

利用 α 凝集素在酿酒酵母表面展示解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2

刘文山^{**}, 徐莉^{**}, 赵鹤云, 杨江科, 闫云君^{*}

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要:【目的】将解脂耶氏酵母胞外脂肪酶 Lip2 展示在酿酒酵母表面, 构建全细胞催化剂。【方法】采用 PCR 方法扩增得到解脂耶氏酵母胞外脂肪酶 Lip2 成熟肽编码基因 *LIP2*, 将其连接到 *AGA2* 基因的下流构建表面展示载体 pCTLIP2。分别以橄榄油、三丁酸甘油酯和对硝基苯酚棕榈酸酯 (pNPP) 为底物检测展示的脂肪酶酶活。在此基础上, 对野生菌及工程菌的酶学性质进行比较。【结果】展示 Lip2 的酿酒酵母重组菌株在半乳糖的诱导下, 表现出水解橄榄油、三丁酸甘油酯以及 pNPP 的活性, 20 诱导 72h 时酶活达到最高, 为 182 U/g 干细胞。对展示的 Lip2 的酶学性质研究表明, 其最适温度为 40^oC, 最适 pH 为 8.0, 温度稳定性比自由酶有所提高, 50^oC 温浴 4 h 后残余酶活为其最大酶活的 23.2%。以不同碳链长度的对硝基苯酚酯为底物检测其底物特异性, 结果显示其水解 C8, C12, C16 对硝基苯酚酯活性相近, 均远高于对硝基苯酚丁酸酯 (C4) 的水解酶活。【结论】对于 Lip2, α 凝集素系统是一个有效的展示系统, 利用该系统成功将 Lip2 展示在酿酒酵母表面, 从而构建了酿酒酵母全细胞催化剂, 该全细胞催化剂具有良好的潜在应用前景。

关键词: 脂肪酶; 解脂耶氏酵母; 酿酒酵母; 表面展示

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1543-06

脂肪酶 (Lipase, EC3.1.1.3) 是一种工业上广泛应用的水解酶类, 它可以催化三酰基甘油酯水解、酯化、转酯、氨解等反应。被广泛应用于洗涤剂、油脂与食品加工、有机合成、皮革与造纸工业等领域。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 胞外脂肪酶 Lip2 具备很高的水解、酯化、转酯活性^[1], 已被应用到酯合成、对映体拆分、生物柴油等领域^[2-4]。然而, 多数游离脂肪酶对温度及有机溶剂的稳定性较差, 反应产物分离困难, 这些都有待改进以适应不同工业生产条件的需求。利用微生物表面展示技术则可以较好地解决上述问题。微生物表面展示技术一方面可以作为脂肪酶蛋白质工程中的一种高通量筛选手段, 另一方面则可以作为全细胞催化剂, 它不仅具备传统固定化酶的诸多优点, 而且与传统固定化酶相比不需要复杂

的纯化过程。而目前国内外均没有表面展示 Lip2 的报道。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由于其安全、能对真核蛋白进行有效的分泌和折叠等优点, 其展示不同的蛋白已经被广泛应用到了越来越多的领域, 如蛋白质工程、细胞吸附、分子识别、全细胞催化、生物转化、生物治疗、信号转导、生物传感器和疫苗等^[5,6]。目前酿酒酵母中的多个细胞壁蛋白均被用于表面展示, 其中脂肪酶的表面展示主要是用 α 凝集素和 Flo1 作为载体蛋白^[7-9], 未见有 α 凝集素用于脂肪酶表面展示的报道。

本研究利用酿酒酵母表面蛋白 α 凝集素作为载体蛋白第一次将解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2 成功地展示在酿酒酵母表面, 同时还考察了最佳诱导时间以及最适

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA020203, 2007AA05Z417); 武汉市攻关项目 (200720422138)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

作者简介: **并列第一作者。刘文山 (1981-), 男, 湖北人, 博士研究生, 从事微生物脂肪酶分子生物学方面的研究。E-mail: lwenshan@yahoo.com.cn;

徐莉 (1971-), 女, 湖北人, 博士, 从事微生物分子生物学研究。E-mail: xuli1881@yahoo.cn

收稿日期: 2008-04-22; 修回日期: 2008-07-10

温度、最适 pH、温度稳定性、底物特异性等酶学性质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒：*Y. lipolytica* 菌株（中国科学院微生物所赠送），*Escherichia coli* DH5 α [*F*⁻ *endA1 hsdR17* (*r_K*⁻/*m_K*⁺) *supE44 thi-1 λ -recA1 gyrA96 Δ lacU169* (Φ 80*lacZDM15*)]，*S. cerevisiae* EBY100(a *GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4::HIS2 prb1 Δ 1.6R can1 GAL*)和表面展示质粒 pCT302 均由宾夕法尼亚大学 Eric T. Boder 教授赠送。

1.1.2 培养基：LB、YPD、SD 均按参考文献[10]配置，诱导培养基 SG+CAA (6.7 g/L YNB, 20 g/L 半乳糖, 5 g/L Casein)，橄榄油检测平板为含橄榄油乳化液及罗丹明 B 的 SG+CAA 平板，三丁酸甘油酯检测平板为含有三丁酸甘油酯的 SG+CAA 平板。解脂耶氏酵母发酵培养基如下：40 g/L 黄豆粉, 40 mL/L 橄榄油, 1 g/L KH₂PO₄, 0.5g/L Na₂HPO₄, 0.2g/L MgSO₄, 0.1g/L CaCl₂。

1.1.3 酶与试剂：限制性内切酶 *Nhe*、*Xho*，Taq 酶，T4 DNA 连接酶，凝胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品，质粒小量提取试剂盒为 tiangen 公司产品，YNB 为 Difco 公司产品，Casein、不同碳链长度的对硝基苯酚酯 (C4、C8、C12、C16)、酸洗玻璃珠均为 Sigma 公司产品。PCR 引物均在上海生工合成，其他普通生化试剂均为国产分析纯。

1.2 表面展示载体 pCTLIP2 的构建

将解脂耶氏酵母菌株接种至 YPD 培养基中 28 培养过夜后，采用酸洗玻璃珠法提取基因组 DNA^[11]。以该基因组为模板，设计引物 lip2s: 5'-CTTGCTAG-CGTGTACACCTCTACCGAGAC-3 (下划线为 *Nhe* 酶切位点)和 lip2a : 5'-CTTCTCGAGTTAGATACCA-CAGACACCCT-3 (下划线为 *Xho*I 酶切位点)，扩增成熟 Lip2 编码基因，PCR 条件为 94 5 min；94 1 min，56 1 min，72 1 min；30 个循环；72 10 min。PCR 产物和载体 pCT302 分别用 *Nhe* 和 *Xho* 酶切，纯化后用 T4 DNA 连接酶连接，将连接产物转化 *E. coli* DH5 α ，经含氨苄青霉素的 LB 平板筛选，挑取菌落抽提质粒，经 PCR 和酶切进行鉴定后，将阳性克隆送上海英骏公司测序，以确证其读码框是否正确。

1.3 酵母转化及筛选

将上述构建成功的质粒 pCTLIP2 转化酿酒酵母

EBY100，转化采用 LiCl 法^[12]。转化子利用不含色氨酸的 SD 选择性培养基进行筛选，将得到的转化子利用 lip2s 和 lip2a 为引物进行菌落 PCR 验证以验证质粒是否导入。

1.4 脂肪酶活性检测

1.4.1 脂肪酶酶活的平板检测：将重组酿酒酵母 EBY100- pCTLIP2 及对照 EBY100 接种到橄榄油检测平板 28 培养 4 d 后，紫外下观察荧光圈；同时将该克隆接种至三丁酸甘油酯检测平板上 28 培养 4 d 后白光下观察水解圈。

1.4.2 诱导表达：将重组酿酒酵母 EBY100-pCTLIP2 接种至 SD+CAA 培养基中培养过夜，离心后将菌体转移到 SG+CAA 培养基中，在 200 r/min，20 条件下诱导表达。分别诱导 24、36、48、60、72、84 h 取样测定脂肪酶活力，每个时间点测 2 次酶活，确定最佳诱导时间。

1.4.3 脂肪酶酶活的定量测定：取诱导表达一定时间的培养液 1 mL 离心后，用 20 μ L pH8.0 的 Tris-HCl 重悬作为全细胞催化剂。野生解脂耶氏酵母则 28 $^{\circ}$ C 培养 3 天后离心取上清测定脂肪酶活力。脂肪酶酶活的定量检测采用分光光度法^[13]，绘制以对硝基苯酚 (pNP) 浓度为横坐标，OD₄₁₀ 为纵坐标的标准曲线，得到 pNP 浓度计算公式为：pNP 浓度 (mmol/L) = (OD₄₁₀+0.0035) /13.396，一个酶活单位定义为每分钟释放 1 μ mol pNP 所需要的酶量。

1.5 酶学性质的检测

1.5.1 最适温度：通过测定不同温度 (20、25、30、35、40、45 和 50) 下的 pNPP 水解酶活以确定脂肪酶的最适温度。每个温度测 2 次酶活取平均值。

1.5.2 最适 pH：通过测定不同 pH (pH6~7 的磷酸钾缓冲液和 pH7~9 的 Tris-HCl 缓冲液) 下的 pNPP 水解酶活以确定脂肪酶的最适 pH。每个 pH 测 2 次酶活取平均值。

1.5.3 温度稳定性：将全细胞或酶液置于 50 水浴 1~4 h 后，测定其 pNPP 水解酶活以确定 50 下酶活随时间的变化趋势。酶活测定条件均为 pH8.0, 40。

1.5.4 底物的链长特异性：配制 10 mmol/L 的不同碳链长度的对硝基苯酚酯 (C4、C8、C12、C16) 的乙醇溶液，然后加入 4 倍体积的无水乙醇和 95 倍体积的 pH8.0 的 Tris-HCl 作为底物溶液，加入脂肪酶后 40 反应 5 min 后测定 OD₄₁₀。根据不同底物的水解酶活确定脂肪酶的链长特异性。

2 结果

2.1 表面展示载体 pCTLIP2 及重组菌株 EBY100-pCTLIP2 的构建

以解脂耶氏酵母基因组为模板 PCR 扩增得到 906 bp 的 Lip2 成熟肽编码序列, 将该序列克隆至表面展示载体 pCT302 中 AGA2 的 3'端, 使 AGA2-LIP2 融合基因处于 GAL1 启动子下游, 构建载体 pCTLIP2 以实现半乳糖诱导下的高效表达 (图 1)。由于酿酒酵母细胞壁蛋白 a 凝集素由 Aga1p 和 Aga2p 两个亚基通过二硫键连接组成, Aga1p 通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 共价结合到细胞壁上。因此表达的 Aga2p-Lip2 融合蛋白通过二硫键和 Aga1p 结合, 然后通过 Aga1p 共价结合到细胞壁上。此外, 酿酒酵母 EBY100 基因组中被整合了一个 GAL1-AGA1 开放阅读框, 以使 Aga2p-Lip2 融合蛋白能与充足的 Aga1p 结合。

2.2 重组酿酒酵母的平板酶活检测

之前大量工作^[14,15]均表明 pCT302 是一种非常有

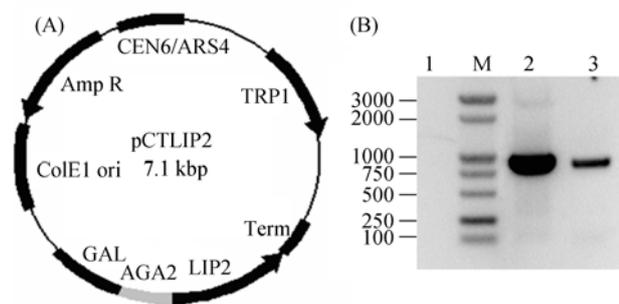


图 1 表面展示载体 pCTLIP2 的构建及重组酵母验证
Fig. 1 Construction of the plasmid pCTLIP2 and the detection of recombinant yeast. A: Construction of the plasmid pCTLIP2 for cell surface display of Lip2; B: Detection of EBY100 Transformed with pCTLIP2 and pCT302 by PCR. 1. pCT302; M. DNA Maker; 2,3 pCTLIP2.

效的表面展示载体, 为了检测展示的 Lip2 是否仍然保留脂肪酶的活性, 将重组酿酒酵母 EBY100-pCTLIP2 及对对照分别接种至橄榄油和三丁酸甘油酯检测平板上, 可以观察到 EBY100-pCTLIP2 有明显的水解圈, 而对照则没有。这表明展示在酿酒酵母表面的 Lip2 具有催化活性, 能够水解脂肪酶的天然底物橄榄油及三丁酸甘油酯 (图 2)。

2.3 最佳诱导时间

将重组酿酒酵母 EBY100-pCTLIP2 接种至 SG+CAA 培养基中进行诱导表达, 分别诱导 24、36、48、60、72、84 h 后用分光光度法检测酶活, 结果诱导 72 h 时酶活达到最大 (图 3-A)。最大酶活可达 182 U/g 干细胞。而培养液离心后的上清液则没有检测到酶活, 进一步说明脂肪酶是固定在细胞表面上的。

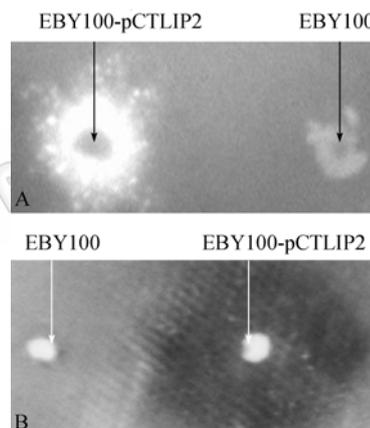


图 2 重组酿酒酵母的在橄榄油平板(A)和三丁酸甘油酯平板(B)的酶活检测
Fig. 2 Halo assay of recombinant yeast. A: Olive oil plate in UV; B: Tributyrin plate in white light on black background.

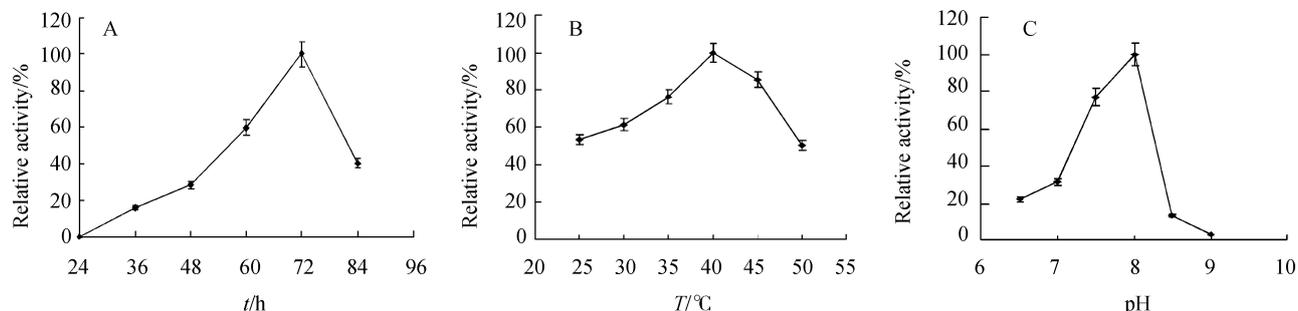


图 3 最佳诱导时间及酶的最适温度和最适 pH

Fig. 3 The best time for induction, and the optimum temperature and pH of displayed lipase Lip2. A: The best time for induction; B: The optimum temperature of displayed lipase Lip2; C: The optimum pH of displayed lipase Lip2.

2.4 表面展示脂肪酶的最适温度、pH 及温度稳定性由图 3-B、C 可知，表面展示的脂肪酶的最适温度为 40 ，最适 pH 为 8.0，而解脂耶氏酵母发酵后所得 Lip2 的最适温度和 pH 也分别为 40 和 pH8.0，与 Yu 等^[15]2007 年报道的 Lip2 的最适温度及 pH 一致。但是展示的脂肪酶 Lip2 的热稳定性比自由酶有所提高，50 温浴 4 h 后残余酶活为其最高酶活的 23.2%。而野生菌发酵所得 Lip2 在 50 温浴 4 h 后残余酶活基本为零，与 Yu 等报道 Lip2 在 45℃ 条件下温水浴 4 h 后残余酶活仅有 5% 的结果较一致，其温度稳定性均低于表面展示的 Lip2。

2.5 表面展示脂肪酶的底物特异性

分别用不同碳链长度的对硝基苯酚酯为底物检测了表面展示脂肪酶 Lip2 的酶活，结果显示其水解 C8、C12、C16 对硝基苯酚酯活性相近，均远高于对硝基苯酚丁酸酯（C4）的水解酶活（图 4），因此可以初步判断，展示的脂肪酶 Lip2 的最适底物为中链和长链的脂肪酸酯。而野生菌发酵所得 Lip2 对 C12、C16 对硝基苯酚酯活性相近，均远高于水解 C4 和 C8 对硝基苯酚酯的酶活，此结果与 Yu 等的报道一致，Yu 等通过测定 Lip2 对 C4-C20 的脂肪酸甲酯的水解酶活发现其最适碳链长度为 C12-C16^[16]。可见，表面展示的 Lip2 比野生菌发酵所得 Lip2 有更广泛的底物适应性。

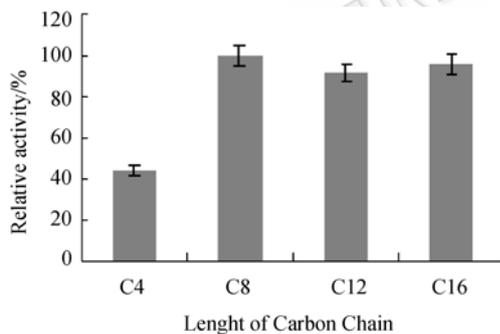


图 4 表面展示脂肪酶 Lip2 的底物特异性
Fig. 4 The substrate specificity of displayed lipase Lip2.

3 讨论

酿酒酵母作为最常用的表面展示宿主之一，它不仅具备安全、遗传背景较清晰等优点，而且作为真核生物，能对外源蛋白进行加工、折叠和翻译后修饰；细胞较大，可以提高 FACS 的筛选效率。已经有多种脂肪酶在酿酒酵母中进行了表面展示，但是成功展示

的脂肪酶只有米根霉脂肪酶（*Rhizopus oryzae* lipase, ROL）^[7, 8]和南极假丝酵母（*Candida antarctica*）脂肪酶 B^[9]。利用酿酒酵母的载体蛋白也可以在毕赤酵母（*Pichia pastoris*）中展示目的蛋白，目前只有 3 种脂肪酶，即 ROL^[17]和解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip7，Lip8^[18]均利用 Flo1 在毕赤酵母中实现了表面展示，但是 Tanino 等发现 ROL 展示在毕赤酵母表面时的活力只有其展示在酿酒酵母表面时的 25%^[17]，可能是融合蛋白在毕赤酵母中表达量过高所致。因此本文采用酿酒酵母作为宿主进行表面展示。

酿酒酵母表面展示所用的载体蛋白有两类，一类是 C 端锚定的载体蛋白，主要是含有 GPI 锚定信号的细胞壁蛋白，如 α 凝集素^[7]，Cwp2p^[19]和 Flo1 的 C 端部分^[20]等，但是这类载体蛋白容易使活性中心位于 C 端的酶失去活性，如 *Humicola lanuginosa* 脂肪酶和 *Fusarium solani* 角质酶利用 α 凝集素为载体蛋白在酿酒酵母表面展示后没有脂肪酶活性^[21]，ROL 利用 α 凝集素为载体蛋白在酿酒酵母表面展示所得酶活仅为 4.1U/g 干细胞^[7]。另一类则是 N 端锚定的载体蛋白，主要有 α 凝集素^[14]、Flo1 的 N 端部分^[8]和 Pir 蛋白^[22]。这类载体蛋白一般不会妨碍活性中心位于 C 端的酶类的活性，如利用 Flo1 的 N 端部分展示的 ROL 酶活则远高于利用 α 凝集素为载体蛋白展示的 ROL^[7, 8]。目前这 3 种蛋白中只有 Flo1 被用于展示脂肪酶。但是 Flo1 非共价结合在细胞壁上，易从细胞壁上解离^[23]。此外，Pir 虽然是共价结合到细胞壁上，但是也不稳定，容易被弱碱从细胞壁上解离^[24]，只有 α 凝集素是共价结合在细胞壁上并且相对不容易从细胞壁上解离^[14]。因此，本研究采用 α 凝集素作为载体蛋白展示活性中心位于 C 端的 Lip2，结果展示在酿酒酵母表面的 Lip2 保留了水解脂肪酶天然底物橄榄油以及三丁酸甘油酯的能力，其水解酶活可以达到较高的水平，为 182 U/g 干细胞。而展示在酿酒酵母表面的 Lip2 比自由酶具有更好的温度稳定性可能是由于酿酒酵母细胞壁表面结构对 Lip2 有保护作用，而具有比自由酶更广泛的底物适应性则可能是由于蛋白融合或者酿酒酵母中的糖基化对 Lip2 结构造成了一定的影响。其详细机制还有待进一步研究。

由于展示了 Lip2 的酿酒酵母全细胞具备上述特性，因此可能更适应催化底物成分复杂多样的反应，如利用餐饮废油生产生物柴油等。同时表面展示酶蛋白作为全细胞催化剂可以类似于固定化酶回收方便，

而相对于固定化酶而言又省去了复杂的酶纯化步骤^[5, 6]。因此, 本文为进一步开发表面展示脂肪酶作为全细胞催化剂催化制备生物柴油等奠定了较好的技术基础。此外, 利用本研究为基础还可以进行脂肪酶 Lip2 的定向进化以及纯化等工作。

参 考 文 献

- [1] Fickers P, Benetti PH, Wache Y, *et al.* Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*, 2005, 5 (6-7): 527-543.
- [2] He XL, Chen BQ, Tan TW. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, 18 (4-6): 333-339.
- [3] Guieysse D, Sandoval G, Faure L, *et al.* New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron Asymmetry*, 2004, 15 (22): 3539-3543.
- [4] Deng L, Tan TW, Wang F, *et al.* Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida sp.* 99-125. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2003, 105 (12): 727-734.
- [5] Ueda M, and Tanaka A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol Adv*, 2000, 18 (2): 121-140.
- [6] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display--applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64 (1): 28-40.
- [7] Washida M, Takahashi S, Ueda M, *et al.* Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56 (5-6): 681-686.
- [8] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda O, *et al.* Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain. *Applied Environ Microbiol*, 2002, 68 (9): 4517-4522.
- [9] Tanino T, Ohno T, Aoki T, *et al.* Development of yeast cells displaying *Candida Antarctica* lipase B and their application to ester synthesis reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75 (6): 1319-1325.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Babour A, Beckerich JM, Gaillardin C. Identification of an UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2004, 21 (1): 11-24.
- [12] Ito H, Fukuda Y, Murata K, *et al.* Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 1983, 153 (1): 163-168.
- [13] Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*, 1979, 138 (3): 663-670.
- [14] Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat biotechnol*, 1997, 15: 553-557.
- [15] Parthasarathy R, Bajaj J, Boder ET. An Immobilized Biotin Ligase: Surface Display of Escherichia coli BirA on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*, 2005, 21 (6): 1627-1631.
- [16] Yu MG, Qin SW, Tan TW. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem*, 2007, 42 (3): 384-391.
- [17] Tanino T, Fukuda H, Kondo A. Construction of a *Pichia pastoris* Cell-Surface Display System Using Flo1p Anchor System. *Biotechnol Prog*, 2006, 22 (4): 989-993.
- [18] Jiang ZB, Song HT, Gupta N, *et al.* Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2007, 56 (1): 35-39.
- [19] Breinig F, Schmitt MJ. Spacer-elongated cell wall fusion proteins improve cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58 (5): 637-644.
- [20] 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.
- [21] Schreuder MP, Mooren ATA, Toschka HY, *et al.* Immobilizing proteins on the yeast cells. *Trends of Biotechnol*, 1996, 14 (4): 115-120.
- [22] Andres I, Gallardo O, Parascandola P, *et al.* Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of *Bacillus sp.* BP-7 xylanase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(6): 690-697.
- [23] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, *et al.* Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol*, 1997, 179 (15): 4929-4936.
- [24] Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, *et al.* Pir Proteins of *Saccharomyces cerevisiae* Are Attached to β -1,3-Glucan by a New Protein-Carbohydrate Linkage. *J Biol Chem*, 2006, 281 (17): 11523-11529.

Cell surface display of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Saccharomyces cerevisiae* with a-agglutinin as carrier protein

Wenshan Liu^{**}, Li Xu^{**}, Heyun Zhao, Jiangke Yang, Yunjun Yan^{*}

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: [Objective] In order to display extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* on the surface of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for whole cell catalysts. [Methods] The mature Lip2 encoding fragment was amplified from *Yarrowia lipolytica* total DNA, and was inserted into the 3 terminal of AGA2 to give the plasmid pCTLIP2 for surface display of Lip2. Olive oil, tributyrin and p-nitrophenyl palmitate (pNPP) were used as substrates to measure lipase activity. Moreover, the characterization of displayed lipase and its free form was analyzed. [Results] The surface displayed lipase was confirmed to be active towards olive oil, tributyrin and p-nitrophenyl palmitate (pNPP), and reached its highest expression level at 182 U/g dry cell after induced by galactose for 72h. The optimum temperature of cell surface displayed Lip2 was 40 °C. After incubated at 50 °C for 4h, the surface displayed lipase retained 23.2% of its full activity, improved a little compared to free Lip2. The surface displayed lipase showed a preference to medium-chain and long-chain fatty acids p-nitrophenyl esters (C8-C16). [Conclusion] The cell surface display system based on a-agglutinin is an effective system for displaying Lip2, and the whole cell EBY100-pCTLIP2 will be probably suited to a different range of applications.

Keywords: lipase; *Yarrowia lipolytica*; *Saccharomyces cerevisiae*; surface display

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA020203, 2007AA05Z417), and the Wuhan Projects of Science and Technology (200720422138)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

** Those authors contributed equally to this work.

Received: 22 April 2008/ Revised: 10 July 2008

科学出版社新书推介 (2008-09)

“十一五”国家重点图书出版规划项目
应用生物技术大系



生物技术产业化——从实验室到工厂到 (译)

Technology Transfer in Biotechnology
From Lab to Industry to Production

〔德〕U 克拉格主编 曹竹安主译 高福主校著

978-7-03-021732-5 ¥ 58.00 2008年9月出版



本书结合生物化工领域前沿进展, 涵盖了工业生物技术工程化或产业化主要单元的共性技术, 展示了近年来一些取得重大进展并有重要应用前景的工业生物技术成果及发展趋势。主要内容包括微生物发酵及相关反应器开发, 阐述了高压发酵中传氧、传热以及二氧化碳抑制和动力、能量成本的核算理论; 从理论阐述到应用实例, 展示了平行反应器系统、膨胀床吸附的生物化学工程研究技术; 并进而概述了进行微生物发酵代谢流分析的方法和进展。酶催化及酶膜反应器: 论述了生物学原理在不对称催化中的应用, 比较了不同辅因子再生体系的优缺点, 阐述了酶催化的区域选择性和立体选择性, 结合 Degussa 开发的膜反应器概述了其研究进展及应用实例。针对工业生物技术产业下游处理, 阐述了厌氧废水处理工程问题和工艺进展, 比较了不同萃取体系用于初级和次级代谢产物分离的进展和发展趋势。

本书可作为分子生物学、生物工程、生物技术以及医学、药学等领域的高等院校和科研院所的教学和科研人员的参考用书。部分章节。