

齐小雨, 陈 熙, 张 炜. 人溶菌酶重组酵母工程菌的构建和活性干粉的制备[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1122-1127.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.027

人溶菌酶重组酵母工程菌的构建和活性干粉的制备

齐小雨, 陈 熙, 张 炜

(南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 本试验旨在构建一种胞内表达人溶菌酶的新型酵母工程菌, 并利用其高蛋白、富含溶菌酶的特点开发新型动物饲料添加剂, 避免直接使用人溶菌酶制剂带来的高成本、活性不稳定等问题。将来自胎盘的人溶菌酶 *hLYZ* 基因克隆至表达载体 pPICZA 上, 验证后的重组载体电转化至 X-33 毕赤酵母中, 经标准培养基 BMGY/BMMY 培养、甲醇诱导表达后, 检测蛋白表达活力和人溶菌酶活力。在此基础上, 以麦芽汁-蚕蛹为培养基, 通过单因素试验和正交试验来优化培养基成分和摇瓶发酵条件。结果表明, 人溶菌酶基因在重组酵母工程菌中成功表达且酶活力为 1 920 U。以麦芽汁和蚕蛹浸提物为碳氮源, 测得蚕蛹浸提物占 40% 并且营养盐含量为 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时最适合菌体生长。正交试验测得 *R* 值的大小为: 生长阶段 pH 值 > 诱导阶段甲醇含量 > 接种量, 最佳摇瓶发酵条件是生长阶段 pH 值为 6, 诱导阶段甲醇添加量为 1%, 接种量为 3%。经发酵培养的新型酵母工程菌利用真空冷冻干燥技术制成干粉, 活菌数为 1 ml 1×10^9 个, 溶菌酶活性为 1 320 U。上述研究结果为新型饲料添加剂的开发和利用奠定了基础。

关键词: 人溶菌酶; 毕赤酵母; 胞内表达; 培养条件; 活性酵母干粉

中图分类号: S816.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1122-06

Construction of recombinant yeast expressing human lysozyme and preparation of active dry powder

QI Xiao-yu, CHEN Xi, ZHANG Wei

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study aims to construct a genetically-engineered yeast intracellularly expressing lysozyme so as to develop a new animal feed additive instead of high cost and unstable lysozyme preparations. The human lysozyme gene *hLYZ* was cloned into the intracellular expression plasmid pPICZA which was transformed into *Pichia pastoris* X-33 by electronic transformation. After culture and methanol induction, the recombinant yeast was detected for enzyme activity. The culture condition was optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. The result showed lysozyme gene was expressed and the enzyme activity was 1 920 U. Silkworm pupa accounting for 40% of the nitrogen and carbon source and nutrient content at 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were best for yeast thalli growth. The optimal condition for cell growth was pH of 6, methanol inducing concentration of 1% and inoculation size of 3%. By vacuum freezing and drying technology, the genetically engineered yeast was made into active powder with lysozyme activity of 1 320 U and the number of viable count of 1×10^9 per milliliter. The powder can be used for animal feed additive.

Key words: human lysozyme; *Pichia pastoris*; intracellular expression; culture condition; active dry yeast powder

收稿日期: 2015-03-01

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2013428); 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20130672); 南京农业大学青年科技创新基金项目 (KJ2013030)

作者简介: 齐小雨 (1990-), 女, 安徽滁州人, 硕士, 主要从事蛋白质化学研究。(Tel) 17768108908; (E-mail) 13865965727@163.com

通讯作者: 张 炜, (E-mail) wzhang@njau.edu.cn

溶菌酶(Lysozyme)又称 *N*-乙酰胞壁质聚糖水解酶,是一种能水解致病菌中黏多糖的碱性酶^[1-2]。溶菌酶可分为3型:c型(鸡卵清溶菌酶,Chicken egg-white lysozyme)、g型(鹅卵清溶菌酶,Goose egg-white lysozyme)和p型(噬菌体溶菌酶,Phage lysozyme)^[3]。人溶菌酶属于c型溶菌酶,由130个氨基酸组成,相对分子量为14 400^[4]。人溶菌酶具有高生物活性和热稳定性等特点,其杀菌活性是鸡卵清溶菌酶的3倍^[5],同时还有抗病毒、抗肿瘤和增强免疫力的功效,在临床中具有较高的应用价值^[6-7]。现代生物技术利用DNA重组技术生产人溶菌酶,有的以大肠杆菌、霉菌和巴斯德毕赤酵母为宿主^[8]。巴斯德毕赤酵母表达系统自身分泌的背景蛋白少,糖基化程度低,而且其对营养要求低,因此可采用廉价的培养基,易于高密度发酵^[9]。贾向志等将人溶菌酶基因转入到毕赤酵母中进行分泌表达,获得有生物活性的溶菌酶^[10-11]。关于毕赤酵母分泌表达人溶菌酶基因的研究较多,因为其成分简单便于制成溶菌酶基因工程产品,而关于胞内表达的研究较少。

近年来酵母被作为主要的饲料添加剂,传统的酵母饲料是以工业废水废液为原料,接种酵母菌,经发酵干燥制成蛋白质饲料。现代酵母生物饲料源主要是活性干酵母、酵母水解物、酵母微量元素螯合物等^[12-15]。作为优质的蛋白质资源,酵母可作为饲料酶添加剂。活酵母可分泌多种酶,促进营养物质的消化,增进禽畜食欲,促进生长,增强其抵抗疾病的能力^[16]。

本研究拟将人溶菌酶基因转入到毕赤酵母胞内载体pPICZA中,通过优化培养基和摇瓶发酵条件得到高密度酵母菌体,利用真空冷冻干燥技术制得有生物活性的酵母干粉,作为饲料添加剂来使用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种与质粒 大肠杆菌DH5 α 和pMD-19T simple购自大连宝生物工程有限公司,pPICZA质粒和X-33巴斯德毕赤酵母购自上海希匹吉生物有限公司,溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 工具酶与试剂 T4 DNA连接酶和限制性内切酶(*Xho* I、*Eco* R I、*Sac* I)均购自大连宝生物工程有限公司;ZeocinTM(博来霉素类抗生素)、Am-

picillin(青霉素类抗生素)和Lysozyme(溶菌酶)均购自Solarbio公司。

1.1.3 毕赤酵母表达培养基 YPDS培养基(含10.0 g/L酵母提取物、20.0 g/L蛋白胨、20.0 g/L葡萄糖、1.0 mol/L山梨醇),BMGY培养基[含10.0 g/L酵母提取物、20.0 g/L蛋白胨、13.4 g/L酵母氮源、 4.0×10^{-4} g/L生物素、10.0 g/L甘油、100.0 mmol/L磷酸缓冲液(pH6.0)],BMMY培养基(将BMGY培养基中10.0 g/L甘油换成5.0 g/L甲醇)均购自Invitrogen公司。麦芽汁生长培养基制备:称取磨碎的麦芽粉100 g、麸皮15 g,加入600 ml水,放入预先调好的65℃水浴中进行糖化,每隔10 min搅拌1次,碘检验糖化程度(遇碘不变色,即糖化完全),待糖化后补失水,用4~6层纱布进行过滤,121℃下灭菌20 min备用。蚕蛹浸提液制备方法:称取干蚕蛹粉10 g放入1 000 ml锥形瓶内,加蒸馏水500 ml,于4℃下静置,过夜后煮沸30 min,补足水分,让其自然冷却沉淀后吸取上清液,再用滤纸过滤,121℃下灭菌20 min备用。麦芽汁高温浸提液培养基的制备方法:称取磨碎的麦芽粉100 g、麸皮15 g,加入600 ml水,电炉加热煮沸5~10 min后移至预先调好的90℃水浴锅中浸提2~3 h,每隔10 min搅拌1次,浸提结束后补失水,4~6层纱布过滤,121℃下灭菌20 min备用。

1.1.4 引物 pPICZA-*hLYZ*载体引物,P1:5'-CGC-TCGAGTTAATGATGATGATGATGATGCACTCCAC-AACCTTGAAC-3',P2:5'-CGGAATTCCACTCCAC-AACCTTGAACATACTGA-3'。以上引物均由Invitrogen公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 重组菌株的构建及诱导表达

1.2.1.1 胞内表达载体的构建与酵母细胞转化 质粒pMD-19T/*hLYZ*与表达载体pPICZA经过*Eco* R I和*Xho* I双酶切,连接转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。涂布于含ZeocinTM(25 μ g/ml)的低盐LB固体培养基平板上,于37℃恒温培养箱中倒置培养18~24 h。挑选阳性克隆菌株,提取重组表达载体并用*Sac* I单酶切,使其完全线性化。利用电转化法转化巴斯德毕赤酵母感受态细胞X-33。操作参照Invitrogen公司的Easy SelectTM pichia Expression Kit实验手册进行。在不同浓度ZeocinTM的YPDS固体培养基上进行筛选,培养能在高浓度抗

生素培养基上生长的酵母重组子。

1.2.1.2 重组菌株的诱导表达 挑取单个生长状态良好的高抗重组菌落接种于 5 ml 的 BMGY 培养基中,30 ℃ 条件下 250 r/min 振荡培养至 $OD_{600}=2$,室温条件下 1 500 g 离心 5 min 收集酵母菌体,然后用 BMMY 培养基将菌体稀释至 $OD_{600}=1$,30 ℃ 条件下 250 r/min 振荡培养 4~6 d,每隔 24 h 添加甲醇至终浓度为 10 g/L,每 24 h 取样品 1 ml。4 ℃ 条件下 1 500 g 离心 5 min 收集菌体,采用玻璃珠机械破碎法提取胞内蛋白,Western blot 法鉴定蛋白是否表达。

1.2.1.3 重组酵母的酶活测定 利用 BMMY/BMGY 培养酵母重组菌,采用甲醇诱导 48 h 后收集菌体,提取胞内蛋白,利用比浊法测定溶菌酶活力。活力单位定义为,在 25 ℃ 和 pH 6.2 条件下, OD_{450} 每 1 min 下降 0.001 为 1 个酶活力单位(1 U)。由此得酶活力计算公式为:

每 1 L 培养基的酶活力 = $[(OD_{450} - OD'_{450}) \times 1\ 000] / \text{培养基体积(L)}$

OD_{450} 指反应未开始时溶壁微球菌的吸光值; OD'_{450} 指加入人溶菌酶反应 60 s 后溶壁微球菌的吸光值。

1.2.2 试验菌种的制备

1.2.2.1 YPD 平板培养 以新鲜 YPD 平板接菌划线于 30 ℃ 条件下恒温培养 48 h。

1.2.2.2 种子菌的制备 从新鲜的平板上挑取单菌落接入 50 ml 液体培养基,30 ℃ 条件下 220 r/min 培养 24 h 作为种子菌。

1.2.3 培养基的优选

1.2.3.1 麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基 以麦芽汁生长培养基和蚕蛹浸提物为组成成分,按蚕蛹浸提物占比 0%、10%、20%、30%、40%、50% 和 60% 分别配制培养基 10 ml,接种 3% 种子菌,30 ℃ 条件下 250 r/min 培养 16 h,静置后弃上清液,加入 2 ml 麦芽汁高温浸提液培养基,培养 36 h 后测定活菌个数,测得蚕蛹粉最优占比(X1)。

1.2.3.2 酵母营养盐 按蚕蛹最优占比(X1),营养盐含量分别为 110 μg/ml、130 μg/ml、150 μg/ml、170 μg/ml、190 μg/ml、210 μg/ml 和 230 μg/ml 配制麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基各 10 ml,按 3% 接种量接入种子菌,30 ℃ 条件下 250 r/min 培养 16 h,静置后弃上清液,加入 2 ml 麦芽汁高温浸提液培养基,培养 36 h 后测定活菌个数,测得营养盐最优含量(X2)。

1.2.4 摇瓶发酵条件的优选

1.2.4.1 接种量 以蚕蛹浸提物最优占比(X1),酵母营养盐最优含量(X2)配制麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基各 10 ml,分别接种 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7% 的种子菌,30 ℃ 条件下 250 r/min 培养 16 h,静置后弃上清液,加入 2 ml 麦芽汁高温浸提液培养基,每隔 24 h 添加 1% 甲醇,诱导培养 36 h 后测定活菌个数,获得最优接种量(Y1)。

1.2.4.2 甲醇添加量 以蚕蛹浸提物最优占比(X1),酵母营养盐最优含量(X2)配制麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基各 10 ml,接种最优种子菌 Y1,30 ℃ 条件下 250 r/min 培养 16 h,静置后弃上清液,加入 2 ml 麦芽汁高温浸提液培养基,每隔 24 h 分别添加 1%、2%、3%、4%、5%、6% 和 7% 的甲醇,诱导培养 36 h 后测活菌个数,获得最优甲醇添加量(Y2)。

1.2.4.3 生长阶段 pH 以蚕蛹浸提物最优占比(X1),酵母营养盐最优含量(X2)配制麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基各 10 ml,调节生长培养基 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、6.5,接种最优种子菌 Y1,30 ℃ 条件下 250 r/min 培养 16 h,静置后弃上清液,加入 2 ml 麦芽汁高温浸提液培养基,每隔 24 h 添加最优的甲醇用量 Y2,诱导培养 36 h 后测定活菌个数,获得生长阶段最优 pH(Y3)。

1.2.4.4 正交试验优化培养条件 在单因素试验的基础上,以接种量、甲醇添加量、生长时期的 pH 为参试因子,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验设计,以确定最佳的培养条件并进行验证。正交试验因素与水平见表 1。

表 1 培养条件正交试验因素与水平

Table 1 Orthogonal factors and levels of culture conditions

水平	因素		
	A-接种量(%)	B-甲醇添加量(%)	C-生长时期 pH
1	2.0	1.0	5.0
2	3.0	2.0	6.0
3	4.0	3.0	6.5

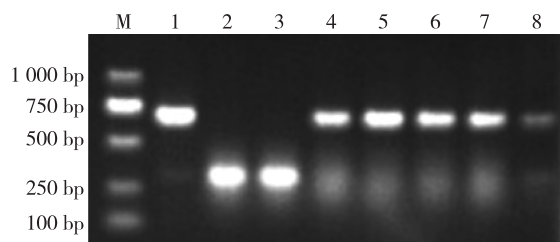
1.2.5 酵母干粉的制备及酶活性测定 将实验室构建的酵母重组菌株用麦芽汁-蚕蛹粉基础生长培养基/麦芽汁高温浸提液培养基进行甲醇诱导表达,培养 48 h 后提取胞内蛋白,用比浊法测定酶活性。另取培养基于室温条件下 1 500 g 离心 5 min 收集菌体,测得湿菌重,按 1:3 的料水比加入 5% 蔗糖溶液,

静置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱冷冻 12 h ,然后在 $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的真空条件下冷冻干燥,制得酵母干粉。将酵母干粉重新溶解后测定活菌数及溶菌酶活性。

2 结果与分析

2.1 重组载体的构建及蛋白表达

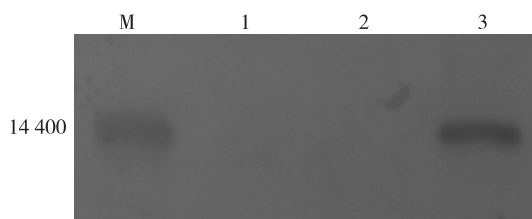
pPICZA/*hLYZ* 电转至 X-33 巴斯德毕赤酵母感受态,提取酵母基因组进行 PCR 鉴定,挑选阳性转化子。阳性转化子的 PCR 鉴定产物大约为 710 bp ,而空载体的 PCR 鉴定产物大约为 293 bp (图 1),说明重组质粒成功进入毕赤酵母的基因组中。通过含高抗生素浓度的培养基筛选出高拷贝的转化子,然后采用甲醇诱导表达,诱导 48 h 后离心收集菌体,收集破碎细胞的蛋白进行 Western blot 分析,蛋白条带大小接近理论值 $14\text{ }700$ (图 2),证明蛋白成功表达。



M: $2\text{ }000\text{ bp}$ DNA marker; 1: 阳性对照; 2、3: 空载体 PCR 鉴定; 4~8: pPICZA/*hLYZ* 重组子 PCR 鉴定。

图 1 酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of yeast transformants by PCR



M: $14\text{ }400$ 蛋白标准品; 1: 野生型酵母 X-33 菌株胞内蛋白; 2: 转空载的酵母胞内蛋白; 3: 转 pPICZA/*hLYZ* 表达载体的酵母胞内蛋白。

图 2 重组酵母胞内蛋白的免疫印迹

Fig.2 Western blot of recombinant protein in yeast cell

2.2 实验室条件下溶菌酶的活性

BMGY/BMMY 培养基接种酵母重组菌株,甲醇诱导表达 48 h 后收集菌体,采用玻璃珠机械破碎法提取胞内蛋白,随后采用比浊法测得溶菌酶活力为 $1\text{ }920\text{ U}$ 。

2.3 培养基

BMGY/BMMY 培养基成本较高,不适合大规模工业化生产。麦芽汁和蚕蛹浸提物分别富含酵母生长所需的碳源和氮源,营养丰富且价格低廉,而且酵母营养盐可提供酵母生长所必需的微量元素,因此选定麦芽汁-蚕蛹粉基础生长培养基和麦芽汁高温浸提液培养基来培养酵母细胞。由图 3、图 4 可知,蚕蛹浸提物占比 40% 和酵母营养盐含量为 $170\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时菌体生长状况最好。

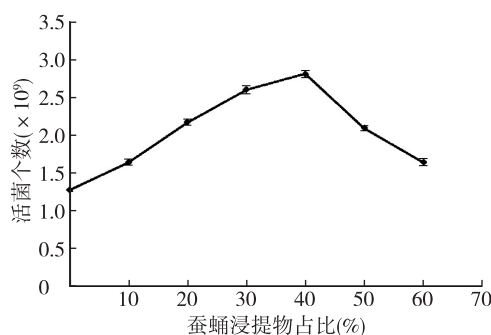


图 3 蚕蛹浸提物占比对活菌数的影响

Fig.3 The influence of the percentage of silkworm chrysalis in culture medium on the number of live yeast

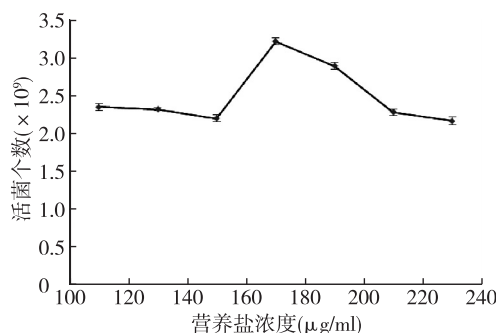


图 4 酵母营养盐浓度对活菌数的影响

Fig.4 The influence of nutritive salt concentration on the number of live yeast

2.4 发酵条件

分别以接种量、诱导阶段甲醇添加量和生长期 pH 为影响因子进行单因素试验,结果表明随着接种量的增加,酵母活菌个数先增加后减少,当接种量为 3% 时酵母活菌数最多(图 5)。酵母活菌个数随着诱导时期甲醇添加量的增加而减少,甲醇添加量为 1% 时酵母活菌数最多(图 6)。随着生长阶段 pH 的增加,酵母活菌数先增加后减少(图 7),当 pH 为 6 时酵母活菌数最多。

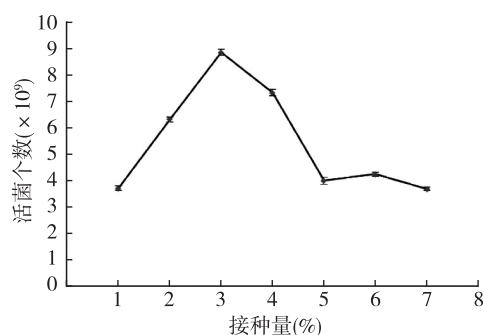


图5 接种量对活菌数的影响

Fig.5 The influence of inoculation size on the number of live yeast

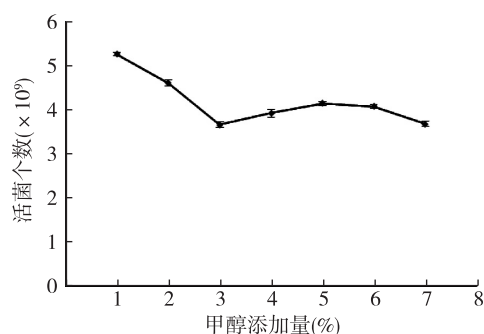


图6 诱导阶段甲醇添加量对活菌数的影响

Fig.6 The influence of methanol concentration on the number of live yeast

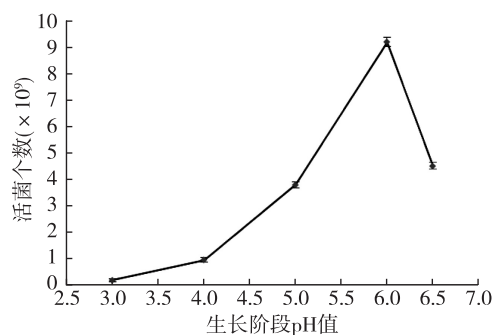


图7 生长阶段 pH 值对活菌数的影响

Fig.7 The influence of pH of cell growth on the number of live yeast

在单因素试验的基础上,以接种量、甲醇添加量、生长时期的 pH 为参试因子,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验。结果(表 2)表明,各因素的最优组合为 $A_2B_1C_2$,即接种量为 3%、甲醇添加量为 1%、生长阶段 pH 值为 6。 R 值的大小顺序是 $C>B>A$,即生长阶段 pH 对酵母活菌数影响最大,其次是甲醇添加量,最后是

接种量。以 $A_2B_1C_2$ 为组合,其他培养条件不变,经 5 次验证试验,测得平均活菌数为 $1 \text{ ml } (8.35 \pm 0.14) \times 10^9$ 个。

表 2 正交试验结果

Table 2 The orthogonal test results

编号	A-接种量 (%)	B-甲醇量 (%)	C-生长阶段 pH 值	活菌数 ($\times 10^9$)
1	2.00	1.00	5.00	3.52
2	2.00	2.00	6.00	7.08
3	2.00	3.00	6.50	4.74
4	3.00	1.00	6.00	8.12
5	3.00	2.00	6.50	4.38
6	3.00	3.00	5.00	3.69
7	4.00	1.00	6.50	5.82
8	4.00	2.00	5.00	3.83
9	4.00	3.00	6.00	4.35
K1	15.34	17.46	11.04	
K2	16.19	15.29	19.55	
K3	14.00	12.78	14.94	
R(极差)	0.73	1.56	2.84	
最优水平	A_2	B_1	C_2	

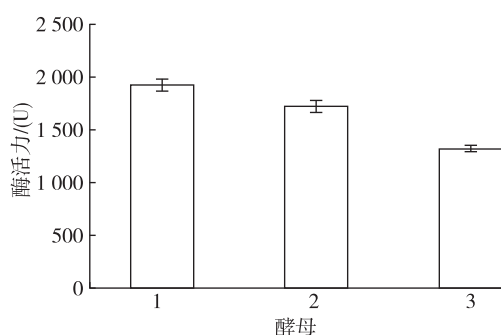
$K1$ 是指当 A、B、C 因素均取 1 水平时的活菌数。 $K2$ 是指当 A、B、C 因素均取 2 水平时的活菌数。 $K3$ 是指当 A、B、C 因素均取 3 水平时的活菌数。

2.5 酵母冻干粉及酶活力

以麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基和麦芽汁高温浸提液培养基培养酵母工程菌,甲醇诱导表达 48 h 后,收集酵母菌体,提取胞内蛋白测定溶菌酶活力为 1 720 U,将酵母菌体置于真空条件下, -55°C 冷冻干燥,制成干粉产品,测得溶菌酶活力为 1 320 U(图 8),其酶活力是冷冻干燥前的 76.8%,1 ml 活菌数达到 1×10^9 个,此干粉可作为动物饲料添加剂使用,为动物提供高活性、高蛋白的酵母饲料。

3 讨论

关于人溶菌酶外源表达研究的报道很多,如胡乔等将人溶菌酶基因构建到毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZ α A 上,成功表达的人溶菌酶活性达到 1 ml 4 473 U^[17]。巴斯德毕赤酵母广泛用于外源蛋白的分泌表达^[18-20],而关于毕赤酵母胞内表达的研究较少。本试验将人溶菌酶基因构建到胞内表达载体



1:BMGY/BMMY 培养基培养的酵母;2:麦芽汁-蚕蛹浸提物培养基/麦芽汁高温浸提液培养基培养的酵母;3:麦芽汁-蚕蛹浸提物培养基/麦芽汁高温浸提液培养基培养的酵母干粉。

图8 酵母冻干粉的溶菌酶活力

Fig.8 The lysozyme activity of dry yeast powder

pPICZA 上,经验证后将重组载体电转化至 X-33 毕赤酵母中进行甲醇诱导表达,经 Western blot 法鉴定蛋白已经成功表达,人溶菌酶活力达到 1 920 U,与毕赤酵母分泌型表达相比,胞内表达测得的溶菌酶活性较低,这可能是由于胞内蛋白成分复杂并且提取工艺繁琐,造成蛋白活性损失。

实验室以 BMGY/BMMY 培养基进行毕赤酵母的诱导表达,其成本较高不利于大规模生产。毕荣宇等^[20]以毕赤酵母为出发菌株,利用豆粕和玉米粉作为氮源和碳源生产单细胞蛋白。本试验以麦芽汁和蚕蛹浸提物为碳源和氮源,通过单因素试验证明蚕蛹浸提物占麦芽汁-蚕蛹基础生长培养基的 40%,酵母营养盐含量为 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时酵母生长最好,接种量为 3%、甲醇添加量为 1%并且生长阶段 pH 值为 6 是最优生长条件。新型麦芽汁-蚕蛹基础培养基/麦芽汁高温浸提液培养基的原料简单,成本较低,适用于工业化生产。其培养产生的溶菌酶酶活力达 1 720 U。利用真空冷冻干燥技术,制得有生物活性的酵母干粉,溶菌酶酶活力为 1 320 U,活菌数为 $1\text{ ml } 1 \times 10^9$ 个。将其作为动物饲料添加剂使用,可避免直接使用溶菌酶制剂带来的高成本、活性不稳定等问题。本研究利用毕赤酵母胞内表达系统成功构建了胞内表达人溶菌酶的酵母工程菌,并明确了最优的培养条件,为新型饲料添加剂的开发和利用奠定了基础。

参考文献:

[1] 李 鹤,马 力,王维香.溶菌酶的研究现状[J].食品研究与开

发,2008,29(1):182-185.

- [2] YU X, ZHAI C, ZHONG X, et al. High-level expression and characterization of carboxypeptidase Y from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* GS115[J]. *Biotechnol Letter*, 2015, 37:161-167.
- [3] TATSUMI H, OGAWA Y, MURAKAMI S, et al. A full length cDNA clone for the alkaline protease from *Aspergillus oryzae*: Structural analysis and expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Gen Genet*, 1989, 219:33-38.
- [4] 白 刃,杨百学,常 洋,等.溶菌酶及其应用[J].*畜禽业*, 2009(244):46-47.
- [5] OGAWA Y, TATSUMI H, MURAKAMI S, et al. Secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in an osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Agr Biol Chem*, 1990, 54(10):2521-2529.
- [6] GUO J P, MA Y. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2008, 58:301-308.
- [7] IKEMURA H, TAKAGI H, INOUE M. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(16):7859-7864.
- [8] 王佃亮.重组人溶菌酶研究进展[J].*中国生物工程杂志*, 2003, 23(9):59-62.
- [9] 闵兆升,郭会明,颜 旭,等.巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)高密度发酵研究进展[J].*生物技术通报*, 2014, 6(3):42-49.
- [10] 贾向志,袁汉英,马文煜.人溶菌酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J].*第四军医大学学报*, 2001, 22(22):2068-2072.
- [11] 贾向志,李 元,马文煜.溶菌酶的研究进展[J].*生物技术通讯*, 2014, 30(6):1396-1401.
- [12] 王红日,陈雪燕,程敦公,等.酵母电击转化效率影响因素研究[J].*山东农业科学*, 2014, 46(1):29-31.
- [13] 周淑芹.酵母培养物对肉仔鸡的作用[D].哈尔滨:东北农业大学,2003.
- [14] 孙红梅,曹连宾,郝力壮,等.酵母培养物对牦牛瘤胃发酵及甲烷产量的影响[J].*江苏农业科学*, 2015, 43(3):177-182.
- [15] 陈训银,董爱华,徐春洪.酵母源生物饲料研究与应用概况[J].*广东饲料*, 2012, 1(21):90-93.
- [16] 朱宏娟,田科雄,李 玲,等.酵母在饲料工业中的新应用[J].*饲料工业*, 2005, 26(12):4-6.
- [17] 陈 艳,江明锋,叶煜辉,等.溶菌酶的研究进展[J].*生物学杂志*, 2009, 26(2):64-66.
- [18] 胡 乔,赵 凌,唐克轩.在毕赤酵母中表达人溶菌酶蛋白的研究[J].*上海交通大学学报*, 2008, 26(3):233-241.
- [19] 马孟根,王红宁.毕赤巴斯德酵母表达外源蛋白研究进展[J].*四川农业大学学报*, 2001, 19(3):277-280.
- [20] 毕荣宇,牟德华.利用毕赤酵母生产单细胞蛋白的玉米粉-豆粕培养基优化[J].*中国饲料*, 2013, 15:6-9.

(责任编辑:王 妮)