

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 高效异源表达脂肪酶研究进展

李 杨, 蔡海莺, 赵敏洁, 李 阳, 冯凤琴*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 馥莉食品研究院, 浙江省农产品加工技术研究重点实验室, 浙江省食品加工技术与装备工程中心, 浙江杭州 310058)

摘要:脂肪酶作为一种常见的工业用酶, 广泛应用于食品、化妆品等与生活密切相关的工业领域, 但较高的生产成本和使用成本, 在一定程度上限制了其进一步应用。通过巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 异源表达系统重组表达脂肪酶, 成为解决限制脂肪酶发展的方法之一。本文介绍了脂肪酶在 *P.pastoris* 表达系统中的异源表达及其优化策略, 并对毕赤酵母表面展示异源脂肪酶的技术及应用进行了归纳。

关键词:巴斯德毕赤酵母 (*P.pastoris*), 脂肪酶, 重组表达优化方法, 表面展示技术

Research progress in heterologous expression of lipase genes in *Pichia pastoris*

LI Yang, CAI Hai-ying, ZHAO Min-jie, LI Yang, FENG Feng-qin*

(Zhejiang University, College of Biosystems Engineering and Food Science, Fuli Institute of Food Science, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Zhejiang R & D Center for Food Technology and Equipment, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Lipase, as a common industrial enzyme is widely used in food, cosmetics and other industrial fields which are closely related to our daily life. However, the high cost of its production and usage limits the further application to a certain extent. Heterologous expression of lipase genes in *Pichia pastoris* has become one of the methods to resolve this problem. This review introduced the heterologous expression of lipase genes in *Pichia pastoris* and the corresponding optimization strategies. Finally, the technology of lipase displaying on *P.pastoris* surface and its applications were summarized.

Key words: *Pichia pastoris*; lipase; optimization strategies of recombinant expression; surface display technology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)07-0377-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.07.071

脂肪酶 (Triacylglycerol acylhydrolases; EC 3.1.1.3) 是能在油水界面上水解甘油三酯的一类酶的总称, 主要来源于动物、植物和微生物。脂肪酶可以催化解脂、酯交换、酯化等反应, 使得它在油脂加工、食品、洗涤剂、化妆品等领域有很广泛的应用。例如, 随着配方奶粉的不断更新, 母乳脂肪替代品 1, 3-油酸-2-棕榈酸三酰基甘油 (OPO) 的研制^[1] 也越来越广泛, 这些结构脂的合成反应, 不仅需要适合反应条件的脂肪酶, 更需要有较高酶活的脂肪酶。脂肪酶的生产方法主要有 3 种: 提取法、化学合成法和微生物发酵法, 其中, 微生物发酵法以其较高的得率、较低的成本逐渐成为脂肪酶生产的首选方法。随着工业的发展, 对脂肪酶的需求也越来越大, 仅仅依靠传统野生菌株和突变株进行发酵得到的脂肪酶

产量, 已经不能满足工业的需要, 通过异源表达系统通常能够获得比野生菌更高的脂肪酶产量^[2], 因此, 利用异源表达系统高水平表达脂肪酶成为一个重要的课题。

巴斯德毕赤酵母 (*P.pastoris*) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一种真核重组蛋白表达系统^[3], 它不仅克服了大肠杆菌表达系统缺少翻译后修饰、通常形成包涵体及表达产量低等缺陷, 还克服了酿酒酵母表达系统分泌效率低、重组菌株不够稳定、表达质粒易丢失等缺陷, 并因其独特的高表达、高分泌、高稳定性等成为现在应用最广、效果最好的异源蛋白表达系统之一^[4]。本文从异源表达脂肪酶的优化策略, 重组表达的脂肪酶的分离纯化, 毕赤酵母表面展示异源脂肪酶的技术及应用等方面介绍了脂肪酶在

收稿日期: 2014-07-14

作者简介: 李杨 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物脂肪酶发酵及性质研究。

* 通讯作者: 冯凤琴 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2012C12005-2); 浙江省植物食品加工技术科技创新团队项目 (2010R50032)。

表1 常见微生物脂肪酶在毕赤酵母中的表达

Table 1 The expression of lipase genes of some common microorganisms in *P.pastoris*

脂肪酶基因来源	表达水平	底物	宿主	表达载体	启动子	参考文献
荧光假单胞菌脂肪酶	20.3U/mL	Olive oil	GS115	pPIC9K	AOX1 AOX2	[10]
不动杆菌脂肪酶	10600U/mL	pNPC	GS115	pPICZ α A	AOX1	[11]
解脂耶氏酵母 Lip2	43900U/mL	Olive oil	GS115	pPICZ α A	AOX1	[12]
解脂耶氏酵母 Lip2	12500U/mL	Olive oil	X-33	pPICZ α A	AOX1	[13]
南极假丝酵母 CALB	480U/mL	tributyryn	GS115	pPICZ α B pPICZB	AOX1	[14]
南极假丝酵母 CALA	215U/mL	tributyryn	X-33	pPICZ α A		[15]
折皱假丝酵母脂肪酶	14000U/mL	Olive oil	X-33	pGAP α A	GAP	[16]
米根霉脂肪酶	1500U/mg protein	Olive oil tributyryn	X-33	pPIC9K	AOX1	[17]
华根霉脂肪酶	587U/mL	pNPP	GS115	pPIC9K	AOX1	[18]
青霉菌脂肪酶	407U/mL	tributyryn	GS115	pPIC9K	AOX1	[19]

P.pastoris 表达系统中的异源表达。

1 巴斯德毕赤酵母表达系统

P.pastoris 表达系统相对于其他异源蛋白表达系统,它具有以下优点:含有醇氧化酶1(AOX1)基因启动子,可以通过甲醇诱导进行异源蛋白表达,具有表达可控性;表达载体上插入的信号肽,可以将表达的异源蛋白高效地分泌到胞外;自身分泌的蛋白较少,有利于异源蛋白的分离;外源基因可以整合到毕赤酵母的基因组上,因传代导致外源基因丢失的可能性较小;具有翻译后修饰功能,如切除信号肽、糖基化修饰等,使异源蛋白更接近天然构象,具有高活性;具有诱导型和组成型两种表达方式,防止了如毒素等异源蛋白组成型表达对宿主的危害;培养成本低,毕赤酵母的营养要求低、培养基廉价、操作简便。同时,分泌型异源蛋白易被蛋白酶水解、较难表达具有活性的复杂蛋白、高密度发酵易污染成为了限制 *P.pastoris* 表达系统应用的最主要因素^[5-6]。

P.pastoris 表达系统商业化已经非常成熟。表达载体按异源蛋白是否分泌可分为胞内表达载体(如 pPIC3.5K)^[7] 和胞外表达载体(如 pPIC9K、pPICZ α A);按表达方式分为诱导型表达载体(pPIC9K)和组成型表达载体(pGAP α A)。常用的 *P.pastoris* 表达菌株均来自于对野生型石油酵母 Y-11430 的突变改造,菌株多为 HIS4 营养缺陷型突变体,所以可以将组氨酸脱氢酶 His4 基因作为筛选标记基因进行重组转化子的筛选。目前常用的表达宿主有 GS115、X33、KM71^[8]、SMD1168^[9]。常见的转化方法有4种:原生质体转化法、电转化法、聚乙二醇(PEG)法和氯化锂(LiCl)法。其中,电转化法应用最普遍、转化效率最高。

2 脂肪酶基因的毕赤酵母表达

许多微生物脂肪酶已成功地在毕赤酵母中高效表达(表1)。从表1中可以看出,在毕赤酵母中成功表达的脂肪酶基因,包括了细菌、酵母、霉菌来源的不同脂肪酶基因,其中以使用分泌表达载体采用分泌表达方式进行表达的居多。

将脂肪酶基因进行定向改造或突变后转入毕赤

酵母中表达,也是当前研究的热点。对脂肪酶基因进行定向改造,可以提高脂肪酶的产量。施碧红等^[20]利用易错 PCR 技术直接对扩展青霉目的蛋白的编码序列进行随机突变,毕赤酵母异源表达后筛选得到的重组脂肪酶比活力比异源表达的重组野生菌株提高了17%。Lin-Cereghino 等^[21]定点突变 α 因子分泌信号序列,去除了57~70氨基酸的3级结构 α -螺旋,重组脂肪酶在毕赤酵母中的分泌量增加了至少50%。对脂肪酶基因的定向改造还可以得到具有特殊性质的脂肪酶,例如现今比较关注的耐热性脂肪酶。Yu 等^[22]在研究华根霉脂肪酶时,通过两轮易错 PCR 引入了平均1~2个氨基酸,又通过两轮 DNA 改组连接了有益的突变体,从而使定向进化得到的突变体的 Tm 值提高了22℃。

脂肪酶基因的定向改造是获得特殊性质脂肪酶的一种方式,而易错 PCR 技术使得这种改造成为可能。*P.pastoris* 表达系统具有完善的表达体系,将突变的脂肪酶基因转入 *P.pastoris* 表达系统中进行成功表达,更加丰富了 *P.pastoris* 表达系统的应用范围。

3 脂肪酶的毕赤酵母表达优化策略

3.1 选择强的启动子

醇氧化酶1(AOX1)启动子和3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)启动子分别是毕赤酵母中最常见的诱导型和组成型启动子。AOX1 启动子主要涉及抑制/去抑制机理和诱导机理^[23],诱导机理是以甲醇为诱导物进行表达,表达强度随着甲醇浓度的不同而不同。GAP 启动子是在毕赤酵母中克隆得到的组成型启动子,使用 GAP 启动子进行表达的发醇条件简单,不需要甲醇诱导及更换碳源,发醇周期短且产量高^[24],还可以避免宿主细胞中甲醛和过氧化氢的累积。除此之外,FLD1(依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶)启动子是以甲醇或甲胺(廉价无毒的氮源)为碳源或氮源的诱导型启动子,也是一种能够带来高水平表达的强启动子。

3.2 基因序列优化

基因序列优化主要涉及三方面:密码子优化、GC 含量优化、mRNA 二级结构优化。

不同物种的基因在密码子使用上存在着明显的偏好性,密码子偏好性对重组蛋白的异源表达具有深刻复杂的影响。原始脂肪酶基因在 *P.pastoris* 等异源表达系统中表达时,往往会导致稀有密码子的出现,而稀有密码子可能会成为制约翻译速率的因素。密码子优化的方法主要有三种:改造宿主 tRNA,稀有密码子的替换,选择同源性较接近的表达宿主或同源表达^[25]。基因 GC 含量通常可对表达进行间接调控,影响脂肪酶蛋白的表达量。GC 含量的优化可以提高 mRNA 的转录水平,从而导致脂肪酶表达量的提高。Yang 等^[26] 在对南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB) 基因进行优化设计和合成时,替换掉了使用不频繁的稀有密码子,而且将 GC 含量控制在 45%~55%,优化得到的 CALB 基因在 *P.pastoris* 中表达的酶活及蛋白含量分别为 202.4U/mL 和 149.2mg/L,较原始的 CALB 基因分别提高了 102% 和 80.2%。

此外,mRNA 如果形成大而稳定的二级结构如发卡结构和茎环结构,尤其是起始密码子附近的稳定二级结构,将需要更大的能量来打破折叠自由能,这会影响 mRNA 在翻译过程中与核糖体的结合和延伸,从而降低翻译的效率和蛋白的表达水平。优化 mRNA 二级结构,可以降低翻译时所需的能量,从而提高翻译速率^[25]。

3.3 筛选基因拷贝数合理的转化子

增加目的基因的拷贝数是提高异源脂肪酶产量的方法之一。通常,随着基因拷贝数的增加,同一宿主所表达的异源蛋白的水平也会提高。但是,基因剂量对异源脂肪酶表达水平既有正效应也有负效应,Sha 等^[27] 研究华根霉 CCTCCM201021 脂肪酶在毕赤酵母中表达时,发现基因拷贝数为 5 时,脂肪酶酶活在发酵 96h 后达到最高值 12500U/mL;而基因拷贝数增加到 6 时,酶活 96h 时显著下降到大约 2000U/mL。由以上结果进行推测:毕赤酵母表达重组脂肪酶的能力先随基因拷贝数增加而增加,呈正效应;当拷贝数超过一定数值时,又呈下降趋势。盲目地增加基因拷贝数不一定能达到优化表达的目的,因此,在选择增加基因拷贝数来优化表达时,要先通过实验确定达到脂肪酶最高表达产量的基因拷贝数,以此拷贝数进行优化表达才是合理、有效的。

3.4 信号肽的选择

为方便异源脂肪酶的提取,应采用分泌表达的方式,而信号肽可以帮助将异源脂肪酶分泌到胞外。异源脂肪酶的分泌表达可以利用自身的信号肽,或者是利用酿酒酵母的 α 因子前导肽序列来引导分泌。两种信号肽在表达不同的脂肪酶时,会产生不同的效果。Vadhana 等^[14] 的研究表明,使用自身信号肽表达 CALB (南极假丝酵母脂肪酶 B) 的水平比使用 α 因子前导肽序列高;但是,使用两种信号肽表达 CALA (南极假丝酵母脂肪酶 A) 的水平几乎相同。所以,针对不同的目的基因,应该选择合适的信号肽,进而提高异源脂肪酶的分泌效率。

3.5 脂肪酶前导肽 (propeptide) 的引入

很多分泌蛋白的 N-端都有一个前导肽,它可以

在转入宿主前或转入到宿主后减缓翻译速度和帮助蛋白质正确折叠,所以被认为是分泌蛋白的分子内伴侣^[21]。王乐乐^[28] 成功克隆了华根霉脂肪酶的前导肽并在毕赤酵母中高效表达,得到的脂肪酶酶活为 161U/mL (橄榄油为底物),比野生菌高了约 43 倍,表明脂肪酶的前导肽对其高效地表达具有重要的作用。成熟的脂肪酶往往没有前导肽,这说明前导肽最终会被去除。对前导肽进行糖基化修饰可以帮助 Kex2 蛋白酶去除前导肽,并实现脂肪酶的分泌^[29],这也印证了毕赤酵母异源表达系统糖基化修饰的重要性。

3.6 优化发酵条件

毕赤酵母作为模式生物,发酵工艺已经十分成熟,主要是针对影响脂肪酶产量的几个因素(如诱导时间、初始 pH、甲醇添加量和诱导温度等)进行单因素或者正交实验,探索得到毕赤酵母表达最高水平的条件^[18]。此外,发酵过程中的含氧量也在很大程度上影响表达产量。一般是通过通气、搅拌来增加溶氧;还可以构建含有低氧条件诱导表达的 PsADH2 启动子的表达载体,帮助异源脂肪酶基因在高密度发酵的低氧条件下高效表达^[30]。

4 重组表达的脂肪酶的分离纯化

在研究脂肪酶的基本性质,如分子量大小、反应温度、反应 pH 及对有机溶剂等的耐受性时,往往需要对脂肪酶进行一系列纯化来得到纯度较高的脂肪酶(一般电泳图为单一条带)。通常的纯化做法是通过离心发酵液去除细胞,不同饱和度的硫酸铵沉淀脂肪酶,重溶沉淀后透析,超滤浓缩酶液,最后通过离子交换层析(Q-Sepharose FF 阴离子交换柱或 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱等)、凝胶柱层析(Superdex 200 或 75)等步骤进行纯化^[31-32]。在各个步骤中间,如果有需要,还可以通过冷冻干燥来脱除水分达到浓缩的目的,而且冻干后的酶粉比较利于保存。

上述方法不仅可以纯化异源表达的脂肪酶,而且也普遍适用于直接发酵得到的脂肪酶。对于毕赤酵母异源表达的脂肪酶的纯化,还可以使用镍柱亲和层析法。一般在构建毕赤酵母表达载体时,会在目的蛋白序列下游添加 His-Tag 序列片段,表达的脂肪酶中会带有 His-Tag,它可以和 Ni^{2+} 产生螯合作用而被吸附,所以可以通过金属螯合层析法纯化脂肪酶^[17,33]。对于异源表达的脂肪酶,使用镍柱亲和层析法,是比较简便快捷的纯化方法。

5 毕赤酵母表面展示异源脂肪酶

表面展示技术是将靶蛋白基因与载体蛋白基因融合,实现二者在微生物表面融合表达并保持靶蛋白生物活性的技术,是 Smith 于 1985 年首先提出并逐步发展起来的^[34]。酵母细胞表面展示技术是一种真核蛋白表达系统,其基本原理是将外源靶蛋白基因与特定的载体基因序列融合后导入酵母细胞,融合蛋白诱导表达后,信号肽引导融合蛋白向细胞外分泌。由于融合蛋白含有锚定酵母细胞壁的结构,可将融合蛋白锚定在酵母细胞壁中,从而将外源蛋

白分子表达在酵母细胞表面。目前以酿酒酵母展示系统发展较为完善,主要分为凝集素系统和絮凝素系统,凝集素系统又分为 α 凝集素系统(其N端与目的蛋白融合)和 α 凝集素系统(其C端与目的蛋白融合);絮凝素系统分为糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定系统(其N端与目的蛋白融合,FS)和絮凝结构域锚定系统(目的蛋白的N端与Flo1蛋白的絮凝功能区融合,FL)^[35-38]。

Su等^[33]将酿酒酵母细胞壁锚定蛋白Sed1p序列与CALB序列融合在一起,融合蛋白转化进入毕赤酵母中表达并成功地在其表面得到展示,毕赤酵母表面展示的CALB在60℃保温2h后酶活下降了43%,而游离的CALB在同样温度下保温10min后酶活就仅剩余15%,这说明,毕赤酵母表面展示的脂肪酶的热稳定性比游离脂肪酶高。毕赤酵母表面展示的脂肪酶较多地应用于全细胞催化生产生物柴油(主要成分为脂肪酸甲酯)。Huang等^[39]将米黑根毛霉脂肪酶(RML)展示在毕赤酵母表面,作为催化剂用来催化大豆油和甲醇生产生物柴油,重复使用10次后仍能保持80.46%的酶活;Jin^[40]在研究生物柴油的生产时,混合使用了毕赤酵母表面展示的sn-1,3专一性脂肪酶RML和无专一性的CALB,提高了1,2-甘油二酯转化成1,3-甘油二酯或者2-单脂肪酸甘油酯转化成3-单脂肪酸甘油酯的转化速度,使脂肪酸甲酯的含量显著增加,从反应20h获得80%提高到反应16h获得91.2%。利用酵母表面展示技术和毕赤酵母表达体系构建的脂肪酶全细胞催化剂,因其特有的耐受性、稳定性和高催化活性,已经广泛地应用于生物柴油的生产,同时也涉及风味酯的合成^[35]。

6 展望

毕赤酵母表达的异源蛋白种类很多,单就酶而言,就涉及脂肪酶、蔗糖酶、几丁质酶、溶菌酶等,其中,脂肪酶及其表面展示的全细胞催化剂的研究较为丰富。宏基因组文库中含有大量的未能培养的脂肪酶基因,利用毕赤酵母异源表达宏基因组文库中脂肪酶基因的应用也越来越广泛^[41]。

毕赤酵母表达的异源脂肪酶,很多仅限于应用在非食品工业,但是食品工业中很多营养物质及添加剂(如代可可脂、OPO)的生产,都离不开脂肪酶的催化。所以,验证毕赤酵母表达的异源脂肪酶具有遗传稳定性及食用安全性,成为现今要解决的迫切问题。相信具备食用安全性的毕赤酵母表达系统,不仅能扩展毕赤酵母表达系统的应用,而且可以促进食品工业的发展。

参考文献

[1] Luis Esteban, María J. Jiménez, Estrella Hita, et al. Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position and oleic acid at sn-1,3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 54(1):62-69.

[2] Marina Guillén, Maria Dolors Benaiges, Francisco Valero. Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase

extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract [J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 54(2): 117-123.

[3] 胡世界, 罗素兰, 张吉贞, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其高水平表达策略 [J]. 生物技术, 2007, 17(6): 78-82.

[4] 唐元家, 余柏松. 巴斯德毕赤酵母表达系统 [J]. 国外医药抗生素分册, 2002, 23(6): 246-271.

[5] 娄瑞娟, 罗利龙, 张霞, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统的研究进展和前景展望 [J]. 生物学杂志, 2010, 27(5): 73-76.

[6] 章如安, 杨晟, 邱德荣, 等. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展 [J]. 微生物学通报, 2000, 5(27): 371-373.

[7] Takanori Tanino, Hideki Fukuda, Akihiko Kondo. Construction of a *Pichia pastoris* Cell-Surface Display System Using Flo1p Anchor System [J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(4): 989-993.

[8] Carolina Arnau, Ramon Ramon, Carles Casas, et al. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(6): 494-500.

[9] Mehmedalija Jahic, Fredrik Wallberg, Monika Bollok, et al. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures [J]. Microbial Cell Factories, 2003, 2:6.

[10] Yang Jiangke, Zhang Bo, Yan Yunjun. Cloning and Expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 Lipase Gene in *Pichia pastoris* and Characterizing for Transesterification [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(2): 355-365.

[11] Zhao Xiaolan, Xie Wanyong, Lin Ying, et al. Combined strategies for improving the heterologous expression of an alkaline lipase from *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 in *Pichia pastoris* [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(9): 1317-1323.

[12] Yu Mingrui, Wen Sai, Tan Tianwei. Enhancing production of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Pichia pastoris* [J]. Engineering in Life Sciences, 2010, 10(5): 458-464.

[13] Yu Mingrui, Stefan Lange, Sven Richter, et al. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization [J]. Protein Expression and Purification, 2007, 53(2): 255-263.

[14] Ashok Kumar Prasanna Vadhana, Prem Singh Samuel, Ronald M Berin, et al. Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(3): 177-183.

[15] Jan Pfeffer, Sven Richter, Jens Nieveler, et al. High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 931-938.

[16] Zhao Wei, Wang Jinwen, Deng Riqiang, et al. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(3): 189-195.

- [17] Riadh Ben Salah, Ali Gargouri, Robert Verger, et al. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(8): 1375-1384.
- [18] Yu Xiaowei, Wang Lele, Xu Yan. *Rhizopus chinensis* lipase Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 57(1-4): 304-311.
- [19] Tan Zhongbiao, Li Jianfang, Wu Minchen, et al. High-level heterologous expression of an alkaline lipase gene from *Penicillium cyclospium* PG37 in *Pichia pastoris* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(12): 2767-2774.
- [20] 施碧红, 李强, 陈明, 等. 易错 PCR 技术改造扩展青霉菌脂肪酶 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(12): 25-28.
- [21] Geoff P. Lin-Cereghino, Carolyn M. Stark, Daniel Kim, et al. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Gene, 2013, 519: 311-317.
- [22] Yu Xiaowei, Wang Rui, Zhang Meng, et al. Enhanced thermostability of a *Rhizopus chinensis* lipase by *in vivo* recombination in *Pichia pastoris* [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11.
- [23] Joan Lin Cereghino, James M. Cregg. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1): 45-66.
- [24] Hans R. Waterham, Mary Ellen Digan, Patricia J. Koutz, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter [J]. Gene, 1997, 186: 37-44.
- [25] 蔡海莺, 李杨, 张辉, 等. 基因设计对重组蛋白表达的影响研究进展 [J]. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1201-1213.
- [26] Yang JiangKe, Liu LiYing, Dai JiangHong, et al. de novo Design and Synthesis of *Candida antarctica* Lipase B Gene and α -Factor Leads to High-Level Expression in *Pichia pastoris* [J]. PLOS ONE, 2013, 8(1).
- [27] Sha Chong, Yu Xiaowei, Li Fei, et al. Impact of Gene Dosage on the Production of Lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021 in *Pichia pastoris* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169: 1160-1172.
- [28] 王乐乐, 喻晓蔚, 徐岩. 华根霉前导肽脂肪酶基因的克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达 [J]. 高技术通讯, 2009, 19(1): 105-110.
- [29] Liu Yue, Xie Wenping, Yu Hongwei. Enhanced Activity of *Rhizomucor miehei* Lipase by Deglycosylation of Its Propeptide in *Pichia pastoris* [J]. Current Microbiology, 2013.
- [30] 汪小锋, 孙永川, 申旭光, 等. 毕赤酵母中表达透明颤菌血红蛋白提高重组脂肪酶的表达 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(12): 1755-1764.
- [31] Patricio A. Muñoz, Daniela N. Correa-Llante'n, Jenny M. Blamey. Production, Purification and Partial Characterization of Four Lipases from a Thermophile Isolated from Deception Island [J]. Lipids, 2013, 48(5): 527-533.
- [32] Cao Yan, Zhuang Yu, Yao Changjin, et al. Purification and characterization of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and its application for efficient resolution of (R, S)-1-phenylethanol [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 64(15): 55-60.
- [33] 孙金鹏, 钱圣一, 敬科举, 等. 南极假丝酵母脂肪酶 B 在毕赤酵母的表达及酶学性质研究 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(4): 765-771.
- [34] 代敏, 纪昌涛, 汪小锋, 等. 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶在毕赤酵母中的表面展示及酶学性质 [J]. 微生物学报, 2012, 52(7): 857-865.
- [35] Su Guodong, Huang Dengfeng, Ha Shuangyan, et al. Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5): 1493-1501.
- [36] 王佳, 孙中远, 刘建新. 酵母细胞表面展示技术 [J]. 动物营养学报, 2011, 11(23): 1847-1853.
- [37] 苏国栋, 张少平, 尹钰, 等. 毕赤酵母展示表达南极假丝酵母脂肪酶 B [J]. 生物技术通报, 2012(8): 107-112.
- [38] 张溪, 韩双艳, 苏国栋, 等. 外源脂肪酶在毕氏酵母表面展示及发酵过程分析 [J]. 现代食品科技, 2010, 2(1): 9-13.
- [39] Huang Dengfeng, Han Shuangyan, Han Zhenlin, et al. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase - displaying *Pichia pastoris* whole cells in an iso-octane system [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 63: 10-14.
- [40] Jin Zi, Han Shuangyan, Zhang Li, et al. Combined utilization of lipase - displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media [J]. Bioresource Technology, 2013, 130: 102-109.
- [41] Zheng Jianhua, Liu Liguang, Liu Cuina, et al. Molecular Cloning and Heterologous Expression of a True Lipase in *Pichia pastoris* Isolated via a Metagenomic Approach [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(5): 300-311.

(上接第 362 页)

- [15] 叶志兵. 大麻仁蛋白粉提高运动员营养指标值的临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 12: 150.
- [16] 牛程麟, 王新颖, 金丽, 等. 蛋白强化的营养制剂对高运动量人员骨骼肌含量及营养状况的影响 [J]. 肠外与肠内营养, 2010, 17(4): 217.
- [17] 熊正英, 唐量. 芦荟对运动训练小鼠血清酶活性和血尿素氮, 血糖及血红蛋白含量的影响 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 32(2): 90-92.
- [18] 佐热古丽·热依木. 人体运动能力及蛋白质的载体作用 [J]. 新农村, 2010(6): 165-166.
- [19] 段卫杰. 蛋白粉在田径各项目的作用 [J]. 读写算: 教育教学研究, 2010(34): 115.
- [20] 张青, 吕波, 王雨, 等. 生姜对小鼠运动疲劳的对抗作用 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2012(1): 34.
- [21] 林立, 高波, 孔令斌, 等. 混配农药对小鼠运动能力及抗疲劳能力的影响 [J]. 中国全科医学, 2007, 10(12): 983-983.