

组合策略提 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶在毕赤酵母中的分泌表达 及其催化制备生物柴油的应用

许蕊 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:【目的】构建高效分泌表达疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)脂肪酶 TLL 的毕赤酵母(*Pichia pastoris*)工程菌, 实现脂肪酶的高水平表达, 以降低生物催化剂的制备成本。将获得的脂肪酶 TLL 用于催化制备生物柴油, 考察其催化活性, 为生物酶法生产生物柴油提供参考。【方法】采用多种策略来提高毕赤酵母中脂肪酶 TLL 的表达水平。首先对基因表达元件进行了筛选, 比较了不同信号肽的分泌效率、不同启动子的启动强度和不同基因剂量对脂肪酶分泌表达的影响。然后对重组菌的发酵参数进行调控, 包括培养基初始 pH、诱导温度、诱导 OD₆₀₀、甲醇浓度和表面活性剂等。为了降低发酵成本, 采用生物柴油生产过程中产生的副产物粗甘油作为碳源。此外, 为了减轻甲醇对细胞生长的抑制作用, 在所构建的重组菌中额外引入一个由组成型启动子 P_{GCW14} 控制的表达盒, 并采用了甲酯缓释甲醇一步诱导策略。由于毕赤酵母自身分泌的背景蛋白较少, 可将获得的发酵上清液直接用于催化制备生物柴油。【结果】通过基因工程方法获得了一株含有 AOX1 启动子、MFΔ 信号肽、4 拷贝 *tll* 基因和共表达透明颤菌(*Vitreoscilla*) 血红蛋白 VHb 的毕赤酵母重组菌, 在诱导表达 96 h 后, 获得 1530 U/mL 的脂肪酶酶活。对发酵参数进行进一步调控, 获得的重组菌在最优发酵条件下, 即培养基中以粗甘油作为碳源, 初始 pH 为 6.0, 并添加 0.1% (w/v) Tween 80 表面活性剂, 在 OD₆₀₀ 为 3.0 时, 于 25 °C 的诱导温度下, 每 24 h 添加 1% (v/v) 的甲醇进行诱导。发酵 192 h 后, 发酵上清液中的总蛋白含量为 1.2 g/mL, 发酵酶活达到 7700 U/mL。采用甲酯缓释甲醇一步诱导策略时, 比较了甲醇、油酸甲酯、生物柴油分别作诱导物时, 对脂肪酶 TLL 表达水平的影响。发现以 1% (v/v) 生物柴油为诱导物时, 脂肪酶表达水平最高, 发酵 192 h 后, 总蛋白含量为 1.4 g/mL, 酶活达到 8700 U/mL, 较原始菌株提高了 29 倍。以发酵上清液在无溶剂体系中催化麻风树籽油制备生物柴油, 在粗酶液用量为 30 U/g, 含水量为 20% (w/w), 甲醇/油的摩尔比为 4:1, 甲醇分 3 步添加的条件下, 在 35 °C 下反应 60 h, 生物柴油得率达到 96%。【结论】采用粗甘油作为碳源, 通过基因工程和发酵调控实现了脂肪酶 TLL 在毕赤酵母中的高效表达, 提出的甲酯缓释甲醇一步诱导策略能够缓解高浓度甲醇诱导带来的菌体生长抑制问题, 所获得的发酵上清液可直接用于催化制备生物柴油, 为生物酶法制备生物柴油提供了高效廉价的生物催化剂。

关键词: 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶; 毕赤酵母; 非甲醇诱导; 生物柴油

Multiple strategies for high-efficiency expression of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* and production of biodiesel in solvent-free system

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was to construction a recombinant *Pichia pastoris* to high level secretion expression *Thermomyces lanuginosus* lipase to reduce the cost of biocatalyst. In order to identify the catalytical activity, the obtained TLL was applied to produce biodiesel using *Jatropha curcas* oil as substrate. 【Method】 In this study, multiple strategies were used to improve the expression level of TLL in *P. pastoris*. Firstly, the effects of gene expression elements, including signal peptides, promoters and the gene doses, on lipase secretion expression were compared. Then, the fermentation parameters of the recombinant strain were regulated, including the initial pH of the culture medium, the induction temperature, the induction OD₆₀₀, the methanol concentration and the addition of surfactant. To reduce the fermentation cost, crude glycerol, a by-product of biodiesel production, was used as the carbon source. In addition, in order to alleviate the inhibitory effect of methanol on cell growth, an additional expression cassette controlled by the constitutive promoter P_{GCW14} was introduced into the recombinant strain, and a one-step induction strategy was adopted. Because *P. pastoris* secreted less background protein, the obtained fermentation supernatant could be directly used as catalyst in biodiesel production. 【Result】 A recombinant *P. pastoris* with MFΔ signal peptide, 4 copies of *tll* gene and co-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin was constructed by genetic engineering. After 96 h of induction, 1530 U/mL of lipase activity was obtained. The

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFB1504002)

* 王飞为通讯作者

fermentation parameters were further optimized. Under the optimal fermentation parameters, the culture medium contains crude glycerol as the carbon source and 0.1% (w/v) Tween 80, the initial pH was 6.0, 1% (v/v) methanol was added every 24 h for induction at 25 °C when the OD₆₀₀ was 3.0. After 192 h of fermentation, the total protein content in the fermentation supernatant was 1.2 g/mL, and the lipase activity reached 7700 U/mL. The effects on TLL expression were compared when methanol, methyl oleate and biodiesel were used as inducers. The highest expression level was observed when 1% (v/v) biodiesel was used as inducer. After fermentation for 192 h, the total protein content was 1.4 g/mL, and the lipase activity reached 8700 U/mL, which was 29-fold higher than that of the original strain. Moreover, the fermentation supernatant can be directly used in solvent-free system to produce biodiesel from *J. curcas* oil. The highest biodiesel yield of 96 % was achieved after 60 h at 35 °C with TLL concentration of 30 U/g oil, water content of 20 % (w/w) and step-wise addition of methanol (methanol to oil ratio of 4:1). **【Conclusion】** When using crude glycerol as carbon source, TLL was efficiently expressed in *P. pastoris* by genetic engineering and fermentation regulation. The proposed one-step induction strategy could alleviate the growth inhibition caused by induction with high concentration of methanol. The fermentation supernatant could be directly used as biocatalyst. This study provides an efficient and low-cost biocatalyst for the biodiesel production by enzymatic route.

Key words: *Thermomyces lanuginosus* lipase; *Pichia pastoris*; non-methanol induction; biodiesel.

随着化石资源的枯竭和环境污染问题的日益突出, 生物柴油作为一种清洁、可再生的生物质燃料日益受到人们的重视。与化学法相比, 生物酶法生产生物柴油具有反应条件温和、生物催化剂无毒、产物易于分离等优点, 是一条可持续发展的生产路线 (Miotti Jr *et al.*, 2022)。疏棉状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*) 脂肪酶 TLL 在生物柴油生产、油脂改性、手性拆分等多个工业领域得到广泛应用 (Noro *et al.*, 2021)。在生物柴油的生产中, TLL 具有同时进行酯交换和酯化反应生成脂肪酸甲酯的能力, 对不同来源和性质的原料具有广泛的适用性。尽管 TLL 具有这些优势, 但脂肪酶的高制备成本仍然是生物酶法工业化生产生物柴油的主要障碍。脂肪酶的成本由催化活性、表达水平和制备方法决定。因此, 实现脂肪酶 TLL 的高水平表达和降低生产成本将推动酶催化途径的工业化应用。

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 具有翻译后修饰、易于高密度培养、背景蛋白少等优点, 是外源蛋白生产中最常用的表达系统之一 (Yang & Zhang, 2018)。外源蛋白在毕赤酵母中的表达受多种因素的影响, 如启动子强度、分泌信号肽效率、基因剂量、培养 pH、温度、溶氧、甲醇诱导浓度等 (Fischer & Glieder, 2019)。此外, 透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 血红蛋白 VHb 是一种末端氧化酶 (Wang *et al.*, 2020), 可以促进氧气的输送, 从而改善细胞呼吸和能量代谢。因此, VHb 广泛应用于提高发酵过程中代谢物的积累。TLL 在毕赤酵母中的表达水平通过共表达脂肪酶同工酶并添加一个五肽序列获得了提高, 达到 483.29 U/mL (Cai *et al.*, 2017)。一株含有 7 拷贝 *tlI* 基因的重组菌, 在最优发酵条件下, 脂肪酶酶活达到 6600 U/mL, 为目前报道的最高水平 (Fang *et al.*, 2014)。

醇氧型启动子 AOX1 是一种受甲醇严格调控的高强度启动子, 被广泛用于异源蛋白在毕赤酵母中的表达。为了避免过量甲醇导致细胞活力降低, 通常采用分步添加甲醇的诱导方式, 但诱导过程繁琐, 存在染菌风险。为了避免这些问题, 一种甲醇和甲酯两步诱导策略被提出 (Kumari & Gupta, 2014), 在培养过程中, 先加入少量甲醇激活 P_{AOX1} 表达脂肪酶, 随后加入油酸甲酯, 油酸甲酯经脂肪酶水解成脂肪酸和甲醇, 脂肪酸作为碳源被利用, 而甲醇则继续激活 P_{AOX1} 诱导脂肪酶表达, 使得脂肪酶活性提高 20-40%。然而, 这种两步诱导策略仍然需要额外添加甲醇。

因此, 本研究为了提高脂肪酶 TLL 在毕赤酵母中的表达水平, 采用了基因工程技术和发酵调控方法。此外, 为了缓解菌株的生长抑制问题, 在所构建的重组菌中引入一个由组成型启动子控制的表达盒, 并提出了以甲酯缓释甲醇的一步诱导的策略。研究了脂肪酶 TLL 在无溶剂体系中催化麻疯树籽油制备生物柴油的最佳工艺条件, 为生物柴油的酶法制备提供了高效的催化剂和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实 材料

大肠杆菌 Top 10F'用于质粒构建, 毕赤酵母 KM71H 和载体 pPICZαA、pGAPZA 用于蛋白的异源表达, 所用菌株均为本实验室保藏。本研究使用的培养基 YPDS、BMGY 和 BMMY, 按照 EasySelect™ 毕赤酵母表达试剂盒手册制备。*tll* 基因 (Genbank 登录号: AFO54513.1)、*vgb* 基因 (Genbank 登录号: AY278220)、信号肽和启动子基因由上海生工生物有限公司合成。

限制性内切酶购自北京 NEB 公司。对硝基苯月桂酸酯 (*p*-NPL)、脂肪酸甲酯标准品、甲醇和正己烷购自 Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司。麻风树籽油为实验室自制, 其 FFA 含量为 7.2%, 酸值为 13.9 mg KOH/g, 皂化值为 226.9 mg KOH/g, 密度为 0.91 g/cm³, 含水量为 0.3%。粗甘油是生物柴油生产过程中的副产物, 由中国林科院林产化学工业研究所馈赠。粗甘油纯度为 96.7%, 含水量为 1.5%, 含 0.8% 的钾盐和 0.5% 的其它有机物。

1.2 研究方法

1.2.1 脂肪酶 TLL 在毕赤酵母中的表达 重组质粒经限制性内切酶 *Sac*I 线性化后, 电转化毕赤酵母 KM71H 感受态细胞。用含有 100 μg/mL 博来霉素抗性的 YPDS 平板和含有 3% 三辛酸甘油酯的平板筛选活性较高的阳性转化子。将筛选出的转化子接种于 BMGY/BMMY 培养基中, 每 24 h 加入终浓度为 0.5% (v/v) 的无水甲醇。采用甲酯诱导时, 将 BMMY 培养基中的甲醇替换为 0.5-8.6% (v/v) 的油酸甲酯或生物柴油。

1.2.2 脂肪酶酶活的测定 以 *p*-NPL (C12) 为底物, 参照文献 (Qu et al., 2022) 中的方法, 以分光光度法测定脂肪酶酶活。取 180 μL PBS 缓冲液 (pH 7.5), 加入 10 μL 20 mM *p*-NPL 异丙醇溶液, 于 40 °C 预热 5 min。加入 10 μL 适当稀释的酶液, 准确反应 5 min 后加入 600 μL 1 M Na₂CO₃ 溶液。12000 rpm 离心 3 min 后, 取 200 μL 反应液测定其在 410 nm 处的吸光值。酶活 (U) 定义为在反应条件下, 每分钟释放 1 μmol 对硝基苯酚 (*p*-NP) 所需的酶量。

1.2.3 生物柴油的制备与分析 于 25 mL 具塞茄形瓶中加入 5 g 麻风树籽油, 加入一定量的脂肪酶 (10-50 U/g)、水 (10-80%, w/w) 和甲醇 (3:1-6:1, mol/mol), 于 30-45 °C 的水浴摇床中 180 rpm 振荡反应 72 h。

每 12 h 取 100 μL 样品, 离心后取 50 μL 上层油相, 加入 50 μL 10 mg/mL 十七烷酸甲酯 (内标), 加入正己烷至 500 μL。采用 Agilent-7890A 气相色谱仪, 配备 FID 检测器和 DB-WAX 气相色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm, Agilent)。气相分析方法参照文献 (Xu et al., 2023)。柱箱温度为 150 °C, 保持 0.5 min, 25 °C/min 程序升温升至 190 °C; 然后以 4 °C/min 程序升温到 225 °C; 随后以 2 °C/min 程序升温到 240 °C, 保持 3 min。进样口温度为 260 °C, 进样量为 1 μL, 分流比 50:1。生物柴油得率 (%) 定义为脂肪酸甲酯与原料油的质量百分比。

1.3 统计分析

所有的试验和样本都重复进行三次。采用 IBM SPSS 20.0 软件进行统计学分析。显著性差异 ($P < 0.05$), 采用单因素方差分析和 Duncan's 多极差检验。数据采用 Microsoft Excel 2010 和 MicroCal Origin 8.5 软件处理, 以平均值 ($n = 3$) ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 表达脂肪酶 TLL 的毕赤酵母 组菌的构建

为了构建高效表达脂肪酶 TLL 的毕赤酵母重组菌, 比较了不同的启动子、信号肽和 *tll* 基因拷贝数以及共表达 Vhb 蛋白对 TLL 分泌表达的影响。除了考察不同的基因剂量时, 其它重组菌株所整合的 *tll* 基因均通过 qPCR 确定为单拷贝。

首先，选择 7 种不同的信号肽比较其对 TLL 表达的影响。以含有 α -MF 信号肽的重组菌 KT 为对照。如图 1a 所示，只有菌株 KT/MFH 的产量下降了 8%。和 KT 相比，重组菌 KT/M α ，KT/SP23，KT/MF4I，KT/Ost1 的相对 TLL 酶活分别为 347%、464%、204%、400%。菌株 KT/MF Δ 获得的 TLL 酶活是 KT 的 3.86 倍。启动子影响毕赤酵母的转录效率和外源蛋白的表达，本研究选取 2 个诱导型启动子 P_{AOX1} 和 P_{FLD1}，以及 5 个组成型启动子 P_{GAP}、P_{PDC}、P_{PyK}、P_{G1} 和 P_{P9}，考察启动子对 TLL 表达的影响。以含有 P_{AOX1} 启动子的菌株 KT/MF Δ 为对照，与之相比，不同启动子控制下所表达的脂肪酶 TLL 的相对酶活在 7%到 103%之间（图 1b）。菌株 KT/MF Δ 和 KT/FLD1 所获得的脂肪酶活性几乎相同，且均明显高于含有组成型启动子的菌株。此外，目的基因的拷贝数可以显著影响异源蛋白的表达水平，多拷贝策略已被证明是有效的。菌株 2c、3c、4c、5c 分别携带了 2、3、4、5 个拷贝数的 *tll* 基因。以单拷贝的重组菌株 KT/MF Δ 为对照。如图 1c 所示，当 *tll* 基因拷贝数从 1 增加到 4 时，重组菌分泌表达的 TLL 酶活提高了 91%，从 594 U/mL 增加到 1135 U/mL。而菌株 5c 所获得的 TLL 酶活没有进一步提高，甚至低于菌株 2c。在此基础上，本研究构建了共表达 VHb 蛋白的重组菌 4c/v，如图 1d 所示，诱导 96 h 后，重组菌 4c/v 获得的 TLL 酶活达到 1507 U/mL，比对照菌 4c 高 33%。总而言之，本研究构建了一个含有 4 个 *tll* 基因拷贝数并共表达 VHb 蛋白的重组菌株 4c/v。在重组菌 4c/v 中，TLL 在启动子 P_{AOX1} 和信号肽 MF Δ 的控制下分泌表达。

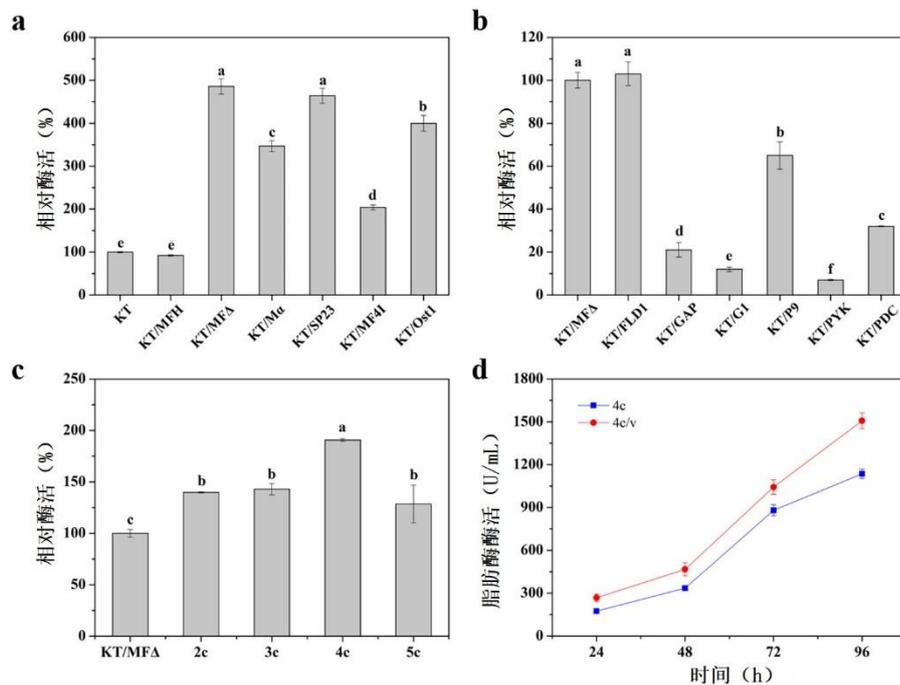


图 1 表达脂肪酶 TLL 的毕赤酵母工程菌的构建

Fig. 1 Construction of recombinant strains with great expression capacity of TLL

(a) 信号肽, (b) 启动子, (c) 基因剂量, (d) VHb 蛋白对重组菌表达 TLL 的影响。不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Effects of (a) signal peptides, (b) promoters, (c) gene dosage and (d) VHb on TLL expression. Different letters indicate values that are significantly different ($P < 0.05$).

2.2 脂肪酶 TLL 在毕赤酵母中的分泌表达

外源蛋白在毕赤酵母中的分泌表达受 pH、温度、通气量、接种量和发酵时间等多种发酵参数的影响。为了得到最优的摇瓶培养条件，以重组菌 4c/v 为种子，优化了培养基初始 pH、诱导温度、诱导 OD₆₀₀、甲醇添加量。如图 2 所示，最优的培养条件是培养基初始 pH 为 6.0，当 OD₆₀₀ 为 3.0 时在 25 °C 下诱导，每 24 h 加入 1% (v/v) 无水甲醇。

此外，在发酵培养基中添加表面活性剂可以减小水的表面张力，防止蛋白在发酵液中聚集，保护目的

蛋白不被降解。同时，还会影响宿主细胞膜的通透性，保证目的蛋白的有效分泌。如图 2e 所示，在加入 0.1% (w/v) 非离子表面活性剂 Tween-80 后，TLL 的酶活提高了 56%。为了降低脂肪酶的生产成本，使用生产生物柴油的副产物粗甘油替代 BMGY 中的精制甘油。从图 2f 中可以看出，在分别含有精制甘油和粗甘油的 BMGY 培养基中，重组菌 4c/v 的生长 OD_{600} 和分泌表达的脂肪酶 TLL 的酶活几乎相同，证明了粗甘油用于毕赤酵母菌发酵产酶的可行性。因此，在随后的实验中，均用粗甘油代替精制甘油。重组菌 4c/v 在最优摇瓶发酵条件下培养 192 h，脂肪酶 TLL 的蛋白量为 1.2 g/L，酶活达到 7700 U/mL。

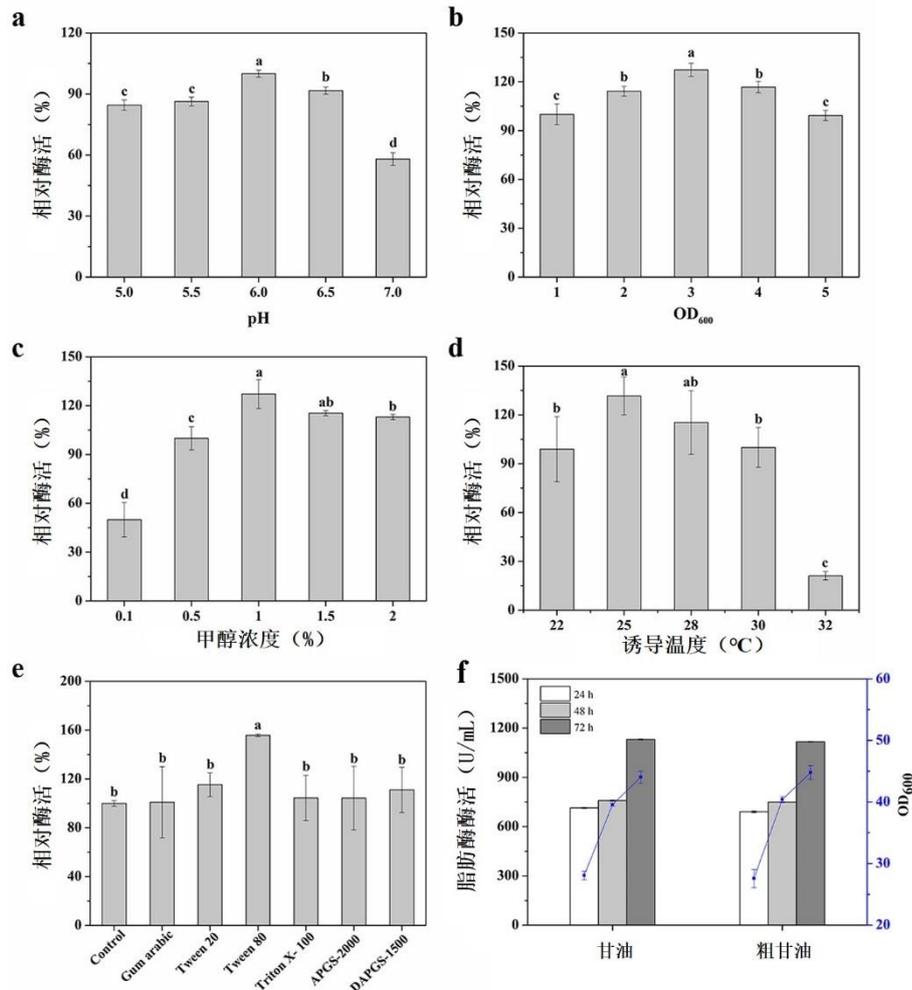


图 2 摇瓶培养条件对 组菌 TLL 酶活的影响

Fig. 2 Effects of culture conditions on secretory expression of TLL in shaking flasks

摇瓶培养条件 (a) 初始 pH, (b) 诱导 OD_{600} , (c) 甲醇浓度, (d) 诱导温度, (e) 表面活性剂, (f) 粗甘油对 TLL 表达的影响。不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Effects of culture conditions (a) initial pH, (b) OD_{600} , (c) methanol concentration, (d) induction temperature, (e) surfactant, (f) crude glycerol on TLL expression. Different letters indicate values that are significantly different ($P < 0.05$).

2.3 甲酯缓 甲 一步诱导策略

2.3.1 双启动子表达系统的构建 为了简化之前的研究中提出的甲酯缓释甲醇两步诱导法，本研究提出了甲酯一步诱导策略。为此，在所构建的重组菌 4c/v 中，引入了一个由启动子 P_{GCW14} 控制的表达盒，构建了一个双启动子表达系统，获得了重组菌 4c+g/v。经 qPCR 验证，菌株 4c+g/v 携带 5 拷贝的 *tll* 基因。首先研究了重组菌 4c+g/v 中的拷贝数增加对脂肪酶 TLL 表达的影响。如图 3 所示，在最佳培养条件下，经甲醇诱导 96 h 后，重组菌 4c+g/v 获得的 TLL 酶活比 4c/v 提高了 20%，比仅整合了 P_{GCW14} 启动子控制的表达盒的菌株 g/v 提高了 1.2 倍。

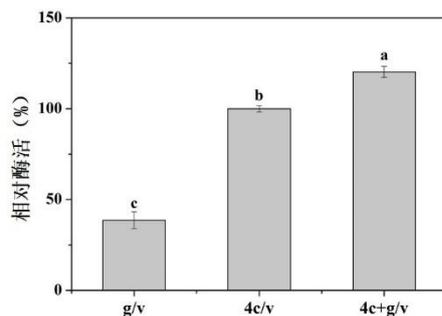


图3 组菌 g/v, 4c/v, 4c+g/v 在甲 诱导下表达脂肪酶 TLL

Fig. 3 Secretory expression of TLL in strains g/v, 4c/v and 4c+g/v induced with methanol

不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$). Different letters indicate values that are significantly different ($P < 0.05$).

2.3.2 甲酯诱导表达脂肪酶 TLL 甲酯一步诱导策略是在所构建的双启动子表达系统的基础上实现的。重组菌 4c+g/v 在启动子 P_{GCW14} 的控制下, 在菌体生长的同时表达了一定量的 TLL。随后, 分泌表达的 TLL 将培养基中的甲酯水解成甲醇和脂肪酸, 甲醇激活 P_{AOX1} 启动子进一步提高了 TLL 的产量。采用甲酯一步诱导策略时缓慢且持续释放甲醇, 以低浓度甲醇稳定表达脂肪酶 TLL, 而无需额外添加甲醇。另一种水解产物脂肪酸被用作碳源, 使重组菌获得了更高的生长 OD₆₀₀。以每 24 h 加入 1% (v/v) 甲醇诱导时所获得 TLL 表达水平为对照, 研究了不同浓度的油酸甲酯对脂肪酶 TLL 表达的影响。如图 4a 所示, 当添加 0.5% (v/v) 的油酸甲酯时, 获得的 TLL 酶活较甲醇诱导时降低了 20%。随着油酸甲酯浓度从 1% 增加到 8.3% (v/v), TLL 酶活略有下降。当油酸甲酯添加量为 1% (v/v) 时, 获得的脂肪酶酶活最高, 比对照提高了 9%。有趣的是, 添加 1% (v/v) 生物柴油时, 脂肪酶 TLL 的表达水平比添加相同量的油酸甲酯时提高了 28% (图 4b)。以 1% (v/v) 浓度的生物柴油诱导 192 h 时, 重组菌 4c+g/v 的发酵上清液中总蛋白浓度为 1.4 g/L, 脂肪酶酶活达到 8700 U/mL。

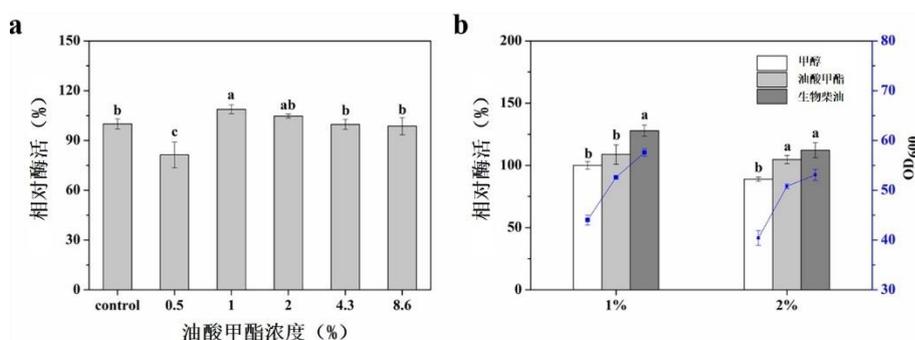


图4 甲酯诱导 组菌 4c+g/v 分泌表达脂肪酶 TLL

Fig. 4 Secretory expression of TLL in the strain 4c+g/v induced with methyl esters

(a) 不同浓度的油酸甲酯, (b) 甲醇、油酸甲酯、生物柴油对脂肪酶 TLL 表达的影响。不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Effects of (a) the concentration of methyl oleate, (b) methanol, methyl oleate and biodiesel on secretory expression of TLL. Different letters indicate values that are significantly different ($P < 0.05$).

2.4 脂肪酶催化制备生物柴油

本研究以不可食用的木本油脂麻风树籽油为原料, 在无溶剂体系中, 直接使用粗酶液为催化剂, 考察了反应条件对生物柴油得率的影响。

一般来说, 高浓度的脂肪酶酶会促进反应, 但含量较低的脂肪酶用量有利于降低生物柴油的生产成本。如图 5a 所示, 当 TLL 用量从 10 U/g 增加至 30 U/g 时, 生物柴油得率随之提高, 反应 72 h 后达到 88.9%。因此, 脂肪酶 TLL 的最佳用量为 30 U/g。维持酶的构象灵活性和提供足够的反应界面需要一定量的水。当水含量增加到 20% (w/w) 时, 反应 72 h 后生物柴油得率最高, 达到 99.0% (图 5b)。当水含量进一步增加, 生物柴油得率不断下降。如图 5c 所示, 考察了 30-40 °C 区间内生物柴油产率与反应温度之间的关系。

当反应温度从 30 ℃ 升高到 35 ℃, 生物柴油得率随着温度的增加而增加, 72 h 后达到 96.1%。然而, 当反应温度超过 35 ℃, 生物柴油得率明显下降, 40 ℃ 时下降了 8.4%。酯交换反应的化学计量学要求每 1 mol 甘油三酯需要 3 mol 甲醇。更高浓度的甲醇使化学平衡向 FAMES 合成的方向移动, 然而过量的酒精可能导致脂肪酶失活。首先, 研究了甲醇/油摩尔比对生物柴油产量的影响。总甲醇分成 3 等分, 分别在 0、12、24 h 加入到反应混合物中。当甲醇/油摩尔比从 3:1 逐渐增加到 4:1 时, 生物柴油产率逐渐增加, 72 h 后产率最高达到 99.2% (图 5d)。然而, 当醇油比达到 5:1 时, 生物柴油的产率降低了 1.8%。通常采用分步添加甲醇来保持相对较低的甲醇浓度, 如图 5e 所示, 甲醇添加方式 10, 即在 0 h 和 16 h 加入醇油比为 1:1 的甲醇, 在 8 h 加入醇油比为 2:1 的甲醇时, 生物柴油得率最高, 反应 60 h 达到 96.1%, 72 h 后达到 99.1%。

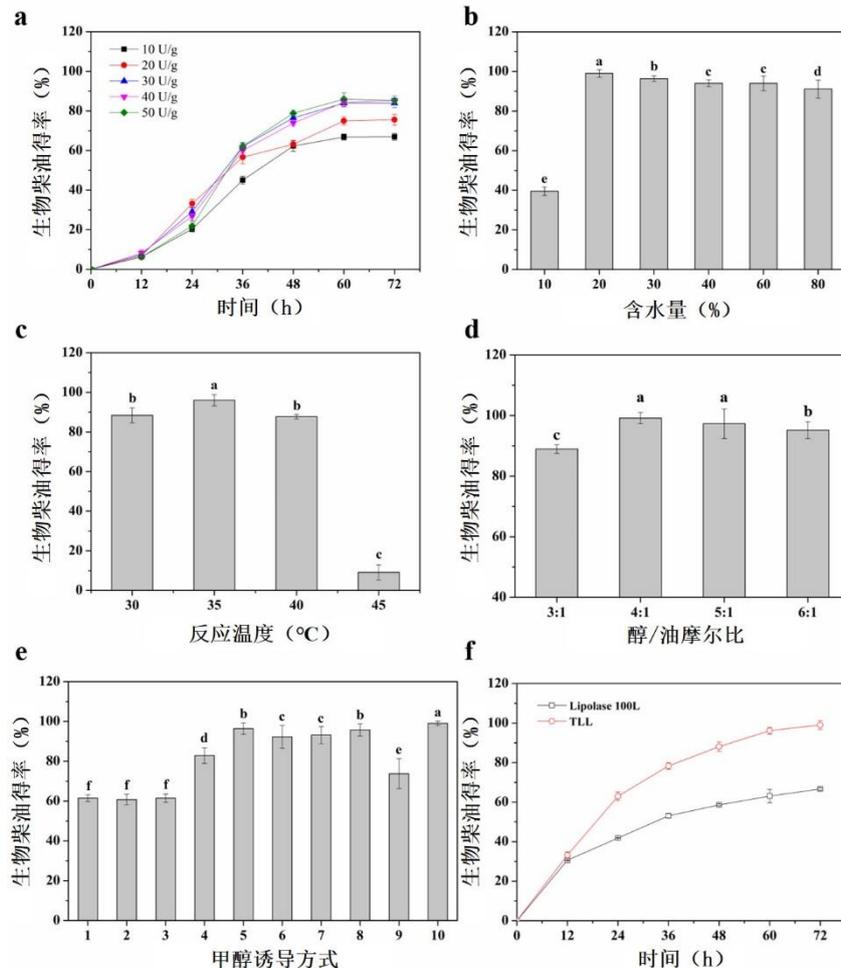


图 5 TLL 催化 树籽油制备生物柴油的反应条件优化 (a) 脂肪酶添加量, (b) 含水量, (c) 温度, (d) 油比, (e) 甲醇添加方式对生物柴油得率的影响; (f) 最优反应条件下脂肪酶 TLL 和 Lipolase 100L 对生物柴油得率的影响

Fig. 5 Optimization of the reaction conditions in biodiesel production from *J. curcas* oil catalyzed by TLL

(a) 脂肪酶添加量, (b) 含水量, (c) 反应温度, (d) 醇油摩尔比, (e) 甲醇添加方式, (f) 脂肪酶 Lipolase 100L 对生物柴油得率的影响。不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Effects of (a) enzyme loading, (b) water content, (c) temperature, (d) methanol/oil ratio, (e) methanol addition method, (f) Lipolase 100L on biodiesel yield. Different letters indicate values that are significantly different ($P < 0.05$).

因此, 脂肪酶 TLL 催化麻风树籽油制备生物柴油最佳的反应条件是在无溶剂反应体系中添加 30 U/g 脂肪酶, 40 wt% 水, 每隔 8 h 分 3 步加入醇油摩尔比为 4:1 的甲醇, 在 35 ℃ 下反应 60 h。如图 5f 所示, 在相同的反应条件下, 商品酶 Lipolase 100L 表现出较低的活性, 72 h 后仅获得 67% 的生物柴油得率。

3 讨论

3.1 基因表达元件对重组菌异源表达蛋白水平的影响

在毕赤酵母重组菌中表达脂肪酶 TLL 时, 发现 MF Δ 信号肽的分泌效率最高。类似的结果也在之前报道的研究中观察到(Lin-Cereghino *et al.*, 2013), 当使用 MF Δ 信号肽时, 辣根过氧化物酶和南极念珠菌(*Candida antarctica*) 脂肪酶 B 的产量至少增加了 50%。可能是由于 MF Δ 信号肽去除了第二 α 螺旋, 从而增加了相互作用的 loop 区域的灵活性(Chahal *et al.*, 2017)。在考察不同启动子的强度时, 发现诱导型启动子的强度均高于组成型启动子, 而启动子 P_{AOX1} 和 P_{FLD1} 对脂肪酶 TLL 的表达强度几乎一样, 由于 P_{AOX1} 启动子是毕赤酵母中调控最严格、应用最广泛的启动子, 因此, 选择 P_{AOX1} 进行进一步的实验。在毕赤酵母中表达来源于地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 的几丁质酶 A 时, 含有 4 拷贝目的基因的重组菌的表达量高于其它菌株(Song *et al.*, 2020)。与本研究中的结果类似, 脂肪酶 TLL 在基因剂量为 4 拷贝的重组菌中获得了更高的表达量, 而更高的基因剂量则使 TLL 的表达量大大降低, 可能的原因是高拷贝数的基因剂量会加重细胞负担, 减少蛋白胞外分泌, 说明基因剂量与目的蛋白的表达量无正相关关系(Zhou *et al.*, 2019)。胞内共表达 VHb 蛋白是缓解发酵过程中氧气限制和提高目的蛋白表达量的有效途径。与 VHb 蛋白进行共表达后, 在相同的培养条件下, 脂肪酶 TLL 的发酵酶活增加了 33%。类似地, 在表达解耶氏酵母脂肪酶 YLLip 2 时, 共表达 VHb 蛋白的重组菌在 50% 的高溶氧水平下, 脂肪酶表达水平提高了 21%(Wang *et al.*, 2019)。

3.2 双启动子表达系统对脂肪酶 TLL 表达的影响

在构建不同拷贝数的重组菌时, 发现 *tll* 基因的最佳拷贝数为 4, 当 *tll* 基因拷贝数增加到 5 时, 脂肪酶活性显著降低。在相同的培养条件下, 以甲醇诱导时, 与 4c/v 和 g/v 这两个重组菌相比, 4c+g/v 获得了更高的 TLL 酶活, 可能是得益于联合启动子的协同作用。虽然重组菌 4c+g/v 因额外引入了一个表达盒使基因剂量增加至 5 拷贝, 但由于存在两个不同功能的启动子, 结构中 RNA 聚合酶结合位点的数量增加, 同时这两个启动子位于两个不同 RNA 聚合酶识别的单个转录单元的上游(Öztürk *et al.*, 2017), 从而获得了更高的表达水平。

3.3 双启动子表达系统对脂肪酶 TLL 表达的影响

在探究不同浓度的油酸甲酯对脂肪酶表达的影响时, 发现当油酸甲酯浓度大于 1% (v/v) 时, 脂肪酶 TLL 的发酵酶活均高于甲醇诱导时。而添加 0.5% (v/v) 油酸甲酯时, TLL 的酶活低于对照, 可能是 0.5% (v/v) 的油酸甲酯浓度太低以至于不能满足重组菌 4c+g/v 的生长需求。无论诱导剂浓度如何, 以油酸甲酯或生物柴油作诱导剂时, 发酵液的 OD₆₀₀ 均高于甲醇诱导时的 OD₆₀₀。因此, 推测甲酯和水解而来的脂肪酸对细胞生长没有影响或影响很小。此外, 当甲醇消耗到低浓度时, 脂肪酸作为碳源被利用是细胞生长密度较高的另一个原因(Kumari & Gupta, 2014)。本研究通过引入组成型启动子 P_{GCW14} 对甲酯诱导策略进行了改进, 并首次将生物柴油作为分泌表达脂肪酶的诱导剂。与 TLL 的高水平表达相比, TLL 表达过程中生物柴油的投入可以忽略不计, 这表明本研究提出的一步甲酯诱导策略在经济上是可行的。尽管如此, 甲酯诱导策略仍需要进一步研究以满足长期和高密度发酵的要求。

3.4 反应条件对脂肪酶催化制备生物柴油的影响

酯交换反应参数对生物柴油产率有很大影响, 包括脂肪酶用量、含水量、反应温度、醇油摩尔比以及甲醇的加入方法。脂肪酶用量的增加可以为反应提供更多的活性位点, 但在本研究中进一步增加酶用量对生物柴油得率的影响不大, 可能是因为脂肪酶催化的反应发生在界面上(Subhedar *et al.*, 2015), 进一步增加脂肪酶用量导致反应界面饱和, 从而引起传质限制。脂肪酶在油水界面被激活, 因此一定量的水是发挥脂肪酶活性所必须的, 而过量的水可能会增加脂肪酶的灵活性(Kuo *et al.*, 2015), 激活其在水相中的水解活性, 导致酯交换反应的产量下降, 因此本研究最佳的含水量为 20%。35 °C 是粗酶液催化制备生物柴油

的最适温度，这是因为和 30 °C 相比，温度升高加速了分子扩散。而反应温度高于 40 °C 时，生物柴油得率的显著降低可能是由于脂肪酶在较高的温度下变性失活。过量的甲醇是高效反应的先决条件 (Mohiddin *et al.*, 2021)，而暴露于高浓度甲醇中会导致脂肪酶变性失活，因此本研究采用 4:1 的醇油摩尔比。在最优反应条件下，粗酶液比商品酶 Lipolase 100L 的生物柴油得率高 32%，说明本研究中制备的 TLL 是一种高效的生物催化剂，具有工业化应用前景。由于直接采用发酵上清液作催化剂，无需分离纯化步骤，且脂肪酶用量相对较低，产品在无溶剂反应体系中容易分离，该生物柴油制备过程具有工艺简单、成本低等优点。

4 结论

为了降低脂肪酶 TLL 的制备成本，通过多种策略构建了具有高表达能力的毕赤酵母重组菌。首先对信号肽、启动子和基因剂量进行优化，然后将 VHb 与 TLL 共表达，促进氧气传递。获得的重组菌株 4c/v 的 TLL 表达水平比原菌株提高了 11 倍。以生物柴油生产过程中的副产物粗甘油为碳源，进一步降低发酵成本。此外，在双启动子表达系统的基础上，提出了以油酸甲酯或生物柴油为诱导剂的一步诱导策略。当加入 1% (v/v) 生物柴油时，诱导 192 h 后，TLL 酶活达到 8700 U/mL，比原始菌株提高 29 倍。一步诱导策略易于操作，对重组菌的生长抑制较小，脂肪酶表达量较高。在无溶剂体系中，直接将发酵上清液用于催化麻风树籽油制备生物柴油。在最优反应条件下，反应 60 h，生物柴油得率最高可达 96.1%。在本工作中，脂肪酶 TLL 的高水平表达和低成本制备对酶法生产生物柴油的经济性和可持续发展具有重要意义。

参 考 文 献

- Cai H, Zhang T, Zhao M, *et al.* 2017. Co-expression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. *Letters in Applied Microbiology*, 65(4): 335-342.
- Chahal S, Wei P, Moua P, *et al.* 2017. Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Gene*, 598: 50-62.
- Fang Z, Xu L, Pan D, *et al.* 2014. Enhanced production of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* via genetic and fermentation strategies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10): 1541-1551.
- Fischer J E, Glieder A. 2019. Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 59: 175-181.
- Kumari A, Gupta R. 2014. Novel strategy of using methyl esters as slow release methanol source during lipase expression by *mut⁺ Pichia pastoris* X33. *PloS one*, 9(8): e104272.
- Kuo T C, Shaw J F, Lee G C. 2015. Conversion of crude *Jatropha curcas* seed oil into biodiesel using liquid recombinant *Candida rugosa* lipase isozymes. *Bioresource Technology*, 192: 54-59.
- Lin-Cereghino G P, Stark C M, Kim D, *et al.* 2013. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519(2): 311-317.
- Miotti Jr R H, Cortez D V, De Castro H F. 2022. Transesterification of palm kernel oil with ethanol catalyzed by a combination of immobilized lipases with different specificities in continuous two-stage packed-bed reactor. *Fuel*, 310: 122343.
- Mohiddin M N B, Tan Y H, Seow Y X, *et al.* 2021. Evaluation on feedstock, technologies, catalyst and reactor for sustainable biodiesel production: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 98: 60-81.
- Noro J, Cavaco - Paulo A, Silva C. 2021. Chemically modified lipase from *Thermomyces lanuginosus* with enhanced esterification and transesterification activities. *ChemCatChem*, 13(21): 4524-4531.
- Öztürk S, Ergün B G, Çalık P. 2017. Double promoter expression systems for recombinant protein production by industrial microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20): 7459-7475.

- Qu P P, Li D D, Lazim R, *et al.* 2022. Improved thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase by molecular dynamics simulation and in silico mutation prediction and its application in biodiesel production. *Fuel*, 327: 125039.
- Song W, Zhang N, Yang M, *et al.* 2020. Multiple strategies to improve the yield of chitinase a from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* to obtain plant growth enhancer and GlcNAc. *Microbial Cell Factories*, 19(1): 181.
- Subhedar P B, Botelho C, Ribeiro A, *et al.* 2015. Ultrasound intensification suppresses the need of methanol excess during the biodiesel production with Lipozyme TL-IM. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27: 530-535.
- Wang J, Zhang T, Li Y, *et al.* 2019. High-level expression of *Thermomyces dupontii* thermo-alkaline lipase in *Pichia pastoris* under the control of different promoters. *3 Biotech*, 9(1): 33.
- Wang S, Kamal R, Zhang Y, *et al.* 2020. Expression of Vhb improved lipid production in *Rhodospiridium toruloides*. *Energies*, 13(17): 4446.
- Xu R, Chen Z, Chen Y, *et al.* 2023. Multiple strategies for high-efficiency expression of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* and production of biodiesel in solvent-free system. *Fuel*, 333: 126246.
- Yang Z, Zhang Z. 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1): 182-195.
- Zhou Q, Su Z, Jiao L, *et al.* 2019. High-level production of a thermostable mutant of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 in *Pichia pastoris*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1): 279.