

# 基因拷贝数和甲醇浓度对重组毕赤酵母产 华根霉脂肪酶的影响

李飞 喻晓蔚 沙冲 徐岩\*

(江南大学生物工程学院 教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 将华根霉脂肪酶基因克隆到甲基营养型毕赤酵母中表达, 以甲醇利用快型菌株为宿主, 在 7 L 发酵罐水平对脂肪酶基因拷贝数分别为 3、5、6 的 3 株基因重组菌——XY RCL-3、XY RCL-5、XY RCL-6 进行高密度发酵调控, 同时研究了甲醇浓度对表达华根霉脂肪酶的影响。结果表明, XY RCL-5 在相同条件下发酵产酶能力高于 XY RCL-6 和 XY RCL-3, 最适甲醇诱导浓度控制在 0.1%±0.02% 时, 酶活可达到 12 500 U/mL, 菌体干重达到 204 g/L, 蛋白浓度也能达到 8.02 g/L。

**关键词:** 基因拷贝数, 甲醇诱导浓度, 毕赤酵母, 华根霉脂肪酶

## Impact of gene dosage and methanol concentration on *Rhizopus chinensis* recombinant lipase production in *Pichia pastoris*

LI Fei YU Xiao-Wei SHA Chong XU Yan\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** The *Rhizopus chinensis* lipase genes was cloned and expressed in *Mut*<sup>+</sup> methylotrophic *Pichia pastoris* with different gene dosage. The high-density fermentation of the recombinant *Pichia pastoris* with gene dosage of three (XY RCL-3), five (XY RCL-5) and six (XY RCL-6) was investigated on 7-liter fermenter. The impact of methanol concentration on *Rhizopus chinensis* lipase expression was also explored. Our results indicated that more *Rhizopus chinensis* lipase was produced in XY RCL-5 produced than that of XY RCL-6 and XY RCL-3 under the same conditions. When methanol concentration was controlled at 0.10%±0.02%, the enzyme activity of *Rhizopus chinensis* lipase produced by XY RCL-5 could achieve 12 500 U/mL, and the dry weight of XY RCL-5 and protein concentration could reach 204 g/L and 8.02 g/L, respectively.

基金项目: 国家 863 计划重点项目(No. 2010AA101501, 2008AA10Z304); 国家自然科学基金项目(No. 20802027); “十一五”支撑计划项目(No. 2008BAI63B07)

\* 通讯作者: Tel: 86-510-85864112; ✉: yxu@jiangnan.edu.cn  
收稿日期: 2010-09-09; 接受日期: 2010-12-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**Keywords:** Gene dosage, Methanol induced concentration, *Pichia pastoris*, *Rhizopus chinensis* lipase

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是目前应用最广泛的外源基因表达系统之一。该表达系统具有醇氧化酶(Alcohol oxidase, AOX1)基因强启动子,可严格调控外源蛋白的表达;同时作为真核表达系统,可对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰,从而使表达出的蛋白具有生物活性<sup>[1-2]</sup>。此外,该酵母菌营养要求低、生长快、培养基廉价,易于进行操作和培养;其高密度发酵技术业已成熟,便于工业化生产;表达量高,许多蛋白可达到每升克级以上水平;表达的外源蛋白可分泌到胞外,分泌的内源蛋白少,外源蛋白分离纯化简便;外源基因通过质粒整合到基因组上,基因工程菌株遗传稳定性好<sup>[3]</sup>。迄今为止,已有数百多种外源蛋白在此体系中成功表达,而且数量在不断增加<sup>[4]</sup>。

基因剂量对外源蛋白表达有重要影响作用。许多试验表明,单拷贝的外源蛋白表达盒足够外源蛋白的高效表达,再增加拷贝数对外源蛋白表达量并无显著影响。也有些实验表明拷贝数的增加对外源蛋白的表达会有负效应。因此,基因剂量对外源蛋白表达水平的影响到底是正效应还是负效应,各自影响机理不尽相同<sup>[5]</sup>。

对于以 AOX1 启动子诱导表达外源蛋白的重组毕赤酵母,进入表达诱导期后,甲醇既是诱导物,又是惟一的碳源。有研究表明,过高的甲醇浓度会抑制合成酶的活性,同时增加了细胞的死亡率<sup>[6]</sup>。

本文着重从重组毕赤酵母的基因剂量以及发酵过程中诱导甲醇浓度对外源蛋白表达的影响进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株、试剂和培养基

**1.1.1 菌种:** 本实验室构建重组巴斯德毕赤酵母 XY RCL-3, XY RCL-5, XY RCL-6, 表达载体为 pPIC9K, 外源基因来源于华根霉(*Rhizopus chinensis*) CCTCCM201021 的前导肽脂肪酶基因, 表型为 *Mut<sup>+</sup>*型。

**1.1.2 培养基:** 种子培养基(BMGY 培养基, g/L):

蛋白胨 20, 酵母提取物 10, YNB 13.4, 甘油 10, 500×生物素 2 mL, pH 6.0 磷酸缓冲液 100 mL。用 250 mL 的三角瓶培养, 装液量 20%。

基础盐培养基(BSM, g/L): 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 28.7 mL, CaSO<sub>4</sub> 0.93, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9, KOH 4.13。用 BSM 基础盐配制成含 4% (W/V)甘油和 4 mL 微量元素 PTM<sub>1</sub> 的溶液。

补料生长培养液: 50%甘油(W/V, 含 12 mL/L 的 PTM<sub>1</sub>)补料液。

诱导培养液: 100%甲醇(含 12 mL/L 的 PTM<sub>1</sub>)诱导液。

PTM<sub>1</sub>(g/L): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 6, KI 0.08, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.02, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 42.2, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 65, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5, Biotin 0.2, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mL。

### 1.2 主要仪器

高速冷冻离心机 3K15: 美国 Sigma-aldrich 公司; UV-3102 PC 型分光光度仪: 尤尼柯仪器有限公司; pH 计: 梅特勒-托利多仪器有限公司; 7 L 发酵罐: 美国 NBS 公司; 电泳仪, 凝胶成像仪: Bio-Rad 公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 种子培养:** 取生长良好的平板菌种 2 环, 接种至种子培养基中, 培养约 20 h, 至菌体干重至 2-6 之间结束培养。

**1.3.2 发酵培养:** 配制 2.5 L 基础盐培养基置于 7 L 发酵罐内, 插入 DO 电极与 pH 电极 (已标定), 接入空气过滤器, 包扎好后在蒸汽灭菌锅内 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。灭好后接上循环水冷却到 30 °C, 并通入空气, 闭环控制, 用 25%的氨水调节 pH。火焰接种, 接种量为 10%, 并加入 4 mL/L 已过滤除菌的 PTM<sub>1</sub> 溶液, 调节转速、温度、空气流量、罐压等进行分批发酵。菌种经过一段适应期后进入指数生长期, 此时 pH 受到闭环控制, 自动流加 25%的工业氨水将 pH 控制在设定值, 不断加大通气量或混合通纯氧与转速来维持菌体生长所需的 DO。当基础料中的底物甘油耗尽后, 此时 DO 陡然上升, 从此处开始流加 50%的甘油(W/V, 含 12 mL/L 的 PTM<sub>1</sub>), 调

节流加速率控制 DO 维持在 20%–40%。

当起始菌体浓度达到 34 g/L 左右时, 停止补甘油, 维持饥饿状态约 30 min, 让甘油彻底耗尽, 校正 DO 为 100%。开始进入甲醇诱导阶段, 向发酵液中流加添有一定体积 PTM<sub>1</sub> 溶液的甲醇, 维持甲醇浓度 0.07%–0.15% (V/V) 之间, 诱导脂肪酶基因的表达。

**1.3.3 粗酶液的制备:** 在发酵液中加入一定量的絮凝剂后, 冷冻离心(4 °C, 8 000 r/min, 30 min)后, 取上清液即得粗酶液。

**1.3.4 脂肪酶水解活力测定方法:** 脂肪酶水解对硝基苯酚棕榈酸酯产生对硝基苯酚和棕榈酸, 对硝基苯酚在水溶液中显黄色, 在 410 nm 有最大的光吸收, 通过测定对硝基苯酚在 410 nm 处的光吸收, 可测得脂肪酶的活力<sup>[7]</sup>。

**1.3.5 总蛋白含量测定:** 考马斯亮蓝 G-250 存在着两种不同的颜色形式, 红色和蓝色。通过测定 595 nm 处光吸收的增加量可知与其结合蛋白质的量。通过此法来测定发酵液中总蛋白含量<sup>[8]</sup>。

**1.3.6 蛋白酶活力测定:** 蛋白酶在一定 pH 和温度条件下, 水解酪素底物, 水浴 60 °C 灭酶, 然后加入三氯乙酸除去未水解的酪素, 滤液对紫外光有吸收, 可采用紫外光谱法测量<sup>[9]</sup>。

**1.3.7 产物 SDS-PAGE 分析:** 使用 Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 5% 浓缩胶, 12% 分离胶, 将样品中加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液, 混匀, 100 °C 水浴加热 10 min, 离心去蛋白沉淀, 将处理好的样品 10 μL 加入到凝胶孔中, 连接电泳仪, 调整初始电压至 80 V, 开始电泳, 待样品全部进入分离胶后, 将电压调至 200 V, 待指示剂(溴酚兰)到达距凝胶底部下缘 1 cm 时停止电泳, 关闭电源后取出凝胶板, 取出凝胶, 加入考马斯亮兰染色液染色 30 min, 倒出染色液, 加入脱色液轻微振荡 2 h 后置于凝胶成像仪上拍照。

**1.3.8 不同基因拷贝数对发酵结果的影响:** 在相同的条件下培养脂肪酶基因拷贝数不同的菌株, 在诱导产酶阶段, 控制甲醇浓度在 0.1%±0.02% (V/V), 每隔 8 h 取样一次。分析各个菌株每个时间点的粗酶液特性。

**1.3.9 不同甲醇诱导浓度对发酵结果的影响:** 选择 XY RCL-5 菌株在一定条件下培养, 在诱导产酶阶段, 分别控制甲醇浓度为 0.07%±0.02% (V/V), 0.10%±0.02% (V/V) 和 0.15%±0.02% (V/V), 每隔 8 h 取样一次。分析各个条件下每个时间点的粗酶液特性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同基因拷贝数对发酵结果的影响

不同基因拷贝数影响目的产物的表达量, 同时也影响菌体的生长情况。通过对诱导阶段不同时间点取样的测定, 得出如下结果, 见图 1。

从图 1 可以看出, 在相同的发酵条件下, 拷贝数为 5 的 XY RCL-5 菌株发酵表达的脂肪酶水解活力最高。酶活可达到 12 500 U/mL。拷贝数为 6 的 XY RCL-6 菌株以及拷贝数为 3 的 XY RCL-3 菌株均表现出较低的脂肪酶水解活力。由此可以推测, 重组的毕赤酵母表达脂肪酶能力先随基因拷贝数的增加而增加, 即呈正效应; 当拷贝数超过一定数值时, 又呈下降趋势, 即呈负效应。

从图 2 中可以看出, 不同拷贝数的菌株在发酵过程中, 菌体的比生长速率均一直下降, 单从数值上看相差不大, 均在 0.02 至 0.03 之间, 在 80 h 左右均降至 0.02 以下; XY RCL-5 的产物比形成速率相对较高, 在诱导阶段的前 64 h 均能保持在较高水平; 底物比消耗速率相差不大, 均在 0.05–0.10 个单位水平。

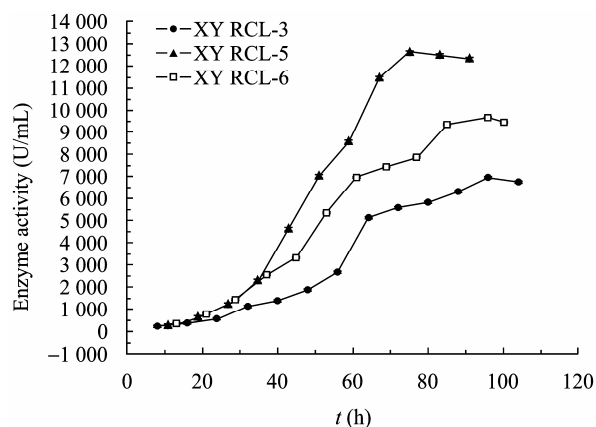


图 1 不同基因拷贝数对脂肪酶水解活力的影响

Fig. 1 The effect of gene dosage on lipase hydrolytic activity

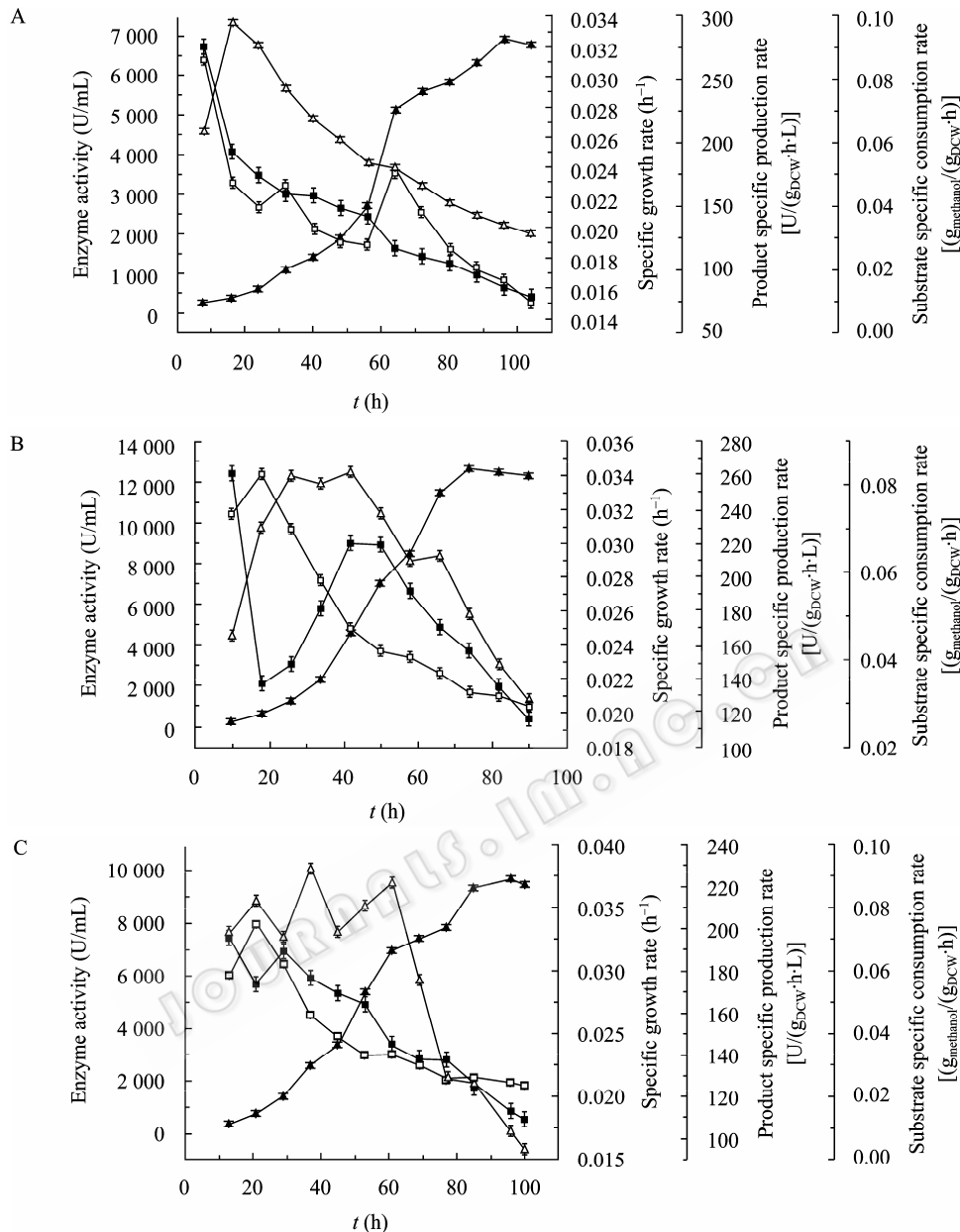


图2 不同拷贝数菌株的部分发酵参数

Fig. 2 Part of fermentation parameters of different copies of strain

注: A: XY RCL-3; B: XY RCL-5; C: XY RCL-6; —■—: 菌体比生长速率; —□—: 产物比生成速率; —▲—: 产物酶活力; —△—: 底物比消耗速率。

Note: A: XY RCL-3; B: XY RCL-5; C: XY RCL-6; —■—: Specific growth rate; —□—: Product specific production rate; —▲—: Enzyme activity; —△—: Substrate specific consumption rate.

拷贝数影响菌株表达脂肪酶水解活力,同时也表现在总蛋白的表达量上面,如图3所示。

从图3可以看出,XY RCL-3菌株表达的蛋白浓度水平比其他2个菌株低,蛋白浓度上升平缓。XY RCL-5和XY RCL-6两株菌体表达的蛋白量相

差不多,但从总体上看,前者略高于后者。总蛋白浓度的水平也从侧面验证了脂肪酶水解活力的高低。

反映发酵水平高低的另一个指标是比活力,比活力反映的是单位蛋白量所表现出的酶活力。它是酶纯度的重要指标。如图4所示。

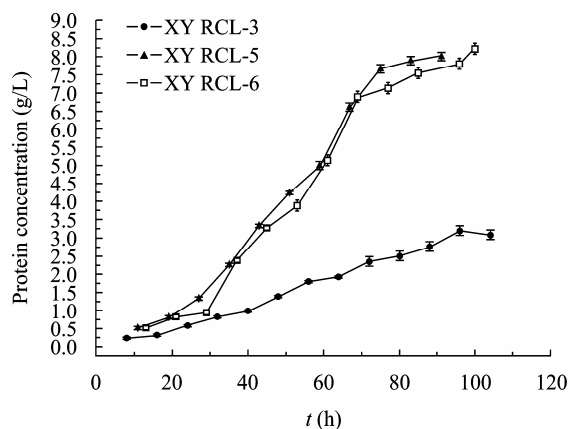


图3 不同基因拷贝数对发酵液中总蛋白浓度的影响  
Fig. 3 The effect of gene dosage on total protein concentration in broth

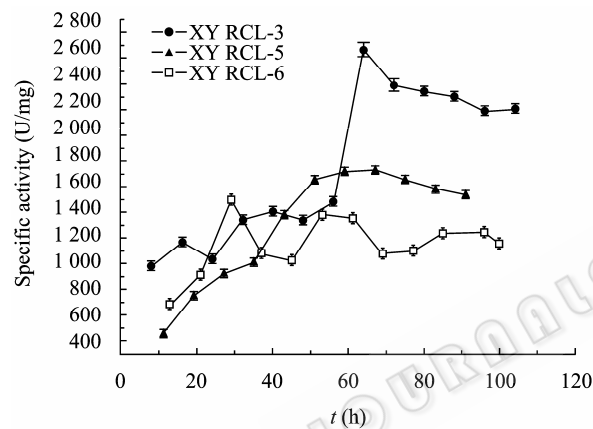


图4 不同基因拷贝数对脂肪酶比活力的影响  
Fig. 4 The effect of gene dosage on lipase specific activity

从图4中可以看出,在诱导的前40 h,3种菌株表现的比活力都比较低,这说明此时表达的脂肪酶含量较少,脂肪酶蛋白占总蛋白量的比重较低。随着诱导表达的进行,菌体量剧增,表达的脂肪酶蛋白也迅速增加,由于杂蛋白的表达受到一定限制,维持在很低的水平,比活力开始升高。当诱导表达进行到约70 h左右,比活力值达到最高。此后,随着发酵液中营养成分的不断消耗,部分菌体开始降解。如图6所示,在诱导70 h后,发酵液中蛋白酶含量明显增加,加剧了脂肪酶蛋白的降解,比活力开始下降。当脂肪酶的表达量高于蛋白酶的降解量时,表现出脂肪酶活力继续升高,如图1所示。从

图4和图5中还可以看出,XY RCL-3菌体表达的脂肪酶比活力最高,这可能是由于XY RCL-3对基础培养基的消耗低于其余两株菌,使得其在发酵后期的表达环境优于其余两株菌,因此表现出比活力更高的现象。

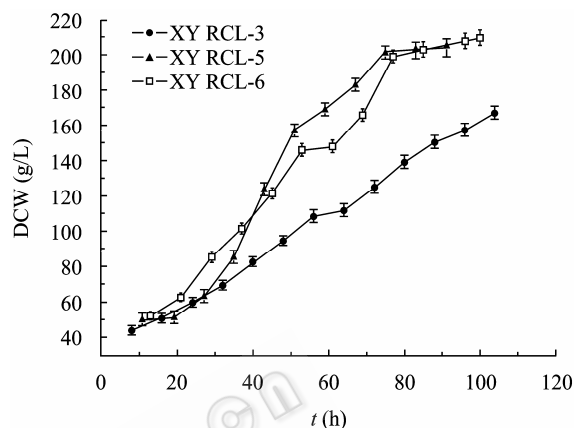


图5 不同基因拷贝数对菌体干重的影响  
Fig. 5 The effect of gene dosage on yeast dry cell weight

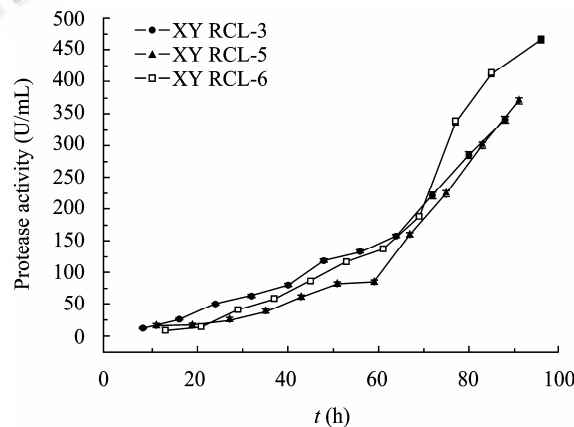


图6 不同基因拷贝数对发酵液中蛋白酶含量的影响  
Fig. 6 The effect of gene dosage on protease activity in broth

总蛋白的浓度并不能完全反映出脂肪酶含量。我们可以从SDS-PAGE图中看出在基因表达过程中脂肪酶浓度在发酵液中含量变化的规律(图7)。

如图7所示,由XY RCL-3菌株发酵得到的结果,在37 kD处的条带是目的蛋白。从图中可以看出,随着诱导时间的增加,发酵液中目的蛋白的浓

度越来越高,到 70 h 以后,目的蛋白的降解开始加剧,杂蛋白含量开始上升。这与我们检测到的在 70 h 后脂肪酶比活力开始下降是相一致的。同时,实验过程中可以发现,不同拷贝数的菌株发酵液中目的蛋白含量的规律是和 XY RCL-3 相类似的。

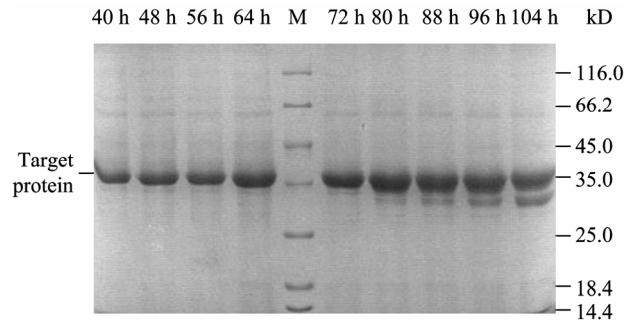


图 7 XY RCL-3 菌株在诱导表达不同阶段发酵液 SDS-PAGE 图

Fig. 7 SDS-PAGE of lipase expressed by XY RCL-3 under different induction phase

## 2.2 不同甲醇诱导浓度对发酵结果的影响

在基因拷贝数相同的情况下,不同的甲醇诱导浓度会对发酵结果产生很大影响。甲醇诱导浓度过高会抑制菌体的生长,对菌体有一定的毒害作用,影响发酵产物的表达;甲醇诱导浓度过低,甲醇的大部分用于菌体生长,同样限制了产物的表达。因此要找到一个平衡点,即加入的甲醇量一方面能保证菌体的生长,同时不会对菌体毒害作用过大。我们在 7 L 罐上做了 0.07%±0.02%, 0.10%±0.02%和 0.15%±0.02% 3 个水平甲醇浓度实验。

不同的甲醇诱导浓度首先表现在发酵过程中产物表达量的不同,在上述 3 个不同诱导浓度下,所产脂肪酶水解活力如图 8 所示。

由图 8 可知,在 0.10%±0.02% 的甲醇诱导浓度下脂肪酶水解活力最高,当甲醇浓度提高到 0.15%±0.02% 时,甲醇已经对菌体形成一定的毒害作用,从而影响到产物的酶活力;当所加甲醇的浓度只有 0.07%±0.02% 时,除去菌体自身生长的需求外,剩余甲醇不能高效的诱导脂肪酶基因表达,也使得产物酶活力较低。

从图 9 可以看出,虽然诱导的甲醇浓度有差异,但是各个时间点的菌体比生长速率差别不大。这说明,甲醇浓度在一定适宜范围内的波动对菌体的生长速率基本没有影响;甲醇浓度在 0.10%±0.02% 的情况下产物的比生成速率相对较高;相应的,在相同的条件下,底物的比消耗速率也相对较高。

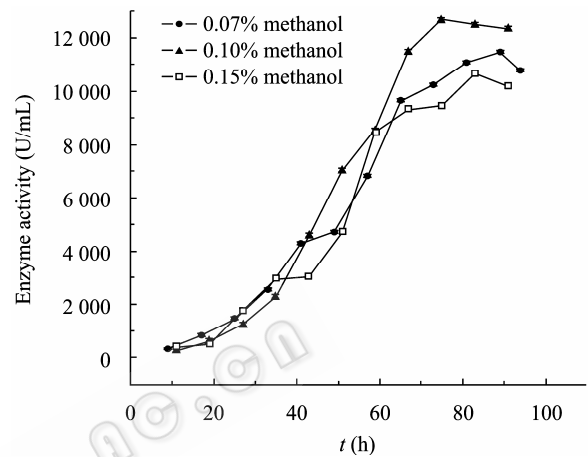


图 8 不同甲醇诱导浓度对脂肪酶水解活力的影响

Fig. 8 The effect of methanol concentrations on lipase hydrolytic activity

图 10 所示的是 XY RCL-5 在上述 3 种条件下,发酵过程中发酵液中总蛋白含量曲线图。

可以看出,在 0.07%±0.02% 和 0.1%±0.02% 2 个甲醇浓度下,发酵液中总蛋白含量相差不大,后者要略微高一些。当甲醇浓度提高到 0.15%±0.02% 时,发酵液中总蛋白含量明显降低。因此我们得出,在甲醇浓度为 0.10%±0.02% 时,菌体在发酵过程中表达的蛋白量更多,更高或更低的甲醇浓度都将降低目的蛋白的表达。

如图 11 所示,目的蛋白在甲醇浓度为 0.15%±0.02% 条件下比活力最高,0.07%±0.02% 浓度下比活力最低,3 种甲醇浓度控制下,目的蛋白都在诱导 60 h 左右时达到最高;图 12 表明,在不同的甲醇浓度下菌体的生长快慢不同,但最终的菌体浓度相差不大;从图 13 中明显可以看出在 0.15%±0.02% 甲醇浓度下诱导时,发酵液中蛋白酶活力最高,发酵后期甚至能达到 500 多个酶活单位。

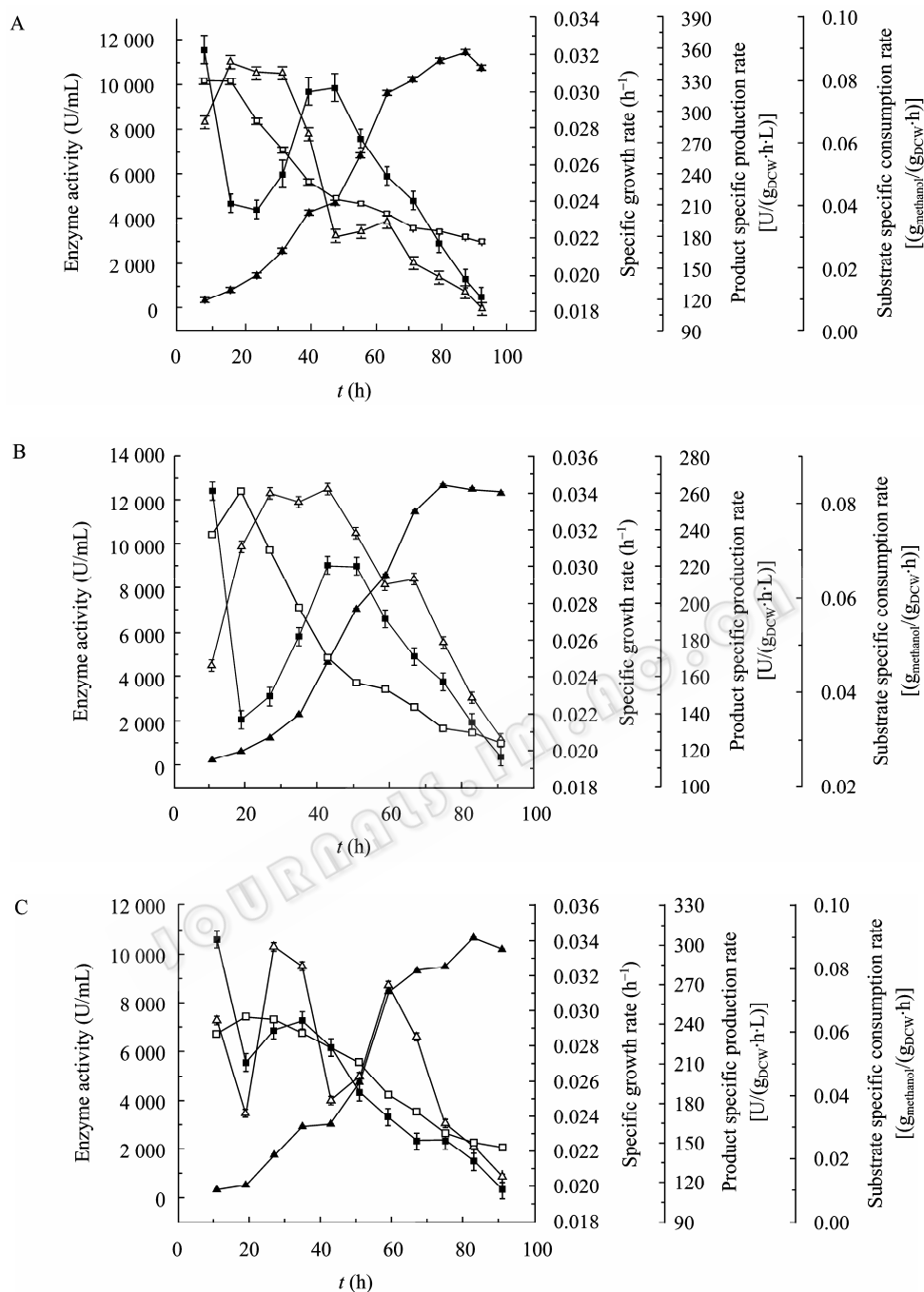


图9 不同甲醇浓度下菌株的部分发酵参数

Fig. 9 Part of fermentation parameters under different methanol concentration

注: A: 甲醇浓度为  $0.07\% \pm 0.02\%$  ( $V/V$ ); B: 甲醇浓度为  $0.10\% \pm 0.02\%$  ( $V/V$ ); C: 甲醇浓度为  $0.15\% \pm 0.02\%$  ( $V/V$ ). —■—: 菌体比生长速率; —□—: 产物比生成速率; —▲—: 产物酶活力; —△—: 底物比消耗速率。

Note: A:  $0.07\% \pm 0.02\%$  ( $V/V$ ); B:  $0.10\% \pm 0.02\%$  ( $V/V$ ); C:  $0.15\% \pm 0.02\%$  ( $V/V$ ). —■—: Specific growth rate; —□—: Product specific production rate; —▲—: Enzyme activity; —△—: Substrate specific consumption rate.

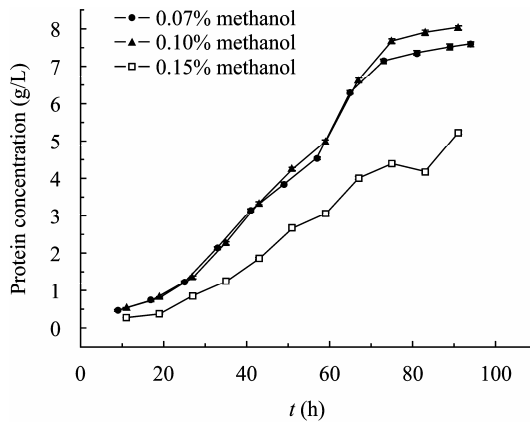


图 10 不同甲醇诱导浓度对发酵液中总蛋白含量的影响  
Fig. 10 The effect of methanol concentrations on total protein concentration in broth

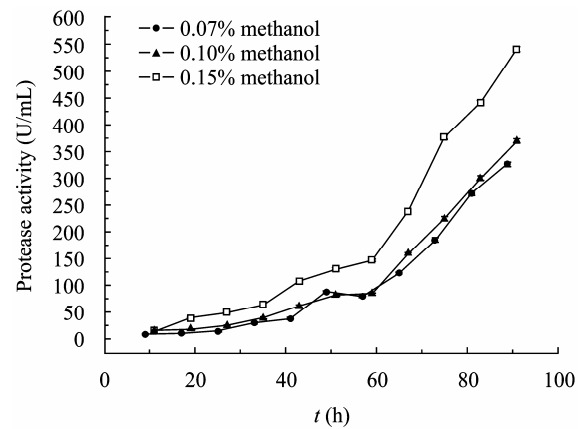


图 13 甲醇诱导浓度对发酵液中蛋白酶含量的影响  
Fig. 13 The effect of methanol concentrations on protease activity in broth

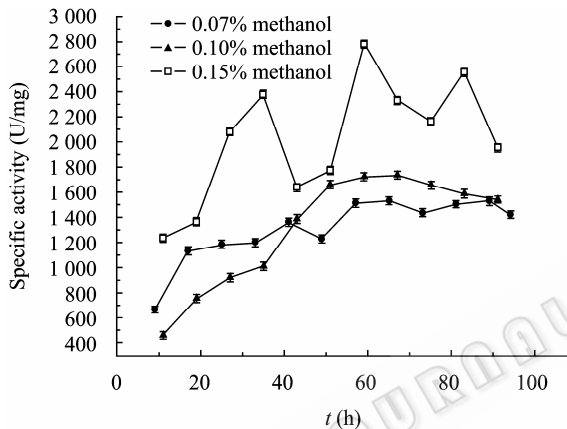


图 11 不同甲醇诱导浓度对脂肪酶比活力的影响  
Fig. 11 The effect of methanol concentrations on lipase specific activity

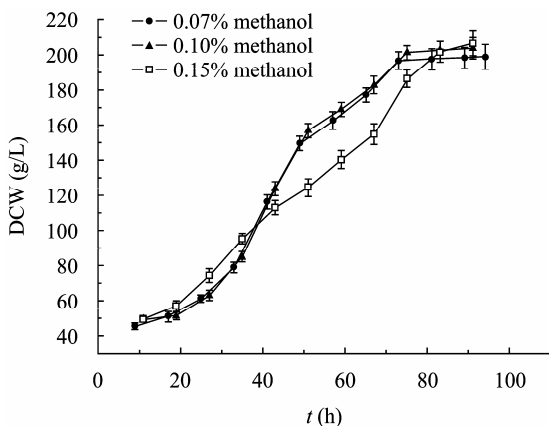


图 12 甲醇诱导浓度对菌体干重的影响  
Fig. 12 The effect of methanol concentrations on yeast dry cell weight

### 3 结论

甲醇营养型毕赤酵母是目前使用广泛的外源蛋白表达系统,本研究通过把华根霉脂肪酶基因克隆到甲醇营养型毕赤酵母中,从重组毕赤酵母的基因剂量以及发酵过程中诱导甲醇的浓度对外源蛋白表达的影响方面进行了研究,实现了脂肪酶的高效表达。据文献报道,基因剂量对外源蛋白表达有重要影响作用。Oriol Cos 等研究表明,基因剂量对外源蛋白表达水平既有正效应,也有负效应<sup>[5,10]</sup>。本文在 7 L 发酵罐条件下对研究室构建的 3 株脂肪酶基因拷贝数分别为 3、5、6 的基因工程菌的发酵特征进行了摸索。结果表明,当脂肪酶基因由单拷贝增加至 5 个拷贝时,菌体表达脂肪酶表现出基因剂量的正效应;在此基础上基因剂量继续增加时,又表现出基因剂量的负效应。

甲基营养型毕赤酵母在表达不同外源蛋白时表现出不同的甲醇诱导浓度适应性。有研究表明,采用不同的甲醇流加方式和控制不同的甲醇诱导浓度,可明显提高目的蛋白的表达量。Yun Wang 等通过研究发现,当甲醇诱导浓度控制在 20 g/L 时,目的产物的产量比甲醇浓度在 6 g/L 时提高 81.6%<sup>[11]</sup>。本研究表明,在甲基营养型毕赤酵母表达华根霉脂肪酶时,甲醇诱导浓度控制在 0.15%±0.02% 时比活力较高,但蛋白产量较低,脂肪酶活力也偏低;而甲醇浓度控制在 0.10%±0.02% 时,产蛋白量和脂



肪酶酶活水平均有明显提高,特别是在酶活力方面最高可达 12 500 U/mL,在根霉产脂肪酶领域已达到国际领先水平。研究表明,在诱导表达阶段,产物的比生成速率是逐渐降低的,特别在诱导的后期,产物比生成速率降至一定值时伴随了发酵液中蛋白酶活力的提升。因此我们猜测,在诱导表达的后期,由于菌体的比生长速率降低,部分菌体的裂解释放了一定的胞内蛋白酶,进而降解了一部分产物,这是导致后期脂肪酶活力降低的主要原因。

## 参 考 文 献

- [1] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Gene*, 1997, 190(1): 55-62.
- [2] Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Mol Cell Biol*, 1989, 9(3): 1316-1323.
- [3] 隋少飞, 陈松林. 巴氏毕赤酵母表达系统的特点及其研究进展[J]. *生物技术通报*, 2004(3): 1-4.
- [4] Cregg JM, Cereghino JL, Shi JY, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 16(1): 23-52.
- [5] Cos O, Serrano A, Montesinos JL, et al. Combined effect of the methanol utilization (*Mut*) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(4): 321-335.
- [6] Khatri NK, Hoffmann F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2006, 93(5): 871-879.
- [7] Pencreac'h G, Baratti JC. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(6): 417-422.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学技术出版社, 2000: 47-64.
- [9] 张寒俊, 刘大川, 杨国燕. 紫外光谱法定量测定不同种蛋白酶活性的研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2004(9): 44-45.
- [10] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85(4): 367-375.
- [11] Wang Y, Wang ZH, Du GC, 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.

编辑部公告

## 《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部  
2009-12-25