

南极假丝酵母脂肪酶 B 的酿酒酵母表面展示及其催化己酸乙酯的合成

潘志友, 韩双艳, 林影, 郑穗平

华南理工大学生物科学与工程学院广东省发酵与酶工程重点实验室, 广州 510006

摘要: 从南极假丝酵母(*Candida antarctica*)基因组克隆得到南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* Lipase B, CALB) 全基因片段, 利用连接肽 celA Linker 将 CALB 与酿酒酵母细胞表面展示蛋白 α -凝集素的 C 端连接融合, 构建表面展示载体 pICAS-celAL-CALB, 转化酵母后获得重组酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* pICAS-celAL-CALB。该重组酵母菌经葡萄糖诱导表达及分析, 表明 CALB 已在酿酒酵母细胞表面成功展示, 水解活力达 26.26 u/(g·dry cell)。重组酵母菌经冻干能有效地实现在非水相中全细胞催化己酸和乙醇酯化合成己酸乙酯。反应物己酸与乙醇的摩尔比为 1:1.25, 己酸乙酯的产率为 98.0%, 具有较好的操作稳定性。

关键词: 酵母表面展示, 南极假丝酵母脂肪酶 B, 全细胞催化, 己酸乙酯

Expression of *Candida antarctica* Lipase B on Yeast Surface and Synthesis of Ethyl Hexanoate Catalyzed by CALB

Zhiyou Pan, Shuangyan Han, Ying Lin, and Suiping Zheng

Key Lab of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Technology SCUT, Guangzhou 510006, China

Abstract: Short-chain esters play a significant role in the food industry as flavor and aroma constituents. *Candida antarctica* lipase B (CALB) is one of the most effective catalysts for organic synthesis. We constructed a CALB-displaying yeast whole-cell biocatalyst and applied it to esterification from caproic acid and ethanol. CALB was fused with the α -agglutinin C-terminal and the signal peptide of Glucoamylase in pICAS, a yeast surface display vector, to construct plasmid pICAS-CALB. An extremely Asn-rich linker, named celAL was inserted in the *Xho* I of pICAS-CALB to construct plasmid pICAS-celAL-CALB. The fused gene was under the control of GAPDH promoter. After incubated at 30°C for 96 h the lipase hydrolytic activity of the yeast whole cells reached a plateau, 26.26 u/(g·dry cell). In nonaqueous media, the yield of 98.0% ethyl hexanoate was obtained after 24 h esterification from caproic acid and ethanol (the molar ratio of caproic acid : ethanol = 1 : 1.25) using lyophilized CALB displaying yeast whole cells.

Keywords: yeast surface display, *Candida antarctica* Lipase B, whole-cell biocatalyst, ethyl hexanoate

己酸乙酯是一种广泛应用于食品调香的酯类香料, 主要用作白酒、食醋、糖果的调香剂。与目前生

产中所用的化学法相比, 酶法合成己酯乙酯具有反应条件温和、转化率高、副产物少、易提取等优点。

Received: August 6, 2007; Accepted: October 24, 2007

Supported by: the National High Technology Research and Development Program (863) (No. 2006AA020203) and the Key Science and Technology Project of Guangdong Province (No. 20062050168).

Corresponding author: Ying Lin. Tel: +86-20-39380698; E-mail: feylin@scut.edu.cn

国家“863”科技攻关项目(No. 2006AA020203)和广东省科技攻关项目(No. 20062050168)资助。

使用酶法合成的己酸乙酯调配白酒时,产品风味柔和、香醇自然^[1]。

在众多脂肪酶中,南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)的用途最为广泛,它对非水溶性和水溶性物质都有很强的催化活性。近几年的研究表明, CALB 在酯化、水解、转酯^[2,3],以及其他类型反应^[4]中都表现出比其它脂肪酶更为出色的催化活性。尤其是在非水相催化中, CALB 表现出极好的活性和操作稳定性。但采用游离脂肪酶为催化剂,酶的分离、再生、循环使用困难,而固定化脂肪酶(如 Novo435)价格昂贵,应用于工业化大生产成本过高。

以表面展示有南极假丝酵母脂肪酶 B 的酿酒酵母全细胞作为催化剂,具有固定化酶的优点,且酶制剂生产工艺简单,将发酵液直接离心收集菌体,真空冷冻干燥制得菌体冻干粉,无需固定化即可用于催化己酸乙酯的生产,反应后离心收集菌体即可重复利用,大大降低生产成本^[5]。酿酒酵母已广泛应用于食品工业,其取代化学载体固定 CALB 生产己酸乙酯,完全符合绿色食品的要求。因此,将具有优良特性的南极假丝酵母脂肪酶 B 展示于酿酒酵母细胞表面,能为酶法生产己酸乙酯提供一种有重要意义的酶制剂。

目前,国外已开展为数不多的酵母展示脂肪酶全细胞作为催化剂的应用研究^[6],但尚存在反应时间长、转化率低、酶易失活等问题,而国内未见有相关的报道。本研究利用 α -凝集素表面展示系统成功地将南极假丝酵母脂肪酶 B 锚定在酿酒酵母细胞表面,并以该工程菌全细胞合成己酸乙酯作为应用模型,研究该新型酶制剂在非水相中催化活性,具有反应时间短、产率高、操作稳定性好的特点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

E.coli-TOP10 由本实验室保存。表达载体 pICAS 与宿主菌酿酒酵母 MT8-1(*Saccharomyces cerevisiae*, MATa, *ade*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*)由日本京都大学植田充美教授惠赠。*Candida antarctica* 为本实验室保存。

1.1.2 培养基

无氨基酸酵母氮源 YNB(Yeast nitrogen base),

蛋白胨均购自 Difco; 酵母抽提物购自 Oxford 公司; 酸水解干酪素购自 Sigma 公司; 氨基酸,核苷酸购于广州市博理生物技术有限公司。其中,南极假丝酵母培养基: 蛋白胨 0.6%, 酪蛋白水解物 0.4%, 酵母膏 0.3%, 牛肉膏 0.15%, 葡萄糖 0.1%。

Luria-Bertani (LB): 胰蛋白胨 1%, 酵母抽提物 0.5%, 氯化钠 1%。YPD: 蛋白胨 2%, 酵母抽提物 1%, 葡萄糖 2%。SD: YNB0.67%, 葡萄糖 2%, 微量的氨基酸,核苷酸。SDC 培养基为 SD 培养基中添加 2%酸水解干酪素。固体平板添加 2%的琼脂。

1.1.3 试剂材料

己酸乙酯、乙酸正丁酯(均为色谱纯)购于 PCA 公司,对硝基苯酚丁酸酯(pNPB)、对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)购于 Sigma 公司。限制性内切酶、T₄ 连接酶、RNaseA 购于大连宝生物工程公司。基因组抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒等购于 QIAGEN 公司。其它试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 CALB 基因的克隆

从南极假丝酵母(*C. antarctica*)细胞中提取全基因组,设计引物 sense Primer: 5'-CTATCAAGATCTCTGCCACTCCTTTGGTGAAGCGTC-3', antisense Primer: 5'-TACATACTCGAGATAGGGGTGACGATGCCGGAG-3', (其中下划线部分分别为 *Bgl* II 和 *Xho* I 酶切位点)。PCR 扩增出 CALB 的编码基因。PCR 反应体系为: 10×PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP4 μ L, 引物各加 10 pmol/L, Taq 酶 2 u, 用双蒸水补足体积到 50 μ L。反应条件为: 95°C 2 min 预变性, 然后以 94°C 1 min, 54°C 45 s, 72°C 1.5 min 为一个循环, 共进行 32 个循环。产物由 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 双酶切连接到 pICAS 载体上。构建的质粒 pICAS-CALB 经酶切鉴定后测序。

1.2.2 表面展示载体的构建

根据文献[7,8]全合成一段含有天然连接肽 *celA* Linker(其氨基酸序列为: PGGAPSNNASNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNHNNNNNNNNNNNNNGG)的 DNA 序列, 其上设计有 *Bgl* II、*Xho* I、*Sal* I 酶切识别位点, *Xho* I、*Sal* I 识别位点之间为 *celA* Linker 基因序列。该片段用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切, 载体 pICAS 用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切, 利用 *Sal* I 与 *Xho* I 酶切后产生的相同粘性末端, 将天然连接肽 *celA* Linker 的基因插入

到表面展示载体 pICAS 的 *Bgl* II 和 *Xho* I 之间构建具有连接肽的表面展示载体 pICAS-celAL。用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切 PCR 扩增的 CALB 基因片段和有连接肽基因的载体 pICAS-celAL, 构建质粒 pICAS-celAL-CALB, 经酶切鉴定后测序。

1.2.3 重组酿酒酵母菌构建和 CALB 的诱导表达

用 *Xba* I 将质粒 pICAS-celAL-CALB 线性化, 转化酿酒酵母 MT8-1, 在添加有 0.2% 三丁酸甘油酯的 SD 平板上筛选转化子。挑取水解圈明显的转化子至 10 mL SDC 诱导表达培养液中培养适当时间, 离心收集菌体, 用磷酸缓冲液洗涤菌体, 再用一定量缓冲液重悬菌体, 调节 OD_{600} 到适当值, 测定脂肪酶活力。

1.2.4 重组酿酒酵母菌株的遗传稳定性

将重组菌株 *S.cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 接种于完全培养基 YPD 中, 每隔 2 d 以 2% 接种量转接到新鲜 YPD 培养基中, 同时把各个时间段所取的种液稀释后, 涂布于 YPD 非选择培养板; 待菌落长出后, 随机挑取同一菌落分别点种于 YPD 非选择培养板和 SD(色氨酸营养缺陷型)选择培养板中; 30°C 倒置培养, 比较两平板菌落的生长情况。

1.2.5 CALB 酶活力测定

采用吸光度法测定脂肪酶活力^[9]。

用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5) 配制浓度为 2 mmol/L 的 pNPB 作为酶反应的底物, 其中添加 0.5% 的 Triton-X 100。在 0.5 mL 浓度为 2 mmol/L 的底物溶液加入 0.5 mL 的适当浓度的菌体重悬液, 37°C 下反应一定时间, 测定 OD_{405} 值。每个样品均测定 3 个平行样。用转化有原载体 pICAS 的重组酿酒酵母 MT8-1 菌体重悬液作空白对照。1 个酶活力单位定义为每分钟水解底物生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.6 酯化反应

试剂都预先用分子筛充分除水, 0.25 mol/L 无水乙醇和 0.2 mol/L 正己酸于正庚烷中。取 5 mL 底物混合物于 50 mL 具塞三角瓶中, 加入适量菌体冻干粉, 于 40°C, 200 r/min 振荡反应。0.5 h 后加入适量分子筛, 反应 24 h, 取样 10 000 r/min 离心 10 min。上清与乙酸正丁酯内标物混合溶于一定量的正己烷中, 振荡混匀, 1 μ L 注入气相色谱测定产物中己酸乙酯的含量^[10]。

1.2.7 气相色谱分析

采用日本岛津 GC-14 气相色谱仪(配备 CBM-102 色谱工作站, 氢火焰离子检测器, HP-SPB 毛细管柱)。分析条件: 气化室温度 260°C, 检测室温度 260°C, 柱温 40°C 维持 1 min 后, 以 10°C/min 的速率升温至 120°C, 维持 5 min; 高纯 N_2 为载气, 柱前压 5.88×10^4 Pa, H_2 50 mL/min, 空气 500 mL/min。进样量 1 μ L^[11]。

2 结果与分析

2.1 CALB 基因的克隆及表达载体的构建

28°C, 220 r/min 的条件下培养南极假丝酵母, 24 h 后 7500 r/min 离心收集菌体。提取染色体 DNA, 并以其为模板, PCR 扩增 CALB 编码基因。在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 片段大小为 1000 bp 左右, 同预期结果相符(图 1)。

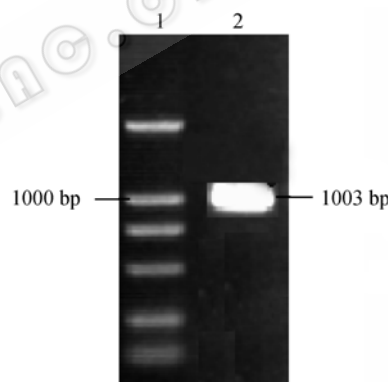


图 1 CALB 基因 PCR 扩增 agarose 电泳图

Fig. 1 PCR amplification of CALB gene

1: marker DL2000; 2: PCR products

为了使锚定蛋白 α -凝集素不干扰 CALB 酶蛋白的正确折叠, 使其能形成天然的构象, 根据文献报道, celA 的天然连接肽与 CALB 酶蛋白有很好的相容性, 故全合成 celA 的天然连接肽的基因, 插入到 CALB 编码基因和 α -凝集素 C 端编码基因之间, 构建重组质粒 pICAS-celAL-CALB。将重组质粒 pICAS-celAL-CALB 转入 *E. coli*-TOP10, 挑取转化子抽提质粒, PCR 和酶切鉴定(图 2), 同预期结果相符。重组质粒经 DNA 测序, 表明, CALB 成熟肽完整编码区已正确插入到表面展示载体 pICAS 上, 在启动子 GAPDH 控制下, 位于葡糖淀粉酶信号肽及 α -凝集素 C 端序列之间, 形成预期设计的融合表达框, CALB 编码基因与 GenBank 上报道的序列(来源

于 *C. Antarctica* LF 058 菌株, GenBank Accession No. Z30645)同源性达 99%, 与 Michiko Kato 等克隆的 CALB 编码基因有较大区别^[12]。

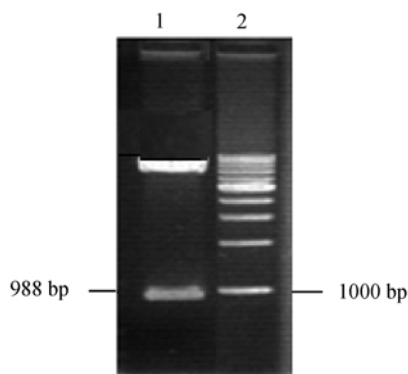


图 2 阳性克隆双酶切鉴定 agarose 电泳图

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of pICAS-celAL-CALB
1: pICAS-celAL-CALB/*Bgl* II+*Xho* I; 2: 1 kb Ladder

2.2 重组酿酒酵母菌株脂肪酶活性的检测

按 1.2.3 操作筛选出水解圈较大的菌株, 进行菌落 PCR 鉴定和脂肪酶活力测定。平板筛选结果如图 3。其中 1、2 为重组酵母菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB, 其周围已形成明显的水解圈。3 为原始菌株 *C. antarctica*, 为阳性对照。4 为空载体转化重组菌 *S. cerevisiae* pICAS, 为阴性对照不能水解三丁酸甘油酯。说明 CALB 已成功展示于酿酒酵母细胞表面, 并具有催化活性。

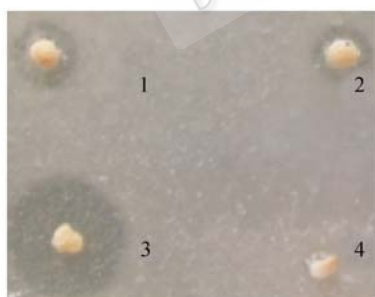


图 3 重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 在含 0.2% 三丁酸甘油酯的 SDC 平板形成水解圈

Fig. 3 Halo formation of CALB-diaplaying yeast on plates containing tributyrin as substrates

1, 2: MT8-1 harboring CALB-celAL-pICAS; 3: *C. antarctica*;
4: MT8-1 harboring pICAS

CALB 成熟肽完整编码基因在启动子 GAPDH 控制下, 属于葡萄糖诱导表达的启动子。分别对重组菌株 *S.cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 和带原载体 pICAS 的阴性对照重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS 进行同批次液体试管培养。重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-

celAL-CALB 的脂肪酶活力在发酵 96 h 达到最高值 62.43 u/L(约 26.26 u/g-dry cell)。其发酵产酶曲线如图 4 所示。

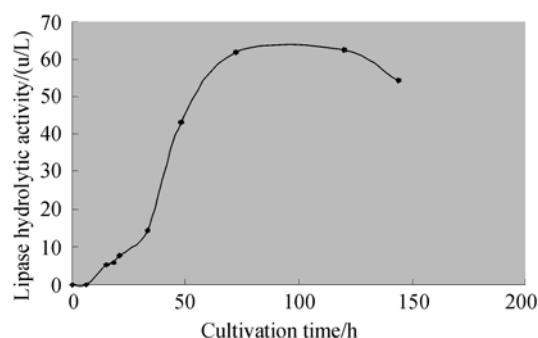


图 4 重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 发酵产酶曲线

Fig. 4 Time course of liapse hydrolytic activities of yeast harboring plasmid pICAS-celAL-CALB

2.3 重组酿酒酵母菌株的遗传稳定性

本实验中重组表达载体 pICAS-celAL-CALB 是单拷贝整合型质粒, 外源基因整合到酵母核染色体上。在重组表达载体上, 除含有目的基因外, 还有筛选标记 *Trp* 基因, 以此可以鉴定重组质粒是否丢失。实验结果见表 1。由表 1 数据可以看出,在所培养的时间范围内, 即在重组酿酒酵母经培养近 200 h, 所构建的重组菌株仍未发生基因丢失现象, 证明该重组菌株具有很好的遗传稳定性。

表 1 重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 的遗传稳定性

Table 1 Genetic stability of recombinant yeast *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB

Continuous cultivation time/h	Number of random selected colony	YPD	SD	Positive rate/%
48	30	30	30	100
96	30	30	30	100
144	30	30	30	100
192	30	30	30	100

2.4 全细胞催化合成己酸乙酯

将重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 液体发酵培养 96 h。离心收集菌体, 用双蒸水洗涤菌体 3 次, 真空冷冻干燥, 制得全细胞脂肪酶制剂。利用此酶制剂在非水相中催化己酸和乙醇酯化合成己酸乙酯。反应物己酸与乙醇的摩尔比为 1 : 1.25, 经气相色谱(图 5)分析己酸乙酯的产率达 98.0%, 连续

反应 10 批次, 己酸乙酯的产率保持在 90.0% 以上, 具有较好的操作稳定性。图 5、图 6 分别为重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 和带原载体质粒 pICAS 的阴性对照重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS 全细胞在非水相中作用后的样品气相色谱检测分析图谱, 图中色谱峰 1、2、3 分别为乙酸正丁酯(内标)、正己酸、己酸乙酯。由于水是酯化反应过程中的产物, 过量的水的存在易导致逆反应的发生, 阻碍反应向酯化方向进行。因此, 反应体系中的水含量是影响酯合成的重要因素。由于该脂肪酶制剂的酯化效率较高, 反应进行 0.5 h, 己酸乙酯的产率已达 40% 以上, 故在反应进行了 0.5 h 时添加适量分子筛去除反应体系中形成的水, 可进一步提高转化效率^[13]。

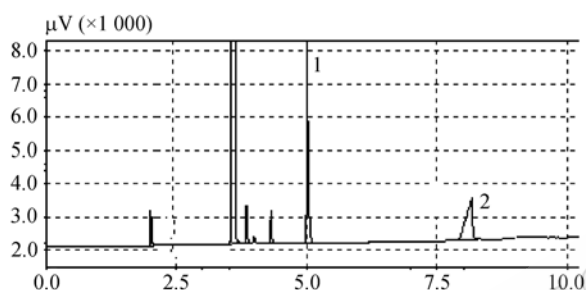


图 5 阴性对照重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS 全细胞催化样品气相色谱分析

Fig. 5 The gas chromatogram of sample product catalyzed by *S. cerevisiae* pICAS

1: n-butyl acetate (inner standard), 2: caproic acid

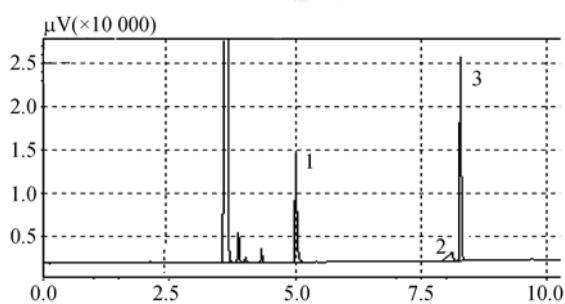


图 6 重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 全细胞催化样品气相色谱分析

Fig. 6 The gas chromatogram of sample product catalyzed by *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB

1: n-butyl acetate (inner standard), 2: caproic acid, 3: ethyl hexanoate

3 讨论

本研究利用酿酒酵母表面展示系统成功地将 CALB 展示于酿酒酵母细胞表面, 并利用该重组酿酒酵母菌体冻干粉为全细胞催化剂在非水相中催化

己酸和乙醇酯化合成己酸乙酯, 取得了较好的效果。反应物己酸与乙醇的摩尔比为 1 : 1.25, 己酸乙酯的产率为 98.0%, 而且酵母表面展示的 CALB 有良好的操作稳定性, 具有固定化酶的优良特性。

同众多的脂肪酶相似, 酿酒酵母表面展示的脂肪酶 CALB 的酯化合成能力与其水解活性之间相关性不大。与商业化的脂肪酶相比, 酿酒酵母表面展示的脂肪酶 CALB 展现出较低的水解活力, 但在有机相中催化己酸和乙醇酯化时转化率极高。Zaks A 等也曾经讨论过这一现象, 在有机介质中酶的空间结构发生改变, 造成反应的热力学平衡转变, 水解活力不高的酶在有机相中的酯合成的转化率也可能较高^[14]。

在酶的立体结构中, 决定底物选择性的最重要因素是活性口袋的空间限制、疏水性质和催化中间体的稳定性。脂肪酶的活性口袋是一个氧负离子空洞, 由几个氢键供体所构成, 主要为酶骨架和其侧链中的酰胺的质子。与其它的脂肪酶相比, CALB 的立体结构中其活性部位氧负离子空洞的可利用空间非常有限, 因而表现出较强的底物选择性^[15, 16]。我们在研究中发现, 酵母表面展示的 CALB 表现出明显的底物偏好性, 其对短链脂肪酸类底物的催化活性明显高于长链脂肪酸, 其水解 pNPB(脂肪酸碳链长度为 4)的活力是 pNPP(脂肪酸碳链长度为 16)的 7 倍。Michiko Kato 等^[12]的研究也表明, 酵母表面展示的 CALB 能有效水解三丁酸甘油酯, 而不能水解豆油(脂肪酸碳链长度为 18)。在非水相中酵母表面展示的 CALB 亦能高效地催化短链酯的合成。

酵母表面展示 CALB 全细胞催化剂具有固定化酶的优点, 其水解活性和非水相中的催化活性、耐热性、耐有机溶剂的能力大大提高。本研究发现, 利用重组酿酒酵母菌体冻干粉为全细胞催化剂在非水相中催化己酸和乙醇酯化, 连续反应 10 批次, 己酸乙酯的产率保持在 90.0% 以上, 具有较好的耐有机溶剂能力和操作稳定性。Takanori Tanino 等^[6]利用酵母表面展示 CALB 全细胞在 60°C 催化己二酸二丁酯的合成, 反应 144 h 后脂肪酶仍保持酯合成活力, 表明酵母表面展示 CALB 具有很好的耐热性。Michiko Kato 等^[12]的研究还发现酵母表面展示 CALB 水解 pNPB 的比酶活力是自由酶的 25 倍, 表明酵母表面展示脂肪酶具有更大的工业应用价值。

Michiko Kato 等利用 α -凝集素酿酒酵母表面展示系统展示来源于 *C. antarctica* CBS6678 菌株的 CALB, 水解 pNPB 活力极低。其利用定点突变技术将来源于 *C. Antarctica* CBS6678 菌株的 CALB 的基因突变为 *C. Antarctica* LF 058 菌株的 CALB 基因 (T25A、T28S、T31S、G46Q、T89A、R97N、I286V), 水解 pNPB 的活力提高 20 倍。截然相反的是, Takanori Tanino 等利用 Flo1p 絮凝素短链展示系统展示来源于 *C. Antarctica* CBS6678 菌株的 CALB, 其水解 pNPB 的活力和非水相中合成己二酸二丁酯的活都明显高于利用该系统展示的来源于 *C. Antarctica* LF 058 菌株的 CALB。这可能是来源于 *C. Antarctica* CBS6678 菌株的 CALB N 端的 3 个特定的氨基端(A25T, S28T, 和 S31T)改变了 CALB 的空间结构, 提高了酵母展示 CALB 的活力。我们将基于酵母表面展示技术, 对这一有趣现象的机理进行探索。

目前固定化脂肪酶仍有成本高、工程投资大和反应过程传质受限制等缺点, 酵母细胞表面展示系统使酶锚定在细胞表面, 无固定化载体内部传质阻力的影响, 能与底物很好的接触, 较大程度上提高了反应速度。我们将基于酵母表面展示技术, 对脂肪酶进行分子改造, 以构建出对有机溶剂耐受能力强、酯化活力高等特性的新型催化剂^[17]。

REFERENCES

- [1] Xu DG, Xiao LS, Cai Y, *et al.* Research of lipase-catalyzed synthesis of ethyl hexanoate in nonaqueous conditions. *Fine Chemicals*, 2004, **21**(4): 279–281.
徐大刚, 肖禄生, 蔡扬, 等. 用脂肪酶非水相生物催化合成己酸乙酯的研究. *精细化工*, 2004, **21**(4): 279–281.
- [2] Torres C, Otero C. Part III, direct enzymatic esterification of lactic acid with fatty acids, *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **29**(1): 3–12.
- [3] Senanayake S, Shahidi F. Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil via lipase-catalyzed transesterification, *Food Chemistry*, 2004, **85**(4): 489–496.
- [4] Gotor-Fernández V, Busto E, Gotor V. Candida antarctica lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Advanced synthesis & catalysis*, 2006, **348**: 797–812.
- [5] Kondo A, Udea M. Yeast cell-surface display—applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 28–40.
- [6] 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.
- [7] Johanna C, Mulder R, Gustavsson M, *et al.* Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification*, 2001, **21**: 386–392.
- [8] Denman S, Xue GP, Patel B. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (*celA*) homologous to *trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(6): 1889–1896.
- [9] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, *et al.* Extracellular lipase of *pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-Ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(15): 4836–4841.
- [10] Li Y, Chen YL. Lipase catalyzed synthesis of ethyl hexanoate in non-aqueous media. *Food and Fermentation Industries*, 2006, **32**(9): 82–85.
李燕, 陈义伦. 根霉脂肪酶有机相合成己酸乙酯条件的研究. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(9): 82–85.
- [11] GB10345. 8-89, Method for determination of hexanoic acetate in Chinese spirits (GLC), 1989.
GB10345. 8-89, 中华人民共和国国家标准, 白酒中己酸乙酯的试验方法, 1989.
- [12] 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(3): 549–555.
- [13] Xu Y, Zhang KC, Wang YF. Flavor ester synthesis by microbial lipases in heptane phase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1998, **14**(2): 214–219.
徐岩, 章克昌, 王亚非. 微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯的研究. *生物工程学报*, 1998, **14**(2): 214–219.
- [14] Zaks A, Klivanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Biochemistry*, 1985, **24**: 3192–3196.
- [15] Uppenberg J, Hansen M T, Patkar S, *et al.* The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 1994, **2**: 293–308.
- [16] Uppenberg J, Ohrner N, Norin M, *et al.* Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, 1995, **34**: 16838–16851.
- [17] Lutz S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**: 2743–2748.