

超耐热酸性 α -淀粉酶基因的克隆及其在酵母细胞中的表达 Molecular Cloning and Expression of Extremely Thermostable and Acid-stable Amylase Gene in *Pichia pastoris*

郭建强¹ 李运敏² 岳丽丽² 邱阳生¹ 矫庆华^{1*}

GUO Jian-Qiang¹, LI Yun-Min², YUE Li-Li², QIU Yang-Sheng¹ and JIAO Qing-Hua^{1*}

1 中国科学院微生物研究所 北京 100080

2 VA Medical Center 111C5, Department of Medicine University of California at San Francisco 4150 Clement Street, San Francisco, CA 94121 USA

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2 VA Medical Center 111C5, Department of Medicine University of California at San Francisco 4150 Clement Street, San Francisco, CA 94121, USA

摘 要 用 PCR 方法扩增来源于极端嗜热厌氧古菌 *Pyrococcus furiosus* 中的超耐热酸性 α -淀粉酶的结构基因 将该结构基因引入载体 pPIC9K 中 将重组质粒 pPIC9K-Amy 转化大肠杆菌 DH5 α 细胞 测序结果表明 克隆到的 α -淀粉酶结构基因为 1305bp 其编码的成熟肽为 435 个氨基酸。将正确构建的重组质粒转化毕赤酵母 GS115 细胞 得到酵母工程菌株。在酵母 α -Factor 及 AOX1 基因启动子和终止信号的调控下 超耐热酸性 α -淀粉酶在甲醇酵母中大量表达并分泌到胞外 该酶的表达受甲醇的严格调控和诱导 随着诱导培养时间的增加 在培养基上清液中的单位体积酶活力相应上升 在诱导培养 7d 后酶活力达到最大值。该酶最适反应温度为 90 ~ 100 $^{\circ}$ C 最适反应 pH 值为 4.5 ~ 5.5。该酶具有非常好的温度稳定性 在 100 $^{\circ}$ C 条件下热处理 5h 仍具有 60% 以上的酶活力。该酶的这些优点使其非常适于在工业生产上应用。

关键词 超耐热酸性 α -淀粉酶 激烈热球菌 *Pyrococcus furiosus* pPIC9K 质粒 毕赤酵母 GS115

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0237-06

Abstract The gene encoding a extremely thermostable and acid-stable α -Amylase was amplified by PCR using hyperthermophilic archaeobacterium *pyrococcus furiosus* genomic DNA as template. Then the gene was cloned into the vector of pPIC9K. The recombinant vector pPIC9K-amy was then transformed into *E. coli* DH5 α strain. Sequencing test showed that the α -amylase gene cloned consisted of 1305 base pairs and the mature protein encoded by the gene consisted of 435 amino acids. The recombinant vector was transformed into chromosome of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS115 strain. Regulated by the α -Factor, promoter of AOX1 gene and termination signal of yeast genomic, the recombinant α -Amylase was expressed and excreted out of the cells. The expression of the recombinant α -amylase was strictly induced by methanol. As induction time increased, the activity of amylase per milliliter medium went up accordingly. After 7 days induction, the activity of the amylase reached the max. The recombinant α -amylase exhibited maximal activity at 90 ~ 100 $^{\circ}$ C and at pH ranging from 4.5 to 5.0. The enzyme is so thermostable that after disposed at 100 $^{\circ}$ C for 5 hours over 60% of activity was retained.

Key words extremely thermostable and acid-stable α -amylase, *Pyrococcus furiosus*, pPIC9K vector, *Pichia pastoris* GS115

Received: September 19, 2005; Accepted: December 12, 2005.

This work was supported by Grant from the State Key Technologies R&D Programme of China (No. 2001BA708B03-03).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62628482; E-mail: jqh5678@yahoo.com.cn

国家“十五”重点科技攻关项目(No. 2001BA708B03-03)资助。

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

α -淀粉酶,系统名称为 α -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶(α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase EC.3.2.1.1),广泛应用于食品、酿造、制药、纺织、石油开采等诸多方面,在工业生产中占有极其重要的地位,是目前用途最广的一种酶制剂^[1]。

Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*(激烈热球菌)是一种生活在海底温泉附近的极端嗜热厌氧古菌,其最适生长温度达到 100℃^[2]。来源于 *Pyrococcus furiosus* 的 α -淀粉酶不同于中温或普通高温 α -淀粉酶,由于其具有的耐热及耐酸的性质^[3,4]以及其活力不需 Ca^{2+} 的保护^[5]等特点受到了人们的关注,1997年丹麦 Steen 等首先报道了该基因的序列并将该基因分别在大肠杆菌和枯草杆菌中表达,该基因含有编码 25 个氨基酸的信号肽序列,成熟肽共 435 个氨基酸^[6]。同年,美国 Dong G Q 等也报道了该基因的序列并将其推测的氨基酸序列与其它淀粉酶氨基酸序列进行了比较^[7]。在国内,沈微等将该基因在大肠杆菌中实现了分泌表达^[8]。

超耐热酸性 α -淀粉酶在我国具有非常广泛的应用前景。我国是一个发酵大国,以粮食为原料的发酵行业如酒精发酵、氨基酸发酵、抗生素发酵、淀粉糖生产、有机酸发酵、维生素发酵等生产厂很多。用中温 α -淀粉酶和普通高温 α -淀粉酶进行生产,首先将湿淀粉浆由 pH 4.0 ~ 4.5 调整到 pH 6.0 进行液化,进行下步的糖化还需将 pH 调回到 4.5 ~ 4.0,反复调节 pH 不仅会增加生产成本,而且调节不当会产生大量的副产物。基因工程菌所产生的超耐热酸性 α -淀粉酶克服了如上弊病,使产品产量和质量大大提高。该酶的耐酸及耐热性质使其可以在 pH 4.5 ~ 5.5、105 ~ 120℃ 的高温喷射条件下将淀粉液化,这使得该酶可以在以淀粉为原料的发酵工业中发挥巨大作用。它的应用可以降低生产成本、提高转化率、简化工艺、减少环境污染。

目前,有关 *P. furiosus α -淀粉酶基因在酵母细胞中的表达尚未见报道。本实验从 *P. furiosus* 中将编码超耐热酸性 α -淀粉酶的基因克隆并实现了将其在常温、好氧的毕赤酵母细胞中的高效分泌表达。*

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:供体菌 *Archaeobacterium Pyrococcus furiosus* (DSM3638) λ pPIC9K 质粒、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。受体菌 *Pichia pastoris* GS115 细胞由姚斌博士赠送。

1.1.2 培养基:大肠杆菌的培养和转化使用 LB 培养基。酵母的培养、转化、筛选和诱导表达使用 YPD、RDB、MD、MM、BMGY 及 BMMY 等培养基^[9]。

1.1.3 试剂:*EcoR* I、*Bgl* II 为 Promega 公司产品;*Bam*H I、CIAP、T₄ DNA ligase 为 TaKaRa 公司产品;Salmon sperm DNA 为 Sigma 公司产品;DNA 快速纯化/回收试剂盒、DNA Marker(λ DNA/*EcoR*I + *Hin*dIII)为鼎国公司产品;PCR 反应引物由上海 Sangon 公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 *P. furiosus* 基因组的提取:离心收集菌体,用 Tris·HCl(pH8.0)重悬。加入溶菌酶及 EDTA,室温放置 1h,加入 STE 溶液稀释。加入 SDS 和蛋白酶 K 37℃ 反应 1h。酚、氯仿抽提后用乙醇沉淀,溶于含 RNase 的无菌水中。

1.2.2 PCR 引物合成和基因扩增:以 *P. furiosus* 的基因组为模板,根据报道的 *P. furiosus α -淀粉酶基因的结构基因部分^[6,10]设计合成引物:*

5'GCGAATTCATGGCAAATACTTGAGCTTGAAG
3'CGGAATTCCTCATTACCCAACACCAC

扩增 *P. furiosus α -淀粉酶基因不含信号肽的结构基因。*

PCR 扩增条件:94℃ 60s,55℃ 60s,72℃ 60s,30 个循环。

1.2.3 重组质粒 pPIC9K-Amy 的构建及转化大肠杆菌 选用 *EcoR* I 酶切 pPIC9K 质粒,并去磷酸化,同时用 *EcoR* I 酶切目的基因 PCR 扩增产物。将二者用 T4 DNA 连接酶连接。用氯化钙转化法将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过氨苄青霉素抗性筛选转化子。提取质粒,用 PCR、*EcoR* I 酶切鉴定是否有外源基因的插入。在该基因内部的下流及质粒上多克隆位点的上游都有 *Bam*H I 酶切位点,所以可用 *Bam*H I 酶切鉴定外源基因的插入方向是否正确。又根据质粒多克隆位点上游序列合成了 5'测序引物:ACTACTATTGCCAGCATTGCT,用该引物及扩增基因时的 3'引物用于测序。

1.2.4 感受态酵母细胞制备方法:挑取 *Pichia pastoris* GS115(His⁻Mut⁺)单菌落接入 5mL YPD 液体培养基中,于 30℃、200r/min 培养 18 ~ 19h。将 5mL YPD 培养液接入 50mL YPD 液体培养基中,于 30℃、200r/min 培养 2.5h。将菌液 1000r/min 离心 5min,弃上清。加入 50mL 预冷的去离子水,振荡,洗涤,1000r/min 离心 5min,弃上清。将沉淀重悬于 5mL 0.1mol/L LiAc 中,6000 ~ 7000r/min 离心数秒。用 500 μ L 0.1mol/L LiAc 重悬菌体。

1.2.5 LiAc 法转化酵母细胞 :用 *Bgl* II 酶切重组质粒 pPIC9K-Amy ,使之线性化。将线性化的 100ng 重组质粒 DNA 加入 10 μ L 经 100 $^{\circ}$ C 变性的鲑鱼精 DNA ,混匀。加入 100 μ L 感受态酵母 ,剧烈振荡 5s。加入 530 μ L PEG、60 μ L 1.0mol/L LiAc 剧烈振荡 5s。30 $^{\circ}$ C , 200r/min 温育 30min。加入 70 μ L DMSO 颠倒温和混匀 42 $^{\circ}$ C 水浴 15min。室温 ,12000r/min 离心 10s,吸尽上清。用 500 μ L 无菌水重悬细胞 ,涂 RDB 平板 , 30 $^{\circ}$ C 培养。

将用重组质粒转化的转化子定义为 Yeast/pPIC9K-Amy ,同时用不含外源基因的 pPIC9K 质粒的转化反应做对照 ,将其转化子定义为 Yeast/pPIC9K (对照转化子)。

1.2.6 转化子鉴定方法 :因为受体菌酵母 GS115 为组氨酸缺陷型 (His^{-}) ,不能在不含组氨酸的 RDB 基本培养基上生长。而转化子的基因组上由于整合上了 *His4* 基因所以可以在 RDB 培养基上生长 (His^{+}) 。另外 ,由于重组的酵母中 *AOX1* 基因受到破坏 ,所以在以甲醇作为唯一碳源的培养基上转化子就不会生长或生长极其缓慢 ,表现为甲醇利用缺陷型 (Mut^{-}) 。

从转化平板 RDB 上挑取 His^{+} 重组子 ,将其分别接种到 MM 和 MD 固体培养基 ,将能在 MD 培养基上正常生长 ,而在 MM 培养基上不能生长或生长极其缓慢的转化子定义为阳性转化子^[11,12]。

1.2.7 酵母细胞基因组的提取 :培养至静止期的菌体细胞离心后用破菌缓冲液重悬。加玻璃珠 ,酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) ,高速振荡。加 TE 缓冲液 ,快速振荡 ,高速离心 ,收集水相 ,加无水乙醇沉淀 DNA。离心 ,沉淀用含 RNase 的 TE 缓冲液重悬 , 37 $^{\circ}$ C 温育。加入浓度为 4mol/L 的乙酸铵及无水乙醇 ,高速离心 ,DNA 沉淀干燥后用 TE 缓冲液重悬。

1.2.8 外源基因的诱导表达 :重组质粒与酵母细胞发生同源重组后可将外源基因整合到酵母染色体 *AOX1* 基因位点上去 ,该外源基因的表达受甲醇的严格调控和诱导。选取重组毕赤酵母中的 8 号阳性转化子 ,经 5mL BMGY 培养基 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h ,离心取菌体 ,换 5mL BMMY 培养基 ,继续 30 $^{\circ}$ C 培养 ,并每 24h 补加甲醇连续诱导 48 h^[13]。

1.2.9 α -淀粉酶活力测定方法 :测定方法参见欧洲专利^[10]。将适当稀释后的 50 μ L 粗酶液加入 200 μ L 含 0.5% 可溶性淀粉的 50mmol/L 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液 ,特定反应条件下 (温度、pH) 温育 15min。冰上放置停止反应 ,加入 500 μ L 0.01mol/L 的碘液

(含 1% 的碘化钾) 。取出 200 μ L ,加入 1.8mL 水 ,测 OD_{600} 。在 1min 内使吸光值降低 1% 的酶量定义为一个酶活力单位。

1.2.10 培养基上清液中总蛋白浓缩方法 :加入含 0.4% 脱氧胆酸钠的三氯乙酸溶液于培养基上清液 ,至三氯乙酸的终浓度为 20% (W/W) ,震荡混合 ,冰上孵育 20 ~ 30min。离心 15min ,去上清。加 3 倍体积的丙酮 ,静置约 10min。离心 15min ,去上清 ,沉淀物置冰上干燥 10min。用含 2-巯基乙醇的样品缓冲液 (1 \times) 溶解沉淀物。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增

电泳检测 (图略) 通过 PCR 反应得到了 1300bp 左右的 DNA 片段 ,与 Steen 报道的 *Pyrococcus furiosus* α -淀粉酶结构基因大小一致^[6]。

2.2 重组质粒 pPIC9K-Amy 的酶切鉴定

Eco RI 酶切重组质粒 pPIC9K-Amy 得到 1.3kb 左右的片段 ,证明有外源基因的插入。*Bam* HI 酶切重组质粒 pPIC9K-Amy 得到 1.2kb 左右的片段 ,证明外源基因是按正确的方向插入的 (见图 1) 。

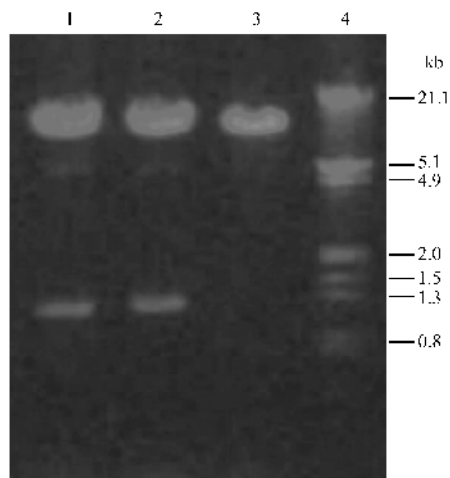


图 1 重组质粒 pPIC9K-Amy 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction pattern of recombinant vector pPIC9K-Amy 1 :pPIC9K-Amy digested with *Bam* HI ; 2 :pPIC9K-Amy digested with *Eco* RI ; 3 :pPIC9K digested with *Eco* RI ; 4 :DNA marker/ *Eco* RI + *Hin* dIII .

2.3 重组酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定

分别提取了以重组质粒 pPIC9K-Amy 转化酵母得到的阳性转化子 (Yeast/pPIC9K-Amy) 的基因组、以空质粒 pPIC9K 转化酵母得到的对照转化子 (Yeast/pPIC9K) 的基因组、宿主菌毕赤酵母 GS115 (Yeast/GS115) 的基因组。分别以这三个基因组为模板 ,用

扩增该基因时使用的 5' 及 3' 引物进行 PCR 鉴定。结果以阳性转化子(Yeast/pPIC9K-Amy)基因组为模板的反应有 1.3kb 左右的扩增产物出现,而以对照转化子(Yeast/pPIC9k)基因组和酵母 GS115 基因组为模板的反应均无扩增产物出现,可以证明酵母阳性转化子(Yeast/pPIC9K-Amy)基因组中已整合了 α -淀粉酶基因(见图 2)。

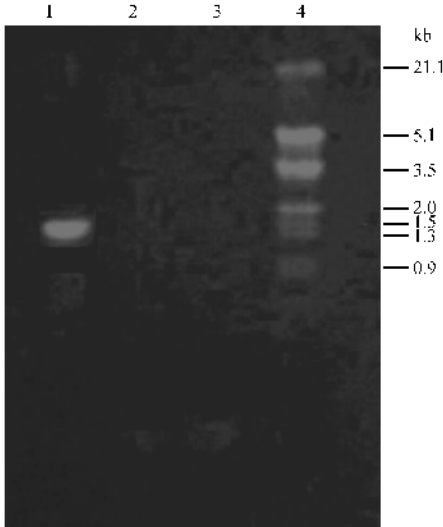


图 2 重组酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR assay of recombinant Yeast genomic DNA

- 1 :Positive transformant (template : Yeast/pPIC9K-Amy genomic DNA);
- 2 :Negative transformant (template : Yeast/ppic9k genomic DNA);
- 3 :Template : Yeast GS115 genomic DNA ; 4 :DNA marker/ Eco R I + Hin d III .

2.4 重组质粒的序列测定

提取构建好的重组质粒,送上海 Sangon 公司测序部。测序结果证明所插入的外源基因序列与文献报道^[6,10]完全一致。

2.5 重组酵母细胞所产 α -淀粉酶 SDS-PAGE 分析

将重组酵母 8 号阳性转化子(Yeast/pPIC9K-Amy)和对照转化子(Yeast/pPIC9K)诱导培养 6d,收集上清液。因为是可溶分泌表达,上清中的蛋白浓度较低,将上清进行浓缩处理。将 400 μ L 的蛋白上清用脱氧胆酸钠沉淀后溶于 40 μ L 1 \times 蛋白上样缓冲液后用于 SDS-PAGE 分析。结果如图 3 8 号阳性转化子(Yeast/pPIC9K-Amy)经诱导培养后,上清中有一条约 60kD 大小的蛋白表达(箭头所示),而对照转化子(Yeast/pPIC9K)经诱导培养后,上清中没有此蛋白的表达。该蛋白由于受到糖基化的修饰,所以其电泳表观分子量略大于 Steen 报道的理论分子量^[6]。

2.6 重组酵母细胞所产 α -淀粉酶活性的测定

不同甲醇浓度诱导的实验结果表明,1.0% ~

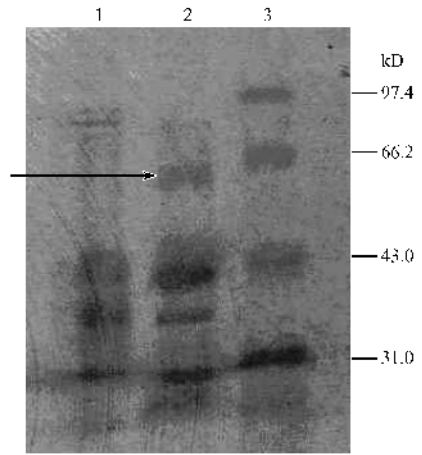


图 3 浓缩后培养基上清中总蛋白 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the concentrated culture supernatant

- 1 :Induced culture supernatant of Yeast/pPIC9K ; 2 :Induced culture supernatant of Yeast/pPIC9K-amy ; 3 :Molecular weight standard.

2.0% 的甲醇浓度是诱导表达的较理想浓度(见图 4)。在 1% 甲醇诱导培养条件下,诱导 6h 后便在培养基上清液中检测到 α -淀粉酶活力,粗酶液水解淀粉的最适反应温度为 95 $^{\circ}$ C(见图 5),反应的最适 pH 为 4.5 ~ 5.0(见图 6),该性质与 Koch. R 报道的 *P. furiosus* 产生的 α -淀粉酶最适作用温度为 100 $^{\circ}$ C,最适作用 pH 为 5.0 的结论基本相符^[3],Steen 等将该基因在原核细胞中表达,其最适作用温度为 100 $^{\circ}$ C,最适作用 pH 为 4.5^[6],也与本实验结论基本一致。每 24h 补加 1% 甲醇连续诱导培养,在诱导培养的前 84h 内,单位发酵液中的酶活力随时间的增加基本上呈线性关系,在诱导培养 7d 后,单位发酵液中的酶活力达到最大值(见图 7)。

2.7 重组酵母细胞所产 α -淀粉酶的温度稳定性

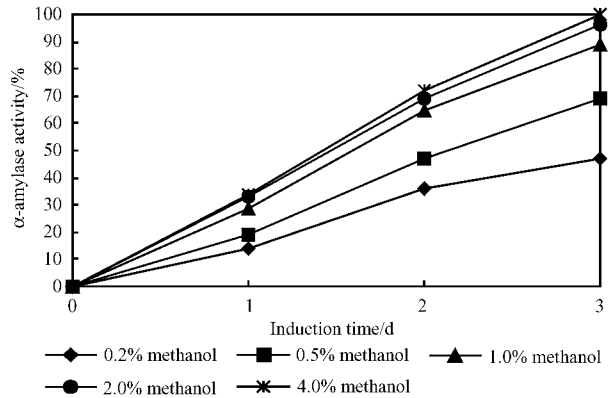
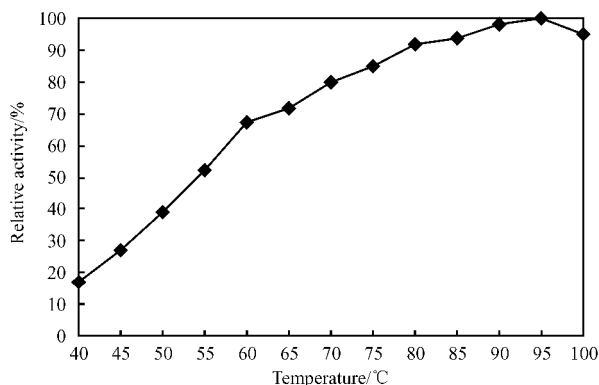
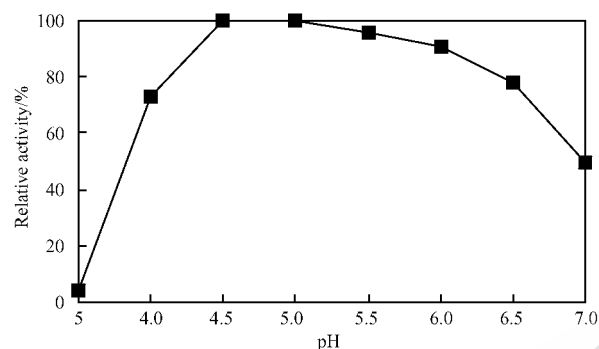
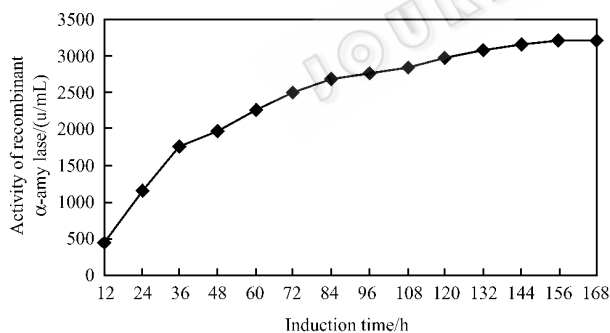


图 4 不同浓度甲醇诱导与单位体积上清液中的相对酶活力之间的关系

Fig.4 Effect of concentration of methanol on

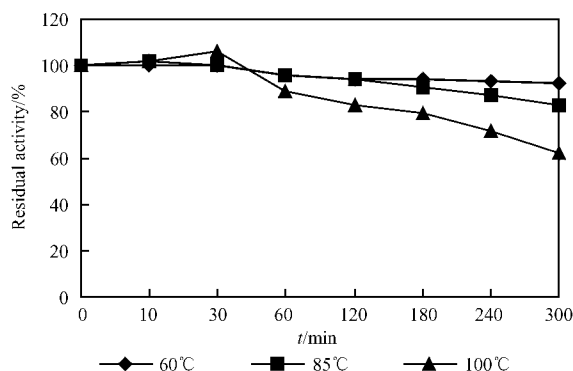
α -amylase yield(induced for 3 days)

图5 重组 α -淀粉酶相对酶活力与温度之间的关系Fig. 5 Effect of temperature on the activity of recombinant α -amylase图6 重组 α -淀粉酶相对酶活力与 pH 之间的关系Fig. 6 Effect of pH on the activity of recombinant α -amylase图7 诱导时间与单位体积上清液产生的 α -淀粉酶活力之间的关系Fig. 7 Effect of induction time on α -amylase yield

酵母工程菌株表达产生的超耐热酸性 α -淀粉酶具有良好的温度稳定性。粗酶液分别经 60℃、80℃、100℃热处理 5h 后,仍具有较高的剩余酶活力(见图 8)。粗酶液在 18℃贮存 30d 仍具有 85% 以上的剩余酶活力,在 4℃贮存 120d,仍具有 80% 以上的剩余酶活力。

3 讨论

来源于 *P. furiosus* 的 α -淀粉酶由于其具有的耐

图8 不同温度条件下重组 α -淀粉酶的剩余活力与时间的关系Fig. 8 Thermal stability of the recombinant α -amylase at various temperature

热及耐酸性质近来受到关注。但由于 *P. furiosus* 属于极端嗜热厌氧古菌,其最适生长温度达到 100℃,极难在工业生产上应用,因此将该基因克隆并构建能够用于工业生产的工程菌株具有重要意义。目前的研究基本限于将其在原核细胞中进行表达,并且大多无法实现有效的分泌表达。本文首次实现了将该基因在毕赤酵母细胞中表达,构建了可以在常温、好氧条件下大规模培养的工程菌株。毕赤酵母表达系统可以通过优化培养条件,改善发酵工艺来提高外源蛋白的表达量。该工程菌株表达产生的 α -淀粉酶可溶,并且可以有效分泌到胞外,这样就避免了在纯化过程中进行细胞破碎、包涵体变复性的步骤,为蛋白纯化提供了便利。

图 8 可见重组 α -淀粉酶具有良好的热稳定性,耐酸性远优于目前常用的来源于嗜热脂肪芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的耐热 α -淀粉酶,而且在毕赤酵母中表达的重组蛋白,在微酸性环境更加稳定,可能与酵母对蛋白的糖基化有关,某些糖基化位点发生糖基化。酶学性质与文献^[6-8]报道的相同,文献中均为原核表达,而本研究为真核表达,有较大的不同点。目前工业上常用双酶法水解淀粉制糖,自然 pH 为 4.0~5.0 的淀粉浆需经液化和糖化两个过程处理。来源于地衣芽孢杆菌的耐热 α -淀粉酶最适 pH 为 5.5~7.0,而来源于黑曲霉的糖化酶最适 pH 为 4.5~5.0,因此淀粉浆需先加碱调整 pH 进行液化,液化液还需再加酸调整 pH 才能用于糖化。如果在生产工艺中使用 *P. furiosus* 的 α -淀粉酶则可省去两步酸、碱调节的步骤。另外,由于 *P. furiosus* 的 α -淀粉酶其热稳定性和活力均不需 Ca^{2+} 的保护,所以在液化的过程中无需添加 Ca^{2+} ,也不用在下游的工艺

中去除 Ca^{2+} , 可以简化生产工序, 降低生产成本。该酶的耐热、耐酸及其活性不需 Ca^{2+} 保护的 特性, 可以使其在工业生产上发挥重要的作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kong XI(孔显良), Wang JY(王俊英). Research and Apply of α -amylase. *Microbiology*(微生物学通报), 1989, **16**(5): 282 - 287
- [2] Gerhard F, Karl OS. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch Microbiol*, 1986, **145**: 56 - 61
- [3] Koch R, Zablowski P *et al.* Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*, *FEMS Microbiology Letters*, 1990, **71**: 21 - 26
- [4] Stephen HB, Henry RC, Robert MK. Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**(7): 1985 - 1991
- [5] Emmanuel Lévêque, Štefan Janecek *et al.* Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **26**: 3 - 14
- [6] Steen J, Constantin E. V, Garabed A. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(26): 16335 - 16342
- [7] Dong GQ, Clare V *et al.* Cloning, Sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(9): 3569 - 3576
- [8] Shen W(沈微), Wang ZX(王正祥) *et al.* Secretary expression of high thermophilic α -amylase gene of *Pyrococcus furiosus*. *China Brewing*(中国酿造), 2003(1): 12 - 14
- [9] Yao H(姚斌), Zhang CY(张春义) *et al.* High-level expression of bioactive phytase in *Pichia pastoris* yeast. *Science in China*(Series C)(中国科学 C 辑), 1998, **28**(3): 237 - 243
- [10] European Patent Application, Publication Number: 94306856.9: 1 - 27
- [11] Wan JQ(万建青), Wu WX(吴文学) *et al.* Expression of porcine interferon- γ gene in *Pichia pastoris* and its effect of inhibiting. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1998, **18**(6): 683 - 686
- [12] Li YH(李英华), Bai JJ(白俊杰) *et al.* Expression of Common Carp Growth Hormone in Yeast *P. pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2001, **17**(4): 488 - 491
- [13] Tian SI(田生礼), Liu I(刘丽) *et al.* Secretion Expression and Activity Assay of Thrombopoietin in *Pichia pastoris*, *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 1998, **14**(4): 358 - 364