

大豆过氧化物酶在毕赤酵母中功能表达

黄建忠^{1*} 林剑辉¹ 石艺平¹ 胡美荣² 陶勇²

(1. 福建师范大学 生命科学院 福建 福州 350108)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要:【目的】大豆过氧化物酶(SBP)作用底物广泛、比活高、热稳定性好,使其在免疫检测、工业污染废水处理领域有着广泛的应用潜力。现有的生产方法主要是从大豆壳中提取,这种方法产量低,成本高,远不能满足于工业应用要求,本研究希望实现在毕赤酵母中高效表达有功能活性的大豆过氧化物酶。【方法】将大豆过氧化物酶基因以及C末端截短20个氨基酸的基因克隆pPIC-9K载体中,并在毕赤酵母X-33中诱导表达。同时还将糖基化位点的天冬酰胺突变成谷氨酰胺,研究糖基化位点对表达的影响。【结果】全长SBP在毕赤酵母中表达是无活性的,只有截短的SBP Δ 20在试管发酵的表达活力达23.5 U/mL,经过糖基化位点的突变表明130、144、185、197对酶活非常重要,不能突变;211和216位点去糖基化突变对酶活有所提高。【结论】经过发酵条件的优化,在5 L的发酵罐中发酵液上清最高酶活力达510 U/mL,是目前报道的最高水平。

关键词: 大豆过氧化物酶, 毕赤酵母, 去糖基化

Expression of soybean peroxidase from soybean in *Pichia pastoris*

HUANG Jian-Zhong^{1*} LIN Jian-Hui¹ SHI Yi-Ping¹ HU Mei-Rong² TAO Yong²

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] Soybean peroxidase (SBP) will be widely used in immunoassay, and wastewater treatment and so on, due to its wide substrates, high specific activity, and good thermal stability. Nowadays, it was obtained mainly by extracted from soybean hull. However, it cannot meet the requirements of industrial applications for its low yield, high cost. In this study, SBP will be expressed in *Pichia pastoris*. [Methods] Both the genes of SBP and truncated C-terminal 20 amino acid SBP were cloned into pPIC-9K. These constructed expression vectors were transformed into *Pichia pastoris* X-33, and then be used to express SBP. Furthermore, the effects of asparagine glycosylation on SBP expression were also investigated by mutating asparagine into glutamine. [Results] Full length of SBP is inactive in *Pichia pastoris*. But the truncated C-terminal 20 amino acid SBP showed 23.5 U/mL. Our results indicated that glycosylation site of 144, 185, 197 have a great effect on the enzyme activity. These mutants were almost inactive; Whereas 211 and 216

基金项目: 福建省产业化关键技术项目(No. 闽财指[2010]358号)

*通讯作者: Tel: 86-591-22868212; 信箱: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2014-03-20; 接受日期: 2014-04-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-18

deglycosylation sites had little effect on activity of SBP, can not be deglycosylation. **[Conclusion]** The highest activity of SBP was 510 U/mL in fermentation, which is the highest level of the reported.

Keywords: Soybean peroxidase, *Pichia pastoris*, Deglycosylation

大豆过氧化物酶与辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)类似,是一种含有血红素的III类过氧化物酶,广泛存在于大多数植物、动物和微生物体内^[1]。这两种蛋白质属于同一亚族的植物过氧化物酶超家族,氨基酸序列有很高同源性(约 57%)^[2-4],具有相似的三维结构和催化机理。与 HRP 相比,SBP 具有更好的耐热性、pH 适用范围宽。有研究表明其构象和热稳定性显著高于 HRP^[5]。大豆过氧化物酶是一种由单一肽链与卟啉(Protoporphyrin IX)构成的血红素蛋白,脱辅基蛋白分子需与血红素结合才构成全酶,由 2 个不同的结构域组成,中间包埋血红素辅基,成熟的 SBP 蛋白由 306 个氨基酸残基组成,分子量约为 39–41 kD。在过氧化氢存在条件下,过氧化氢为电子受体催化底物氧化,以铁卟啉为辅基,可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物,具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。目前 SBP 在食品加工、生物医学检测、农产品贮藏、污水处理和木质素降解及生物合成方面的应用研究已经广泛展开,尤其在免疫诊断试剂、生物传感器、污水处理等方面的应用研究进展飞速^[6-8]。pH 7.0 时,在 PEG 作用下 SBP 能有效去除污水中 95% 的多酚类化合物。现在美国环保部门已经应用 SBP 来处理工业废水^[9]。目前工业上获得 SBP 主要从大豆皮中提取,大多采用复杂的组合纯化法,其中使用层析纯化次数较多,增加纯化步骤与时间,影响纯化回收率,不适合于放大生产^[10]。因此采用异源表达系统高效表达 SBP 是研究的热点和方向,Anette Henriksen 等在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中表达得到包涵体经尿素变性后透析以离子交换柱(Q-Sepharose HP 26/10)浓缩获得 SBP 用于结晶,研究 SBP 的结构^[11]。曾家豫等通过构建随机突变文库筛选毕赤酵母高效表达 SBP 菌株,只得到最高酶活 8.9 U/mL^[12-13]。

毕赤酵母表达外源蛋白具有表达量高、稳定性好、培养成本低和产物易分离纯化等优点,适于大体积高密度连续发酵,具有强且易控的醇氧化酶(Alcohol oxidase, AOX)启动子等优点^[14-16],可严格控制外源基因的表达。本实验以大豆 cDNA 为模板,克隆全长 SBP₃₂₆ 基因和截短 SBP 基因 C 端 20 个氨基酸的 SBP₃₀₆ 基因,以 pPIC9K 为表达载体,以酿酒酵母的 α -Factor 蛋白的信号肽作为引导肽,引导其在毕赤酵母中分泌表达。并通过将 SBP 蛋白的糖基化位点天冬氨酸突变为谷氨酰胺的方法,研究糖基化位点突变对 SBP 表达的影响。优化培养条件与发酵罐发酵,高效表达 SBP。希望能满足 SBP 在工业、医药检测等行业中广泛应用,同时降低其生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 大肠杆菌 *E. coli* DH5a、毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33。

1.1.2 主要试剂: 氯化血红素/卟啉铁(Hemin) CAS: 16009-13-5, 购自 J&K 百灵威公司; ABTS [2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)], 购于 Sigma 公司; T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶, 购自 Fermentas MBI 公司; 质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和凝胶回收试剂盒, 购于 Omega 公司; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基: LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, NaCl 10。YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。BMGY 培养基(g/L): 酵母浸出物 10, 蛋白胨 20, 100 mmol/L pH 6.0 磷酸钾, YNB 13.4, 生物素 4×10^{-3} , 甘油 10。YPCS 发酵培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 酪蛋白水解物 5, 山梨醇 5。发酵罐培养基: BSM 培养基, 参照 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建: 根据 Gijzen 等在 NCBI 核酸数据库报道的 SBP (9418041)基因序列设计寡核苷酸引物, 在引物两端加上酶切位点 *EcoR* I、*Not* I 及保护碱基, 引物序列如表 1 所示。

以大豆 cDNA 为模板, 分别 PCR 扩增全长为 326 个氨基酸的 DNA (去除 N 端信号肽)序列和截短了 C 端 20 个氨基酸的 DNA 序列。经纯化与酶切处理, 分别连接至表达载体 pPIC9K (采用 *EcoR* I 与 *Not* I 酶切), 构建重组表达载体 pPIC9K-SBP₃₂₆ 和 pPIC9K-SBP₃₀₆。转化大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 α , 挑取单克隆, 提质粒, 并分别采用 PCR 扩增 SBP 的上下游引物进行 PCR 验证, 再将阳性质粒酶切验证并送测序。

1.2.2 载体线性化并转化酵母: 将构建正确的载体 pPIC9K-SBP₃₂₆ 和 pPIC9K-SBP₃₀₆ 经 *Sac* I 单酶切线性化后, PCR 产物回收, 转化毕赤酵母野生型 X-33。具体如下 将处理好的感受态细胞和 5–20 μ g 经过线性化后 DNA 加入一个 1.5 mL 预冷离心管中, 混匀并静置 90 s。然后把混合液转移入预先冰浴的转化杯中(0.2 cm 型), 脉冲后立即往转化杯中

加入 1 mL 冰浴的 YPDS 培养基溶液, 然后把转化液转入一个新的 1.5 mL 离心管中, 再放置 30 $^{\circ}$ C 静置培养 8–10 h, 以 900 \times g 离心收集菌体, 生理盐水重悬, 均匀涂布于含有 G418⁺抗生素(浓度为 250 mg/L)平板, 30 $^{\circ}$ C 培养。

1.2.3 SBP 的表达与酶活测定: 在过氧化氢存在条件下, 大豆过氧化物酶将 ABTS 转化成具有绿色的氧化产物, ABTS 的氧化产物在 420 nm 处具有最大吸收峰, 通过分光光度计读取。从抗性平板上分别挑 20 个单克隆接种于 YPCS 发酵培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600}\approx 5$, 以终浓度为 1%无水甲醇诱导, 每隔 24 h 诱导, 72 h 后离心收集上清, 测定酶活。

SBP 的测活总体系为 0.3 mL : 0.1 mol/L pH 4.5 NaOAc-HAc、0.5 mmol/L ABTS、2.9 mmol/L H₂O₂; 加入 1 μ L 适当稀释倍数的发酵液上清, 于 25 $^{\circ}$ C、420 nm 波长处测定 1 min 之内的光吸收值变化, 酶活单位定义为: 每分钟氧化 1 μ mol/L 底物 ABTS 所需要的酶量为一个酶活单位。根据公式, 计算出酶活^[17]。在 420 nm 处 ABTS 摩尔消光系数 $\epsilon_{420}=3.6\times 10^4$ L/(mol \cdot cm)。

$$\text{酶活(U/mL)} = \frac{\Delta A \times 0.3 \times \text{稀释倍数}}{0.036 \times \text{加入的样品体积}}$$

表 1 实验中所用的引物序列
Table 1 The primers sequence used for experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Sequences (5'→3')
SBPF <i>EcoR</i> I	CGGAATTCAGCTTACTCCTACGTTCTACAG
SBPR <i>Not</i> I 306	ATAAGAAT <u>CGGGCCGCT</u> TACGAGTCTCCATTACAAAATTAC
SBPR <i>Not</i> I 326	ATAAGAAT <u>CGGGCCGCT</u> TATTTAGATTGAGCAACAAGC
130F	AACAGCACAAACGAACCCTTGCAAATCAAAACCTTC
130R	GTTCGTTGTGCTGTTAAGCTGTCCCTTCTTC
144F	TTCTTCCAGCTCACTCAACTTAAAGCTTCC
144R	AGTGAGCTGGAAGAAAGGTGCTGGAAGGTTTTG
185F	GATTATACCAGTTCAGCAACACTGGAAACCCTGATC
185R	GCTGAACCTGGTATAATCGGTTTATGAATGTAC
197F	ACTCTGCAGACAACATACTTAGAAGTATTG
197R	TGTTGTCTGCAGAGTTGGATCAGGGTTTCCAG
211F	CCAGCAAGCAACTGGGGATAACCTCAC
211R	GTTGCTTGCTGGGGCATCTTGACGCAATAC
216F	GGGATCAACTCACCAATTTGGACCTGAGCACAC
216R	GGTGAGTTGATCCCCAGTTGCATTCTG

注: 下划线为酶切位点碱基。

Note: The underline for enzyme loci bases.

式中: ΔA 为活度值; 0.036 为 ABTS 的微摩尔消光系数; 0.3 为反应体积。

1.3 SBP 基因上糖基化位点的突变

以质粒 pPIC9K-SBP₃₀₆ 为模板, 突变以下位点 (130、144、185、197、211、216) 的天冬酰胺(Asn) 为谷酰胺(Q)^[18]。分别设计定点突变引物, 进行定点突变。突变后分别线性化, 转化毕赤酵母 X-33, 以截短后未诱变的 pPIC9K-SBP₃₀₆ 为对照, 挑单克隆于 YPCS 发酵培养基经诱导表达, 引物序列如表 1 所示。

1.4 优化发酵条件

1.4.1 优化发酵 pH: 选取截短 SBP 氨基酸 C 端序列中表达活性较高的 X33-SBP₃₀₆ 菌株, 接种于以 100 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐溶液配置的不同 pH (3、4、5、6、7、8) 的 YPCS 发酵培养基中, 在 30 °C 条件下培养至 $OD_{600} \approx 5$ 后以终浓度为 1% 的无水甲醇诱导, 每隔 24 h 加甲醇, 诱导 72 h 后离心收集上清测酶活。

1.4.2 添加 Hemin 浓度对 SBP 酶活影响: 通过外源添加不同浓度 Hemin (0、100、200–1 000 $\mu\text{mol/L}$), 以 250 mL 锥形瓶中装有 100 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐溶液(pH 6) 配置的 YPCS 发酵培养基 50 mL 培养至 $OD_{600} \approx 5$, 开始以终浓度为 1% 无水甲醇诱导表达, 并在首次诱导时加入相应不同浓度 Hemin, 每隔 24 h 加次甲醇, 72 h 后离心收集发酵液上清测酶活。

1.5 5 L 发酵罐发酵 SBP

将保存于 -80 °C 种子划线于 YPD 培养基平板活化, 挑单克隆接种于 YPD 培养基培养 12 h, 转接于 200 mL BMGY 培养基至 $OD_{600} \approx 10$ 接种于发酵罐, 5 L 发酵罐中装液量为 2 L BSM 培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后, 以浓氨水调培养基 pH 5, 控制培养温度 30 °C, 以 10% 发酵体积接种。至培养基中的甘油消耗尽(溶氧值 DO 开始明显上升), 开始流加 50% 甘油, 控制溶氧值 DO 在 20%–30% 之间, 以控制一定的比生长速率, 至 $OD_{600} \approx 180$, 停止流加甘油, 2 h 后往培养基中加入酪蛋白水解物(终浓度为 1%)、加入 Hemin (终浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$)、pH 调至 6、并开始流加甲醇诱导(参照酵母表达手册), 每隔 24 h 加维生素 C 水溶液(终浓度 80 $\mu\text{g/L}$)。

定期取样并采用气相色谱检测发酵液中甲醇的含量, 最高不超过 10 g/L, 并测定发酵液酶活。发酵结束以 $6\,000 \times g$ 、4 °C 离心 20 min 收集发酵液上清, 超滤浓缩并冻存于 -80 °C。

2 结果与讨论

2.1 SBP 基因的克隆和表达载体的构建

以大豆 cDNA 为模板, PCR 扩增获得 SBP 目的片段, 构建重组质粒 pPIC9K-SBP₃₂₆ 与 pPIC9K-SBP₃₀₆, 采用 PCR 扩增 SBP 上下游引物进行 PCR 验证与 *EcoR* I 与 *Not* I 双酶切验。如图 1 所示: 成功地扩增出了约 1 000 bp 的 SBP 基因, 经测序验证成功构建表达载体 pPIC9K-SBP₃₂₆ 和 pPIC9K-SBP₃₀₆。

2.2 大豆过氧化物酶 SBP 的表达

经诱导 72 h 后测定发酵液上清酶活, 发现 X33-SBP₃₂₆ 组的发酵液上清没有酶活。而截短 SBP 氨基酸序列 C 端 20 个氨基酸的 X33-SBP₃₀₆ 组发酵上清可以明显将检测底物 ABTS 氧化成 ABTS²⁺ 显绿色。分别在 420 nm 处测定吸收值, 检测并计算 X33-SBP₃₀₆ 各菌株发酵液上清酶活, 其中最高酶活为 23.5 U/mL。说明表达载体 pPIC9K-SBP₃₀₆ 于毕赤酵母中得到有功能活性表达。

2.3 糖基化位点突变对 SBP 表达的影响

分析 SBP 氨基酸序列, 发现其氨基酸序列中有 7 个 Asn-X-Thr(Ser) 结构, 此结构在酵母中表达后易形成糖基化, 而过度糖基化可能影响蛋白的分

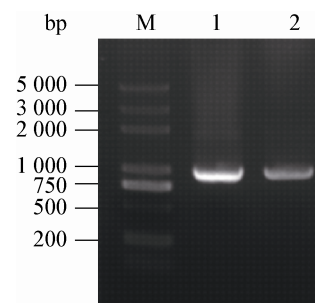


图 1 PCR 扩增 SBP 琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 1 Agarose gel of PCR

注: M: DNA 分子标记; 1, 2: SBP₃₀₆, SBP₃₂₆。

Note: M: DNA marker; 1, 2: PCR products of SBP.

泌。经 PCR 定点诱变 SBP₃₀₆ 氨基酸序列中 130、144、185、197、211、216 处的氨基酸 Asn 突变为 Q 后,结果如图 2 所示。突变 130 位点后酶活明显降低,突变 144、185、197 这 3 个位点后,SBP 无酶活,表明 130、144、185、197 这 4 个位点为必需糖基化位点,而突变 211、216 两个位点后,酶活提高约 10%。

2.4 SBP 发酵条件的优化

2.4.1 不同 pH 培养条件对 SBP 诱导表达的影响: 选取 X33-SBP₃₀₆ 中酶活最高株为实验株,以柠檬酸-磷酸盐溶液配置不同 pH 的 YPCS 发酵培养基,诱导 72 h 后,测酶活,如图 3 所示。在 pH 6 条件下 SBP 酶活达到最高,约 36.92 U/mL,说明在弱酸性条件下胞内的蛋白酶活性较低而减少了已合成目的蛋白的降解,有利于 SBP 表达。

2.4.2 加入不同 Hemin 量对 SBP 酶活的影响: 在 pH 6、100 mmol/L 磷酸盐溶液配置 YPCS 发酵培养基中加入不同浓度 Hemin,测定酶活,结果如图 4 所示。当 Hemin 终浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时 SBP 酶活最高为 135.7 U/mL 的发酵上清相比未添加 Hemin 组 36.9 U/mL 酶活提高了 2.6 倍。由于 Hemin

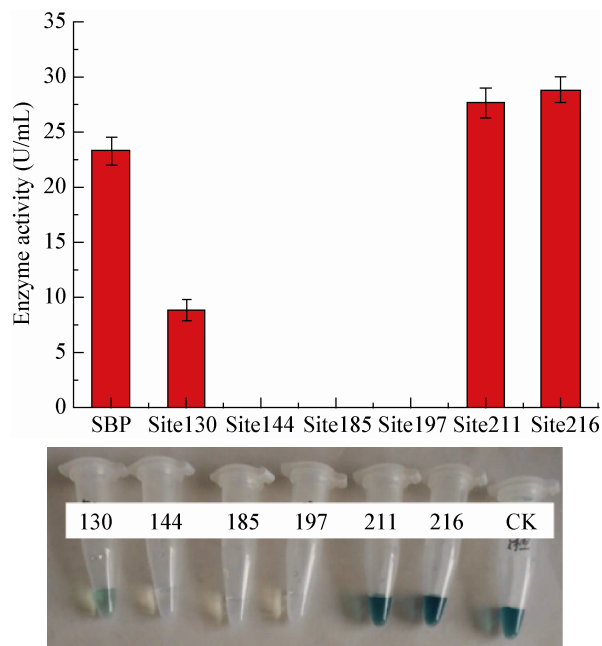


图 2 去糖基化突变对酶活的影响

Figure 2 Effect of deglycosylation mutation

基团是 SBP 活性中心整合基团,酶活性中心直接影响蛋白质空间结构,进而影响酶活,通过外源加入一定量 Hemin 使合成的肽链能够正确与活性中心折叠,从而提高 SBP 酶活,而增加 Hemin 浓度至 1 mmol/L 酶活反而明显降低。至发酵后期离心收菌发酵液的颜色较深,偏褐绿色,发现有部分细胞被着色上 Hemin 的颜色,可能是过高浓度 Hemin 对酵母细胞生长有影响。

2.5 5 L 发酵罐发酵结果

5 L 发酵罐装液量为 2 L,开始诱导时加入 800 $\mu\text{mol/L}$ Hemin,终浓度为 1%的酪蛋白水解物,控制溶氧在 20%–30%范围内,发酵 108 h 后,结果如图 5 所示,下罐测生物量 OD_{600} 为 365,发酵上清酶活为 510.8 U/mL。

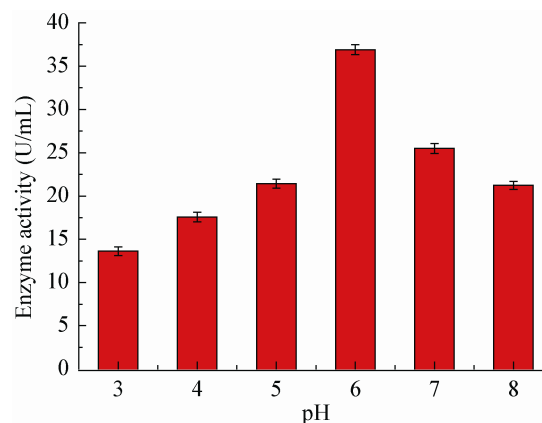


图 3 不同 pH 对 SBP 表达的影响

Figure 3 The effect of pH on SBP expression

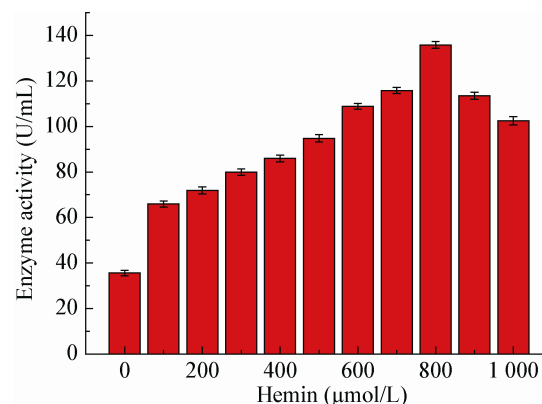


图 4 不同浓度 Hemin 对 SBP 酶活的影响

Figure 4 The influence of Hemin on SBP activity

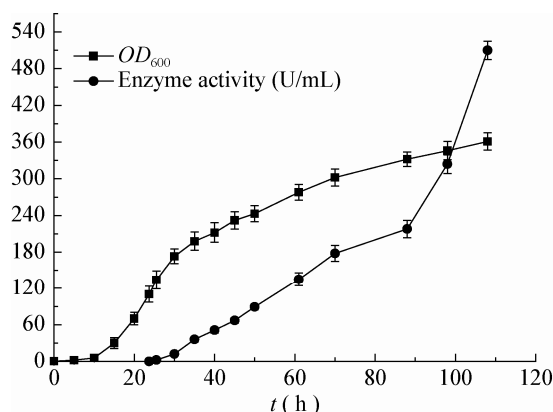


图5 5 L 发酵罐发酵 SBP 的结果

Figure 5 The results of SBP ferment

3 讨论

本研究通过截短 SBP 末端 20 个氨基酸, 实现在毕赤酵母中表达有生物功能活性的 SBP。通过氨基酸序列分析, SBP 氨基酸 C 端 20 个氨基酸形成的短肽会引导已合成 SBP 氨基酸链至胞内溶酶体膜表面而使已合成的肽链不能正确分泌表达, 并分析已报道有生物功能活性的 HRP 与 SBP C 端的氨基酸结构^[1,11], 发现能够有功能活性表达的 HRP 与 SBP 都无此 C 端 20 个氨基酸结构。

对发酵条件优化确定最优表达条件为: pH 6.0 100 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐的 YPCS 培养基中加入 800 μ mol/L Hemin, 以终浓度为 1% 无水甲醇于 30 $^{\circ}$ C 条件下每隔 24 h 诱导。至发酵后期发现菌体对 Hemin 利用率较低, 可能是进入胞内的阻力较大, 相关表面活性剂处理可以增加细胞的通透性, 从而减少发酵液中 Hemin 的加入量, 使其对细胞生长的影响降低。

在 5 L 发酵罐中用 BSM 培养基进行发酵, 加入浓度为 800 μ mol/L Hemin 无水甲醇诱导, 发酵得到了酶活为 510 U/mL 的发酵上清, 是目前报道的最高酶活力, 酶活显著高于国外 Kamal 已报道的 SBP 酶活力: 245 U/mL。该法生产大豆过氧化物酶具有操作简便、高效、经济的优势, 为 SBP 规模化生产奠定了基础。

参考文献

- [1] Kamal JK, Behere DV. Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2003, 94(3): 236-242.
- [2] Kamal JKA, Behere DV. Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase[J]. Biochemistry, 2002, 41(29): 9034-9042.
- [3] Al-Ansari MM, Modaressi K, Taylor KE, et al. Soybean peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of phenols in coal-tar wastewater: comparison of additives[J]. Environmental Engineering Science, 2010, 27(11): 967-975.
- [4] Li ZM, Pang XB, Ye Q, et al. Production and optimization of recombinant human augments of liver regeneration by *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 47(5): 222-227.
- [5] Spadiut O, Rossetti L, Dietzsch C, et al. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy[J]. Protein Expression and Purification, 2012, 86(2): 89-97.
- [6] Hamid M, Khalil-ur-Rehman. Potential applications of peroxidases[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1177-1186.
- [7] Silva MC, Torres JA, Chagas PMB. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2013, 89: 122-129.
- [8] Dietzsch C, Spadiut O, Herwig C. A dynamic method based on the specific substrate uptake rate to set up a feeding strategy for *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 14.
- [9] Marchis T, Avetta P, Bianco-Prevot A, et al. Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2011, 105(2): 321-327.
- [10] Zalai D, Dietzsch C, Herwig C. A dynamic fed batch strategy for a *Pichia pastoris* mixed feed system to increase process understanding[J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(3): 878-886.
- [11] Henriksen A, Mirza O, Indiani C, et al. Structure of soybean seed coat peroxidase A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions[J]. Protein Science, 2001, 10(1): 108-115.
- [12] 曾家豫, 刘芙蓉, 廖世奇, 等. 大豆过氧化物酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. 大豆科学, 2010, 29(5): 733-737.
- [13] 曾家豫, 郑群, 廖世奇, 等. 大豆过氧化物酶基因随机突变文库的构建[J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 731-737.
- [14] Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 22.
- [15] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1995, 6(5): 527-533.
- [16] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270.
- [17] Morawski B, Lin Z, Cirino P, et al. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*[J]. Protein Engineering, 2000, 13(5): 377-384.
- [18] Ryan BJ, Carolan N, O'Fágáin C. Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches?[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(8): 355-363.