



黑曲霉酸性蛋白酶 PrA 在毕赤酵母中的高效表达

李炳坤¹, 郑毅恒², 王飞^{1*}, 成莉凤³, 李丁⁴

1 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

2 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471000

3 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205

4 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014

李炳坤, 郑毅恒, 王飞, 成莉凤, 李丁. 黑曲霉酸性蛋白酶 PrA 在毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3314-3329.

LI Bingkun, ZHENG Yiheng, WANG Fei, CHENG Lifeng, LI Ding. Efficient expression of the *Aspergillus niger* acidic protease PrA in *Pichia pastoris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3314-3329.

摘要:【目的】本研究致力于获得酸性蛋白酶 PrA 的高产酵母菌株, 以便在食品加工、饲料添加剂等领域进行应用。【方法】构建毕赤酵母表达菌株, 在摇瓶水平重组表达 PrA 并检测其酶学性质。通过信号肽改造、基因剂量优化、共表达分子伴侣等措施逐步提高 PrA 产量, 并利用高密度发酵进一步提高表达水平。【结果】PrA 的比酶活为 3 974.00 U/mg, 最适反应 pH 为 3.0, 最适反应温度为 45 °C。初始菌株的 PrA 产量达到 738.03 U/mL。通过使用 MF4I 信号肽将 PrA 产量提高至 1 206.52 U/mL, 增加 PrA 基因拷贝数导致产量提高至 2 406.47 U/mL。进一步共表达分子伴侣或分子伴侣组合将 PrA 产量提高至 4 091.27 U/mL。经过高密度发酵, 发酵 168 h 酶活达到 43 088.00 U/mL, 与初始产量相比提高 58.4 倍。【结论】在毕赤酵母中成功实现了酸性蛋白酶 PrA 的高效表达, 为其未来的工业化应用奠定了基础。这些结果为进一步研究和开发该酶在食品加工和饲料添加剂领域的应用提供了重要参考。

关键词: 毕赤酵母; 酸性蛋白酶 PrA; 信号肽; 基因剂量; 分子伴侣; 高密度发酵

资助项目: 国家自然科学基金(32002316); 湖南省自然科学基金(2023JJ50315)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32002316) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (2023JJ50315).

*Corresponding author. E-mail: wangfei179@163.com

Received: 2024-02-26; Accepted: 2024-05-07; Published online: 2024-05-13

Efficient expression of the *Aspergillus niger* acidic protease PrA in *Pichia pastoris*

LI Bingkun¹, ZHENG Yiheng², WANG Fei^{1*}, CHENG Lifeng³, LI Ding⁴

1 College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

2 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China

3 Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, Hunan, China

4 Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To obtain a yeast strain efficiently producing the acidic protease PrA for applications in food processing, feed additives, and other related industries. **[Methods]** We constructed a recombinant strain of *Pichia pastoris* expressing PrA by fermentation in shake flasks and measured the enzymatic properties of the expressed PrA. Several strategies, such as signal peptide modification, gene dosage optimization, and co-expression with molecular chaperones, were employed to enhance the production of PrA. Additionally, high-density fermentation was employed to further improve the expression level. **[Results]** The expressed enzyme PrA showcased the specific activity of 3 974.00 U/mg, with the optimum performance at pH 3.0 and 45 °C. The production of PrA by the parental strain was 738.03 U/mL. The modification of the MF4I signal peptide increased the production of PrA to 1 206.52 U/mL. Moreover, an increase in the copy number of *prA* further increased the PrA production to 2 406.47 U/mL. Additionally, co-expression with single or combined molecular chaperones increased the PrA production to 4 091.27 U/mL. After undergoing high-density fermentation, the enzyme activity reached 43 088.00 U/mL within 168 h, representing a 58.4-fold increase compared with the initial production. **[Conclusion]** High-level expression of PrA was achieved in *P. pastoris*, which laid a foundation for the future industrial applications. The results provide valuable insights into the research and development of PrA for applications in food processing and feed additives.

Keywords: *Pichia pastoris*; acidic protease PrA; signal peptide; gene dosage; molecular chaperone; high-density fermentation

蛋白酶是一类能够催化蛋白质水解为多肽和氨基酸的酶, 广泛应用于食品^[1]、皮革、生物防治^[2]、医药^[3]及饲料工业^[4-5]。目前, 主要的蛋白质水解酶分为四大类: 丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶, 后者也称为酸性蛋白酶^[6]。酸性蛋白酶的分子质量往往介于 30–40 kDa, 主要由约 380 个氨基酸组成; 不同来源的酸性蛋白酶具有相似的

空间结构和组成, 其催化区域的序列和残基相对保守; 酸性蛋白酶的活性位点具有 Asp-Thr-Gly 基序和伴生的 Gly-X-X-Gly 基序, 形成蛋白质结构中的 psi 环状结构^[7]。对酸性蛋白酶晶体结构进行 X 射线处理和分析发现, 其由 2 个相似的结构域通过 β 折叠片形成, 每个结构域向蛋白中心的催化口袋提供一个 Asp 残基, 通过与蛋白质结合的配体或底物进行催化反应^[8]。目前,

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是工业化生产有机酸、蛋白酶的主要菌种,其分泌的较多杂蛋白不利于蛋白酶的下流纯化,从而限制其在产品端的应用。因此,如何利用异源表达高效、专一地生产酸性蛋白酶是目前亟待解决的问题。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为一种成熟且广泛使用的酵母表达平台,因其能高效表达真核生物来源的目的蛋白而备受青睐^[9]。首先,毕赤酵母具有较强的分泌表达能力,便于进行下游纯化^[10]。其次,毕赤酵母具有蛋白重折叠机制,分泌表达的重组蛋白的可溶性较好,不会形成包涵体^[11]。通过表达元件优化^[12]、基因剂量优化^[13]、共表达分子伴侣^[14]、高密度发酵等措施^[15]可有效提高目的蛋白产量,从而推动目的蛋白实现工业化应用。

本研究采用了自主研发的新一代无抗化毕赤酵母平台 pMCO,该平台可以在甲醇诱导条件下介导酵母细胞发生基因重组,删除其基因组上的抗生素抗性基因,从而便于后续质粒整合^[16]。目前已使用该平台成功表达犬 α 干扰素、壳聚糖酶、纳米抗体、猪瘟病毒 E2 抗原、猪圆环病毒 3 型 Cap 抗原等多种蛋白质^[17-18]。本研究拟将黑曲霉酸性蛋白酶 PrA 基因在毕赤酵母中进行重组表达,并对其酶学性质进行测定;利用信号肽优化、基因剂量优化和共表达分子伴侣进一步提高产量。相关结果为 PrA 的工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

毕赤酵母 GS115 菌株、大肠杆菌菌株 DH5 α 均购自 Invitrogen 公司。质粒 pMCO-AOX α (带有 α -factor 信号肽,用于分泌表达)和 pMCO-AOX (无信号肽,用于胞内表达分子伴侣)均储存于本实验室^[18]。LB、YPG、YPGZ 和 BMMY 培养基配方参考文献[18]。

1.2 pMCO-AOX α -PrA 和单拷贝酵母菌株的构建与表达验证

利用 SignalP 在线数据库对 PrA 基因进行分析,其 N 端 21 个氨基酸被预测为信号肽序列。去除信号肽序列后将目的基因进行密码子优化及体外合成(GenBank 登录号为 PP442023),然后通过 *Xho* I 和 *Pst* I 亚克隆至 pMCO-AOX α 表达载体(C 端融合载体 HisTag)。将质粒用 *Sal* I 进行线性化并乙醇沉淀,然后电转到毕赤酵母 GS115 中。获得的酵母转化子命名为 1- α -PrA。将得到的转化子先转接到新的 YPGZ 平板,30 °C 静置培养过夜后从平板上挑取单菌落到转接到含有 50 mL YPG 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,30 °C、200 r/min 培养 24 h 后,4 °C、6 000 r/min 离心 3 min,收集菌体,并用等体积 BMMY 培养基重悬。25 °C、200 r/min 进行诱导表达 96 h,每隔 24 h 补加终浓度 0.75% 的甲醇。发酵结束后离心收集上清进行酶活测定和 SDS-PAGE 验证。空载质粒 pMCO-AOX α 转入 GS115 以获得阴性对照菌株(命名为 NC)。对发酵液上清进行亲和层析纯化,获得纯化蛋白后使用去糖基化酶 *Endo* H 对发酵液上清及纯化后蛋白进行去糖基化处理及 SDS-PAGE 验证。

1.3 酸性蛋白酶的酶学性质

酶活力测定参考 GB 1886.174—2016 食品安全国家标准(<https://www.eshian.com/standards/36261.html>),以 1% 的酪蛋白为底物,采用 Folin-酚法进行酶活测定。1 g 或 1 mL 酶,在 pH 3.0 和 40 °C 下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。使用 BCA 试剂盒检测纯化 PrA 的蛋白浓度,从而计算其比活力。

1.3.1 标准曲线

分别吸取 100 μ g/mL 的酪氨酸溶液 0、1、2、3、4、5 mL,用蒸馏水定容至 10 mL。分别取

上述溶液各 1 mL, 各加 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5 mL、福林试剂 1 mL, 置于 40 °C 水浴中显色反应 20 min 取出, 在 OD_{680} 处, 以不含酪氨酸试管为对照, 分别测定样品吸光度。以酪氨酸的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.2 酸性蛋白酶的最适反应 pH

于 40 °C 下, 分别在 pH 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 下测定酶活, 以最高酶活力为 100%, 计算其他不同 pH 下的相对酶活, 每个反应设 3 个平行, 探讨不同 pH 值对酶活力的影响。

1.3.3 酸性蛋白酶的最适反应温度和温度稳定性

将纯化蛋白进行适当稀释后分别在 30、35、40、45、50、55、60 °C 下测定酶活, 每个反应设 3 个平行, 以所测最高酶活为 100%, 计算其他不同温度下的相对酶活, 确定酶的最适反应温度。

将酶液分别置于 30、40、45 °C 水浴锅中, 保温不同时间(30、60、90、120 min)后测定剩余相对酶活力, 绘制温度稳定性曲线。每个反应设 3 个平行, 以所测最高酶活为 100%。

1.3.4 金属离子对酸性蛋白酶的影响

将不同的金属离子(Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^+)分别添加到酸性蛋白酶酶活测定体系中, 使其终浓度为 10 mmol/L, 以不加金属离子时的样品酶活为 100%, 每个反应设 3 个平行, 计算不同金属离子存在下的相对酶活, 考察金属离子对酶活力的影响。

1.4 信号肽的替换和质粒构建

根据文献报道序列对表 1 中的信号肽进行密码子优化及体外合成, 通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 将它们亚克隆至 pMCO-AOX α -PrA 载体替换 α -factor 信号肽, 从而产生 S1-S4 等信号肽诱导 PrA 分泌的重组质粒, 将其命名为 pMCO-AOX-S1-PrA、pMCO-AOX-S2-PrA、pMCO-AOX-S3-PrA 和 pMCO-AOX-S4-PrA。

表 1 本研究所用信号肽

Table 1 Signal peptides used in this study

Plasmid name	Signal peptides	References
pMCO-AOX α -PrA	α -factor	[11]
pMCO-AOX-S1-PrA	Msb2	[19]
pMCO-AOX-S2-PrA	MF4I	[20]
pMCO-AOX-S3-PrA	Dsc4	[21]
pMCO-AOX-S4-PrA	nSB	[22]

将上述质粒用 *Sal* I 进行线性化和乙醇沉淀, 然后电转到毕赤酵母 GS115 中。获得的酵母转化子命名为 1-S1-PrA、1-S2-PrA、1-S3-PrA、1-S4-PrA。按照 1.2 的方法进行诱导及表达, 对发酵液上清进行酶活测定和 SDS-PAGE 验证产量。

1.5 多拷贝表达质粒及酵母菌株的构建

以重组质粒 pMCO-AOX-S2-PrA 为亲本质粒进行多拷贝菌株的构建。使用 *Xba* I 对重组质粒进行单酶切, 使用小牛肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)进行脱磷处理得到载体片段; 使用 *Spe* I 和 *Xba* I 对重组质粒进行双酶切得到目的基因表达盒, 使用 DNA 连接酶将两者连接, 即可得到 2 拷贝重组质粒 pMCO-AOX-S2-2PrA。同理依次构建 4、8 拷贝重组质粒 pMCO-AOX-S2-4PrA、pMCO-AOX-S2-8PrA。将上述质粒使用 *Spe* I 和 *Xba* I 处理后, 随后通过 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分离验证, 验证拷贝数是否增加。

将上述含有 2、4、6、8 拷贝目的基因的多拷贝质粒利用 *Sal* I 进行线性化, 然后电击转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中。在 YPGZ 平板上筛选阳性克隆, 将其命名为 2-S2-PrA、4-S2-PrA、8-S2-PrA。按照 1.2 的方法进行诱导及表达并进行酶活测定和 SDS-PAGE 验证。

1.6 多拷贝酵母菌株的抗性消除及验证

将 PrA 产量最高的多拷贝酵母菌株接入含 1% 甲醇的 BMMY 液体试管中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 然后进行平板划线。放入 30 °C 培养

箱中培养到第 3 天时将单菌落同时转接到 YPG 和 YPGZ 平板, 放入 30 °C 培养箱中培养过夜。将 zeocin 敏感的单菌落按照 1.2 的方法进行诱导表达并进行产量验证。

1.7 共表达不同分子伴侣对酸性蛋白酶产量的影响

共筛选 8 种源自毕赤酵母的分子伴侣 HAC1、SSA1、YDJ1、SNL1、PDI、BIP、LHS1、SSO1。PCR 扩增模板为毕赤酵母基因组。所有基因的 5'端含有 *EcoR* I 位点, 3'端含有 *Not* I 位点。使用表 2 中的引物组合扩增目的基因, 使用 *EcoR* I 和 *Not* I 对 PCR 产物进行双酶切, 替换 pMCO-AOX 载体的等位区域, 从而获得用于酵母胞内表达的重组质粒。将 8 个重组质粒通过 *Sal* I 线性化, 经乙醇沉淀后电转到 zeocin 敏感的多拷贝酵母感受态细胞中。将转化子以“8-S2-PrA-分子伴侣”的格式进行命名。按照 1.2

所述方法进行摇瓶诱导及表达验证。

1.8 共表达分子伴侣组合对酸性蛋白酶产量的影响

按照 1.5 的方法将“增产型”分子伴侣表达盒进行整合, 从而获得 pMCO-AOX-SSA1-YDJ1、pMCO-AOX-BIP-LHS1 和 pMCO-AOX-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1。将上述质粒通过 *Sal* I 线性化, 经乙醇沉淀后电转到 8-S2-PrA 感受态中。获得的酵母转化子命名为 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1、8-S2-PrA-BIP-LHS1 和 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1。按照 1.2 的方法进行诱导表达及产量验证。

1.9 高密度发酵

菌株 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1 按照 Liu 等^[12]描述的方案用于高密度发酵测定。开始甲醇诱导后每 24 h 取样进行酶活测定和 SDS-PAGE 验证产量。

表 2 分子伴侣引物

Table 2 Primers used for amplifying molecular chaperones

Primers name	Primer sequences (5'→3')
HAC1-F	<u>GGAATTC</u> ATGCCCCGTAGATTCTTCTCATAAG
HAC1-R	TAGTTT <u>AGCGGCCG</u> CTATTCTGGAAGAATACAAAGTCATTTAAATCAAATGCATTAG
SSA1-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGCCAGCTGTCGGTATTGAT
SSA1-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCAATCGACTTCTCAACAGTTGGTCC
YDJ1-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGGTTAGAGAAACAAAGTTATAT
YDJ1-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCACTGAGAAGCACATTGGACACC
SNL1-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGCTTGATTTATCCCCATTC
SNL1-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCAAAGGTCTCCGAGAACAGCTTT
PDI-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGCAATTCAACTGGAATATT
PDI-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCAAAGCTCGTCGTGAGCGTCTGC
BIP-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGCTGTCGTTAAAACCATCT
BIP-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCACAACATCATGATCATAGTC
LHS1-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGAGAACACAAAAGATAGTA
LHS1-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCACAACATCATGGGATGTTTG
SSO1-F	<u>ACGGAATTC</u> ATGAGTAACAGTATAATCCG
SSO1-R	GTCTAAGGG <u>CGGCCG</u> CTCATCTTCCCCAGTTTCCGACACC

The *EcoR* I and *Not* I sites shown in the primers are underlined.

1.10 统计分析

使用单因素方差分析和 *t* 检验统计学差异。统计学意义确定为 $P < 0.05$ 。所有实验至少进行了 3 次, 所有数据均以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 单拷贝酵母菌株表达验证

将 1- α -PrA 酵母转化子进行摇瓶水平诱导表达, 发酵结束后收集上清液进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示目的蛋白表现为 55–60 kDa 的拖尾条带(图 1, 泳道 1)。鉴于其理论分子量为 40.4 kDa, 重组蛋白的糖基化状态需要被进一步验证。利用去糖基化酶 *Endo H* (图 1, 泳道 2, 30 kDa) 处理目标蛋白, 结果显示目的蛋白的分子量减少, 形成一条 49 kDa 左右较为单一的蛋白条带(图 1, 泳道 2), 分子量仍大于预期, 表明 PrA 可能具有较复杂的糖基化修饰。酶活结果显示, 1- α -PrA 液体培养的最高酶活为 738.03 U/mL。对发酵液上清进行镍柱亲和层析纯化, 纯化后的 PrA 呈现出单一、特异的蛋白条带(图 1, 泳

道 3), 可以进行后续酶学性质检测。以上结果证明 PrA 在毕赤酵母中成功表达。

2.2 酸性蛋白酶的酶学性质

2.2.1 标准曲线

如图 2 所示, 酪氨酸浓度与其 OD_{680} 值呈线性函数关系, $R^2 = 0.99447$, 表明线性关系良好, 可以用作标准曲线。

2.2.2 酸性蛋白酶的酶学性质

以 1% 的酪蛋白为底物, 根据纯化后 PrA 蛋白浓度及酶活测得 PrA 的比酶活为 3 974.00 U/mg。如图 3 所示, 酸性蛋白酶 PrA 的最适反应 pH 为 3.0, 在 pH 2.0–3.0 区间有较为稳定相对酶活, 维持在 80% 左右。其最适温度为 45 °C, 在 40–50 °C 区间有较为稳定相对酶活, 维持在 80% 以上。温度稳定性测定结果显示, 在 30 °C 条件下保温 120 min 后, 酶的最高残余活性为 93%; 在 40 °C 条件下保温 120 min 后, 酶的最高残余活性为 32%; 经过 45 °C 处理 30 min 后相对酶活只有 20% 左右。金属离子测定结果显示 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对 PrA 的活性有激活作用,

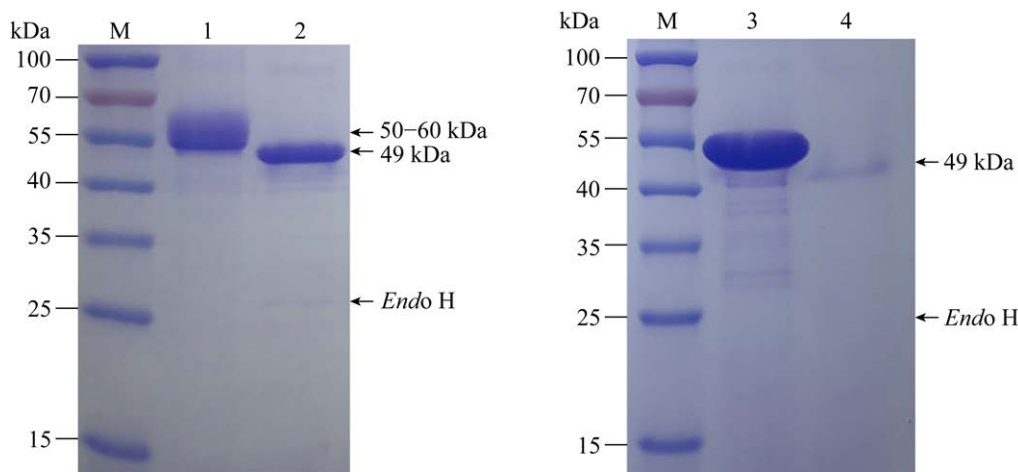


图 1 菌株 1- α -PrA 发酵液上清的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of supernatant of 1- α -PrA. Lane M: Protein marker; Lane 1: 1- α -PrA; Lane 2: Deglycosylated 1- α -PrA; Lane 3: Deglycosylated and purified 1- α -PrA; Lane 4: Negative control.

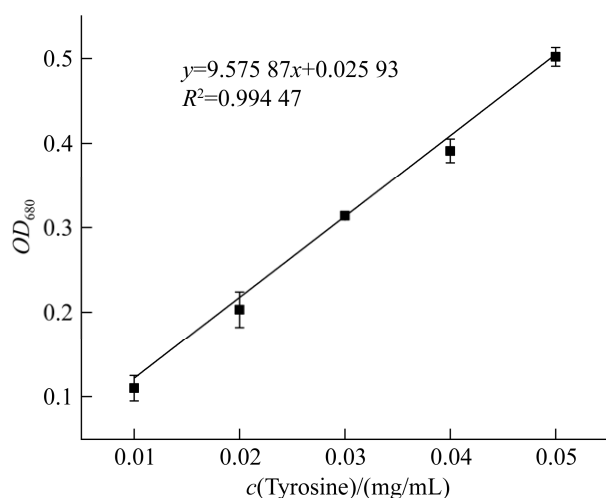


图2 酪氨酸标准曲线

Figure 2 Tyrosine standard curve.

Mn^{2+} 和 K^+ 对PrA无明显影响, Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对PrA的活力有抑制作用, Fe^{3+} 对PrA有较强的抑制作用。

2.3 信号肽优化的质粒构建及验证

对1-S1-PrA、1-S2-PrA、1-S3-PrA和1-S4-PrA进行摇瓶诱导表达,酶活结果如图4所示,1-S2-PrA液体培养的酶活最高,产量为1206.52 U/mL,与初始菌株1- α -PrA相比提高了63%左右。1-S1-PrA和1-S3-PrA有所增加,产量分别是839.78 U/mL和791.95 U/mL。1-S4-PrA的酸性蛋白酶产量有所下降,产量为580.19 U/mL。SDS-PAGE和酶活检测数据均表明信号肽优化后的1-S2-PrA菌株的酸性蛋白酶的产量提升最

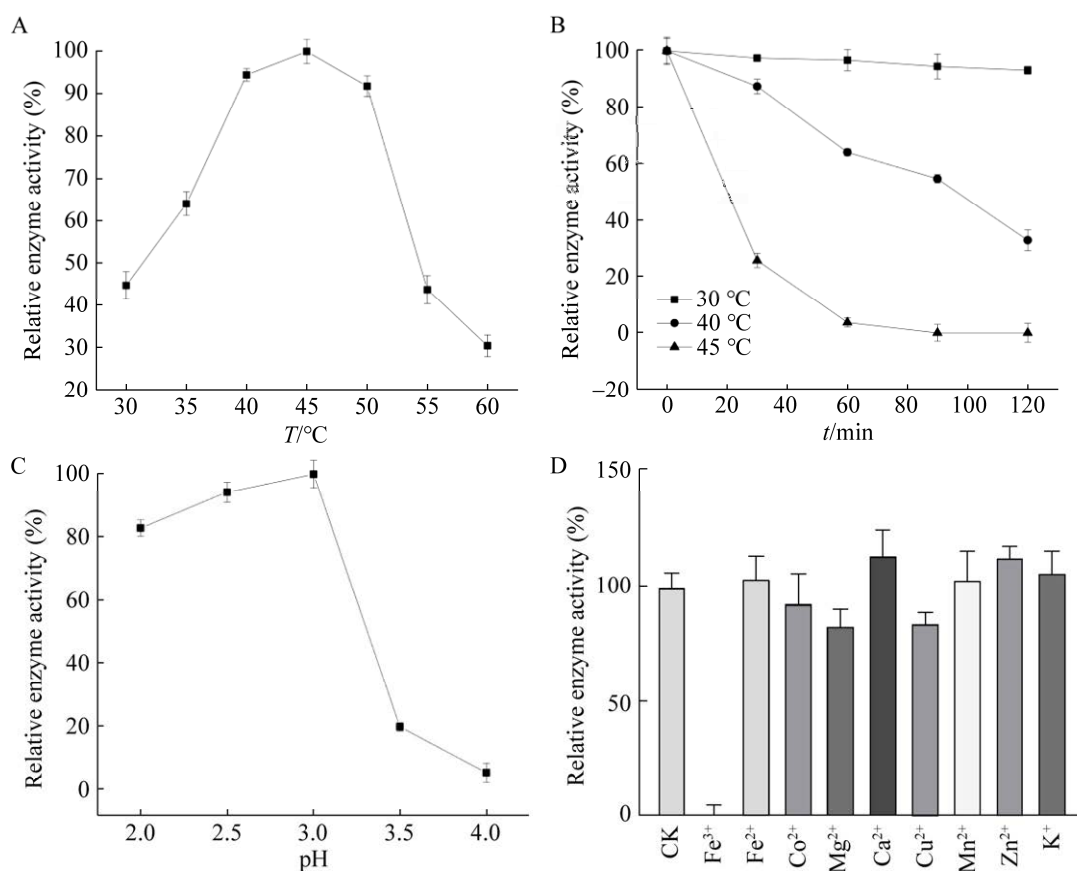


图3 酸性蛋白酶的酶学性质

Figure 3 Enzymatic properties of PrA. A: Optimum temperature. B: Temperature stability. C: Optimum pH. D: Effect of metal ions. CK: Enzyme activity without additional metal ions.

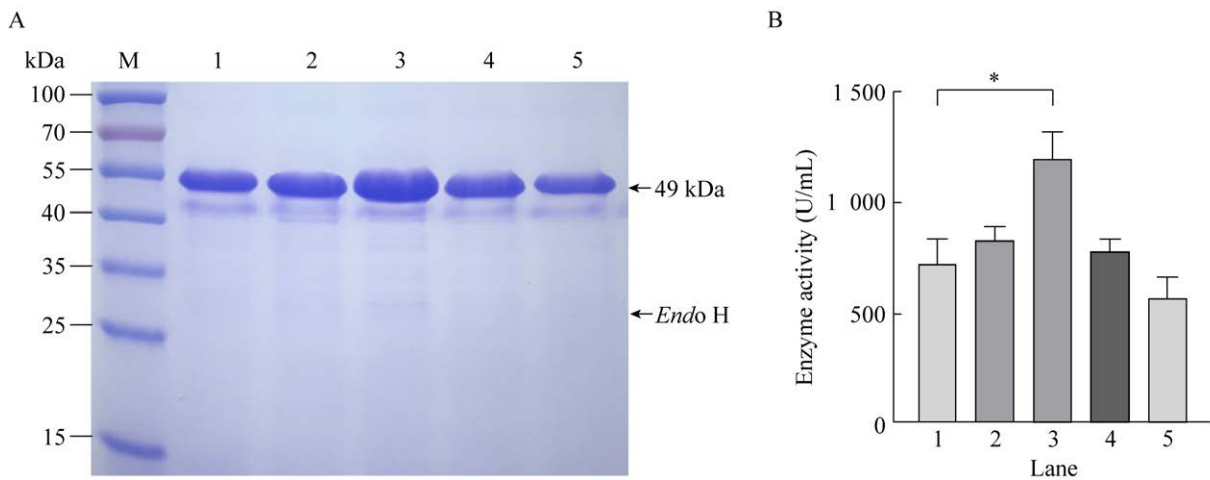


图 4 信号肽优化对 PrA 表达量的影响

Figure 4 Impact of signal peptide optimization on PrA production. A: SDS-PAGE analysis. All samples have undergone deglycosylation treatment. B: Enzyme activity analysis. Lane M: Protein marker; Lane 1: 1- α -PrA; Lane 2: 1-S1-PrA; Lane 3: 1-S2-PrA; Lane 4: 1-S3-PrA; Lane 5: 1-S4-PrA. *: $P < 0.05$.

为显著, 选取 pMCO-AOX-S2-PrA 质粒用于体外构建多拷贝质粒。

2.4 基因拷贝数对 PrA 产量的影响

将 1、2、4、8 拷贝重组质粒进行 *Spe I/Xba I* 双酶切验证, 如图 5 所示, 不同质粒的框架部分分子量保持一致(约 7.5 kb), 1、2、4、8 拷贝质粒表达盒大小依次为 2.5、5.0、10.0、15.0 kb, 分子量依次增大。该结果证明多拷贝表达载体构建成功。

将上述多拷贝质粒线性化并电转到毕赤酵母 GS115 中, 得到的转化子命名为 2-S2-PrA、4-S2-PrA 和 8-S2-PrA。按照 1.2 的方法进行诱导及表达并进行酶活测定和 SDS-PAGE 验证产量。如图 6 所示, 2-S2-PrA、4-S2-PrA 和 8-S2-PrA 相较于 1-S2-PrA 产量均有所增加, 分别提高了 35%、75%和 99%, 酶活分别是 1 624.47、2 115.82、2 406.47 U/mL。当基因组内 PrA 的拷贝数达到 8 个时可以获得最高的酶活力产量(2 406.47 U/mL)。选取 8-S2-PrA 菌株用于抗性消除及后续实验。

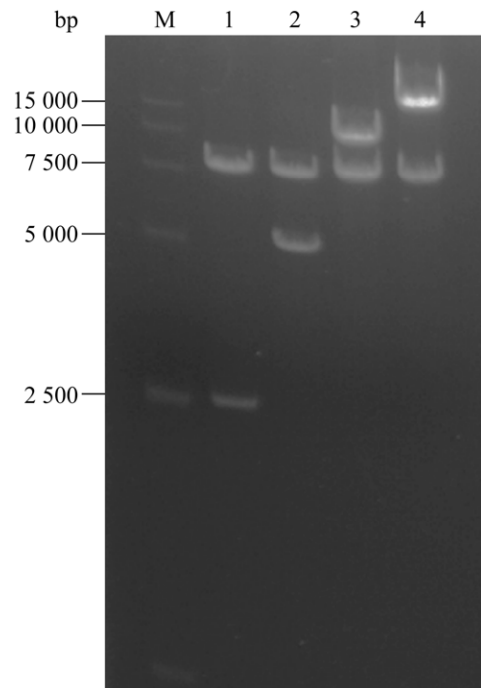


图 5 多拷贝质粒验证

Figure 5 Validation of multi-copy plasmids via *Spe I/Xba I*. Lane M: DNA marker; Lane 1: pMCO-AOX-S2-PrA; Lane 2: pMCO-AOX-S2-2PrA; Lane 3: pMCO-AOX-S2-4PrA; Lane 4: pMCO-AOX-S2-8PrA.

2.5 共表达分子伴侣对 PrA 表达量的影响

按照 1.6 所述方法对 8-S2-PrA 菌株进行抗性消除, 将平板划线所得的单菌落同时转接到 YPG 和 YPGZ 平板, 放入 30 °C 培养箱中培养

过夜。随机挑选对 zeocin 敏感的单菌落(图 7A) 进行摇瓶发酵及产量检测。结果如图 7 所示, 所选取菌株的 PrA 产量基本保持一致。从中选取 6 号菌株制备感受态。

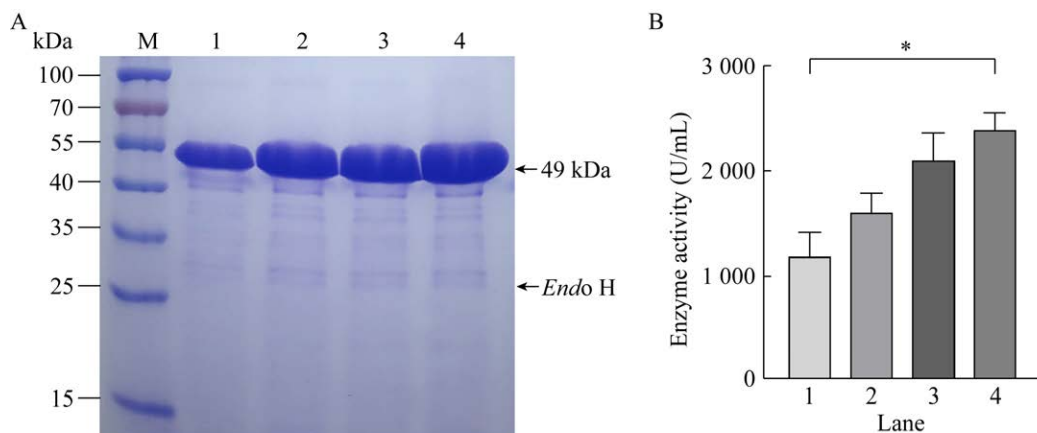


图 6 基因拷贝数对 PrA 表达量的影响

Figure 6 Impact of gene dosage optimization on PrA production. A: SDS-PAGE analysis. All samples have undergone deglycosylation treatment. B: Enzyme activity analysis. Lane M: Protein marker; Lane 1: 1-S2-PrA; Lane 2: 2-S2-PrA; Lane 3: 4-S2-PrA; Lane 4: 8-S2-PrA. *: $P < 0.05$.

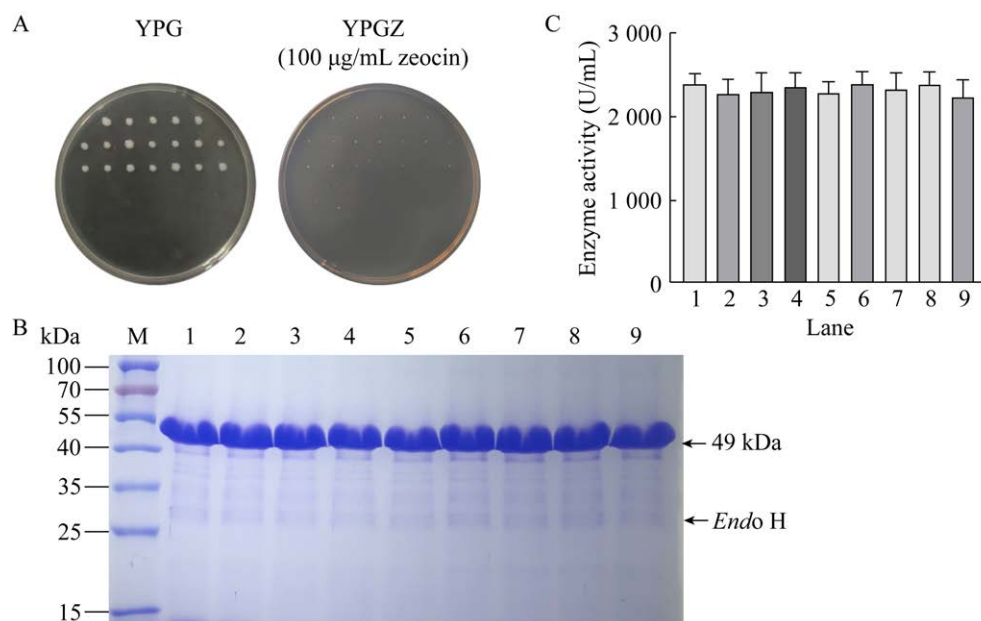


图 7 抗性消除和酶活验证

Figure 7 Elimination of zeocin resistance gene and validation of enzyme activity. A: Resistance elimination analyse. B: SDS-PAGE analysis. All samples have undergone deglycosylation treatment. C: Enzyme activity analysis. Lane M: Protein marker; Lane 1: 8-S2-PrA; Lanes 2–9: Zeocin-sensitive transformants of 8-S2-PrA.

根据表 3 筛选出 HAC1、SSA1、YDJ1、SNL1、PDI、BIP、LHS1 和 SSO1 分子伴侣, 构建其胞内表达质粒。将重组质粒线性化并转入 zeocin 敏感的 8-S2-PrA 感受态细胞, 从而获得共表达不同分子伴侣的酵母菌株。按照 1.2 的方法进行诱导及表达并进行酶活测定和 SDS-PAGE 验证。

如图 8 所示, 来源于毕赤酵母的 SSA1、BIP、LHS1、YDJ1 对 PrA 的表达具有促进作用, 酶活分别是 2 896.86、2 884.95、2 745.62、2 768.27 U/mL (与 8-S2-PrA 相比分别提高了 20%、20%、14% 和 15%)。分子伴侣 HAC1、SNL1、PDI 和 SSO1 对 PrA 有抑制作用, 产量分别下降了 12%、11%、4% 和 6%。因此尝试将对 PrA 有促进作用的分子伴侣组合在一起与 PrA 共表达, 希望能够进一步提高 PrA 的表达量。

2.6 共表达分子伴侣组合对 PrA 产量的影响

将对 8-S2-PrA 表达有促进作用的分子伴侣 SSA1、YDJ1、BIP、LHS1 表达盒进行整合, 产生的重组质粒命名为 pMCO-AOX-SSA1-YDJ1、

表 3 分子伴侣的功能和定位

Table 3 Localizations and functions of molecular chaperones

Name	Major subcellular localization	Function
HAC1	Nucleus	Transcription factor
SSA1	Cytoplasm	Hsp70
YDJ1	Cytoplasm	Hsp40
SNL1	Cytoplasm	Nucleotide exchange factor
PDI	ER	Disulfide isomerase
BIP	ER	Hsp70
LHS1	ER	Nucleotide exchange factor
SSO1	Golgi	Plasma membrane t-SNARE protein

pMCO-AOX-BIP-LHS1、pMCO-AOX-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1。将其线性化并转入 zeocin 敏感的 8-S2-PrA 感受态细胞, 从而获得共表达不同分子伴侣组合的酵母菌株。如图 9 所示, 可知分子伴侣组合 SSA1-YDJ1、BIP-LHS1 和 SSA1-YDJ1-BIP-LHS1 对酸性蛋白酶的产量均有明显提升(分别提升 45%、50% 和 70%), 酶活分别为 3 489.38、3 609.70、4 091.27 U/mL。

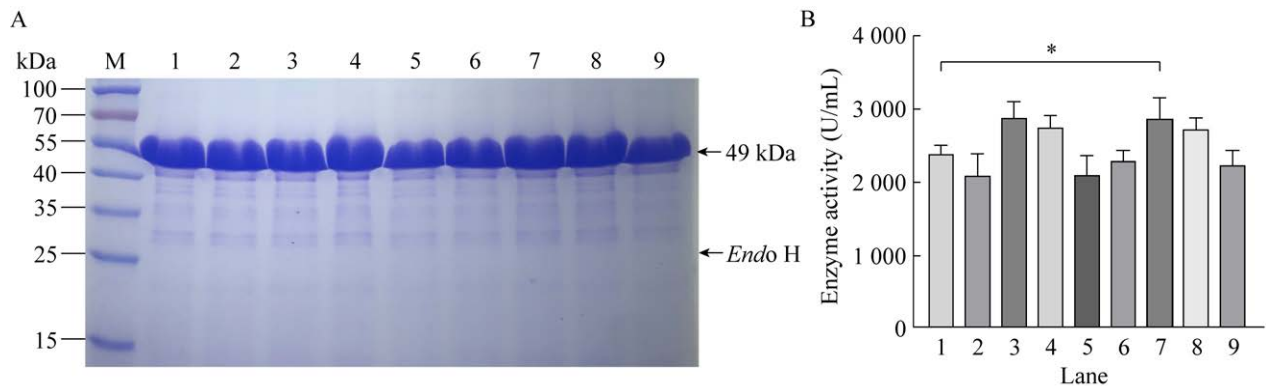


图 8 共表达分子伴侣对 PrA 产量的影响

Figure 8 Impact of co-expressing molecular chaperones on PrA production. A: SDS-PAGE analysis. All samples have undergone deglycosylation treatment. B: Enzyme activity analysis. Lane M: Protein marker; Lane 1: 8-S2-PrA; Lane 2: 8-S2-PrA-HAC1; Lane 3: 8-S2-PrA-SSA1; Lane 4: 8-S2-PrA-YDJ1; Lane 5: 8-S2-PrA-SNL1; Lane 6: 8-S2-PrA-PDI; Lane 7: 8-S2-PrA-BIP; Lane 8: 8-S2-PrA-LHS1; Lane 9: 8-S2-PrA-SSO1. *: $P < 0.05$.

2.7 高密度发酵

按照 1.9 所述方法对 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1 菌株进行高密度发酵, 定时取样后进行 SDS-PAGE。结果如图 10 所示, 发酵原液直接电泳后目的蛋白呈现为扭曲变形的蛋白条带, 而稀释 10 倍后目的蛋白呈现为整齐、特异的蛋白条带。此外, 高密度发酵的 PrA 蛋白的分子量略小于摇瓶发酵样品。据推测, 培养基

中较高的盐离子浓度、PrA 的糖基化修饰, 以及不同发酵温度(摇瓶为 25 °C, 高密度发酵为 30 °C)是造成以上现象的主要原因。

对不同时间点取样的发酵液上清进行酶活检测, 结果如图 11 所示, 随着发酵时间的增加, 酸性蛋白酶的酶活也随之增加, 在 168 h 时酸性蛋白酶的产量达到顶峰, 此时的酶活为 43 088.00 U/mL。在 168 h 后 PrA 产量出现下降

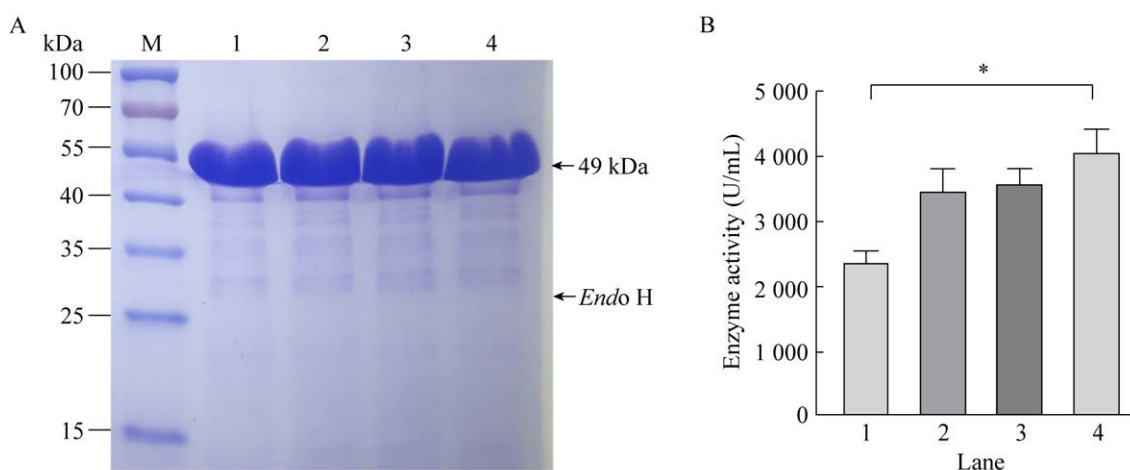


图 9 共表达分子伴侣组合对 PrA 产量的影响

Figure 9 Impact of co-expressing molecular chaperone combinations on PrA production. A: SDS-PAGE analysis. All samples have undergone deglycosylation treatment. B: Enzyme activity analysis. Lane M: Marker; Lane 1: 8-S2-PrA; Lane 2: 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1; Lane 3: 8-S2-PrA-BIP-LHS1; Lane 4: 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1. *: $P < 0.05$.

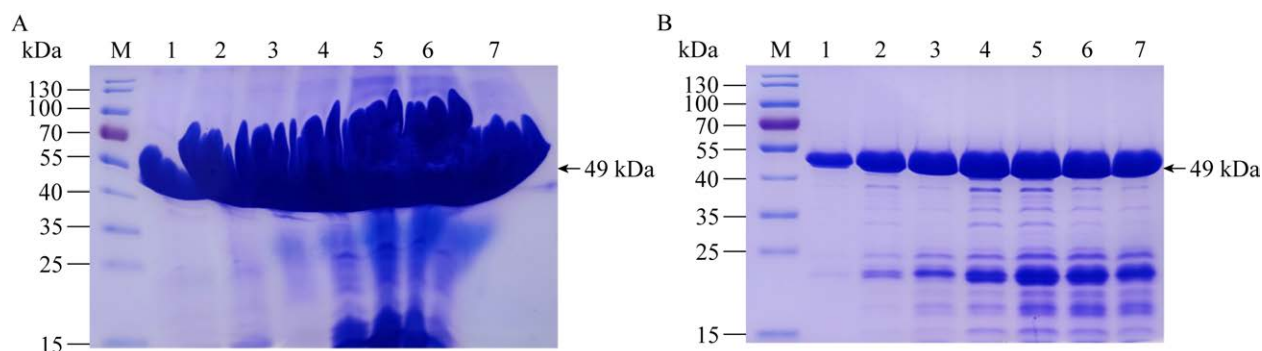


图 10 高密度发酵上清液的 SDS-PAGE 分析

Figure 10 SDS-PAGE analysis of supernatants in high-density fermentation. A: The original supernatants samples. B: The 10-fold diluted supernatants samples. Lane M: Protein marker; Lane 1: 48 h; Lane 2: 72 h; Lane 3: 96 h; Lane 4: 120 h; Lane 5: 144 h; Lane 6: 168 h; Lane 7: 192 h.

趋势, 表明 PrA 出现降解。文献检索结果显示目前酸性蛋白酶的产量处于 50.62–23 000.00 U/mL (表 4), 因此证实本研究的酸性蛋白酶产量已达到较理想水平。

3 讨论与结论

在食品加工及饲料添加剂领域中, 酸性蛋白酶作为一种关键的水解酶发挥着重要作用。本研究成功利用毕赤酵母系统表达了酸性蛋白

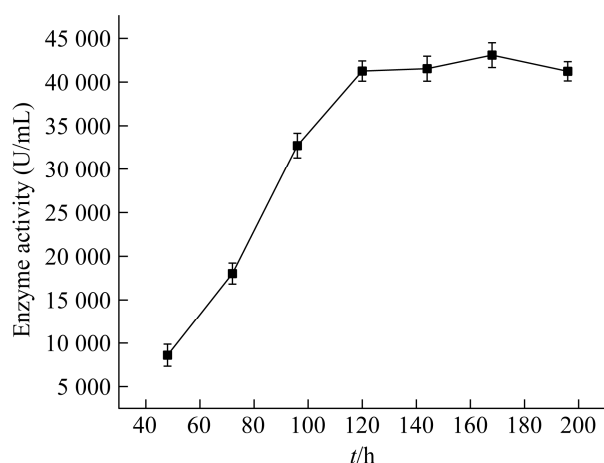


图 11 高密度发酵的酶活曲线

Figure 11 Enzyme activity curves for high-density fermentation.

表 4 不同文献中酸性蛋白酶的产量

Table 4 Yields of acid proteases in existing literatures

Protein name	Host	Maximum enzyme activity (U/mL)
pepB	<i>Aspergillus niger</i> TH-2	1 380.00 ^[23]
AjproA1	<i>Pichia pastoris</i>	669.60 ^[24]
pepA	<i>Pichia pastoris</i>	50.62 ^[25]
pepB	<i>Aspergillus niger</i> SH-2	9 722.00 ^[26]
Acid protease	SKY-520	3 000.80 ^[27]
pepA	<i>Pichia pastoris</i>	23 000.00 ^[28]
RmproA	<i>Pichia pastoris</i>	3 480.40 ^[1]
PrA	<i>Pichia pastoris</i>	43 088.00*

*: The expression level of acid protease in this study.

酶 PrA, 其初始产量达到 738.03 U/mL。在研究其酶学性质过程中发现 PrA 发生了不均一的糖基化, 具体表现为去糖基化处理后其蛋白条带从拖尾条带变成单一、特异的蛋白条带, 而且分子量显著减小。这种拖尾现象并非罕见。比如植酸酶^[29]和猪瘟病毒 E2 抗原^[30]均被预测含有 3 个 N-糖基化位点, 但经毕赤酵母分泌表达前者在 SDS-PAGE 凝胶上表现为邻近的 3 个蛋白条带, 而后者表现为 35–55 kDa 的拖尾条带。糖基化修饰对蛋白活性的影响存在不确定性。研究表明毕赤酵母表达的壳聚糖酶 CSN 发生 N-糖基化修饰, 其在 50 °C 保存 240 min 残余酶活依然保存在 90% 以上。芽孢杆菌表达的 CSN 蛋白在同等条件下残余酶活不到 20%^[31]。该现象证明糖基化修饰可能有助于提高蛋白热稳定性。然而, 糖基化修饰可能导致蛋白亚基或抗原表位被遮蔽从而影响酶活或免疫原性^[32]。因此糖基化修饰对目的产物的影响需要个案分析。

信号肽优化是提高外源蛋白产量的有效方法。Xiong 等^[33]的研究表明 MF4I 信号肽可以显著提高植酸酶(phy-pl-sh)在毕赤酵母中的表达, 与 α -factor 信号肽相比产量提高了 2.9 倍, 酶活达到了 2 650.00 U/mL。Wang 等^[34]的研究表明 MF4I 信号肽可以显著提高甘露聚糖内切-1,4- β -甘露糖苷酶(mannan endo-1,4- β -mannosidase, MAN)在毕赤酵母中的表达, 再用 MF4I 取代 α -factor 信号肽使得 MAN 的产量提高了 2.03 倍。这表明 MF4I 信号肽能够高效地引导蛋白质通过内质网和高尔基体的分泌途径, 从而增加目标蛋白的表达量。本研究使用 MF4I 信号肽使得 PrA 的产量与初始信号肽(α -factor)相比提高了 63%, 酶活达到了 1 206.52 U/mL。

为进一步提高酸性蛋白酶 PrA 的产量, 本研究对 PrA 进行多拷贝酵母菌株构建和共表达分子伴侣的相关研究。结果显示酸性蛋白酶 PrA

在 8 拷贝时酶活最高, 酶活高达 2 406.47 U/mL, 与单拷贝毕赤酵母菌株相比提高了 99%。基因剂量优化的核心原理是通过构建多拷贝菌株提高目的基因的转录水平, 从而增加前体蛋白的合成。在胞内表达相关案例中, 目的蛋白产量往往与基因拷贝数呈现良好的线性关系。例如 9 拷贝菌株的乙肝表面抗原(HBsAg)产量是单拷贝菌株的 19.4 倍^[35], 而胞内表达破伤风毒素 C 片段(tetanus toxin fragment C)时 9 拷贝菌株与单拷贝菌株相比产量提高了 25.45 倍^[36]。然而, 对分泌表达而言, 前体蛋白被合成后需经历信号肽切除、二硫键异构、糖基化修饰、亚细胞转运等环节, 相关细胞因子的丰度会进一步影响目的蛋白的分泌水平。因此在分泌表达相关案例中往往可以观察到随着基因剂量增加, 目的蛋白产量先上升后下降的现象^[16,37-38]。有学者将这种产量曲线称为钟形曲线^[39]。

由于过表达的目的蛋白可能占用大量细胞资源从而对酵母细胞产生胁迫, 此时共表达“蛋白折叠与运输”相关分子伴侣有可能进一步提高蛋白产量。实验结果显示 4 种分子伴侣(SSA1、YDJ1、BIP、LHS1)对 PrA 的表达均有促进作用, 而共表达这 4 种分子伴侣的组合将 PrA 产量提高至 4 091.27 U/mL, 与初始菌株相比提高了 5.5 倍, 由此在摇瓶水平获得了 PrA 的高产酵母菌株。通过组合分子伴侣提高蛋白质重组表达水平在其他一些工业酶中也得到应用, 例如 Wang 等^[40]的研究发现壳聚糖酶(AqCoA)在 16 拷贝的情况下共表达 6 个分子伴侣组合(PDI-ERO1-SSA4- SSE1-YDJ1-SSO2)与初始菌株相比提高了 13 倍。李丁等^[41]的研究表明, 在毕赤酵母中, 犬 α 干扰素表达在 12 拷贝情况下共表达 Hac 时产量最高, 是初始酵母菌株的 5.61 倍, 产量约为 581 mg/L。

高密度发酵能够提高细胞密度(湿重), 并进

一步改善营养、氧气供给以及甲醇诱导连续性, 从而提高目的蛋白产量。Ma 等^[20]用毕赤酵母为宿主表达中性蛋白酶(NPI-p), 在高密度发酵条件下 NPI-p 产量达到 12.87 mg/mL, 与摇瓶发酵相比提高了 8.6 倍。商婷婷^[42]用毕赤酵母采用高密度发酵, 使得木聚糖酶(Xyn11A)的产量与摇瓶相比提高了 7.02 倍。杨琥^[28]以毕赤酵母为表达宿主表达酸性蛋白酶, 经过密码子、信号肽、启动子和基因剂量优化后, 在 30 L 发酵罐中进行高密度发酵产量达到 23 000.00 U/mL。本研究将高产菌株 8-S2-PrA-SSA1-YDJ1-BIP-LHS1 进行 5 L 水平高密度发酵, PrA 表达量进一步提升到了 43 088.00 U/mL。

参考文献

- [1] SUN Q, CHEN FS, GENG F, LUO YK, GONG SY, JIANG ZQ. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides[J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 570-577.
- [2] BANANI H, SPADARO D, ZHANG DP, MATIC S, GARIBALDI A, GULLINO ML. Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 182-183: 1-8.
- [3] GARCÍA-GONZÁLEZ G, ASCACIO-MARTÍNEZ JÁ, HERNÁNDEZ-BELLO R, GONZÁLEZ GM, PALMA-NICOLÁS JP. Expression of recombinant protease MarP from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* and its effect on human monocytes[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(9): 1787-1798.
- [4] KARBALAEI M, REZAEI SA, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [5] AHMAD M, HIRZ M, PICHLER H, SCHWAB H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5301-5317.

- [6] 王亮亮, 李方方, 姜锡瑞. 我国蛋白酶的产业近况与展望[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(8): 141-150.
WANG LL, LI FF, JIANG XR. Current situation and prospect of protease industry in China[J]. China Food Additives, 2021, 32(8): 141-150 (in Chinese).
- [7] DOSTÁL J, DLOUHÁ H, MALON P, PICOVÁ I, HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ O. The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase[J]. Biological Chemistry, 2005, 386(8): 791-799.
- [8] DOSTÁL J, BRYNDA J, HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ O, SIEGLOVÁ I, PICOVÁ I, REZÁCOVÁ P. The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A[J]. Journal of Structural Biology, 2009, 167(2): 145-152.
- [9] KE Y, YUAN XM, LI JS, ZHOU W, HUANG XH, WANG T. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of a recombinant *Aspergillus sojae* alkaline protease in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 148: 24-29.
- [10] GUO JP, MA Y. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 58(2): 301-308.
- [11] HOLLENBERG CP, GELLISSEN G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8(5): 554-560.
- [12] LIU WC, INWOOD S, GONG T, SHARMA A, YU LY, ZHU P. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2019, 39(2): 258-271.
- [13] SHU M, SHEN W, YANG SH, WANG XJ, WANG F, WANG YP, MA LX. High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 92: 56-66.
- [14] ZHANG W, ZHAO HL, XUE C, XIONG XH, YAO XQ, LI XY, CHEN HP, LIU ZM. Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins[J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(4): 1090-1095.
- [15] GE T, FU SH, XU LH, TANG Q, WANG HY, GUAN KP, LIANG GD. High density fermentation and activity of a recombinant lumbrokinase (PI239) from *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 52(1): 1-7.
- [16] LI D, ZHANG B, LI ST, ZHOU J, CAO H, HUANG Y, CUI ZL. A novel vector for construction of markerless multicopy overexpression transformants in *Pichia pastoris*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1698.
- [17] 李丁. 新型无抗多拷贝毕赤酵母表达平台的构建及新壳聚糖酶基因的重组表达[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2016.
LI D. Construction of A novel unmarked expression system for *Pichia pastoris* and recombinant expression of novel chitosanases[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [18] 李丁, 李炳坤, 武奇, 张雪花, 梅梅. 猪圆环病毒 3 型 Cap 蛋白在毕赤酵母中的优化表达[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(12): 80-86.
LI D, LI BK, WU Q, ZHANG XH, MEI M. Optimized expression of porcine circovirus type 3 Cap protein in *Pichia pastoris*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(12): 80-86 (in Chinese).
- [19] DUAN GD, DING LM, WEI DS, ZHOU HC, CHU J, ZHANG SL, QIAN JC. Screening endogenous signal peptides and protein folding factors to promote the secretory expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 306: 193-202.
- [20] MA XJ, LIU YY, LI QQ, LIU L, YI L, MA LX, ZHAI C. Expression, purification and identification of a thermolysin-like protease, neutral protease I, from *Aspergillus oryzae* with the *Pichia pastoris* expression system[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 128: 52-59.
- [21] 丁璐妹, 肖慈英, 储炬, 钱江潮, 张嗣良. 内源信号肽 DSE4 介导头孢菌素 C 酰化酶在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2015, 41(4): 449-454.
DING LM, XIAO CY, CHU J, QIAN JC, ZHANG SL. Secretory expression of CPC acylase mediated by endogenous signal sequence DSE4 in *Pichia*

- pastoris*[J]. Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2015, 41(4): 449-454 (in Chinese).
- [22] VADHANA AKP, SAMUEL P, BERIN RM, KRISHNA J, KAMATCHI K, MEENAKSHISUNDARAM S. Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(3): 177-183.
- [23] 付萌. N末端短肽对黑曲霉表达酸性蛋白酶和脯氨酰内肽酶的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2022.
- FU M. Effect of N-terminal short peptide on high production of acid protease and prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [24] 薛意斌, 李雪, 李延啸, 江正强, 闫巧娟. 日本曲霉酸性蛋白酶的分泌表达、性质及其在猪肉嫩化中的应用[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(5): 82-92, 109.
- XUE YB, LI X, LI YX, JIANG ZQ, YAN QJ. Secretory expression and properties of acid protease from *Aspergillus japonicus* and its application in pork tenderization[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(5): 82-92, 109 (in Chinese).
- [25] 岳晓平, 陈朋, 朱玥明, 曾艳, 刘汉民, 刘红彦, 王敏, 孙媛霞. 米曲霉酸性蛋白酶基因在毕赤酵母中的异源表达及酶学性质[J]. 生物工程学报, 2019, 35(3): 415-424.
- YUE XP, CHEN P, ZHU YM, ZENG Y, LIU HM, LIU HY, WANG M, SUN YX. Heterologous expression and characterization of *Aspergillus oryzae* acidic protease in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(3): 415-424 (in Chinese).
- [26] 董文超, 王斌, 潘力. 白曲酸性蛋白酶在无孢黑曲SH-2中的克隆表达及酶学性质分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(6): 80-87.
- DONG WC, WANG B, PAN L. Cloning and expression of acidic protease of *Aspergillus kawachii* in non-spore *Aspergillus niger* SH-2 and analysis of enzymatic properties[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(6): 80-87 (in Chinese).
- [27] 李西波, 张旭, 杨柳, 张惠惠, 张继. 高产酸性蛋白酶菌株的选育及酶学性质研究[J]. 中国调味品, 2018, 43(3): 28-33, 40.
- LI XB, ZHANG X, YANG L, ZHANG HH, ZHANG J. Study on breeding of strain for producing high-yield acid proteinase and enzymatic properties[J]. China Condiment, 2018, 43(3): 28-33, 40 (in Chinese).
- [28] 杨琥. 宇佐美曲霉酸性蛋白酶在毕赤酵母中的表达及其酶学性质的研究[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2014.
- YANG H. Expression and characterization of acid protease from *Aspergillus usami* in *Pichia pastoris*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2014 (in Chinese).
- [29] LI C, LIN Y, ZHENG XY, PANG N, LIAO XH, LIU XX, HUANG YY, LIANG SL. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*[J]. BMC Biotechnology, 2015, 15: 88.
- [30] LI D, ZHANG HM, YANG L, CHEN J, ZHANG YP, YU XM, ZHENG QS, HOU JB. Surface display of classical swine fever virus E2 glycoprotein on Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles via the SpyTag/SpyCatcher system[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 167: 105526.
- [31] KANG LX, CHEN XM, FU L, MA LX. Recombinant expression of chitosanase from *Bacillus subtilis* HD145 in *Pichia pastoris*[J]. Carbohydrate Research, 2012, 352: 37-43.
- [32] DELIC M, VALLI M, GRAF AB, PFEFFER M, MATTANOVICH D, GASSER B. The secretory pathway: exploring yeast diversity[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(6): 872-914.
- [33] XIONG AS, YAO QH, PENG RH, ZHANG Z, XU F, LIU JG, HAN PL, CHEN JM. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 1039-1047.
- [34] WANG Y, ZHENG J, LIN FL, ZHOU HB. Improved extracellular endo-1,4- β -mannosidase activity of recombinant *Pichia pastoris* by optimizing signal peptide[J]. Journal of Central South University, 2015, 22(6): 2088-2095.
- [35] LOVE KR, POLITANO TJ, PANAGIOTOU V, JIANG B, STADHEIM TA, LOVE JC. Systematic single-cell analysis of *Pichia pastoris* reveals secretory capacity limits productivity[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37915.
- [36] CLARE JJ, RAYMENT FB, BALLANTINE SP,

- SREEKRISHNA K, ROMANOS MA. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene[J]. *Biotechnology (Nature Publishing Company)*, 1991, 9(5): 455-460.
- [37] INAN M, ARYASOMAYAJULA D, SINHA J, MEAGHER MM. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(4): 771-778.
- [38] YANG H, ZHAI C, YU XH, LI ZZ, TANG W, LIU YY, MA XJ, ZHONG X, LI GL, WU D, MA LX. High-level expression of proteinase K from *Tritirachium album* Limber in *Pichia pastoris* using multi-copy expression strains[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 122: 38-44.
- [39] ZHU T, GUO M, TANG Z, ZHANG M, ZHUANG Y, CHU J, ZHANG S. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(3): 954-963.
- [40] WANG YX, LUO X, ZHAO YQ, YE XF, YANG F, LI ZK, HUANG Y, FANG XD, HUAN MH, LI D, CUI ZL. Integrated strategies for enhancing the expression of the AqCoA chitosanase in *Pichia pastoris* by combined optimization of molecular chaperones combinations and copy numbers via a novel plasmid pMC-GAP[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(12): 4035-4051.
- [41] 李丁, 李兰, 安允飞, 毕振威, 于晓明, 陈瑾, 郑其升. 联合策略优化犬 α 干扰素的酵母表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(S1): 88-95.
- LI D, LI L, AN YF, BI ZW, YU XM, CHEN J, ZHENG QS. Optimization of yeast expression of canine interferon α by combined strategy[J]. *China Biotechnology*, 2022, 42(S1): 88-95 (in Chinese).
- [42] 商婷婷. 耐热木聚糖酶重组酵母高密度发酵工艺及其生物学特性研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2017.
- SHANG TT. High-density fermentation technology of thermophilic xylanase in recombinant yeast and biological characteristics of thermophilic xylanase[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2017 (in Chinese).