

拟南芥硫酯酶基因在毕赤酵母中的表达

郝昭程, 王腾飞, 李忠奎, 郝梓凯, 戴琨, 王瑞明

齐鲁工业大学食品与生物工程学院, 山东 济南 250353

郝昭程, 王腾飞, 李忠奎, 等. 拟南芥硫酯酶基因在毕赤酵母中的表达. 生物工程学报, 2015, 31(1): 115–122.
Hao ZC, Wang TF, Li ZK, et al. Expression of *Arabidopsis thaliana* thioesterase gene in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 115–122.

摘要: 硫酯酶在生物体内能催化水解脂酰酰基载体蛋白和饱和脂肪脂酰链, 对中链脂肪酸 (Medium chain fatty acids, MCFAs) 的积累起着关键作用。为获得具有生产中链脂肪酸能力的工程菌, 以拟南芥 cDNA 为模板, PCR 扩增得到其脂酰-ACP 硫酯酶基因 *AtFatA*, 经 *EcoR* I / *Xba* I 双酶切后连接至同样双酶切的质粒中, 获得重组质粒 pPICZαA-*AtFatA*。将重组质粒电击转入毕赤酵母 GS115 中, 通过 Zeocin 抗性筛选, 挑选出阳性克隆子并摇瓶发酵诱导, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析获得明显目的蛋白条带, 首次成功构建 *AtFatA* 的真菌表达系统。气质联用法检测发酵产物胞外游离脂肪酸, 发现毕赤酵母 *AtFatA* 重组菌株比起始 GS115 菌株胞外游离 MCFAs (主要是辛酸) 产量增加 51%, MCFAs 产量占胞外总脂肪酸产量的 28.7%, 而野生菌中这一比例仅有 18.1%, 这为日后生产安全无毒害的 MCFAs 探索了一条新的途径。

关键词: 拟南芥, 脂酰-ACP 硫酯酶, 毕赤酵母, 基因重组表达, 游离中链脂肪酸, 胞外

Expression of *Arabidopsis thaliana* thioesterase gene in *Pichia pastoris*

Zhaocheng Hao, Tengfei Wang, Zhongkui Li, Zikai Hao, Kun Dai, and Ruiming Wang

Department of Food and Biology Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, Shandong, China

Abstract: Thioesterase catalyzes the hydrolysis of acyl-ACP and saturated fatty acyl chain. It plays a key role in the accumulation of medium chain fatty acids *in vivo*. In this study, to construct an engineering strain to produce MCFAs, the *Arabidopsis* acyl-ACP thioesterase gene *AtFatA* was amplified by PCR from cDNA of *Arabidopsis* and double digested by

Received: April 3, 2014; **Accepted:** May 9, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31171727).

Corresponding author: Ruiming Wang. Tel: +86-531-89631191; E-mail: ruiming3K@163.com

国家自然科学基金 (No. 31171727) 资助。

网络出版时间: 2014-07-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140205.html>

EcoR I/Xba I, then linked to the plasmid digested with same enzymes to get the recombinant plasmid pPICZ α A-*AtFatA*. We transformed the gene into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation and screened positive colonies by YPD medium with Zeocin. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) results showed that the recombinant enzyme had a molecular of 45 kDa band which was consistent with the predicted molecular mass and we constructed the expression system of gene *AtFatA* in fungus for the first time. Under shake-flask conditions, Gas Chromatograph-Mass Spectrometer-computer results indicated that recombinant strain produced 51% more extracellular free MCFAs than the wild and its yield reached 28.7% of all extracellular fatty acids. This figure is 10% higher than the control group. The result provides a new way to produce MCFAs.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, acyl-ACP thioesterase, *Pichia pastoris*, genic recombination expression, free medium chain fatty acids, extracellular

中链脂肪酸 (MCFAs) 通常是指由 8–10 个碳原子组成碳链的脂肪酸。人体摄入 MCFAs 可以不需要肝脏和胆囊来消化和乳化, 故而机体能快速吸收能源, 增加热量, 加速体内的新陈代谢, 使更多的热量用于循环, 对脂肪消化能力下降或切除胆囊的人而言, 大有裨益^[1-3]。日前, 在北京召开的“功能性脂肪酸与健康论坛”中, 与会专家指出 MCFAs 除在以往临床营养中具有脂肪乳剂的用途之外, 还在减少体脂肪堆积、预防心血管疾病方面具有积极意义^[4-7]。研究显示, MCFAs 对患有 II 型糖尿病的动物模型及病人具有治疗优势^[8], 能促进动物的早期发育^[9-10], 并在抵抗大肠杆菌及白色念珠菌等致病菌方面具有积极功效, 对我们的免疫系统有益^[11-14]。

当前, MCFAs 供应有限, 因为它们通常是某些热带油加工的副产品。我们目前获得食用级 MCFAs 的主要途径是将富含中链脂肪酸甘油三脂的植物油, 如椰子油、棕榈油进行水解、分馏以收集。受这类植物油来源限制, 恐将不能满足日益增长的 MCFAs 市场需求。有研究报告, 硫酯酶能催化水解脂酰-ACP 和饱和脂肪脂酰链, 对中链脂肪酸的积累起着关键作用^[15]。本研究首次以真菌为宿主, 在毕赤酵母 GS115

的基因组上整合外源拟南芥硫酯酶基因 (*AtFatA*) 对其进行基因改造, 利用宿主酵母细胞器复杂, 利于真核蛋白表达以及微生物的传代速度快以及其发酵周期短, 代谢可控的双重优点^[16], 以期获得稳定、高产、易收集的胞外游离中链脂肪酸的重组菌, 进而探索一种安全、无毒害 MCFAs 的生产新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存; 宿主菌毕赤酵母 GS115、质粒 pPICZ α A 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂及仪器

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* cDNA 为山东大学微生物国家重点实验室所赠; *Taq* 酶、DNA 连接酶、限制酶均购自大连宝生物公司; DNA 柱纯化试剂盒购自生工生物工程 (上海) 有限公司; DNA 及蛋白标准分子量、质粒提取试剂盒以及 T 载体购于北京全式金公司; LB 培养基、YPD 培养基均按照 Invitrogen 公司毕赤酵母表达手册配制; 其他试剂为国产和进口分析纯试剂。所用仪器: 2720 Thermal Cycler PCR 仪;

国产 DYY-12 电泳仪；Bio-Rad Gene Pulser 电转化仪；岛津 GCMS-QP2010 气质联用仪。

1.1.3 引物

据拟南芥硫酯酶基因 *AtFatA* (GenBank Accession No. AK176105) 设计引物, 上游、下游引物分别命名为 P1、P2, 并分别引入 *EcoR* I、*Xba* I 酶切位点 (下划线), 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应获取目的片段

以拟南芥的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s; 57 °C 30 s; 72 °C 2 min; 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物并进行柱回收。

1.2.2 构建重组 T 载体 pEASY-Blunt-*AtFatA*

将 T 载体及上述 PCR 反应所得基因产物分别进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切反应, 胶回收基因片段和相同酶切的 T 载体, 按照一定比例连接得到重组 T 载体后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并将其涂布于含有 30 μ g/mL Zeocin 抗性平板, 37 °C 恒温箱隔夜培养, 蓝白斑筛选, 用灭菌牙签挑取抗性单克隆菌落, 分别以 P1、P2 作上、下游引物, 进行菌落 PCR 初步验证。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used for amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward (P1)	CGGAATT <u>CG</u> AAAAGATGTTGAAGCTTCG
Reverse (P2)	GCTCTAGACCAACAATCCAGTTCCTC

The underlined sequences correspond to the *EcoR* I restriction site in P1 and the *Xba* I site in P2.

按对应序号在同浓度 Zeocin 抗性低盐 LB 培养基中扩培, 提取重组 T 载体, 酶切二次鉴定, 然后将通过验证的重组 T 载体送至上海生工测序最终验证。

1.2.3 重组质粒 pPICZ α A-*AtFatA* 的构建

摇菌并提取、纯化重组 T 载体、pPICZ α A 质粒, 对二者分别进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切反应, 胶回收 *AtFatA* 基因片段和相同酶切的 pPICZ α A 质粒, 按照一定比例连接得到重组质粒后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (图 1) 然后按照 1.2.2 中重组 T 载体的操作方法对其进行抗性筛选; 37 °C 隔夜培养后见白色菌落。进一步对所构建的重组质粒 pPICZ α A-*AtFatA* 进行如上重组 T 载体的三步验证, 确保重组质粒构建成功以及所携目的基因的精确。

1.2.4 重组质粒 pPICZ α A-*AtFatA* 的转化和鉴定

将提纯的 pPICZ α A-*AtFatA* 质粒用 *Sac* I 限制酶单切线性化后, 电击转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 涂布于含有 120 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 平板, 30 °C 培养 4-6 d, 筛选到阳性转化子。同浓度 Zeocin YPD 培养基扩培后提取重组菌的基因组, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 鉴定, 同时以转化过空载体的菌株作空白对照。

1.2.5 外源蛋白的诱导表达与检测

挑取 Mut+ 重组子, 接种至含 50 mL BMGY 培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C、250 r/min 振荡培养 20 h; 3 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 再以 50 mL BMMY 重悬菌体, 菌液置于 500 mL 挡板瓶中, 用四层纱布封口, 28.5 °C、250 r/min 振荡培养, 诱导表达; 每 24 h 向培养基中添加除菌的无水甲醇使其终浓度为 0.5%, 诱导 72 h,

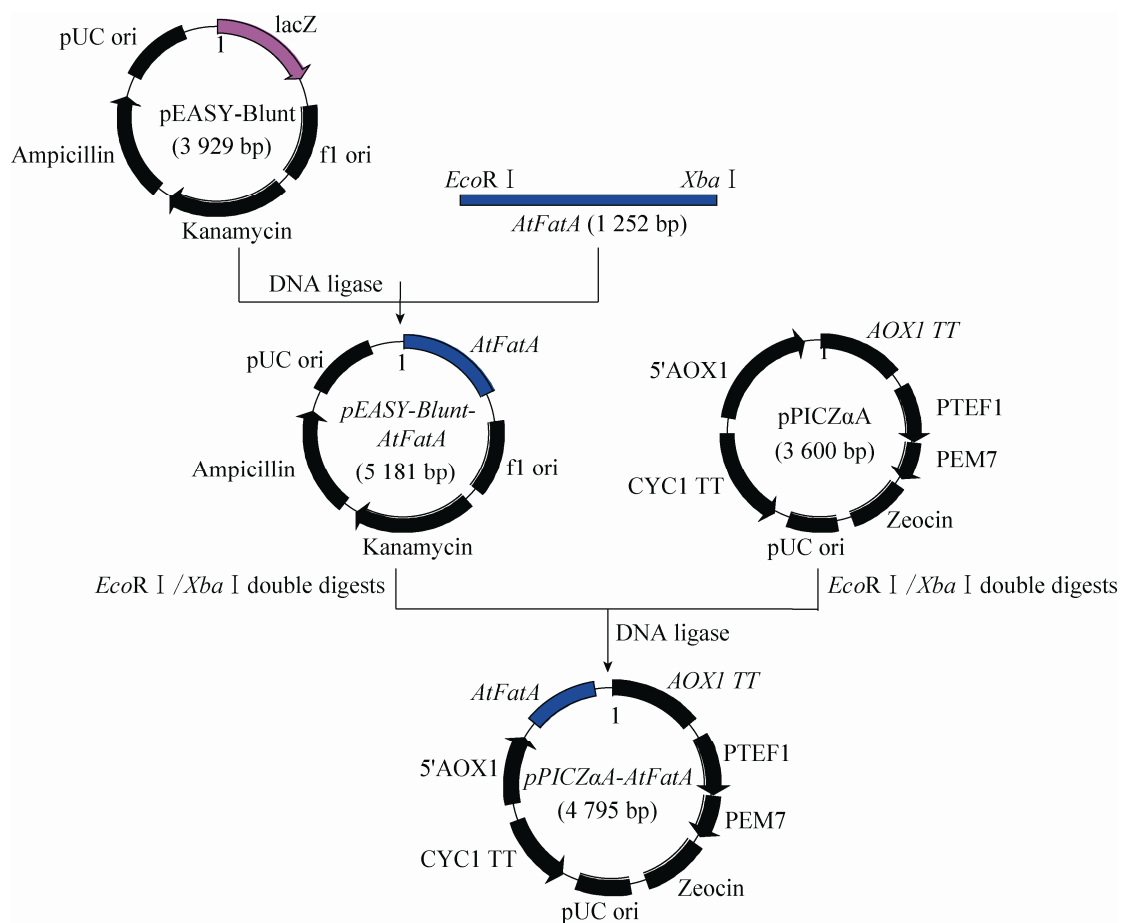


图 1 重组质粒 pPICZ α A-*AtFatA* 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPICZ α A-*AtFatA*.

收集发酵物。取少量发酵产物离心，收集发酵上清液与发酵既得菌体。在缓冲液保护下将菌体破壁、3 000 r/min 离心 5 min 处理，保留上清。同时取野生菌进行相同发酵条件及后期处理，以作空白对照。用 SDS-PAGE 法分别对发酵上清液和破壁离心后菌体上清液进行蛋白检测。

1.2.6 胞外游离脂肪酸的检测

用气质联用法 (GC-MS) 检测胞外游离脂肪酸种类及含量，进而间接评估外源硫酯酶蛋白活性。将 1.2.5 中的发酵上清液进行脂肪酸甲酯化处理，处理方法参考文献[17]。GC-MS 色

谱条件：毛细管柱为 DB-5MS，载气为高纯氦气 (99.999%)，进样器温度 230 °C，检测器温度 250 °C，载气柱头压 65.2 kPa。程序升温条件：初始温度 90 °C，保持 3.5 min，5 °C/min 升至 250 °C，保持 5 min。分流比设定为 1 : 30，每次进样量为 1 μ L。

2 结果与分析

2.1 目的基因扩增

以拟南芥的 cDNA 作为模板，由 PCR 扩增得到约 1 200 bp 的目的片段，大小与拟南芥硫

酯酶基因预测值相符,说明目的基因克隆成功。

2.2 重组 T 载体及重组质粒的构建与鉴定

硫酯酶基因扩增片段插入 T 载体、重组质粒。经菌落 PCR 及对提取重组 T 载体、重组质粒分别酶切验证(重组质粒双酶切验证如图 2 所示),硫酯酶目标片段经 DNA 测序后,将测序结果与 GenBank (Accession No. AK176105) 序列进行比对分析,结果显示 PCR 扩增所得基因片段序列与拟南芥 FatA 型脂酰-ACP 硫酯酶目的基因序列相似度达到 100%,未发生碱基突变或丢失,表明目标基因 (*AtFatA*) 扩增获得成功。

2.3 重组质粒的转化

将构建完成并测序无误的重组质粒通过电转化法整合到毕赤酵母 GS115 基因组中,从抗性平板上挑取阳性菌落,经 YPD 液体培养基摇瓶培养 48 h,提取酵母基因组,以 P1, P2 为引物进行 PCR 鉴定,证明阳性转化子基因组为模板成功克隆出 *AtFatA* 基因,重组质粒整合进入毕赤酵母基因组,重组菌构建成功,命名为 *Pichia pastoris-AtFatA*。

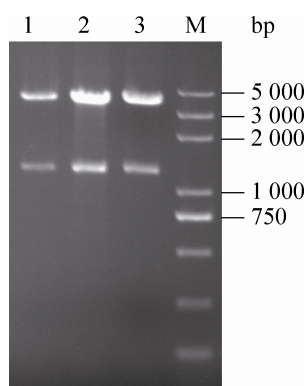


图 2 重组质粒 *AtFatA* 片段的双酶切检验

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of the *AtFatA* recombinant plasmid. M: DNA marker; 1-3: double digestion of recombinant plasmid pPICZαA-*AtFatA*.

2.4 外源蛋白的诱导表达

与对照菌相比,整合有拟南芥硫酯酶基因的重组菌在阳性转化子诱导表达后经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测胞外蛋白,并未发现差异蛋白;但对胞内蛋白进行检测时,发现重组菌多出一条大小约 45 kDa 的蛋白(图 3 中 6、8 泳道),这与拟南芥硫酯酶预测的相对分子质量大小相符。这说明重组菌株表达的外源蛋白成功,但是并没有直接将外源蛋白分泌至胞外,而是以胞内蛋白形式存在。比对胞内外蛋白电泳图,分析认为目的蛋白没有分泌至胞外的原因可能有两点:

一是目的蛋白分泌到胞外后被胞外的蛋白酶所降解。从图 3 的 1-4 泳道中可以看到胞外确实存在微量非目的蛋白(约 38 kDa 处)的蛋白条带,说明了蛋白酶存在的可能性。相同条件下重新摇瓶发酵,发酵液中添加蛋白酶抑制剂以作对照。发酵结束后取对照组发酵上清液进行 SDS-PAGE 检测仍得到完全一致的结果,未见目的蛋白条带,这说明 1-4 泳道中的微量蛋白并非蛋白酶,排除蛋白酶干扰的可能性;二是目的蛋白没有按照预期设计分泌到胞外,而是以胞内蛋白的形式存在。由于目的蛋白的分泌受外源基因的特性如基因密码子组成,信号肽的准确表达与引导,目的蛋白分泌前在胞内相关细胞器上的正确修饰与传送以及该目的蛋白本身的空间结构等多种因素影响,上述任一因素的干扰都可能会最终导致目的蛋白的分泌失败^[18-20]。

2.5 胞外游离脂肪酸的检测

分别收集野生菌及重组菌的发酵上清液,对胞外游离脂肪酸进行甲酯化处理,并分别对

两组甲酯化产物进行 GC-MS 检测, 结果如图 4、5 所示。分析对比该两组相同检测条件下的图谱可知, 重组菌与对照菌均主要含 6 种胞外游离脂肪酸, 分别为辛酸 (8:0)、月桂酸 (12:0)、肉豆蔻酸 (14:0)、棕榈酸 (16:0)、油酸 (18:1)、硬脂酸 (18:0), 这说明重组菌中 *AtFatA* 基因的表达并没有改变菌体产生胞外游离脂肪酸的种类。与野生菌相比, 重组菌 *Pichia pastoris-AtFatA* 生产胞外游离辛酸、月桂酸、肉

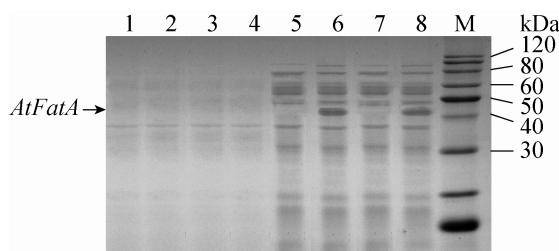


图 3 野生菌与 *Pichia pastoris-AtFatA* 胞内及胞外蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对比分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of extracellular and intracellular protein of *Pichia pastoris* wild strain and *Pichia pastoris-AtFatA* recombinant strain. M: protein marker; 1 and 3: extracellular protein's determination of wild yeast; 2 and 4: extracellular protein's determination of *Pichia pastoris-AtFatA*; 5 and 7: intracellular protein's determination of wild yeast; 6 and 8: intracellular protein's determination *Pichia pastoris-AtFatA*.

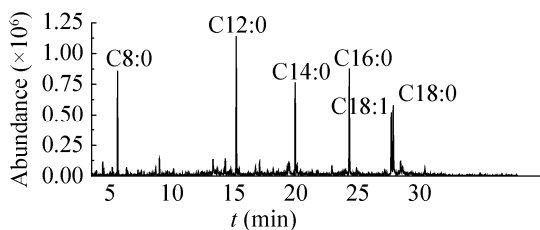


图 4 GC-MS 分析起始毕赤酵母 GS115 (野生菌) 胞外游离脂肪酸组成

Fig. 4 GC-MS analysis of the extracellular free fatty acids composition of *Pichia pastoris* wild GS115 strain.

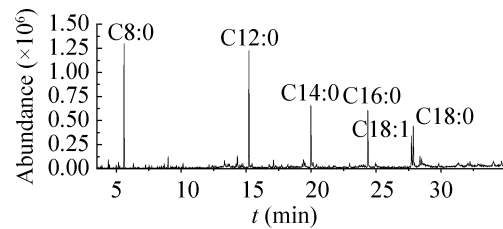


图 5 GC-MS 分析 *AtFatA* 重组菌胞外游离脂肪酸组成

Fig. 5 GC-MS analysis of the extracellular free fatty acids composition of *Pichia pastoris-AtFatA*.

豆蔻酸、棕榈酸、油酸和硬脂酸的能力分别为野生菌的 151%、110%、85.5%、68.2%、62.7% 和 75%。重组菌比野生菌胞外游离 MCFAs (主要是辛酸) 产量增加 51%, MCFAs 产量在胞外总游离脂肪酸产量中所占比例达到 28.7%, 高出野生菌 10.6%。

3 讨论

实验在宿主菌毕赤酵母 GS115 的基因组上插入外源 *AtFatA* 基因对其进行基因改造并成功表达, 大幅度提高了胞外游离 MCFAs 的产量, 使得直接从发酵液中方便地分离提取 MCFAs 成为可能, 免去了破碎细胞提取发酵产物的繁琐, 节约生产成本, 利于工业化生产。与外源硫酸酯酶的植物表达系统^[21]相比, 该表达系统的培养、转化及高密度发酵等操作接近原核生物, 表达系统简单^[16], 非常适合规模化生产; 而与该外源酶的原核表达系统^[22]相比, 该真核表达系统则具有一定的蛋白质翻译后加工能力, 有利于真核蛋白的表达^[16], 且该系统不产生内毒素, 更适合用于食品及医药品的生产。值得一提的是外源 *AtFatA* 基因是以基因重组的方式整合到毕赤酵母的基因组上, 故而外源基因在毕赤酵母中比较稳定, 不会发生原核表达系统传代过

程中类似质粒丢失的现象^[23]。毕赤酵母表达系统具有稳定、低毒、代谢可控以及适合规模发酵等诸多优点,该研究方法对指导生产食品及药用 MCFAs 具有一定的积极意义。但我们认为要想将此技术运用到工业生产上还存在以下两个问题:第一,该实验只是通过摇瓶发酵的方式对该重组菌产 MCFAs 的性能进行了检测,其生产 MCFAs 的能力虽较野生菌有一定程度提高,但要想进一步提高其产量,扩大到工业化生产,实现规模发酵还需摸索诸多条件,如该重组菌在发酵罐中产 MCFAs 的最适温度、pH、及供氧量乃至最适发酵周期等,这些因素都将对发酵效率产生影响^[24-26];第二,如何从发酵液中安全、稳定、方便地分离或提取 MCFAs 的工艺尚需进一步摸索。在此分离或提取过程中应尽量不引入对人体有毒害作用的提取剂,从而确保生产出的 MCFAs 在食品及药用等方面的安全性,又可减少产物后期处理中为除去引入的有毒提取剂而徒增的工艺流程,节约生产成本。相信随着对巴斯德毕赤酵母研究和认识的进一步深入以及化工行业分离提取技术的蓬勃发展,上述的两个问题短期内即可得到解决,届时利用工程菌的代谢生产 MCFAs 亦会具有一定的应用前景。

REFERENCES

- [1] Shinohara H, Ogawa A, Kasai M, et al. Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(10): 1811-1818.
- [2] Montgomery MK, Maghzal GJ, Stocker R, et al. The beneficial effects of medium-chain fatty acids on metabolism and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*, 2012, 1817: S112.
- [3] Liu WL, Liu W, Liu CM, et al. Preparation and evaluation of easy energy supply property of medium-chain fatty acids liposomes. *J Microencapsul*, 2011, 28(8): 783-790.
- [4] Tachibana S, Sato K, Takahashi T, et al. Octanoate inhibits very low-density lipoprotein secretion in primary cultures of chicken hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2002, 132(3): 621-627.
- [5] Matsuo T, Takeuchi H. Effects of structured medium- and long-chain triacylglycerols in diets with various levels of fat on body fat accumulation in rats. *Br J Nutr*, 2004, 91(2): 219-225.
- [6] Peter J, Victor F, Ronald J, et al. Bioactivity and emerging role of short and medium chain fatty acids. *Lipid Technol*, 2010, 22(12): 266-269.
- [7] Liu WL, Liu W, Liu CM, et al. Medium-chain fatty acid nanoliposomes suppress body fat accumulation in mice. *Br J Nutr*, 2011, 106(9): 1330-1336.
- [8] Koji N, Teruyoshi Y. Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*, 2010, 61(3): 208-212.
- [9] Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, et al. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep*, 2012, 2: 930.
- [10] Zentek J, Buchheit RS, Ferrara F, et al. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Anim Health Res Rev*, 2011, 12(1): 83-93.
- [11] Zhang X, Yang M, Song F, et al. Antimicrobial activity of selected fatty acids and their derivative. *J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci*, 2013, 39(2): 155-160 (in Chinese).
张希, 杨明, 宋飞, 等. 脂肪酸及其衍生物的抑菌活性. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2013, 39(2): 155-160.
- [12] Dierick N, Decuypere J, Molly K, et al. The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing

- medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition. *Livest Prod Sci*, 2002, 76(1): 1–16.
- [13] Nishi Y, Mifune H, Kojima M. Ghrelin acylation by ingestion of medium-chain fatty acids. *Methods Enzymol*, 2012, 514: 303–315.
- [14] Hermans D, Martel A, Van Deun K, et al. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poult Sci*, 2010, 89(6): 1144–1155.
- [15] Tjellstrom H, Strawsine M, Silva J, et al. Disruption of plastid acyl:acyl carrier protein synthetases increases medium chain fatty acid accumulation in seeds of transgenic *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2013, 587(7): 936–942.
- [16] Han XQ, Liu XT, Yin SH. Expression system of *Pichia pastoris*. *J Microbiol*, 2003, 23(4): 35–53 (in Chinese).
韩雪清, 刘湘涛, 尹双辉. 毕赤酵母表达系统. *微生物学杂志*, 2003, 23(4): 35–53.
- [17] Xu M, Wang J, Chai ZH, et al. Analysis of cellular fatty acid composition of marine bacteria by gas chromatography. *Marine Sci*, 2013, 37(2): 76–83 (in Chinese).
徐敏, 王静, 柴子涵, 等. 海洋细菌脂肪酸的气相色谱分析. *海洋科学*, 2013, 37(2): 76–83.
- [18] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 31–39.
- [19] Gasser B, Sauer M, Maurer M, et al. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(20): 6499–6507.
- [20] Xu P, Robinson AS. Decreased secretion and unfolded protein response up-regulation are correlated with intracellular retention for single-chain antibody variants produced in yeast. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(1): 20–29.
- [21] Dehesh K, Jones A, Knutzon DS, et al. Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *Plant J*, 1996, 9(2): 167–172.
- [22] Cheng T, Yang JM, Liu H, et al. Expression of *Arabidopsis thaliana* thioesterase gene (*atfata*) in *Escherichia coli* and its influence on biosynthesis of free fatty acid. *Chin J App Environ Biol*, 2011, 17(4): 568–571 (in Chinese).
程涛, 杨建明, 刘辉, 等. 拟南芥硫酯酶基因 (*atfata*) 在大肠杆菌中的表达及其对游离脂肪酸合成的影响. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(4): 568–571.
- [23] Gou XH, Wang W, Liu DY, et al. Expression of MTHase gene in *Pichia pastoris* and its genetic stability. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, 16(3): 408–411 (in Chinese).
苟兴华, 王卫, 刘达玉, 等. 麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因在巴斯德酵母中的表达及遗传稳定性. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(3): 408–411.
- [24] Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, et al. Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2005, 27(6): 399–406.
- [25] Zhu T, You L, Gong F, et al. Combinatorial strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(4): 407–412.
- [26] Jiang F, Kongsaree P, Schilke K, et al. Effects of pH and temperature on recombinant manganese peroxidase production and stability. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 146(1/3): 15–27.

(本文责编 陈宏宇)