

用 GAP 启动子在 *Pichia pastoris* GS115 中组成型表达鼠灰链霉菌腺苷酸脱氨酶

方炜^{1,2} 张梁^{1,2*} 顾正华^{1,2} 丁重阳^{1,2} 石贵阳^{1,2}

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】构建产 AMP 脱氨酶的重组毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)菌株, 并初步优化其发酵条件。【方法】以鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)基因组为模板 PCR 扩增获得腺苷酸脱氨酶基因 *AMPD*, 以 pGAP9K 为载体构建重组表达质粒 pGAP9K-*AMPD* 并通过电转化法转入 *Pichia pastoris* GS115, 筛选转化子对其酶活进行测定, 并初步优化其发酵条件。【结果】构建了毕赤酵母重组菌, 通过分光光度法测定, 显示重组菌有明显的酶活; 初步优化发酵条件为: 该重组菌最适发酵培养基为: 甘油 2%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, pH 6.0; 发酵条件为: 接种龄 24 h, 转接量 3%, 30 °C、200 r/min 培养 96 h, 取发酵上清液测定酶活, 重组菌腺苷酸脱氨酶酶活达到 $2\ 230 \pm 60$ U/mL。【结论】构建了一株产 AMP 脱氨酶活性较高的重组毕赤酵母菌株, 并通过优化发酵条件使其酶活达到 $2\ 230 \pm 60$ U/mL。为 AMP 脱氨酶工业化生产奠定了一定的基础。

关键词: 腺苷酸脱氨酶, 鼠灰链霉菌, 毕赤酵母, 重组表达, 发酵优化

Constitutive expression of AMP deaminase from *Streptomyces murinus* in *Pichia pastoris* GS115 using the GAP promoter

FANG Wei^{1,2} ZHANG Liang^{1,2*} GU Zheng-Hua^{1,2} DING Zhong-Yang^{1,2} SHI Gui-Yang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory of Food Fermentation Process and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] We constructed a recombinant *Pichia pastoris* GS115 strain to produce AMP deaminase and optimized the fermentation conditions. [Methods] The *AMPD* gene was amplified from *Streptomyces murinus* and cloned into the expression plasmid pGAP9K, the recombinant expression plasmid was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electrotransformation. Furthermore, we determined the AMP deaminase activity of positive transformants. Finally, we optimized the fermentation conditions. [Results] We constructed a recombinant *P. pastoris* GS115 strain (*P. pastoris* GS115/pGAP9K-*AMPD*) that showed AMP deaminase activity. The fermentation conditions of the recombinant strain were studied. The results showed that the optimum fermentation

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100905); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(No. NCET-11-0665)

*通讯作者: 信箱: zhangl@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-12-19; 接受日期: 2014-03-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-17

medium of the recombinant strain contains 2% glycerin, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH_2PO_4 and 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 6.0). And the recombinant enzyme activity of fermentation supernatant was $2\,230 \pm 60$ U/mL with 3% of inoculation amount, 24 hours of seed time, 96 hours for 200 r/min at temperature of 30 °C. **[Conclusion]** We constructed a recombinant *P. pastoris* GS115 strain that showed AMP deaminase activity about $2\,230 \pm 60$ U/mL under optimized fermentation conditions. This research is helpful to advance the industrial production of AMP deaminase.

Keywords: AMP deaminase, *Streptomyces murinus*, *Pichia pastoris*, Recombinant expression, Fermentation optimization

腺苷酸脱氨酶(AMP deaminase, EC 3.5.4.6)是一种氨基水解酶,它可将腺苷酸嘌呤碱基上的氨基脱去,生成肌苷酸(IMP)和 NH_3 。IMP 可用于生产药品、强力味精以及呈味核苷酸,而 NH_3 可以作为细胞的 H^+ 缓冲剂^[1-2]。另外,AMP 脱氨酶是嘌呤核苷酸代谢循环中的三种主要酶类之一,对于维持机体免疫力^[3]和腺苷酸能荷^[4]具有重要作用。因此,它是工业生产中一种重要的酶。

AMP 脱氨酶广泛存在于各种生物体内,包括微生物、动物以及人体内,其最早由鼠骨骼肌,随后又由人红血细胞制备。目前工业生产中通常由酵母、青霉、毛霉及曲霉等微生物发酵产 AMP 脱氨酶,但是在酶的活性及稳定性等方面存在很多问题^[5]。因此,利用基因重组技术,将微生物来源的 AMP 脱氨酶基因在特定宿主中进行重组表达,可以有效改善上述问题。现在国内关于 AMP 脱氨酶基因重组表达的研究鲜见报道,国外关于该酶重组表达的研究较少,仅日本在专利中报道过一次^[6]。毕赤酵母作为一种真核表达系统,它既具有了原核表达系统操作简单、生长快速、易于培养等优点,还具有原核表达系统所不具有的特点,如外源蛋白稳定性好、分泌量大、易于纯化以及对外源蛋白进行翻译后修饰等^[7]。三磷酸甘油醛脱氢酶启动子(pGAP)是一种组成型启动子,不需要甲醇诱导,因而避免了甲醇带来的危害,并且在发酵过程中不需要进行碳源转换,操作方便,大大缩短了发酵周期,提高了生产效率^[8-11]。本实验通过基因重组技术,利用 pGAP 组成型启动子,实现了鼠灰链霉菌 AMP 脱氨酶基因在毕赤酵母中的重组表达,并对

该重组菌摇瓶发酵条件进行了优化,为后续实验奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*), *Escherichia coli* JM109, *Pichia pastoris* GS115 为本实验室保藏。克隆载体 pMD19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司; pGAP9K 为本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂: 质粒小量提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物技术公司; DNA 限制性内切酶、DNA marker、Protein marker 购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶、2×GC Buffer I、dNTPs 购自 TaKaRa 公司; Ampicillin、Kanamycin、G418、5'-AMP 以及 PCR 引物购自上海生工生物有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: LB 培养基用于重组大肠杆菌的培养; YEPD 培养基用于培养毕赤酵母 GS115; 种子培养基 ISP-2 (g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0 (pH 7.3), 用于鼠灰链霉菌的培养; MD 培养基用于酵母重组子的筛选; 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 20.0, 酵母膏 10.0, KH_2PO_4 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 调节 pH 6.0, 用于重组菌的发酵培养。

1.2 方法

1.2.1 AMP 脱氨酶基因的克隆: 根据 NCBI 公布的鼠灰链霉菌脱氨酶基因序列, 设计上下游引物:

P1: 5'-CCGGAATTCGCGCCGCGCCCGCCCGGCAG-3'; P2: 5'-CCGGAATTCACCCCCGGGCGTGCC-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点)。提取鼠灰链霉菌染色体基因组^[12], 以其为模板, P1、P2 为引物, PCR 扩增出鼠灰链霉菌 AMP 脱氨酶基因(不含信号肽)。扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 70 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后连 T 载体转化 JM109 感受态, 筛选阳性转化子送上海生工公司测序。

1.2.2 重组表达载体 pGAP9K-AMPD 的构建: 提取测序正确的阳性克隆转化子 pMD19-T-AMPD, 用 *EcoR* I 酶切纯化回收后, 与经同样酶切的 pGAP9K 载体 16 °C 连接过夜, 转化 JM109 感受态细胞, 涂布 Kan 抗性平板, 提取质粒, 经酶切验证阳性克隆转化子后, -70 °C 甘油管保藏。

1.2.3 *Pichia pastoris* GS115 感受态细胞的制备: 具体方法见参考文献[13-14]。

1.2.4 线性化质粒 pGAP9K-AMPD 对 GS115 的电转: 取制备好的感受态细胞, 加入 20 μ L 经 *Sac* I 线性化的质粒, 轻弹混匀, 冰浴 10 min, 转入已预冷的电转杯中。然后, 1 500 V、5 ms 电击一次, 向电转杯中加入等体积已预冷的 1 mol/L 无菌山梨醇溶液, 混匀。涂布 MD 平板, 3-5 d 挑取单菌落检测。

1.2.5 阳性克隆转化子的筛选与鉴定: 从 MD 平板上挑取转化子培养后, 通过蜗牛酶法提取重组子染色体基因组, 如果目的基因整合到酵母基因组中, 则可以使用引物 P1 和 P2 扩增出目的片段, 而原始菌未能扩增出目的片段。

1.2.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析: 将筛选得到的阳性酵母重组子接种于 30 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 36 h。然后以 2% 接种量接种于 50 mL YEPD 液体培养基中, 培养 5 d 后, 取发酵上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.7 AMP 脱氨酶酶活测定方法: 分光光度法测定 AMP 脱氨酶酶活^[15-16]: 用 0.1 mol/L pH 6.0 琥珀酸-NaOH 缓冲液将 5'-AMP 配成终浓度为

0.1×10^{-3} mol/L 的反应底物。取 3 mL 反应底物于 60 °C 保温 5 min, 加入 100 μ L AMP 脱氨酶液, 反应 15 min 后, 立即加入 3 mL 10% 高氯酸终止反应, 用紫外分光光度计在 265 nm 处测定其吸光值。对照实验方法同上, 反应底物保温后用冰水预冷, 加入 3 mL 10% 高氯酸终止反应后再加 100 μ L 酶液。

酶活定义: 在上述条件下, 每分钟吸光值改变 0.001 定义为一个酶活单位。计算公式如下: 酶活(U/mL) = $(\Delta A_{265} \times K \times 10) / (0.001 \times T)$ 。 ΔA_{265} 为反应组与对照组吸光度的差值; K 为酶液的稀释倍数; T 为反应时间, min。

1.2.8 摇瓶发酵的初步优化^[17-19]: 通过单因素实验以及正交实验分别考察碳源、氮源、培养基 pH、接种龄、接种量、发酵时间等因素, 从而确定该重组菌的最适发酵培养基和发酵条件。

2 结果与分析

2.1 重组菌株的构建

以鼠灰链霉菌基因组为模板, PCR 扩增获得 AMP 脱氨酶基因(不含信号肽), 大小为 1 476 bp, 与理论值相符。将目的基因与 T 载体相连, 得到重组质粒 pMD19-T-AMPD, 送上海生工公司测序, 测序结果与 NCBI 公布的鼠灰链霉菌 *AMPD* 比对一致性达到 99.5%。然后, 提取重组质粒 pMD19-T-AMPD, 经 *EcoR* I 酶切割回收后, 与经同样酶切的 pGAP9K (该载体的具体构建过程见参考文献[20]) 相连, 获得重组表达载体 pGAP9K-AMPD。将重组表达载体 pGAP9K-AMPD 线性化后电转化 GS115, 挑取单菌落进行 PCR 验证, 从而得到阳性转化子。

2.2 重组酵母表达产物的 SDS-PAGE 分析

参照 1.2.6, 进行 SDS-PAGE 电泳。如图 1 所示, 转化子的发酵上清在 53 kD 出现一条明显的条带, 而对照菌株(*P. pastoris* GS115 with pGAP9K) 在该处没有条带。该条带的分子量与用 DNAMAN 软件预测的 AMP 脱氨酶分子量大小吻合, 说明目的基因已经得到了表达。

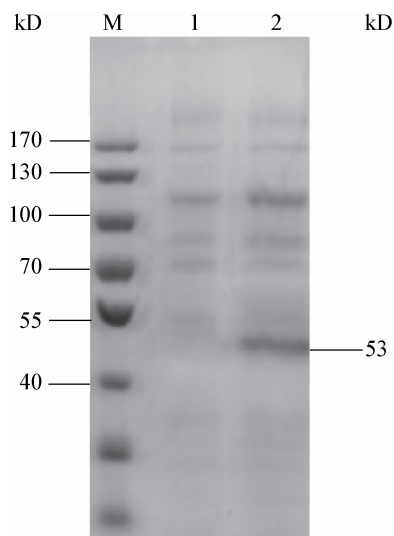


图 1 *P. pastoris* GS115 转化子表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of expression product in *P. pastoris* GS115 transformant

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 阴性对照; 2: 阳性转化子。

Note: M: Protein marker; 1: Negative recombinant of GS115 (pGAP9K); 2: Positive recombinant of GS115 (pGAP9K-AMPD).

2.3 重组菌发酵培养基的优化

2.3.1 不同碳源对重组菌产酶的影响: 以 2% 蛋白胨为氮源, 分别以 2% 甘油、乳糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉以及葡萄糖为碳源对重组菌进行摇瓶发酵, 如图 2 所示。结果表明, 各种碳源对重组菌的生长和酶活影响差别较大。其中以甘油为碳源时, 不仅菌体量达到最高, 而且 AMP 脱氨酶的酶活也最高; 以葡萄糖作为碳源时, 菌体量和酶活也较好, 仅次于甘油; 但分别以乳糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉为碳源时, 不仅菌体生长不好, 而且酶活很低。因此, 选择甘油作为碳源。

在以甘油为碳源时, 继续考察甘油的添加量对重组菌生长和产酶的影响。分别配制含有 0.5%、1%、2%、3%、4%、5% 甘油的发酵培养基, 对重组菌进行摇瓶培养, 72 h 后取样测菌体浓度和酶活, 如图 3 所示。结果表明, 当甘油浓度 ≤ 20 g/L 时, 菌体浓度和酶活随着甘油浓度的增加而不断上升; 当甘油浓度 > 20 g/L 时, 随着甘油浓度的不断

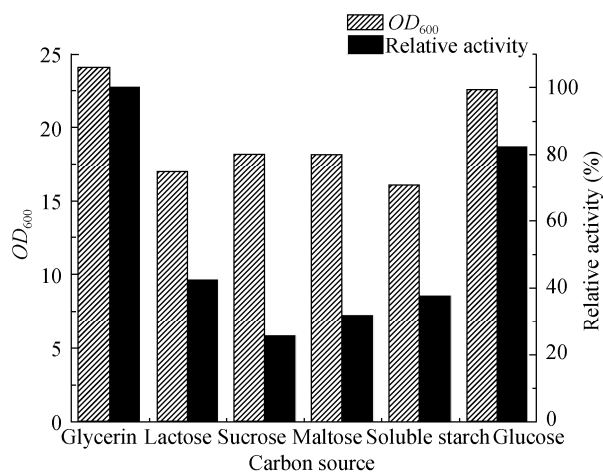


图 2 不同碳源对菌体生长和酶活的影响

Figure 2 Effect of different carbon sources on recombinant strain and activity of AMP deaminase

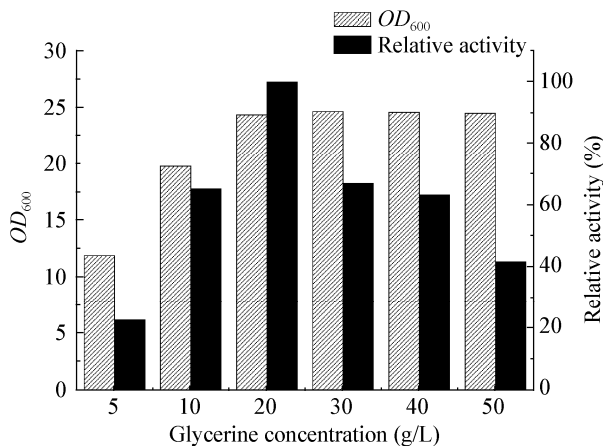


图 3 甘油添加量对菌体生长和酶活的影响

Figure 3 Effect of different glycerine concentration on recombinant strain and activity of AMP deaminase

上升菌体量不再增加, 而酶活在逐渐降低, 这可能是由于过高的甘油浓度对重组酶的表达有抑制作用。

2.3.2 不同氮源对重组菌产酶的影响: 以 2% 甘油为碳源, 分别以 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、麸皮、棉籽粉、玉米浆、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏等单一氮源以及蛋白胨+酵母膏(2:1)、蛋白胨+牛肉膏(2:1)复合氮源为氮源进行摇瓶发酵, 72 h 后测菌体浓度和酶活, 如图 4 所示。结果表明, 无机氮源产酶能力较低且菌体生长相对较差; 有机氮源更有利于促

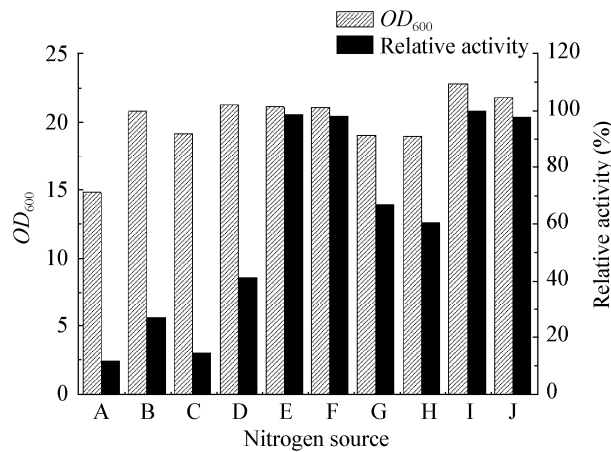


图4 不同氮源对菌体生长和酶活的影响

Figure 4 Effect of different nitrogen sources on recombinant strain and activity of AMP deaminase

注: A: 硫酸铵; B: 硝酸钾; C: 麸皮; D: 棉籽粉; E: 玉米浆; F: 蛋白胨; G: 酵母膏; H: 牛肉膏; I: 蛋白胨+酵母膏(2:1); J: 蛋白胨+牛肉膏(2:1).

Note: A: (NH₄)₂SO₄; B: KNO₃; C: Bran; D: Cottonseed flour; E: corn steep liquor; F: Tryptone; G: Yeast extract; H: Beef extract; I: Tryptone+Yeast extract (2:1); J: Tryptone+Beef extract (2:1).

进产酶且有利于菌体的生长, 其中, 以蛋白胨+酵母膏(2:1)为氮源是酶活最大。因此, 选取蛋白胨+酵母膏(2:1)作为氮源。

2.4 重组菌发酵条件的优化

2.4.1 接种龄对重组菌产酶的影响: 分别取处于对数生长期 12、16、20、24、28、32、36 h 的种子液以 2%接种量转接至 50 mL 发酵培养基中, 摇瓶培养 72 h 后, 取样测菌体浓度和酶活, 结果如图 5 所示。结果表明, 对数期内, 菌体浓度随着菌龄的增大而增加, 而酶活在对数期 20 h 达到最大, 之后逐渐降低。因此, 最适接种龄为 20 h。

2.4.2 接种量对重组菌产酶的影响: 将种龄为 20 h 的种子液分别以 1%、2%、3%、4%、5% 的接种量接到 50 mL 发酵培养基中, 72 h 后取样测菌体浓度和酶活, 如图 6 所示。结果显示, 在 1%–5% 范围内, 重组菌的菌体浓度与接种量成正相关。酶活测定结果显示在接种量为 3% 时酶活最大, 高于或低于 3% 接种量时酶活均有所降低。因此, 最佳接种量为 3%。

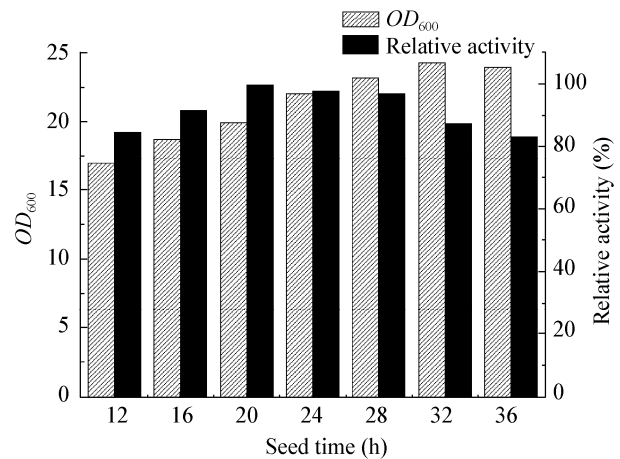


图5 接种龄对菌体生长和酶活的影响

Figure 5 Effect of seed time on recombinant strain and activity of AMP deaminase

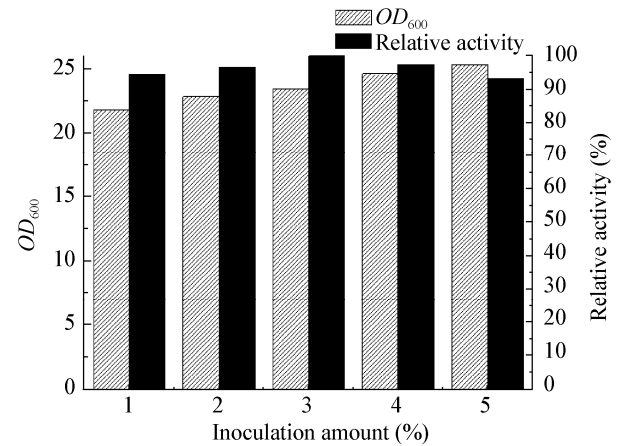


图6 接种量对菌体生长和酶活的影响

Figure 6 Effect of inoculation amount on recombinant strain and activity of AMP deaminase

2.4.3 培养基 pH 对重组菌产酶的影响: 配制 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的 50 mL 发酵培养基, 按 20 h 种龄、3% 接种量接入液体种子, 72 h 后测菌体浓度和酶活, 结果如图 7 所示。结果显示, pH 值为 4.0–6.0 时菌体量逐渐增大, pH 值为 6.0–7.5 时菌体量变化不大; pH 值为 4.0 时没有酶活, pH 为 6.0 时重组酶活性最大, 当 pH 大于 6.0 时, 随着 pH 值增大酶活逐渐降低。因此, 培养基最适 pH 确定为 6.0。

2.4.4 发酵时间对重组菌产酶的影响: 配制 pH 值为 6.0 的 50 mL 发酵培养基, 按 20 h 种龄、3% 接

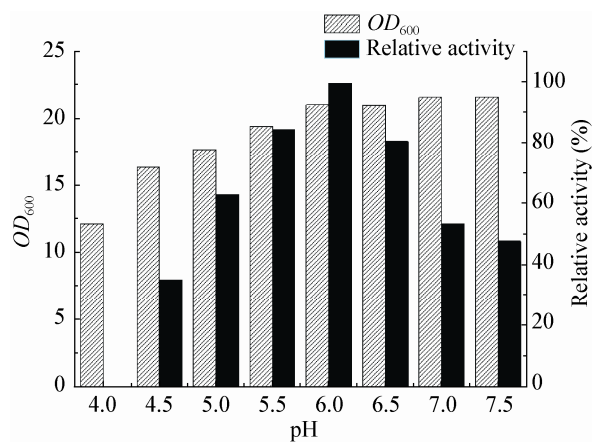


图7 培养基 pH 对菌体生长和产酶的影响

Figure 7 Effect of medium pH on recombinant strain and activity of AMP deaminase

种量接入液体种子, 30 °C、200 r/min 摇瓶培养, 分别培养 48、60、72、84、96、108、120 h 后, 取样测酶活, 结果如图 8 所示。

2.5 正交实验

根据正交设计原理以及对发酵培养基和发酵条件的单因素实验结果, 设计了四因素三水平的正交实验方案, 见表 1。

正交实验结果如表 2 所示。从表中可以看出, 4 个因素对酶活影响从大到小为: 碳源添加量>培养基 pH>发酵时间>接种龄。最佳条件组合为: A₂B₂C₃D₂。即碳源添加量为 2%, 培养基 pH 为 6.0, 接种龄 24 h, 发酵时间 96 h。在该条件下进行验证试验, 重组菌酶活可达到 2 230±60 U/mL。

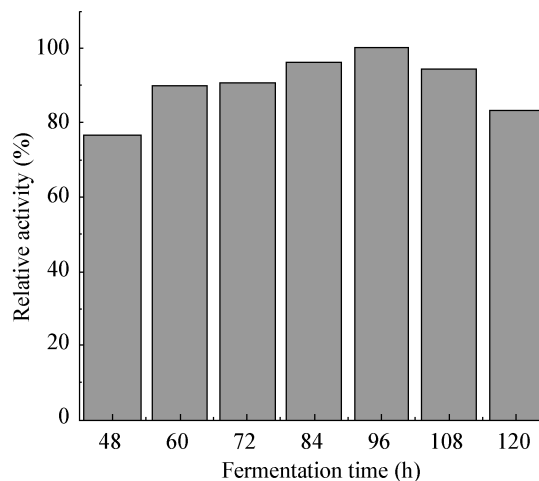


图8 发酵时间对重组菌产酶的影响

Figure 8 Effect of fermentation time on activity of AMP deaminase

表 1 正交实验因素表
Table 1 The factor of orthogonal experiment

因素 Factor	碳源添加量 Glycerin concentration (%)	培养基 pH Medium pH	接种龄 Seed time (h)	发酵时间 Fermentation time (h)
1	1	5.5	16	72
2	2	6.0	20	96
3	3	7.0	24	120

表 2 正交实验结果表
Table 2 The results of orthogonal experiment

实验 Test	A 碳源添加量 Glycerin concentration (%)	B 培养基 pH Medium pH	C 接种龄 Seed time (h)	D 发酵时间 Fermentation time (h)	AMPD 酶活 AMPD activity (U/mL)
1	1	1	1	1	1 810
2	1	2	2	2	1 940
3	1	3	3	3	1 720
4	2	1	2	3	2 210
5	2	2	3	1	2 290
6	2	3	1	2	2 130
7	3	1	3	2	2 230
8	3	2	1	3	2 250
9	3	3	2	1	2 060
x_1	1 823.333	2 083.333	2 063.333	2 053.333	
x_2	2 210.000	2 160.000	2 070.000	2 100.000	
x_3	2 180.000	1 970.000	2 080.000	2 060.000	
R	386.667	190.000	16.667	46.667	

3 讨论

AMP 脱氨酶在食品、医药以及其它领域应用广泛。目前国内外 AMP 脱氨酶工业化生产主要是微生物发酵法,包括固态发酵法和液态发酵法,该方法在酶的活性、稳定性以及提取纯化等方面存在着许多问题,因此寻求一种新的方法解决上述问题显得尤为重要。

本实验以鼠灰链霉菌为基因来源,扩增其 AMP 脱氨酶基因,构建重组表达载体 pGAP9K-AMPD,电转化宿主菌 *Pichia pastoris* GS115,从而获得产 AMP 脱氨酶的重组菌。通过单因素实验和正交实验对该重组菌摇瓶发酵条件进行了初步优化,优化后该重组菌 AMP 脱氨酶酶活达到 $2\ 230\pm 60$ U/mL,约为原始菌株鼠灰链霉菌 AMP 脱氨酶表达水平的 3.7 倍(原始菌株酶活约为 600 U/mL)。另外,与米曲霉、蜂蜜曲霉等来源的 AMP 脱氨酶相比较,鼠灰链霉菌来源的 AMP 脱氨酶具有良好的热稳定性^[21],因而在工业应用中具有一定的优势。本研究实现了鼠灰链霉菌来源的 AMP 脱氨酶基因在毕赤酵母的胞外表达,为国内 AMP 脱氨酶的工业化应用奠定了基础。虽然该重组 AMP 脱氨酶的活性较之前报道有了很大的提高,但是距离工业化应用的要求还有一定的差距。后续工作将以重组 AMP 脱氨酶的纯化和性质研究为主,并进行工艺放大实验,以期得到更高的酶活。

参考文献

- [1] 叶炜,田吕明,姚鹏,等. AMP 脱氨酶的生化性质研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 164-179.
- [2] 刘军昌,段作营,沈梅生,等. 固态发酵生产腺苷酸脱氨酶[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 36-42.
- [3] Marquetant R, Sabina RL, Holmes EW. Identification of a noncatalytic domain in AMP deaminase that influences binding to myosin[J]. Biochemistry, 1989, 28(22): 8744-8749.
- [4] Chapman AG, Atkinson DE. Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction[J]. Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(23): 8309-8312.

- [5] 普为民,丁骅孙,陶元器. 5'-腺苷酸脱氨酶产生菌选育及发酵生态学研究[J]. 云南大学学报, 1994, 16(2): 184-188.
- [6] 水口凉子,森茂治,东本笃树,等. 放线菌来源的 AMP 脱氨酶及其应用: 日本, 200580013789[P]. 2007-4-18.
- [7] 余占桥,马青山,赵龙妹,等. 毕赤酵母优化表达外源蛋白策略[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1035-1042.
- [8] 蒋慧慧,李丰功,陆毅,等. 三种酵母启动子在毕赤酵母中的功能比较[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(5): 60-68.
- [9] Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, et al. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* using the GAP promoter[J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(6): 552-557.
- [10] 曹东艳,柳倩,贺晓云,等. 源于 GAP 启动子的毕赤酵母组成型表达系统的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(4): 1217-1221.
- [11] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. Gene, 1997, 186(1): 37-44.
- [12] 刘炳辉,曹远银,闫建芳,等. 6种链霉菌基因组 DNA 提取方法比较[J]. 河南农业科学, 2008(10): 86-89.
- [13] 高炳森,唐天乐,长孙东亭,等. 毕赤酵母高效电转化条件的研究[J]. 中国海洋药物, 2010(2): 1-5.
- [14] 郭忠鹏. 代谢工程改善工业酒精酵母发酵性能[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2011.
- [15] 何战胜,邓健,许金生,等. 催化光度法测定体液腺苷脱氨酶的活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 546-547.
- [16] 刘军昌,段作营,毛忠贵. AMP 脱氨酶活性测定的一种改进方法[J]. 食品与发酵工业, 2000, 27(7): 30-33.
- [17] 洒荣波,石贵阳,王正祥. 基因工程菌 *Pichia pastoris* 高密度培养条件的摇瓶研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 52-57.
- [18] 刘林. 植酸酶基因在 *Pichia pastoris* 中的表达及发酵条件初步优化[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2009.
- [19] 焦龙,于宏伟,郭润芳,等. 毕赤酵母工程菌 pk53 产纤溶酶发酵条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 94-98.
- [20] 屠发志. 纤维素酶系酿酒酵母载体的构建以及 *Pichia pastoris* 工程菌表达纤维素酶[D]. 儋州: 华南热带农业大学硕士学位论文, 2007.
- [21] Sato Y, Horinouchi S, Ohnishi Y. Characterization of a thermostable adenosine 5'-monophosphate deaminase gene in *Streptomyces murinus*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(1): 65-70.