

重组角质酶的制备及合成乙酸乙酯条件优化

郭小杰^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 吴敬^{1,2}, 陈晟^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了实现镰孢菌角质酶的高效表达, 对重组菌株 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-ScCuA 在 3 L 发酵罐进行了发酵工艺优化, 获得的最优发酵条件为: 诱导温度 28 ℃, 初始诱导菌浓 OD₆₀₀ 为 100, 诱导阶段甲醇体积分数为 1% 条件下进行诱导产酶。在该条件下发酵 138 h 时上清酶活可达到最大值 419 U/mL, 是优化前的 2 倍。对重组角质酶在有机溶剂中合成乙酸乙酯的酯化条件进行了优化, 结果表明, 当底物乙酸浓度为 0.1 mol/L, 乙醇浓度为 0.15 mol/L, 温度 50 ℃, 在异辛烷中反应 16 h, 乙酸乙酯可以达到最大转化率 94.12%。

关键词: 角质酶; 毕赤酵母; 高密度发酵; 酯合成; 乙酸乙酯

中图分类号: TQ 925 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)08-0888-08

Optimization of Recombinant Cutinase Fermentation Conditions and Its Application in Ethyl Acetate Synthesis

GUO Xiaojie^{1,2}, SU Lingqia^{1,2}, WU Jing^{1,2}, CHEN Sheng^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to achieve efficient production of the cutinase from *Sirococcus conigenus*, the optimization of fermentation conditions was investigated in *P. pastoris* KM71 harboring the plasmid pPIC9K-ScCuA. The optimized fermentation conditions were as follows: the inducing temperature is 28 ℃, the induction phase methanol concentration is maintained at 1%. When the initial cell concentration OD₆₀₀ reached 100. Under the optimum condition, the enzyme activity reached 419 U/mL at cultivation of 138 h, was 2 times than before. Different reaction parameters for the synthesis of ethyl acetate by direct esterification in organic solvents are investigated. The highest yield of 94.12% is obtained at 0.1 mol/L acetic acid, 0.15 mol/L alcohol using a reaction temperature of 50 ℃ for 16 h incubation time in iso-octane.

Keywords: cutinase, *P. pastoris*, high-efficiency expression, ester synthesis, ethyl acetate

收稿日期: 2015-12-03

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2013B090600065); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2015019-18)。

* 通信作者: 陈晟(1984—), 女, 江苏常州人, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事基因工程和蛋白质工程研究。

E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

引用本文: 郭小杰, 宿玲恰, 吴敬, 等. 重组角质酶的制备及合成乙酸乙酯条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(08): 888-895.

角质酶(EC 3.1.1.74)是一种丝氨酸酯酶,属于 α/β 水解酶家族中的最小成员^[1]。研究表明,角质酶是一种多功能酶,不仅能够水解角质的酯键,也能够水解各种小分子可溶性酯类物质、短链和长链甘油三酯、聚己内酯和其他聚酯类物质^[2-3],此外,角质酶还能够催化酯合成反应和酯交换反应^[4-6],因此在农业生产、天然产物提取、纺织、食品、洗涤剂、生物柴油及酯合成等领域具有广泛的应用前景。

毕赤酵母表达系统是一种真核表达系统,已被成功应用于基础研究和表达各种来源于人类、动物、植物、真菌、细菌和病毒等的重组异源蛋白^[7-8]。该表达系统对异源蛋白表达有许多优势:异源表达基因在甲醇诱导下整合到基因组中靠近乙醇氧化酶启动子的下游,因此在甲醇作为唯一碳源的情况下可以实现目的基因的高效表达;异源蛋白也能在廉价原料的情况下实现大量分泌;毕赤酵母还能对异源蛋白进行翻译后修饰,使其正确折叠和糖基化^[9-11]。*P. pastoris* 高密度发酵表达外源蛋白差异较大,一方面与外源基因本身的特性有关,另一方面发酵条件对其表达量也有重要影响,因此可以从培养基组成、温度、pH、初始诱导菌浓、溶氧、诱导甲醇浓度等方面对发酵工艺条件进行优化研究。

乙酸乙酯(EA)又称醋酸乙酯,为无色透明液体,是一种用途广泛的精细化工产品,可用作涂料、人造革、人造纤维等的溶剂;也可用作黏合剂的溶剂,用于印刷油墨的生产;用做医药和有机酸等产品的萃取剂;还可用作纺织工业的清洗剂,也是制药工业和有机合成中的重要原料;同时也是香料工业中的重要香料添加剂,为我国 GB2760—86 规定为允许使用的食用香料^[12-13]。乙酸乙酯通常是通过从菠萝、香蕉等果品中提取或者化学合成方法得到。前者得到的是混合酯类物质、浓度低、提取量少,从而使其生产成本比较高。而化学合成方法则是用强酸或者强碱作为催化剂在高温高压下反应生成,有副产物形成,且需要后处理^[14-15]。与化学合成相比,酶催化合成反应具有区域选择性和位置专一性、条件温和、不会造成环境污染,且产品更易被大众接受^[16-17]。到目前为止,脂肪酶、酯酶和角质酶已经被广泛用于在非水媒介中生产酯类物质^[18-19]。

本研究对实验室前期构建的含有酸性角质酶基因的重组毕赤酵母进行了 3 L 罐发酵工艺优化,并对其在有机溶剂中合成乙酸乙酯的工艺进行优

化,以获得高效合成乙酸乙酯的最优方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 含 *Sirococcus conigenus* 角质酶基因的重组菌 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-ScCutA 为本实验室保藏。

1.1.2 培养基 种子培养基(g/L):酵母粉 10,蛋白胨 20,YNB 13.4,甘油 30。

3 L 罐发酵培养基 (BSM)(g/L):CaSO₄ 0.939, MgSO₄·7H₂O 14.9, KOH 4.13, K₂SO₄ 18.2, 甘油 30, 85% H₃PO₄ 26.7 mL/L, 微量盐溶液 (PTM₁) 4.3 mL/L。

PTM₁ 溶液 (g/L):CuSO₄·5H₂O 6, ZnCl₂ 20, Na₂MoO₃·2H₂O 0.2, CoCl₂ 0.5, KI 0.08, MnSO₄·H₂O 3, H₃BO₃ 0.02, FeSO₄·7H₂O 65, H₂SO₄ 5.0 mL/L。

生长补料培养基 (g/L):甘油 500 (含 5 mL/L PTM₁)。

甲醇诱导培养基:甲醇(含 12 mL/L PTM₁)。

1.1.3 试剂 硫磺脱氧胆酸钠和对硝基苯丁酸酯(4-Nitrophenyl butyrate, pNPB)购于 Sigma 公司;酵母无氨基基础氮源培养基(YNB)购自上海生物工程公司;分子级酵母粉和蛋白胨购自 Oxoid(英国)公司;其他常规试剂均为国产分析纯,购于国药。

1.1.4 主要仪器 台式高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;超净工作台购自苏州科盛制造有限公司;梅特勒 DEL320pH 计购自梅特勒-托利多仪器有限公司;721E 型可见分光光度计购自上海光谱仪器有限公司;恒温水浴摇床购自江苏金坛亿通电子有限公司;3 L Infors 全自动发酵罐购自伊孚森生物技术有限公司;FC-2002 型甲醇浓度检测流加仪购自上海苏波信息技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *P. Pastoris* KM71/pPIC9K-ScCutA 在 3 L 发酵罐的高密度发酵培养 从-80℃保藏的甘油管中以 0.2%的接种量将种子接种于种子培养基中,30℃、200 r/min 培养 20~24 h。采用 3 个阶段的培养过程对毕赤酵母 KM71/pPIC9K-ScCutA 进行高密度发酵条件优化。首先,将种子液以体积分数 10%的接种量接入含 1 L 基础盐培养基 (BSM) 的 3 L Infors 全自动发酵罐中。发酵开始分批生长阶段温

度控制在30℃,用氢氧化铵对pH值进行调整,并保持在5.0。通过偶联转速与溶氧,将溶氧水平维持在30%左右。当初始培养基中甘油耗尽后,开始溶氧反弹,随着溶解氧的迅速增加,指数流加甘油来实现高细胞密度。在菌体量达到所需要的值时,停止流加甘油,饥饿处理1~2 h待培养基中甘油完全消耗掉后开始进行甲醇诱导。对诱导温度、诱导阶段甲醇维持体积分数和初始诱导细胞浓度的优化是通过改变诱导温度(26、28、30℃)、初始诱导细胞浓度 OD_{600} (50、100、150)和诱导阶段甲醇体积分数(0.25%、1%、2%)来实现。

1.2.2 角质酶酶活的测定方法 将30 μ L适当稀释的酶液加入到1 470 μ L含50 mmol/L pNPB的1×McIlvatic缓冲液(pH 4.5)中,在340 nm处记录对硝基酚的生成速率。酶活单位定义:在37℃,每分钟水解对硝基苯丁酸酯生成1 μ mol对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活力单位。

1.2.3 利用冻干角质酶制备短链芳香酯的反应条件优化

(1)重组Cutinase的纯化和冻干。ScCutA用35%的硫酸铵沉淀、1×McIlvatic缓冲液(pH 7.0)透析和DEAE-Sephacrose阴离子交换柱进行纯化,酶活最高的洗脱峰所对应的酶液用1×McIlvatic缓冲液(pH 4.5)透析、-80℃凝固,然后用真空冷冻干燥机过夜冻干。冻干的酶粉4℃保存用于酯合成反应。

(2)有机溶剂脱水。所有用于酯合成反应的有机试剂需要脱水预处理:将3Å分子筛加入有机试剂中,室温放置一个星期,滤去分子筛,得脱水有机溶剂。

(3)乙酸乙酯的酯合成方法。称取一定量的乙酸和乙醇于20 mL带塞烧瓶中,量取10 mL无水的有机溶剂(异辛烷、正己烷、正庚烷、丙酮、乙腈),加入50 U/mL的冻干角质酶粉,置于恒温水浴摇床中,在摇床转速150 r/min下反应一定时间,取样待测。

(4)酯化率的定量分析。样品在反应前后分别取500 μ L加入到10 mL水中,以酚酞作指示剂,用0.005 mol/L的NaOH滴定,通过测定样品在反应前、后酸值的降低值确定酯化反应产率,酯化率计算公式:转化率(%)=1-消耗的NaOH体积/空白样品消耗NaOH体积。

2 结果

2.1 3 L罐中高密度发酵生产角质酶

2.1.1 诱导温度对重组菌生长以及产酶的影响

温度是影响菌体生长和外源蛋白表达的重要因素之一。升高温度,有利于细胞的正常生长和蛋白表达,但温度过高会使菌体过早衰老,而*P. Pastoris*的发酵周期相对较长,高温会使其发酵周期缩短,降低外源蛋白的表达量,同时也会增加宿主细胞内蛋白酶的释放,增加目的蛋白的降解^[20]。因此,利用*P. Pastoris*表达外源重组蛋白的整个发酵过程中,菌体生长阶段的培养温度可以直接参照表达实验手册(Invitrogen公司)而定,而诱导产酶阶段的温度则需根据所表达的特定蛋白来定^[21-22]。为考察温度对ScCuA表达的影响,本研究在初始诱导细胞浓度 OD_{600} 为50、诱导阶段甲醇体积分数为0.25%条件下,考察了不同诱导温度26、28、30℃对菌体生长和发酵产酶的影响。

由图1(a)可知,在整个诱导培养过程中,28℃条件下更有利于菌体的生长,菌体生长要好于其他条件,至诱导138 h放罐时 OD_{600} 达到286。但是从图1(b)中可以发现,当诱导温度为26℃和30℃时能够达到的最高酶活相近,菌体在28℃诱导下所得酶活最高,为248.7 U/mL,为26℃和30℃诱导下的1.2倍。因此,发酵重组毕赤酵母生产角质酶时应采用28℃的诱导温度。

2.1.2 诱导阶段维持甲醇浓度对重组菌生长和产酶的影响

在酵母发酵过程中,甲醇不仅是整个诱导发酵过程中的唯一碳源,还是外源蛋白表达的诱导剂,它能诱导细胞产生大量的AOX酶,从而促进甲醇代谢为细胞生长提供能量及诱导目的蛋白表达。然而,并不是甲醇浓度越高越有利于外源蛋白的表达。在*P. pastoris*诱导表达外源蛋白的过程中,培养基中过高体积分数的甲醇会对酵母细胞产生毒害,抑制细胞代谢甲醇的功能^[23],导致细胞死亡率升高,进而降低目的蛋白的表达量^[24]。因此,维持整个诱导发酵过程中的甲醇体积分数对细胞的生长和产酶有重要的影响。

本研究考察了当初始诱导细胞浓度 OD_{600} 达到50,诱导温度为28℃条件下,诱导阶段维持不同体积分数的甲醇对*P. pastoris*菌体生长和角质酶产量的影响,最终确定诱导剂甲醇应该维持的最佳体

积分数。如图 2(a)所示,在整个诱导培养过程中,1%甲醇体积分数条件下更有利于菌体的生长,菌体生长要好于 0.25%和 2%,且 2%体积分数甲醇条件下,细胞生长明显受到抑制,说明维持较高体积分数甲醇不利于细胞生长。对比不同甲醇体积分数下的酶活曲线,如图 3(b)所示,在诱导前 72 h 时,3 个诱导甲醇体积分数下角质酶酶活相差不大。但是随着诱导的进行,维持 1%甲醇体积分数下增长迅速,发酵液中角质酶酶活最高,达到 315.8 U/mL。因此,诱导阶段维持 1%的甲醇体积分数对角质酶在 *P. pastoris* 中的表达最有利。

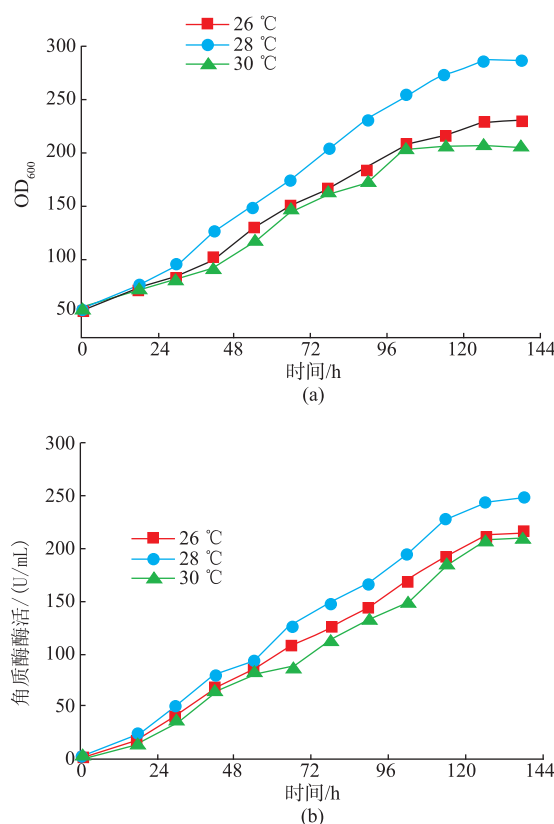


图 1 诱导温度对重组毕赤酵母细胞生长和产酶的影响
Fig. 1 Effects of inducing temperature on *P. pastoris* growth and production of cutinase synthase

2.1.3 初始诱导细胞浓度对重组菌生长和产酶的影响 利用重组毕赤酵母在 3 L 发酵罐的高密度发酵是许多重组蛋白工业化生产的重要途径^[25]。通常情况下,提高初始诱导菌体浓度可以增加诱导阶段的生物量,使更多的甲醇合成外源蛋白^[26]。然而当生物量达到较高水平时,培养条件(溶氧量、营养物质等)容易受到限制,外源蛋白的产量和稳定性也会受到影响,因此高表达量的获得应以实际取得的生

物量为准,高细胞浓度诱导下并不一定能得到高表达量^[27]。为考察初始诱导菌体浓度对 ScCuA 表达的影响,本研究在初始诱导 OD₆₀₀ 为 100、诱导阶段甲醇体积分数为 1%条件下,考察了不同初始诱导菌体浓度 OD₆₀₀ 分别为 50、100、150 时对菌体生长和发酵产酶的影响。

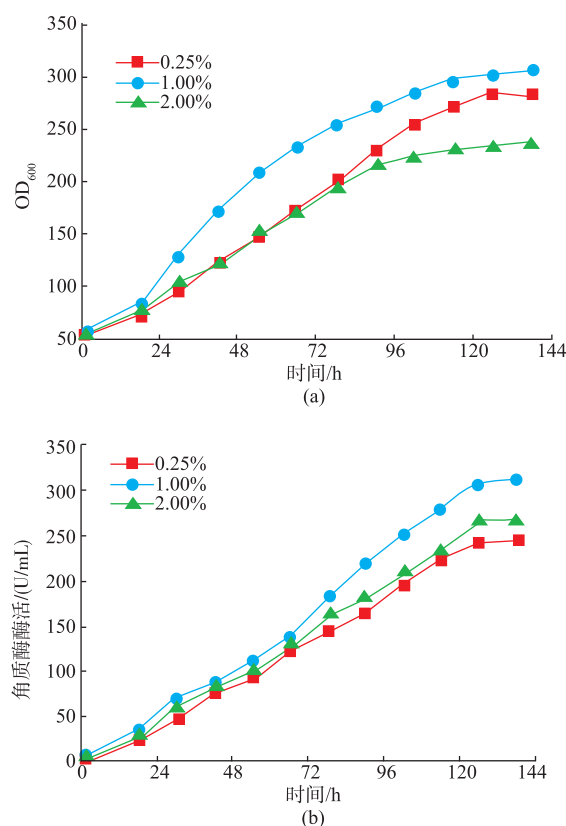


图 2 维持不同甲醇体积分数对重组毕赤酵母细胞生长和产酶的影响

Fig. 2 Effects of methanol concentrations on *P. pastoris* growth and cutinase production

由图 3 可知,在诱导前 72 h,初始诱导菌体浓度对重组菌生长的影响较明显,但是达到稳定期后菌体浓度差别不大。当初始诱导菌浓(OD₆₀₀)由 50 增加到 100 时,最高酶活从 315.8 U/mL 增加到 419.2 U/mL。而当初始诱导菌浓为 150 时,酶活反而下降到 363.5 U/mL。可能是由于菌体浓度过高时,罐内的营养物质和溶氧条件都较低菌浓条件下差,严重影响了菌体的生长和产酶。因此选择 OD₆₀₀=100 作为最适的初始诱导菌体浓度。

2.2 重组角质酶酯合成条件优化

2.2.1 不同有机溶剂对酸酯化率的影响 通常情况下,酶在有机相中的催化活性和稳定性与有机溶

剂的疏水性有关,其活性随着溶剂亲水性的增大而减弱;同时不同有机溶剂对底物的溶解度也不同,只有溶解在溶剂中的底物才能参与酯化反应^[28-29]。本实验考察了反应温度为 40 ℃, 加酶量 50 U/mL, 乙酸底物浓度 0.1 mol/L, 酸醇摩尔比为 1:1 条件下, 分别在异辛烷、正庚烷、正己烷、丙酮、乙腈中, 对乙酸乙酯转化率的影响。由图 4 可知, 在各种有机溶剂中角质酶催化合成乙酸乙酯的酯化率各不相同, 使用乙腈和丙酮作溶剂时, 酯化率均较低, 分别只有 43.16% 和 58.32%; 用正庚烷、正己烷和异辛烷作溶剂时, 乙酸的酯化率均高于 75%, 其中用异辛烷作溶剂时, 反应 16 h 时酯化率最高, 达到 82.52%。因此选用异辛烷作为角质酶催化合成乙酸乙酯的溶剂。

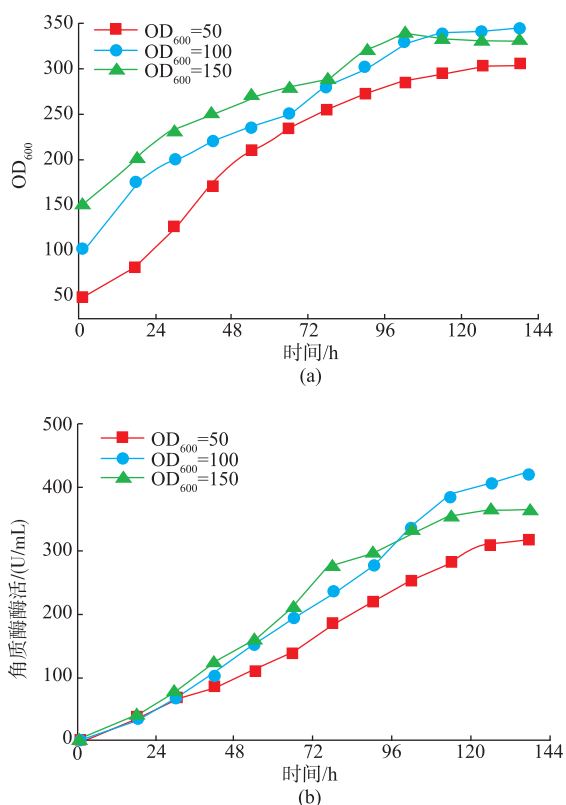


图 3 初始诱导菌浓度对重组毕赤酵母细胞生长和产酶的影响
Fig. 3 Effects of initial induction cell density on *P. pastoris* growth and cutinase production

2.2.2 温度对酸酯化率的影响 温度对生物催化反应的活性、选择性、稳定性, 以及热力学平衡有重要的影响^[30]。本实验研究了不同反应温度 30~80 ℃, 在异辛烷 10 mL, 加酶量 50 U/mL, 酸底物浓度 0.1 mol/L, 酸醇摩尔比为 1:1 条件下反应 16 h, 对乙

酸乙酯转化率的影响。如图 5 所示, 最适反应温度为 30~55 ℃, 且在 50 ℃ 反应达到最大转化率 85.57%。这一结果与该酶在水相中的水解性质不一致, 一方面, 可能是由于酶的结构在冻干过程中发生改变, 使酶的稳定性增加。另一方面, 固体酶比液体酶在有机溶剂中更稳定。然而, 随着温度的继续升高, 转化率呈降低趋势。这可能是由于高温使部分酶蛋白失活, 因为高温是蛋白质变性和失活的重要原因之一^[31]。

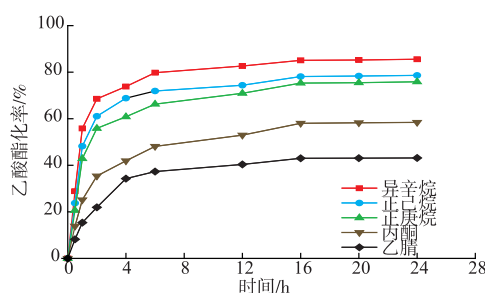


图 4 不同有机溶剂对乙酸酯化率的影响
Fig. 4 Effects of different organic solvents on the esterification rate of acetic acid

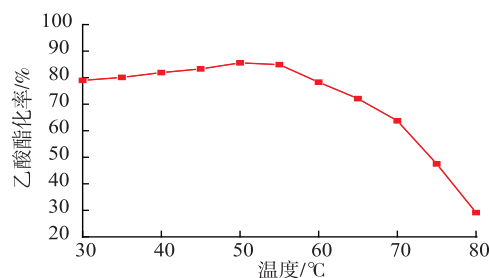


图 5 温度对乙酸酯化率的影响
Fig. 5 Effects of different reaction temperature on the esterification rate of acetic acid

2.2.3 底物浓度对酸酯化率的影响 众所周知, 从热力学角度来讲, 增加底物浓度有利于加快反应速度、促进反应平衡向产物方向移动^[14,32]; 同时在酯合成反应中, 也可以通过加入过量的亲核试剂(醇)或者把产物从反应混合物中移除来推动反应平衡向产物生成方向移动^[33-34]。然而, 过量的醇又会降低反应速度。因此, 考虑到生产成本和催化反应中存在的底物抑制现象, 需要确定一个使乙酸乙酯转化率达到最大值的最佳底物浓度。

(1) 底物乙醇浓度对酸酯化率的影响。通过固定乙酸的浓度为 0.1 mol/L, 改变醇的浓度 0.05~

0.3 mol/L,研究醇浓度对酯合成转化率的影响。如图6所示,乙酸乙酯的最大转化率在乙醇浓度为0.15 mol/L时达到最大值94.12%。然而,继续增加乙醇浓度从0.15 mol/L到0.3 mol/L,乙酸乙酯的转化率呈明显的降低趋势。一方面可能是由于过量的醇使反应体系中的部分酶失活^[30];另一方面可能是由于高浓度的醇改变了介质的极性,这与使用高极性试剂达到的效果是一致的^[15,31]。因此乙醇的最佳浓度为0.15 mol/L。

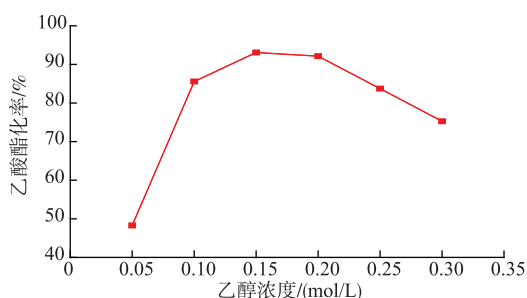


图6 乙醇浓度对乙酸酯化率的影响

Fig. 6 Effects of ethanol concentration on the esterification rate of acetic acid

(2)底物乙酸浓度对酸酯化率的影响。为了研究乙酸浓度对酯合成转化率的影响,通过固定乙醇的浓度为0.15 mol/L,改变乙酸的浓度0.05~0.3 mol/L。如图7所示,随着乙酸浓度的增加,乙酸的酯化率呈增加趋势,当乙酸浓度为0.1 mol/L时,转化率达到了最大值94.12%,然而继续增加乙酸浓度(0.1~0.3 mol/L),乙酸乙酯的转化率呈明显的降低趋势。这可能是由于当乙酸浓度过高时,会影响角质酶的稳定性。因此选定0.1 mol/L为反应最佳乙酸浓度。

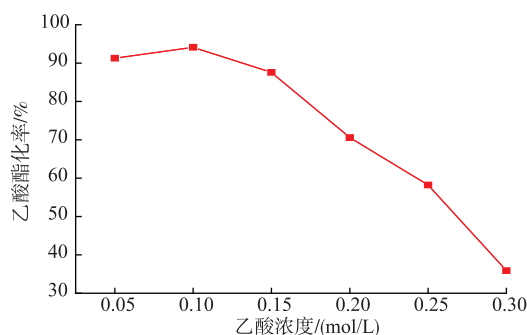


图7 乙酸浓度对乙酸酯化率的影响

Fig. 7 Effects of acetic acid concentration on the esterification rate of acetic acid

3 讨论

目前,国内外学者对角质酶的研究越来越多。关于角质酶在毕赤酵母中的高密度已经有不少文献报道,Seman等人^[9]将来源于*Glomerella cingulata*的角质酶基因在*Pichia pastoris*中进行补料分批发酵优化,诱导24 h时角质酶酶活达到434 U/mL;北京化工大学麻莹等人^[35]将*Monilinia fructicola*角质酶在毕赤酵母中进行异源表达时产量为128.56 U/mL;Kwon等人^[10]将角质酶在*P. pastoris*中异源表达,未经发酵条件优化,不含His标签的角质酶产量达到342 mg/L,表明以*P. pastoris*作为宿主菌制备角质酶具有很大的潜力。在上述研究的基础上,本研究对重组毕赤酵母KM71/pPIC9K-ScCutA基因工程菌在3 L发酵罐进行了发酵工艺优化,发酵138 h时上清的最大酶活可达到419 U/mL,是优化前的2倍,并且是摇瓶的14.7倍左右。下一步研究重点是将该角质酶基因进行多种伴侣蛋白协同表达,如二硫键异构酶(PDI)和核糖体结合蛋白(BIP)可以帮组蛋白质折叠,N-乙酰转移酶(Mpr1)能降低细胞氧气消耗过程中的活性氧(ROS),以期获得更高表达量的角质酶酶液。

乙酸乙酯作为一种无毒无害的绿色溶剂,其市场需求量随着经济的发展呈快速的增长趋势。据统计,2014年世界乙酸乙酯总消费水平达到2 800 kt/a。酶法合成芳香酯因条件温和、无污染而有希望替代化学合成法。徐岩等人^[6]利用重组酶以0.5 mol/L的乙醇和0.5 mol/L的乙酸为底物时,35℃反应72 h,转化率可高达91.5%;de Barros等人^[36]研究*F. solani pisi*角质酶在异辛烷中催化合成短链脂肪酸酯,其中乙酸乙酯的转化率为78%。本研究考察了有机试剂种类、温度、反应时间、底物酸浓度以及底物醇浓度等对合成乙酸乙酯的影响,其最大转化率达到94.12%。虽然异辛烷作为反应溶剂可以得到高得率的乙酸乙酯,但是它易燃、易挥发、沸点高、有毒性等特点,限制了它的工业应用。在后续的研究工作中,可着重尝试用离子液体或者微乳液代替异辛烷作为反应溶剂。

4 结语

本研究对重组毕赤酵母KM71/pPIC9K-ScCutA基因工程菌在3 L发酵罐进行了发酵工艺优化,发

酵 138 h 时上清的最大酶活可达到 419 U/mL, 是优化前的 2 倍。对该重组角质酶在有机相合成乙酸乙酯的酯合成条件进行了优化。结果表明, 最优条件

为底物乙酸浓度为 0.1 mol/L, 乙醇浓度为 0.15 mol/L, 温度 50 °C, 在异辛烷中反应 16 h, 乙酸乙酯可以达到最大转化率 94.12%。

参考文献:

- [1] CHEN S, SU L. Cutinase: characteristics, preparation, and application[J]. **Biotechnology Advances**, 2013, 31(8): 1754-1767.
- [2] CHEN S, SU L. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca* [J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2010, 63(3): 121-127.
- [3] XU H, YAN Q, DUAN X, et al. Characterization of an acidic cold-adapted cutinase from *Thielavia terrestris* and its application in flavor ester synthesis[J]. **Food Chemistry**, 2015, 188: 439-445.
- [4] CHAUDHARI S A, SINGHAL R S. Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physico-chemical characterization[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015, 79: 398-404.
- [5] FRAGA L P, CARVALHO P O, MACEDO G A. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties[J]. **Food & Bioprocess Technology**, 2012, 5(1): 138-146.
- [6] XU Y, WANG D, et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2002, 18(1/2/3): 29-37.
- [7] DAMASCENO L M, HUANG C J, BATT C A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2011, 93(1): 31-39.
- [8] DEMAÎN A L, VAISHNAV P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms [J]. **Biotechnology Advances**, 2009, 27(3): 297-306.
- [9] SEMAN W M K W, BAKAR S A. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions[J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 184: 219-228.
- [10] KWON M A, KIM H S, YANG T H, et al. High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2009, 68(1): 104-109.
- [11] LI Y Y, ZHONG K X. High-level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2015, 108: 90-96.
- [12] DING Aijun, WANG Jinlong. New research and reflection on the synthesis of ethyl acetate [J]. **Chemistry Education**, 2010, 5: 13-14. (in Chinese)
- [13] HUANG Huansheng, HUANG Kelin, YANG Bo, et al. Current situation and development trend of synthetic production technology of ethyl acetate[J]. **Technology and development of Chemical Industry**, 2007, 36(12): 12-16. (in Chinese)
- [14] DE BARROS D P C, FERNANDES P. Synthetic application and activity of cutinase in an aqueous, miniemulsion model system: Hexyl octanoate synthesis[J]. **Catalysis Today**, 2011, 173(1): 95-102.
- [15] KARMEE S K. Lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from crude *Pongamia oil* [J]. **Energy Sources Part A Recovery Utilization & Environmental Effects**, 2015, 37(5): 536-542.
- [16] BORREGUERO I, CARVALHO C M L. Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation[J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2001, 11(4-6): 613-622.
- [17] MATAMA T, CASAL M, CAVACO P A. Direct enzymatic esterification of cotton and avicel with wild-type and engineered cutinases[J]. **Cellulose**, 2012, 20(1): 409-416.
- [18] DUTTA K, DASU V V. Synthesis of short chain alkyl esters using cutinase from *Burkholderia cepacia* NRRL B2320[J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2011, 72(3/4): 150-156.
- [19] NORDBLAD M, ADLERCREUTZ P. Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B[J]. **Journal of Biotechnology**, 2008, 133(1): 127-133.
- [20] POTVIN G, AHMAD A, ZHANG Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2012, 64(19): 91-105.
- [21] MATTANOVICH D, BRANDUARDI P. Recombinant protein production in yeasts [J]. **Methods in Molecular Biology**,

- 2012, 824(3):329-358.
- [22] FANG Shuguang, CHU Jun, HUANG Li, et al. Degradation of reteplase expressed by recombinant *Pichia pastoris* [J]. **Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)**, 2006, 32(12): 1413-1417. (in Chinese)
- [23] AHMAD M, HIRZ M, PICHLER H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(12): 5301-5317.
- [24] CORSI A K, SCHEKAN R. Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1996, 271(48): 30299-30302.
- [25] XIA Shan, WU Fujun, ZHAO Hongliang, et al. Progress of *Pichia pastoris* engineering bacteria on high-density fermentation [J]. **Letters in Biotechnology**, 2013, 1: 109-112. (in Chinese)
- [26] WANG Y, WANG Z, DU G, et al. Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration [J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(3): 1343-1349.
- [27] 汪志浩. 重组毕赤酵母生产碱性果胶酶的流加策略及工业化放大 [D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [28] LIU Shanshan, LIU Peng, ZHOU Lingmei, et al. Catalytic reaction of lipase in organic phase and its applications [J]. **Bulletin of Fermentation Science and Technology**, 2015, 44(2): 52-56. (in Chinese)
- [29] WANG Zhaoye, YANG Liping. Research progress of the enzyme-catalysis in non-aqueous phase [J]. **Hebei Huagong**, 2013(2): 31-34. (in Chinese)
- [30] HAN S Y, PAN Z Y, HUANG D F, et al. Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase [J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2009, 59(1): 168-172.
- [31] JIN Z, NTWALI J, HAN S Y, et al. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor [J]. **Journal of Biotechnology**, 2012, 159(1/2): 108-114.
- [32] HALLING P J. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? [J]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B**, 2004, 359(1448): 1287-1297.
- [33] NYSSOLA A, PIHLAJANIEMI V, JARVINEN R, et al. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88 [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2013, 52(4-5): 272-278.
- [34] ERGAN F, TTANI M, ANDRE G. Use of lipases in multiphasic systems solely composed of substrates [J]. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1991, 68(6): 412-417.
- [35] 麻莹. 桃褐腐菌角质酶基因的克隆与表达 [D]. 北京: 化工大学, 2012.
- [36] DE BARROS D P C, FONSECA L P, FERNANDES P, et al. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent [J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2009, 60(3): 178-185.

科 技 信 息

欧盟重新评估亚铁氰化钠、钾和钙作为食品添加剂的安全性

2018年7月25日, 欧洲食品安全局发 10.2903 / j.efsa.2018.5374 文件, 重新评估亚铁氰化钠 (sodium ferrocyanide, E 535), 亚铁氰化钾 (potassium ferrocyanide, E 536) 和亚铁氰化钙 (calcium ferrocyanide, E 538) 三种亚铁氰化物作为食品添加剂的安全性。

经重新评估, 食品添加剂及食品营养源专家组(ANS)得出结论: 根据暴露评估, 建立了 0.03 毫克/千克体重的亚铁氰化物离子的每日允许摄入量, 亚铁氰化物 (E 535-538) 仅允许作为盐和盐替代品两种食品类别的食品添加剂, 在目前的授权使用范围和水平下没有安全问题。

[信息来源] 厦门 WTO 工作站. 欧盟重新评估亚铁氰化钠、钾和钙作为食品添加剂的安全性 [EB/OL]. (2018-7-27). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/show.asp?id=57713>