

混合碳源流加对重组毕赤酵母生产碱性果胶酶的影响

汪志浩¹, 张东旭¹, 李江华¹, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学 食品科学技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要: 为提高重组毕赤酵母生产碱性果胶酶(PGL)的产量和生产强度, 在诱导期采用多种碳源与甲醇混合添加的模式。实验结果发现: 甘油、山梨醇、乳酸与甲醇的混合添加均可以提高 PGL 的产量, 其中山梨醇与甲醇的混合流加效果最为显著。研究表明, 通过双碳源混合流加可以提高细胞活力, 增强醇氧化酶活力, 提高毕赤酵母表达外源蛋白效率。当山梨醇的流速为 3.6 g/(h·L)时, PGL 酶活可达 1593 U/mL, 生产强度为 16.7 U/(mL·h), 比对照分别提高了 84.6%和 45.2%, 实现了碱性果胶酶的高效生产。

关键词: 重组毕赤酵母, 碱性果胶酶, 混合碳源, 流加策略, 细胞存活率, 醇氧化酶(AOX)

Effects of mixed carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for polygalacturonate lyase production

Zhihao Wang¹, Dongxu Zhang¹, Jianghua Li¹, Guocheng Du¹, and Jian Chen^{1,2}

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

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to increase the production and productivity of alkaline polygalacturonate lyase (PGL), we studied the mixed carbon sources feeding strategies during the induction phase by recombinant *Pichia pastoris* GS115. Glycerol, sorbitol or lactic acid co-feeding with methanol all enhanced the PGL production. Among all the feeding strategies, the sorbitol co-feeding strategy was most significant. By using this strategy, the PGL activity and productivity reached 1593 U/mL and 16.7 U/(mL·h). Compared to the control, the enhancements of PGL activity and productivity were 84.6% and 45.2% respectively, when we set the sorbitol feeding rate at 3.6 g/(h·L).

Keywords: recombinant *Pichia pastoris*, polygalacturonate lyase, mixed carbon sources, feeding strategy, cell viability, alcohol oxidase (AOX)

巴斯德毕赤酵母是一种广泛应用的外源蛋白表达系统, 目前已经数百种外源蛋白及多肽在这个系统中得到了成功的表达, 并进行了工业化生产^[1]。重组毕赤酵母的表型可以根据其对甲醇利用能力的

Received: September 16, 2009; **Accepted:** November 6, 2009

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-07-0378), National Natural Science Foundation of China (No. 20836003), Key Technologies Research and Development Program of Jiangsu Province, China (No. BE200900022), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2009AA02Z204).

Corresponding author: Dongxu Zhang. Tel: +86-510-85918309; E-mail: zhangdongxu@jiangnan.edu.cn

Jianghua Li. Tel: +86-510-85918309; E-mail: a302304@163.com

教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-07-0378), 国家自然科学基金(No. 20836003), 江苏省科技支撑计划(No. SBE200900022), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2009AA02Z204)资助。

不同将其分成 3 类: Mut⁺型(甲醇快速利用型)、Mut^s型(甲醇慢利用型)、Mut⁻型(甲醇非利用型)^[2]。每种表型都有其各自的特点,比如 Mut^s型菌株在甲醇诱导阶段的生长能力要明显劣于 Mut⁺型,但是在某些外源蛋白的表达上既可以消耗较少的甲醇又达到了较高的表达水平。而 Mut⁺型菌株则可以适应培养基中较高的甲醇浓度,抵抗甲醇毒害的能力也优于 Mut^s^[3-4]。故此,由于外源蛋白对宿主的不同要求,3 种表型的毕赤酵母各有用处,但 Mut⁺型与 Mut^s型的应用更为广泛。

碱性果胶酶(Polygalacturonate lyase, PGL)是一类能在碱性条件下高效分解植物组织中果胶质(由 D-半乳糖醛酸以 α -1,4 糖苷键连接形成的直链状的聚合物)的酶的总称^[5],作为一种用于纺织清洁生产的全新温和的酶制剂而备受关注。目前国内外的研究工作主要集中于 PGL 的野生菌株筛选和基因工程菌构建上^[6-7]。本研究室在前期工作中分离筛选得到一株碱性果胶酶高产菌株 WSHB04-02^[8],扩增出其编码碱性果胶酶的基因,并成功表达于 *Pichia pastoris* GS115 中^[9],通过王芸等的优化控制,碱性果胶酶的产量可达 863 U/mL,处于国际领先水平^[10-11]。

现今,在毕赤酵母表达体系中,混合碳源流加策略被逐渐采用,甘油等碳源和甲醇的混合添加可以提高外源蛋白的表达效率^[12-14]。为了降低甲醇对细胞的毒害作用,进一步提高碱性果胶酶的产量,本研究通过研究甘油、山梨醇、乳酸和甲醇的混合流加策略,降低了细胞死亡率,提高了胞内启动子 AOX 酶的表达效率,从而实现了碱性果胶酶的更高效表达。

1 材料与方法

1.1 菌株

以 *P. pastoris* GS115 (Invitrogen)为宿主,整合来自 *Bacillus* sp. WSHB04-02 菌株中的碱性果胶酶的编码基因,具有 His⁺和 Mut⁺表型,拷贝数为 2~3 个,由本实验室构建并保存^[9]。

1.2 培养基

1.2.1 YPD 种子培养基

葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L。

1.2.2 分批发酵培养基(BSM)

85%磷酸 26.7 mL/L, CaSO₄ 0.93 g/L, K₂SO₄ 18.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 甘油 40.0 g/L, PTML^[13] 4.35 mL/L, 25%氨水调 pH 5.5。

1.2.3 补料生长培养基

50%(W/V)甘油(含 12 mL/L PTM1)。

1.2.4 发酵诱导培养基

100%甲醇(含 12 mL/L PTM1), 50%(W/V)甘油(含 12 mL/L PTM1), 50%(W/V)山梨醇(含 12 mL/L PTM1), 50%(W/V)乳酸(含 12 mL/L PTM1)。

1.3 培养方法

1.3.1 种子摇瓶培养

从甘油管中接 800 μ L 菌液于 50 mL YPD 中(50 mL 培养基/500 mL 三角瓶),于 30°C、200 r/min 培养 24 h。

1.3.2 补料高密度发酵培养

将 YPD 中菌液接入 3 L 全自动发酵罐(LiFlus GM BioTRON, Korea),接种量为 10%,以 25%氨水控制 pH 5.5,温度 30°C,调节搅拌转速和通气量维持溶氧 30%以上。当甘油耗尽(DO 迅速上升)时,开始流加补料生长培养基。当菌体达到一定浓度后,停止补料。待甘油再次耗尽,继续保持基质匮乏状态约 1 h 后,开始流加诱导培养基,把诱导温度降低至 22°C,并且维持整个诱导过程甲醇浓度为 2%(W/V),诱导 PGL 表达。发酵过程由发酵罐控制系统软件进行在线控制和数据采集^[15]。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体干重的测定

取 10 mL 发酵液置于离心管中,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,将离心菌体置于 105°C,烘至恒重,称量并计算菌体干重(Dry cell weight, DCW, 单位为 g/L)。

1.4.2 碱性果胶酶活性的测定

参见文献[8]。一个标准酶活单位(1 U)定义为:每分钟使聚半乳糖醛酸裂解产生 1 μ mol 的不饱和聚半乳糖醛酸的酶量。

1.4.3 甲醇、甘油、山梨醇、乳酸浓度的测定

甲醇残留浓度采用流加检测仪测定与控制(FC2002, East China University of Science and

Technology)。甘油、山梨醇、乳酸采用高效液相色谱(HPLC)法。Waters 600 HPLC system (Waters Corp., USA), C₁₈ 反相柱(Waters Sugar Pak I); 流动相: 纯水; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 85°C; 进样量: 10 μL; 检测器: 示差折光检测器。

1.4.4 醇氧化酶 AOX 活力测定

由于 AOX 催化生成的 H₂O₂ 与 4-氨基安替比林反应生成红色的醌, 醌在 500 nm 具有最大吸收光。通过将发酵液离心处理后, 0°C 下超声破碎, 经 4°C 离心, 得无细胞酶液。在 37°C、500 nm 下用 UV2450 分光光度计动态测定无细胞酶液吸光度的改变, 计算出醌的增加量来测定 AOX 的活力。酶活单位(1 U)定义为: 每分钟产生 1 μmol 的过氧化氢所需的酶量^[16]。

1.4.5 细胞活力测定

细胞活力采用 FITC 荧光染色技术测定^[17]。取 1 mL 样品在 10 000×g 下离心 1 min, 用 Tris-HCl (pH 9.0)重悬。重悬后的样品加入适量的 FITC 染料在 30°C 下培养 30 min, 离心, 用 Tris-HCl 洗涤 2~3 遍。利用血球计数板和荧光显微镜 (Nikon Digital Camera DXM 1200C)对活死细胞进行观察和计数, 细胞能够吸收绿色染料从而在荧光下显示亮绿色的表明是死细胞, 反之则是活细胞。

2 结果与讨论

2.1 山梨醇与甲醇的混合流加

在前期的研究中得到以下结论: 诱导期采用

22°C 的低温诱导发酵, 甲醇残留浓度维持在 2%(W/V)左右, 最终 PGL 的产量可达 863 U/mL^[11]。但在其他 *P. pastoris* 表型的发酵过程中, 甲醇残留浓度一般被控制在 0.5%^[18]。由此认为甲醇残留浓度维持在 2%(W/V)左右, 在将近 100 h 的诱导期中, 甲醇会对细胞生理造成较大的毒性, 从而限制了 PGL 产量的进一步提高。而在 Mut^s 中, 山梨醇是一种不会抑制 AOX 启动子的碳源^[19], 即山梨醇不会影响菌体对甲醇的吸收, 但山梨醇的存在可以有效缓解由于大量表达外源蛋白造成的对细胞的代谢负担。本研究采用山梨醇和甲醇的混合流加策略, 即在诱导期采用一系列低速流加山梨醇(0、1.80、3.60、7.20 g/(h·L)), 诱导期的菌体量、PGL 的产量等结果如图 1 所示。当山梨醇的流速为 3.60 g/(h·L) 时, 诱导 100 h, PGL 的产量和平均生产强度分别可达 1592 U/mL 和 16.7 U/(mL·h), 比甲醇单一流加策略下结果提高了 84.6%和 45.2%。同时, 添加山梨醇后的平均产酶速率要比对照实验有明显提高, 最大比产酶速率可以达到 0.19 U/(g·h) (图 2A), 而 PGL 比酶活也提高了 63.7%。由此可见, 山梨醇以合适的低速流加时, 不仅可避免其过量累积, 也不会影响菌体对甲醇的利用效果, 进而显著增加 PGL 的产量。

2.2 甘油与甲醇的混合流加

甘油与甲醇的混合流加是研究最早的一种混合碳源流加方式^[20]。甘油是毕赤酵母最容易吸收利用

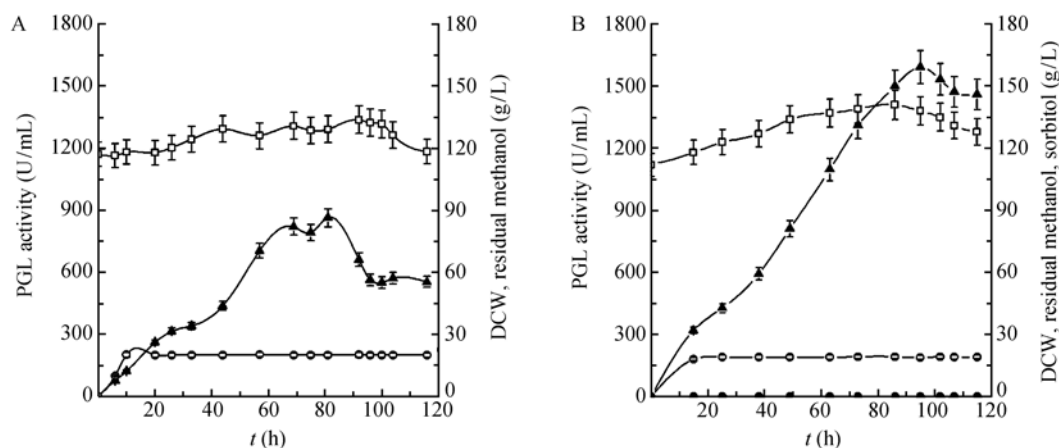


图 1 山梨醇与甲醇混合添加的发酵过程曲线

Fig. 1 Time evolution of biomass(□), residual methanol concentration(○), PGL production(▲), and residual sorbitol concentration(●) under the different sorbitol feeding rates in the induction phase. (A) 0 g/h. (B) 3.60 g/h.

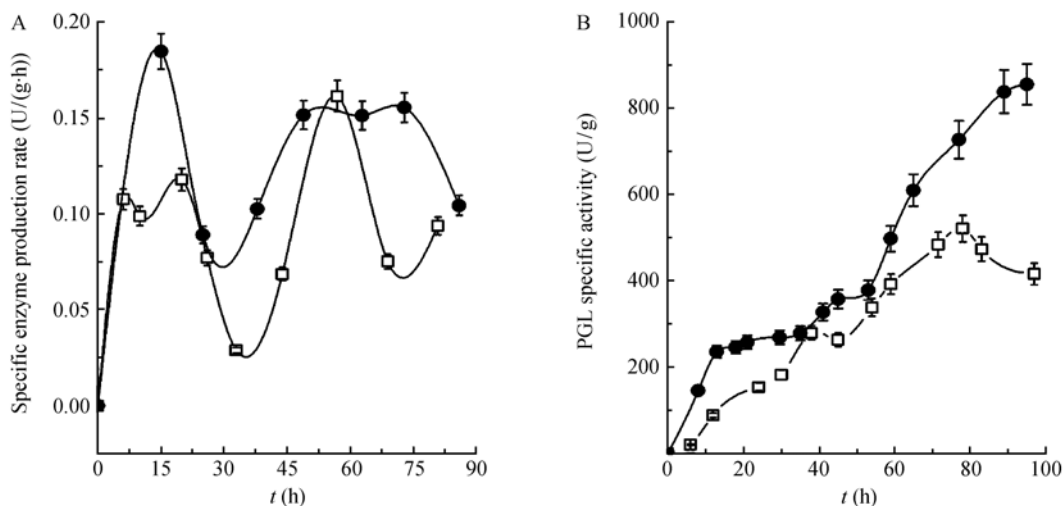


图 2 山梨醇与甲醇混合添加对细胞比产酶速率(A)和 PGL 比酶活的影响(B)

Fig. 2 Time courses of specific enzyme production rate (A) and PGL specific activity (B) in mixed substrates fed-batch cultures when the sorbitol feeding rate was controlled at 0 g/(h·L) (□) and 3.6 g/(h·L) (●) in the post-induction phase.

的碳源, 在诱导期加入少量甘油可以提高细胞活力, 从而增加比生长速率和比产酶速率^[21]。但甘油添加过量会导致溢流代谢物乙醇产生, 阻遏启动子 AOX1 的表达, 从而影响外源蛋白的产量^[22], 所以甘油流速的控制要求较山梨醇更为苛刻。本研究考察了甲醇残留浓度同样维持在 2%, 低速流加甘油 (1.78 g/(h·L)、3.56 g/(h·L)、7.17 g/(h·L))对 PGL 的影响。如图 3A, 当甘油流速为 3.56 g/(h·L)时, 效果

最为明显, PGL 酶活最高可达 1191 U/mL, 平均生产强度为 12.7 U/(mL·h), 比对照分别提高了 38.0% 和 19.8%。而甘油流速为 7.17 g/(h·L), 体系中测出甘油存在少量累积, PGL 的产量也和对照相近。因此, 甘油和甲醇的混合添加虽然可以提高 PGL 产量, 但幅度要小于山梨醇, 且由于其残留浓度控制要求较高, 所以在大规模生产中的操控性更为困难。

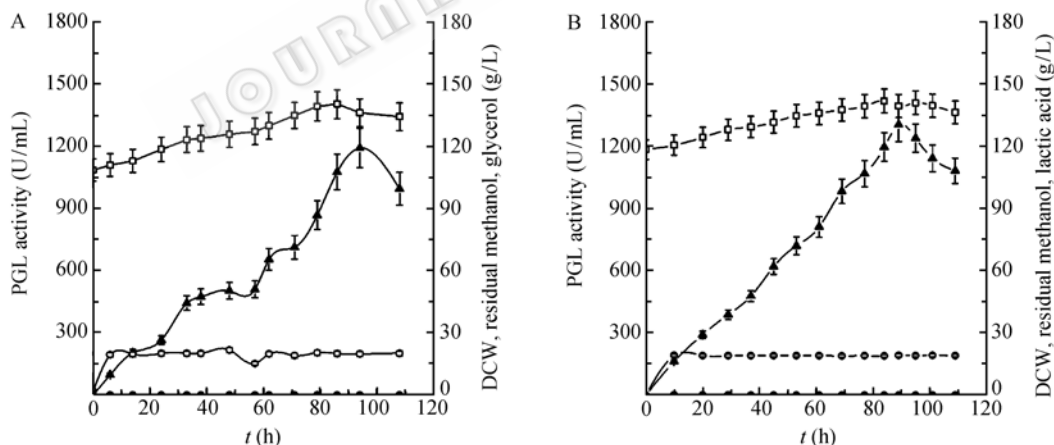


图 3 甘油、乳酸与甲醇混合添加的发酵过程曲线

Fig. 3 Time evolution of biomass(□), residual methanol concentration(○), PGL production(▲), and residual glycerol (A) or lactic acid (B) concentration(●) under the mixed carbon feeding strategy in the induction phase. (A) 3.56 g/(h·L). (B) 3.64 g/(h·L).

2.3 乳酸与甲醇的混合流加

乳酸也可作为一种非抑制性碳源参与毕赤酵母表达体系, Xie 曾经报道在 *P. pastoris* Mut^s 型发酵过程中, 乳酸与甲醇混合添加可以最大程度提高血管

生长抑制素的产量和生产强度^[12], 但在 Mut⁺型中的报道则更为罕见。本实验研究了乳酸与甲醇的混合流加对 *P. pastoris* GS115 Mut⁺产 PGL 的影响, 乳酸的流速为 1.82 g/(h·L)、3.64 g/(h·L)和 7.28 g/(h·L)。如图

3B所示,当乳酸的流速为3.64 g/(h·L)时,PGL酶活最高为1305 U/mL,平均生产强度为14.6 U/(mL·h),比对照提高了50.9%和37.7%。乳酸和山梨醇相似,体系中残留低浓度的乳酸是不会影响AOX1的表达,所以控制乳酸的流速比甘油更为简便。但是乳酸作为一种弱酸,会对发酵体系的pH产生一定的冲击,不利于体系的pH维持稳定,这可能也是限制PGL产量进一步提升的原因之一。表1比较了3种碳源和甲醇混合添加对发酵重要指标的影响。

表1 不同流加方式下细胞生长和PGL合成过程参数比较
Table 1 Comparison of parameters for PGL production under different mixed carbon sources during the induction phase

Carbon sources combination	Methanol	Sorbitol and methanol	Glycerol and methanol	Lactic acid and methanol
Induction period (h)	81	95	94	89
Initial DCW (g/L)	117.1	120.4	115.4	118.3
Final DCW (g/L)	129.2	138	136.5	139.2
Maximum PGL activity (g/mL)	863	1592	1191	1305
Average specific growth rate (h ⁻¹)	0.0013	0.0015	0.0019	0.0020
Average specific enzyme production rate (U/(g·h))	0.0865	0.130	0.101	0.114
PGL productivity (U/(g·h))	10.6	16.7	12.7	14.6

2.4 不同碳源流加对胞内 AOX 酶的影响

为了进一步了解混合碳源对重组 *P. pastoris* 生产 PGL 的影响,以下研究考察了混合碳源对胞内 AOX 酶活和细胞活力的影响。*P. pastoris* 对外源蛋白的表达受到 AOX1 启动子调控,AOX 醇氧化酶是甲醇代谢途径中第一个关键酶,它受甲醇的诱导启动,受甘油的阻遏。Jungo 等^[23]提出醇氧化酶的合成受碳源的影响较大,山梨醇、乳酸与甘油不同,它们是不会对 AOX1 启动子造成抑制的碳源,所以山梨醇与乳酸的残留浓度的控制要更为方便。通过测定 AOX 酶的活性,发现在诱导前 40 h,差异不大。无论是否采用双碳源流加,胞内 AOX 酶活性均急剧上升,而诱导 40 h 后,胞内 AOX 酶活性差异变大。在流加山梨醇(3.60 g/(h·L))和乳酸(3.64 g/(h·L))的条件下,AOX 酶活性在诱导 70 h 左右达到最大,为 6.9 U/g 和 7.4 U/g,而在添加甘油(3.56 g/(h·L))的情

况下,AOX 酶活也可达 6.1 U/g,之后它们又都以相似的速度开始下降。相反,空白实验在 75 h 的 AOX 酶活最高值只有 5.4 U/g,之后其下降的速度更快(图 4)。由此可见,山梨醇等碳源低速流加时,醇氧化酶 AOX 没有受到抑制,并且有可能随着细胞活力的增强,其酶活得到更大程度的提高。

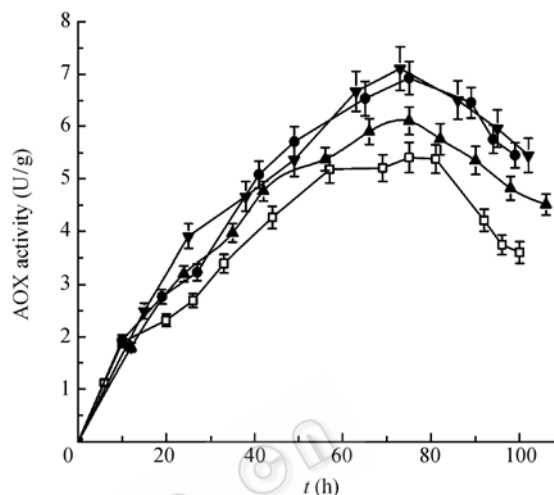


图4 混合碳源流加对胞内醇氧化酶(AOX)的影响

Fig. 4 Time evolution of intracellular AOX activity under mixed carbon sources feeding strategies in the post-induction phase. methanol (\square), lactic acid co-feeding (\bullet), glycerol co-feeding (\blacktriangle), sorbitol co-feeding (\blacktriangledown).

2.5 不同碳源流加对细胞存活率的影响

FITC 荧光染色法可用作观察发酵过程中的活细胞和死细胞的变化情况。从图 5 中可知,诱导前 30 h,细胞死亡现象均不明显。在山梨醇流加条件下,诱导 90 h 以后,细胞死亡率仅为 8.8%;然而甲醇作为单一碳源的流加模式下,细胞死亡率在 30 h 后迅速上升,到发酵结束时,细胞死亡率在 28.1%左右。在乳酸和甘油的添加条件下,细胞死亡率也只有 13.6%和 9.6%。结果表明:混合碳源流加策略可以显著提高细胞活力,减少甲醇的毒害作用,从而使碱性果胶酶的产量得以提高。另外,Sinha 曾研究过毕赤酵母随着细胞的死亡,可以从胞内分泌释放蛋白酶,而蛋白酶的降解作用也是限制外源蛋白产量提高的重要原因之一^[24]。所以,由于山梨醇等碳源的加入使细胞死亡率降低,从而削弱了蛋白酶的降解作用,从侧面为 PGL 产量的提高做出了贡献。

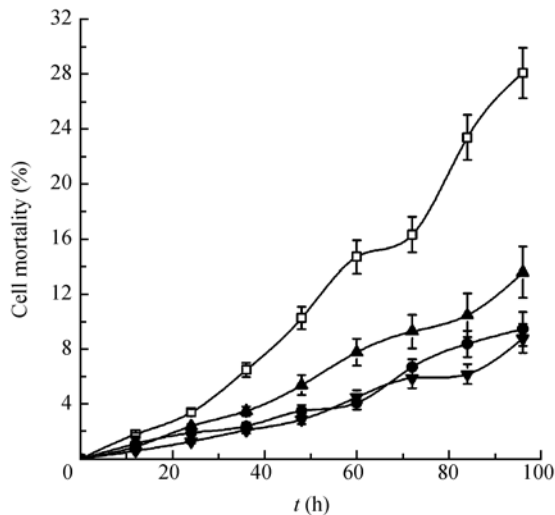


图5 混合碳源流加对细胞死亡率的影响

Fig. 5 Effect of mixed carbon sources feeding strategies on cell mortality in the post-induction phase. methanol (□), lactic acid co-feeding (●), glycerol co-feeding (▲), sorbitol co-feeding (▼).

3 结论

在重组毕赤酵母发酵生产 PGL 中发现, 采用合适的流速进行双碳源混合流加策略可以提高细胞活力, 增强醇氧化酶活力, 使毕赤酵母高效表达外源蛋白。其中, 山梨醇与甲醇混合添加的效果最为显著, 实现了 PGL 发酵生产的高产量(1592 U/mL)和高生产强度(16.7 U/(mL·h))的统一。因此, 双碳源流加方式不仅可以提高 PGL 的产量, 更可以推广至生产其他外源蛋白的毕赤酵母 Mut⁺型菌株中, 为该系统高效表达外源蛋白提供新的策略。

REFERENCES

- [1] Gereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microb Rev*, 2000, **24**: 45–66.
- [2] Peng LS, Zhong XF, Ou JX, *et al.* High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 2004, **108**: 185–192.
- [3] Cregg JM, Tschoop JF, Stillman C, *et al.* High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 1987, **5**: 479–485.
- [4] Chiruvolu V, Cregg JM, Meagher MM. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb Technol*, 1997, **21**: 277–83.
- [5] Kalantzi S, Mamma D, Christakopoulos P, *et al.* Effect of pectate lyase bioscouring on physical, chemical and low-stress mechanical properties of cotton fabrics. *Bioresource Technol*, 2008, **99**: 8185–8192.
- [6] Matsumoto T, Katsura D, Kondo A, *et al.* Efficient secretory overexpression of *Bacillus subtilis* pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification. *Biochem Eng J*, 2002, **12**: 175–179.
- [7] Bekri MA, Desair J, Keijers V, *et al.* *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 2440–2447.
- [8] Zhang JH, Li Y, Liu H, *et al.* Isolation, phylogenetic analysis of a bacterium with high yield of alkaline pectate lyase and optimization of its culture conditions. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11**: 354–358.
张健红, 李寅, 刘和, 等. 一株碱性果胶酶高产细菌的分离、系统发育分析和产酶条件的初步优化. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**: 354–358.
- [9] Zhuge B, Du GC, Wei S, *et al.* Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J*, 2008, **40**: 92–98.
- [10] Wang Y, Wang ZH, Du GC, *et al.* Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration. *Bioresource Technol*, 2009, **100**: 1343–1349.
- [11] Wang Y, Wang ZH, Xu QL, *et al.* Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2008, **44**(9): 949–954.
- [12] Xie JL, Zhou QW, Peng D, *et al.* Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiotensin production. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **36**: 210–216.
- [13] Zhang WH, Sinha J, Smith LA, *et al.* Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnol Progress*, 2005, **21**: 386–393.
- [14] Xie JL, Zhang L, Ye Q, *et al.* Angiotensin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 173–177.
- [15] Lee CY, Lee SJ, Jung KH, *et al.* High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2003, **38**: 1147–1154.
- [16] Suye S, Ogawa A, Yokoyama S, *et al.* Screening and identification of *Candida methanosorbosa* as alcohol oxidase-producing methanol using yeast. *Agric Biol Chem*, 1990, **54**: 1297–1298.
- [17] Breeuwer P, Abee T. Assessment of the intracellular pH of immobilized and continuously perfused yeast cells employing fluorescence ratio imaging analysis. *J Methods Microbiol*, 2000, **39**: 253–264.
- [18] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.*

Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**: 249–270.

[19] Jungo C, Schenk J, Pasquier M, *et al.* A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 2007, **131**: 57–66.

[20] Jungo C, Marison I, von Stockar U. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: a quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J Biotechnol*, 2007, **128**: 824–837.

[21] Xie JL, Zhou QW, Zhang L, *et al.* Feeding of mixed carbon resource during the expression phase in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* expressing angiostatin. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(4): 467–470.

谢静莉, 周庆玮, 张励, 等. 表达血管生长抑制素的重

组毕赤酵母在诱导阶段混合碳源的流加. *生物工程学报*, 2003, **19**(4): 467–470.

[22] Files D, Ogawa M, Scaman CH, *et al.* A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme Microb Technol*, 2001, **29**: 335–340.

[23] Jungo C, Rerat C, Marison IW, *et al.* Quantitative characterization of the regulation of the synthesis of alcohol oxidase and of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut(+) strain. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39**: 936–944.

[24] Sinha J, Plantz BA, Inan M, *et al.* Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89**: 102–112.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

中国至 2050 年生物质资源科技发展路线图(中、英版)

中国科学院生物质资源领域战略研究组

中文版 978-7-03-025304-0 ¥ 65.00 2009 年 8 月 出版
 英文版 978-7-03-025639-3 ¥ 124.00 2009 年 10 月 出版

本书从我国国情出发, 面向未来, 综合考虑需求、资源、环境、科技和经济等多方面因素, 在近期突出生物质能源的前提下, 明晰我国生物质资源未来发展, 前瞻性研编至 2050 年科技发展路线图。重点涵盖 6 个方面的内容: 光合作用机理与提高作物及能源植物光能利用效率, 生物质能源与能源植物, 微生物资源发掘利用——一个巨大的未知资源世界, 战略生物资源的发掘和可持续利用, 基因组与生物质基因资源, 生物质资源的特殊利用——仿生科学与技术。

本报告可作为政府部门、科研机构、大学、企业进行科技战略决策的重要参考, 也可供国内外专家、学者研究和参考。

