

皱褶假丝酵母脂肪酶 CRL1 在毕赤酵母中的高效表达及其催化合成维生素 E 醋酸酯

郝月绰, 林影, 梁书利

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 本研究将经密码子优化的皱褶假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase) CRL1 基因克隆到毕赤酵母分泌型表达载体 pHKA, 构建得到重组菌株 GS115/pHKA-CRL1; 经摇瓶发酵并结合甲醇诱导 120 h 处理, 该菌株对底物对硝基苯酚丁酯 (*p*NPB) 的水解活力达到 39.73 U/mL。通过对 AOX1 启动子和 α 分泌信号肽同时进行改造, 进一步获得重组菌株 GS115/pHKA-AOX1m/am-CRL1, 其脂肪酶活力提高达到 63.63 U/mL。发酵液上清液经超滤浓缩、硫酸铵沉淀后, 再经脱盐和阴离子交换层析处理, 获得纯化的重组 CRL1。该纯化工艺的纯化倍数为 5.41 倍, 回收率为 33.81%。而纯化重组 CRL1 的比酶活为 984.5 U/mg。重组 CRL1 的最适温度为 40 °C, 最适 pH 为 7.5; 经 40 °C 保温 6 h, 仍保留 52.99% 的相对活力; 在偏酸性环境中较为稳定。以摇瓶发酵、真空冷冻干燥后的重组 CRL1 为催化剂, 在无溶剂体系中催化合成维生素 E 醋酸酯, 在最适反应条件下 (200 mg D- α -生育酚、1 mL 乙酸酐、100 mg CRL1、反应温度 60 °C、转速 200 r/min、反应时间 9 h), D- α -生育酚的转化率在 97.00% 以上。

关键词: 皱褶假丝酵母脂肪酶; 毕赤酵母; 蛋白纯化; 酶学性质; 维生素 E 醋酸酯

文章编号: 1673-9078(2018)10-126-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.018

Efficient Expression of *Candida rugosa* Lipase CRL1 in *Pichia pastoris* and its Application for Synthesis of Vitamin E Acetate

HAO Yue-chuo, LIN Ying, LIANG Shu-li

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, the optimized gene encoding *Candida rugosa* lipase CRL1 was synthesized in vitro, cloned into the vector pHKA and expressed in *Pichia pastoris*, producing a lipase activity of 39.73 U/mL towards *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) after induction for 120 h in flask fermentation. A new gene encoding GS115/pHKA-AOX1m/am-CRL1 was obtained by modifying the AOX1 promoter and α -factor signal peptide, which lipase activity achieved 63.63 U/mL. Then the purified CRL1 was isolated from the supernatant of the zymotic fluid, through sequential treatments of ultrafiltration, ammonium sulphate precipitation and anion exchange chromatography. The specific enzyme activity of this purified CRL1 was 984.5 U/mg. The recombinant CRL1 was characterized by the optimal temperature and pH at 40 °C and 7.5, respectively. Besides, it retained 52.99% of its original activity after incubation at 40 °C for 6 h and it was relatively stable in a slightly acidic environment. Furthermore, the crude CRL1 was lyophilized and harvested as an effective biocatalyst to synthesize vitamin E acetate in the solvent-free system. The optimal synthesis was performed with 200 mg D- α -tocopherol, 1 mL acetic anhydride, and 100 mg crude CRL1, at 60 °C and a shearing rate of 200 r/min for 6 h, of which more than 97% of D- α -tocopherol was transformed.

Key words: *Candida rugosa* lipase; *Pichia pastoris*; purification; characterization; vitamin E acetate

皱褶假丝酵母(*C. rugosa*), 原称柱状假丝酵母(*C. cylindracea*), 是一种半子囊不产孢子的食品安全级酵母菌株^[1]。皱褶假丝酵母脂肪酶(*C. rugosa* lipases, CRLs)主要由野生型菌株 ATCC 14830 和 Type VII 生

收稿日期: 2018-01-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (30471225); 中央高校基本科研业务费项目 (2017MS103)

作者简介: 郝月绰 (1993-), 男, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 梁书利 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶学与酶工程

产^[1], 是目前应用最为广泛的商品化脂肪酶之一, 在制药、食品、化妆品和能源等领域具有广泛的应用^[2-5]。目前已知 CRLs 由 8 种同工酶组成, 其中 CRL1 具有最高的表达量和酶活力^[6-8]。不同商品酶之间由于 CRLs 的成分和比例不同, 在催化效率、区域选择性和立体选择性上表现出显著差异^[9,10]。分离或生产单一的皱褶假丝酵母脂肪酶, 尤其是 CRL1, 对开展 CRLs 的进一步研究具有重要意义。

CRL1 已经被报道在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中

表达成功^[8,11,12]。Brocca 等^[11]首次实现了 CRL1 在毕赤酵母的活性表达, 并发现对丝氨酸非通用密码子的改造是重组 CRL1 成功表达的关键。Chang 等^[13]和 Xu 等^[12]分别通过培养基优化以及基因过表达的方法将 CRL1 在毕赤酵母的表达量进一步提高, 而关于启动子和分泌信号肽的系统优化目前尚未报道。毕赤酵母表达系统是目前应用最为广泛的外源蛋白表达系统, 既具有原核表达系统易培养、繁殖快的优点, 又可对外源蛋白进行翻译后加工修饰。此外, 毕赤酵母遗传背景清晰、便于遗传操作, 拥有强大的启动子、能够高效表达外源蛋白, 适合高密度发酵且便于分离纯化。作为模式菌株或工业生产菌株, 目前已经有超过 5000 种外源蛋白在毕赤酵母中成功表达^[14]。

维生素 E(生育酚)作为一种重要的保健药品, 具有抗衰老、抗不育、提高免疫力和预防心血管疾病等重要作用^[15]。由于维生素 E 具有易氧化、表面活性差等缺点, 目前的研究热点主要集中在其酚羟基的改性上^[16]。作为市场上最主要的维生素 E 衍生物产品, 维生素 E 醋酸酯可用化学催化剂(三乙胺、HCl/ZnCl₂ 等)催化 D- α -生育酚与醋酸酐反应得到^[17-19], 但存在副产物多、污染环境、底物选择性差和产物转化率低等缺陷。而生物酶法具有反应条件温和、高效、专一和清洁生产等优点, 随着人们对食品安全和绿色食品的意识和要求不断提高, 开发生物酶法催化合成维生素 E 醋酸酯具有重要的研究意义和应用价值。

本研究结合启动子和分泌信号肽改造实现皱褶假丝酵母脂肪酶 CRL1 在毕赤酵母的高效表达。在蛋白纯化的基础上, 进一步测定了重组 CRL1 的酶学性质; 并建立无溶剂体系中重组 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的方法, 为维生素 E 醋酸酯的高效合成及应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因、菌株和质粒

根据 CRL1 的蛋白序列(UniProt KB-P20261), 使用 OptimumGeneTM 对密码子偏好性进行优化, 并将其其中 19 个非通用丝氨酸密码子 CTG 转化为通用丝氨酸密码子 TCT, 委托上海捷瑞生物工程有限公司合成。

大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* Top10 和毕赤酵母菌株 *P. pastoris* GS115 购自 Invitrogen 公司。质粒 pHKA 和 pHKA-AOXm/am 均由本实验室构建并保存^[20]。

1.1.2 试剂与培养基

KOD 酶购自 TOYOBO 公司; T₄ DNA 连接酶、DNA Marker 和限制性内切酶均购自 Takara 公司; 质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Magen 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自捷瑞生物工程有限公司; 对硝基苯酚丁酯(pNPB)购自 Sigma 公司; 酵母抽提物购自 Oxford 公司; 酵母氮源 YNB 和蛋白胨购自 Difco 公司; 87.25% D- α -生育酚购自江苏玺鑫维生素有限公司; 95.50% D- α -生育酚和 96.00% D- α -生育酚醋酸酯购自 Sigma 公司; 无水乙醇(色谱纯)购自天津科密欧化学试剂有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

LB 培养基(1 L): 5.0 g 酵母抽提物, 10.0 g 蛋白胨, 10.0 g 氯化钠; YPD 培养基(1 L): 10.0 g 酵母抽提物, 20.0 g 蛋白胨, 20.0 g 葡萄糖; BMGY 培养基(1 L): 10.0 g 酵母抽提物, 20.0 g 蛋白胨, 13.4 g YNB, 100 mL PBS (100 mmol/L, pH 6.0)缓冲液, 10 mL 甘油; BMMY 培养基(1 L): 10.0 g 酵母抽提物, 20.0 g 蛋白胨, 13.4 g YNB, 100 mL PBS (100 mmol/L, pH 6.0)缓冲液, 10 mL 甲醇; MD 筛选平板(1 L): 13.4 g YNB, 20.0 g 葡萄糖, 20.0 g 琼脂; 三丁酸甘油酯乳化平板(1 L): 5.0 g 硫酸铵, 3.0 g 酵母抽提物, 20.0 g 琼脂, 1.0 g PVA, 2.0 $\times 10^{-4}$ g 生物素, 5 mL 三丁酸甘油酯, 5 mL 甲醇, 100 mL PBS (100 mmol/L, pH 6.0)缓冲液。

1.1.3 仪器与设备

PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; NanoDrop 1000 超微量核酸蛋白测定仪, 美国 Thermo 公司; 5804R 型高速冷冻台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; 万分之一分析天平, 德国 Satorius 公司; ZWYR-D2402 型恒温培养摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国 GE 公司; UV-2350 型分光光度计, 美国 UNICO 公司; 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; KS 4000 i control 型恒温反应摇床, 德国 IKA 公司; 7820A 型气相色谱仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组菌株构建和发酵

以 *EcoR* I 和 *Not* I 分别为上、下游酶切位点, 设计并合成引物(上游引物为 CRL1-F: CCGGAATTCCATCATCATCATCATCATGCTCCAAC TGCTACTTTGGC; 下游引物为 CRL1-S: ATTTGCGGCCGCTTAAACGAAAAAGGAT GGTGGGT); 以质粒 pGH-CRL1 为模板, PCR 扩增 CRL1 基因序列。CRL1 基因和质粒载体 pHKA 或 pHKA-AOX1m/am(AOX1 启动子的改造参照 Hartner

等^[21]的方法,在原 AOX1 启动子的基础上引入一个顺式作用原件; α 分泌信号肽的改造参照 Kjeldsen 等^[22]的方法,在原 α 分泌信号肽和多克隆位点之间引入一段 10 个氨基酸长度的间隔肽)分别进行双酶切,产物纯化回收后采用 T₄ DNA 连接酶进行连接。连接产物用 CaCl₂ 转化法转入 *E. coli* Top10 感受态,涂布于含 5 mg/mL 卡那霉素的 LB 平板,37 °C 过夜培养。挑取阳性转化子过夜培养后提取质粒,进行双酶切鉴定并送样至上海生工生物工程有限公司进行测序。

重组质粒 pHKA-CRL1 或 pHKA-AOX1m/am-CRL1 经 *Sal* I 线性化后,电击转入 *P. pastoris* GS115 感受态中,涂布 MD 筛选平板,30 °C 培养 72 h。挑取经菌落 PCR 鉴定正确的阳性转化子至三丁酸甘油酯乳化平板,30 °C 培养大约 48 h。挑取产生水解圈直径较大的单菌落至 YPD 培养基进行活化,然后接种 BMGY 培养基,30 °C、250 r/min 培养 16~24 h 至 OD₆₀₀ 为 2.0~6.0。离心收集菌体,转接 BMMY 培养基,控制起始 OD₆₀₀ 为 1.0,30 °C、250 r/min 摇瓶培养 120 h。发酵期间每隔 24 h 添加 1%(V/V)甲醇,诱导重组菌株产酶,同时取样测定重组菌株生长曲线和发酵液中脂肪酶活力。

1.2.2 脂肪酶水解活力测定

采用对硝基苯酚法测定脂肪酶水解活力^[23]。发酵液样品经 14,000 r/min 离心 5 min,弃菌体。取 50 μ L 适当稀释后的酶液,加入到装有 900 μ L Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0)缓冲液的 2 mL 离心管中,对照组为 950 μ L 缓冲液,置于恒温震荡混匀仪 45 °C、800 r/min 预热 5 min。快速加入 50 μ L 对硝基苯酚丁酯乳化液,相同条件下反应 5 min。反应结束后 14,000 r/min 离心 1 min,取 200 μ L 上清液于 96 孔板中,用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光度值,每组设 3 个平行。一个酶活力单位定义为每分钟水解生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。

1.2.3 酶蛋白纯化

发酵结束后,发酵液于 4 °C、14,000 r/min 离心 10 min,取上清液经 10,000 MWCO PES 膜包超滤浓缩,浓缩液通过 35% 和 85% 饱和硫酸铵分段盐析处理。蛋白沉淀复溶后用 Buffer A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)缓冲液平衡的 Sephadex G-25S 柱进行脱盐操作,见峰收集。收集液再经过 Capto DEAE 阴离子交换层析柱处理,Buffer B(在 Buffer A 的条件下加入 500 mmol/L NaCl)溶液进行梯度洗脱,收获纯化后的酶蛋白溶液。

采用 Bradford 法测定蛋白浓度,以小牛血清蛋白为标准蛋白。SDS-PAGE 检测纯化效果。

1.2.4 酶学性质测定

最适温度及温度稳定性:在 pH 8.0 条件下,25 °C~60 °C 温度范围内测定酶活力,确定酶的最适温度;酶液分别在 40 °C、50 °C 和 60 °C 条件下水浴保温,1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 取样测定酶活力,考察酶的温度稳定性。

最适 pH 及 pH 稳定性:在 45 °C 条件下,pH 6.0~10.0 温度范围内测定酶活力,确定酶的最适 pH;酶液分别在 pH 6.5、pH 7.0 和 pH 8.0 条件下于 45 °C 水浴保温,1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h 取样测定酶活力,考察酶的 pH 稳定性。

1.2.5 CRL1 催化剂制备

离心收集发酵上清液,于 -80 °C 冰箱冻结 6 h,再于 0.37 Pa、-50 °C 条件下冷冻干燥 18 h,收获 CRL1 冻干酶粉,于 4 °C 冰箱保存。使用时在装有饱和 MgCl₂ 溶液的干燥器中平衡 48 h 后备用。

1.2.6 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯

称取 200 mg D- α -生育酚底物于 10 mL 具塞反应瓶中,加入 2 mL 乙酸酐作为酰基供体,置于恒温振荡反应器于 40 °C、200 r/min 条件下预热 5 min,加入 75 mg CRL1 催化剂进行催化反应。反应结束后,样品经 14,000 r/min 离心 5 min,取上清用无水乙醇适当稀释后进行气相检测。

1.2.7 气相色谱检测分析

色谱柱:J&W DB-17HT 石英毛细管柱(30 m \times 0.32 mm, 0.15 μ m);升温程序:100 °C 保持 1 min,以 15 °C/min 升至 280 °C 并保持 1 min,再以 5 °C/min 升至 290 °C 并保持 1 min;进样口温度 280 °C,检测器(氢离子火焰检测器)温度 300 °C,载气(N₂)流速 20 mL/min,分流比 40:1,进样体积 1 μ L。

以 95.50% D- α -生育酚为标准品建立质量浓度-峰面积标准曲线。采用外标法对反应体系中 D- α -生育酚含量进行定量分析。转化率计算见公式(1)。

1.2.8 数据统计分析

以上实验均设置三个平行组,实验数据采用 EXCEL 软件进行统计分析,结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株的构建和平板筛选

$$D-\alpha-\text{生育酚转化率}(\%) = \frac{\text{反应前}D-\alpha-\text{生育酚含量} - \text{反应后}D-\alpha-\text{生育酚含量}}{\text{反应前}D-\alpha-\text{生育酚含量}} \times 100\% \quad (1)$$

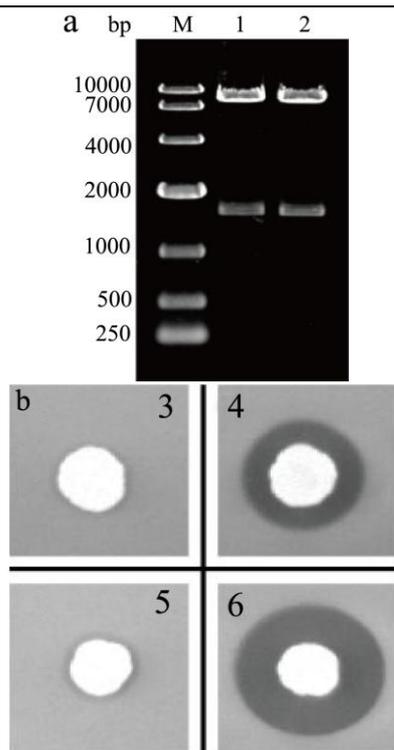


图1 重组质粒双酶切鉴定(a); 重组菌株三丁酸甘油酯平板筛选(b, 36 h)

Fig.1 Identification of recombinant plasmid (a) and screening of recombinant strains on tributyrin agar plate(b)

注: M 为 Takara 10,000 bp Ladder; 1 为重组质粒 pHKA-CRL1 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切产物; 2 为重组质粒 pHKA-AOX1m/am-CRL1 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切产物; 3 为对照菌株 GS115/pHKA; 4 为重组菌株 GS115/pHKA-CRL1; 5 为对照菌株 GS115/pHKA-AOX1m/am; 6 为重组菌株 GS115/pHKA-AOX1m/am-CRL1。

以质粒 pGH-CRL1 为模板, PCR 扩增得到长度为 1600 bp 左右的 CRL1 基因片段, 经限制性内切酶切割后插入到质粒载体 pHKA(或 pHKA-AOX1m/am), 然后连接产物转化 *E.coli* Top10 进行复制扩增, 构建重组质粒 pHKA-CRL1(或 pHKA-AOX1m/am-CRL1)。重组质粒经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 在 1600 bp 左右和 7800 bp 左右出现两条条带, 分别与目的基因和质粒载体大小相符(图 1a)。同时, 重组质粒测序结果与目的基因序列完全一致, 表明重组质粒构建成功。

重组质粒线性化处理电转 *P.pastoris* GS115, 从 MD 筛选平板上挑选转化子, 使用 5' AOX1 上游通用引物和 CRL1 基因下游引物进行菌落 PCR 鉴定, 阳性转化子条带大小为 1800 bp 左右。

挑取阳性转化子至三丁酸甘油酯乳化平板进行初筛(图 1b), 其中产生水解圈较早、直径较大的单菌落可能具有较高的脂肪酶水解活力, 从中选取 3~5 个单菌落进行摇瓶发酵复筛。

2.2 重组 CRL1 的表达和纯化

2.2.1 重组 CRL1 的表达

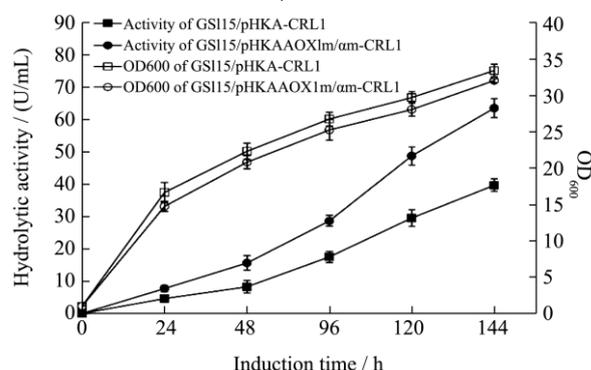


图2 CRL1 重组菌株摇瓶发酵生长曲线和产酶特征曲线

Fig.2 Curve of growth and lipase production of recombinant CRL1 strains in flask fermentation

重组菌株 GS115/pHKA-CRL1 和 GS115/pHKA-AOX1m/am-CRL1 的摇瓶发酵生长曲线和产酶特征曲线如图 2 所示。从图上看, 随着发酵的进行, 两株重组菌株的菌体数量和脂肪酶活力都逐渐提高, 并且在 120 h 时分别达到最大值。重组菌株 GS115/pHKA-CRL1 在 120 h 时酶活力为 39.73 U/mL, OD 值为 33.48。Li 等^[19]曾在毕赤酵母中分别对 AOX1 启动子和 α 信号肽进行改造, 将 AOX1 启动子的-230 至-190 区域的顺式作用元件增加至二拷贝和删除-777 至-712 区域, 在 α 信号肽和多克隆位点之间增加可被信号肽切割识别的 10 个氨基酸 (EEAEAEAEPK), 改造后重组植酸酶的表达水平分别提高了 35% 和 12%。本研究采用了相同方法对 AOX1 启动子和 α 信号肽同时进行改造, 改造后重组菌株 GS115/pHKA-AOX1m/am-CRL1 的酶活力有明显提高, 最高水解活力达到 63.63 U/mL, 相对提高 60.18%。此外, 改造对重组菌株菌体生长情况没有明显影响, OD₆₀₀ 最高值为 32.35, 并且在整个过程中与重组菌株 GS115/pHKA-CRL1 的生长趋势保持一致, 说明利用该组合策略对 CRL1 重组菌株的改造较为成功。

2.2.2 重组 CRL1 的纯化

重组菌株 GS115/pHKA-AOX1m/am-CRL1 摇瓶发酵 120 h, 离心收集粗酶液 245 mL, 酶活力为 64.30 U/mL, 然后按照方法 1.2.3 进行酶蛋白纯化。发酵液上清液首先经过 10,000 MWCO PES 膜包超滤浓缩, 可去除分子量小于 10 ku 的杂蛋白, 得到浓缩液 64 mL, 比酶活提高了 1.06 倍, 酶活力回收率为 72.84%。随后浓缩液通过 35% 和 85% 饱和硫酸铵分段盐析处理, 进一步去除杂蛋白。蛋白复溶后利用 AKTA 蛋白纯化系统和 Sephadex G-25S 脱盐柱进行脱盐操作, 收

集液中色素明显减小, 比酶活达到 604.76 U/mg。最后采用 Capto DEAE 阴离子交换层析柱对收集液进一步纯化, 确定进样缓冲液最适 pH 为 6.0, 洗脱液分段洗脱梯度为 150 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L NaCl, 在此条件下重组 CRL1 得到最佳效果。发酵液上清液经过超滤浓缩、硫酸铵沉淀及脱盐和阴离子交换层析三步纯化, 收集液中重组 CRL1 的比酶活达到 984.52

U/mg, 纯化倍数 5.41 倍, 酶活回收率 33.81% (表 1)。

将纯化过程中收集到的重组 CRL1 样品进行 SDS-PAGE 检测, 可以看到, 粗酶液经过“超滤浓缩-硫酸铵沉淀后脱盐-阴离子交换层析”三步纯化后, 杂蛋白逐步去除, 在分子量 60 ku 附近得到单一的蛋白条带, 与预期相符, 为重组 CRL1 目的条带(图 3)。

表 1 重组 CRL1 的蛋白纯化

Table 1 Purification of the recombinant CRL1

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白/mg	比酶活/(U/mg)	纯化倍数/(fold)	回收率/%
粗酶液	15754.50	86.55	182.03	1.00	100.00
超滤浓缩	11474.94	30.54	375.73	2.06	72.84
硫酸铵沉淀后脱盐	10661.95	17.63	604.76	3.32	67.68
阴离子交换层析	5326.23	5.41	984.52	5.41	33.81

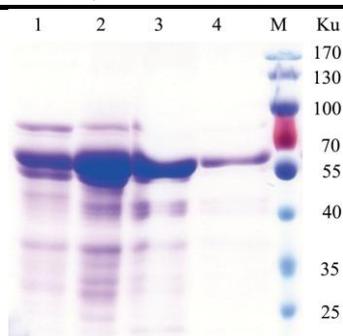


图 3 不同纯化步骤后重组 CRL1 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of recombinant CRL1 purified by different steps

注: M 为 Protein Marker; 1 表示粗酶液; 2 表示超滤浓缩处理; 3 表示硫酸铵沉淀后脱盐处理; 4 表示阴离子交换层析处理。

2.3 重组 CRL1 的酶学性质

根据方法 1.2.4 测定了温度和 pH 对重组 CRL1 的影响。结果表明重组 CRL1 的最适温度为 40 °C, 在 35 °C 和 45 °C 时分别保留了 66.85% 和 73.51% 的相对活力(图 4a)。40 °C、50 °C 和 60 °C 时的半衰期分别为 5 h、2 h 和 1 h 左右, 热稳定较差(图 4b)。重组 CRL1 的最适 pH 为 7.5, 在 pH 值 7.0~8.0 范围内酶活力维持在 73.93% 以上(图 4c)。在 pH 值 6.5、7.0 和 8.0 条件下经 45 °C 水浴保温 6 h, 酶活力分别保留 40.96%、26.35% 和 17.74%, 在偏酸性环境中较为稳定(图 4d)。以上测定结果与 Chang 等^[8]报道的基本一致, 对 CRL1 的催化应用具有指导意义。

2.4 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯

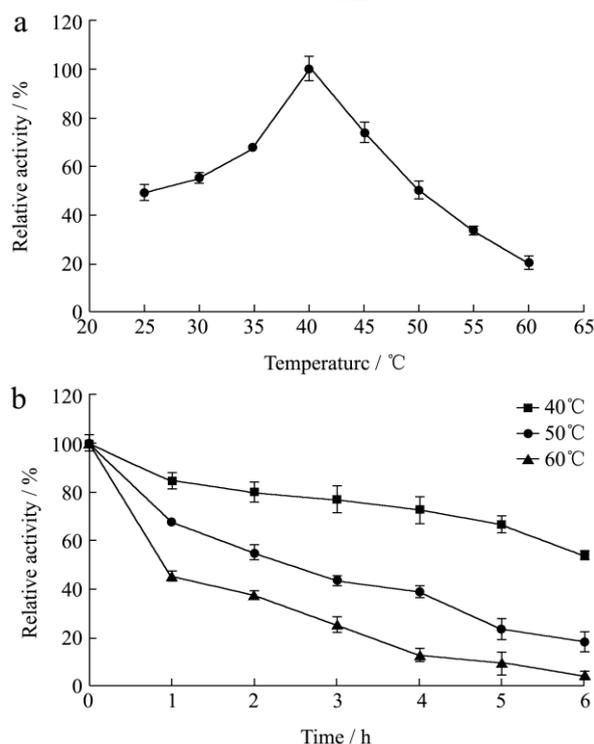
2.4.1 反应温度对维生素 E 醋酸酯合成的影响

温度是影响 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的主

要影响因素, 且主要影响反应初速度, 而对最终反应平衡影响不大。在 40 °C、50 °C 和 60 °C 条件下分别反应 30 h、15 h 和 9 h, D- α -生育酚的转化率分别达到 94.11%、95.58% 和 94.72%(图 5)。随着反应的进行, 底物转化逐渐趋于完全, 反应 36 h 时 40 °C、50 °C 和 60 °C 条件下的转化率分别为 94.97%、97.37% 和 97.53%。后续利用 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的最适反应温度选定在 60 °C。

2.4.2 摇床转速对维生素 E 醋酸酯合成的影响

摇床转速通过影响反应体系中的物质和能量传递而影响维生素 E 醋酸酯的合成效果, 较低的转速不利于底物之间的充分接触, 而过高的转速则会破坏底物分子之间的相互作用且浪费能量。



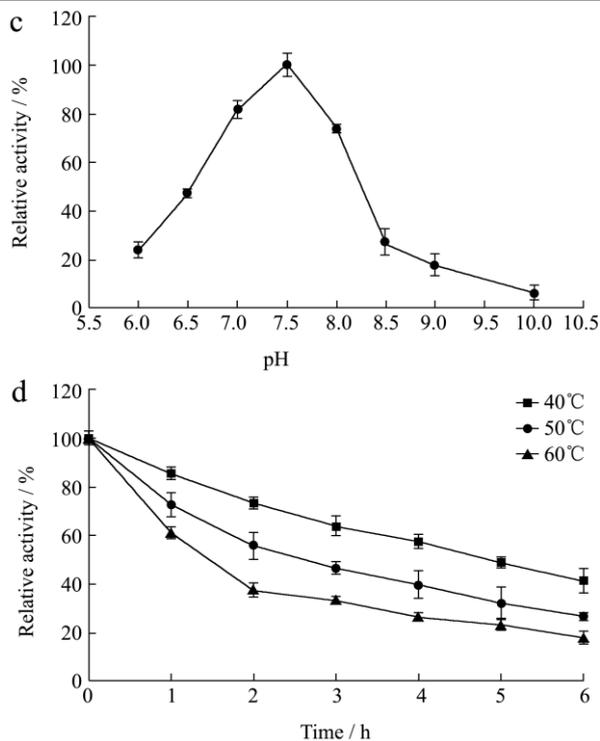


图4 重组 CRL1 酶学性质

Fig.4 Temperature effects on the activity

注: a 最适温度, b 温度稳定性, c 最适 pH, d pH 稳定性。

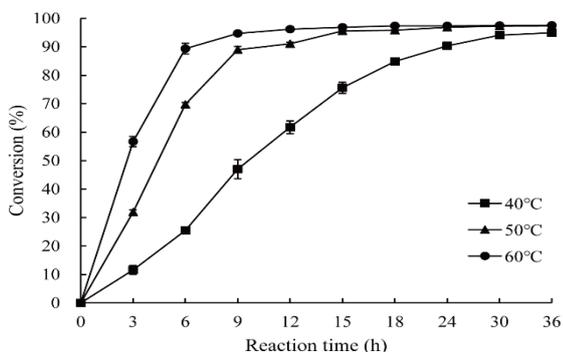


图5 反应温度对维生素 E 醋酸酯合成的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on the synthesis of vitamin E acetate

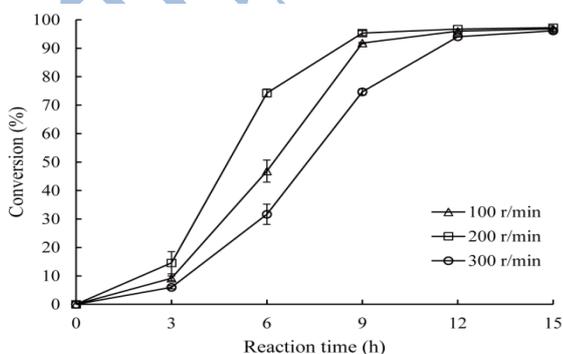


图6 摇床转速对维生素 E 醋酸酯合成的影响

Fig.6 Effect of shaking speed on the synthesis of vitamin E acetate

转速主要影响反应初速度,在 100 r/min、200 r/min 和 300 r/min 条件下分别进行反应,反应在大约 12 h、9 h 和 15 h 时分别达到平衡且 D- α -生育酚的转化率均为 97.00%左右(图 6)。后续利用 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的最适摇床转速为 200 r/min,同时结合 2.4.1 实验结果,将最适反应时间确定为 9 h。

2.4.3 底物浓度对维生素 E 醋酸酯合成的影响

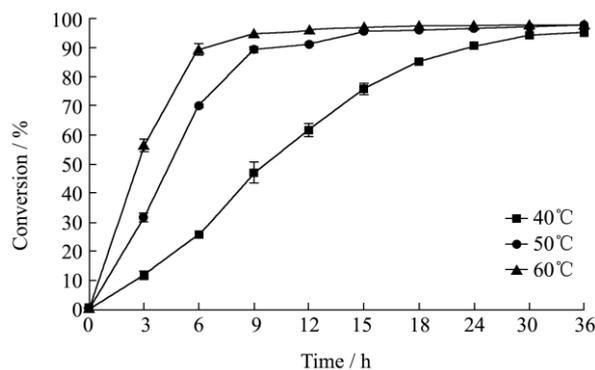


图7 底物浓度对维生素 E 醋酸酯合成的影响

Fig.7 Effect of substrate concentration on the synthesis of vitamin E acetate

控制 D- α -生育酚含量一定,改变反应体系中乙酸酐的添加量,考察了底物浓度对维生素 E 醋酸酯合成的影响。反应温度 60 °C,反应时间 9 h。从结果中可以看到,随着乙酸酐添加量的增加, D- α -生育酚的转化率不断提高,在乙酸酐添加量为 1 mL 时转化率达到最大;之后继续增加乙酸酐含量对 D- α -生育酚的转化率的提高没有明显影响,猜测可能是因为反应体系中酶与底物分子的结合达到了饱和状态(图 7)。CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的最适底物浓度为 1 mL 乙酸酐/200 mg D- α -生育酚。

2.4.4 脂肪酶添加量对维生素 E 醋酸酯合成的影响

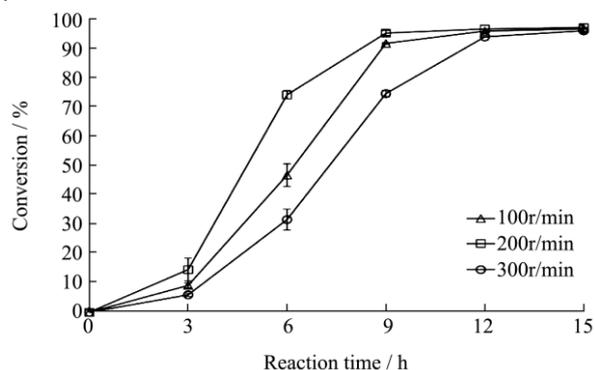


图8 脂肪酶添加量对维生素 E 醋酸酯合成的影响

Fig.8 Effect of lipase dosage on the synthesis of Vitamin E acetate

接下来,考察了脂肪酶添加量对维生素 E 醋酸酯合成的影响。反应条件为: 200 mg D- α -生育酚、1 mL

乙酸酐、反应温度 60 °C, 反应时间 9 h。随着 CRL1 添加量从 25 mg 逐渐增加到 100 mg, D- α -生育酚的转化率从 57.42% 逐渐提高到 97.62%; 之后继续增加 CRL1 添加量, D- α -生育酚的转化率维持在 97.00% 左右, 可能是因为该条件下处于活跃状态的底物分子已经被过量的酶结合完全(图 8)。CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的最适脂肪酶添加量为 100 mg。

截至目前, 关于酶法合成维生素 E 醋酸酯的研究较少。Torres 等^[15]以 Novozym 435 为催化剂, 在叔戊醇溶剂中催化 D- α -生育酚和乙酸乙酯转酯反应生成维生素 E 醋酸酯, 连续反应 18 d, 转化率只有 65%。龚等^[24]以实验室自制固定化假丝酵母脂肪酶为催化剂, 在石油醚溶剂中催化 D- α -生育酚和乙酸乙酯转酯反应生成维生素 E 醋酸酯, 转化率达到 95%, 但是反应时间需要 72 h, 难以满足工业化生产条件。本研究通过对无溶剂体系中重组 CRL1 催化合成维生素 E 醋酸酯的主要影响因素进行逐步优化, 确定最适反应条件为: 200 mg D- α -生育酚、1 mL 乙酸酐、100 mg CRL1、反应温度 60 °C、转速 200 r/min、反应时间 9 h, D- α -生育酚的转化率可达到 97.00% 以上, 具有良好的工业化应用前景。

3 结论

皱褶假丝酵母脂肪酶在工业生产中具有广泛的应用。本研究系统研究了皱褶假丝酵母脂肪酶 CRL1 在毕赤酵母中的表达、纯化、酶学性质以及催化应用。通过对 AOX1 启动子和 α 分泌信号肽同时进行改造, CRL1 在毕赤酵母中的表达水平由 39.73 U/mL 提高到 63.63 U/mL, 相对提高 60.18%。建立了超滤浓缩、硫酸铵沉淀后脱盐和阴离子交换层析三步法纯化重组 CRL1 的方法, 纯化后 CRL1 的比酶活达到 984.52 U/mg。重组 CRL1 的最适温度和最适 pH 分别为 45 °C 和 7.5, 经 45 °C 保温 6 h 仍保留 52.99% 的相对活力, 在偏酸性环境中较为稳定。以重组 CRL1 为催化剂, 建立并优化了在无溶剂体系中高效合成维生素 E 醋酸酯的绿色方法, 最适反应条件为: 200 mg D- α -生育酚、1 mL 乙酸酐、100 mg CRL1、反应温度 60 °C、转速 200 r/min、反应时间 9 h, D- α -生育酚的转化率可达到 97.00% 以上, 具有良好的工业化应用前景。

参考文献

- [1] Akoh C C, Lee G C, Shaw J F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms [J]. *Lipids*, 2004, 39(6): 513-526
- [2] Alcantara A R, Maria P D D, Fernandez M, et al. Resolution

- of racemic acids, esters and amines by *Candida rugosa* lipase in slightly hydrated organic media [J]. *Food Technology & Biotechnology*, 2004, 42(4): 343-354
- [3] Feng S, Cheng P, Li G L, et al. Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid [J]. *Renewable Energy*, 2016, 90: 329-335
- [4] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235-251
- [5] Vorlová S, Bornscheuer U T, Gatfield I, et al. Enantioselective hydrolysis of d,l-menthyl benzoate to l-(-)-menthol by recombinant *Candida rugosa* lipase LIP1 [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2002, 344(10): 1152-1155
- [6] Li X, Jiang X, Yang J, et al. Cloning of a novel lipase gene, lipJ08, from *Candida rugosa* and expression in *Pichia pastoris* by codon optimization [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(2): 269-276
- [7] Alberghina L, Lotti M. Cloning, sequencing, and expression of *Candida rugosa* lipases [J]. *Methods in Enzymology*, 1997, 284: 246
- [8] Chang S W, Lee G C, Shaw J F. Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(3): 815
- [9] López N, Pernas M A, Pastrana L M, et al. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media [J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(1): 65-73
- [10] Domínguez d M P, Sánchez-Montero J M, Sinisterra J V, et al. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(2): 180-196
- [11] Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, et al. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase [J]. *Protein Science*, 1998, 7(6): 1415-1422
- [12] Li X, Liu Z, Wang G, et al. Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris* [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2016, 82: 115-124
- [13] Chang S W, Shieh C J, Lee G C, et al. Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa* LIP1 gene and optimum production of recombinant LIP1 expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2005, 67(2): 215
- [14] Schwarzhans J P, Luttermann T, Geier M, et al. Towards

- systems metabolic engineering in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(6): 681-710
- [15] Torres P, Reyes-Duarte D, López-Cortés N, et al. Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(2): 145-153
- [16] Yin Chunhua, Zhang Cong, Gao Ming. Enzyme-catalyzed synthesis of vitamin E succinate using a chemically modified novozym-435 [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2011, 19(1): 135-139
- [17] 胡传荣,李洪涛,付晶,等.天然维生素 E 乙酸酯的制备[J].现代食品科技,2005,21(2):85-87
HU Chuan-rong, LI Hong-tao, FU Jing, et al. Preparation of natural vitamin E acetate [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2005, 21(2): 85-87
- [18] 金萱.天然维生素 E 酯的制备工艺研究[D].杭州:浙江大学,2005
JIN Xuan. Preparation of natural vitamin E esters [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005
- [19] Bonrath W, Giraudi L. Process for the manufacture of tocyl and tocopheryl acylates: US, US7321053 [P]. 2008
- [20] Cheng L, Ying L, Zheng X, et al. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris* [J]. *BMC Biotechnology*, 2015, 15(1): 1-11
- [21] Hartner F S, Ruth C, Langenegger D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(12): e76
- [22] Kjeldsen T, Pettersson A F, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 1999, 29(1): 79
- [23] Zhang L, Liang S, Zhou X, et al. Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2013, 79(18): 5519-26
- [24] 龚学兵.脂肪酶催化合成天然维生素 E 酯的研究[D].北京:北京化工大学,2007
GONG Xue-bing. Lipase catalyzed synthesis of natural vitamin E esters [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2007