

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620081151612

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

南极假丝酵母脂肪酶B 高效表达及在选择性酰化
方面的应用研究

The efficient expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia*
pastoris and its selective acylation study

孙金鹏

指导教师姓名: 卢 英 华 教 授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 1 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 1 1 年 6 月

学位授予日期: 2 0 1 1 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	3
第一章 综述.....	5
1.1 脂肪酶概述.....	5
1.2 CALB (<i>Candida antarctica</i> lipase B)	6
1.2.1 CALB 的来源.....	6
1.2.2 CALB 的结构.....	6
1.2.3 CALB 的催化特性.....	7
1.2.4 CALB 的作用机理.....	8
1.2.5 CALB 的应用.....	9
1.3 CALB 的克隆表达.....	10
1.3.1 用 <i>Escherichia coli</i> 表达 CALB	10
1.3.2 用 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 表达 CALB.....	11
1.3.3 用 <i>Pichia pastoris</i> 表达 CALB.....	11
1.4 毕赤酵母表达系统.....	12
1.4.1 毕赤酵母表达系统的优点.....	12
1.4.2 毕赤酵母的生物学特性.....	13
1.4.3 毕赤酵母的表达载体.....	14
1.4.4 毕赤酵母的转化方法.....	15
1.4.5 影响表达的因素.....	17
1.4.6 外源蛋白成功表达例子.....	20
1.5 密码子优化技术.....	22
1.6 脂肪酶在维生素 A 合成中的应用.....	26
1.7 脂肪酶的固定化.....	27
1.8 选题意义及研究内容.....	28

第二章 野生型 CALB 的克隆及其在毕赤酵母的表达	30
2.1 引言.....	30
2.2 实验材料及仪器	30
2.2.1 菌株与质粒	30
2.2.2 主要试剂与材料	31
2.2.3 主要仪器与设备	32
2.2.4 培养基和常用溶液.....	33
2.3 实验方法.....	38
2.3.1 南极假丝酵母基因组的提取	38
2.3.2 目的基因扩增.....	39
2.3.3 琼脂糖凝胶电泳.....	40
2.3.4 PCR 产物的纯化.....	40
2.3.5 酶切反应（双酶切）	41
2.3.6 目的基因 CALB 与载体 pPIC9K 的连接反应.....	42
2.3.7 DH5 α 感受态细胞的制备.....	42
2.3.8 大肠杆菌的转化.....	43
2.3.9 重组质粒 pPIC9K-CALB 的提取和鉴定.....	43
2.3.10 重组质粒的线性化.....	44
2.3.11 <i>Pichia pastoris</i> GS115 的电击转化.....	44
2.3.12 重组菌表型鉴定及基因拷贝数检测.....	45
2.3.13 重组酵母的 PCR 鉴定	45
2.3.14 重组毕赤酵母 GS115-pPIC9K-CALB 的产酶诱导	46
2.3.15 CALB 酶活测定	47
2.3.16 考马斯亮蓝染色法（Bradford 法）测定总蛋白	47
2.3.17 SDS-PAGE 电泳	49
2.4 结果与讨论	50
2.4.1 南极假丝酵母基因组的提取.....	50

2.4.2 PCR 扩增 CALB 基因片段.....	51
2.4.3 酶切产物回收.....	52
2.4.4 重组质粒 pPIC9K-CALB 的鉴定.....	52
2.4.5 CALB 基因测序与比对.....	53
2.4.6 重组毕赤酵母基因组验证.....	54
2.4.7 重组毕赤酵母表型筛选.....	54
2.4.8 毕赤酵母重组菌拷贝数筛选.....	55
2.4.9 重组毕赤酵母的产酶诱导.....	56
2.5 小结.....	58
第三章 CALB 基因密码子优化及其在毕赤酵母的表达.....	59
3.1 引言.....	59
3.2 实验材料及仪器.....	59
3.2.1 菌株与质粒.....	59
3.2.2 主要试剂与材料.....	59
3.2.3 主要仪器与设备.....	59
3.2.4 培养基和常用溶液.....	60
3.3 实验方法.....	60
3.3.1 CALB 基因的优化设计.....	60
3.3.2 重组质粒 pMD18T-syCALB 的提取.....	60
3.3.3 酶切反应.....	60
3.3.4 目的基因 syCALB 与载体 pPIC9K 的连接反应.....	61
3.3.5 大肠杆菌的转化.....	62
3.3.6 重组质粒 pPIC9K-syCALB 的提取和鉴定.....	62
3.3.7 pPIC9K-syCALB 转化毕赤酵母 GS115.....	62
3.3.8 重组酵母的鉴定.....	62
3.3.9 重组毕赤酵母 GS115-pPIC9K-syCALB 的产酶诱导.....	62
3.3.10 CALB 的酶活测定和 SDS-PAGE 分析.....	63

3.3.11 金属螯合层析法纯化 CALB.....	63
3.3.12 酶学性质的测定.....	63
3.4 结果与讨论.....	64
3.4.1 syCALB 基因的获得.....	64
3.4.2 载体 pPIC9K 的获得.....	65
3.4.3 重组质粒 pPIC9K-syCALB 的鉴定.....	66
3.4.4 syCALB 基因测序与比对.....	66
3.4.5 重组毕赤酵母基因组验证.....	67
3.4.6 重组毕赤酵母表型筛选.....	68
3.4.7 毕赤酵母重组菌拷贝数筛选.....	68
3.4.8 定性检测 CALB.....	69
3.4.9 重组毕赤酵母的产酶诱导.....	70
3.4.10 金属螯合层析法纯化 CALB.....	72
3.4.11 重组 CALB 酶学性质的测定.....	74
3.5 小结.....	78
第四章 重组毕赤酵母发酵生产 CALB 的条件优化.....	79
4.1 引言.....	79
4.2 实验材料与仪器.....	79
4.2.1 实验材料.....	79
4.2.2 实验所需主要药品与仪器设备.....	80
4.2.3 常用培养基及溶液.....	80
4.3 实验方法.....	80
4.3.1 摇瓶培养.....	80
4.3.2 3.6 L 发酵罐高密度培养重组毕赤酵母.....	80
4.3.3 酵母菌体干湿重测定.....	82
4.3.4 考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法) 测定总蛋白.....	83
4.3.5 CALB 酶活测定.....	83

4.4 结果与讨论	84
4.4.1 培养基的选择	84
4.4.2 甲醇添加量的选择	86
4.4.3 不同 pH 对表达外源蛋白的影响	87
4.4.4 诱导温度的选择	88
4.4.5 重组毕赤酵母发酵罐高密度发酵	89
4.5 小结	91
第五章 CALB 单酰化维生素 A 前体的研究及其固定化	92
5.1 引言	92
5.2 试验材料与仪器	93
5.2.1 主要试剂	93
5.2.2 主要仪器	93
5.3 试验方法	94
5.3.1 乙酰化反应	94
5.3.2 检测方法	94
5.3.3 聚丙烯树脂固定化 CALB	94
5.4 结果与讨论	95
5.4.1 Novozyme 435 单酰化氢化物条件的优化	95
5.4.2 聚丙烯树脂固定化 CALB 的研究	103
5.5 小结	104
第六章 结论和展望	106
6.1 结论	106
6.2 展望	107
参考文献	109
附录 培养基配方	119

CONTENTS

Chinese Abstract	1
English Abstract	3
Chapter 1 Review	5
1.1 Overview of lipase	5
1.2 CALB (<i>Candida antarctica</i> lipase B)	6
1.2.1 The source of CALB	6
1.2.2 The structure of CALB	6
1.2.3 The catalytic characteristics of CALB	7
1.2.4 The catalytic mechanism of CALB	8
1.2.5 The application of CALB	9
1.3 Cloning and expression of CALB	10
1.3.1 Expression of CALB in <i>Escherichia coli</i>	10
1.3.2 Expression of CALB in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.3.3 Expression of CALB in <i>Pichia pastoris</i>	11
1.4 <i>Pichia pastoris</i> expression system	12
1.4.1 Advantages of <i>Pichia pastoris</i>	12
1.4.2 Biological characteristics of <i>Pichia pastoris</i>	13
1.4.3 Expression vectors of <i>Pichia pastoris</i>	14
1.4.4 Introduction of foreign gene into <i>Pichia pastoris</i>	15
1.4.5 Factors affecting the expression	17
1.4.6 Examples of protein expressed by <i>Pichia pastoris</i>	20
1.5 Technique of codon optimization	22
1.6 The application of lipase in synthesis of vitamin A	26
1.7 Immobilization of lipase	27
1.8 Contents and purpose of this study	28

Chapter 2 Cloning and expression of wild type CALB in *Pichia pastoris*.....30

2.1 Introduction.....	30
2.2 Materials and equipment	30
2.2.1 Strains and plasmid	30
2.2.2 Reagents.....	31
2.2.3 Equipment	32
2.2.4 Culture media and solution	33
2.3 Experimental methods.....	38
2.3.1 Extraction of <i>Candida antarctica</i> genomic DNA.....	38
2.3.2 Amplification of target gene.....	39
2.3.3 Agarose gel electrophoresis.....	40
2.3.4 Purification of PCR products	40
2.3.5 Restriction endonuclease reaction.....	41
2.3.6 Ligation of DNA fragment and pPIC9K.....	42
2.3.7 Preparation of competent <i>E. coli</i> DH5 α	42
2.3.8 Transformation of recombinant plasmid into <i>E. coli</i>	43
2.3.9 Extraction of recombinant plasmid pPIC9K-CALB.....	43
2.3.10 Linearization of recombinant plasmid pPIC9K-CALB.....	44
2.3.11 Transformation of recombinant plasmid into GS115	44
2.3.12 Phenotype identification and muti-copy selection.....	45
2.3.13 PCR identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	45
2.3.14 Expression in recombinant <i>Pichia pastoris</i> GS115-pPIC9K-CALB.....	46
2.3.15 Determination of CALB activity.....	47
2.3.16 Determination of protein concentration by Bradford method.....	47
2.3.17 SDS-PAGE analysis	49
2.4 Results and discussion.....	50
2.4.1 Extraction of <i>Candida antarctica</i> genomic DNA.....	50

2.4.2 PCR amplification of CALB gene.....	51
2.4.3 Recycling of enzyme digested products.....	52
2.4.4 Identification of pPIC9K-CALB.....	52
2.4.5 Analysis of CALB sequence.....	53
2.4.6 Genome identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	54
2.4.7 Phenotype identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	54
2.4.8 Mutil-copy selection of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	55
2.4.9 Expression of CALB in recombinant <i>Pichia pastoris</i>	56
2.5 Conclusions.....	58
Chapter 3 Codon optimization of CALB gene and expression by <i>Pichia pastoris</i>	59
3.1 Introduction.....	59
3.2 Materials and equipment.....	59
3.2.1 Strains and plasmid.....	59
3.2.2 Reagents.....	59
3.2.3 Equipment.....	59
3.2.4 Culture media and solution.....	60
3.3 Experimental methods.....	60
3.3.1 Codon optimization of CALB gene.....	60
3.3.2 Extraction of recombinant pMD18T-syCALB.....	60
3.3.3 Restriction endonuclease reaction.....	60
3.3.4 Ligation of syCALB and pPIC9K.....	61
3.3.5 Transformation of recombinant plasmid into <i>E. coli</i>	62
3.3.6 Extraction of recombinant plasmid pPIC9K-syCALB.....	62
3.3.7 Transformation of pPIC9K-syCALB into <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	62
3.3.8 Identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	62
3.3.9 Expression in recombinant <i>Pichia pastoris</i> GS115-pPIC9K-syCALB.....	62
3.3.10 Determination of CALB activity and SDS-PAGE analysis.....	63

3.3.11 Purification of CALB by metal chelate chromatography	63
3.3.12 Characterization of recombinant CALB properties	63
3.4 Results and discussion	64
3.4.1 Isolation of syCALB	64
3.4.2 Recovery of pPIC9K	65
3.4.3 Identification of pPIC9K-syCALB	66
3.4.4 Analysis of syCALB sequence	66
3.4.5 Genome identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	67
3.4.6 Phenotype identification of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	68
3.4.7 Mutil-copy selection of recombinant <i>Pichia pastoris</i>	68
3.4.8 Qualitative analysis of CALB	69
3.4.9 Expression of syCALB in recombinant <i>Pichia pastoris</i>	70
3.4.10 Purification of CALB by metal chelate chromatography	72
3.4.11 Characterization of recombinant CALB properties	74
3.5 Conclusions	78
Chapter 4 Optimization of CALB fermentation by recombinant <i>Pichia pastoris</i>	79
4.1 Introduction	79
4.2 Materials and equipment	79
4.2.1 Materials	79
4.2.2 Reagents and equipment	80
4.2.3 Culture media and solution	80
4.3 Experimental methods	80
4.3.1 Shake flask culture	80
4.3.2 High-cell density cultivation of recombinant <i>P. pastoris</i> in 3.6 L bioreactor	80
4.3.3 Determination of dry/wet biomass	82
4.3.4 Determination of protein concentration by Bradford method	83
4.3.5 Determination of CALB activity	83

4.4 Results and discussion	84
4.4.1 Selection of culture media.....	84
4.4.2 Optimization of methanol concentration in induction phase.....	86
4.4.3 Effect of pH on heterologous protein expression.....	87
4.4.4 Effect of induction temperature on heterologou protein expression.....	88
4.4.5 High cell density fermentation in bioreactor with recombinant <i>P. pastoris</i>	89
4.5 Conclusions	91
Chapter 5 Immobilization of CALB and its application in single acylation of vitamin A	92
5.1 Introduction	92
5.2 Materials and equipment	93
5.2.1 Reagents.....	93
5.2.2 Equipment.....	93
5.3 Experimental methods	94
5.3.1 Acetylation.....	94
5.3.2 Analysis methods.....	94
5.3.3 Polypropylene immobilized CALB.....	94
5.4 Results and discussion	95
5.4.1 Optimization of single acylation by Novozyme 435.....	95
5.4.2 The study of immobilization of CALB by polypropylene.....	103
5.5 Conclusions	104
Chapter 6 Conclusions and Prospects	106
6.1 Conclusions	106
6.2 Prospects	107
References	109
Appendix: Ingredients of culture media	119

摘 要

南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctic lipase B*, CALB) 来源于南极假丝酵母, 是一种优良的脂肪酶, 它对水溶性、非水溶性物质都有很强的催化活性, 在有机合成、手性化合物拆分、医药中间体等领域得到广泛应用。然而南极假丝酵母产酶量低, 发酵周期长, 远不能满足目前的需求。而通过基因改良的米曲霉发酵获得的 CALB, 其售价约为 16000 元/千克, 不适合工业化应用。本课题主要目的是以毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为表达系统, 通过基因工程手段提高 CALB 的表达量, 从而降低其工业应用的成本。主要研究内容及其结果如下:

首先, 探索野生型 CALB 基因在毕赤酵母表达的可行性。以南极假丝酵母基因组为模板扩增 CALB 基因的前导肽 (pro-peptide) 和编码成熟肽 (mat-peptide) 部分, 将 PCR 扩增产物插入 pPIC9K 的多克隆位点, 得到重组质粒 pPIC9K-CALB, 将其线性化后转化毕赤酵母 GS115, 最终获得 8 拷贝数的重组毕赤酵母 GS115-pPIC9K-CALB。对 GS115-pPIC9K-CALB 进行甲醇诱导, 收集不同诱导时间的上清液进行酶活测定和 SDS-PAGE 分析, 结果表明毕赤酵母无法表达野生型 CALB。

其次, 鉴于野生型 CALB 基因无法在毕赤酵母系统实现表达, 根据 CALB 的氨基酸序列 (GenBank accession No. Z30645.1), 采用巴斯德毕赤酵母偏好密码子重新设计 CALB 基因序列, 序列保留 pro-peptide 和 mat-peptide 部分, 并在序列的下游添加 His-Tag 标签序列, 合成优化序列。将序列插入 pPIC9K 的多克隆位点得到重组质粒 pPIC9K-syCALB, 转化毕赤酵母 GS115 后得到重组毕赤酵母 GS115-pPIC9K-syCALB。经过 1% 甲醇诱导 120 h, 酶活力达到最大值 46 U mL^{-1} , 蛋白表达量为 242.2 mg L^{-1} 。SDS-PAGE 分析表明重组 CALB 分子量为 35 kd 和 38 kd, 比野生型 CALB 略大。通过金属螯合层析对发酵上清液纯化, 将目的蛋白纯化了 5.23 倍, 比活达到 856.7 U mg^{-1} , 酶活的回收率达到 81.2%。对重组 CALB 进行酶学性质研究发现, 其最适反应温度和 pH 分别为 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 6.5, CALB 在 pH 为 5.0-8.0 之间、 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下有较好稳定性, Ca^{2+} , Zn^{2+} ,

Mn^{2+} 有助于酶活的提高，而 Cu^{2+} ， Ag^+ ， Fe^{3+} 强烈抑制酶催化反应。摇瓶优化阶段，确定最优诱导培养基为 BMMY，培养基最适 pH 为 6.0，最佳诱导温度为 20 °C，甲醇最适添加量为 2%。使用 3.6 L 发酵罐高密度培养重组毕赤酵母 GS115-pPIC9K-syCALB，采用变温发酵策略，以 BSM 作为培养基。前期流加甘油充当碳源，30 °C 培养；当细胞干重为 25.7 g L⁻¹ 时进行甲醇诱导，诱导温度为 20 °C，甲醇起始流加速率为 1.8 mL h⁻¹ L⁻¹，根据溶氧变化手动控制甲醇流加速率，维持溶氧值为 25%。诱导 112 h 后酶活为 163.7 U mL⁻¹，蛋白浓度在诱导 124 h 达到最大值，为 824.7 mg L⁻¹。

最后，在毕赤酵母高效表达 CALB 的基础上，尝试以聚丙烯树脂 (PP) 固定化 CALB，并以 PP-CALB 催化维生素 A 前体的单酰化反应。以商品化 CALB，即 Novozyme 435 优化得到最佳反应条件：溶剂为正己烷（分子筛干燥除水），酰基供体为乙酸乙烯酯，其与维生素 A 前体的摩尔比控制在 3:1，酶添加量为 5 mg mL⁻¹，反应温度 50 °C，反应时间 90 min。Novozyme 435 和 PP-CALB 对氢化物转化率分别为 88.7%和 39%，产物均为单酰化物。

关键词：南极假丝酵母脂肪酶 B；密码子优化；毕赤酵母；变温发酵；固定化

Abstract

Candida antarctica lipase B is an excellent lipase, which shows strong catalytic activity to hydrophilic and hydrophobic substrates and is widely used in the resolution of chiral compounds in organic solvent and synthesis of pharmaceutical intermediates. However, the production of enzyme by *Candida antarctica* cannot meet the industrial requirement due to the low yield and long fermentation period. Besides, the CALB from genetically modified *Aspergillus oryzae* is 16000 yuan per kilogram, which is not adaptive in industry. The purpose in our research is to improve the production of CALB by using *Pichia pastoris* as the expression system. The studies and results in this research are as follows:

First, the feasibility of expression of the wild type CALB by *Pichia pastoris* was investigated. The nucleotide sequence of CALB was PCR-amplified from *Candida antarctica* genomic DNA, and the gene fragment was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K, yielding pPIC9K-CALB. The recombinant plasmid was then transformed into *P. pastoris* GS115. The recombinant GS115-pPIC9K-CALB with eight copy number was obtained by G418 resistance screening. However, enzyme activity and SDS-PAGE analysis of sample taken from shake flask culture in different induction periods showed that the wild type CALB could not be expressed by *Pichia pastoris*.

Secondly, we designed and synthesized CALB gene fragment according to the amino acid sequence. High-usage codons of *Pichia pastoris* were chosen and the fragment included pro-peptide, mat-peptide and His-Tag. The synthetic fragment was inserted into the MCS of pPIC9K, yielding GS115-pPIC9K-syCALB. Induced by methanol for 120 h the enzyme activity reached the maximum 46 U mL⁻¹, corresponding to a secreted protein concentration of 242.2 mg L⁻¹. SDS-PAGE analysis showed the size of the recombinant CALB were 35 kd and 38 kd which were larger than the wild type. The CALB was purified by metal chelate chromatography by 5.23 folds and the specific activity reached 856.7 U mg⁻¹ with

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库