

# 南极假丝酵母脂肪酶 B 在毕赤酵母中的 效表达及其在生物柴油生产中的应用

肖敦驰<sup>1</sup> 李迅<sup>1</sup> 张瑜<sup>1</sup> 王飞<sup>1,\*</sup>

(1, 南京林业大学, 210037)

**摘要:**【目的】本研究以毕赤酵母为宿主, 构建高效表达 CALB 毕赤酵母工程菌, 实现 CALB 的大量有效分泌表达, 并用其催化地沟油生产生物柴油。【方法】首先, 体外构建了表达 CALB 的质粒, 该质粒为进行了 CALB 密码子优化后的质粒, 随即选取不同的毕赤酵母为宿主, 将质粒线性化后, 电转化导入毕赤酵母中进行分泌表达。然后, 通过查阅文献选择了 7 个不同类型的启动子, 并在原质粒的基础上进行启动子元件的更换得到新的质粒, 线性化, 电转化导入毕赤酵母中进行分泌表达。在摇瓶培养后, 离心收集上清液并比较上清液中 CALB 的脂肪酶活性和蛋白质浓度, 得出最强的启动子元件。然后, 在最强启动子的基础上比较了 5 个信号肽的分泌性能, 同样通过比较摇瓶培养后上清液中 CALB 的脂肪酶活性和蛋白质浓度, 得出最佳的启动子和信号肽组合。通过提升抗生素的浓度, 筛选出了含有 3 个 *calb* 基因拷贝数的阳性转化子, 并将该转化子进行发酵罐发酵培养。然后, 对一些培养条件进行优化, 包括温度、初始 pH 和接种量等。最后, 将表达出的脂肪酶 CALB 用作催化剂催化地沟油生产生物柴油, 优化了催化剂用量、水含量、温度和醇油摩尔比等因素。【结果】毕赤酵母 GS115 对 CALB 的表达效果略高于毕赤酵母 X-33 对 CALB 的表达效果, 在后续实验中以毕赤酵母 GS115 为表达 CALB 的宿主。对 CALB 的表达最佳的启动子和信号肽组合为启动子 *P<sub>GCW14</sub>* 和 *Ma* 信号肽, 脂肪酶活性相对于表达元件优化前提升了约 88%, 分泌到胞外的蛋白质含量也提升了近 80%。在 BSM 培养基中进行发酵培养, 在十天的发酵过程中, 发酵后的脂肪酶活性和蛋白质含量分别较最初的原始工程菌株提升了约 34 倍和 20 倍。此外, 所获得的 CALB 上清液被直接用于催化地沟油生产生物柴油, 游离脂肪酸被有效转化。【结论】本研究通过基因元件优化和培养条件优化实现了 CALB 的高效表达。此外, 所获得的 CALB 还用于催化酸化地沟油与甲醇的酯交换反应, 这为利用重组 CALB 作为生物催化剂将含有大量游离脂肪酸的废弃或低质量原料油转化为生物柴油提供了一条很有前景的途径。研究结果可为酵母中 CALB 的高效表达和提高脂肪酶产量提供参考, 这将为其他有价值蛋白质的生物生产带来新的可能性。

**关键词:** 生物柴油; 毕赤酵母; CALB; 启动子; 信号肽

## Efficient expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and its application in biodiesel production

**Abstract:** 【Objective】 In this study, *Pichia Pastoris* was used as host to construct a CALB-expressing engineering strain to achieve a large amount of effective secreted expression of CALB, and use it to catalyze the production of biodiesel from waste oil. 【Method】 Firstly, a CALB-expressing plasmid was constructed in vitro, which was a plasmid optimized with CALB codon. Then different *P. pastoris* were selected as hosts, and the plasmid was linearized and introduced into *P. pastoris* for secretion and expression by electroporation method. Then, seven different types of promoters were selected through literature review, and new plasmids were obtained by replacing promoter elements on the basis of the original plasmids, which were linearized and introduced into *P. pastoris* for secretion and expression. After culture in shake bottle, the supernatant was collected by centrifugation and lipase activity and protein concentration of CALB in the supernatant were compared to obtain the strongest promoter element. Then, the secretion performance of the five signal peptides was compared on the basis of the strongest promoter, and the optimal combination of promoter and signal peptide was obtained by comparing the lipase activity and protein concentration of CALB in the supernatant after shaking bottle culture. Then, recombinant *P. pastoris* containing 3 copies of *calb* gene were obtained by screening with high concentrations of antibiotics and cultured in fermenter. A number of culture conditions are optimized, including temperature, initial pH, and amount of inoculation. Finally, the expressed lipase CALB was used as a catalyst to catalyze the production of biodiesel from gutter oil, and the factors such as the amount of catalyst, water content, temperature and molar ratio of alcohol to oil were optimized. 【Result】 The expression effect

of *P. pastoris* GS115 on CALB was slightly higher than that of *P. pastoris* X-33 on CALB. In the following experiments, *P. pastoris* GS115 was used as the host for CALB expression. The best combination of promoter and signal peptide for CALB expression was promoter *P<sub>GCW14</sub>* and M $\alpha$  signal peptide. The lipase activity increased by about 88% compared with that before the optimization of expression elements, and the protein content secreted into the extracellular cells also increased by nearly 80%. After the ten days of fermentation culture in BSM medium, the lipase activity and protein content after fermentation increased about 34 times and 20 times, respectively, compared with the original engineering strain. In addition, the obtained CALB supernatant was directly used to catalyze the production of biodiesel from gutter oil, and the free fatty acids were effectively converted. 【Conclusion】 In this study, the efficient expression of CALB was achieved by optimizing gene elements and culture conditions. In addition, the obtained CALB was used to catalyze the transesterification of acidified gutter oil with methanol, suggesting a promising pathway to convert waste or low quality of bio-oil feedstocks with high amount of free fatty acids into biodiesel by using recombinant CALB as catalyst. The results can provide with a good reference for efficient expression of CALB and enhancing lipase production in *P. pastoris*. It is supposed to bring with new possibility for the bio-production of other valuable proteins.

**Keywords:** biodiesel; *Pichia pastoris*; CALB; promoter; signal peptide

随着石油资源的日益枯竭和环境保护的需要, 生物柴油等可再生清洁能源受到越来越多的关注(Abdul Hakim Shaah et al., 2021)。生物柴油, 又称脂肪酸甲酯, 通常由非食用油与甲醇酯化或酯交换反应而得。在众多生产方法中, 脂肪酶催化生产生物柴油因其选择性高、反应条件温和、下游加工简单, 绝对是最有前途的方法之一(Changmai et al., 2020)。脂肪酶是一种三酰基甘油酯水解酶, 广泛用于催化水解、酯化和酯交换反应, 广泛应用于食品、制药和能源工业(Le et al., 2012)。来自南极念珠菌的脂肪酶 B (CALB) 由于具有多种生物催化用途, 是目前研究和应用最广泛的脂肪酶之一。Wang 等研究了利用固定化 CALB 催化大豆油的甲醇分解, 生物柴油的产率为 68.2% (Wang et al., 2021)。Yan 等研究了 CALB 和 TLL 在酵母细胞表面的共同展示, 并利用它们催化大豆油的甲醇分解, 得到了 95.4% 的生物柴油产率(Yan et al., 2012)。然而, 市场上脂肪酶(如 Novozyme 435, 16000 元/公斤)的昂贵成本似乎是制约脂肪酶催化酯交换生产生物柴油产业化的主要障碍之一(Sun et al., 2021)。因此, 无论使用何种形式的脂肪酶作为催化剂, 确保其丰富和廉价的来源仍然是重要的。

为了克服这些瓶颈, 在过去的几十年里, 人们发现了如高质量的宿主选择、密码子优化和培养条件优化等组合策略, 以实现脂肪酶的高效表达。甲基营养型毕赤酵母绝对是生产各种异源蛋白的最优秀宿主之一(Karbalaei et al., 2020)。该酵母具有生长速度快、表达能力强、分泌性表达、不需要复杂培养基、转录后修饰等显著优势。一些研究报告称, 毕赤酵母已被用于生产 1000 多种重组蛋白, 其中包括 500 多种药用蛋白(Juturu & Wu, 2018; Potvin et al., 2012)。但是, 任何表达系统都有改进的空间, 毕赤酵母也是如此。近年来研究了碳源、培养基、pH、温度等发酵参数对毕赤酵母异源蛋白生产的影响(Gao et al., 2015; Viader-Salvado et al., 2013; Zheng et al., 2012)。此外, 相关遗传元件的优化修饰也取得了良好的效果。特别是, 增加外源基因在 *P. pastoris* 基因组中的基因剂量可以大大增加其表达(Aw & Polizzi, 2013)。这些方法都起到了一定的作用, 但对于特定的蛋白质, 还需要通过相关实验的结果来验证其是否有效。

本研究通过优化 CALB 的不同表达调控元件, 提高 CALB 的表达水平。在酵母分泌表达系统中, 含有启动子和信号肽的顺式元件是有效的基因表达元件。特别是启动子作为基因工程中表达载体的重要组成部分, 对外源蛋白的表达水平影响很大。此外, 本研究还利用所表达的脂肪酶催化高酸值地沟油生产生物柴油。

## 1 材料与方法

### 试验材料

大肠杆菌 Top10、毕赤酵母 GS115 和 X-33 以及质粒 pPICZ $\alpha$ A 均来自美国 Invitrogen 公司。相应的密码子优化基因、启动子和信号肽序列由 Generay 公司化学合成。所有限制性内切酶均购自 NEB 公司。凝胶萃取和质粒提取试剂盒购自苏州 Axygen Scientific 公司。Ezup 柱酵母基因组 DNA 纯化试剂盒购自上海生工生物技术公司。2 $\times$ T5 快速 qPCR Mix(SYBR Green I)试剂盒购自北京 TSINGKE 公司。地沟油来自中国林

业科学研究院林产化学工业研究所。除另有说明外，使用的其他化学品均购自国药化学试剂公司。

采用低盐 Luria-Bertani 培养基（酵母浸膏 5 g/L，色氨酸 10 g/L，NaCl 5 g/L）培养大肠杆菌。在 LB 培养基中加入 1.5 g/L 琼脂和一定量的 zeocin（终浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）制备 LB 板。采用 YPD 培养基（酵母提取液 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L）培养巴斯德毕赤酵母 GS115 和 X-33。采用 YPDs 板（酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、山梨醇 182 g/L、琼脂 15 g/L）筛选重组酵母菌。此外，还利用三辛酸甘油酯平板筛选重组巴斯德酵母。将 2% 聚乙烯醇与甘油三酯按 3:1 的比例配制成乳状液，加入到含 13.4 g/L YNB、琼脂 1.5 g/L，比例为 3% 的培养基中，制备三丙林平板。摇瓶培养采用 BMGY 培养基（10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨、100 mM 磷酸钾、pH 6.0、13.4 g/L YNB、 $4 \times 10^{-4}$  g/L 生物素和 10 g/L 甘油）和 BMMY 培养基（10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨、100 mM 磷酸钾、pH 6.0、13.4 g/L YNB、 $4 \times 10^{-4}$  g/L 生物素和 1% (v/v) 甲醇）。采用 BSM 培养基（26.7 mL/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ，4.13 g/L KOH，18.2 g/L  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ，14.9 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.93 g/L  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and 40 g/L glycerol，4.35 mL/L PTM1）进行发酵培养。

### 试验方法

1.2.1 质粒构建 由 Generay 公司将 CALB 基因进行密码子优化，并构建在质粒 pPICZ $\alpha$ A 上。在此质粒的基础上，通过酶切后再连接的方式进行启动子和信号肽的改造。用 Bgl II 和 BstB I 对启动子和载体进行酶切，然后用 T4 连接酶将新的启动子连接。利用 BstB I 和 EcoR I 对信号肽和载体进行酶切，然后用 T4 连接酶将新的信号肽连接。

1.2.2 摇瓶培养 将携带 CALB 基因的阳性转化子接种于含有 2 mL YPD 培养基的 20 mL 摇管中，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm 下培养过夜。然后将培养基转移到 BMGY 培养基上。当在组成型启动子下表达 CALB 时，将酵母细胞直接接种于含有 50 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中，初始 OD<sub>600</sub> 值为 1.0。当在甲醇诱导启动子下表达 CALB 时，将酵母细胞接种于含有 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中，生长约 12 小时 ~ 16 小时后离心，重悬于含有 50 mL BMMY 培养基的 250 mL 摇瓶中，初始 OD<sub>600</sub> 值为 1.0。每 24 小时向 BMMY 培养基中加入 0.5% (v/v) 甲醇。每 24 h 吸取 1 ml 培养液，离心取上清液，进行蛋白浓度和酶活性测定。

1.2.3 发酵培养 菌株被接种在含 250 mL YPD 培养基的 1 L 烧瓶中，在 30 $^{\circ}\text{C}$  下以 250 rpm 振荡 20 h - 24 h，然后将 10% (v/v) 的接种物接种到含 0.6 L 培养基的 1.3 L 发酵罐中。初始温度设定为 30 $^{\circ}\text{C}$ ，当酵母细胞 OD<sub>600</sub> 达到 200 左右时，将温度调整到合适的温度。根据上一步的优化结果设定 pH 值，通过加入 25% (v/v) 的氢氧化铵或 30% (v/v) 的  $\text{H}_3\text{PO}_4$  调节 pH 值。在整个发酵过程中，通过控制搅拌和通气，将溶氧 (DO) 控制在 20% ~ 30% 左右。以溶氧 (DO) 突然升高表现为甘油耗然后，滴加 500 g/L (w/v) 的甘油，每 12 h 收集发酵液，分析 OD<sub>600</sub>、总蛋白含量和脂肪酶活性。

1.2.4 脂肪酶活性测定 以 4-硝基苯基月桂酸酯 (4-NPL) 为底物，在 40 $^{\circ}\text{C}$  下测定培养上清中脂肪酶的活性。在脂肪酶的作用下，4-NPL 被水解生成月桂酸酯和 4-硝基苯酚。脂肪酶活力被定义为在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 条件下每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  4-硝基苯酚所需酶量。将 100 mM PBS 缓冲液 180  $\mu\text{L}$ 、pH 为 7.5、20 mM 4-NPL 10  $\mu\text{L}$  加入适当稀释的培养上清液中，在 40 $^{\circ}\text{C}$  恒温 5 分钟后开始反应。5 分钟后，加入 600  $\mu\text{L}$  1M 碳酸钠终止反应。然后在 1200 rpm 离心 3 分钟后，测定 410 nm 处上清的吸光度。

1.2.5 制备生物柴油 地沟油与甲醇在 25 mL 的茄形瓶中分别以不同条件（醇油摩尔比（3:1、4:1、5:1 和 6:1）、温度（25 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ ）、含水量（10% ~ 50%）和脂肪酶用量（10 ~ 30 U/g 油））进行反应，在恒温水浴摇床中以 180 rpm 进行混合。为避免甲醇对脂肪酶的毒性作用，每 12h 加入 1 摩尔当量甲醇。样品在 12,000 $\times$ g 离心 5 分钟，用正己烷溶解样品。样品中的水分用无水硫酸钠除去。上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  微过滤器过滤后，采用气相色谱法进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 CALB 在毕赤酵母中的表达情况

如图 1 所示，经过 72 小时的甲醇诱导后，上清液中的 CALB 达到最大活性。相对于密码子优化前的 CALB 重组菌，密码子优化过后的 CALB 重组菌所表达的 CALB 活性明显提升。但在 GS115 和 X-33 中，

CALB 的表达水平没有显著差异,而在 GS115 中表达的 CALB 脂肪酶活性略高于在 X-33 中表达的 CALB。在 GS115 中,经甲醇诱导 72 小时后,经密码子优化的 CALB 活性达到  $12.80 \pm 0.02$  U/mL。

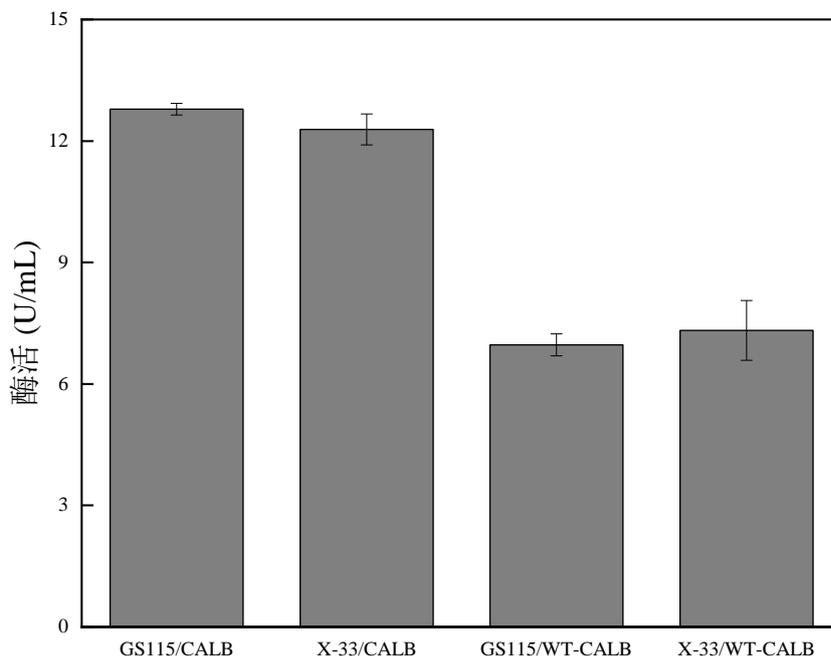


图 1 甲醇诱导 72 h 后脂肪酶活性的比较

Fig. 1 Comparison of lipase activity in *P. pastoris* after 72 h induction with methanol

## 2.2 启动子和信号肽筛选

本研究选用了包括常用的  $P_{AOX1}$  在内的 3 个诱导启动子 ( $P_{AOX1}$ ,  $P_{FLD1}$ ,  $P_{AOX1(d1+201)}$ ) 和 4 个组成启动子 ( $P_{GCW14}$ ,  $P_{P9}$ ,  $P_{PDC}$ ,  $P_{PYK}$ ) 在 GS115 中表达 CALB。如图 2A 所示,  $P_{GCW14}$  相对于  $P_{AOX1}$  表现出更强的启动子能力。使用  $P_{GCW14}$  后,培养上清液中 CALB 的脂肪酶活性增加约 29%,蛋白浓度增加至  $0.27 \pm 0.01$  g/L。

目前商业应用中使用最广泛的信号肽之一是来自酿酒酵母的  $\alpha$ -因子序列 ( $\alpha$ MF)。在此,我们选择了其他四种信号肽 (SP23,  $M\alpha$ ,  $MF\Delta$ , pre-Ost1-pro- $\alpha$ MF) 与其进行比较,如图 2B 所示,所有信号肽的分泌能力均高于  $\alpha$ MF 信号肽。其中,  $M\alpha$  信号肽的活性最高,可使 CALB 活性提高 46%。SP23、 $MF\Delta$  和 pre-Ost1-pro- $\alpha$ MF 信号肽分别使 CALB 活性升高约 41%、29%和 35%。此外,Bradford 法显示,各信号肽下 CALB 蛋白浓度均升高,其中  $M\alpha$  信号肽使 CALB 表达量升高至  $0.36 \pm 0.02$  g/L。

选用此启动子和信号肽组合构建的 CALB 基因表达盒,通过高浓度抗生素筛选,得到了一株 *calb* 基因拷贝数为 3 的毕赤酵母重组菌,培养上清液中 CALB 的脂肪酶活性达到  $28.69 \pm 0.99$  U/mL。

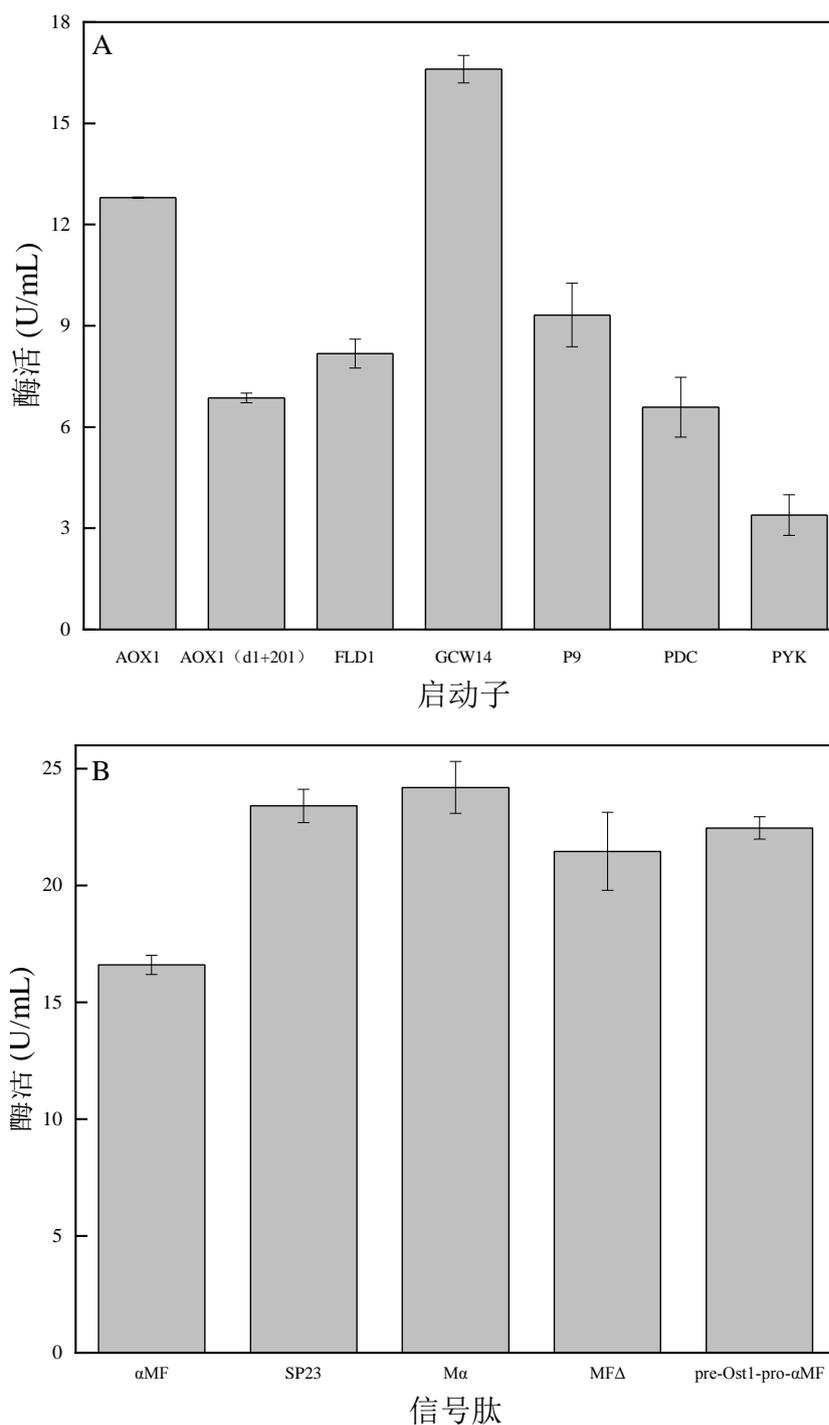


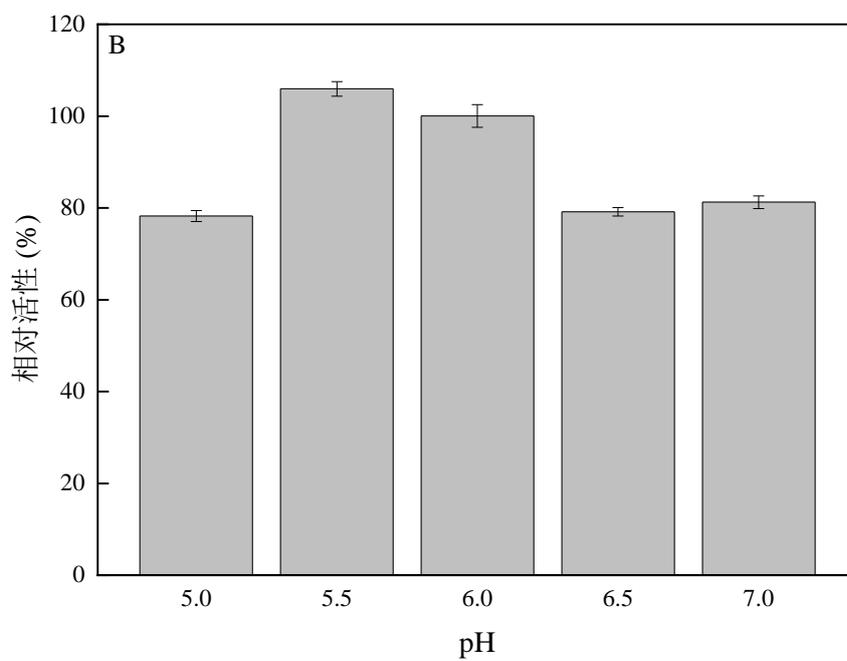
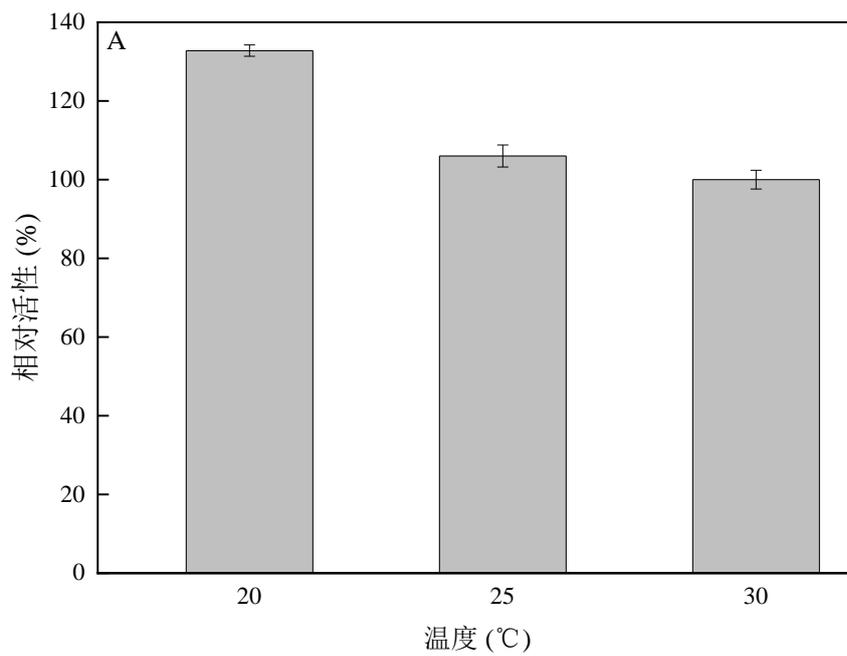
图2 启动子与信号肽筛选

Fig. 2 Comparison of different promoters and signal peptides

(A) 启动子, promoter; (B) 信号肽, signal peptide

### 2.3 培养条件优化

对培养条件如培养温度, 培养基初始 pH 和初始接种剂量进行了优化, 为下一步发酵罐发酵培养的发醇参数提供参考。如图 3A 所示, 在低温下(20 °C)分泌出的 CALB 的脂肪酶活性明显高于高温下(20 °C)的活性, 说明毕赤酵母在低温下更有利于产酶。如图 3B 所示, 与初始 pH 为 6.0 相比, 初始 pH 为 5.5 时 CALB 活性略有升高。在其他初始 pH 条件下, CALB 的活性仅为初始 pH 6.0 的 80%左右。如图 3B 所示, 接种剂量似乎并未对 CALB 的表达造成太大的影响, 这也复合预期, 可以消除每次因接种造成的人工误差。



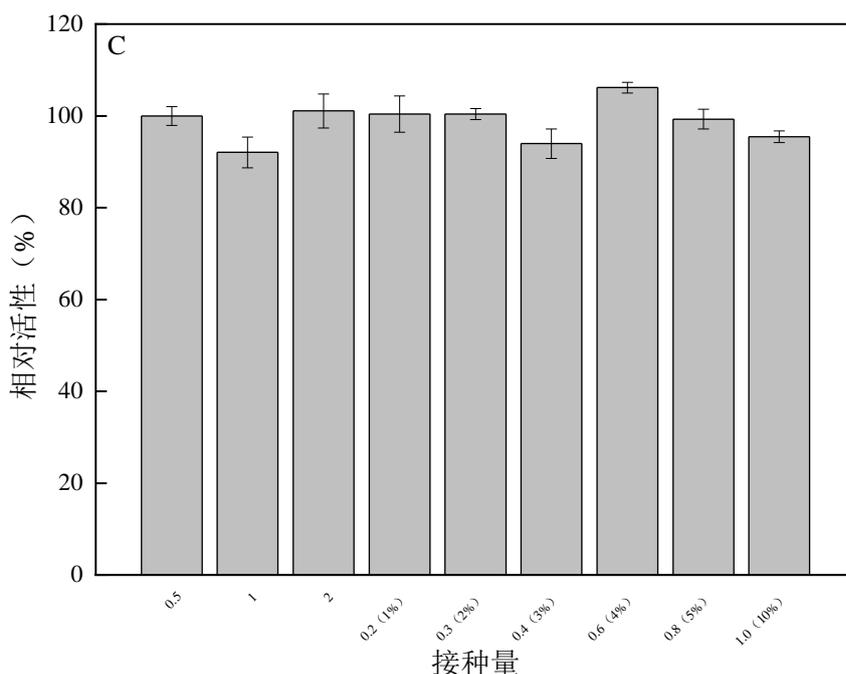


图3 培养条件对脂肪酶活性的影响

Fig. 3 The effect of incubation conditions on lipase activity

(A) 温度, temperature; (B) 初始 pH, initial pH; (C) 接种量, inoculation dosage

#### 2.4 发酵罐培养

经过大约 22 小时的繁育后, 发酵液中最初的 40 g/L 甘油被耗尽。通过控制转速和甘油补充速度, 使溶解氧保持在一定范围内。生长约 40 小时后, 当生物反应器内 OD<sub>600</sub> 值达到 200 左右时, 调节温度至 20 °C。图 4 为重组菌株在 BSM 培养基中的发酵情况, 发酵进行约 9 天后, CALB 的脂肪酶活性和蛋白质含量最高, 分别达到 438.16±2.41 U/mL 和 4.05±0.1 g/L。酶活性和蛋白质含量分别比初始菌株提高了 34.23 倍和 20.25 倍。

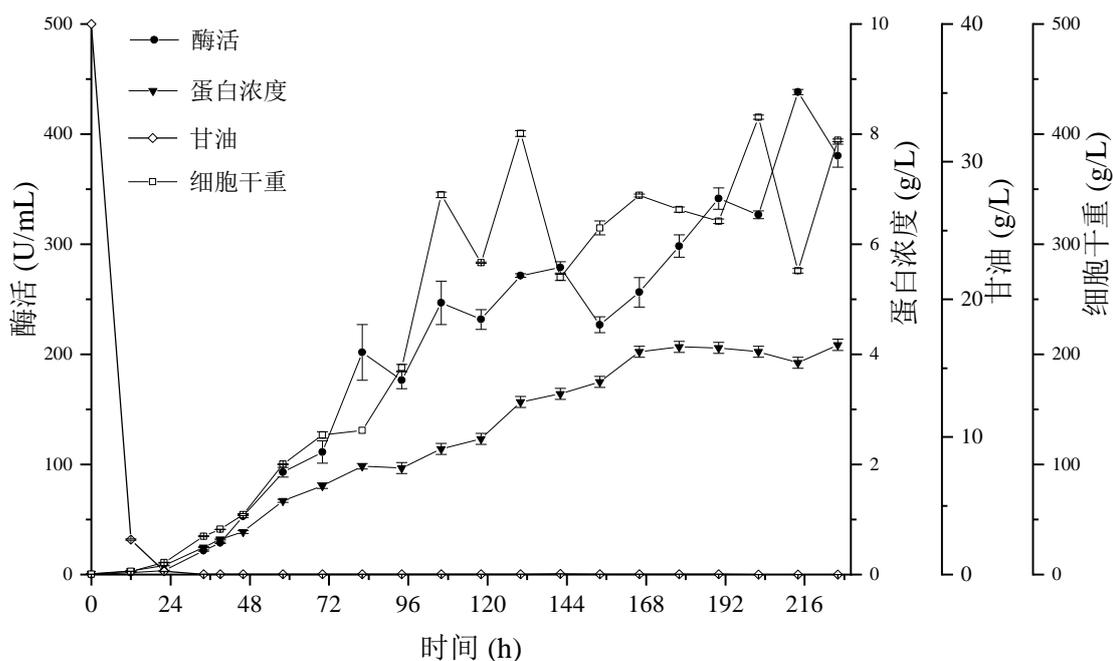
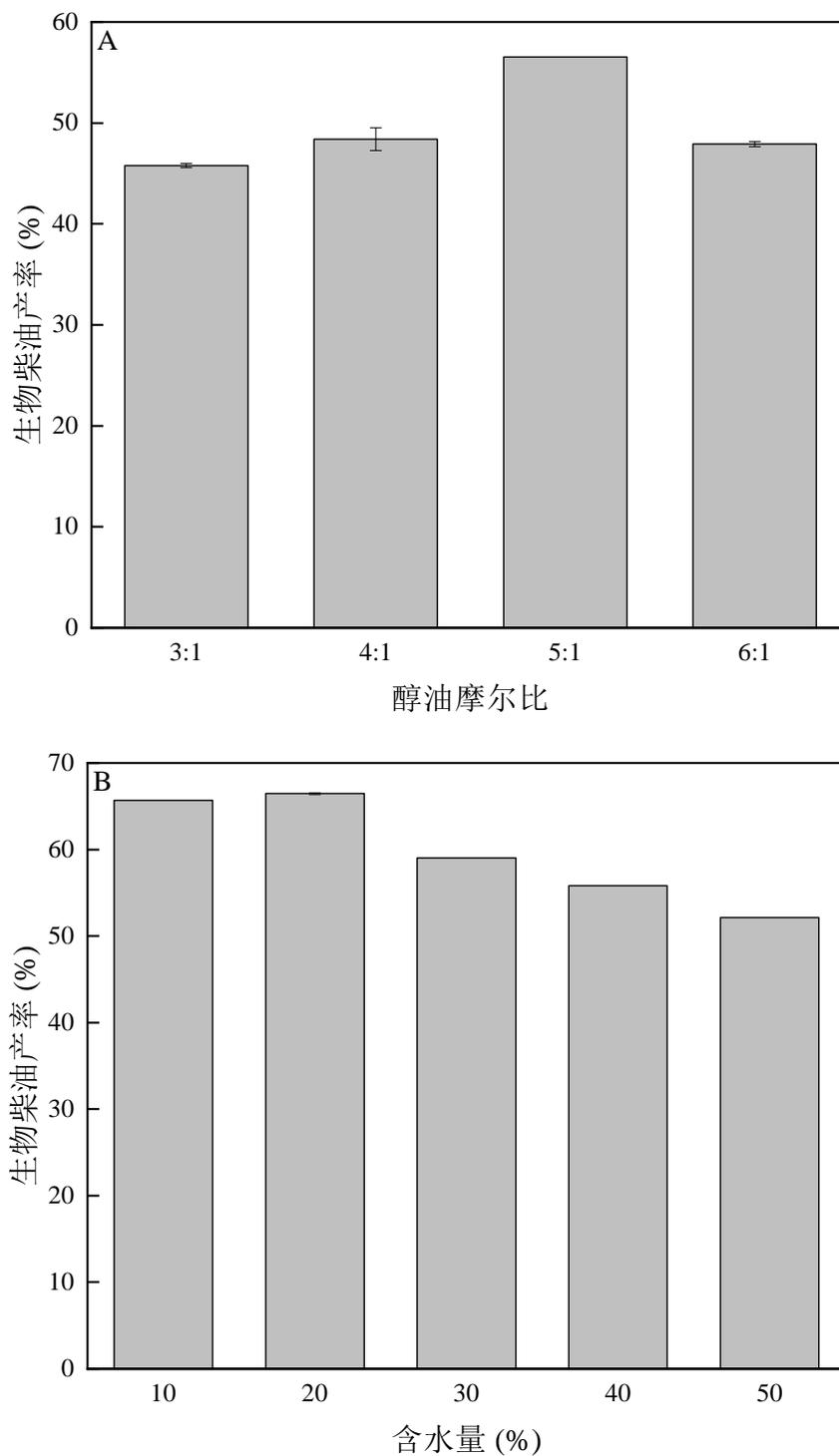


图4 CALB 重组菌株在 BSM 培养基中的发酵图谱

Fig.4 Fermentation profile of recombinant strain expressing CALB in BSM medium

#### 2.5 CALB 催化地沟油制备生物柴油

根据 GB/T5530-2005, 测定使用的地沟油的酸值为  $152.44 \pm 1.61$  mg/g KOH, 酸度为  $76.75 \pm 0.81\%$ 。如图 7 所示, 通过实验确定了重组 CALB 催化地沟油制备生物柴油的最佳工艺条件为: 醇油摩尔比为 5:1, 催化剂用量为 20 U/g 油, 水含量 (v/v) 20%, 反应温度  $30^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下, 反应 60 小时后, 生物柴油产率为  $66.52 \pm 0.11\%$ 。



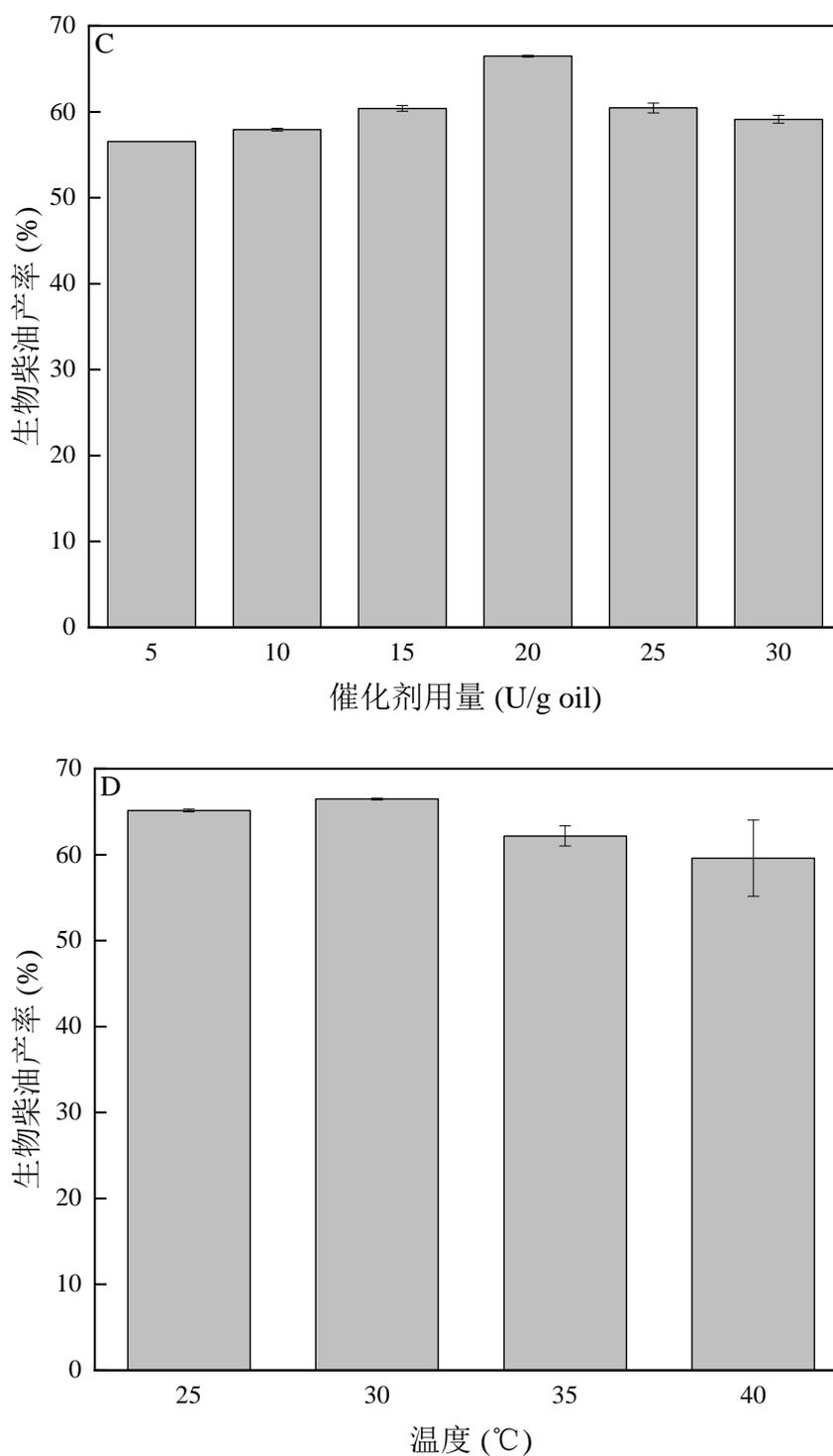


图 5 CALB 催化地沟油制备生物柴油反应优化

Fig.5 Optimization of biodiesel preparation from gutter oil by CALB catalyst

(A) 醇油摩尔比, molar ratio of methanol to oil; (B) 含水量, water content, (C) 催化剂用量, lipase dosage; (D) 温度, temperature

### 3 讨论

#### 3.1 脂肪酶的表达情况

对于在毕赤酵母中用于蛋白表达的启动子选择性不多, 通常为  $P_{AOXI}$  (甲醇诱导型启动子) 或  $P_{GAP}$  (组成型启动子), 这主要是由于它们的强度较高。启动子相关研究也在进行中, 专家学者们已努力鉴定新的可选择的启动子序列, 在本研究中所使用的其余启动子均是有关专家所研究发现的新型启动子。如图 2 所示,

虽然只有  $P_{GCW14}$  相对于  $P_{AOX1}$  表现出更强的启动子能力, 但不能说明其余启动子的效果并不好, 他们也会有各自的用途。

进入内质网是酵母中重组蛋白分泌表达的第一步, 这需要信号序列的存在。一般情况下, 信号肽引导重组蛋白进入内质网, 进入内质网腔后被 Kex2 酶裂解。相对于启动子而言, 信号肽的选择较多, 各种强劲有效的信号肽被广泛使用, 本研究结果也证实了这一点, 所选用的信号肽均起到了作用。

总之, 分泌到胞外的脂肪酶 CALB 活性测定和蛋白质浓度检测结果说明, 毕赤酵母 GS115 较好的表达了 CALB, 且直接将其分泌到细胞外, 简化了下游加工过程, 降低了脂肪酶的生产成本。

### 3.2 脂肪酶的发酵表达

通过培养条件优化, 确定了相关发酵参数, 其中低温培养 (20 °C) 是确实有效的。降低温度以降低蛋白质合成速度是一种常见的培养策略, 早已用于提高蛋白质产量, 这种现象可能与酵母细胞内环境受到干扰有关。相关研究发现高温 (30 °C) 孵育会引起严重的内质网 (ER) 应激, 可能造成严重的 ER 损伤, 导致 ER 吞噬。然而, 这种情况在低温 (20 °C) 下明显改善。本研究中的结果更加证实了这一点。

发酵的结果总体相对较好, 在 10 天的发酵过程中,  $OD_{600}$  值最高可达 1600, 细胞干重超过 400 g/L, 真正实现了高密度发酵。此外, 脂肪酶活性和蛋白浓度较发酵前大幅提升, 在相同条件下, 对市售液体 CALB 的活性进行了测试, 结果表明, 发酵罐产生的 CALB 活性与市售的商品化液体 CALB 活性相当。

### 3.2 脂肪酶催化生产生物柴油

由于地沟油中含有大量游离脂肪酸, 使用化学法处理时会较为麻烦, 因此使用酶催化法更为适宜。在本研究中的生物产油转化率较低, 只有 66.52%, 通过查阅相关文献, 推测可能是本研究中所表达的 CALB 对甘油三酯的反应速率较为缓慢, 因此在长时间的反应过程中, 优先催化了游离脂肪酸与甲醇的酯化反应。Tongboriboon 等报道 Novozym 435 的酯交换活性和水解活性远低于其酯化活性 (Tongboriboon et al., 2010)。Fedosov 等人报道, CALB 对成品油的甲醇分解非常缓慢, 因为甘油三酯是其活性最低的底物 (Fedosov et al., 2013)。这些结论与本实验获得的低生物柴油产率得到了印证, 这表明本研究获得的游离 CALB 可能更适合与其他脂肪酶协同处理低品质油脂。

## 4 结论

本研究通过构建携带 CALB 的毕赤酵母重组菌实现了 CALB 的高效表达。首先, 成功表达并鉴定了经密码子优化后的 CALB, 并选择了 7 个启动子和 5 个信号肽进行比较。其中,  $P_{GCW14}$  和 Ma 信号肽对脂肪酶产生的推动作用最大。在此条件下, 通过高浓度抗生素筛选和拷贝数测定, 鉴定出含有 3 个 *calb* 基因拷贝数的毕赤酵母重组菌。在 1.3 L 的生物反应器中, 选择 BSM 培养基作为发酵培养基, CALB 的最大活性为  $438.16 \pm 2.41$  U/mL, 总蛋白含量为  $4.05 \pm 0.1$  g/L。在相同条件下, 发酵罐中产生的 CALB 活性与市售液体 CALB 活性相当。总的来说, 这个出色的表达系统对酶的毕赤酵母中表达具有参考意义。此外, 所产 CALB 还可用于催化地沟油生产生物柴油, 在酸化油处理方面具有广阔的应用前景。

## 参考文献

- Abdul Hakim Shaah, M., Hossain, M. S., Salem Allafi, F. A., Alsaedi, A., Ismail, N., Ab Kadir, M. O., & Ahmad, M. I. (2021). A review on non-edible oil as a potential feedstock for biodiesel: physicochemical properties and production technologies. *RSC Advances*, 11(40), 25018-25037.
- Changmai, B., Vanlalveni, C., Ingle, A. P., Bhagat, R., & Rokhum, S. L. (2020). Widely used catalysts in biodiesel production: a review. *RSC Advances*, 10(68), 41625-41679.
- Wang, Q., Ge, M., Guo, X., Li, Z., Huang, A., Yang, F., & Guo, R. (2021). Hydrophobic poly(ionic liquid)s as “two-handed weapons”: Maximizing lipase catalytic efficiency in transesterification of soybean oil toward biodiesel. *Applied Catalysis A: General*, 626.
- Yan, Y., Xu, L., & Dai, M. (2012). A synergetic whole-cell biocatalyst for biodiesel production. *RSC Advances*, 2(15).
- Sun, S., Guo, J., & Chen, X. (2021). Biodiesel preparation from Semen Abutili (*Abutilon theophrasti* Medic.) seed oil using low-cost

- liquid lipase Eversa (R) transform 2.0 as a catalyst. *Industrial Crops and Products*, 169, Article 113643.
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*, 235(9), 5867-5881.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *Chembiochem*, 19(1), 7-21.
- Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91-105.
- Gao, M. J., Zhan, X. B., Gao, P., Zhang, X., Dong, S. J., Li, Z., . . . Lin, C. C. (2015). Improving Performance and Operational Stability of Porcine Interferon-alpha Production by *Pichia pastoris* with Combinational Induction Strategy of Low Temperature and Methanol/Sorbitol Co-feeding. *Appl Biochem Biotechnol*, 176(2), 493-504.
- Viader-Salvado, J. M., Castillo-Galvan, M., Fuentes-Garibay, J. A., Iracheta-Cardenas, M. M., & Guerrero-Olazarán, M. (2013). Optimization of five environmental factors to increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. *Biotechnol Prog*, 29(6), 1377-1385.
- Zheng, J., Zhao, W., Guo, N., Lin, F., Tian, J., Wu, L., & Zhou, H. (2012). Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant beta-mannanase by *Pichia pastoris*. *Bioresour Technol*, 118, 257-264.
- Aw, R., & Polizzi, K. M. (2013). Can too many copies spoil the broth? *Microbial Cell Factories*, 12, Article 128
- Fedosov, S. N., Brask, J., Pedersen, A. K., Nordblad, M., Woodley, J. M., & Xu, X. (2013). Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85-86, 156-168
- Tongboriboon, K., Cheirsilp, B., & H-Kittikun, A. (2010). Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(1-2), 52-59.