

## 中性内切型纤维素酶在毕赤酵母中高水平表达的研究

# High-level Production of Neutral Endoglucanase 1 in *Pichia pastoris*

丁少军<sup>1\*</sup>, 宋美静<sup>1</sup>, 杨红军<sup>1</sup>, 邢增涛<sup>2</sup>, 周蕊<sup>1</sup>, 曹杰<sup>1</sup>

DING Shao-Jun<sup>1\*</sup>, SONG Mei-Jing<sup>1</sup>, YANG Hong-Jun<sup>1</sup>, XING Zeng-Tao<sup>2</sup>, ZHOU Rui<sup>1</sup> and CAO Jie<sup>1</sup>

1 南京林业大学生物工程系, 南京 210037

2 上海农业科学院食用菌研究所, 上海 201106

1 Department of Biological Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

2 Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

**摘 要** 中性内切型纤维素酶在纺织及造纸工业具有重要的应用, 为了进一步提高从我国草菇中克隆的一种新的中性内切型纤维素酶(EG1)在 *Pichia pastoris* 中的表达水平, 我们进行了提高基因拷贝数及高密度发酵等多种手段实现其高水平表达的研究。在前期研究的基础上, 利用对已整合 *eg1* 的重组子再转化的方法, 从含有 2000  $\mu\text{g/L}$  Zeocin 的 YPDSZ 平板上筛选到高抗 Zeocin 转化子, 在摇瓶培养条件下, 该转化子表达量比原来提高了 3.8 倍, 在 pH 4~8 条件下均有稳定表达, 接种量( $OD_{600} = 5.0$ )表达水平最好, 提高甲醇的诱导浓度对表达有显著的促进作用。用 3.2L 发酵罐进行了高密度发酵, 甲醇诱导 95.5h 后达到最高值, 比摇瓶培养再提高了 6.4 倍, 因此利用高抗 Zeocin 转化子及高密度发酵的手段, 使 EG1 的表达水平提高了 34 倍, 蛋白表达量达 8.80mg/mL, EG1 酶活达到 543.36IU/mL, 实现了中性内切纤维素酶的高水平表达, 本研究将大大促进建立我国纺织用纤维素酶大规模高效生产技术。

**关键词** 中性内切型纤维素酶, 毕赤酵母, 高水平表达

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0071-06

**Abstract** The gene (*eg1*) encoding for novel endoglucanase 1 was cloned previously from Chinese straw mushroom *Volvariella volvacea*. EG1 has high thermal stability and optimal pH at neutral and shows great potential in textile and paper industry applications. To improve the expression level of EG1 in *Pichia pastoris*, the increasing copy number of clone, and its high cell density fermentation in 3.2L fermenter for its high-level expression were investigated in this work. By electro-transformation of pPICZ $\alpha$ B-*eg1* into GS115EG11 integrated with single copy of *eg1* gene, A resistant transformant with 3.8 times higher level expression than GS115EG11 was screened from YPDSZ plate containing 2000 $\mu\text{g/mL}$  of Zeocin. The effect of initial cell density, pH and methanol on its expression and biomass accumulation was evaluated in shaking culture. Optimal EG1 production was observed when initial cell density  $OD_{600}$  was 5.0. EG1 production and biomass accumulation did not seem to vary when cells were induced at different pH values. Both of EG1 and cell density were found to increase with higher methanol concentrations, reaching 62.48 IU/mL and 31.7 ( $OD_{600}$ ) respectively after 120 h induction with 2.0% (V/V) methanol compared to 30.24 IU/mL and 17.79 ( $OD_{600}$ ) with 0.25% methanol induction. EG1 expression was further increased by 6.4 times higher than

Received: September 21, 2005; Accepted: November 10, 2005.

This work was supported by a grant from the National Sciences Foundation of China (No.30271058).

\* Corresponding author. Tel: 86-25-85224711; E-mail: dshaojun@njfu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30271058) 校高层次留学回国人才基金项目 微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

shaking culture after 95.5 hours induction with methanol in fed-batch fermentation, so totally 34 times higher than that for GS115EG11 was achieved by screening of high Zeocin resistant clone and high cell density fermentation. The production of EG1 with 543.36IU/mL CMC activity and 8.80mg/mL protein expression was obtained in *Pichia pastoris*.

**Key words** neutral endoglucanase 1, *Pichia pastoris*, high-level production

纤维素酶在众多领域均具有广泛的应用前景,特别在纺织工业,纤维素酶已经成功地应用于牛仔布生物酶洗、纤维素类织物的生物抛光、Lyocell 织物的生物整理,成为纺织品和服装湿处理中的关键<sup>[1]</sup>。不过,纤维素酶本身的特性及生产成本仍然是限制纤维素酶在这些领域更广泛应用的主要障碍<sup>[2]</sup>。

纤维素酶它不是单一酶,而是起协同作用的多组分酶系,主要包括外切型纤维素酶(CBH)内切型纤维素酶(EG)以及 $\beta$ -葡萄糖苷酶(BGL)等三种酶<sup>[3]</sup>。但是,纺织工业及造纸工业的纤维素酶处理过程中,并不需三种纤维素酶组分协同作用把纤维素完全水解为葡萄糖,它往往造成纤维机械强度的下降。研究认为,单组分的EG就可以有效地部分水解纤维素纤维的无定型区,从而易被随后的机械揉搓将表面的微原纤维脱落,达到去除靛蓝染料及纤维生物改性的目的<sup>[4,5]</sup>。目前世界主要酶制剂厂商开发的纺织用纤维素酶多为富含EG或单组分EG的纤维素酶制品。

中性纤维素酶在牛仔布洗旧加工过程中,具有酶洗不易返染现象,处理织物的性能优良,通常用于高档产品的处理,需求量较大<sup>[6]</sup>,但目前产自 *Trichoderma reesei* 等纤维素酶高产真菌的纤维素酶一般为酸性纤维素酶<sup>[7]</sup>,因此,寻找中性内切型纤维素酶的新酶源,及其大规模高效生产技术对发展我国纺织用纤维素酶具有重大而深远的意义。

我们从我国草菇(*Volvariella volvacea*)中克隆到一种新的中性内切型纤维素酶的基因(*eg1*) (Genbank No. AF329732),该酶在中性pH环境中具有最高活性和较强的热稳定性<sup>[8]</sup>,酶用量为3IU/g,对靛蓝织物酶洗60分钟后的织物减量率为1.53%,该酶在废纸纤维生物脱墨中也有显著效果,有望成为理想的纺织及造纸用纤维素酶<sup>[9]</sup>,但EG1在草菇中的表达量较低,利用 *Pichia pastoris* 外源表达体系,我们成功地实现了EG1的分泌表达<sup>[10]</sup>。本文,为了进一步提高该酶表达水平,我们构建多拷贝数工程菌及高密度发酵工艺等多种策略来实现其高水平表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株、质粒 pPICZ $\alpha$ B-*eg1*;酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115(His<sup>-</sup>Mut<sup>+</sup>)工程菌 GS115EG11 均为本实验室保存。

**1.1.2 工具酶和生化试剂:**限制酶、T4DNA 连接酶购自 Promega 公司;蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品;SDS、TEMED、过硫酸铵、丙烯酰胺及 N,N' 甲叉双丙烯酰胺等购自 BIO-RAD 公司,CM-纤维素(CMC)购自 SIGMA 公司,其它化学试剂均为进口或国产试剂。

**1.1.3 培养基:**酵母培养基 BMGY、BMMY、YPD、YPDSZ、MD、MM 等配方见 Invitrogen 公司操作手册。

分批发酵培养基:含甘油 4%(W/V)发酵基础盐(Fermentation Basal Salts Medium)和 4mL/L PTM1 微量元素溶液配制而成。

补料生长培养基:50%甘油(W/V,含 12mL/L PTM1)补料液。

发酵诱导培养基:100%甲醇(含 12mL/L PTM1)诱导液。

**1.1.4 仪器:**GenePulser II 电穿孔仪购自 BIO-RAD 公司;GIS2026 图像分析系统购自上海天能公司;摇床购自 SHELLAB 公司;BIOSTAT CT2-2 全自动发酵罐购自 B. BRUAN 公司;紫外可见分光光度计 UV-1800 购自 Hitachi 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 酵母的电击转化及多拷贝数重组子筛选:**将已构建重组载体 pPICZ $\alpha$ B-*eg1* 用 *Sac* I 酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母工程菌 GS115EG11,该工程菌由我实验室构建,已整合了单拷贝的 *eg1* 基因,能分泌表达中性型纤维素酶 EG1。电转化后的酵母菌涂布于含有 2000 $\mu$ g/L Zeocin 的 YPDSZ 平板上,于 28 $^{\circ}$ C 培养 3~4d,挑取阳性转化子。这些转化子分别接种于 10mL BMGY(150mL 三角瓶)培养 1d,离心收集菌体后转接到 10mL BMMY 进行诱导培养,86 小时后测定上清液中的 CMC 酶活,筛选高表达菌株,电转化方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

1.2.2 多拷贝酵母工程菌和 GS115EG11 表达水平

的比较:分别接种2种工程菌于含有100mL BMGY的1L三角瓶中(每种均接3个三角瓶,下同),在28℃及250r/min培养1d,离心收集菌体,转接到含有100mL BMMY的1L三角瓶中继续诱导培养,每隔24h取样并添加1mL 100%甲醇培养6d,测定上清液中CMC酶活。

**1.2.3 摇瓶诱导表达条件的研究:**分别研究了接种量、起始pH、甲醇浓度对多拷贝酵母工程菌表达水平的影响。除接种量、起始pH、甲醇浓度不同外,培养过程都按如下进行:从平板上挑一单菌落,接入装有25mL BMGY的250mL三角瓶中,28℃,250r/min,培养24h。离心收集菌体,再接入至25mL BMMY中,30℃,250r/min培养。每24h补加100%甲醇,5d后收集上清液,比较CMC酶活、pH、 $OD_{600}$ 。

**1.2.3 分批高密度发酵:**经在BMGY摇瓶培养的培养液,按10%接种量接入到装有2.0L 4%甘油分批发酵培养基(pH5.0)的BIOSTAT CT2-2全自动3.2L发酵罐中,进行分批培养,搅拌速度为1000r/min,通纯氧维持溶氧(DO)在40%以上,流加28%氨水自动控制pH5.0,当碳源甘油耗尽后(DO陡然上升,1min内),流加补料生长培养基(流加速度20~36mL/min,溶氧维持大于40%)。当DO再次上升,甘油耗尽后,流加发酵诱导培养基进行甲醇诱导表达发酵,流加速度:0~4h,3.5mL/(L/h);5~24h,逐渐提高流加速度到10mL/(L/h),并一直维持该速度至发酵结束。通过调节氧气流量使溶氧(DO)一直大于40%,发酵过程中,每隔12h取样,测定 $OD_{600}$ 、湿重及CMC酶活,发酵结束后离心收集上清液。

**1.2.4  $OD_{600}$ 及细胞湿重的测定:**发酵液稀释后于波长600nm处以蒸馏水为对照进行比色测定, $OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$ ;取1mL发酵液在10000r/min离心10min,吸尽上清液后,称得的细胞重量换算为每升的克数即细胞湿重。

**1.2.5 SDS-PAGE分析及蛋白质浓度测定:**SDS-PAGE按Laemmli<sup>[10]</sup>方法进行,一定量的发酵液用样品缓冲液(0.8g SDS、4g蔗糖、5mL pH6.8的Tris-HCl缓冲液、2.5%BB和2mL  $\beta$ -巯基乙醇)于100℃处理10min,变性,浓缩胶浓度3.75%,分离胶浓度7.5%。考马斯亮蓝R250染色。蛋白质浓度测定采用Pierce公司的BCA蛋白测定试剂盒进行。

**1.2.6 CMC酶活的测定:**内切型纤维素酶的活性是利用Somogyi-Nelson方法<sup>[10]</sup>,用CM-纤维素(CMC)为底物测定经酶处理后,还原糖释放出的量来决定

的。总反应中含有1.0mL 0.1mol/L磷酸钾缓冲液(pH7.5)0.4mL 2% CM-纤维素(Sigma)和0.1mL经稀释后的酶液,对照不含CM-纤维素或酶液,经在50℃下反应30min后,加入0.5mL Somogyi试剂中止反应,在100℃下加热15min,冷却到室温时,加入0.5mL Nelson试剂,离心后测定反应液在520nm下的吸光值。酶活定义为每分钟生成1 $\mu$ mol葡萄糖的酶量为一个酶活单位。

## 2 结果

### 2.1 高抗Zeocin重组子筛选及和GS115EG11工程菌的比较

利用重组载体pPICZ $\alpha$ -eg1对GS115EG11工程菌再转化的方法,在含有2000 $\mu$ g/L Zeocin的YPDSZ平板中获得了60个阳性转化子,摇瓶培养表明,大部分转化子都比GS115EG11的表达水平有不同程度的提高,筛选出最高表达量的转化子GS115MEG1,比较二者在摇瓶条件下的表达水平,如图1。

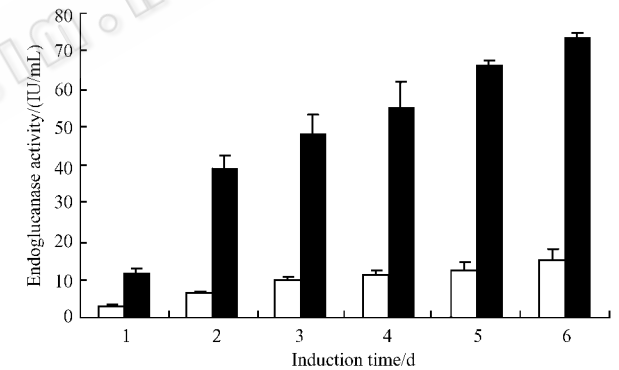


图1 高抗Zeocin重组子筛选及和GS115EG11工程菌的比较

Fig. 1 Comparison of expression level of EG1 in GS115MEG1 (■) and GS115EG11 (□)

从结果可以看出,培养6d后,多拷贝数重组子GS115MEG1的表达水平比出发菌株GS115EG11工程菌提高了3.8倍。

### 2.2 接种量对EG1表达的影响

GS115MEG1在BMGY培养过夜( $OD_{600} = 15$ ),离心后收集菌体,转接BMMY培养基(pH6.0),使细胞浓度( $OD_{600}$ )分别为1.0、2.5、5.0、10.0、15.0,每隔24h加入1.0%(V/V)的甲醇进行诱导,5d后测定CMC酶活、 $OD_{600}$ ,如图2,结果显示,接种量从1.0提高到15.0,培养液中最终的 $OD_{600}$ 增加了28.3%,但CMC酶活在接种量为5时最高,不同接种量之间相差并不显著,因此在下面的实验中采用1.0的接

种量。

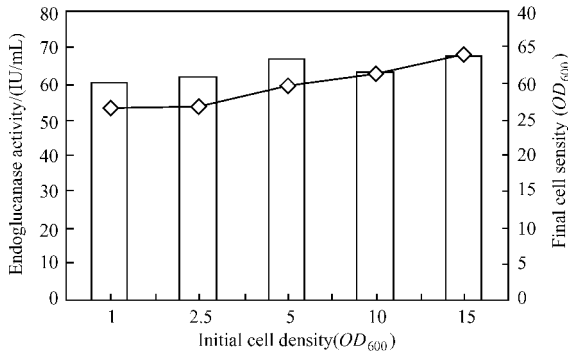


图2 接种量对EG1表达的影响

Fig. 2 Effect of initial cell density on the EG1 expression

□ Endoglucanase activity; ◇ Final cell density.

### 2.3 起始 pH 对 EG1 表达的影响

GS115MEG1 在 BMGY 培养过夜后,离心后收集菌体,接种于以 100mmol/L 的  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  为缓冲液配制的 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0 及 8.0 的 BMMY,每隔 24h 加入 1.0%(V/V)甲醇进行诱导,5d 后测定 CMC 酶活、 $OD_{600}$ 、pH,如图 3。

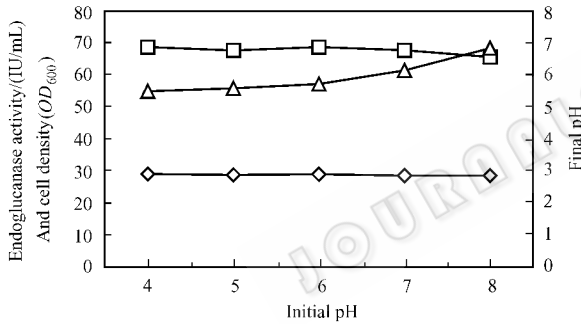


图3 起始 pH 对 EG1 表达的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on the EG1 expression

□ endoglucanase activity; ◇ cell density; △ final pH.

结果发现,pH4.0~8.0 的范围内,生长及表达良好,培养液中的 CMC 酶活及  $OD_{600}$  没有显著差别,但培养终止 pH 值有很明显的变化,在起始 pH 值为 6.0、7.0 及 8.0 的 BMMY 培养液中培养后的 pH 均有不同程度的下降,而起始 pH 值 4.0、5.0 的 BMMY 培养液中培养的 pH 均有不同程度的上升。

### 2.4 甲醇浓度对 EG1 表达的影响

将生长 BMGY 培养基的菌体接入含有甲醇百分比浓度(V/V)分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 的 BMMY (pH6.0)上进行诱导培养,每隔 24h 后补加相同浓度的甲醇,5d 后按上述方法测定 CMC 酶活、 $OD_{600}$ 、pH,如图 4,结果发现,摇瓶培养时,当甲醇的浓度由 0.25% 提高到 1.0% 时,CMC 酶活及  $OD_{600}$  均快速上升,CMC 酶活从 30.24IU/mL 提高到

57.41IU/mL,增幅达 89.8%,超过 1.0% 后,增幅趋于平缓,最终分别提高了 106.5% 和 78.2%。在试验中我们还发现,当甲醇浓度为 0.25% 和 0.5% 时,终止 pH 均都比起始 pH6.0 高。

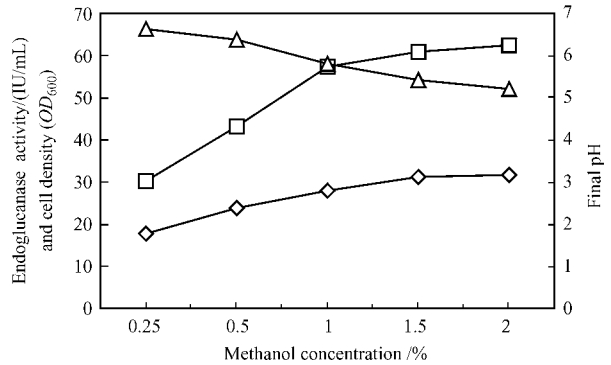


图4 甲醇浓度对 EG1 表达的影响

Fig. 4 Effect of methanol concentration on the EG1 expression

□ endoglucanase activity; ◇ cell density; △ final pH.

### 2.5 分批高密度发酵

进行了二批次发酵罐高密度发酵实验,第一批次发酵罐高密度发酵时,流加 50% 甘油量为 150mL,共进行了 128.5h 的发酵(甲醇诱导时间为 102h),在第一批次的基础上,优化发酵过程,我们进行了第二批次发酵,流加 50% 甘油的量增为 225mL,发酵时间延长为 144h(甲醇诱导时间为 113.5h),如图 5。

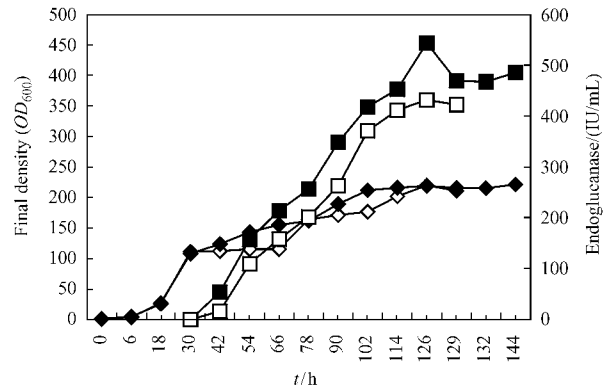


图5 GS115MEG1 的分批高密度发酵

Fig. 5 Batch-fed fermentation of GS115MEG1

□ and ■ Endoglucanase activity (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> fermentation respectively); ◇ and ◆ Final cell density (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> fermentation respectively).

二批次发酵结果表明,在发酵初期,酵母经过 6h 左右的延滞期后,细胞密度快速增加,进入甲醇诱导阶段,发酵液中的 CMC 酶活性线性增加,发酵 126h(甲醇诱导时间分别为 99.5h 和 95.5h 后)达到最高值,分别为 431.85IU/mL 和 543.36IU/mL,比摇瓶培养再提高了 4.89 和 6.41 倍,总蛋白质表达量

分别达 6.95mg/mL 和 8.80mg/mL, SDS-PAGE 显示, 如图 6 发酵液中目的蛋白的浓度逐渐增强。发酵结束后, 最终的细胞湿重分别为 354g/L 和 401g/L。

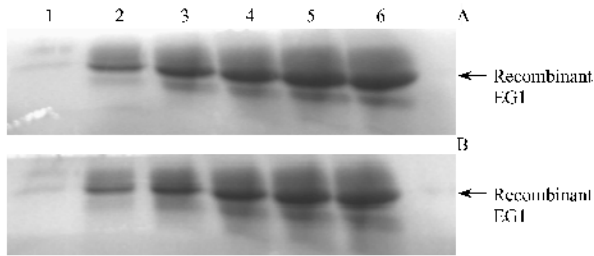


图 6 发酵液中分泌蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of protein secreted into fermentation liquid

A: 1<sup>st</sup> fermentation; 1~6: after 30, 54, 78, 102, 126, 128.5 hours fermentation respectively; B: 2<sup>nd</sup> fermentation; 1~6: after 30, 54, 78, 102, 126, 132 hours fermentation respectively.

### 3 讨论

#### 3.1 多拷贝数重组子筛选及对表达水平的影响

毕赤巴斯德酵母表达系统具有真核生物表达的特点, 且表达量高, 易于工业化发酵, 现已广泛用于外源蛋白的表达。但毕赤巴斯德酵母表达水平和目的基因密码子偏爱性、载体、克隆菌株、外源基因拷贝数的多少以及发酵工艺等多种因素都有极大的关系<sup>[11]</sup>。

由于单拷贝 *Sh ble* 基因整合到 *P. pastoris* 基因组中可以产生对 100 $\mu$ g/mL Zeocin 的抗性, 因此利用高浓度的 Zeocin 平板可筛选到高拷贝数转化子<sup>[12]</sup>。在毕赤巴斯德酵母的一次电转化中, 就可以发生外源基因连续整合到基因组, 从而形成多拷贝数的重组子, 但概率非常低, 很难能筛选到能在 2000 $\mu$ g/L Zeocin 的 YPDSZ 平板生长的多拷贝数的重组子。在这里, 我们对已整合了 *eg1* 的 GS115EG11 进行二次电转化的方法, 在含有 2000 $\mu$ g/L Zeocin 的 YPDSZ 平板上获得了 60 个阳性转化子, 极大地提高了转化率, GS115MEG1 和 GS115EG11 摇瓶对比试验表明, 表达量增加了 3.8 倍多。虽然有报道单拷贝数转化子足以获得高的表达量, 甚至高拷贝数反而降低表达量<sup>[13, 14]</sup>, 但对 EG1 来说, 提高基因拷贝数对提高表达水平十分有效。经过多次传代及诱导试验, 该转化子表达水平非常稳定。

#### 3.2 接种量、pH、甲醇浓度对生长及表达水平的影响

接种量、pH、甲醇浓度等外部条件是影响毕赤巴斯德酵母表达外源蛋白的重要因素, 提高接种量,

虽能相应地提高细胞密度, 但过高接种量下, EG1 的表达量反而略有下降, 这可能在摇床条件下受到养分及溶氧的限制, 生长状态不好。外源蛋白在表达过程的稳定性往往会影响最终表达量, 有些蛋白本身对 pH 非常敏感, 也易被 *P. pastoris* 分泌蛋白水解酶所降解, 这在高密度发酵中尤为严重<sup>[15]</sup>, 因此选择合适 pH 有重要意义。内切纤维素酶通常是包含纤维素接合域 (Cellulose Binding Domain) 和催化域 (Catalytic domain) 以一段多肽连接的双功能域蛋白, 连接多肽易被蛋白水解酶所降解, 这也是造成纤维素酶外源表达困难的原因<sup>[16]</sup>, 在我们的实验中, GS115MEG1 在 pH4.0~8.0 均生长良好, 有基本相同的表达水平, 表明重组 EG1 对蛋白水解酶稳定性很好。

GS115MEG1 是含 AOX1 强启动子、Mut<sup>+</sup> 的重组子, 甲醇的浓度是影响表达水平的最关键的参数, 甲醇既是强诱导剂, 但对细胞也有一定的毒性。当甲醇的浓度由 0.25% 提高到 2.0% 时, CMC 酶活及 OD<sub>600</sub> 大幅度提高, 表明甲醇可被 GS115MEG1 快速利用, 维持较高浓度的甲醇添加量, 不仅有利于提高细胞密度, 也有利于 AOX1 强启动子始终处于诱导状态, 提高表达水平。相反, 甲醇的添加量过低, 甲醇会过早耗尽, 会造成细胞饥饿, 也易使细胞处于非诱导状态, 降低表达水平, 在这种情况下, 细胞很可能会利用培养液中一些酸性有机物, 使 pH 上升。

#### 3.3 分批高密度发酵

高密度发酵是提高外源蛋白在 *P. pastoris* 表达量的重要策略之一。本实验在摇瓶发酵研究的基础上, 采用 3.2L 发酵罐进行发酵实验。两种发酵, 最高 CMC 酶活达分别比摇瓶培养再提高了 4.89 和 6.41 倍, 因此利用多拷贝转化子及高密度发酵策略, 我们成功地使 EG1 在 *P. pastoris* 表达量比原来的 GS115EG11 提高了 34 倍多。

精确控制甲醇的流加量, 维持合适的甲醇浓度和溶氧 (DO) 是保证外源蛋白在高密度发酵时表达量的最为关键的因素, 在这里, 我们通纯氧以维持溶氧, 利用 DO Spike 的方法很好地控制了甲醇的流加速度, 加之, 该工程菌从摇瓶培养上看, 具有较好的适应性, 易于高密度发酵, 二批次发酵结果均令人满意, 不过, 单纯利用利用 DO Spike 的方法, 也会造成甲醇浓度过高的情况<sup>[17]</sup>, 因此, 我们今后将会利用甲醇在线检测方法, 进一步优化发酵工艺, 我们相信, 表达量将会进一步提高。

随着诱导时间的延长, 细胞密度不再增高, 且

的蛋白的表达量略有下降,这可能由于密度过高,菌体代谢旺盛,有害物质积累导致其进入生长停滞期,发酵延长后色素增多,颜色加深,应及时放罐。

## 4 结论

中性内切型纤维素酶在纺织及造纸工业具有重要的应用,建立大规模高效生产技术对发展我国纺织用纤维素酶具有重大而深远的意义。我们利用毕赤巴斯德酵母表达体系,通过构建多拷贝重组子及高密度发酵工艺等多种策略,成功地使从我国草菇中克隆到新的中性内切型纤维素酶 EG1 的酶活达到 543.36IU/mL。目前,中性内切型纤维素酶市场需求量较大,价格昂贵,多为国际上大公司所垄断,本研究将大大有助于发展具有自主知识产权的中性内切型纤维素酶制剂生产技术。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advance*, 2000, **18** : 355 - 383
- [ 2 ] Lenting HBM, Warmoeskerken MMCG. Guidelines to come to minimized tensile strength loss upon cellulase application. *Journal of Biotechnology*, 2001, **89** : 227 - 232
- [ 3 ] Tomme P, Warren RAJ and Gilkes NR. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advance in Microbial Physiology*, 1995, **37** : 2 - 81
- [ 4 ] Lui J, Otto E, Lange NK, Husain P *et al.* Bio-polishing of cotton knit: from multicomponent cellulase complex to mono-component. Book of papers of the International Conference and Exhibition of the AATCC, Philadelphia, PA, 1998, pp. 445 - 454
- [ 5 ] Arja Miettinen-Oinonen, Pirkko Suominen. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68** : 3956 - 3964
- [ 6 ] Arja Miettinen-Oinonen, John Londesborough, Vesa Joutsjoki *et al.* Three cellulases from *gMelanocarpus albomycesg* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **34** : 332 - 341
- [ 7 ] Heikinheimo L, Miettinen-Oinonen A, Suominen P *et al.* Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Research Journal*, 2000, **70** : 969 - 973
- [ 8 ] Ding SJ, Ge W, Buswell JA. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvarella volvacea*: purification, characterization, cloning and expression. *European Journal of Biochemistry*, 2001, **268** : 5687 - 5695
- [ 9 ] Wu SF(吴淑芳), Ding SJ(丁少军), Li ZZ(李忠正). Function of endoglucanase I in the deinking process of office waste paper. *Chemistry and Industry of Forest Products(林产化学与工业)*, 2005, **25** : 87 - 90
- [ 10 ] Ding SJ, Ge W, Buswell JA. Secretion, purification and characterization of a recombinant *Volvarella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31** : 621 - 626
- [ 11 ] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Review*, 2000, **24** : 45 - 66
- [ 12 ] Vale'rie Sarraemagna, Pascal Demange, Alain Milon *et al.* Optimizing Functional versus Total Expression of the Human m-Opioid Receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002, **24** : 212 - 220
- [ 13 ] Vassileva A, Chugh SD, Swaminathan A *et al.* Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2001, **21** : 71 - 80
- [ 14 ] Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB *et al.* Production of mouse epidermal growth factor in yeast: High-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991, **105** : 205 - 212
- [ 15 ] Feng H, Meinander NO, Jonsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **79** : 438 - 449
- [ 16 ] Ferrarese L, Trainotti L, Gattolin S *et al.* Secretion, purification and activity of two recombinant pepper endo-beta-1,4-glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letter*, 1998, **422** : 23 - 26
- [ 17 ] Zhou XS(周祥山), Fan WM(范卫民), Zhang YX(张元兴). Effects of different methanol feeding strategy on hirusin production in high density fermentation by recombinant *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(3): 348 - 351