



南极假丝酵母脂肪酶 A 的表面展示及酶学性质

严慧玲 蓝东明 王永华* 杨博

(华南理工大学 轻工与食品学院 广东 广州 510640)

摘要: 采用 a 凝集素作为载体蛋白, 首次将南极假丝酵母脂肪酶 A 展示在酿酒酵母细胞表面, 通过 MD 平板筛选获得表面展示型的 CALA 酵母工程菌株。免疫荧光检测显示 CALA 被成功展示在酵母细胞壁表面, 重组子经诱导后能在三丁酸甘油酯板上形成透明圈, 说明展示的 CALA 具有活性。重组酵母在液体培养基培养 72 h, 活性达到最高, 为 80.4 U/g 干细胞。酿酒酵母展示的 CALA 最适温度及 pH 值为 70 °C 和 pH 8.0。经 50 °C 保温 2 h, 仍含有 60% 水解酶活力。展示的 CALA 在 pH 7.0 和 pH 8.0 溶液中比较稳定。经 DMSO 处理 2 h, 展示的 CALA 仍保持 70% 的活性。以上结果表明酵母展示的 CALA 可作为一种有潜质商业用途的全细胞催化剂。

关键词: 南极假丝酵母脂肪酶 A, 酵母表面展示, 全细胞催化, 酶学性质

Cell surface display of *Candida antarctica* lipase A by *Saccharomyces cerevisiae* and its practical properties

YAN Hui-Ling LAN Dong-Ming WANG Yong-Hua* YANG Bo

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: Lipase A gene of *Candida Antarctica* (cala) was displayed for the first time on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* using a-agglutinin as an anchor protein, recombinant strains were screened on minimal dextrose plates. Results of immunofluorescence microscopy assay revealed that the CALA-a-agglutinin fusion proteins were successfully anchored on the *S. cerevisiae* cell surface. Furthermore, yeast displayed CALA produced halo on the MD plate containing tributyrin, suggesting that CALA was active on the cell wall. Yeast displayed CALA displayed maximal activity after 72 h cultivation in YNB-CAA medium, with an activity of 80.4 U/g dry cells. The optimal temperature and pH for yeast displayed CALA were 70 °C and pH 8.0, respectively. It remained 60% of activity after incubation at 50 °C for 2 h and the lipase still remained 70% activity after incubated in buffer containing

30% dimethyl sulfoxide for 2 h. Those properties make yeast displayed CALA great potential for industrial application.

Keywords: *Candida antarctica* Lipase A, Yeast surface display, Whole-cell biocatalyst, Properties of enzyme

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一类在食品及医药等行业应用广泛的酶类^[1], 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。南极假丝酵母脂肪酶 A (*Candida antarctica* lipase A)^[2], 是现有研究中唯一一种对甘油三酯 sn-2 位显示出偏好的脂肪酶^[3], 它对位阻醇(包括二级和三级醇), 表现出较高的活性^[4], 可以水解一些叔丁酯的保护氨基酸, 这意味着 CALA 能催化绝大多数脂肪酶所不能催化的多分支和大体积底物。CALA 不仅具备了与南极假丝酵母脂肪酶 B^[5] (*Candida antarctica* lipase B)同样的高温稳定性和有机溶剂耐受性, 而且比 CALB 表现出更高的界面活性, 具有很高的工业潜在价值。

应用游离态脂肪酶作为催化剂, 酶的稳定性差、不可循环利用, 而商业化的固定化脂肪酶价格昂贵, 应用于工业化大生产成本过高。自 Smith 首次将外源蛋白展示在噬菌体表面从而开创表面展示技术以来, 微生物表面展示技术发展十分迅速, 已被用于酿酒酵母表面展示等领域^[6-7]。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞较大、细胞壁坚硬, 且遗传背景清晰, 是制备酵母表面展示最常用的真核宿主之一。目前已有多种工业酶(如脂肪酶、纤维素酶等)被成功展示在酿酒酵母细胞表面^[8]: Seizabur shiraga^[9]将米根霉脂肪酶(ROL)固定在酿酒酵母表面, 发现酶的催化活性比目前商业出售的酶高出 3-6 倍, 证明其可以作为生产酯酶的一个行之有效的办法; Michiko Kato^[10]等的研究发现酵母表面展示 CALB 水解 pNPB 的比酶活力是游离态 CALB 的 25 倍; Kond 等^[11]改用絮凝酵母 YF207 作为宿主菌株以可溶性淀粉为原料生产乙醇, 具有很高的生产率, 并且在乙醇发酵过程中保持絮凝的能力, 而把 CALA 展示在酿酒酵母表面, 并对其进行酶学性质的研究还没有被报道。

本文采用表面展示技术, 首次将南极假丝酵母脂肪酶 A 展示在酿酒酵母细胞表面, 筛选出高活性的菌株, 对其进行发酵表达, 并对表面展示脂肪酶 A 的酶学性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 酿酒酵母重组菌株 EBY100/pYD1-CALA, 阴性对照菌株 EBY100/pYD1, 阳性对照菌株 GS115/pGAPZaA-CALA (本实验室构建)。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、表面展示质粒 pYD1 购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基: YNB-CAA 培养基: 0.67% YNB (含硫酸铵), 0.5%酪氨酸, 2%葡萄糖或半乳糖; MD 平板: 0.67% YNB (含硫酸铵), 2%葡萄糖, 0.01%亮氨酸, 1.5%琼脂粉; 三丁酸甘油酯检测平板: 0.67% YNB (含硫酸铵), 2%半乳糖, 0.01%亮氨酸, 1.5%琼脂粉, 2%三丁酸甘油酯乳化液(三丁酸甘油酯: 2%聚乙烯醇=1:3)。

1.1.3 试剂: 小鼠抗 His 抗体购于默克公司, FITC 标记兔抗小鼠二抗购于鼎国公司, PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其他普通生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建及转化酿酒酵母: 采用 PCR 方法从质粒 BSK-*cala* 上获得目的基因 *cala* (大小为 1 347 bp), 使用的引物为: 上游引物序列: 5'-CCGG AATTCGCTCCAGCCGCCGAACTTTAG-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物序列: 5'-CCGC TCGAGTGGAGGGGTAATTGGTCCAAATG-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。PCR 产物经 *Xho* I、*EcoR* I 双酶切后连入 pYD1, 获得重组载体 pYD1-*cala*, 详细实验操作见参考文献[12]。重组质粒经酶切验证正确后, 转入酿酒酵母 EBY100 细胞基因组中,

涂布 MD 平板, 30 °C 培养 48 h 至克隆出现。转化步骤详见 Invitrogen S.c.EasyComp. Transformation Kit。

1.2.2 外源基因在酿酒酵母中的诱导表达: 将酿酒酵母重组菌株 EBY100/pYD1-CALA 接种单个菌落到 10 mL 含 20 g/L 葡萄糖的 YNB-CAA 液体培养基中, 同时将酿酒酵母重组菌株 EBY100/pYD1 作阴性对照, 30 °C、250 r/min 培养过夜。当 OD_{600} 达到 2–5 时, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。随后用含 20 g/L 半乳糖的 YNB-CAA 液体培养基悬浮细胞沉淀, 使 $OD_{600}=0.5$ 。20 °C、250 r/min 恒温摇床培养细胞。

1.2.3 表面展示 CALA 的制备: 参照方法 1.2.2, 更换含 20 g/L 半乳糖的 YNB-CAA 培养基后, 在 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 取样, 每次取样量以 $OD_{600}=0.5$ 时 4 mL 细胞所含的细胞量为恒定值, 测定 pNPC 水解酶活(测定条件均为 pH 8.0 和 70 °C), 以优化最佳诱导展示时间。在最佳诱导时间下 6 000 r/min 离心, 10 min 收集菌体, 用 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 洗涤菌体 3 次后重悬菌体, 使 $OD_{600}=2.0$, 即为全细胞催化剂。

1.3 脂肪酶活性检测

1.3.1 平板法检测脂肪酶酶活: 将重组酿酒酵母重组菌株 EBY100/pYD1-CALA 和空载体对照酿酒酵母菌株 EBY100/pYD1 接种到三丁酸甘油酯检测平板上, 28 °C 培养 4 d 后观察水解圈。

1.3.2 免疫荧光检测: 将重组酿酒酵母转接至培养基中培养一定时间后离心(培养方法参照 1.2.2), 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后用 250 μ L 含 1 g/L BSA 的 PBS 缓冲液重悬并加入 1 μ g 抗 His 抗体后冰浴 30 min, 离心并用 PBS 缓冲液洗涤后重悬入含 1 g/L BSA 的 PBS 缓冲液中, 加入 1 μ g FITC 标记抗小鼠 IgG 后冰浴 30 min。离心并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后置于荧光显微镜下观察。

1.3.3 酿酒酵母表面展示脂肪酶活力测定方法及酶活力单位的定义: 酶活力测定采用分光光度法^[13]。以 13.2 mol/L 的 (p-Nitrophenyl caprylate) pNPC 为底物, $OD_{600}=2.0$ 时 10 μ L 酶液所含的细胞量为统一标准的相应量的粗酶液, 反应总体积为 200 μ L。测定步骤: 先加入 80 μ L 的 20 mmol/L pH 8.0 的

Tris-HCl 缓冲液, 再加入 10 μ L 的酶液, 将酶标板置于适当的温度预热 5 min, 然后加入 10 μ L 的底物溶液, 于同一温度反应 5 min, 反应结束后立即加入 100 μ L 异丙醇终止反应, 在 405 nm 处测量光吸收值。1 个酶活单位定义为每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚(pNP)所需要的酶量。

1.4 酶学性质测定

1.4.1 最适温度及温度稳定性: 通过测定不同温度(30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C、100 °C)下的 pNPC 水解酶活以确定脂肪酶的最适催化温度。为了进一步测定表面展示脂肪酶的温度稳定性, 将全细胞悬浮液(用 0.05 mol/L, pH 8.0 Tris-HCl 重悬)分别在不同温度(50 °C、60 °C、70 °C、80 °C)下放置 2 h, 每 30 min 取 1 次样, 测定 pNPC 水解酶活。酶活测定条件均为 pH 8.0 和 70 °C。测量的每个样品测 3 次酶活取平均值, 重复 3 次。

1.4.2 最适 pH 及 pH 稳定性: 通过测定不同 pH (pH 4.0、pH 5.0 为 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 6.0、pH 7.0 为 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 8.0 为 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0 为 0.05 mol/L Gly-NaOH 缓冲液)下的 pNPC 水解酶活以确定脂肪酶的最适 pH。测量的每个样品测 3 次酶活取平均值, 重复 3 次。为了进一步测定全细胞 pH 稳定性, 将酶液在不同 pH 的缓冲液(pH 4.0、pH 5.0 为 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 6.0、pH 7.0 为 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 8.0 为 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0 为 0.05 mol/L Gly-NaOH 缓冲液)中放置 24 h, 然后在 70 °C、pH 8.0 的条件下测定剩余酶活。测量的每个样品测 3 次酶活取平均值, 重复 3 次。

1.4.3 有机溶剂耐受性: 将最佳诱导时间下的酶若干管各 100 μ L 离心, 沉淀分别溶于 70 μ L 的 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0)中, 分别用甲醇、乙醇、异丙醇、DMSO 补齐体积至 100 μ L, 混匀后于常温放置 2 h, 每 30 min 取样 1 次, 离心收集菌体, 用 1 mL pH 8.0 缓冲液洗涤 1 次, 离心弃上清后用 100 μ L pH 8.0 缓冲液重悬, 按标准细胞量量取相应酶液加入酶活反应体系, 70 °C 反应。对样品不加任何的有机溶剂。测量的每个样品测 3 次酶活取平均值, 重复 3 次。

2 结果

2.1 表面展示 CALA 载体的构建及活性菌株的筛选

2.1.1 表面展示载体 pYD1-*cala* 的构建: 以质粒 BSK-*cala* 为模板 PCR 扩增得到 1 347 bp 的 *cala* 成熟肽编码序列(不含自身信号肽), 克隆到 PYD1 载体上, 构建载体 pYD1-*cala* 以实现在半乳糖诱导下的高效表达。重组质粒经双酶切(*Xho* I、*Eco*R I)鉴定正确(图 1)。为了与载体 C 端的 His 标签融合表达, 将 *cala* 基因序列的终止密码子去除, His 标签可用于免疫荧光检测。载体的 N 端, Aga2p 与 CALA 融合并通过两对二硫键与 EBY100 酵母表面蛋白 Aga1p 连接, 使 Aga2p-CALA 融合蛋白共价结合到细胞壁上。

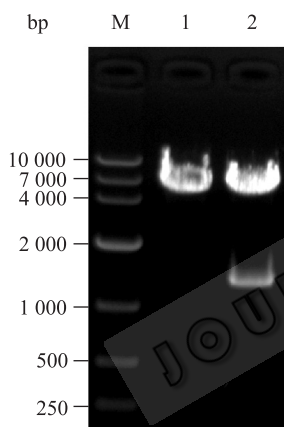


图 1 表面展示质粒 pYD1-*cala* 的酶切验证

Fig. 1 Digestion of pYD1-*cala*

Note: M: 10 kb DNA marker; 2: pYD1 digested by *Xho* I/*Eco*R I; 3: pYD1-*cala* digested by *Xho* I/*Eco*R I.

2.1.2 CALA 活性菌株的筛选: 为了检测 CALA 是否被展示在酵母细胞壁表面, 对重组酵母细胞进行免疫荧光分析, 结果如图 2A 所示, 酵母表面展示的 CALA 由于与抗 His 抗体及 FITC 标记的二抗的结合, 在荧光显微镜底下可观察到细胞壁表面显绿色荧光, 而对照则没有明显荧光。这表明 CALA 成功地展示到 EBY100 酵母细胞表面。在三丁酸甘油酯平板上可以观察到 EBY100/pYD1-CALA 周围有明显的水解圈, 说明表面展示的 CALA 具有水解三丁

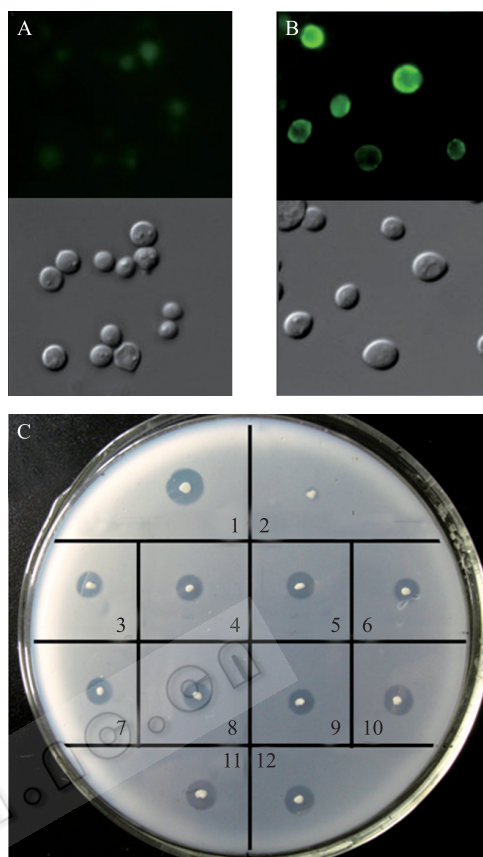


图 2 脂肪酶表面展示的荧光及活性检测

Fig. 2 Confirmation of successful surface display of active CALA

Note: A,B: Differential interference micrographs (lower) and immunofluorescence micrographs (upper) of EBY100 (A) and EBY100/pYD1-CALA (B); C: Halo assay of displayed CALA (Tributyrin plate). 1: GS115/pGAPZαA-CALA; 2: Control cell (EBY100/ pYD1); 3-12: EBY100/pYD1-CALA.

酸甘油脂的活性(图 2B), 但透明圈比阳性对照的 GS115/pGAPZαA-CALA (分泌表达)要小, 而对照则无明显水解圈。

2.2 表面展示 CALA 细胞的制备

参照方法 1.2.3, 在 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 取样, 每次取样量以 $OD_{600}=0.5$ 时 4 mL 细胞所含的细胞量为恒定值, 测定 pNPC 水解酶活, 结果如图 3 所示。确定最适发酵时间为 72 h, 此时酶活达到 80.4 U/g 干细胞。CALA 菌株在 YPD 中发酵 72 h 后, 6 000 r/min, 10 min 离心, 收集菌体, 用 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 洗涤 3 次后重悬菌体, 使 $OD_{600}=2.0$, 即为全细胞催化剂。

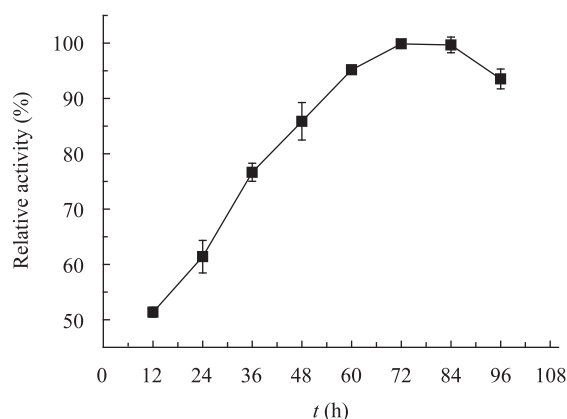


图3 表面展示脂肪酶酶活随时间变化曲线

Fig. 3 Time course curve of lipase activity

2.3 酶学性质测定

2.3.1 最适温度及温度稳定性: 如图4A所示, 表面展示脂肪酶在 70 °C 时酶活达到最大, 60 °C 和 80 °C 是酶活保持 70% 以上的活性, 但高于 90 °C, 酶活迅速下降。为了进一步测定表面展示脂肪酶的温度稳定性, 将全细胞悬浮液(用 0.05 mol/L, pH 8.0 Tris-HCl 重悬) 分别在不同温度 (50 °C、60 °C、70 °C、80 °C) 下放置 2 h, 每 30 min 取 1 次样, 测定 pNPC 水解酶活, 酶活测定条件均为 pH 8.0 和 70 °C。结果如图 4B 所示, 水浴 2 h 后 50 °C、60 °C 处理的样品的酶活仍保持在 50% 以上, 80 °C 处理的样品几乎没有酶活; 在 70 °C 保温, 展示酶的半衰期为 1 h。结果表明, 酿酒酵母表面展示 CALA 具有较

好的热稳定性。

2.3.2 最适 pH 及 pH 稳定性: 如图 5A 所示, 展示的脂肪酶在弱碱环境具有较好的活性, 在 pH 值为 8.0 时, 活性最高。pH 值为 7.0 时, 展示酶保持超过 80% 的酶活性。在酸性环境下, 酶活都低于最高酶活的 40%。将酶液分别在不同 pH 的缓冲液 (pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0) 中放置 24 h 后, 在 70 °C、0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的条件下测定剩余酶活, 以测定表面展示 CALA 的 pH 稳定性, 结果如图 5B 所示。其在 pH 6.0–8.0 之间的缓冲液中处理 24 h 后仍保持 80% 以上的水解活力, pH 8.0 时酶的稳定性最大, 之后酶的稳定性呈下降趋势。该酶在酸性条件下稳定性较差, 在 pH 值为 4.0 时基本检测不到活性。由此表明, 酿酒酵母表面展示 CALA 在弱碱性条件下具有较好的稳定性。

2.3.3 有机溶剂耐受性: 为了进一步检测酿酒酵母表面展示 CALA 的有机溶剂稳定性, 分别以 30% 甲醇、乙醇、异丙醇、DMSO 与酿酒酵母表面展示 CALA 混匀后于常温放置 2 h, 每 30 min 取样 1 次, 结果发现酿酒酵母表面展示 CALA 具备较好的 DMSO 稳定性, 2 h 后残余酶活为 70%。但甲醇、乙醇、异丙醇对酿酒酵母表面展示 CALA 存在明显的抑制作用。用这 3 种有机溶剂处理全细胞 1 h 后, 酶活均降至 20% 以下。

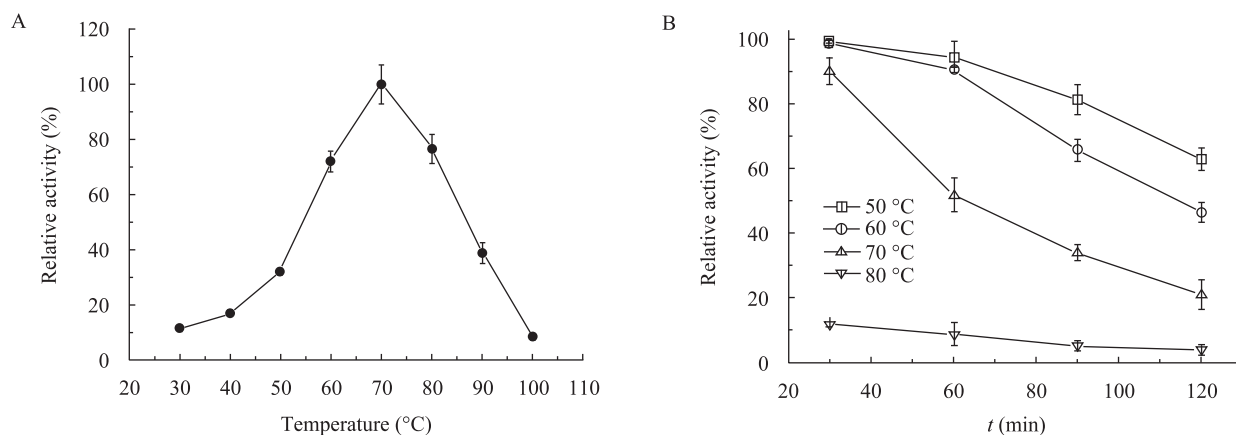


图4 表面展示脂肪酶的最适温度和温度耐受性

Fig. 4 Optimal temperature and Thermostability of CALA

Note: A: Effect of temperature on the activity of the displayed lipase; B: Thermostability of CALA displayed at yeast cell surface at different temperature.

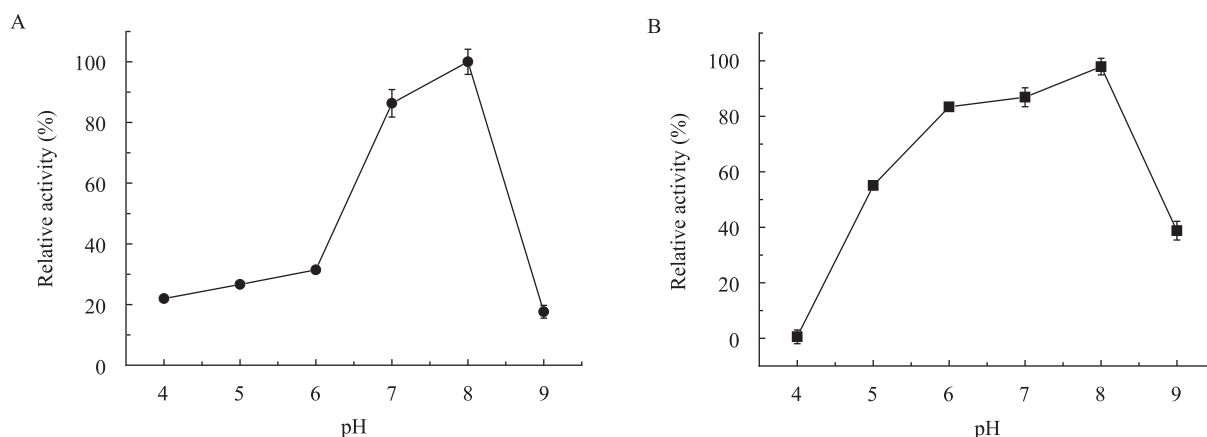


图 5 表面展示脂肪酶的最适 pH 和 pH 耐受性

Fig. 5 Optimal pH and The pH stability of CALA displayed at yeast cell surface

Note: A: Effect of pH on the activity of the displayed lipase; B: The pH stability of CALA displayed at yeast cell surface.

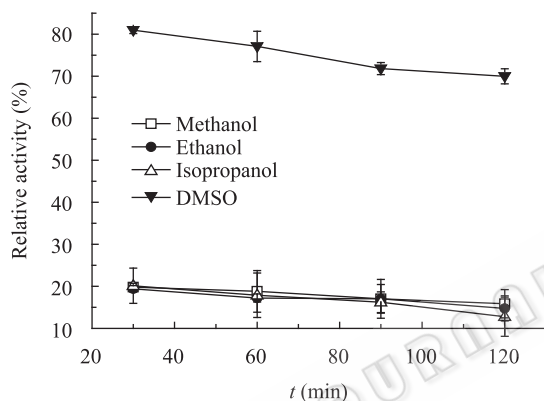


图 6 酿酒酵母表面展示脂肪酶 CALA 的有机溶剂耐受性

Fig. 6 Solvent tolerance of the lipase of CALA displayed at yeast cell surface

3 讨论

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, 用其展示不同的蛋白已经被广泛应用到了越来越多的领域。酿酒酵母表面展示技术的关键是用于锚定的细胞壁蛋白, 目前主要将 Flo1 作为载体蛋白^[14]用于脂肪酶表面展示。由于 Flo1 非共价结合在细胞壁上, 易从细胞壁上解离^[15], 只有 α 凝集素是共价结合在细胞壁上且相对不易从细胞壁上解离^[16], 故本文采用 α 凝集素作为载体蛋白, 首次将南极假丝酵母脂肪酶 A 展示在酿酒酵母细胞表面, 获得水解酶

活为 80.4 U/g 干细胞的全细胞催化剂。

展示的 CALA 在弱碱性条件下具有很好的稳定性和水解活性, 与 Pfeffer^[17]等报导的游离态 CALA 相比, 其水解对硝基苯酚丁酸酯的最适反应 pH 值为 8.0, 向碱性条件偏移; 最适反应温度大大提高, 为 70 °C; 耐热性则与游离态 CALA 相当。DMSO 处理 2 h 后展示的 CALA 仍保持 70% 的活性, 说明展示的 CALA 具有很好的耐受有机溶剂的特性。由于蛋白展示量受细胞表面积的限制, 故展示的 CALA 酶活低于分泌表达的酶活。而展示在酿酒酵母表面的 CALA 比自由酶具有更好的有机溶剂耐受性及温度稳定性, 可能是由于酿酒酵母细胞壁表面结构对 CALA 有保护作用。其详细机制还有待进一步研究。通过进一步优化锚定蛋白以及利用表面展示技术作为筛选手段对 CALA 进行定向进化, 可进一步提高展示酶活性及操作稳定性, 为开发出具有高活性、高稳定性的表面展示脂肪酶全细胞催化剂奠定技术基础。

参考文献

- [1] Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(9): 396-403.
- [2] Solymár M, Fülöp F, Kanerva LT. *Candida antarctica* lipase A-a powerful catalyst for the resolution of heteroaromatic β -amino esters[J]. Tetrahedron: Asymmetry,

- 2002, 13(21): 2383–2388.
- [3] Rogalska E, Cudrey C, Ferrato F, et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases[J]. Chirality, 1993, 5(1): 24–30.
- [4] Kirk O, Christensen MW. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin[J]. Organic Process Research and Development, 2002, 6(4): 446–451.
- [5] Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis[J]. Biocat Biotransform, 1998, 16(3): 181–204.
- [6] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the viron surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315–1317.
- [7] Saleem M, Brim H, Hussain S, et al. Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation[J]. Biotechnol Adv, 2008, 26(2): 151–161.
- [8] Ueda M, Tanaka A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface[J]. Biotechnol Adv, 2000, 18(2): 121–140.
- [9] Shiraga S, Kawakami M, Ishiguro M, et al. Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents[J]. Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4335–4338.
- [10] Kato M, Fuchimoto J, Tanino T, et al. Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(3): 549–555.
- [11] Kondo A, Shigechi H, Abe M, et al. High level production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell surface glucoamylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(3): 291–296.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Vorderwuelbecke T, Kieslich K, Erdmann H. Comparison of lipase by different assays[J]. Enzyme Microb Technol, 1992, 14(8): 631–639.
- [14] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4517–4522.
- [15] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, et al. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(15): 4929–4936.
- [16] Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries[J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(6): 553–557.
- [17] Pfeffer J, Richter S, Nieveler J, et al. High yield expression of lipase A from *Candida Antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation[J]. Microbiol Biotechnol, 2006, 72(5): 931–938.

栏目介绍

生物实验室

“生物实验室”栏目刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度，深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果，交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室，以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。