

酒酵母细胞表 展示技术在农林废弃物生物炼制中的最新进展

张晨梦 张瑜 李迅 王飞*

(江苏省林业资源高效加工利用协同创新中心 南京林业大学化学工程学院 南京 210037)

摘要: 随着对化石燃料需求的增加以及环境问题的日益严重,生物质已成为地球上燃料来源和可持续能源中最具吸引力的替代品。农业和林业残留物或工业废料中的纤维素等生物质被认为是生产生物燃料和生物化学物质的理想可持续糖源。农林废弃物在世界范围内大量产生,造成了一定的资源浪费和环境问题。从循环经济的角度来看,核心任务是将农林废弃物提炼为有价值的能源和化学品。相较于化学转化法,微生物转化法具有安全性,环境友好性,微生物转化可以迅速而有效地生产目标蛋白,也可以获得更高的产量,更低的成本,更少的废物。微生物细胞表面显示技术是一种新颖、经济的技术,为工程蛋白提供了一个强大的平台,与经典的细胞内和细胞外表达(分泌)系统相比,该技术避免了酶纯化和底物运输过程,是解决酶不稳定性的有效方法。酿酒酵母作为生产各种燃料和化学品的常见细胞工厂,具有细胞较大、通常被认为是安全的(GRAS)生物和可以进行分泌蛋白翻译后加工的优点,非常适合细胞表面展示。纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶、环糊精葡聚糖转化酶、淀粉酶等多种酶已在酵母细胞表面成功表达,并具有生物活性。成功构建的工程菌株不仅能有效降解富含木质纤维素和淀粉的农林业废弃物,而且为同时糖化发酵(SSF)/固结生物处理(CBP)工艺奠定了基础。细胞表面显示技术可用于从富含糖、甘油三酯和废弃蛋白质的廉价来源的生物质生产生物燃料和各种化学品。此外,它还广泛应用于生物吸附剂和口服疫苗。结合代谢工程和合成生物学方法,可以构建具有所需功能的工程酵母细胞。在这篇综述中,我们首先描述了利用细胞表面显示技术构建修饰酿酒酵母的各种策略,包括直接细胞表面展示和支架介导的细胞表面展示策略。同时,本文重点介绍了国内外利用细胞表面展示技术在农林废弃物的生物冶炼上的应用。细胞表面展示效率的提高取决于靶蛋白的有效表达和分泌以及所展示的靶蛋白的活性。本文总结了提高酿酒酵母细胞表面展示效率的策略,包括锚定结构域的选择以及定位效应,提高蛋白的分泌表达,增强细胞表面的空间利用率等。最后对于细胞表面展示技术现在面临的困难进行了探讨并展望了未来的发展前景。

关键词: 酿酒酵母; 细胞表面展示; 农林废弃物; 生物炼制

Recent advances in *Saccharomyces cerevisiae* cell surface display technology for agricultural and forestry waste biorefineries

Abstract: With the increasing demand for fossil fuels and growing environmental concerns, biomass has emerged as the most attractive alternative among fuel sources and sustainable energy sources on the planet. Biomass such as cellulose from agricultural and forestry residues or industrial wastes is recognized as an ideal sustainable source of sugar for the production of biofuels and biochemical. Agricultural and forestry wastes are produced in large quantities worldwide, causing some waste of resources and environmental problems. From the perspective of circular economy, the central task is to refine agricultural and forestry wastes to produce valuable energy and chemicals. Microbial conversion is safe, environmentally friendly compared to chemical conversion methods, can produce target proteins quickly and efficiently, and can also result in higher yields, lower costs, and less waste. Microbial cell surface display technology is a novel and cost-effective technology that provides a powerful platform for engineering proteins/peptides with enhanced properties. Compared to the classical intracellular and extracellular expression (secretion) systems, this technology avoids enzyme purification, substrate transport processes, and is an effective solution to enzyme instability. *Saccharomyces cerevisiae* is well suited to cell surface display as a common cell factory for the production of various fuels and chemicals, with the advantages of large cell size, being a Generally Regarded As Safe (GRAS) organism, and post-translational processing of secreted proteins. Various enzymes such

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFB1504002)

* 王飞为通讯作者

as cellulase, hemicellulase, lipase, amylase, cyclodextrin dextran converting enzyme, and amylase have been successfully expressed on the surface of yeast cells and are biologically active. The successfully constructed engineered strains not only effectively degrade lignocellulose- and starch-rich agricultural and forestry wastes, but also lay the foundation for the simultaneous saccharification fermentation (SSF)/consolidation bioprocessing (CBP) process. Cell surface display technology can be used to produce biofuels and a variety of chemicals from inexpensive sources of biomass rich in sugars, triglycerides and waste proteins. In addition, it is widely used in biosorbents and oral vaccines. Combining metabolic engineering and synthetic biology approaches, engineered yeast cells with desired functions can be constructed. In this review, we first describe various strategies for constructing modified *S. cerevisiae* using cell surface display technology, including direct cell surface display and scaffold-mediated cell surface display strategies. Meanwhile, this paper focuses on the application of *S. cerevisiae* cell surface display technology for agricultural and forestry waste biofinerie. The improvement of cell surface display efficiency depends on the effective expression and secretion of target proteins as well as the activity of the displayed target proteins. This paper summarises the strategies to improve the efficiency of cell surface display in *S. cerevisiae*, including the selection of anchoring domains and localization effects, the enhancement of protein secretion and expression, and the optimization of cell surface space utilization. Finally, the difficulties faced by the cell surface display technology are discussed and the future development prospects are envisaged.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; cell surface display; agricultural and forestry waste; biorefineries.

近些年来, 以生物质作为原料生产各种燃料和有价值的化学品已引起极大的兴趣。石油资源的枯竭以及环境问题促进的对新能源的研究以及环境友好性, 可持续性转化方式的开发。农林废弃物如甘蔗渣、玉米秸秆、麦秆、草、木屑等作为储量很大的木质纤维素原料是丰富、廉价和可再生的糖来源。废物生物炼制的定义是将生物质(残渣)以综合的方式转化为其他有用的产品, 旨在最大限度地从废物处理中获得增值产品的产出(Kosugi et al., 2009)。然而, 废物生物炼制的主要挑战是缺乏一种环境友好的、低成本的技术来更好地降解和转化废物, 因为这将极大地促进废物生物炼制的经济可行性(Taylor, 2008)。细胞表面显示技术是固定化功能蛋白/肽和赋予微生物细胞特定功能的一种有吸引力的方法。在细胞表面展示系统中, 功能蛋白/肽与锚定蛋白基因融合, 在信号肽的引导下在细胞表面或质膜上表达, 与细胞内表达和分泌相比, 细胞表面展示技术具有独特的优势: 1)在恶劣的温度或 pH 条件下, 细胞表面展示的蛋白比游离蛋白更能稳定地维持其功能和特性。2)固定在细胞表面的蛋白质可以通过过滤或离心回收, 避免了裂解细胞或从培养基中纯化蛋白质的复杂过程。3)多酶细胞表面共展示系统可以缩短底物传递距离, 具有协同效应的酶共展示可以触发协同邻近效应, 提高催化效率。表面显示功能蛋白的工程酵母可以作用于不能进入细胞的大分子底物(如纤维素、半纤维素), 以及由此产生的单体(如葡萄糖)可以被细胞直接用来生产有价值的产品(如生物乙醇)。这一过程有助于将水解、糖化和发酵结合在一起的综合生物处理过程。细胞表面显示系统有许多潜在的应用, 包括生物催化剂、高通量文库筛选、生物吸附剂、口服疫苗等(Teymennet-Ramírez et al., 2022)。

细胞表面显示系统已成功应用于多种微生物细胞。其中, 酵母细胞是最适合细胞表面展示的宿主细胞之一, 细胞尺寸较大, 细胞壁坚硬, 可对表达的异源真核蛋白进行翻译后加工(包括折叠、糖基化等)(Liu et al., 2016a)。在酵母中, 细胞表面展示最早是在酿酒酵母中发展起来的, 并取得了显著的成果。随后, 利用酿酒酵母细胞壁蛋白全长或锚定结构域的表面展示系统被应用于其他酵母, 包括毕赤酵母(Dong et al., 2020)和解耶氏酵母(An et al., 2016)。酿酒酵母易于基因操纵, 由于其在食品工业中的广泛使用, 通常被认为是安全的(Cha et al., 2022)。本文重点介绍了利用酿酒酵母作为细胞表面显示对象的研究进展, 不仅介绍了改善细胞表面显示的策略, 而且更详细地讨论了表面工程酿酒酵母在农林废弃物的生物炼制方面的应用, 并对未来商业化的挑战提出了见解。

1 酿酒酵母细胞表面展示系统

细胞表面展示是通过在细胞表面展示功能蛋白/多肽来赋予酿酒酵母细胞新功能的有力工具。对细胞壁结构的研究丰富了细胞表面展示系统。酿酒酵母细胞壁的内层主要由 β -葡聚糖组成，与几丁质交联以保持细胞壁强度，外层主要由甘露蛋白组成，甘露蛋白与内层共价连接，异源蛋白可固定在甘露蛋白层上，从而决定细胞表面性质(Ye et al., 2021)。在细胞表面展示平台中，不同的酶可以位于同一细胞表面，其接近性可以提高它们的协同作用。该平台简化了某些生物催化过程中的蛋白质纯化，促进了全细胞催化剂的构建和重复使用。

1.1 直接细胞表面展示

在细胞表面展示中，将目标蛋白与特定的载体序列融合后导入酵母细胞，然后表达融合蛋白。信号肽引导融合蛋白向细胞外分泌，融合蛋白所含的锚蛋白可与酵母细胞壁结构结合，将目标蛋白固定在酵母细胞表面(Kondo & Ueda, 2004)。根据锚蛋白融合方式的不同，细胞表面展示系统可分为糖基磷脂酰肌醇锚定系统(Xing et al., 2022)、FS/FL(Flo1p 的截短形式(Matsumoto et al., 2002) 锚定系统和 Pir 蛋白锚定系统(图 1)。Cwp1p、Cwp2p、Tip1p、Flo1p、Sed1p、YCR89w 和 Tir1 等 GPI 锚蛋白通过 C 端 GPI 锚结构与细胞壁的 β -1, 6-葡聚糖连接，目的基因通常融合在 N 端(Vaart et al., 1997)。其中，由 Aga1 和 Aga2 组成的 α -凝集素通过 Aga1 的 C 端 GPI-锚结构与细胞壁共价结合，靶蛋白基因与 Aga2 的 C 端或 N 端融合，Aga2 与 Aga1 通过二硫键连接。编码 Flo1p 絮凝功能域的 FL/FS 基因位于 Flo1p 的 N 端附近，可通过非共价作用粘附于细胞壁中的甘露聚糖，目标蛋白一般在其 C 端融合。一些 C 端附近有活性位点的蛋白与 GPI 锚定蛋白融合后具有抑制活性，使用 FL/ FS 展示系统可以减轻这种抑制作用。此外，Pir 蛋白展示系统适用于 C 端融合、N 端融合和插入融合。该蛋白与前两种锚定模式的不同之处在于，它可以通过 N 端重复序列与细胞壁中的 β -1, 3-葡萄糖形成酯连接，也可以利用 C 端半胱氨酸残基通过二硫键附着到细胞壁的成分上(Yang et al., 2019)。

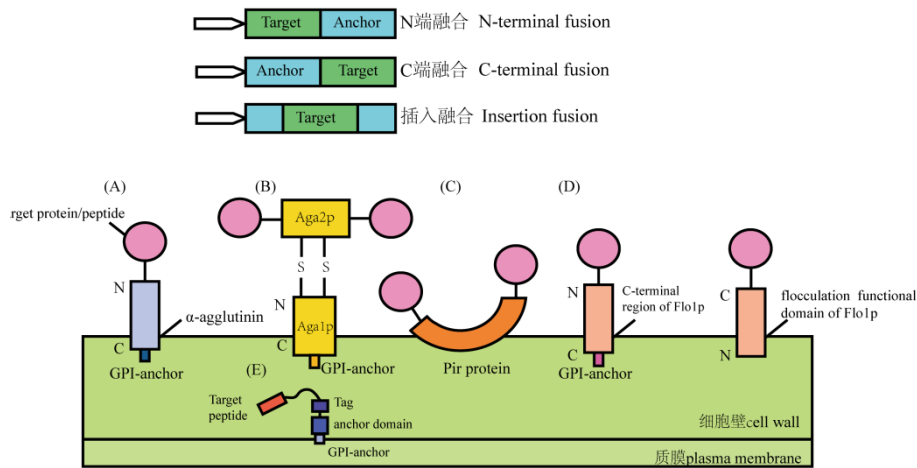


图 1. 酿酒酵母细胞表面展示系统。(A) 基于 α -凝集素的显示系统；(B) 基于 α -凝集素的显示系统；(C) 基于 flo1p 的显示系统；(D) 薄膜显示系统。

Figure 1. Cell surface display systems in *S. cerevisiae*. (A) α -agglutinin-based display system; (An et al.) α -agglutinin-based display system; (B) Pir-based display system; (C) Flo1p-based display system; (D) Membrane display system.

1.2 支架介导的细胞表面展示

天然纤维素体通常存在于厌氧菌中(Felix & Ljungdahl, 1993)。该复合物由支架蛋白、锚定结构域、粘连蛋白、纤维结合结构域和催化单元组成，为基于支架的细胞表面展示提供了一种新的策略。这种细胞表面展示系统通常触发酶-酶接近协同效应和酶-底物-细胞复合协同效应。天然纤维素体的复杂组成和支架蛋白的相当大的分子量为细胞表面展示创造了代谢负担。当需要多酶展示时，其特异性不高，降低了

自组装效率。因此, 研究人员选择了不同菌株的粘连-对接模块和纤维素结合域(CBD)组成人工支架, 并从酵母细胞壁中选择锚定蛋白作为锚定元件, 将支架展示在酵母细胞表面(Fierobe et al., 2005; Mingardon et al., 2007; Wiczorek & Martin, 2010)。与相应对接模块(dockerin)融合的靶蛋白可以通过粘连模块(cohesin)与对接模块的相互作用与支架结合(图 2)。纤维素体成分可以在同一细胞内产生并组装在细胞表面, 也可以由不同菌株的细胞产生, 然后共孵育在所展示的支架的细胞表面组装。例如, 表面显示支架蛋白的细胞可以直接与含有纤维素酶的大肠杆菌细胞裂解物孵育, 形成用于乙醇生产的纤维素复合物(Tsai et al., 2009)。

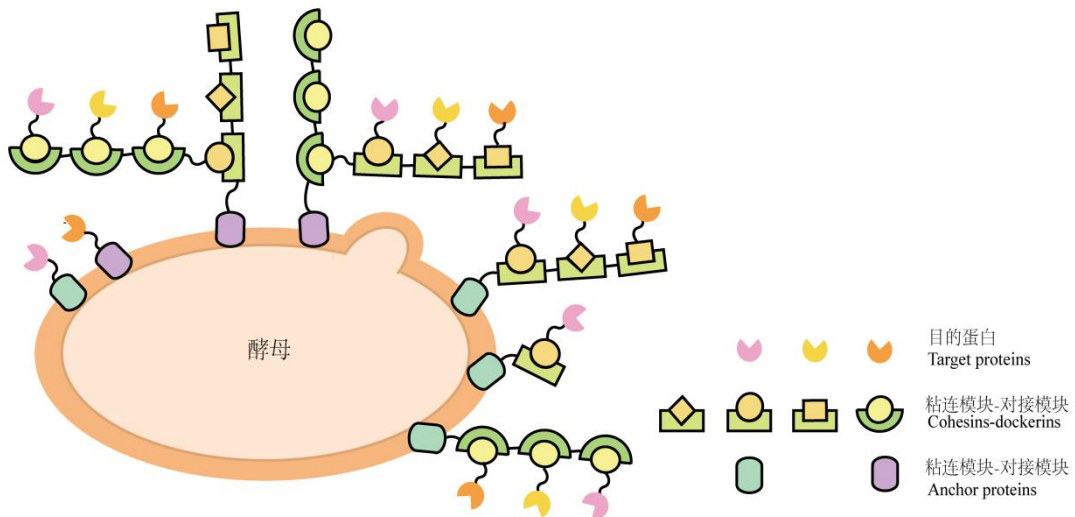


图 2 酒酵母直接和间接细胞表面展示策略示意图。

Figure 2. Schematic illustrations of direct and indirect cell-surface display strategies in *S. cerevisiae*.

2 提高细胞表面展示效率的策略

细胞表面展示效率的提高取决于靶蛋白的有效表达和分泌以及所展示的靶蛋白的活性。为此, 人们通过选择合适的锚定蛋白和表达载体、构建高表达基因盒、加强蛋白质折叠和翻译后修饰等方法来提高蛋白质的产生和活性。然而, 需要进一步努力实现普遍商业化。

2.1 锚定蛋白的作用和定位效果

酶在细胞表面的显示效率与锚定蛋白有关(表 1)。已经尝试通过筛选对比新的锚定蛋白来提高细胞表面显示效率(Phienluphon et al., 2019)。通过计算预测从不同来源选择了 37 种 GPI 型锚蛋白, 与 yEGFP 融合, 通过比较荧光强度进行预筛选, 并进一步将几种有活力的荧光锚蛋白与 β -葡萄糖苷酶融合, 测定酶活性。最后, 发现来自乳酸克鲁维菌的 6_K1 具有更高的转录水平和更好的靶蛋白展示效率。Yang 等(Yang et al., 2019)通过比较几种展示体系的展示效率和酶活性, 采用 α -凝集素锚定体系, 以 α -半乳糖苷酶为靶酶, 直接与 Aga1p 融合, 开发了一种新的表面展示体系。该酶还与传统的 α -凝集素和其他六种选定的锚定蛋白融合。酶活性比较表明, Aga1p、Dan4p 和 Sed1p 具有较高的展示效率, 是很有前途的重组蛋白在酵母表面固定的锚定系统。锚定蛋白结构域的显示效率随所显示蛋白的分子量的变化而变化。结构锚定域的定位效应也可能影响靶蛋白在细胞表面的展示效率。Inokuma 等人(Inokuma et al., 2020)将锚定结构域(Sed1p 和 Sag1p)与异源蛋白融合, 并在酿酒酵母中表达。荧光和免疫电镜观察发现, 这两个结构域在细胞表面的锚定作用不同, sed1p 锚定结构域主要定位于细胞壁外表面, sag1p 锚定结构域主要定位于细胞壁内。通过适当地控制锚定位置, 可以有效地利用细胞壁空间, 使细胞表面显示技术在各个领域得到更大的应用。

表 1 不同锚定蛋白的锚定效率比较

Tab. 1 Comparison of anchoring efficiencies of different anchor proteins

酶来源 Enzyme origin	锚定蛋白 Anchor protein	酵母宿主 Yeast host	启动子 Promoter	酶活 Activity	参考文献 References
β -glucosidase (BGL1) from <i>Aspergillus aculeatus</i>	SAG1	<i>S. cerevisiae</i>	SED1	99 \pm 10 U/g cell dry weight	(Inokuma et al., 2014)
	SED1	<i>S. cerevisiae</i>	SED1	235 \pm 28 U/g cell dry weight	
BGL1 from <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	DAN4	<i>S. cerevisiae</i>	TEF1	~785 U/g cell dry weight	(Yang et al., 2019)
	AGA1	<i>S. cerevisiae</i>	TEF1	~920 U/g cell dry weight	(Yang et al., 2019)
BGL from <i>Aspergillus niger</i>	Sag1	<i>S. cerevisiae</i>	GPD	~18 U/g cell dry weight	(Zhang et al., 2019)
	Sed1	<i>S. cerevisiae</i>	GPD	25.22 \pm 0.81 U/g cell dry weight	(Zhang et al., 2019)
Lipase Lip2 from <i>Y. lipolytica</i>	Cwp2	<i>S. cerevisiae</i>	GPD	~8 U/g cell dry weight	(Zhang et al., 2019)
	Cwp2	<i>S. cerevisiae</i>	PGK	7.6 \pm 0.4 U/cell dry weight	(Liu et al., 2010)
Lip7 from <i>Y. lipolytica</i>	a-agglutinin	<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	283 U/g cell dry weight	(Liu et al., 2010)
	Flo1	<i>P. pastoris</i>	AOX1	85 U/g cell dry weight	(Jiang et al., 2007)
<i>Rnizopus oryzae</i> Lipase (ROL)	FLO1	<i>S. cerevisiae</i>	TRP1	61.3 IU/g cell dry weight	(Matsumoto et al., 2002)
β -Glucuronidase from <i>Aspergillus oryzae</i>	Ago1	<i>P. pastoris</i>	GAP	24.32 U/g dry cell weight	(Wang et al., 2019)
	Pir1	<i>P. pastoris</i>	GAP	28.89 U/g dry cell weight	(Wang et al., 2019)

2.2 改善蛋白质分泌

蛋白质分泌是提高细胞表面显示效率的重要因素。改善蛋白分泌的主要策略包括提高蛋白表达水平和信号肽工程。启动子的强度往往决定了酿酒酵母中异源蛋白的表达水平。不同类型的启动子强度不同。此外，启动子的强度还会受到其他因素的影响，如生长条件(Sun et al., 2012a)(如葡萄糖浓度)、内含子(Hoshida et al., 2017)等因素。利用启动子工程技术构建合成启动子，有可能进一步提高蛋白表达水平。将不同启动子的上游激活序列(UASs)与核心启动子结合，构建合成启动子库。利用这种方法，通过将 UAS_{GAL1} 与 TDH3 和 TEF1 的核心启动子融合，成功构建了强于 P_{GAL1} 的半乳糖诱导启动子(Deng et al., 2021)。选择有效的信号肽有助于促进蛋白质分泌，增加在细胞表面显示的蛋白质数量。酿酒葡萄球菌 SED1 信号肽是一种高效分泌的葡萄糖苷酶(BGL1)。细胞外的 BGL1 的活性分别是米根霉葡萄糖淀粉酶(GLUASP)和酿酒葡萄球菌 α -交配信息素(MF α 1SP)的 1.3 倍和 1.9 倍(Inokuma et al., 2016)。MF α 1SP 的 α 因子前驱体设计突变有机会获得增强的信号肽，用于多种真菌酶的分泌(Aza et al., 2021)。此外，也有研究者提出将靶蛋白与促分泌肽盒融合，并对原肽进行合理优化，可以促进异源蛋白的分泌(Cha et al., 2022)。通过优化启动子与信号肽的组合，可以进一步提高酶的表达。不同的启动子和信号肽组成 9 个基因盒与马氏克鲁维菌菊粉酶基因进行融合表达。携带 PGK1 启动子和 MF α 1 信号序列的酿酒酵母菊粉酶活性最高(Hong et al., 2015)。终止子通过终止转录和控制 mRNA 的半衰期来影响基因表达。合成终止子序列短，易于合成，功能更强。据报道，与常用的 CYC1 终止子相比，一组短的(35-70 bp)合成终止子可将荧光蛋白输出量提高 3.7 倍，转录物水平提高 4.4 倍(Curran et al., 2015)。与天然启动子相比，合成终止子在酿酒酵母中可能具有更好的功能。其他改善蛋白质分泌的策略包括：1)参与蛋白质转运或细胞表面展示的相关基因过表达(Li et al., 2022; Van Zyl et al., 2016)和基因表达的组合调控(Yang et al., 2022)。2)点突变和基因缺失(Matsuoka et al., 2014)。从紫外诱变菌株中鉴定出的点突变靶基因参与了多种细胞内生物过程。检测点突变和基因缺失对 α -淀粉酶分泌的影响有助于平衡这些生物过程，从而改善蛋白质分泌(Wang et al., 2022)。3)分泌途径优化(Besada-Lombana & Da Silva, 2019)和压力调节。4)伴侣蛋白的共过表达(Bae et al., 2022)。5)整合方法的选择。营养缺陷整合、鸡尾酒 δ -整合、CRISPR- δ -整合(Sasaki et al., 2019)和其他整合方法等相继开发来增加整合基因拷贝数，从而增强蛋白分泌过表达。

2.3 低 酒酵母细胞表 空 位 ， 优化空 利用

当展示在细胞表面时,目标蛋白的活性可能会受到与其他 GPI 蛋白竞争细胞壁上有限结合位点的限制。例如, SED1 干扰物的 β -葡萄糖苷酶活性比未干扰 SED1 的菌株高 22% (Bamba et al., 2018), CWP2 和 YGP1 的破坏可使 BGL 活性比原始菌株分别提高 63%和 24% (Arnthong et al., 2022), CCW12 和 CCW14 共敲除导致细胞壁厚度增加,这可能增加细胞表面显示的异源蛋白的数量(Inokuma et al., 2021)。在锚蛋白和靶蛋白之间添加适当长度的连接肽似乎有助于将蛋白质的活性部分与细胞壁分离,为底物进入创造空间,并提高展示酶的活性。为了进一步提高细胞表面的空间利用率和显示效率,引入支架蛋白是一种潜在的策略。通过增加粘连模块数和利用双层支架可以增强脚手架蛋白(图 3)。功能四价的体外组装与游离酶相比,酵母细胞表面的设计纤维素体在磷酸膨胀纤维素(PASC)的水解方面表现出 4.2 倍的增强(Tsai et al., 2013)。在酿酒酵母中,将基于双支架的纤维素体与细胞内的纤维素糊精途径相结合,可以实现纤维素混合糖的共同利用。利用 Aga1p 的重复 n 端构建合成支架蛋白 ScafAGA3。此外,与 Aga2p 融合的 *C. thermocellum* 的支架蛋白 ScafCipA3 通过二硫键连接到支架蛋白 ScafAGA3 上,分泌的纤维素酶组装到 ScafCipA3 上,从而形成具有两个支架蛋白的复合纤维素体。新设计的纤维素体通过调节支架蛋白和纤维素酶的比例,使酵母能够将纤维素直接发酵成乙醇(1.52 g/L)(Tang et al., 2018)。

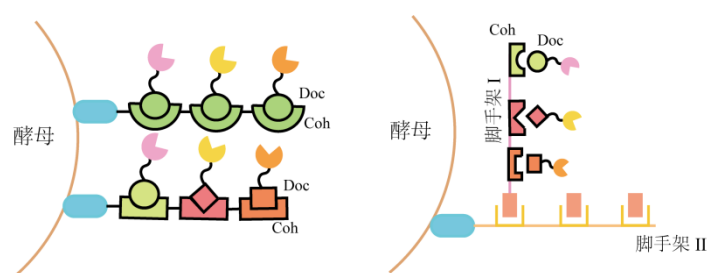


图 3 酒酵母细胞表 显示在纤维素 解中的应用。

Figure 3 Schematic diagram of the assembly strategy on the yeast cell surface using scaffoldin.

3.酿酒酵母细胞表面展示技术在农林废弃物生物转化中的应用

农林废弃物在世界范围内大量产生,造成了一定的资源浪费和环境问题。从循环经济的角度来看,核心任务是将农林废弃物提炼为有价值的能源和化学品(Song et al., 2020)。纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶、环糊精葡聚糖转化酶、淀粉酶等多种酶已在酵母细胞表面成功表达,并具有生物活性。成功构建的工程菌株不仅能有效降解富含木质纤维素和淀粉的农林业废弃物,而且为同时糖化发酵(SSF)/固结生物处理(CBP)工艺奠定了基础。

3.1 工程 酒酵母催化纤维素的生物转化

纤维素由葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成,是自然界中含量最多的大分子多糖。将纤维素水解成葡萄糖至少需要三种纤维素酶:内切葡聚糖酶(Guirimand et al.)、纤维素二糖水解酶(CBH)和 β -葡萄糖苷酶(BGL)。EG 通过作用于纤维素的无定形区,随机水解 β -1,4-糖苷键,缩短长链纤维素分子,产生大量具有还原端和非还原端的较短纤维素链;CBH 从还原/非还原端切断纤维素结晶区;BGL 将纤维多糖水解成葡萄糖。这三种酶已经成功地展示在酿酒酵母的细胞表面,将纤维素水解为葡萄糖(表 2)。将来自里氏木霉的 EGII 和来自埃氏 *Talaromyces emersonii* 的 CBH 放在同一空间(在细胞表面或培养基中)有利于无定形纤维素乙醇的发酵(Liu et al., 2015)。工程酿酒酵母证明这两种酶,以及另外两种(来自黄孢菌 *lucknowense* 的 CBH2 和来自刺曲霉的 BGL)作用于无定形纤维素和结晶纤维素,表现出更高的乙醇产量,因为 CBH2 减

少了纤维素表面的凹凸不平，并通过增强的协同水解促进了 CBH1 的运动(Liu et al., 2016b)。人们曾多次尝试改进发酵工艺，并引入新的木质纤维素降解酶(如水解多糖单加氧酶(LPMOs)和纤维素二糖脱氢酶(CBH)，以进一步提高纤维素的降解和产率(Cunha et al., 2021)。多种支架的开发(如 CipA、ZZ-Coh-Coh 和 ScafAGA3)有助于控制细胞表面显示蛋白的比例，更有效地提高乙醇产量(Qi et al., 2021)。以磷酸膨胀纤维素为唯一碳源，生成并生长由 LPMOs、cdh、CBH、EG 和 BGL 组成的五功能微纤维素体(Liang et al., 2014)。氧化活性和经典水解酶之间的微妙平衡对于纤维素材料的降解至关重要。在一个菌株中表达所有纤维素组分可能会造成沉重的代谢负担和潜在分泌机制的阻塞，从而降低酶的活性。因此，显示锚定支架和分泌催化和非催化单元应该被认为是两个独立的步骤，这样可以减轻酵母宿主的代谢负担。在细胞摄取之前将纤维素水解成葡萄糖的主要缺点是：1)由于葡萄糖对细胞外纤维素酶的抑制导致纤维素水解效率低下。2)葡萄糖诱导的碳分解代谢抑制影响其他糖的共利用。有报道称酿酒酵母中纤维素糊精转运系统的重构(Ylinen et al., 2022)。该系统促进了纤维素的高效利用，减轻了葡萄糖的抑制作用。

表 2 酒酵母细胞表 显示在纤维素 解中的应用

TABLE 2 Applications of *S. cerevisiae* cell surface display in cellulose degradation.

菌株 Strains	乙醇产量 Ethanol yield	底物 Substrate	酶 Enzymes	锚定蛋 白 Anchor	参考文献 References
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	EG, DL-CBH1, 2.9 g/L CBHI-S, 2.6 g/L	10 g/L PASC	EG II, CBH I, BGI	Sed1	(Liu et al., 2016b)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	1.3 g/L	100 g/L MC6	EG, BGL, CBHI, CBHII	Sed1	(Liu et al., 2016b)
<i>S. cerevisiae</i>	39.4 ± 2.3 g/L	200 g-DW/L cellulosic	BGL1, CBH2, EG2	a- agglutinin	(Matano et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	1.52 g/L	PASC	CBHI, CelA, BGL1	Aga1-	(Tang et al., 2017)
<i>S. cerevisiae</i> EBY100	4.3 g/L	10 g/L CMC and batch fed sucrose	celcca (Guirimand et al.), CA_C0911 (CBH)	Aga1- Aga2	(Li et al., 2017)
	2.9 g/L	xylose and 10 g/L			
	1.2 g/L	xylose and 10 g/L			
<i>S. cerevisiae</i> EBY100	1,138 mg/L	Avicel	celCCA, celCCE,	Aga1-	(Fan et al., 2016)
	1086 mg/L	PASC			
<i>S. cerevisiae</i> EBY100	8.61 g/L	20 g/L galactose and 10 g/ L CMC	celcca, CA_C0911	Aga1- Aga2	(Fan et al., 2016)
	9.97 g/L	20 g/L galactose and 10 g/L PASC			
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	2.9 g/L	10 g/L Avicel	EG2, CBH1, CBH2, BGL	Sed1	(Liu et al., 2017)
Commercial ethanol <i>S. cerevisiae</i>	(>50 g/L)	cheese whey and	BGL1, EG, CBH1, CBH2	Sed1	(Cunha et al., 2021)

3.2 工程 酒酵母催化半纤维素的生物转化

木聚糖是半纤维素的主要成分，是木质纤维素中含量第二大的多糖。它更容易通过预处理过程可降解

为纤维素单体,使其成为生物乙醇发酵的有吸引力的糖源。随着细胞表面展示工程的逐渐成熟和木糖代谢酶的异种表达,通过工程酿酒酵母可以实现木聚糖同化的一步化过程。通过引入木糖同化途径相关酶的编码基因,可以构建利用木糖的酿酒酵母。一系列用于水解阿拉伯木聚糖的多功能微型半纤维素体被成功构建。将由木糖还原酶(XR)、木糖醇脱氢酶(XDH)和 D-木糖激酶(XK)组成的 D-木糖利用途径整合到酿酒酵母 L2612 基因组中,并展示双功能迷你半纤维素体,得到的工程酿酒酵母可以将桦木木聚糖直接转化为乙醇(Sun et al., 2012b)。通过控制利用木糖的工程酵母的混合培养物,展示不同的半纤维素酶在细胞表面,可以有效地降解木聚糖以生产乙醇(Tabañag et al., 2018)。工业酿酒酵母具有良好的耐热性和对抑制剂的高抗性,被认为是在细胞表面展示半纤维素水解酶和优化木糖同化的强大宿主。利用工业菌株作为基因重组宿主可能更有利于乙醇的商业化生产。通过在重组酵母中引入木聚糖降解酶和表达的木糖同化酶,可以直接降解半纤维素底物,生产除乙醇以外的多种高附加值产品。

木糖醇是由木糖一步还原制得的高附加值戊糖醇。从纯化的 D-木糖中生产木糖醇需要昂贵的催化加氢过程。构建了一种利用重组木糖的酿酒酵母,可直接降解稻秆水解液中的半纤维素生产木糖醇。细胞表面显示技术与膜分离技术的结合进一步提高了木糖醇的产量,通过多酶共展示工程的酿酒酵母从膜分离的水解液中获得木糖醇产量增加了两倍(与未经膜分离的水解液相比)(Guirimand et al., 2016)。一种表达细胞质木糖还原酶的工程酿酒酵母被构建,其细胞表面共显示 β -D-葡萄糖苷酶、木糖糖苷酶和木聚糖酶,以木质硫酸盐浆(KP)为原料生产木糖醇(Guirimand et al., 2019)。这些结果为木质纤维素大规模生产木糖醇奠定了基础。

3.3 工程 酒酵母催化淀粉的生物转化

淀粉是 α -D-葡萄糖的聚合物,通常比纤维素更容易降解,在许多农业和工业废物中大量存在。利用表面显示工程酿酒酵母降解淀粉原料不仅可以生产生物燃料,而且可以提高食品工业的工艺质量。 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶共显示构建了酿酒酵母直接从玉米淀粉中生产乙醇,产率为理论值的 86.5%(Yamada et al., 2011)。 α -淀粉酶的活性依赖于锚定蛋白,基于絮凝蛋白体系的菌株的活性比基于凝集素体系的菌株高 40 倍(Shigechi et al., 2002)。大多数不溶性淀粉是部分不可降解的,学者们对此做出了一些尝试,如提高酶活性来提高淀粉利用效率的报道。成功构建了具有结构优化 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的二倍体酵母菌,用改性酵母发酵 100 g/L 原料淀粉,连续 23 个循环平均乙醇产量高达 1.61 g/L/h,产量为理论值的 76.6%(Yamakawa et al., 2012)。环糊精葡聚糖转移酶(CGTase)在酿酒酵母细胞表面被证明可以有效地水解淀粉,产生用于酵母发酵的葡萄糖和麦芽糖,并增强面包烘焙过程(Shim et al., 2007)。

4 当前的挑战和未来的前景

酵母细胞表面显示技术在过去的几十年里得到了迅速的发展,不同的显示系统被成功设计出来。目前广泛应用的酿酒酵母细胞表面展示工程在发展过程中存在一些瓶颈: 1)外源蛋白的低效生产导致工程酵母菌株作为生物催化剂时的活性较低; 2)随着循环利用次数的增加,工程酵母的活性下降幅度较大; 3)在提高酵母细胞的表面空间利用率方面还需要做更多的尝试; 4)目前的研究大多处于实验室水平,所构建的工程菌株是否适合工业化大规模生产还有待进一步研究; 5)关于工程酵母对许多抑制化合物的耐受性的分子和生理知识是有限的。

为了解决以上瓶颈,未来的研究可以从以下几个方面着手: 1)开发更多新颖的锚定蛋白来扩展细胞表面的可展示位点,设计新的结合细胞表面展示的基因编辑系统来增加靶基因的拷贝数,简化质粒转化过程; 2)应开发更多的包封工程酵母的生物材料,增加重复使用的次数,保持展示蛋白的活性,进一步扩大应用

领域。此外,诱导酿酒酵母自动絮凝的系统设计也有助于促进酵母的回收;3)通过合理系统的设计构建酿酒酵母细胞表面展示系统,包括调控多个靶蛋白在细胞表面展示的位置和比例以及多功能支架和靶蛋白在细胞表面的结合方式。探索有效和通用的连接子是提高细胞表面显示效率的必要条件;4)细胞表面展示技术与代谢工程、合成生物工程相结合,有助于提高工程酵母对混合底物的利用能力,减少副产物的产生,构建多功能的“超级酵母”;5)通过菌株诱变、定向进化、基因工程等手段提高工程菌株对发酵过程中抑制剂或有毒物质的耐受性。应在模拟工业生产环境中对工程酿酒酵母的性能进行评估。

5 结论

本文综述了细胞表面显示技术在农林废弃物生物炼制中的最新进展和提高酿酒酵母显示效率的策略。尽管对增加细胞表面显示蛋白的数量以及靶蛋白的高效表达和分泌有明显的要求,但未来有望有更多利用细胞表面显示的产品商业化。

参考文献

- An, J., Zhang, L., Li, L., *et al.* 2016. An Alternative Approach to Synthesizing Galactooligosaccharides by Cell-Surface Display of β -Galactosidase on *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(19), 3819-3827.
- Arnthong, J., Ponjarat, J., Bussadee, P., *et al.* 2022. Enhanced surface display efficiency of β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of cell wall protein-encoding genes YGP1 and CWP2. *Biochemical Engineering Journal*, 179, 108305.
- Aza, P., Molpeceres, G., de Salas, F., *et al.* 2021. Design of an improved universal signal peptide based on the α -factor mating secretion signal for enzyme production in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(7), 3691-3707.
- Bae, J.-H., Yun, S.-H., Kim, M.-J., *et al.* 2022. Secretome-based screening of fusion partners and their application in recombinant protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 663-673.
- Bamba, T., Inokuma, K., Hasunuma, T., *et al.* 2018. Enhanced cell-surface display of a heterologous protein using SED1 anchoring system in SED1-disrupted *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 306-310.
- Besada-Lombana, P.B., Da Silva, N.A. 2019. Engineering the early secretory pathway for increased protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 55, 142-151.
- Cha, Y., Li, W., Wu, T., *et al.* 2022. Probing the Synergistic Ratio of P450/CPR To Improve (+)-Nootkatone Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(3), 815-825.
- Cunha, J.T., Gomes, D.G., Romani, A., *et al.* 2021. Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous valorization of corn cob and cheese whey via ethanol production. *Energy Conversion and Management*, 243, 114359.
- Curran, K.A., Morse, N.J., Markham, K.A., *et al.* 2015. Short Synthetic Terminators for Improved Heterologous Gene Expression in Yeast. *ACS Synthetic Biology*, 4(7), 824-832.
- Deng, J., Wu, Y., Zheng, Z., *et al.* 2021. A synthetic promoter system for well-controlled protein expression with different carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 202.
- Dong, C., Qiao, J., Wang, X., *et al.* 2020. Engineering *Pichia pastoris* with surface-display minicellulosomes for carboxymethyl cellulose hydrolysis and ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 108.
- Fan, L.-H., Zhang, Z.-J., Mei, S., *et al.* 2016. Engineering yeast with bifunctional minicellulosome and cellodextrin pathway for co-utilization of cellulose-mixed sugars. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 137.
- Fan, L.-H., Zhang, Z.-J., Yu, X.-Y., *et al.* 2013. In vitro assembly of minicellulosomes with two scaffoldins on the yeast cell surface for cellulose saccharification and bioethanol production. *Process Biochemistry*, 48(3), 430-437.
- Felix, C.R., Ljungdahl, L.G. 1993. THE CELLULOSOME: The Exocellular Organelle of *Clostridium*. *Annual Review of Microbiology*, 47(1), 791-819.

- Fierobe, H.-P., Mingardon, F., Mechaly, A., *et al.* 2005. Action of Designer Cellulosomes on Homogeneous Versus Complex Substrates: CONTROLLED INCORPORATION OF THREE DISTINCT ENZYMES INTO A DEFINED TRIFUNCTIONAL SCAFFOLDIN*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16325-16334.
- Guirimand, G., Inokuma, K., Bamba, T., *et al.* 2019. Cell-surface display technology and metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhancing xylitol production from woody biomass. *Green Chemistry*, 21(7), 1795-1808.
- Guirimand, G., Sasaki, K., Inokuma, K., *et al.* 2016. Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* combined with membrane separation technology for xylitol production from rice straw hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), 3477-3487.
- Hong, S.-J., Kim, H.J., Kim, J.-W., *et al.* 2015. Optimizing promoters and secretory signal sequences for producing ethanol from inulin by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *Kluyveromyces marxianus* inulinase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(2), 263-272.
- Hoshida, H., Kondo, M., Kobayashi, T., *et al.* 2017. 5'-UTR introns enhance protein expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 241-251.
- Inokuma, K., Bamba, T., Ishii, J., *et al.* 2016. Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(11), 2358-2366.
- Inokuma, K., Hasunuma, T., Kondo, A. 2014. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 8.
- Inokuma, K., Kitada, Y., Bamba, T., *et al.* 2021. Improving the functionality of surface-engineered yeast cells by altering the cell wall morphology of the host strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14), 5895-5904.
- Inokuma, K., Kurono, H., den Haan, R., *et al.* 2020. Novel strategy for anchorage position control of GPI-attached proteins in the yeast cell wall using different GPI-anchoring domains. *Metabolic Engineering*, 57, 110-117.
- Jiang, Z.-B., Song, H.-T., Gupta, N., *et al.* 2007. Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 56(1), 35-39.
- Kondo, A., Ueda, M. 2004. Yeast cell-surface display—applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1), 28-40.
- Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., *et al.* 2009. Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. *Renewable Energy*, 34(5), 1354-1358.
- Li, J., Zeng, Y., Wang, W.-B., *et al.* 2022. Increasing extracellular cellulase activity of the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by engineering cell wall-related proteins for improved consolidated processing of carbon neutral lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 365, 128132.
- Li, Y.-J., Lu, Y.-Y., Zhang, Z.-J., *et al.* 2017. Co-fermentation of Cellulose and Sucrose/Xylose by Engineered Yeasts for Bioethanol Production. *Energy & Fuels*, 31(4), 4061-4067.
- Liang, Y., Si, T., Ang, E.L., *et al.* 2014. Engineered Pentafunctional Minicellulosome for Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6677-6684.
- Liu, W.-S., Pan, X.-X., Jia, B., *et al.* 2010. Surface display of active lipases Lip7 and Lip8 from *Yarrowia Lipolytica* on *Saccharomyces Cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 885-891.
- Liu, Z., Ho, S.-H., Hasunuma, T., *et al.* 2016a. Recent advances in yeast cell-surface display technologies for waste biorefineries. *Bioresource Technology*, 215, 324-333.
- Liu, Z., Ho, S.-H., Sasaki, K., *et al.* 2016b. Engineering of a novel cellulose-adherent cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic biofuel production. *Scientific Reports*, 6(1), 24550.
- Liu, Z., Inokuma, K., Ho, S.-H., *et al.* 2017. Improvement of ethanol production from crystalline cellulose via optimizing cellulase ratios in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(6), 1201-1207.
- Liu, Z., Inokuma, K., Ho, S.-H., *et al.* 2015. Combined cell-surface display- and secretion-based strategies for production of cellulosic ethanol with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 162.

- Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A. 2012. Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 108, 128-133.
- Matsumoto, T., Fukuda, H., Ueda, M., *et al.* 2002. Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4517-4522.
- Matsuoka, H., Hashimoto, K., Saijo, A., *et al.* 2014. Cell wall structure suitable for surface display of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 31(2), 67-76.
- Mingardon, F., Chanal, A., López-Contreras, A.M., *et al.* 2007. Incorporation of Fungal Cellulases in Bacterial Minicellulosomes Yields Viable, Synergistically Acting Cellulolytic Complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3822-3832.
- Phienluphon, A., Mhuantong, W., Boonyapakron, K., *et al.* 2019. Identification and evaluation of novel anchoring proteins for cell surface display on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3085-3097.
- Qi, K., Chen, C., Yan, F., *et al.* 2021. Coordinated β -glucosidase activity with the cellulosome is effective for enhanced lignocellulose
- Sasaki, Y., Mitsui, R., Yamada, R., *et al.* 2019. Secretory overexpression of the endoglucanase by *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR- δ -integration and multiple promoter shuffling. *Enzyme and Microbial Technology*, 121, 17-22.
- Shigechi, H., Uyama, K., Fujita, Y., *et al.* 2002. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting α -amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3), 179-187.
- Shim, J.-H., Seo, N.-S., Roh, S.-A., *et al.* 2007. Improved Bread-Baking Process Using *Saccharomyces cerevisiae* Displayed with Engineered Cyclodextrin Glucanotransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4735-4740.
- Song, C., Zhang, C., Zhang, S., *et al.* 2020. Thermochemical liquefaction of agricultural and forestry wastes into biofuels and chemicals from circular economy perspectives. *Science of The Total Environment*, 749, 141972.
- Sun, J., Shao, Z., Zhao, H., *et al.* 2012a. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 2082-2092.
- Sun, J., Wen, F., Si, T., *et al.* 2012b. Direct Conversion of Xylan to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Displaying an Engineered Minihemicellulosome. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3837-3845.
- Tabañag, I.D.F., Chu, I.M., Wei, Y.-H., *et al.* 2018. Ethanol production from hemicellulose by a consortium of different genetically-modified *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 89, 15-25.
- Tang, H., Wang, J., Wang, S., Shen, Y., *et al.* 2018. Efficient yeast surface-display of novel complex synthetic cellulosomes. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 122.
- Taylor, G. 2008. Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy*, 36(12), 4406-4409.
- Teymennet-Ramírez, K.V., Martínez-Morales, F., Trejo-Hernández, M.R. 2022. Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- Tsai, S.-L., DaSilva, N.A., Chen, W. 2013. Functional Display of Complex Cellulosomes on the Yeast Surface via Adaptive Assembly. *ACS Synthetic Biology*, 2(1), 14-21. doi:10.1021/sb300047u
- Tsai, S.-L., Oh, J., Singh, S., Chen, R., *et al.* 2009. Functional Assembly of Minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Surface for Cellulose Hydrolysis and Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6087-6093.
- Vaart, J.M.V.d., Biesebeke, R.t., Chapman, J.W., *et al.* 1997. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 615-620.
- Van Zyl, J.H.D., Den Haan, *et al.* 2016. Overexpression of native *Saccharomyces cerevisiae* ER-to-Golgi SNARE genes increased heterologous cellulase secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 505-518.
- Wang, X., Feng, X., Lv, B., *et al.* 2019. Enhanced yeast surface display of β -glucuronidase using dual anchor motifs for high-temperature glycyrrhizin hydrolysis. *AIChE Journal*, 65(9), e16629.

- Wang, Y., Li, X., Chen, X., *et al.* 2022. CRISPR/Cas9-mediated point mutations improve α -amylase secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foac033.
- Wieczorek, A.S., Martin, V.J.J. 2010. Engineering the cell surface display of cohesins for assembly of cellulosome-inspired enzyme complexes on *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 69.
- Xing, H., Zhu, L., Wang, P., *et al.* 2022. Display of receptor-binding domain of SARS-CoV-2 Spike protein variants on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *Frontiers in Immunology*, 13.
- Yamada, R., Yamakawa, S.-i., Tanaka, T., *et al.* 2011. Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(4), 393-396.
- Yamakawa, S.-i., Yamada, R., Tanaka, T., *et al.* 2012. Repeated fermentation from raw starch using *Saccharomyces cerevisiae* displaying both glucoamylase and α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(6), 343-347.
- Yang, S., Shen, J., Deng, J., *et al.* 2022. Engineering Cell Polarization Improves Protein Production in *Saccharomyces cerevisiae*. in: *Microorganisms*, Vol. 10.
- Yang, X., Tang, H., Song, M., *et al.* 2019. Development of novel surface display platforms for anchoring heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 85.
- Ye, M., Ye, Y., Du, Z., *et al.* 2021. Cell-surface engineering of yeasts for whole-cell biocatalysts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(6), 1003-1019.
- Ylinen, A., de Ruijter, J.C., Jouhten, P., *et al.* 2022. PHB production from cellobiose with *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 124.
- Zhang, Y., Min, Z., Qin, Y., *et al.* 2019. Efficient Display of *Aspergillus niger* β -Glucosidase on *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall for Aroma Enhancement in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), 5169-5176.