

# 基于 CRISPR/Cas9 和紫外诱变构建高产小牛胰凝乳酶的多拷贝乳酸克鲁维酵母

宋悦辰<sup>1,2</sup>, 周婕妤<sup>1,2</sup>, 倪晔<sup>1,2\*</sup>

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

宋悦辰, 周婕妤, 倪晔. 基于 CRISPR/Cas9 和紫外诱变构建高产小牛胰凝乳酶的多拷贝乳酸克鲁维酵母[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2983-2997.

SONG Yuechen, ZHOU Jieyu, NI Ye. Construction of a *Kluyveromyces lactis* strain with multi-copy integration for enhanced bovine chymosin production by CRISPR/Cas9 and UV mutagenesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2983-2997.

**摘要:** 小牛胰凝乳酶(bovine chymosin)作为重要的食品酶, 广泛应用于乳制品行业中奶酪的生产制造。本研究将密码子优化后的小牛胰凝乳酶酶原基因作为目的基因, 构建了分泌表达框, 通过基因组整合至乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*), 单拷贝菌株的摇瓶发酵活力达到了 40 U/mL; 基于单拷贝菌株, 采用 CRISPR/Cas9 技术敲除筛选基因 *amdS*, 构建了多拷贝整合菌株, 双拷贝和三拷贝整合菌株的摇瓶发酵活力分别增加到 70 U/mL 和 78 U/mL。基于双拷贝整合菌株 KLUcym<sup>D</sup>, 采用紫外诱变育种技术, 在 多轮诱变育种后筛选得到一株高产小牛胰凝乳酶的重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2, 摇瓶发酵酶活力达到 270 U/mL; 5 L 罐中发酵 76 h, 酶活力达到最高值 600 U/mL。综上, 本研究成功构建了一株高产小牛胰凝乳酶的乳酸克鲁维酵母重组菌株, 为进一步工业化放大生产奠定了基础。

**关键词:** 小牛胰凝乳酶; 乳酸克鲁维酵母; 合成生物学; 多拷贝整合; 紫外诱变育种

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102700); 国家自然科学基金(22377040)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102700) and the National Natural Science Foundation of China (22377040).

\*Corresponding author. E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-03-04; Accepted: 2024-04-11; Published online: 2024-04-16

# Construction of a *Kluyveromyces lactis* strain with multi-copy integration for enhanced bovine chymosin production by CRISPR/Cas9 and UV mutagenesis

SONG Yuechen<sup>1,2</sup>, ZHOU Jieyu<sup>1,2</sup>, NI Ye<sup>1,2\*</sup>

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Bovine chymosin is an essential food enzyme widely used in cheese production in the dairy industry. This study used a codon-optimized prochymosin gene to construct an expression cassette for extracellular expression of bovine chymosin in *Kluyveromyces lactis*. After integration of the prochymosin gene into the host cell genome, the single-copy integration strain KLUcym showed the clotting activity of 40 U/mL in a shake flask. The CRISPR/Cas9 system was employed to delete *amdS* and construct the double-copy integration strain and triple-copy integration strain, which achieved the clotting activities of 70 U/mL and 78 U/mL in shake flasks, separately. Subsequently, multiple rounds of UV mutagenesis were performed on the double-copy strain KLUcym<sup>D</sup>, and a recombinant *K. lactis* strain with a high yield of bovine chymosin was obtained. This strain achieved the clotting activity of 270 U/mL in a shake flask and 600 U/mL in a 5 L bioreactor after 76 h. In summary, we construct a strain KLUcym<sup>D</sup>-M2 for high production of bovine chymosin, which lays a foundation of industrial fermentation.

**Keywords:** bovine chymosin; *Kluyveromyces lactis*; synthetic biology; multi-copy integration; UV mutagenesis

小牛胰凝乳酶(bovine chymosin)是一种来自于小牛皱胃的酸性蛋白酶,属于天冬氨酸蛋白酶家族<sup>[1]</sup>。作为乳制品行业中一种常见的酶,小牛胰凝乳酶常被用于奶酪的生产制备。其主要功能是水解牛乳中κ酪蛋白的Phe105-Met106肽键,从而导致酪蛋白不稳定生成絮凝状固体,是奶酪加工中的前体产物。

小牛胰凝乳酶主要有3种结构,分别为小牛胰凝乳酶酶原前体(preprochymosin)、小牛胰凝乳酶酶原(prochymosin)和小牛胰凝乳酶(chymosin)。在小牛体内的合成途径中,小牛胰凝乳酶酶原前体首先被翻译表达,在分泌过程中,酶原前体N端的16个氨基酸被剪切去除,形

成小牛胰凝乳酶酶原,当酶原被运输到小牛皱胃后,皱胃中的酸性环境使小牛胰凝乳酶酶原发生剪切,最终酶原N端的42个氨基酸被去除,形成具有凝乳活力的小牛胰凝乳酶。在这一过程中,小牛胰凝乳酶最终以323个氨基酸的蛋白形式存在,并参与牛乳的水解<sup>[2]</sup>。目前的研究表明,在真核系统如毕赤酵母等菌株中,只有小牛胰凝乳酶酶原序列能够进行较为高效的翻译表达<sup>[3]</sup>。

乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)作为一种一般安全认证(Generally Recognized as Safe, GRAS)的食品安全菌株,由其表达的多种酶制剂可被用于日常的饮食加工中,如催化乳糖水解以及转糖苷反应的乳糖酶<sup>[4]</sup>、啤酒酿造

中降低麦汁黏度的葡聚糖酶<sup>[5]</sup>以及用于奶酪制备的凝乳酶<sup>[6]</sup>等。随着合成生物学的不断发展<sup>[7-8]</sup>, 多种方法及策略被应用于构建微生物重组菌株, 同时, 针对宿主菌株中蛋白表达水平的相关研究也成为热点<sup>[9-10]</sup>, 主要集中在通过不同启动子的筛选<sup>[11-13]</sup>、蛋白分泌途径的改造<sup>[14]</sup>以及诱变育种等手段提高目标蛋白的表达量<sup>[15]</sup>。

近年来国内外对于乳酸克鲁维酵母表达小牛胰凝乳酶均有研究报道。冯镇等<sup>[16]</sup>使用表达载体 pKLAC1 成功在乳酸克鲁维酵母中表达了小牛胰凝乳酶, 活力达到了 83 SU/mL。袁伟<sup>[17]</sup>通过定点突变对凝乳酶进行改造, 并对突变体的酶学性质进行了分析。徐龙龙<sup>[18]</sup>构建了乳酸克鲁维酵母重组表达菌株, 并采用响应面法优化了培养基成分和发酵条件, 在 5 L 罐中发酵 66 h 活力达到了 700 SU/mL。Candiotti 等<sup>[19]</sup>对乳制品生产中不同凝乳酶及胃蛋白酶对乳清的作用进行了分析研究。Steensels 等<sup>[20]</sup>对多种工业应用酵母菌株进行了相关技术的总结说明, 提出了多种工业酵母的选择及改造方法。

诱变育种作为常见的一种育种技术, 常被用于筛选高产菌株<sup>[21]</sup>。其中, 紫外诱变以快速

有效、诱变效率高以及不易回复突变等优点被用于多种真核及原核重组菌中。紫外诱变是利用紫外光引起 DNA 分子形成嘧啶二聚体, 导致碱基转换、颠换、移码或缺失, 从而使诱变菌株发生突变或死亡。结合使用高效的筛选方法进行菌株筛选, 则能较为快速地得到优良菌种。

构建安全高效生产的乳酸克鲁维酵母重组菌株是工业化生产的重要基础。为提高乳酸克鲁维酵母的异源蛋白表达量, 本研究首先依据乳酸克鲁维酵母菌株密码子偏好性合成了小牛胰凝乳酶酶原基因, 并构建了分泌表达框, 用于构建基因组整合表达菌株。将构建的双拷贝菌株作为出发菌株, 通过紫外诱变育种技术和高通量筛选方法, 最终得到了一株高效稳定表达小牛胰凝乳酶的乳酸克鲁维酵母菌株, 为工业化应用生产提供了实验依据和技术指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所使用的菌株及质粒如表 1 所示。小牛胰凝乳酶基因 GenBank 登录号为 NM\_180994.2。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Name	Description	Sources
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> JM109	For plasmids' construction	Lab stock
KLUcym	<i>Kluyveromyces lactis</i> GG799 derivate, P <sub>TEF1</sub> :: <i>cym</i> (integrated site <i>ura3</i> )	This study
KLUcym <sup>D</sup>	KLUcym derivate, double-copy numbers	This study
KLUcym <sup>T</sup>	KLUcym <sup>D</sup> derivate, triple-copy numbers	This study
KLUcym <sup>D</sup> -M1	KLUcym <sup>D</sup> derivate, UV mutant strain	This study
KLUcym <sup>D</sup> -M2	KLUcym <sup>D</sup> derivate, UV mutant strain	This study
<b>Plasmids</b>		
LHZ515	CRISPR/Cas9 plasmid used in <i>Kluyveromyces marxianus</i> <sup>[22]</sup>	Prof. Lü Hong
pETKL	Plasmid contains <i>cym</i> expression cassette	This study
pETKL-URA3	Plasmid contains <i>cym</i> expression cassette with <i>ura3</i> homologous arms	This study
pKCAS	CRISPR/Cas9 plasmid	This study
pKLAC1- <i>cym</i>	Plasmids contain prochymosin gene <i>cym</i>	This study

### 1.1.2 培养基

LB 培养基(Luria-Bertani medium) (g/L): 酵母提取物 5.0、蛋白胨 10.0、氯化钠 10.0。

酵母提取物蛋白胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium) (g/L): 葡萄糖 30.0、蛋白胨 30.0、酵母提取物 10.0。

酵母碳源基础培养基(yeast carbon base medium) (g/L): YCB 11.700、乙酰胺 0.295。

以上培养基配制成固体培养基均添加 2% (质量体积分数)琼脂粉。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 45.0、蛋白胨 25.0、酵母提取物 15.0、磷酸二氢钾 3.0、磷酸氢二钾 2.0。

培养基采用 121 °C 20 min 程序进行灭菌处理。葡萄糖溶液单独配制,采用 115 °C 15 min 程序进行灭菌处理,使用前加入相应培养基。

抗生素:卡那霉素(kanamycin) 50 μg/L、氨苄青霉素(ampicillin) 100 μg/L 及潮霉素(hygromycin) 300 mg/L。

### 1.1.3 主要试剂及设备

本研究所使用的化学试剂(如氯化钠等)均购自国药集团化学试剂有限公司;高保真性酶 KOD-Plus-Neo 购自上海硕盟生物科技有限公司;卡那霉素、氨苄青霉素及质粒提取试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司;一步克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物均购自 Oxoid 公司;琼脂粉购自上海思域化工科技有限公司;限制性内切酶等均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。引物合成及 DNA 测序由天霖生物科技(上海)有限公司完成。

本研究所使用的主要仪器:PCR 扩增仪及琼脂糖凝胶核酸电泳仪均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;组合式摇床购自上海知楚仪器有限公司;台式冷冻离心机及移液器均购自艾本德(上海)国际贸易有限公司;数显控温

水浴锅购自常州荣华仪器制造有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒构建

通过一步克隆法构建本研究所需要质粒,所用引物如表 2 所示。

#### (1) 小牛胰凝乳酶酶原表达框构建

以质粒 LHZ515 作为模板,分别使用引物 TEFP-EXP-F 和 TEFP-EXP-R 扩增出启动子  $P_{TEF1}$  序列及 Kozak 序列 GGAAA 用于增强蛋白翻译表达;使用引物 CYCT-EXP-F 和 CYCT-EXP-R 扩增终止子  $T_{CYC1}$ 。以质粒 pKLAC1-*cym* 为模板,使用引物 BOC-EXP-F 和 BOC-EXP-R 扩增出带有信号肽的小牛胰凝乳酶酶原 *cym* 基因;使用引物 AMDS-EXP-F 和 AMDS-EXP-R 扩增出筛选标记 *amdS* 基因。以质粒 pET28a 为模板,使用引物 pET28a-REVF 和 pET28a-REVR 扩增出用于在大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 中进行传代及筛选的骨干质粒。参照一步克隆试剂盒说明书,将 PCR 扩增出的片段进行同源连接,得到含有小牛胰凝乳酶酶原表达框的质粒 pETKL。

以乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*) GG799 菌株基因组 DNA 为模板,分别使用 URA3-PET-F 和 URA3-PETRER, URA3-PETREF 和 URA3-PET-R 作为引物,扩增出 2 段长度在 1 000 bp 左右的同源片段。以 pETKL 为模板,使用 BOCHY-URA3-PET-F 和 BOCHY-URA3-PET-R 作为引物扩增出小牛胰凝乳酶酶原表达框片段,使用重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR)将得到的同源片段和表达框连接,得到靶点为 *ura3* 基因位点的线性片段用于整合表达。以 pETKL 为模板使用引物 pET28a-REVF 和 pET28a-REVR 扩出质粒骨架,参照一步克隆试剂盒进行同源连接,得到质粒 pETKL-URA3。

#### (2) CRISPR/Cas9 质粒构建

以质粒 LHZ515 作为模板,使用 PKCAS-F

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
pET28a-REVF	CTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGA	24
pET28a-REVR	CCGCACTTATGACTGTCTTCTTTA	24
TEFP-EXP-F	AGAAGACAGTCATAAGTGCGGATAGCTTCAAAATGTTTCTAC	42
TEFP-EXP-R	TAATATAGTAGAGAATTTTCATTTTTCCCGTTCTAGAAAAGTT	42
BOC-EXP-F	AAGTTTTCTAGAACGGGAAAAATGAAATTCTCTACTATATTA	42
BOC-EXP-R	ATTACATGACTCGAGAAGAGATTAAGCGGCCGCAGCGCGCC	42
CYCT-EXP-F	GCGCGCCTGCGGCCGCTTAATCTCTTCTCGAGTCATGTAAT	42
CYCT-EXP-R	ACCCGGAAACAACAAAAGGATGCAAATTAAGCCTTCGAGCG	42
AMDS-EXP-F	CGCTCGAAGGCTTTAATTTGCATCCTTTTGTGTTTCCGGGT	42
AMDS-EXP-R	GGATATAGTTCTCTCTTTCAGAACACACAATATGCATGTAAT	42
URA3-PET-F	AGAAGACAGTCATAAGTGCGGTGTCTCTTCCCCTTAATGATC	42
URA3-PET-R	TCAGCAAGCATCAATAATCCC	21
BOCHY-URA3-PET-F	TCGTAAAAGGTTTAAAGAAGATAGCTTCAAAATGTTTCTAC	42
BOCHY-URA3-PET-R	CCGCACTTATGACTGTCTTCTAACACACAATATGCATGTAAT	42
URA3-PETREF	ATTGTCTTCCAAGGGTTCTCT	21
URA3-PET-R	GTAGAAACATTTTGAAGCTATCTTCTTTAAACCTTTTAACGA	42
PKCAS-F	CGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGTTAATTAAGCACTGGCCGTC	42
CYCT-R	GACGGCCAGTGCTTAATTAACGCAAATTAAGCCTTCGAGCG	42
AMDS-F	TATTTCTAGCTCTAAAACCTGTGATCTTCAGTTCGGCCGATCATTTATCTTTCA	56
AMDS-R	AGTGAAAGATAAATGATCGGCCGAACTGAAGATCACAGGTTTTAGAGCTAGA	56

和 CYCT-R 作为引物, 使用全质粒 PCR 扩增出带有 sgRNA 位点的 CRISPR/Cas9 质粒, 使用 AMDS-F 和 AMDS-R 作为引物, 构建质粒 pKCAS 用于敲除 *amdS* 筛选基因。

### 1.2.2 感受态细胞制备及转化

*E. coli* JM109 感受态使用化学法进行制备, 取保藏在冰箱的甘油菌在 LB 平板上划线, 37 °C 活化 12 h, 挑取单菌落接种至 4 mL LB 培养基中, 37 °C 培养 12 h。按 1% 接种量转接至装有 40 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 37 °C 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.3–0.5。收集菌体后, 使用  $MgCl_2/CaCl_2$  方法制备大肠杆菌感受态细胞。热激法进行质粒转化, 取感受态细胞加入适量质粒后混匀, 42 °C 热激 90 s 后立刻取出并置于冰上, 冰浴 5 min 后置于 37 °C 摇床, 后培养 1–1.5 h。待后培养结束后, 吸取 100  $\mu$ L 菌液涂布至带有

相应抗生素的筛选平板。

*K. lactis* GG799 感受态使用山梨醇法进行制备。取甘油菌划线至 YPD 平板, 30 °C 活化 2–3 d, 取单菌落接种至 4 mL YPD 摇菌管中, 30 °C 培养 24 h, 按 2% 接种量转接至装有 40 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C 培养至  $OD_{600}$  为 0.8–1.0。收集菌体后, 使用无菌水重悬菌体, 3 300 r/min 离心 10 min 收集细胞, 重复 2 次。经 1 mol/L 山梨醇溶液重悬菌体后, 3 300 r/min 离心 10 min 收集细胞, 感受态菌液按照 100  $\mu$ L 每管分装至 1.5 mL EP 管。

乳酸克鲁维酵母感受态使用电脉冲法进行质粒或线性片段转化。取分装好的感受态菌液放置于预冷完成的电转杯里, 按顺序加入 20  $\mu$ L 的鲑鱼精单链 DNA, 20  $\mu$ L 纯化后的线性片段或质粒, 混匀后使用 1.5 kV、5 ms 条件电击 1 次。

取 1 mL 1 mol/L 山梨醇溶液吹吸混匀后, 置于 30 °C 水浴锅中后培养 1.5–2 h。待培养结束后, 取 100  $\mu$ L 菌液涂布至 YCB 筛选平板或潮霉素筛选平板。

### 1.2.3 多拷贝菌株的构建方法

以单拷贝重组菌株作为出发菌株, 构建 CRISPR/Cas9 敲除质粒, 使用潮霉素维持质粒传代。敲除后失去 *amdS* 基因的重组菌株会失去在 YCB 平板上的生长能力, 将目的基因片段重新转化进菌株后, 生长在 YCB 平板上的阳性菌落均整合有新的表达框。采用 48 孔板筛选的方法挑取单菌落进行发酵, 挑取共约 200 株阳性菌落进行筛选, 测定多拷贝重组菌株发酵液的凝乳活力。

### 1.2.4 紫外诱变育种

将基因组整合有表达框的重组乳酸克鲁维酵母菌株划线于 YPD 平板进行活化, 30 °C 培养 2–3 d 获得单菌落。取单菌落接种于装有 40 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C 培养 20–24 h 后, 取摇瓶中菌液 10 mL 于 50 mL 离心管中, 使用无菌水重复洗涤 3 次后离心收集菌体, 并用相同体积的无菌水进行重悬。在无菌培养皿中加入重悬于无菌水的菌液, 同时放入磁力转子并以 75 r/min 的转速进行搅拌。将上述装置置于距离紫外灯(30 W, UV-C) 20–30 cm 的黑暗环境中分别照射 100–150 s, 以未进行紫外诱变的菌液为对照组, 以紫外灯照射不同时间的菌液为实验组。分别使用无菌水将对照组和实验组的菌液稀释  $10^2$ – $10^4$  倍, 避免平板上菌落生长过于密集。稀释后菌液吹吸混匀后涂布于 YPD 平板, 30 °C 培养 3–4 d。当平板长出单菌落后进行菌落计数, 得到致死率在 80% 左右时的诱变条件, 挑取单菌落进行后续孔板发酵, 用于筛选高表达小牛胰凝乳酶的菌株。

紫外诱变菌株使用平板划线后转接至装有

40 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶, 每隔 24 h 转接相同体积菌液至装有新鲜 40 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中进行传代, 同时转接至装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶进行发酵。连续传代 10 次, 分别测定相应发酵液中的小牛胰凝乳酶活力。

### 1.2.5 孔板及摇瓶发酵

经平板筛选的阳性酵母菌株, 使用孔板发酵测定相应凝乳活力。将单菌落接种至一级 48 孔板中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 得到种子液, 按照 10% 的接种量转接至每孔装有 1 mL YPD 培养基的二级 48 孔板中, 其余菌液使用 30% (质量体积分数) 甘油保存至冰柜中。转接后的二级 48 孔板按照 30 °C、200 r/min 条件振荡培养, 发酵 72 h 后按照 4 000 r/min、20 min 条件离心, 收集上清液并测定凝乳活力。

使用孔板筛选得到的高表达菌株从一级 48 孔板中取出, 划线于 YPD 平板活化, 30 °C 培养 2–3 d, 挑取单菌落接种至装有 40 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C 振荡培养 24 h。按照 2% 的接种量转接至装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶, 30 °C 振荡培养, 发酵 96 h 后按照 8 000 r/min、10 min 条件离心, 收集上清液并测定凝乳活力。

### 1.2.6 小牛胰凝乳酶活力测定

本研究所构建的重组乳酸克鲁维酵母菌株所表达的小牛胰凝乳酶均为胞外分泌表达, 发酵完成后对发酵液进行离心(8 000 r/min, 10 min), 收集含有小牛胰凝乳酶的上清液进行活力测定。由于重组乳酸克鲁维酵母菌表达的小牛胰凝乳酶是酶原的形式, 首先需要对酶原进行激活, 然后对有活力的小牛胰凝乳酶进行活力测定。

#### (1) 小牛胰凝乳酶酶原激活

取上清液于离心管中, 使用 1 mol/L HCl 溶

液进行酸化,调整上清液 pH 至 2.0 左右,室温放置 2 h 后,使用 1.5 mol/L 的 Tris 溶液回调上清液 pH 至 5.5 左右,此时上清液中均为具有凝乳酶活力的小牛胰凝乳酶。

## (2) 小牛胰凝乳酶活力测定

小牛胰凝乳酶活力测定方法参考 Arima 法<sup>[23]</sup>。取 10% (质量体积分数)的脱脂乳粉溶解于 10 mmol/L 的氯化钙溶液,室温放置并缓慢搅拌 1 h 后所得乳液即可用于凝乳酶活力测定。取 5 mL 制备完成的乳液于试管中,放置于 37 °C 水浴锅中 10 min,加入 500  $\mu$ L 酶原激活后的上清液并开始计时,反应过程中使用搅拌棒不断搅拌,当试管内壁上出现微小白色膜状物时代表到达反应终点,此时停止计时并记录反应完成所需要时间(T)。每个实验设 3 组平行并确保平行实验中乳液凝固时间相差小于 5 s,酶活力(U)按照以下公式计算:

$$\text{Activity} = T \times U \times n / t$$

其中  $T$  代表标准凝乳酶样品到达反应终点时所需要时间,单位为 s;  $U$  代表标准凝乳酶样品活力,单位为 U/mL;  $n$  代表发酵上清液稀释倍数,  $t$  代表发酵上清液到达反应终点所需要时间,单位为 s。

### 1.2.7 5 L 发酵罐发酵

5 L 发酵罐培养基(g/L): 葡萄糖 45.00、蛋白胨 25.00、酵母提取物 15.00、磷酸二氢钾 3.00、磷酸氢二钾 2.00、氯化钙 5.00、硫酸酶 0.75。

取保藏在冰箱中的甘油菌划线于 YPD 平板,30 °C 活化 2-3 d,挑取单菌落至装有 40 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中,30 °C 摇床振荡培养 20-24 h。取发酵液按照 2% 接种量接种至装有 125 mL YPD 培养基的 500 mL 摇瓶中,30 °C 摇床振荡培养 20-24 h 作为种子液。种子液按照 5% 接种量接种至含有 2.5 L 发酵培养基

的 5 L 发酵罐中,在培养温度 30 °C 下进行分批补料发酵。

分批补料发酵条件如下:通气量为 1.5 vvm,初始葡萄糖浓度为 45 g/L,使用 50% 的氨水和 10% 的硫酸维持培养基 pH 在 6.5 左右。当发酵罐培养基中残糖浓度接近 1 g/L 时,按照 6 g/(L·h) 的速度流加补料葡萄糖母液。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸克鲁维酵母重组菌的构建

#### 2.1.1 单拷贝菌株的构建

为了得到能够稳定表达小牛胰凝乳酶酶原的乳酸克鲁维酵母重组菌株,选取强启动子  $P_{TEF}$  以及 Kozak 序列 GGAAA 构建表达框,按照 1.2.1 中所述的方法,构建得到含有小牛胰凝乳酶酶原表达框的质粒 pETKL 用于基因组整合表达。

在使用发酵罐进行高密度发酵时,需要在培养基中补充抗生素或使用特定培养基成分来维持发酵过程中的筛选压力,从而保证游离质粒的传代扩增,而基因组整合型则保证携带有目的基因的重组菌能够在生产中稳定表达。基于以上原因,在构建得到小牛胰凝乳酶酶原表达框后,本研究选择了 *ura3* 位点进行整合,该位点作为常见的筛选位点被广泛应用在酿酒酵母等传统酵母中,对蛋白分泌表达的影响较小。按照 1.2.1 中所述方法得到质粒 pETKL-URA3 (图 1),并构建获得单拷贝重组菌株 KLUcym。

#### 2.1.2 多拷贝菌株的构建

有研究表明重组菌株中异源蛋白的表达量与拷贝数量相关,本研究构建了不同拷贝数量的重组菌以提高异源蛋白的表达水平。以单拷贝重组菌株 KLUcym 为出发菌株,通过敲除筛选基因 *amdS*,使出发菌株失去乙酰胺利用能力,从而进行多拷贝菌株的构建。按照 1.2.3 所

述方法，敲除重组菌株中的筛选标签，将敲除菌株分别划线于筛选平板 YCB 以及 YPD 平板，失去 *amdS* 基因的菌株因不能利用平板中的唯一氮源乙酰胺，在 YCB 平板上无法生长(图 2)。

以敲除筛选基因 *amdS* 的重组菌株作为出发菌株，按照 1.2.3 所述的方法进行表达框基因组整合，从而得到双拷贝重组菌株 KLUcym<sup>D</sup> 以及三拷贝重组菌株 KLUcym<sup>T</sup>。

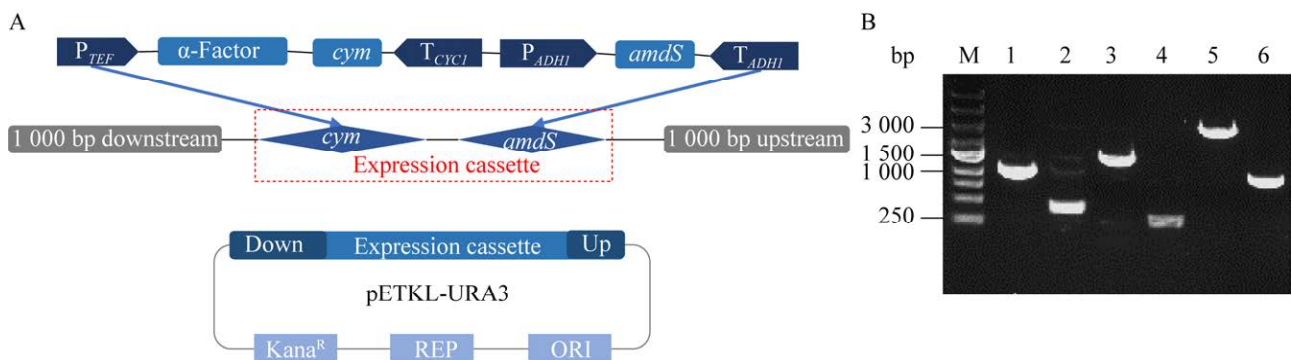


图 1 小牛胰凝乳酶原基因组同源整合表达框的构建及验证 A: pETKL-URA3 质粒构建示意图。B: pETKL-URA3 质粒琼脂糖核酸凝胶电泳验证图

Figure 1 Construction of bovine chymosin homologous expression cassette. A: Construction of plasmid pETKL-URA3. B: Identification of plasmid pETKL-URA3 by agarose gel electrophoresis. M: DNA Ladder DL2503; 1: Upstream homologous arm, 1 000 bp; 2: Promoter  $P_{TEF}$ , 400 bp; 3: Prochymosin gene *cym*, 1 460 bp; 4: Terminator  $T_{CYC1}$ , 250 bp; 5: Screening gene *amdS*, 3 000 bp; 6: Downstream homologous arm, 1 000 bp.

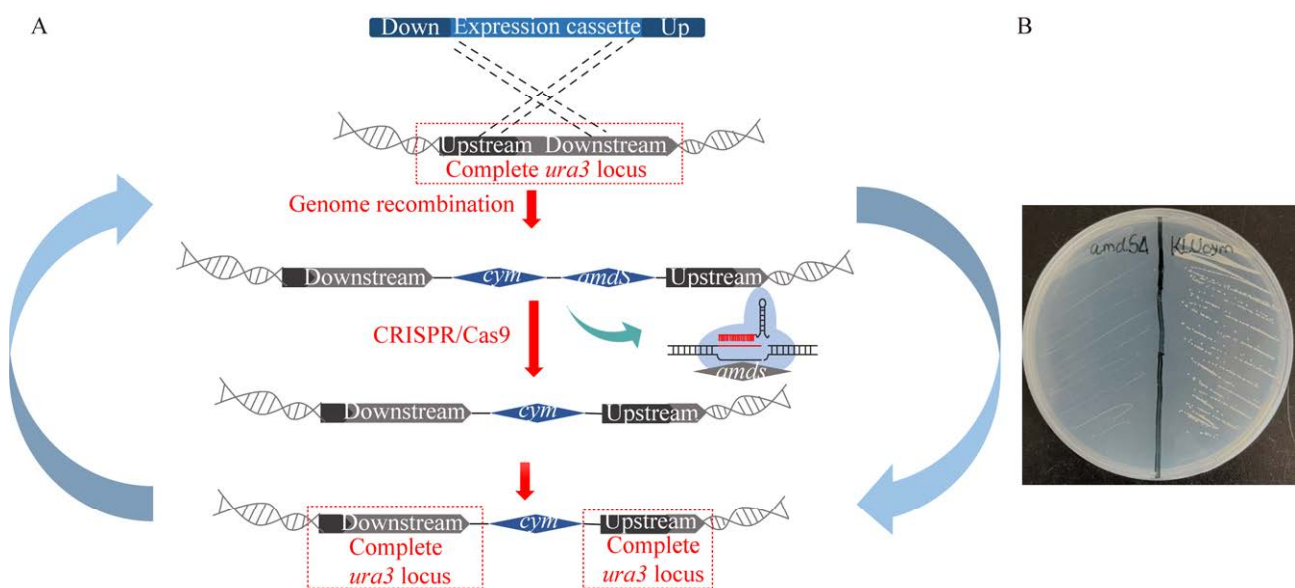


图 2 CRISPR/Cas9 技术敲除重组菌株筛选基因及多拷贝菌株构建的示意图

Figure 2 Construction of multi-copy recombinant strain. A: Deletion of recombinant strain screening gene *amdS* by CRISPR/Cas9. B: Construction of multi-copy recombinant strain using YCB plates.



### 2.1.3 重组菌株的摇瓶发酵验证

构建完成的重组菌株 KLUcym、KLUcym<sup>D</sup> 和 KLUcym<sup>T</sup> 按照 1.2.5 的方法进行摇瓶发酵。离心收集发酵液上清后,按照 1.2.6 所述的方法进行活力测定。单拷贝菌株 KLUcym 和双拷贝菌株 KLUcym<sup>D</sup> 经过 96 h 摇瓶发酵后,活力分别达到了 40 U/mL 和 70 U/mL,双拷贝较单拷贝菌株 KLUcym 的摇瓶发酵活力增加约 75%。三拷贝菌株 KLUcym<sup>T</sup> 经过 96 h 摇瓶发酵后,活力达到了 78 U/mL,与双拷贝菌株 KLUcym<sup>D</sup> 相比提高了约 11% (图 3A)。

为了探究不同拷贝数重组菌株的活力差别是否来自于菌体生长的差异,本研究绘制了发酵期间菌体的生长曲线(图 3B)。虽然三拷贝重组菌株 KLUcym<sup>T</sup> 较另外 2 种重组菌株的生长速率较慢,但这 3 种菌株在发酵终点的菌体浓度相近,表明影响活力的因素并非菌体之间的生长差异。

为了进一步研究三拷贝重组菌株 KLUcym<sup>T</sup> 活力提高水平较小是否由于培养基中氮源成分的不足,本研究调整培养基成分后进行发酵验

证。控制复合氮源浓度为 40 g/L,调整葡萄糖浓度分别为 30、45 和 60 g/L 进行摇瓶发酵,比较不同浓度时发酵液中的小牛胰凝乳酶表达水平(图 4)。当葡萄糖浓度为 45 g/L 时,活力达到最高值 78 U/mL;当葡萄糖浓度为 30 g/L 时,培养基中氮源处于过量状态,理论上菌株能够将大部分氮源用于合成异源蛋白小牛胰凝乳酶,但此时活力值较低,仅为 58 U/mL;当提高葡萄糖浓度为 60 g/L 时,菌体生长旺盛,活力也达到较高水平 66 U/mL。随着葡萄糖浓度的增加,重组菌株培养基中氮源依次呈现过量-适量-缺乏这 3 个状态,此时异源蛋白合成受到菌体浓度的限制。当葡萄糖浓度在 45 g/L 时,菌体的生长以及异源蛋白合成处于相对平衡的状态,在发酵过程中既满足了菌体的快速生长,也能保证异源蛋白的合成。控制葡萄糖浓度为 45 g/L,调整复合氮源浓度分别为 30、40 和 50 g/L 进行发酵。当减少氮源用量时,用于菌体生长及异源蛋白合成的物质减少,小牛胰凝乳酶产量降低;当增加氮源用量时,影响小牛胰凝乳酶合成的主要因素则是菌体的生长情况。

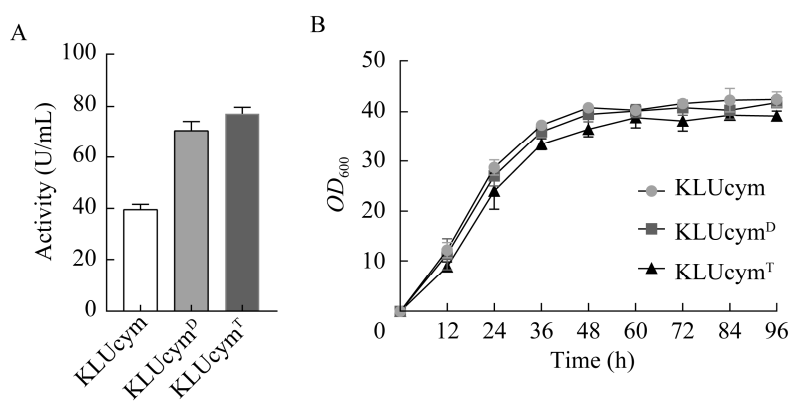


图 3 重组菌株 KLUcym、KLUcym<sup>D</sup> 及 KLUcym<sup>T</sup> 在 500 mL 摇瓶中的发酵 96 h 活力数据及生长曲线 A: 重组菌株 96 h 发酵终点的活力数据. B: 重组菌株摇瓶发酵的生长曲线

Figure 3 Clotting activity and growth curves of recombinant strain KLUcym, KLUcym<sup>D</sup> and KLUcym<sup>T</sup> for 96 h in 500 mL shake flask fermentation. A: Clotting activity of different recombinant strains after 96 h fermentation. B: Growth curves of different recombinant strains.

当培养基中氮源处于过量状态时，三拷贝重组菌株 KLUcym<sup>T</sup> 活力并没有大幅度提升。乳酸克鲁维酵母是葡萄糖效应阴性菌株，呼吸代谢起主要作用，控制培养基中碳氮源含量达到菌体生长和目的蛋白生产的平衡，是重组菌株生产小牛胰凝乳酶的关键因素。由此可见，虽然拷贝的增加会提高蛋白表达量，但宿主菌自身蛋白加工能力是限制异源蛋白胞外表达水平

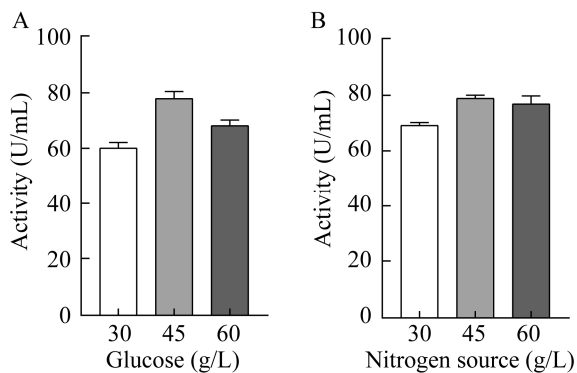


图4 培养基成分对于重组菌株 KLUcym<sup>T</sup> 发酵生产小牛胰凝乳酶的影响 A: 不同葡萄糖浓度对发酵的影响. B: 不同氮源浓度对发酵的影响

Figure 4 Effects of medium components on bovine chymosin production of recombinant strain KLUcym<sup>T</sup>. A: Effect of different glucose concentration on bovine chymosin production. B: Effect of different nitrogen sources on bovine chymosin production.

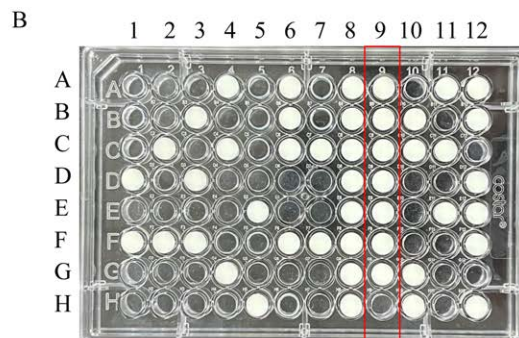
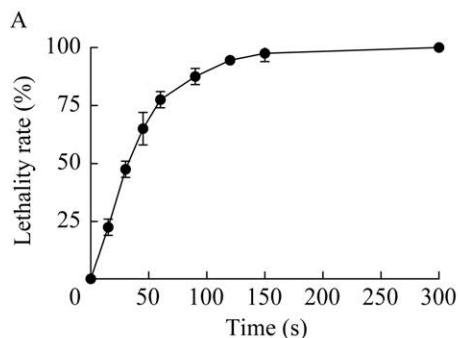


图5 重组菌株 KLUcym<sup>D</sup> 的紫外诱变育种筛选 A: 重组菌株 KLUcym<sup>D</sup> 的紫外诱变致死率曲线图. B: 紫外诱变育种的 96 孔板筛选图(9A-9G: KLUcym<sup>D</sup> 对照组, 9H: 空白对照组)

Figure 5 UV-mutagenesis of strain KLUcym<sup>D</sup>. A: Lethality rate curve of recombinant strain KLUcym<sup>D</sup>. B: 96 well-plate screening of UV mutants (9A-9G: KLUcym<sup>D</sup>, 9H: Blank control).

的主要因素。

## 2.2 重组菌株的紫外诱变育种

通过构建小牛胰凝乳酶表达框并使用 CRISPR/Cas9 技术敲除筛选基因，成功构建了多拷贝菌株，其中，三拷贝和双拷贝菌株的蛋白表达水平接近，这可能是源于重组菌株内部的蛋白合成分泌途径限制。对菌株分泌途径的改造往往涉及多种酶的改造，而诱变技术能够对菌株进行全基因组的突变。在之前的发酵中，双拷贝菌株的蛋白表达量有较大的提升，因此选择双拷贝菌株 KLUcym<sup>D</sup> 进行紫外诱变育种。按照 1.2.4 所述的方法，对于对数生长前中期的重组菌株进行诱变处理，通过预实验确定诱变时间为 120 s，诱变致死率在 80% (图 5A)。诱变完成后的菌株进行孔板活力筛选(图 5B)，按照 1.2.5 所述的方法进行孔板初筛，总共筛选了约 2 000 株突变株。从中选取了 240 株活力提高水平大于 30% 的突变株进行复筛，采用摇瓶发酵并测定相应凝乳活力。

以 KLUcym<sup>D</sup> 作为出发菌株，通过孔板筛选后，筛选到 2 株高活力表达菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M1 和 KLUcym<sup>D</sup>-M2，2 株菌株经过摇瓶发酵 96 h，测得凝乳活力分别为 120 U/mL 和 270 U/mL (图 6A)。

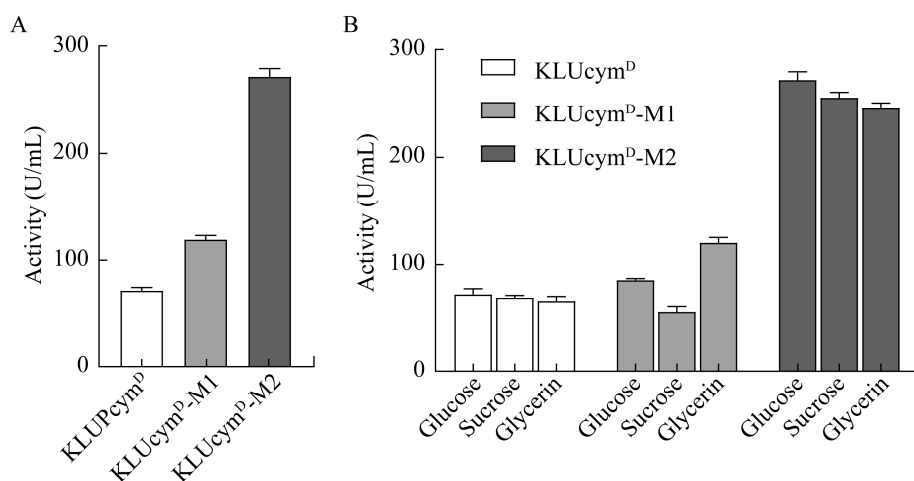


图6 紫外诱变菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M1 和 KLUcym<sup>D</sup>-M2 在 500 mL 摇瓶中的发酵 96 h 的活力水平 A: 摇瓶发酵活力. B: 采用不同碳源时的发酵活力

Figure 6 Fermentation of recombinant strain KLUcym<sup>D</sup>-M1 and KLUcym<sup>D</sup>-M2 in 500 mL shake flasks after 96 h. A: Clotting activity of different recombinant strains. B: Clotting activity of different recombinant strains using glucose, sucrose and glycerin as carbon sources.

分别选取葡萄糖、蔗糖以及甘油作为发酵碳源,对紫外诱变后的两株重组菌株进行摇瓶发酵。当重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M1 使用甘油作为碳源时,较使用葡萄糖进行发酵时活力提高约 50%,而使用蔗糖进行发酵时活力则有明显下降。与 KLUcym<sup>D</sup>-M1 不同,菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 在使用葡萄糖作为碳源时,摇瓶发酵的活力最高,达到最高值 270 U/mL,而使用蔗糖和甘油时发酵水平相近,且均低于使用葡萄糖作为碳源时的发酵活力(图 6B)。

诱变菌株在连续传代后可能会发生回复突变,需要进行连续传代稳定性验证,按照 1.2.6 所述的方法对每一代菌株进行活力测定,紫外诱变菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 在连续传代 10 代后,仍能保持较为稳定的小牛胰凝乳酶表达能力,发酵液中酶活力没有明显变化,说明经过紫外诱变后的重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 具有较好的遗传稳定性(图 7)。

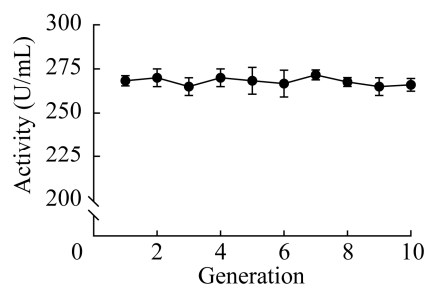


图7 KLUcym<sup>D</sup>-M2 传代稳定性的检测  
Figure 7 Genetic stability test of KLUcym<sup>D</sup>-M2.

### 2.3 5 L 发酵罐中发酵验证

选择重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2,在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵。发酵罐中菌体浓度在发酵 72 h 时达到最大值,胞外小牛胰凝乳酶原的蛋白表达量增速稍慢于菌体生长速度,在 76 h 时达到最大值 600 U/mL (图 8)。因此,重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 在 5 L 发酵罐中能够正常进行高密度发酵产酶,进一步证明了本研究构建的重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 具有工业化应用的前景。

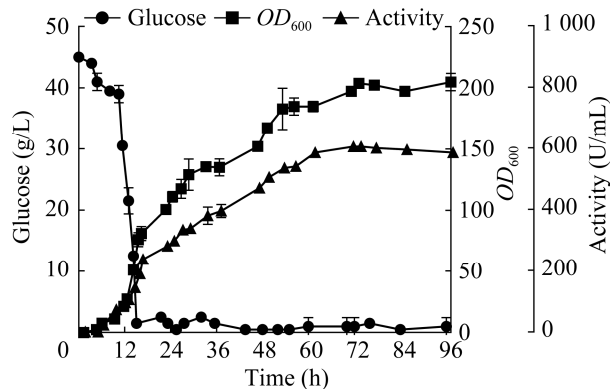


图8 重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 在 5 L 发酵罐中的发酵产酶时间进程曲线

Figure 8 Fermentation of recombinant strain KLUcym<sup>D</sup>-M2 in a 5 L bioreactor.

### 3 讨论与结论

作为一种常见的食品安全菌株，从乳制品中分离的乳酸克鲁维酵母被批准用于多种食品酶的生产。

微生物宿主胞外分泌表达异源蛋白的水平受到多方面因素的影响，如表达元件中不同强度的启动子<sup>[24]</sup>、Kozak 序列以及跨膜分泌标签<sup>[25]</sup>。蛋白合成过程中过快的翻译往往会导致蛋白的错误折叠，使酶失去催化活力。然而，真核宿主菌的异源蛋白表达往往受到多方面因素的影响，如启动子强度、分泌肽的选择以及蛋白分泌途径中细胞器的影响。随着合成生物学的发展，多种基因编辑方法的使用加快了重组菌株的改造效率，但在乳酸克鲁维酵母中的相关应用较少，同时对其蛋白分泌途径的研究也较为匮乏。因此，本研究构建了异源蛋白表达框并通过诱变技术提高蛋白表达量，为乳酸克鲁维酵母作为细胞工厂表达异

源蛋白的后续研究提供了一定基础。

本研究构建了小牛胰凝乳酶原表达框，基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了乳酸克鲁维酵母多拷贝菌株，其中，双拷贝菌株 KLUcym<sup>D</sup> 及三拷贝菌株 KLUcym<sup>T</sup> 摇瓶水平发酵的酶活力分别达到了 70 U/mL 和 78 U/mL。不同拷贝数的重组菌株在发酵终点的菌体浓度差别较小，蛋白表达量的区别可能是源于菌体内部负责蛋白合成及分泌途径的核糖体等细胞器能力的限制<sup>[26]</sup>。已报道的研究中，随着重组菌株中拷贝数量增加，蛋白表达量的变化往往呈现先增后减的趋势，过多的拷贝可能会加重菌体蛋白合成途径的压力<sup>[27-28]</sup>。研究表明，蛋白的分泌表达受到分泌途径中相关酶的调控<sup>[29]</sup>，而基因组整合插入可能会导致分泌途径中不同酶的表达水平发生变化，加重菌体内部代谢压力。虽然异源蛋白表达量与拷贝数量有关，但两者之间并不是精准的线性关系。在一定范围内，拷贝数量的增加会导致蛋白表达量的提升。随着拷贝的增加，蛋白表达量会受到宿主菌蛋白分泌途径中细胞器加工能力的限制，从而停止增加甚至有明显下降<sup>[30-31]</sup>。然而多拷贝菌株的小牛胰凝乳酶表达水平较低，尚不能满足大规模工业生产。因此，为提高重组菌株的异源蛋白分泌表达量，通过紫外诱变育种技术，在多层诱变筛选后得到了一株胞外分泌小牛胰凝乳酶重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2，摇瓶水平发酵的酶活力达到了 270 U/mL，在 5 L 发酵罐中的小牛胰凝乳酶产量为 600 U/mL，如表 3 所示，本研究构建的重组菌株具有良好的发酵活力。

表3 乳酸克鲁维酵母表达小牛胰凝乳酶的研究进展

Table 3 Comparison of studies on bovine chymosin production by *Kluyveromyces lactis*

Method	Activity	References
Expression cassette integration	83 SU/mL in shake flask	[16]
Expression cassette integration and point mutation	99.67 SU/mL in shake flask	[17]
Fermentation condition optimization	700 SU/mL in 5 L bioreactor	[18]
Multi-copy integration and UV mutagenesis	600 U/mL (860 SU/mL) in 5 L bioreactor	This study

重组菌株 KLUcym<sup>D</sup>-M2 中异源蛋白的胞外表达水平的提升可能来自于两个方面：蛋白翻译表达水平的提升或者蛋白分泌途径的增强。采用紫外诱变育种技术会对重组菌株全基因组进行突变，这可能增强某些蛋白转录和翻译的元件，提高了胞内蛋白的总表达量，从而提升了小牛胰凝乳酶酶原的胞外分泌表达量。真核宿主在合成肽链后，分泌途径中的细胞器会对肽链进行加工，因此蛋白分泌途径中相关蛋白表达水平的变化可能导致异源蛋白的胞外分泌水平发生改变，如内质网中帮助多肽链进行折叠的蛋白二硫键异构酶、进行糖基化修饰加工的糖基转移酶、高尔基体上进行分类转运的蛋白以及细胞膜组成蛋白等<sup>[32]</sup>。

异源蛋白翻译合成后一般需要经过蛋白分泌途径的加工，再经过囊泡运输分泌至胞外。新合成的肽链通过信号肽和信号识别颗粒结合，靶向进入内质网腔。肽链在内质网经过正确的折叠和修饰加工后被转运至高尔基体，在高尔基体进一步分类加工后，经由囊泡运输释放到胞外<sup>[33]</sup>。在诱变育种过程中，宿主菌蛋白分泌途径相关蛋白的表达水平可能上调，如高尔基体中负责运输异源蛋白至细胞膜的网格蛋白，以及负责将异源蛋白从内质网运输到高尔基体的被膜小泡 COP II 等，囊泡运输过程中不同蛋白表达水平的上调最终导致小牛胰凝乳酶酶原的胞外分泌表达量增加<sup>[34-35]</sup>。同时，内质网、高尔基体等细胞器上帮助蛋白分泌的酶可能在诱变后表达水平提高，从而进一步帮助异源蛋白分泌至胞外。

目前对于乳酸克鲁维酵母表达小牛胰凝乳酶的研究，主要基于响应面法优化发酵相关参数，对于底盘细胞改造较少。在工业生产中，通过上游改造获得良好的底盘细胞可实现更高的生产效率。本研究通过 CRISPR/Cas9 结合紫

外诱变技术，得到一株具有良好的传代稳定性的高产小牛胰凝乳酶菌株。通过 5 L 发酵罐分批补料发酵，进一步提高了重组菌株的发酵产酶水平。本研究证实了乳酸克鲁维酵母作为异源蛋白表达宿主的巨大潜力，为工业化生产小牛胰凝乳酶奠定了基础。

## 致谢

感谢复旦大学生命科学学院上海工业菌株工程技术研究中心吕红教授研究团队提供质粒 LHZ515。

## REFERENCES

- [1] GILLILAND GL, WINBORNE EL, NACHMAN J, WLODAWER A. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1990, 8(1): 82-101.
- [2] BARKHOLT PEDERSEN V, ASBÆK CHRISTENSEN K, FOLTMANN B. Investigations on the activation of bovine prochymosin[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1979, 94(2): 573-580.
- [3] VALLEJO JA, AGEITOS JM, POZA M, VILLA TG. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(22): 10606-10610.
- [4] CHOCKCHAIWASDEE S, ATHANASOPOULOS VI, NIRANJAN K, RASTALL RA. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(4): 434-443.
- [5] ESTEBAN PF, VAZQUEZ de ALDANA CR, del REY F. Cloning and characterization of 1,3-beta-glucanase-encoding genes from non-conventional yeasts[J]. *Yeast*, 1999, 15(2): 91-109.
- [6] van DEN BERG JA, van der LAKEN KJ, van OUYEN AJ, RENNIERS TC, RIETVELD K, SCHAAP A, BRAKE AJ, BISHOP RJ, SCHULTZ K, MOYER D. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin[J]. *Bio/Technology* (Nature Publishing

- Company), 1990, 8(2): 135-139.
- [7] QIU YB, LEI P, WANG R, SUN L, LUO ZS, LI S, XU H. *Kluyveromyces* as promising yeast cell factories for industrial bioproduction: from bio-functional design to applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 64: 108125.
- [8] WAGNER JM, ALPER HS. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances[J]. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 2016, 89: 126-136.
- [9] YUN CR, KONG JN, CHUNG JH, KIM MC, KONG KH. Improved secretory production of the sweet-tasting protein, brazzein, in *Kluyveromyces lactis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(32): 6312-6316.
- [10] SPOHNER SC, SCHAUM V, QUITMANN H, CZERMAK P. *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 222: 104-116.
- [11] MADHAVAN A, SUKUMARAN RK. Promoter and signal sequence from filamentous fungus can drive recombinant protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 165: 302-308.
- [12] SAKHTAH H, BEHLER J, ALI-REYNOLDS A, CAUSEY TB, VAINAUSKAS S, TARON CH. A novel regulated hybrid promoter that permits autoinduction of heterologous protein expression in *Kluyveromyces lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(14): e00542-e00519.
- [13] SALIOLA M, MAZZONI C, SOLIMANDO N, CRISÀ A, FALCONE C, JUNG G, FLEER R. Use of the KlADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 53-60.
- [14] ZIOGIENE D, VALAVICIUTE M, NORKIENE M, TIMINSKAS A, GEDVILAITE A. Mutations of *Kluyveromyces lactis* dolichol kinase enhances secretion of recombinant proteins[J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(3): foz024.
- [15] ZHAO XL, HUSSAIN MH, MOHSIN A, LIU ZB, XU ZX, LI ZX, GUO WQ, GUO MJ. Mechanistic insight for improving butenyl-spinosyn production through combined ARTP/UV mutagenesis and ribosome engineering in *Saccharopolyspora pogona*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 11: 1329859.
- [16] 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[J]. *食品科学*, 2008, 29(7): 297-302.
- FENG Z, ZHANG LW. Study on expression of prochymosin in *Kluyveromyces lactis* and genetic stability[J]. *Food Science*, 2008, 29(7): 297-302 (in Chinese).
- [17] 袁伟. 牛凝乳酶原基因的定点突变与酶性质研究[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2011.
- YUAN W. Site-directed mutagenesis of gene encoding bovine prochymosin and their enzymatic properties[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2011 (in Chinese).
- [18] 徐龙龙. 重组乳酸克鲁维酵母发酵制取牛凝乳酶[D]. 南阳: 南阳师范学院硕士学位论文, 2017.
- XU LL. Fermentation preparation of bovine chymosin by recombinant *Kluyveromyces lactis*[D]. Nanyang: Master's Thesis of Nanyang Normal University, 2017 (in Chinese).
- [19] CANDIOTI MC, HYNES E, PEROTTI M, ZALAZAR CA. Proteolytic activity of commercial rennets and pure enzymes on whey proteins[J]. *Milchwissenschaft*, 2002, 57(9): 546-550.
- [20] STEENSELS J, SNOEK T, MEERSMAN E, NICOLINO MP, VOORDECKERS K, VERSTREPEN KJ. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(5): 947-995.
- [21] YAMADA R, KASHIHARA T, OGINO H. Improvement of lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through UV mutagenesis[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(5): 99.
- [22] WU PP, ZHOU JG, YU Y, LU H. Characterization of essential elements for improved episomal expressions in *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Biotechnology Journal*, 2022, 17(4): 2100382.
- [23] ARIMA K, YU J, IWASAKI S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lindt*[M]//PERLMAN GE, LORAND L. *Methods in Enzymology: Vol 19*. New York and London: Academic Press, 1970: 446-459.
- [24] XIAO CF, XUE SL, PAN YY, LIU XF, HUANG MT. Overexpression of genes by stress-responsive promoters increases protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(8): 203.
- [25] XUE SL, LIU XF, PAN YY, XIAO CF, FENG YZ, ZHENG L, ZHAO MM, HUANG MT. Comprehensive

- analysis of signal peptides in *Saccharomyces cerevisiae* reveals features for efficient secretion[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(2): 2203433.
- [26] WENTZ AE, SHUSTA EV. Enhanced secretion of heterologous proteins from yeast by overexpression of ribosomal subunit RPP0[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 24(3): 748-756.
- [27] ZHENG J, GUO N, ZHOU HB. A simple strategy for the generation of multi-copy *Pichia pastoris* with the efficient expression of mannanase[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(12): 1410-1416.
- [28] LIU Y, ZHU XQ, LI WD, WEN H, LIU CS. Enhancing ergosterol production in *Pichia pastoris* GS115 by overexpressing squalene synthase gene from *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(5): 338-345.
- [29] LI YL, XIAO CF, PAN YY, QIN L, ZHENG L, ZHAO MM, HUANG MT. Optimization of protein folding for improved secretion of human serum albumin fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(47): 18414-18423.
- [30] NACKEN V, ACHSTETTER T, DEGRYSE E. Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Gene*, 1996, 175(1/2): 253-260.
- [31] YAMADA R, TANAKA T, OGINO C, KONDO A. Gene copy number and polyploidy on products formation in yeast[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(4): 849-857.
- [32] ZHANG SY, FENG Z, ZENG QM, ZENG JH, LIU HJ, DENG P, LI SY, LI N, WANG JQ. Enhancing pullulan production in *Aureobasidium pullulans* through UV mutagenesis breeding and high-throughput screening system[J]. *Fermentation-Basel*, 2024, 10(2): 103.
- [33] BAO JC, HUANG MT, PETRANOVIC D, NIELSEN J. Balanced trafficking between the ER and the Golgi apparatus increases protein secretion in yeast[J]. *Amb Express*, 2018, 8(1): 37.
- [34] YODA K, NODA Y. Vesicular transport and the Golgi apparatus in yeast[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(1): 1-11.
- [35] DAMASCENO LM, HUANG CJ, BATT CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 31-39.

(本文责编 陈宏宇)