

牛凝乳酶基因在毕赤酵母中的重组表达

张莉, 姜媛媛, 张健, 杨贞耐

中国农业科技东北创新中心农产品加工研究中心, 长春 130033

摘要: 通过 PCR 技术从克隆载体 pMD18T-Prochy 上扩增牛凝乳酶原基因, 双酶切后定向插入到酵母表达载体 pPICZaA 中, 构建表达质粒 pPICZaA-Prochy, 线性化后电转化毕赤酵母 GS115, 经 PCR 和测序鉴定凝乳酶原基因成功插入到毕赤酵母的基因组中。在甲醇诱导下进行凝乳酶的表达, SDS-PAGE 分析证明重组凝乳酶的分子量约为 37 kD, 培养基上清液中凝乳酶的活性为 12.2 SU/mL。本研究首次应用毕赤酵母表达牛凝乳酶, 在培养基中获得分泌表达的重组凝乳酶, 为干酪工业提供了新型及优良的凝乳酶来源。

关键词: 牛凝乳酶, 分泌表达, 毕赤酵母

Recombinant expression of bovine chymosin in *Pichia pastoris*

Li Zhang, Yuanyuan Jiang, Jian Zhang, and Zhennai Yang

Center of Agro-food Technology, Northeast Agricultural Research Center of China, Changchun 130033, China

Abstract: To express bovine chymosin in yeast, we amplified the prochymosin gene from the plasmid pMD18T-Prochy by PCR, and then cloned the gene into the expression vector pPICZaA, resulting in pPICZaA-Prochy. *Pichia pastoris* GS115 was used as host cells. Integration of the prochymosin cDNA into the *Pichia pastoris* genome was confirmed by PCR and sequencing analysis. Chymosin was expressed in *Pichia pastoris* successfully, and a strong band at about 37 kD was shown by SDS-PAGE. Activity tests showed that the chymosin activity of the culture supernatant was 12.2 SU/mL. This is the first report of successful expression of chymosin in *Pichia pastoris*. The recombinant *Pichia pastoris* strain obtained in this study could be further used to produce recombinant chymosin for cheese making.

Keywords: bovine chymosin, secretory expression, *Pichia pastoris*

凝乳酶是从未断奶的小牛皱胃中提取的一种天冬氨酸蛋白酶, 它可以切断牛乳中的 κ -酪蛋白使乳凝固。在小牛皱胃中, 凝乳酶通常合成为一个含有 381 个氨基酸的前体聚肽——凝乳酶原前体, 凝乳酶原前体在分泌过程中去掉 16 个信号肽形成含有 365 个氨基酸的凝乳酶原。凝乳酶原无活性, 它在酸

性 pH 下通过多步的自动催化过程, 去掉 N 末端 42 个氨基酸形成有活性的含有 323 个氨基酸的蛋白——凝乳酶^[1]。

凝乳酶主要的生物学功能是水解牛乳中 κ -酪蛋白的 Phe105-Met106 键, 导致牛乳凝结, 因此被广泛用于干酪制造业。传统的凝乳酶通过宰杀未断奶

Received: April 20, 2009; **Accepted:** June 18, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z306), Jilin Province Science and Technology Development Plan (Nos. 20060219, 20080228).

Corresponding author: Zhennai Yang. Tel: +86-431-87063148; Fax: +86-431-87063075; E-mail: zyang@cjaas.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA10Z306), 吉林省科技发展计划项目(Nos. 20060219, 20080228), 现代农业产业技术体系建设专项资金(农科教发[2007]14 号)资助。

小牛从皱胃中提取。目前世界年均约 5000 万头小牛被宰杀供提取凝乳酶,由于全球性的小牛短缺使其来源变得不稳定,这种传统而昂贵的制法已不能满足世界干酪需求量不断增长的需要。利用微生物生物工程生产凝乳酶可以获得高纯度的凝乳酶,生产成本低,来源稳定。目前美国有 70%、英国有 90%的干酪是用生物工程凝乳酶生产的。

Beppu 等^[2]在 1983 年首次报道利用 *Escherichia coli* 生产凝乳酶,凝乳酶原 cDNA 在 *E. coli* 中表达,导致无活性的酶以包涵体的形式在细胞内积累。通常,在 *E. coli lac* 启动子^[3-4]、*trp* 启动子^[2,5]、*tac* 启动子^[4]、 λP_R 启动子、*pho A* 启动子和 *T7* 启动子的控制下,凝乳酶以 Met-凝乳酶原或 N-末端融合蛋白的形式合成^[6]。

一些真核生物,包括酵母、真菌已经用于凝乳酶原和凝乳酶的生产。在 *Saccharomyces cerevisiae* 中,编码凝乳酶原前体、凝乳酶原和凝乳酶的基因在磷酸甘油酸激酶(*pgk*)、半乳糖苷酶(*gal 1* 和 *gal 10*)和磷酸丙糖异构酶(*tpi*)的控制下表达。这些蛋白质主要以不溶形式合成,积累在细胞中难以激活。应用酵母分泌信号,将转录单位整合到酵母基因组和宿主基因组的突变体中,凝乳酶原的分泌至少增加 80 倍,可被激活的凝乳酶原产量可达 20 mg/L^[7-9]。在 *Aspergillus nidulans* 中,凝乳酶在使用源自 *A. niger* 的葡糖淀粉酶(*gla A*)启动子作用下以活性细胞外酶形式合成,但凝乳酶产量较低^[10-11]。

国内对凝乳酶研究也较早,1988 年,谭思元等^[12]研究了凝乳酶原 mRNA 的分离及其 cDNA 的克隆,成功分离了凝乳酶原 mRNA,并通过拼接 *pCT 5* 及 *pCT 15* 获得完整的凝乳酶原基因。唐兵等^[13-16]研究了凝乳酶原分子折叠和酶复性,并通过进一步对大肠杆菌中表达调控的研究,有效地在大肠杆菌中表达了牛凝乳酶。最近冯镇等^[17]克隆了小牛凝乳酶,并在乳酸克鲁维酵母中进行了分泌表达。

毕赤酵母表达系统具有表达量高、能进行蛋白质翻译后修饰、容易大规模生产、生产成本低、外源蛋白基因遗传稳定性较好等特点,目前国内外已有数百种外源蛋白基因在毕赤酵母中表达。毕赤酵母表达系统具有很高的生物安全性,获得包括美国

FDA 在内的广泛认可。它能够对外源蛋白进行翻译后加工,使之更接近于天然蛋白的构象和活性,是一种广泛应用的真核表达系统。目前,在我国尚未见到利用毕赤氏酵母表达牛凝乳酶的报道。本研究通过基因工程的方法构建牛凝乳酶毕赤酵母表达系统,即从小牛皱胃中克隆得到牛凝乳酶基因,将牛凝乳酶基因与酵母表达载体连接,并将连接的载体转入毕赤酵母细胞中,从而表达重组牛凝乳酶。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

EasySelect Pichia Expression Kit, 吉林省农业科学院李启云博士提供;大肠杆菌 JM109、质粒 pMD18T-Prochy, 本实验室保存。

1.2 试剂与工程酶

Ex Taq 聚合酶, pMD18T 试剂盒, DNA Marker DL2000、DL15000, 购自大连宝生物工程公司;限制性内切酶 *Xho I*、*Xba I*、*Sac I*, DNA 回收试剂盒, T4 DNA 连接酶, 购自 MBI 公司; SDS、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED 等, 购自 BBI 公司;其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器与设备

PCR 扩增仪, Eppendorf Mastercycler gradient; 全自动凝胶成像系统, AlphaImager HP; 蛋白电泳系统, Bio-rad Mini-Protean; 电转仪, Bio-rad MicroPulser; 台式高速离心机, Eppendorf 5415D; 紫外可见分光光度计, Varian Cary 300; 高速冷冻离心机, Thermo Sorvall Evolution RC。

1.4 培养基

LLB、YPD、MDH、MMH、BMGY、BMMY 培养基的组成和配制参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.5 PCR 扩增目的基因

根据对酵母表达载体 pPICZaA 的限制性酶切位点分析,并参考本实验室已克隆的凝乳酶基因序列 (GenBank Accession No. FJ768675.1), 在基因上下游设计特异引物 ZaAProS 和 ZaAProAS, 序列见表 1, 由上海生工生物工程有限公司合成。

下划线部分分别是 *Xho I* 和 *Xba I* 酶切位点, 上游引物中 AAAAGA 为 pPICZa 系列载体 α 分泌因子的 KEX 2 切割位点。

表 1 本实验中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
ZaAProS	TGCTCGAGAAAAGAGCTGAGATCACCAAGG
ZaAProAS	TGCTCTAGAATGATGGCTTTGGCCAGCC
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

以质粒 pMD18T-Prochy 为模板, 通过 PCR 扩增得到牛凝乳酶原基因片段。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 32 次循环; 72 °C 延伸 10 min。产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 酵母表达载体的构建

回收 PCR 产物, 用 *Xho* I 和 *Xba* I 对回收的 PCR 产物和质粒 pPICZaA 分别进行双酶切。将分别回收载体和目的基因的双酶切产物用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 下连接, 构建表达载体 pPICZaA-Prochy, 将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 用 LLB 琼脂平板(含 Zeocin 25 µg/mL)筛选。选择阳性克隆, 提取质粒 DNA, 用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切验证后送上海生物工程技术有限公司测序。

1.7 电转化毕赤酵母 GS115

使用 *Sac* I 酶切重组质粒 pPICZaA-Prochy 使其线性化。65 °C 加热 20 min 使酶失活。制备毕赤酵母 GS115 感受态细胞。通过电脉冲法将线性化的质粒转化到毕赤酵母 GS115 中。酵母转化株经 YPD 液体培养后提取染色体 DNA, 用 PCR 方法验证目的基因与染色体整合的情况。在 MDH 和 MMH 平板筛选出 Mut⁺表型重组菌株。

1.8 重组酵母的诱导表达

将筛选得到的重组酵母 GS115/pPICZaA-Prochy Mut⁺接种于含 25 mL BMGY 培养基的三角瓶中, 30 °C、300 r/min 培养 16~18 h, 至 OD₆₀₀ 达到 2.0~6.0。室温下 3000×g 离心 5 min, 收集菌体, 用约 200 mL BMMY 重悬菌体, 使 OD₆₀₀ 为 1.0 左右。将菌液置于 1 L 的摇瓶中, 用双层纱布或粗棉布封口, 放置于 30 °C、300 r/min 的摇床上进行诱导表达。每 24 h 向培养基中添加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%, 每隔 24 h 取样检测菌液 OD₆₀₀ 及菌液上清凝乳酶活力, 实验重复 3 次。上清液加入饱和 (NH₄)₂SO₄ 至终

浓度为 60%, 4 °C 放置过夜。12 000 × g 离心 10 min, 收集上清蛋白, 真空冷冻干燥后进行 SDS-PAGE(12%)分析。

1.9 重组凝乳酶蛋白活性检测

将重组酵母培养液以 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液直接用于凝乳酶活性的检测。

凝乳酶活测定方法: 采用 Arima K 的方法进行凝乳酶活性的测定。用 0.01 mol/L CaCl₂ 溶液配制 10% 脱脂乳。此溶液配制后在室温下放置 40 min 后使用, 取 5 mL 10% 脱脂乳于 35 °C 保温 10 min, 加入适量稀释的酶制剂, 振荡均匀并开始计时, 观察管壁上开始出现凝乳颗粒为终点, 记录凝乳时间(*t*)。在上述条件下, 40 min 凝结 1 mL 10% 脱脂乳的酶量定义为一个 Soxhlet 单位(SU)。

$$\text{凝乳酶活力} = \frac{\text{实验用乳量}}{\text{凝乳酶量}} \times \frac{40}{t}$$

实验重复 3 次, 结果以 3 次重复的平均值表示。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增目的基因

以含有凝乳酶原基因的 pMD18T-Prochy 质粒为模板, 经 PCR 扩增得到 1100 bp 左右的片段, PCR 产物回收电泳结果见图 1。

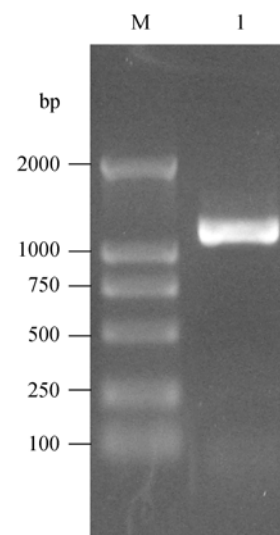


图 1 牛凝乳酶原基因的克隆

Fig. 1 PCR product of bovine prochyimosin gene. M: DNA marker DL2000; 1: prochyimosin gene.

2.2 酵母表达载体的构建

将 pMD18T-Prochy 及表达载体 pPICZaA 经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切, 纯化回收后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下于 22 °C 连接, 构建重组表达质粒 pPICZaA-Prochy, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 获得重组菌, 挑取重组菌单克隆, 提取质粒。电泳结果如图 2 所示, 表达质粒 pPICZaA-Prochy 经 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后出现 2 条带, 其中一条带为载体, 约 3600 bp, 另一条带为所克隆的凝乳酶基因片段, 约 1100 bp。测序结果表明该转化菌的质粒中确实含有目的基因片段, 且读码框正确, 表达质粒 pPICZaA-Prochy 构建成功。

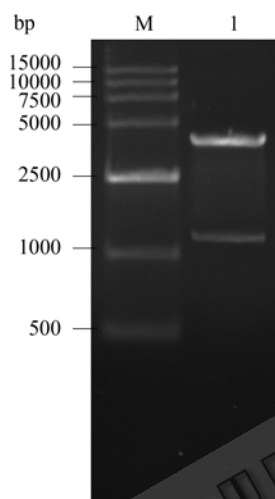


图 2 重组表达质粒酶切鉴定图

Fig. 2 Results of recombinant plasmid digested by *Xho* I and *Xba* I. M: DNA marker DL15000; I: double enzyme digestion products.

2.3 电转化毕赤酵母 GS115

用 *Sac* I 对表达载体 pPICZaA-Prochy 进行线性化处理, 用电转化的方式将质粒转入毕赤酵母 GS115, 利用含抗生素 Zeocin 的 YPD 培养基筛选阳性转化子。提取重组酵母菌基因组 DNA 作为模板, 利用酵母表达载体通用引物 5'AOX1、3'AOX1 和目的基因特异性引物 ZaAProS、ZaAProAS 进行 PCR 鉴定。从图 3 可以看出, 使用表达载体通用引物, 阳性重组菌扩增出 1600 bp 左右的片段; 使用基因特异性引物, 阳性重组菌扩增出 1100 bp 左右的片段。电泳结果显示条带大小与理论值相符, 证明线性化的 pPICZaA-Prochy 与酵母菌 GS115 染色体基因组成

功重组。

挑选阳性克隆进行表型鉴定, 结果如图 4 所示, 重组毕赤酵母在 MDH 和 MMH 平板上均能正常生长, 说明挑选的阳性克隆均为 Mut⁺表型。

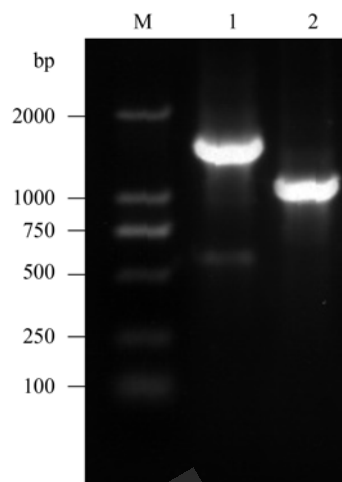


图 3 转化子的 PCR 鉴定结果

Fig. 3 Identification of transformant by PCR. M: DNA marker DL2000; 1: PCR products with universal primer; 2: PCR products with specific primer.

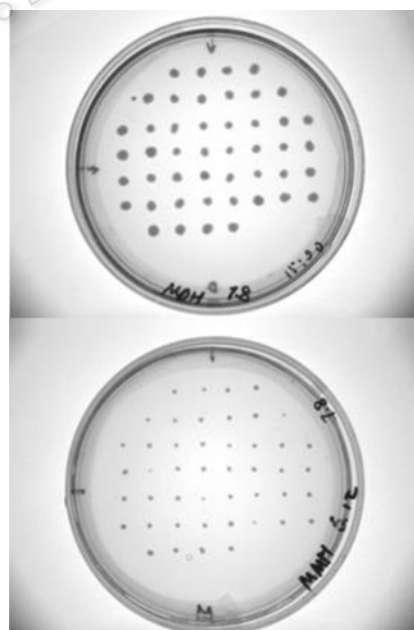


图 4 重组毕赤酵母表型鉴定结果

Fig. 4 Mut phenotype identification of recombinant *Pichia pastoris* GS115.

2.4 重组酵母的诱导表达

重组毕赤酵母 GS115/pPICZaA-Prochy 的生长曲线及活力曲线如图 5 所示。重组毕赤酵母 GS115/

pPICZaA-Prochy 在 24 h 内进入对数生长期, 48 h 以后进入稳定生长期, 菌液 OD_{600} 维持在 3.0 左右。其产酶曲线滞后于生长曲线, 在 144 h 后, 产酶有明显上升的趋势, 192 h 酶活达到最高, 为 12.2 SU/mL。

取上清蛋白加入 $2\times$ Loading Buffer 蛋白上样液, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后上样。SDS-PAGE 电泳结果如图 6 所示, 从图中可以看出, 在分子量 37 kD 处有明显的条带。

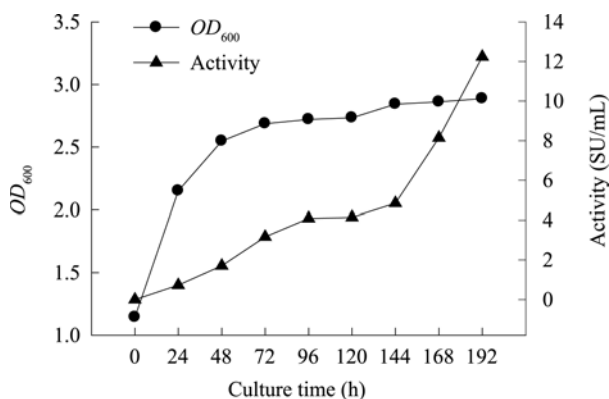


图 5 重组毕赤酵母 GS115/pPICZaA-Prochy 生长曲线及活力曲线

Fig. 5 Growth and activity curve of recombinant GS115/pPICZaA-Prochy.

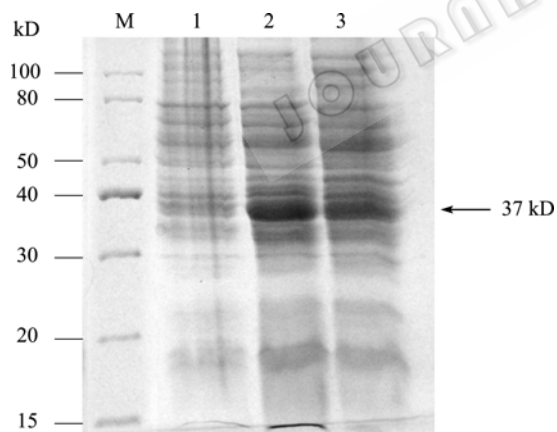


图 6 重组酵母上清液的 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant yeast supernatants. M: protein marker; 1: induced control yeast supernatant; 2, 3: induced positive recombinant yeast supernatant.

2.5 重组凝乳酶的酶学反应鉴定

2.5.1 热失活试验

加热可以使牛凝乳酶活性迅速消失。将稀释的重组蛋白溶液 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min, 检测活性全部丧失

(图 7-5)。

2.5.2 pH 反应试验

牛凝乳酶处于碱性条件下(pH 值大于 9.8), 由于蛋白构象变化造成活性迅速消失。将稀释的重组蛋白溶液调 pH 值至 10.0, 反应 20 min, 检测活性全部丧失(图 7-6)。

2.5.3 酶抑制反应试验

牛凝乳酶属于天冬氨酸蛋白酶, 胃蛋白酶抑制剂 Pepstatin A 可以专一地抑制天冬氨酸蛋白酶的活性。在重组牛凝乳酶蛋白溶液中加入 Pepstatin A 至终浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$, 反应 30 min 后, 检测活性完全丧失(图 7-7)。

重组凝乳酶的酶学反应鉴定结果如图 7 所示, 未添加凝乳酶的空白脱脂乳溶液、未转入凝乳酶基因的空质粒对照均未出现凝乳反应。商品凝乳酶和重组凝乳酶在较短时间内出现凝乳反应。重组凝乳酶经过热处理、碱处理及蛋白酶抑制剂处理后, 其生物活性消失, 充分证明了上清液的活性来源于重组牛凝乳酶。

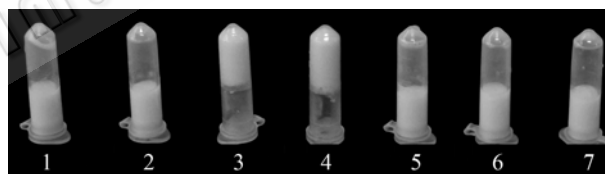


图 7 重组凝乳酶活性检测

Fig. 7 Milk-clotting test of recombinant chymosin. 1: skimmed milk; 2: control yeast; 3: commercial chymosin; 4: recombinant chymosin; 5-7: effects of temperature, pH and inhibitors on the activity of recombinant chymosin.

3 讨论

毕赤酵母表达系统的系列产品作为目前应用最为广泛的酵母表达系统, 其主要的优点有: 醇氧化酶为可调控的强启动子, 能高密度发酵, 重组蛋白表达量高。外源基因整合在酵母基因组上, 可以稳定存在。同时, 高效分泌表达质粒能将外源蛋白表达后, 进行翻译后加工处理, 将外源蛋白分泌到细胞外, 不但提高表达蛋白的活性, 而且有利于产物的纯化, 非常适宜扩大为工业规模。目前, 国内外尚无利用毕赤酵母表达牛凝乳酶的报道。

国内外学者对生物工程凝乳酶已经进行了多年的研究, 而且应用了不同的载体表达凝乳酶基因, 如大肠杆菌、酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母、丝状真菌等。但是使用这些载体表达的凝乳酶基因都需要在酸性条件下活化以后, 才能形成有活性的凝乳酶。本研究利用 pPICZaA 质粒在毕赤酵母中表达牛凝乳酶, 不需要进一步的体外加工即可获得有活性的凝乳酶。产生这种结果的机理可能是由于引物设计中包含了二肽 Lys-Arg, 可以被 KEX 2 基因编码的内切酶作用, 自动切掉 a-factor 前导肽, 从而产生有活性的蛋白, 类似假凝乳酶的产生机理^[18]。

本研究成功构建了牛凝乳酶毕赤酵母分泌型表达载体 pPICZaA-Prochy, 在毕赤酵母上清液中表达有活性的重组牛凝乳酶, 活性为 12.2 SU/mL。通过酶学实验证明了上清液的活性来源为重组牛凝乳酶。本研究获得的重组凝乳酶不需要预酸化激活就可以得到有活性的凝乳酶, 减少了操作步骤, 简化了酶的纯化过程, 降低了凝乳酶生产成本。本研究获得的重组毕赤酵母为干酪工业提供了新型及优良的凝乳酶来源。

REFERENCES

- [1] Newman M, Safro M, Frazao C, *et al.* X-Ray analyses of aspartic proteinases IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J Mol Biol*, 1991, **221**(4): 1295–1309.
- [2] Beppu T. The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends Biotechnol*, 1983, **1**(3): 85–89.
- [3] Nishimori K, Shimizu N, Kawaguchi Y, *et al.* Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. *Gene*, 1984, **29**(1/2): 41–49.
- [4] Mccaman MT, Andrews WH, Files JG. Enzymatic-properties and processing of bovine prochymosin synthesized in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1985, **2**(3/4): 177–190.
- [5] Emtage JS, Angal S, Doel MT, *et al.* Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(12): 3671–3675.
- [6] Crabbe SCAM. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem*, 1997, **61**(4): 395–418.
- [7] Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, *et al.* Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1983, **24**(1): 1–14.
- [8] Goff CG, Moir DT, Kohno T, *et al.* Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1984, **27**(1): 35–46.
- [9] Moir DT, Davidow LS. Production of proteins by secretion from yeast. *Methods Enzymol*, 1991, **194**: 491–507.
- [10] Cullen D, Gray GL, Wilson LJ, *et al.* Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Analysis*, 1987, **17**: 19.
- [11] Ward M, Wilson LJ, Kodama KH, *et al.* Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Biotechnology (NY)*, 1990, **8**(5): 435–440.
- [12] Tan SY, Liu NJ, Yang KY. Isolation of mRNA coding for prochymosin and identification of its cDNA clones in *E. coli*. *Chin J Biotech*, 1988, **4**(2): 91–97.
谭思元, 刘年娟, 杨开宇. 凝乳酶原 mRNA 的分离及其 CDNA 克隆的鉴定. *生物工程学报*, 1988, **4**(2): 91–97.
- [13] Wang G, Liu NJ, Yang KY. Regulation of the expression of calf prochymosin gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 1994, **10**(2): 162–167.
王革, 刘年娟, 杨开宇. 牛凝乳酶原基因在大肠杆菌中表达调控的研究. *生物工程学报*, 1994, **10**(2): 162–167.
- [14] Tang B, Yang KY. Research on the functional property of prochymosin disulfide bond Cys45-Cys50. *Sci China: Series C*, 1997, **27**(1): 14–20.
唐兵, 杨开宇. 凝乳酶原 Cys45-Cys50 二硫键功能的研究. *中国科学: C 辑*, 1997, **27**(1): 14–20.
- [15] Li HY, Dong YC. Construction, expression and characterization of calf chymosin β -turn mutants. *Chin J Biotech*, 1998, **14**(1): 39–45.
黎红晔, 董贻诚. 凝乳酶 β -转角突变体的构建, 表达和性质分析. *生物工程学报*, 1998, **14**(1): 39–45.
- [16] Chen HJ, Pan XF, Zhang GB, *et al.* Site-directed mutagenesis at disulfide bond Cys206-Cys210 of prochymosin (chymosin). *Chin J Biotech*, 2001, **17**(1): 7–10.
陈红杰, 潘学峰, 张国宝, 等. 凝乳酶原 (凝乳酶) 二硫键 Cys206-Cys210 的定位突变. *生物工程学报*, 2001, **17**(1): 7–10.
- [17] Feng Z, Zhang LW. Study on expression of prochymosin in *Kluyveromyces lactis* and genetic stability. *Food Sci*, 2008, **29**(7): 297–302.
冯镇, 张兰威. 小牛凝乳酶原基因在乳酸克鲁维酵母中的表达及遗传稳定性研究. *食品科学*, 2008, **29**(7): 297–302.
- [18] Barkholt PV, Asbaek CK, Foltmann B. Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur J Biochem*, 1979, **94**(2): 573–580.