

综述

# 酿酒酵母纤维素乙醇统合加工 (CBP) 的策略及研究进展

徐丽丽, 沈煜, 鲍晓明

山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

**摘要:** 木质纤维素乙醇的统合生物加工过程 (Consolidated bioprocessing, CBP) 是将纤维素酶和半纤维素酶生产、纤维素水解和乙醇发酵过程组合或部分组合, 通过一种微生物完成。统合生物加工过程有利于降低生物转化过程的成本, 越来越受到研究者的普遍关注。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 是传统的乙醇发酵菌株。介绍了影响外源基因在酿酒酵母中表达水平的因素, 纤维素酶和半纤维素酶在酿酒酵母中表达研究进展及利用酿酒酵母统合加工纤维素乙醇的策略。

**关键词:** 木质纤维素, 统合生物加工, 纤维素酶系, 纤维素乙醇, 酿酒酵母

## Progress and strategies on bioethanol production from lignocellulose by consolidated bioprocessing (CBP) using *Saccharomyces cerevisiae*

Lili Xu, Yu Shen, and Xiaoming Bao

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

**Abstract:** Ethanol production from lignocelluloses of consolidated bioprocessing (CBP) is a system in which cellulase and hemicellulase production, substrate hydrolysis, and fermentation are combined or partially combined by ethanologen microorganisms that express cellulolytic or hemicellulolytic enzymes or engineering cellulolytic microorganisms with ethanol production properties. Due to its potential for significant cost reduction, CBP is receiving more and more attention. In this review article, we discuss the factors that influence the expression level of cellulases in *Saccharomyces cerevisiae* and updated progress in bioethanol production from lignocellulose by the CBP strategy using the yeast species.

**Keywords:** lignocelluloses, consolidated bioprocessing, cellulases, lignocellulosic ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*

新型能源的开发利用是当目前人类面对能源、物能源的燃料乙醇, 由于其独特的车用性质而受到环境及粮食等问题所采取的积极措施, 作为主要生 广泛关注。利用丰富廉价的可再生木质纤维素生产

**Received:** July 4, 2010; **Accepted:** July 13, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA05Z402), International Scientific Cooperation and Exchange Special Program of China (No. S2010GR0740), National Natural Science Foundation of China (No. 30970091).

**Corresponding author:** Xiaoming Bao. Tel/Fax: +86-531-88365826; E-mail: bxm@sdu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA05Z402), 国际科技合作与交流专项 (No. S2010GR0740), 国家自然科学基金 (No. 30970091) 资助。

乙醇, 是规模化发展车用燃料乙醇的基础。木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 占地球总生物量的 40% 左右, 高效、廉价地利用木质纤维素转化为如燃料乙醇等化工产品, 是由石油基向生物基经济社会过渡的基础。

木质纤维素中单纯由葡萄糖组成的纤维素所占的比例最高, 为 33%~51%, 但其复杂的晶体结构为纤维素乙醇加工过程增加了困难, 一般情况下, 可以通过部分水解木质素和半纤维素, 破坏纤维素结晶结构的理化预处理过程来解决。在此基础上, 通过糖化酶 (纤维素酶与半纤维素酶) 对纤维素和半纤维素的水解以及微生物对己糖、戊糖的乙醇发酵, 完成纤维素乙醇生产过程。一般情况下, 糖化和发酵 2 个步骤可以通过同步糖化发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 或同步糖化共发酵 (Simultaneous saccharification and cofementation, SSCF) 的工艺一次完成。但 SSF 和 SSCF 工艺的前提是必须建立另外的纤维素酶和半纤维素酶的生产工艺<sup>[1]</sup>。将纤维素酶和半纤维素酶生产、水解和乙醇发酵组合或部分组合在一起完成, 被称为木质纤维素乙醇的统合生物加工过程 (Consolidated bioprocessing, CBP), 由于统合生物加工简化了加工过程, 降低了能耗, 有利于降低生物转化过程的成本, 越来越受到研究者的普遍关注<sup>[1-3]</sup>。

自然界主要通过产生纤维素酶系的微生物降解木质纤维素, 不同物种的纤维素降解酶系组成及水解性质都有很大的差异。纤维素和半纤维素结构复杂, 其水解涉及的酶的种类繁多 (图 1), 其基本过程是纤维素在内切葡聚糖酶 (Endoglucanases, EC 3.2.1.4, 来自真菌的简称 EG; 来自细菌的简称 Cen) 和纤维二糖水解酶 (Cellobiohydrolases, 又称外切葡聚糖酶, Exoglucanases, EC 3.2.1.91, 来自真菌的简称 CBH; 来自细菌的简称 Cex) 的协同作用下, 产生纤维二糖和一些纤维寡糖, 进而  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase, 简称 BG, EC 3.2.1.21) 水解产生葡萄糖。另外预处理后未去除的半纤维素也需要在半纤维素酶的作用下产生糖分, 最终糖分经微生物发酵转化成乙醇<sup>[2,4]</sup>。纤维素 (半纤维素) 酶系及降解过程的复杂性, 表明实现木质纤维素乙醇的 CBP 是有一定难度的。

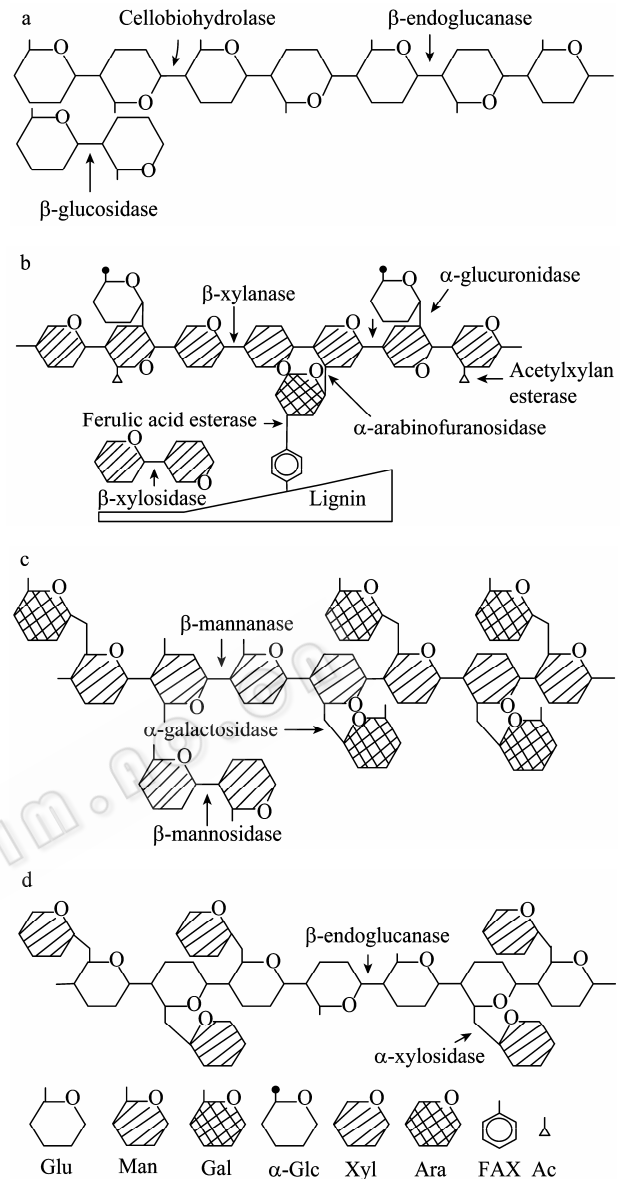


图 1 纤维素 (a) 与半纤维素 (b、c、d) 的复杂结构及其水解所涉及的酶类<sup>[5-6]</sup> (纤维素 (a) 以及阿拉伯糖糖基木聚糖 (b)、半乳糖甘露聚糖 (c)、木葡聚糖 (d) 等半纤维素结构显示存在不同形式的侧链)

Fig. 1 Complex structure of cellulose and hemicelluloses and the enzymes involved in their degradation<sup>[5-6]</sup>. Cellulose (a) and hemicellulose (b), (c) and (d) depicting the different side chains of arabinoxylan, galactomannan and xyloglucan, respectively.

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 是传统的乙醇生产菌株, 具有许多优良的生产性能, 如在厌氧条件下较好的生长能力, 能发酵葡萄糖产生较高的乙醇得率和生产速率, 具有较高的乙醇和其他抑制物耐受性, 被公认为食品安全性 GRAS (Generally Regarded As Safe) 微生物等, 这些优点使得酿酒酵母成为统合生物加工研究的首选微生物, 将酿酒酵

母作为统合生物加工载体的主要要求是在酿酒酵母中高效分泌表达木质纤维素水解酶<sup>[1]</sup>。以下综述了影响外源基因在酿酒酵母中表达水平的因素, 纤维素水解酶在酿酒酵母中表达方面的研究进展及利用酿酒酵母统合加工纤维素乙醇的策略。

## 1 影响外源基因在酿酒酵母中表达水平的因素

外源基因在酿酒酵母中的表达水平受很多因素影响, 主要从以下几方面考虑:

### 1.1 外源基因的序列特性

不同生物对同一氨基酸不同密码子的使用频率不同, 表现出不同的密码子偏好性。外源基因的密码子不一定适合酿酒酵母的密码子偏好性, 影响了外源基因的表达水平<sup>[7]</sup>, 通过密码子优化可以提高外源基因在酿酒酵母中的表达, 如 Kotula 等<sup>[8]</sup>将小鼠来源的免疫球蛋白  $\kappa$  链基因密码子优化成酿酒酵母偏好的密码子, 优化的  $\kappa$  链基因在酿酒酵母 F762 菌株中, 其合成速率提高了 5 倍, 蛋白质稳定性提高了至少 50 倍。Wiedemann 等<sup>[9]</sup>将地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 的 L-阿拉伯糖异构酶基因 *araA* 和大肠杆菌的 L-核酮糖激酶基因 *araB*、L-核酮糖-5-P-4-差向异构酶基因 *araD* 进行密码子优化, 在酿酒酵母中建立优化的 L-阿拉伯糖代谢途径, 与天然基因的途径相比, 重组菌株能更好地转化 L-阿拉伯糖。

### 1.2 外源基因的拷贝数

毫无疑问, 外源基因的拷贝数势必影响其在酿酒酵母中的表达水平, 通过不同类型的质粒可以控制外源基因的拷贝数, 例如以 2  $\mu$  质粒自主复制区为骨架的附加体质粒在酿酒酵母中可以维持大约 100 个拷贝<sup>[10-11]</sup>, 而相应的以着丝粒区为骨架的着丝粒质粒仅能维持 1~2 个拷贝<sup>[12]</sup>。对于二(多)倍体、野生型酿酒酵母工业菌株而言, 外源基因的稳定高效表达是保持其生产特性的基础, 一般地, 通过高拷贝整合可以实现。高拷贝整合策略是依据酿酒酵母高频同源重组的特性, 利用染色体上 DNA 重复序列如 rDNA<sup>[13-16]</sup>或  $\delta$ -序列<sup>[17]</sup>作为整合位点。rDNA 单元编码 rRNA, 是酵母基因组中度重复的 DNA 序

列, 在单倍体酵母基因组中大约有 140~200 个拷贝的 rDNA, 这种整合方式可以使外源基因的稳定性达到 99% 以上<sup>[18]</sup>;  $\delta$ -序列是酿酒酵母 Ty 反转录转座子的长末端序列, 在单倍体酵母基因中有 400 多个拷贝, 可使更多的目的基因拷贝整合到酵母基因组中<sup>[19]</sup>。

另外, 利用 Cre-lox P 标记基因去除重组系统, 可以在酿酒酵母基因组中不同的非必需 DNA 区域中, 或者二(多)倍体细胞的同源染色体间, 反复插入外源基因, 也可以实现定量控制外源基因多个拷贝的整合表达<sup>[20]</sup>。本实验室通过该系统, 将木糖代谢的关键酶基因, 整合在二倍体工业菌株中同源染色体上的 *GRE3* 基因区域, 不仅敲除了对副产物木糖醇积累有关的醛糖还原酶基因 *GRE3*, 同时使外源基因表达量有所提高。

### 1.3 表达水平的调控

启动子是基因表达最重要的调控元件, 通过选择不同强度的启动子可以控制外源基因的表达量, 本课题组分别将酿酒酵母自身的 *TEF1*、*PGK1*、*HXK2* 和 *HXT7* 这 4 种不同的启动子置换了木酮糖激酶基因 *XKSI* 的启动子, 实时荧光定量 PCR 检测结果显示, *XKSI* 的表达量与天然启动子状态下相比, 依次提高了 47.8 $\pm$ 6.8、34.5 $\pm$ 9.2、11.1 $\pm$ 2.4、2.2 $\pm$ 0.2 倍, 该实验结果验证了启动子对基因的表达水平的调控, 但这种启动子的选择并不能精确地控制基因的表达量。另外通过选择组成型或诱导型启动子可以控制外源基因的表达方式, 对细胞生长不利的外源蛋白, 一般选用诱导型启动子; 以追求高外源基因表达量为目的, 一般选用组成型的强启动子, 例如糖酵解途径中的关键酶启动子。而对于关注代谢产物即代谢工程研究的相关酶基因的表达, 则应控制在适当的水平, 有必要选用合适的启动子以及合适的转录调控因子调控每个外源基因的表达<sup>[21]</sup>。

### 1.4 外源基因对酵母细胞生命活动的影响

某些外源基因的高表达会影响酵母的正常生命活动, Nakajima 等<sup>[22]</sup>报道, 将环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* 的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因 (*bglH*) 在酿酒酵母中分泌表达, 所分泌的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶使酵母细胞生长受到抑制并且细胞膨胀, 推测由于酵母细胞壁中

的 $\beta$ -1,3-葡聚糖被表达的 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶降解导致细胞变小, 囊泡膨胀。酿酒酵母中多个基因的共表达是酿酒酵母分子改造包括 CBP 酵母的所需的重要策略<sup>[23]</sup>, 但在酵母细胞中表达多个外源基因, 可能会增加细胞的负担, 影响细胞的生长及 (或) 代谢, 但内在分子机制尚不清楚。

### 1.5 受体菌分泌途径及分泌过程中蛋白质的正确加工

蛋白质的分泌过程是在蛋白质合成的基础上, 在信号肽的引导下, 进入内质网进行折叠、糖基化等修饰, 并通过质量控制系统 (Quality control system, QC system) 检测, 正确折叠的蛋白进入胞内蛋白运输途径及分泌后信号肽剪切过程<sup>[24]</sup>。

信号肽是蛋白分泌的必要因素。相对于许多丝状真菌而言, 酿酒酵母蛋白分泌系统并不强, 常用的信号肽有酸性磷酸脂酶 (PHO5)、蔗糖酶 (SUC2)、 $\alpha$  因子 (MF $\alpha$ 1) 和 Killer 毒素等中的内源性信号肽<sup>[25]</sup> Kotula 等<sup>[8]</sup>利用蔗糖酶信号肽, 成功实现小鼠免疫球蛋白  $\kappa$  链的分泌表达。异源信号肽包括外源基因在天然菌株中自身的信号肽, 也是外源蛋白在酿酒酵母分泌表达的常用策略。刘怀伟等<sup>[26]</sup>通过马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* 的菊粉酶信号肽 (INU1A), 成功引导腐皮镰孢菌 *Fusarium solani* 壳聚糖酶基因 *CSN* 的 cDNA 在酿酒酵母的分泌表达。Penttilä 等<sup>[27]</sup>通过基因的天然信号肽, 成功引导瑞氏木霉 *Trichoderma reesei* CBH II 基因在酿酒酵母中的分泌表达。但有观点认为, 外源蛋白自身的信号肽引导的蛋白分泌效率低, 重组蛋白较易降解。应该说, 由于分泌蛋白自身结构的特点以及信号肽分泌效率的差异, 对特异蛋白而言信号肽的选择尚需要仔细研究定夺。

所有的蛋白质都要正确折叠才能分泌行使正确功能, 错误折叠的分泌性蛋白不仅会被细胞中的内质网偶联的蛋白降解机制降解, 还会激发胞内的非折叠蛋白应答机制<sup>[28]</sup>。Schröder 报道<sup>[29]</sup>超表达多个助折叠蛋白和伴侣蛋白 (如 Bip、PDIs 等) 对于不同外源蛋白的表达可能产生更有效的促进作用。

胞内蛋白质运输又叫膜泡运输, 新合成的蛋白质多肽链-核糖体复合物通过 N-末端信号肽序列与信号识别颗粒 (SRP) 及其受体 (SR) 相互作用穿

过内质网膜上的易位子隧道进入到内质网腔中进行进一步的加工修饰, 蛋白质被分拣运输到细胞表面过程中的每一个运输步骤和小泡的准确定位都是由许多胞内膜蛋白控制的, 运输途径中的非有效运输和错误分拣经常导致目标蛋白滞留, 其中 Vps10 蛋白偶联的 Golgi-to-Vacuole 误分拣途径可能会导致分泌性蛋白在酿酒酵母空泡中积累<sup>[30]</sup>。有很多文献报道在酿酒酵母中敲除 *VPS10* 基因对于外源蛋白表达有促进作用<sup>[31-33]</sup>。

另外一个制约外源蛋白从酵母细胞中有效分泌的因素就是被宿主蛋白酶降解, 这个过程容易被环境胁迫尤其是高密度发酵过程诱导进行<sup>[24]</sup>。优化培养条件、构建蛋白酶缺陷型菌株, 均可以减少宿主的这种特异性降解<sup>[34-36]</sup>。

蛋白质糖基化是酿酒酵母分泌途径中最主要的翻译后修饰加工过程, 包括 O-糖基化及 N-糖基化修饰, 而其中在一系列作用于不同位点的甘露糖基转移酶的催化下, 可以形成 50 个以上甘露糖链, 容易对外源蛋白造成过度甘露糖化进而影响蛋白质的性质<sup>[37]</sup>。

## 2 纤维素酶和半纤维素酶在酿酒酵母中的表达

由于酿酒酵母具有良好的将糖转化为乙醇的发酵性能, 因此酿酒酵母纤维素乙醇综合加工 (CBP) 主要的菌株改造策略是实现木质纤维素水解酶类在其中的高效表达, 由于纤维素酶和半纤维素酶作用的底物是不溶性的大分子, 因此分泌表达是一个基本要求。

### 2.1 纤维素酶在酿酒酵母中的表达

纤维二糖水解酶 (CBH) 是从纤维素末端水解产生纤维二糖, 外切葡聚糖酶的有效分泌是 CBP 酵母可行性的关键<sup>[5]</sup>。一般地, 经过适当折叠的外源蛋白需要糖基化才能行使生物功能。对瑞氏木霉而言, 适度的 O-糖基化修饰有利于纤维素酶分泌<sup>[38]</sup>, 但酿酒酵母具有独特的糖基化修饰系统, 容易对外源蛋白造成过度甘露糖基化<sup>[39]</sup>。糖基化修饰对于蛋白质功能的影响有物种特异性, 酿酒酵母中过度 N-糖基化对外源蛋白表达的影响因蛋白而异, 而纤维

素酶过度糖基化主要影响其底物结合能力,也可能影响其他方面的酶学性质。多种来源的 CBH 基因已经在酿酒酵母中成功分泌表达,并通过对受体菌的分子改造,以减少过度糖基化对 CBH 的影响。

Penttilä 等<sup>[27]</sup>将瑞氏木霉的 *CBH II* 基因构建到酿酒酵母表达载体上,通过其天然的信号肽在酿酒酵母中分泌表达,在 5 L 发酵罐培养,培养基中检测到大约有 100 mg/mL *CBH II* 蛋白,且被过度 N-糖基化修饰。重组表达的 *CBH II* 能降解无定形纤维素,但与天然 *CBH II* 相比,其对微晶纤维素的结合能力下降,推测与酶的过度 N-糖基化有关。Hong 等<sup>[40]</sup>将嗜热子囊菌 *Thermoascus aurantiacus* 的 *CBH I* cDNA 在酿酒酵母 3-磷酸甘油醛脱氢酶的 *GAPDH* 基因的启动子的控制下,通过高拷贝附加体质粒,转化酿酒酵母,培养基中没有检测到 *CBH I* 的活性,推测是外源蛋白表达量较低。但浓缩纯化后的重组 *CBH I* 在 65°C 条件下孵育 1 h 仍能保持大于 80% 的初始活性,同时发现该重组酶被过度 N-糖基化,酶解去糖基化后,酶在 65°C 条件稳定性明显下降,推测过度糖基化使其热稳定性发生变化。

酿酒酵母中外源蛋白的过度 N-糖基化是在高尔基体中由糖基转移酶催化完成的,如可以将起始的甘露糖残基转移到 N-葡聚糖中间体 (Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) 上的 *OCH1* 基因编码的  $\alpha$ -1,6-甘露糖基转移酶、*MNN1* 基因编码的  $\alpha$ -1,3-甘露糖基转移酶, *MNN4* 基因编码的磷酸甘露糖基转移酶 Mnn6p 的正调节蛋白以及 *KRE2* 基因编码的  $\alpha$ -1,2-甘露糖基转移酶等一系列糖基转移酶,其中主要是甘露糖基转移酶。敲除酿酒酵母糖基转移酶可以缓解对外源蛋白的过度糖基化。Nagasu 等<sup>[41]</sup>敲除 *OCH1*、*MNN1* 和 *MNN4* 阻断了外侧糖链延伸,缓解外源蛋白的过度 N-甘露糖基化,有利于提高酶活。Heinzelman 等<sup>[42]</sup>将瑞氏木霉 *CBH II* 基因转入敲除 *KRE2* 基因的酿酒酵母受体菌中,与出发菌株相比,其产生的重组 *CBH II* 大小由 55 kDa 左右变为 48 kDa 左右。本课题组将携带 *CBH II* 基因的高拷贝质粒,分别在敲除了 *KRE2* 基因的及原初的酿酒酵母实验室菌株中表达,前者所产生重组 *CBH II* 的酶活提高了约 0.82 倍。

相比而言,在酿酒酵母中表达内切葡聚糖酶

(EG) 成功的例子更多,无论是真菌源的或细菌源的,酶活也比 *CBH* 的高几个数量级<sup>[43-48]</sup>。Panttilä 等<sup>[43]</sup>将瑞氏木霉的 *EG I* 基因和 *EG III* 基因均在 *PGKI* 启动子控制下,通过其天然的信号肽在酿酒酵母中分泌表达,重组酵母能向培养基中分泌有活性的 *EG I* 和 *EG III*,但与天然的 *EG I* 相比,酿酒酵母产生的重组 *EG I* 蛋白相比分子量较大,同样发生了不同程度的过度 N-糖基化。Mochizuki 等<sup>[44]</sup>将隐球菌黄曲霉 *Cryptococcus flavus* 的内切纤维素酶基因 *CMCI* 在 *GAP* 启动子的控制下,克隆到含有  $\delta$ -序列的表达载体上,通过  $\delta$ -序列整合到酿酒酵母单倍体基因组上,重组酵母分泌产生的 *CMC* 酶活大约为 12 500 U/L,比酶活约为 1 390 U/g DCW,通过  $\delta$ -序列整合表达的 *CMC* 酶活是 *YE<sub>p</sub>* 类型质粒分泌表达的 *CMC* 酶活的 1.4 倍。

在纤维素降解过程中, $\beta$ -葡萄糖苷酶的催化作用是一个限速步骤,可将内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶作用产生的纤维二糖降解成葡萄糖,有利于缓解纤维二糖对内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶的反馈抑制<sup>[49]</sup>。Shen 等<sup>[15]</sup>将扣囊腹膜酵母菌 *Sacchromycopsis fibuligera* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *BGL1* 克隆到带有 *PGKI* 强启动子的高拷贝整合型质粒上,通过 rDNA 区整合到酿酒酵母二倍体工业菌株 N27 染色体上,重组 *BGL1* 比酶活达到 1.02 IU/mg 总蛋白。表达 *BGL1* 基因的酵母工程菌株 N227 能在 48 h 内将 6.2 g/L 纤维二糖消耗掉,产生 3.3 g/L 的乙醇,乙醇得率达到 0.532 g/g,接近理论值 0.538 g/g。van Rooyen 等<sup>[50]</sup>将扣囊复膜酵母菌的 *BGL1* 基因和白曲霉 *Aspergillus kawachii* 的 *BGL A* 基因分别在酿酒酵母中分泌表达,表达 *BGL1* 基因的重组酵母在含 5 g/L 纤维二糖的基本培养基中,在好氧和厌氧条件下的最大比生长速率为 0.23 h<sup>-1</sup> 和 0.18 h<sup>-1</sup>。

## 2.2 半纤维素酶在酿酒酵母中的表达

虽然一般的预处理手段可以水解木质纤维素中的半纤维素组分,但并不能完全水解<sup>[1]</sup>,CBP 酿酒酵母依然需要高效分泌表达半纤维素酶系。迄今为止,已报道若干半纤维素酶包括  $\beta$ -木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶等木聚糖水解酶以及其他的辅助酶和脱支酶

在酿酒酵母中成功表达<sup>[51-56]</sup>。

木聚糖骨架的降解需要  $\beta$ -木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶等木聚糖水解酶的作用, 这两种水解酶均有成功表达的报道。DC la Grange 等<sup>[51]</sup>将瑞氏木霉的内切- $\beta$ -1,4-木聚糖酶 *XYN2* 基因的 cDNA 分别在组成型强启动子 *PGK1* 和 *ADH2* 启动子的控制下, 通过高拷贝附加体质粒, 转化酿酒酵母, 产生的  $\beta$ -木聚糖酶酶活分别为 160、1 200 nkat/mL。同一课题组<sup>[52]</sup>又从短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus* 基因组文库中克隆得到  $\beta$ -木糖苷酶基因 *xynB*, 将该基因在 *ADH2* 启动子控制下, 构建到高拷贝附加体质粒上, 分别通过天然信号肽和酿酒酵母的 *MFa1* 信号肽分泌表达, 结果表明只有利用 *MFa1* 信号肽的重组酵母能产生有生物学功能的  $\beta$ -木糖苷酶, 但重组酵母在合成培养基中生长 143 h 时,  $\beta$ -木糖苷酶最大总酶活仅为 0.09 nkat/mL。而同样通过 *ADH2* 启动子及 *MFa1* 信号肽的分泌表达策略, 黑曲霉的  $\beta$ -木糖苷酶基因 *xlnD* 在酿酒酵母中得到有活性的分泌性  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[53]</sup>。进而采用相同策略, 将黑曲霉  $\beta$ -木糖苷酶基因 *xlnD* 及瑞氏木霉  $\beta$ -木聚糖酶 *XYN2* 在酿酒酵母中共分泌表达, 重组酵母能产生酶活为 1 577 nkat/mL 的  $\beta$ -木聚糖酶和酶活为 3.5 nkat/mL 的  $\beta$ -木糖苷酶, 2 种酶能直接将桦木的木聚糖转化为 D-木糖<sup>[53]</sup>。

另外还需要一系列的辅助酶和脱支酶如  $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸苷酶、 $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶以及乙酰木聚糖酯酶和酚酸酯酶等的作用才能完全降解含多种取代基的木聚糖。Margolles-Clark 等<sup>[54]</sup>在酿酒酵母中构建了瑞氏木霉的 cDNA 表达文库, 将此表达文库在含有 pNPA (对硝基苯基- $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷) 培养基的微孔平板中培养, 有 20 个酵母克隆可以分泌  $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶, 16 个克隆的 cDNA 为阿拉伯糖苷酶基因 *ABF1*, 而另外 4 个克隆为  $\beta$ -木糖苷酶基因 *BXL1*, 其中表达 *ABF1* 基因的酵母能从对硝基苯基- $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷和阿拉伯糖基木聚糖中释放 L-阿拉伯糖。Crous 等<sup>[55]</sup>将黑曲霉中的  $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶基因 *ABF B* 的 cDNA 在 *PGK1* 强启动子的控制下, 通过多拷贝质粒转化酿酒酵母, 重组酵母能分泌有活性的  $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶, 在合成培养基和复合培养基上 48 h 产生的  $\alpha$ -L-呋喃型阿拉伯糖苷酶最大酶活分别为

0.020 U/mL 和 1.40 U/mL。de Wet BJM 等<sup>[56]</sup>将出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* 的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸苷酶的基因 *aguA*, 构建在含有 *ADH2* 强启动子的高拷贝附加体质粒上, 转化酿酒酵母, 重组酵母能产生有活性的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸苷酶。

总之, 纤维素酶和半纤维素酶在酿酒酵母的成功表达, 为 CBP 酵母菌株的选育奠定了基础。

### 3 利用酿酒酵母统合加工纤维素乙醇的策略

利用酿酒酵母统合加工纤维素乙醇主要从以下几个方面加以考虑。

#### 3.1 纤维素水解酶在酿酒酵母中的共表达

CBP 酵母需要多个纤维素水解酶的活性, 通过在酿酒酵母中共表达纤维素水解酶类, 建立糖化及乙醇发酵系统, 以期实现纤维乙醇的统合生物加工, 人们对此进行了不懈的努力。Kotaka 等<sup>[57]</sup>在酿酒酵母表面展示了米曲霉 *Aspergillus oryzae* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 AO090009000356 和内切葡聚糖酶基因 AO090010000314, 重组酵母能以 20 g/L  $\beta$ -葡聚糖作为底物进行乙醇发酵, 在 24 h 内乙醇的浓度达到 7.94 g/L, 乙醇的转化率达到理论值的 69.6%。Fujita 等<sup>[23]</sup>成功地将瑞氏木霉的 *EG II* 基因、*CBH II* 基因和棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus* 的 *BGL1* 基因在酿酒酵母表面实现共表达, 重组菌株能够直接利用磷酸膨胀纤维素 (PASC) 产生乙醇。Den Haan 等<sup>[58]</sup>将瑞氏木霉的 *EG I* 基因和扣囊复膜酵母菌的 *BGL1* 基因, 在酿酒酵母中共表达, 重组菌株在厌氧条件下能在含 10 g/L PASC 为唯一碳源的培养基中生长, 比生长速率为  $0.03 \text{ h}^{-1}$ , 细胞浓度达到 0.27 g DCW/L, 同时产生 1.0 g/L 乙醇。DC la Grange 等<sup>[53]</sup>将黑曲霉的  $\beta$ -木糖苷酶基因 *xlnD* 和瑞氏木霉的  $\beta$ -木聚糖酶的基因 *XYN2* 在酿酒酵母中共分泌表达, 重组酵母产生的  $\beta$ -木聚糖酶和  $\beta$ -木糖苷酶能直接将桦木的木聚糖转化为 D-木糖。

#### 3.2 强化酿酒酵母外源蛋白表达能力

由于酿酒酵母表达系统有一定的局限性, 其缺乏有效的分泌系统, 分泌效率低, 而且容易产生高甘露糖型的过度 N-糖基化现象, 制约着纤维素水解酶的高效表达, 有必要对纤维水解酶基因及酿酒酵

母受体菌的改造方面进行改造,在不影响其他优良特性的基础上提高酿酒酵母菌株的外源蛋白表达能力。

### 3.3 纤维素水解酶酿酒酵母异源表达与相应酶系的配合

我们认为木质纤维素乙醇的统合生物加工过程实质上是通过一种微生物将纤维素酶生产、纤维素水解和乙醇发酵过程组合或部分组合,在酿酒酵母中共表达 CBP 酵母所需要的所有外源基因是不太容易实现的,而且不仅会增加细胞的负担,且酿酒酵母代谢己糖和戊糖的能力也有可能受到影响。如果根据特定微生物产生纤维素酶系的某些不足,如瑞氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活较低等,将不足组分酶的基因在酿酒酵母中高效表达,配合使用相应的酶系的酶制剂,也是酿酒酵母统合加工纤维素乙醇的一个策略,能在一定程度上减少成本。如 Shen 等<sup>[15]</sup>将扣囊腹膜酵母菌来源的 *BGL1* 基因在酿酒酵母工业菌株中成功表达,在 SSF 过程中,在同一纤维素酶系 JU-A10 的作用系统中,重组菌株 NAN-227 的纤维二糖利用能力和从微晶纤维素的乙醇产生速率、得率,均优于出发菌株 NAN-27 与额外添加  $\beta$ -葡萄糖苷酶的实验组。

### 3.4 纤维素水解酶各组分的比例

纤维素水解酶各组分的比例对木质纤维素的酶解作用有很大影响。Gao 等<sup>[59]</sup>测定了真菌和细菌的纤维素水解酶混合物作用于氨气爆破法 (AFEX) 处理的玉米秸秆的酶活,发现某些真菌纤维素水解酶和细菌纤维素水解酶可以协同作用于葡聚糖和木聚糖,通过测定 73 个不同的酶混合物组合最终确定了单个酶的最佳比例,即真菌纤维素酶 (占总蛋白的 78%) 中 CBH I 占总酶的 9%~51%、CBH II 占总酶的 9%~51%、EGI 占总酶的 10%~50%,半纤维素酶中 (占总蛋白的 22%) 中 LX1 细菌内切木聚糖酶占总酶的 13%、细菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶 L $\beta$ X 占总酶的 9%;在 50℃, pH 4.5 条件下,酶混合物最有效,氨气爆破法 (AFEX) 处理的玉米秸秆的糖化作用最佳,接近 95%的葡聚糖和 75%的木聚糖转化。针对不同木质纤维素材料不同预处理方法获得的酶解底物,确定酶解过程需要的最佳纤维素水解酶组分的比例,不仅可以在一定程度上降低成本,避免不

必要的浪费,而且可以有效地提高酶解的效率,这也是统合加工纤维素乙醇的重要内容。

## 4 其他 CBP 载体的研究进展

其他细菌和真菌如热纤梭菌 *Clostridium thermocellum*、克雷伯氏杆菌 *Klebsiella oxytoca*、运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis*、瑞氏木霉及粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 等均有作为统合生物加工的载体的研究报道。

热纤梭菌 *Clostridium thermocellum* 由于其表面存在多个纤维素酶的蛋白质复合体——纤维小体,能直接将纤维素分解为乙醇,但其具有发酵不完全、发酵速度慢、乙醇产率较低等缺陷。Guedon 等<sup>[60]</sup>通过途经代谢工程手段强化了下游代谢途径,即在热纤梭菌中异源表达了运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶基因 *PDC* 和乙醇脱氢酶基因 *ADH II*,与出发菌株相比,重组菌株细胞浓度增加了 180%,纤维素消耗增加了 150%,乙酸和乙醇得率分别增加了 93%和 53%, $H_2$ 得率则增加了 75%。

克雷伯氏杆菌 *Klebsiella oxytoca* 是一种肠道细菌,具有较宽的底物利用范围如己糖、戊糖、纤维二糖和纤维三糖等,特别是对纤维二糖的利用特点可减少纤维素酶的使用。但野生型的 *K. oxytoca* 发酵产物主要为有机酸,乙醇产率较低。Ingram 等<sup>[61]</sup>将欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi* 的 2 种内切葡聚糖酶基因 *celY* 和 *celZ* 整合在 *K. oxytoca* P2 菌的染色体上,重组菌株分泌产生约 20 U/mL 的内切葡聚糖酶到胞外,但利用该菌配合真菌纤维素酶发酵,纤维素产生的乙醇却增加了 22%。

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 是唯一通过 ED 途径厌氧发酵葡萄糖的微生物,可以发酵葡萄糖、果糖、蔗糖等六碳糖产乙醇,但不能利用五碳糖生产乙醇。运动发酵单胞菌具有较高的糖吸收率、较高的乙醇产率、生物量少、较高的乙醇耐受等。但该菌底物利用范围过窄,一般野生型 *Z. mobilis* 菌株只能以葡萄糖、果糖和蔗糖作为生产乙醇的底物,不能将复杂的碳水化合物代谢为乙醇。Brestic-Goachet 等<sup>[62]</sup>将欧文氏菌的内切葡聚糖酶的基因 *celZ* 在运动发酵单胞菌中表达,大部分重组内切酶在胞质空间中积累。Okamoto 等<sup>[63]</sup>将醋酸杆菌

*Acetobacter xylinum* 的具有羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活性的基因 *ACM1*, 构建到运动发酵单胞菌和大肠杆菌的穿梭质粒 pZA22 上, 重组质粒 pZAAC21 转化运动发酵单胞菌和大肠杆菌, 在运动发酵单胞菌中的 CMC 酶活比在大肠杆菌中高 10 多倍, 但 75% 的总 CMC 酶活同样在运动发酵单胞菌的胞质空间中被检测到。该菌株没有在发酵纤维素产乙醇方面作过尝试。

瑞氏木霉和粗糙脉孢菌不仅能够高产量地产生多种糖化酶<sup>[64]</sup>, 能有效地降解木质纤维素, 而且同时具有转化葡萄糖和木糖产生乙醇的完整代谢途径, 但是其发酵速率较慢, 产乙醇的速率和得率不高, 对乙醇的耐受性也有限, 同时酶产生的好氧及乙醇产生的厌氧要求的矛盾等等, 制约了其作为 CBP 载体载体的发展<sup>[21]</sup>。同样地, 粗糙脉孢菌也同时具有纤维素降解及乙醇发酵能力, 而且其木糖产乙醇的能力较瑞氏木霉稍强<sup>[65]</sup>, 但其作为 CBP 载体的不足之处也与瑞氏木霉相似。

## 5 展望

综合生物加工 (CBP) 由于其工艺上的高度整合, 有效节省了原料和时间, 迎合了未来生物质能源生产发展的趋势, 虽然构建完美 CBP 酵母目前来说还不太现实, 但随着纤维素水解酶在酿酒酵母中的表达研究的不断进步, 利用酿酒酵母生产纤维素乙醇的成本会进一步降低, 有关 CBP 酵母选育方面的研究还有很长的路要走。

## REFERENCES

- [1] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 506–577.
- [2] Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, *et al.* Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(5): 577–583.
- [3] Demain AL, Newcomb M, Wu JH. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, **69**(1): 124–154.
- [4] Hahn-Hägerdal B, Wahlbom CF, Gardonyi M, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, **73**: 53–84.
- [5] van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, *et al.* Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, **108**: 205–235.
- [6] Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**(5): 577–591.
- [7] Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**(5): 494–500.
- [8] Kotula L, Curtis PJ. Evaluation of foreign gene codon optimization in yeast: expression of a mouse IG kappa chain. *Biotechnology (N Y)*, 1991, **9**(12): 1386–1389.
- [9] Wiedemann B, Boles E. Codon-optimized bacterial genes improve L-arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(7): 2043–2050.
- [10] Murray JA. Bending the rules: the 2- $\mu$  plasmid of yeast. *Mol Microbiol*, 1987, **1**(1): 1–4.
- [11] Fitcher AB. The 2  $\mu$  circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1988, **4**(1): 27–40.
- [12] Clarke L, Carbon J. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*, 1980, **287**(5782): 504–509.
- [13] Wang Y, Shen Y, Bao XM, *et al.* Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(11): 885–890.
- [14] Li M, Ma T, Bao XM, *et al.* Construction of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose reductase gene efficiently and primary study on its xylitol fermentation. *Food Ferment Ind*, 2006, **32**(1): 1–4.  
李敏, 马涛, 鲍晓明, 等. 稳定高效表达木糖还原酶基因工业酿酒酵母的构建及木糖醇发酵的初步研究. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(1): 1–4.
- [15] Shen Y, Zhang Y, Bao XM, *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing beta-glucosidase. *Bioresour Technol*, 2008, **99**(11): 5099–5103.
- [16] Zhang X, Shen Y, Bao XM, *et al.* Ethanolic cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(18): 7104–7110.
- [17] Lee FW, Da Silva NA. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the delta sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**(3): 339–345.



- [18] Liu XY, Shen Y, Bao XM. *et al.* Construction of a ribosomal DNA multi-copy integration vector and application in the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J Shandong Univ: Natural Sci*, 2005, **40**(3): 105–109.  
刘向勇, 沈煜, 鲍晓明, 等. rDNA 介导的多拷贝整合表达载体的构建及其在酿酒酵母工业菌株中的应用. 山东大学学报: 理学版, 2005, **40**(3): 105–109.
- [19] Parekh RN, Shaw MR, Wittrup KD. An integrating vector for tunable, high copy, stable integration into the dispersed Ty sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*, 1996, **12**(1): 16–21.
- [20] Johansson B, Hahn-Hägerdal B. Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2002, **19**(3): 225–231.
- [21] Xu Q, Singh A, Himmel ME. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocelluloses. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, **20**(3): 364–371.
- [22] Nakajima H, Noguchi K, Yamamoto M, *et al.* Expression of an 87-kD- $\beta$ -1,3-glucanase of *Bacillus circulans* IAM1165 in *Saccharomyces cerevisiae* by low-temperature incubation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**(12): 2039–2042.
- [23] 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.
- [24] Idiris A, Tohda H, Kumagai H, *et al.* Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**(2): 403–417.
- [25] Kang HA, Nam SW, Kwon KS, *et al.* High-level secretion of human alpha 1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence. *J Biotechnol*, 1996, **48**(1/2): 15–24.
- [26] Liu HW, Bao XM. Characterization of a chitosanase from *Fusarium solani* and its expression in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49**(12): 1607–1612.  
刘怀伟, 鲍晓明. 腐皮镰孢菌壳聚糖酶的酶学性质研究及其在酿酒酵母工业菌株中的表达. 微生物学报, 2009, **49**(12): 1607–1612.
- [27] Penttilä ME, André L, Lehtovaara P, *et al.* Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1988, **63**(1): 103–112.
- [28] Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, *et al.* Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 2000, **101**(3): 249–258.
- [29] Schröder M. Engineering eukaryotic protein factories. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**(2): 187–196.
- [30] Idiris A, Tohda H, Sasaki M, *et al.* Enhanced protein secretion from multiprotease-deficient fission yeast by modification of its vacuolar protein sorting pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **85**(3): 667–677.
- [31] Hong E, Davidson AR, Kaiser CA. A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol*, 1996, **135**(3): 623–633.
- [32] Holkeri H, Makarow M. Different degradation pathways for heterologous glycoproteins in yeast. *FEBS Lett*, 1998, **429**(2): 162–166.
- [33] Zhang B, Chang A, Kjeldsen TB, *et al.* Intracellular retention of newly synthesized insulin in yeast is caused by endoproteolytic processing in the Golgi complex. *J Cell Biol*, 2001, **153**(6): 1187–1198.
- [34] Turner BG, Avgerinos GC, Melnick LM, *et al.* Optimization of pro-urokinase secretion from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37**(9): 869–875.
- [35] Kang HA, Choi ES, Hong WK, *et al.* Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**(5): 575–582.
- [36] Gonzalez-Lopez CI, Szabo R, Blanchin-Roland S, *et al.* Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics*, 2002, **160**(2): 417–427.
- [37] Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1426**(2): 227–237.
- [38] Kubicek CP, Panda T, Schreferl-Kunar G, *et al.* O-linked-but not N-linked-glycosylation is necessary for secretion of endoglucanase I and II by *Trichoderma reesei*. *Can J Microbiol*, 1987, **33**(8): 698–703.
- [39] Kukuruzinska MA, Bergh ML, Jackson BJ. Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 915–944.
- [40] Hong J, Tamaki H, Yamamoto K, *et al.* Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **63**(1): 42–50.
- [41] Nagasu T, Shimma Y, Nakanishi Y, *et al.* Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast*, 1992, **8**(7): 535–547.
- [42] Heinzelman P, Snow CD, Wu I, *et al.* A family of

- thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(14): 5610–5615.
- [43] Penttilä ME, André L, Saloheimo M, *et al.* Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1987, **3**(3):175–185.
- [44] Mochizuki D, Miyahara K, Hirata D, *et al.* Overexpression and secretion of cellulolytic enzymes by  $\delta$ -sequence-mediated multicopy integration of heterologous DNA sequences into the chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77**(5): 468–473.
- [45] Sakamoto S, Tamura G, Ito K, *et al.* Cloning and sequencing of cellulase cDNA from *Aspergillus kawachii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1995, **27**(5): 435–439.
- [46] van Rensburg P, van Zyl WH, Pretorius IS. Co-expression of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase gene and a *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1996, **30**(3): 246–250.
- [47] Saloheimo M, Nakari-Setälä T, Tenkanen M, *et al.* cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Eur J Biochem*, 1997, **249**(2): 584–591.
- [48] Okada H, Tada K, Sekiya T, *et al.* Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(2): 555–563.
- [49] Yan TR, Lin YH, Lin CL. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 1998, **46**(2): 431–437.
- [50] van Rooyen R, Hahn-Hägerdal B, La Grange DC, *et al.* Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Biotechnol*, 2005, **120**(3): 284–295.
- [51] DC la Grange, Pretorius IS, van Zyl WH. Expression of a *Trichoderma reesei* beta-xylanase gene(XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(3): 1036–1044.
- [52] DC la Grange, Pretorius IS, van Zyl WH. Cloning of the *Bacillus pumilus* beta-xylosidase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**(3): 262–266.
- [53] DC la Grange, Pretorius IS, Claeysens M, *et al.* Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase (*xlnD*) and the *Trichoderma reesei* xylanase II (*xyn2*) genes. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(12): 5512–5519.
- [54] Margolles-Clark E, Tenkanen M, Nakari-Setälä T, *et al.* Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10): 3840–3846.
- [55] Crous JM, Pretorius IS, van Zyl WH. Cloning and expression of the alpha-L-arabinofuranosidase gene (*ABF2*) of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**(3): 256–260.
- [56] de Wet BJM, Van Zyl WH, Prior BA. Characterization of the *Aureobasidium pullulans*  $\alpha$ -glucuronidase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **38**(5): 649–656.
- [57] Kotaka A, Bando H, Kaya M, *et al.* Direct ethanol production from barley beta-glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* beta-glucosidase and endoglucanase. *J Biosci Bioeng*, 2008, **105**(6): 622–627.
- [58] Den Haan R, Rose SH, Lynd LR, *et al.* Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2007, **9**(1): 87–94.
- [59] Gao Dahai, Chundawat SP, Liu Tongjun, *et al.* Strategy for identification of novel fungal and bacterial glycosyl hydrolase hybrid mixtures that can efficiently saccharify pretreated lignocellulosic biomass. *Bioenerg Res*, 2010, **3**(1): 67–81.
- [60] Guedon E, Desvaux M, Petitdemange H. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 53–58.
- [61] Ingram LO, Zhou S, Davis FC. Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (*celY*) and CelZ (*celZ*) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(1): 6–14.
- [62] Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B, *et al.* Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 893–902.
- [63] Okamoto T, Yamano S, Ikeaga H, *et al.* Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**(4): 563–568.
- [64] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**(4): 438–443.
- [65] Zhang Z, Qu Y, Zhang X, *et al.* Effects of oxygen limitation on xylose fermentation, intracellular metabolites, and key enzymes of *Neurospora crassa* AS3.1602. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, **145**(1/3): 39–51.