

酵母细胞表面展示技术及其在非水相酶催化合成中的应用

韩双艳, 李华珍, 金子, 黄登峰, 任昌琼, 林影

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: 酵母展示技术是将外源蛋白与酵母细胞壁蛋白融合, 并将外源蛋白表达在酵母细胞表面。酵母展示技术已广泛应用于各种功能蛋白的表达及筛选。以下重点介绍酵母展示技术在脂肪酶展示体系构建及其在脂肪酸甲酯、短链芳香酯及糖酯生物合成中的应用。

关键词: 酵母展示, 全细胞催化, 甲酯, 芳香酯, 糖酯

Yeast cell surface display and its application of enzymatic synthesis in non-aqueous phase

Shuangyan Han, Huazhen Li, Zi Jin, Dengfeng Huang, Changqiong Ren, and Ying Lin

School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: Yeast surface display involves that the exogenous protein, which was fused with the yeast outer shell cell wall protein, was genetically anchored on the yeast cell surface. It has been widely used in expression and screening of functional protein. Here, we focused on the construction of lipase-displaying systems and its application in enzymatic biosynthesis, such as fatty acid methyl esters, short-chain flavour esters and sugar esters applications, and so on.

Keywords: yeast display, whole-cell catalysis, methyl esters, flavour esters, sugar esters

尽管酶制剂在绿色化学制造过程中有巨大的应用前景, 但精细化学品制备过程中商业酶应用的实际例子还是非常少。如何提高酶在生物合成中的稳定性、底物耐受性、催化效率和产物浓度等是酶催化合成的关键^[1]。

酵母展示技术利用酵母细胞壁蛋白, 如: 酵母凝集素、酵母絮凝素等, 与外源蛋白的融合, 融合蛋白表达分泌途中由于细胞壁糖基化蛋白与细胞壁的共价结合或非共价嵌合作用, 将外源蛋白锚定在细

胞壁上。酵母细胞展示体系具有糖基化作用、蛋白翻译后折叠和哺乳动物类似的分泌机制的等优势^[2-3]。此外, 将酶蛋白在酵母细胞表面展示可以直接实现酶分子的固定化, 减少酶分离纯化的复杂工艺, 提高酶的回收率, 已有研究表明酶的酵母细胞表面展示有利于提高酶的稳定性及有机溶媒耐受性^[4]。因此, 酵母细胞展示技术在酶催化有机相合成与转化中具有极大的应用前景。

脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)是一类重要的酯键水

Received: October 9, 2009; **Accepted:** October 22, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China-Guangdong Provincial People's Government of the Joint Natural Science Fund Projects (No. U0773001).

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

广东省-国家自然科学基金联合基金(No. U0773001)资助。

解酶,能催化天然的底物油脂水解,与其他水解酶类相似,脂肪酶催化的水解反应也具有可逆性,可催化酯类化合物的分解、合成和酯交换,具有化学选择性和高度的立体异构专一性,反应条件温和,副产物少。已有报道将脂肪酶在酵母细胞表面展示,具有固定化酶的稳定性高、耐性强、易回收利用等优良特性,作为全细胞催化剂应用于生物催化反应,尤其在生物转化与合成中凸显优势^[5-7]。此外,由于其具有可再生及细胞表面在线检测分析的特性,已被应用于酶分子定向进化与催化偶联的高通量筛选技术体系的构建。

来源于南极假丝酵母 *Candida antarctica* 的脂肪酶分为 A(CALA)与 B (CALB)两种类型,其中 CALB 的晶体结构已经测定和解析。CALB 具有广泛的用途,近几年的研究成果表明,CALB 在酯化、水解、转酯以及其他类型反应中都显示了较其他脂肪酶更为出色的催化性能^[8]。此外,米黑根毛霉脂肪酶 (*Rhizomucor miehei* lipase, RML)是一条 α/β 型单链多肽,有着明显的界面激活效应,固定化的 RML 可在非水相反应体系中高效催化酯交换和酯合成,因而其固定化技术得到广泛研究^[9]。以下重点描述了基于酵母展示技术的脂肪酶(CALB 与 RML)全细胞催化剂的制备,及其在脂肪酸甲酯、短链芳香酯及糖酯生物合成的应用。

1 毕氏酵母展示体系的构建

如图 1 所示,将酿酒酵母絮凝素 *Flo1* 基因 *FS* 片段与米黑根毛霉脂肪酶基因(含前肽片段 ProRML)连接,插入毕氏酵母分泌表达质粒 pPIC9K 中,构建毕氏酵母细胞展示表达质粒 pKFS-RML。

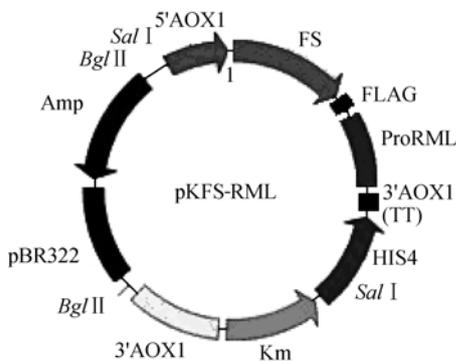


图 1 絮凝素酵母展示 RML 脂肪酶载体构建
Fig. 1 Construction of RML-displaying *Pichia pastoris* expression plasmid.

同样地,将南极假丝酵母基脂肪酶 CALB 基因与酿酒酵母 α 凝聚素基因片段连接,插入到质粒 pPIC9K 中,构建获得毕氏酵母细胞展示表达质粒 pKNS-CALB,基因融合方式和重组质粒构建如图 2 所示。

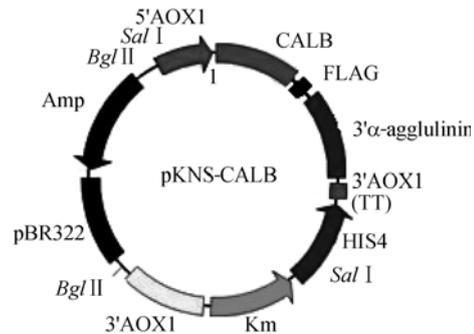


图 2 凝聚素酵母展示 CALB 脂肪酶载体构建
Fig. 2 Construction of CALB-displaying *Pichia pastoris* expression plasmid.

将构建的 pKFS-RML 及 pKNS-CALB 质粒分别转化毕氏酵母 GS115,在三丁酸甘油酯乳化平板上筛选转化子,得到具有脂肪酶表达活性的两株重组酵母工程菌 GS115/FSRML 和 GS115/NSCALB。

2 基于酵母展示技术的全细胞脂肪酶催化剂制备

重组毕氏酵母外源蛋白表达菌株易于高密度发酵培养,对营养要求低,工业化放大生产方法成熟,而且自身分泌的蛋白质非常少,有利于高效表达外源蛋白。外源基因通过整合型质粒进入毕赤酵母染色体基因组,结构稳定,不易丢失,外源蛋白质表达量较高。

将重组外源脂肪酶的菌株 GS115/FSRML 和 GS115/NSCALB 分别接种于 YPD 培养基中,200 r/min、30°C 培养 24 h,然后转入发酵罐(工作体积为 30 L)在 BSM 培养基中进行批式补料发酵,24 h 待甘油耗尽后,开始流加 BSM 和甲醇发酵产酶,获得高效全细胞脂肪酶,图 3 为 GS115/FSRML 菌株的发酵与产酶曲线。

发酵完毕,离心收集菌体,并用含有一定量保护剂的缓冲液清洗,再经真空冷冻干燥冻干制备 RML 脂肪酶全细胞催化剂。同样的制备方法可得到 CALB 脂肪酶全细胞催化剂。

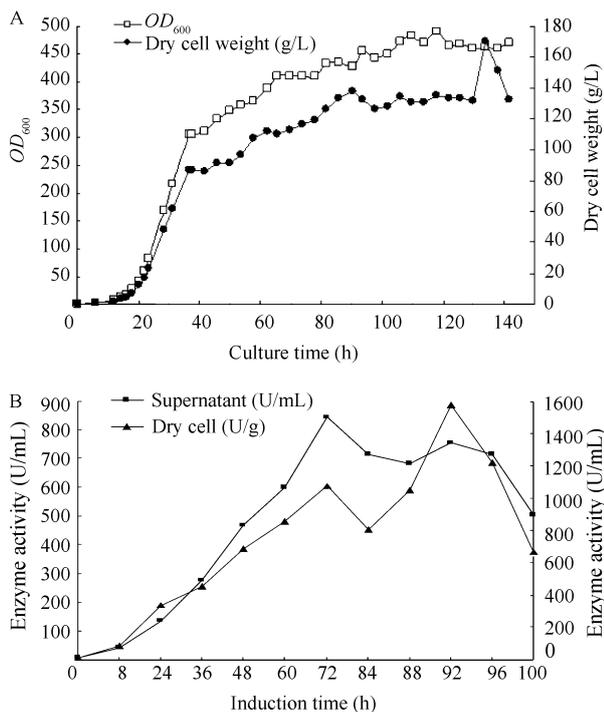


图3 GS115/FSRML 重组毕氏酵母发酵诱导产酶曲线

Fig. 3 Fermentation and enzyme-producing curves of recombinant *Pichia pastrois* GS115/FSRML. (A) Cell density. (B) Lipase activities.

3 全细胞脂肪酶催化剂在脂肪酸甲酯生物合成中的应用

脂肪酸甲酯(FAME)源于动植物油脂,由酸、碱或酶催化下经甲醇醇解制备而成,早期 FAME 几乎全部用作合成其他化学品合成的中间体,如:脂肪酸甲酯磺酸钠(MES)的合成。近年来由于各国为防止大气污染,制定了严格的汽车尾气排放标准,因此都在大力发展清洁燃料,FAME 作为一种清洁的可再生能源受到了普遍的关注,也被称为生物柴油。

利用酵母展示 RML 全细胞脂肪酶反应条件为:0.965 g 大豆油,分别在 0 h、24 h 和 48 h 加入甲醇,醇油摩尔比为 1.5:1,反应体系异辛烷/油为 2:1(V/V),温度 55°C,反应时间 72 h,细胞量(GS115/FSRML)为 0.36 g,其中全细胞脂肪酶酶粉、大豆油、甲醇和异辛烷均在硝酸钠饱和盐溶液中平衡 84 h。结果如图 4 所示:毕赤酵母表面展示 RML 脂肪酶催化合成反应 72 h 后,脂肪酸甲酯产率达到 89.17%。

以上反应 72 h 结束后,将全细胞脂肪酶催化剂用丙酮清洗酶粉,然后放于室温晾干。接着加入到

含有新的反应底物的如上反应液中,开始下一批次的反应。由图 5 可知,全细胞脂肪酶 RML 能有效催化脂肪酸甲酯的合成,重复利用 8 批次后,脂肪酸甲酯产率仍能达到第一批产率的 81.28%,反应工作时间达 576 h。

4 全细胞脂肪酶催化剂在芳香酯生物合成中的应用

利用酶法生产香味物质,已有相关专利报道。如用脂肪酶催化己酸与乙醇反应,生产的己酸乙酯用于勾兑白酒、调配香精等。酶法生产的芳香酯在香味的协调性、使用的安全性上都优于化学合成的酯类,许多短链芳香酯更是水果中的主要香味化合物。

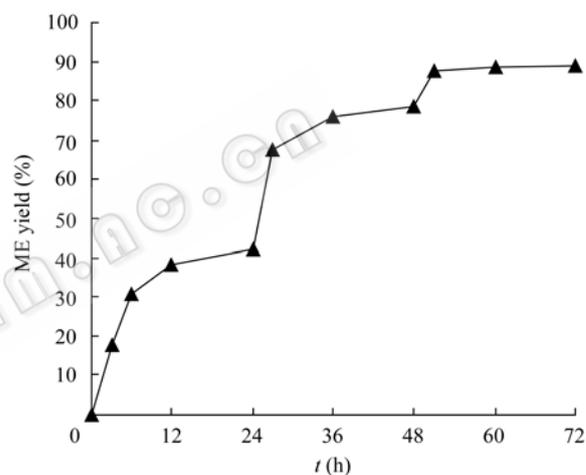


图4 RML 全细胞脂肪酶催化甲酯合成反应曲线

Fig. 4 Synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by RML-displaying yeast whole cells.

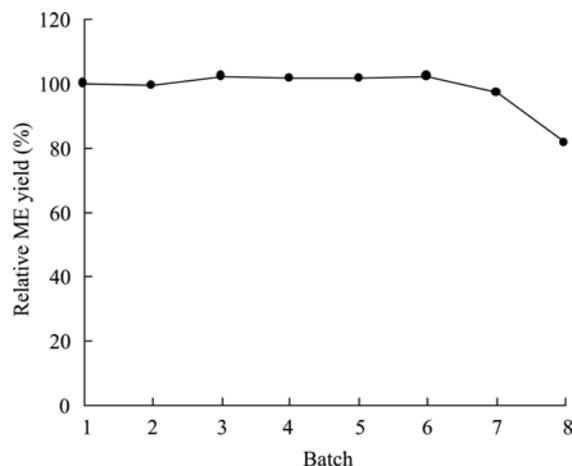


图5 RML 全细胞脂肪酶催化甲酯合成操作稳定性

Fig. 5 Operational stability of RML-displaying yeast whole cell catalyst.

用脂肪酶可以催化酯化反应、酯基转移反应和内酯化反应, 可以进行风味酯的合成。目前已有 50 多种酯可以由酶法合成。

利用酵母展示 CALB 全细胞脂肪酶生产芳香酯, 合成反应条件为: 在反应体系中加入一定量的正庚烷, 分别加入底物酸(0.4 mol/L)和 Novozym435 或 CALB-1 冻干粉(基于絮凝素锚定的毕赤酵母展示 CALB)/CALB-2 冻干粉(基于凝集素锚定的毕氏酵母展示 CALB), 酶量均为 0.1 g, 酸:醇=1: 1.5(摩尔比)的比例加入底物醇, 加入分子筛除水, 在 55°C 下酶催化合成反应, 并定时监控转化率。

研究结果表明: 在合成反应中, 使用凝集素锚定的毕氏酵母展示脂肪酶 CALB-2 相对于使用絮凝素锚定的毕氏酵母展示脂肪酶 CALB-1, 其效率有不同程度的提高。对丙酸乙酯合成而言, 达到最大转化率的时间从原 9 h 缩短为 6 h; 对于乙酸异戊酯合成来说, 虽然 CALB-2 的优势不是特别明显, 但其转化率始终优于 CALB-1; 对于己酸乙酯合成而言, CALB-1 需要 6 h 左右才能达到转化率 90% 以上, 而 CALB-2 只需要 2 h 就达到转化率 90% 的水平。相对商品酶 Novozym435, 全细胞脂肪酶催化剂在丙酸乙酯、乙酸异戊酯及己酸乙酯等短链芳香酯合成中显示了一定的优势(图 6)。

5 全细胞脂肪酶催化剂在糖酯生物合成中的应用

糖酯作为一种非离子型表面活性剂, 能降低水的表面张力形成胶束, 具有乳化、渗透、粘度调节和防止晶析等多种功能, 已广泛应用于医药、食品及化妆品等工业。目前, 工业生产糖酯主要采用化学合成法, 用化学法合成选择性差, 产率低, 且需在高温高压条件下进行, 糖环会发生聚合, 不易进行特定位置的酯化, 其副产品的变性和致癌性引起人们越来越多的关注。1986 年 Klibanov 等首创以吡啶为溶剂用猪胰脂肪酶催化糖酯合成, 得到了 6-O-酰基-葡萄糖^[10], 此后酶法催化合成糖酯的研究在国内外各相关实验室相继展开, 还有学者发现利用商品的南极假丝酵母脂肪酶 Novozym435 在糖的伯羟基位置上具有良好的反应区域选择性, 催化酯化成高

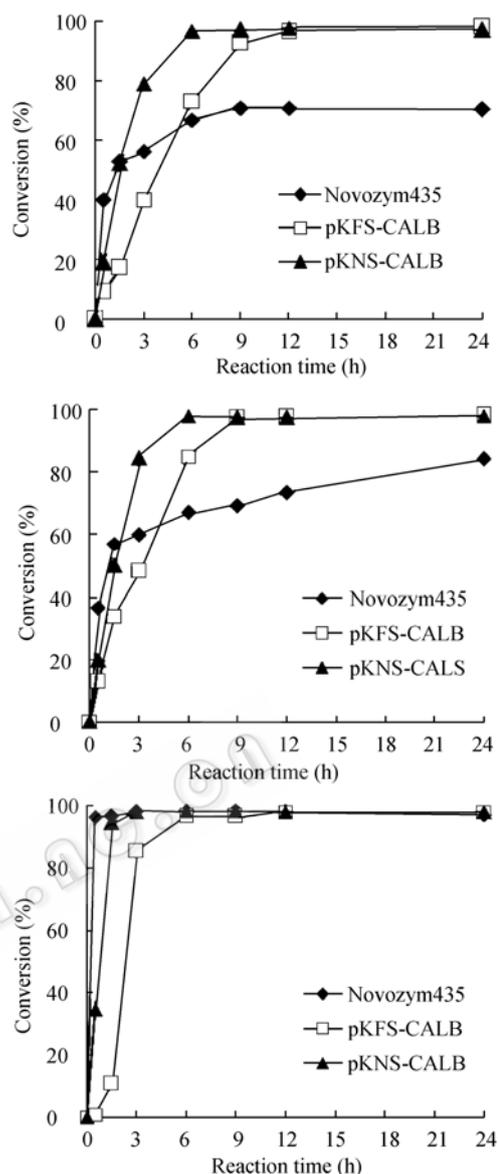


图 6 三种不同脂肪酶催化短链芳香酯

Fig. 6 Synthesis of flavour esters catalyzed by lipases. (A) Ethyl propionate. (B) Isoamyl acetate. (C) Ethyl hexanoate.

纯度的 6-O-酰基-糖酯。

本研究以全细胞脂肪酶 CALB 为催化剂, 以葡萄糖/果糖和月桂酸为底物, 在几种单一有机溶剂(叔丁醇, 叔戊醇, 丙酮, 正己烷)和复合有机溶剂(叔丁醇+DMSO, 叔戊醇+DMSO, 丙酮+DMSO, 正己烷+DMSO)中催化反应合成糖酯。反应条件为: 0.3 g 脂肪酶, 3 mmol/L 葡萄糖(0.595 g)/果糖(0.54 g), 月桂酸 1.2 g (6 mmol/L), 1.2 g 分子筛, 5 mL 反应体系, 55°C, 72 h。复合溶剂 4:1(V/V)。结果如图 7 所示, 研究得到全细胞脂肪酶 CALB 催化剂催化合成月桂酸单糖酯的效率最高达到 Novozym435 商品酶的 75%。

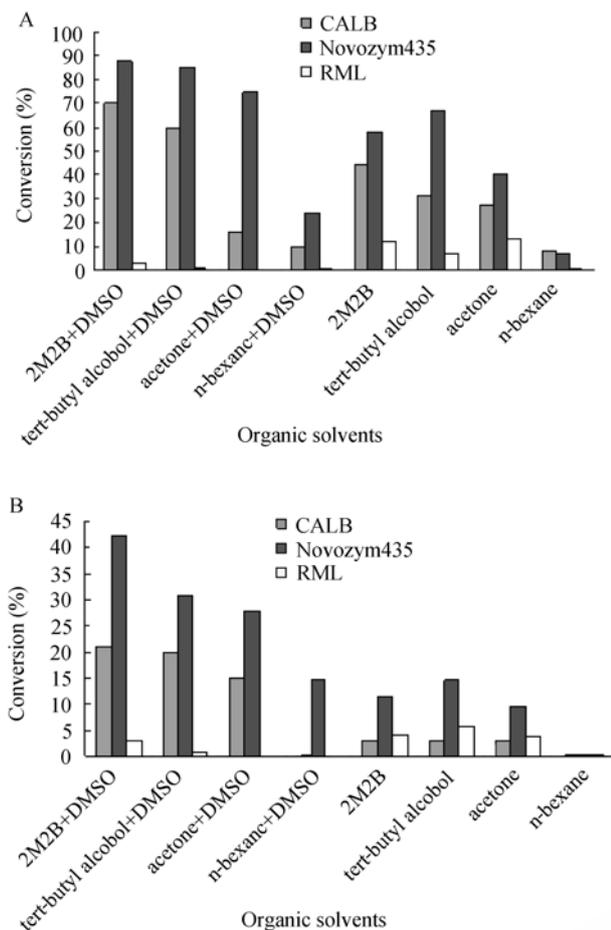


图7 三种不同脂肪酶催化合成单糖酯

Fig. 7 Synthesis of sugar esters catalyzed by lipases. (A) Lauroyl glucose monoester. (B) Lauroyl fructose monoester.

6 结束语

综上所述, 利用基于酵母展示体系的全细胞催化技术无需酶的提取纯化, 减少了酶活性在制备过程中的损失, 节省了生产中的设备投资和运行费用。同时酵母展示脂肪酶体现了固定化酶的优势, 与游离酶相比, 易于回收, 可反复使用。进一步提高酶的制备效率及酶的催化活性, 将有利于工业化大

规模生产的推广。

REFERENCES

- [1] Luetz S, Giver L, Lalonde J. Engineered enzymes for chemical production. *Biotech Bioeng*, 2008, **101**(4): 647–653.
- [2] Gai SA, Wittrup KD. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, **17**: 467–473.
- [3] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**(1): 28–40.
- [4] Han ZL, Han SY, Zheng SP, *et al.* Enhanced thermostability of *R. miehei* lipase by engineering a de novo disulfide bond and display on yeast surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85:117-126.
- [5] Matsumoto T, Ito M, Fukuda H, *et al.* Enantioselective transesterification using lipase-displaying yeast, whole-cell biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**(4): 481–485.
- [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] Tanino T, Aoki T, Chung WY, *et al.* Improvement of a *Candida antarctica* lipase B-displaying yeast whole-cell biocatalyst and its application to the polyester synthesis reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**(1): 59–66.
- [8] Han SY, Pan ZY, Huang DF, *et al.* Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, **59**: 168–172.
- [9] Zhang WG, Han SY, Wei DZ, *et al.* Functional display of *Rhizomucor miehei* lipase on surface of *Saccharomyces cerevisiae* with higher activity and its practical properties. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, **83**(3): 329–335.
- [10] Therisod M, Klivanov AM. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J Am Chem Soc*, 1996, **108**(18): 5638–5640.