群间的比例,从而实现对3种协同作用纤维素酶之间比例的调控,摸索出最优模式,利用优化的菌群进行纤维素乙醇统合生物加工,提高底物利用率,提升乙醇产量<sup>[24]</sup>。

利用酿酒酵母表面技术展示纤维素酶实现同步发酵纤维素产乙醇的研究已取得一定的研究成果,但是在这一领域里仍存在一些亟待解决的问题,例如:展示在细胞表面的纤维素酶的活性与游离酶相比有所下降;成功展示的纤维素酶稳定性有待提高;对于该技术的研究目前仍停留在实验室阶段,还未实现工业化等<sup>[25-26]</sup>。今后此领域的研究还需更多的发展和完善,包括开发更多具有固定化展示功能的细胞壁甘露糖蛋白;进一步提高现有展示的纤维素酶的稳定性、表达量及活性;克服工业化生产中扩大培养、乙醇抑制等难题。

## REFERENCES

- [1] Hawkins GM, Doran-Peterson J. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4(1): 1–14.
- [2] Fujii T, Yu G, Matsushika A, et al. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *saccharomyces cerevisiae* expressing  $\beta$ -xylosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(6): 1140–1146.
- [3] Shibasaki S, Maeda H, Ueda M. Molecular display technology using yeast-arming technology. *Anal Sci*, 2009, 25(1): 41–49.
- [4] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(1): 28–40.
- [5] Sato N, Matsumoto T, Ueda M, et al. Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(4): 469–474.
- [6] 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. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4517–4522.
- [7] Fukuda T, Tsuchiyama K, Makishima H, et al. Improvement in organophosphorus hydrolase activity of cell surface-engineered yeast strain using Flo1p anchor system. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(5): 655–659.
- [8] 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. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 1207–1212.
- [9] Yanase S, Hasunuma T, Yamada R, et al. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(1): 381–388.
- [10] Baek SH, Kim S, Lee K, et al. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. *Enzyme Microb Technol*, 2012,

- 51(6/7): 366–372.
- [11] Guo B, Styles CA, Feng Q, et al. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(22): 12158–12163.
- [12] Yang F, Cao M, Jin Y, et al. Construction of a novel  $\alpha$ -agglutinin expression system on the surface of wild-type *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and genetic immobilization of  $\beta$ -glucosidase I. *Bioenerg Res*, 2013, 6(4): 1205–1211.
- [13] Hasunuma T, Kondo A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochem*, 2012, 47(9): 1287–1294.
- [14] Yamada R, Hasunuma T, Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 754–763.
- [15] Yang XS. Ethanol production from cellulosic hydrolysate in situ detoxification by a yeast strain: China, ZL 200810223301.5. 2009-01-28 (in Chinese). 杨秀山. 单一菌种对木质纤维素水解产物的原位脱毒乙醇发酵方法: 中国, ZL 200810223301.5. 2009-01-28.
- [16] Zhang YHP, Cui J, Lynd LR, et al. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by  $\alpha$ -phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*, 2006, 7(2): 644–648.
- [17] Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs*, 2010, 1(6): 395–403.
- [18] Fujita Y, Takahashi S, Ueda M, et al. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(10): 5136–5141.
- [19] Wood TM, Bhat KM. Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol*, 1988, 160: 87–112.
- [20] Carrão-Panizzi MC, Bordignon JR. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2000, 35(5): 873–878.
- [21] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350–356.
- [22] Apiwatanapiwat W, Murata Y, Kosugi A, et al. Direct ethanol production from cassava pulp using a surface-engineered yeast strain co-displaying two amylases, two cellulases, and  $\beta$ -glucosidase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(1): 377–384.
- [23] Fukuda T, Tsuchiyama K, Makishima H, et al. Improvement in organophosphorus hydrolase activity of cell surface-engineered yeast strain using Flo1p anchor system. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(5): 655–659.
- [24] Baek SH, Kim S, Lee K, et al. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 51(6/7): 366–372.
- [25] Yanase S, Yamada R, Kaneko S, et al. Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast. *Biotechnol J*, 2010, 5(5): 449–455.
- [26] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1207–1218.

(本文责编 郝丽芳)