

乙醇对重组毕赤酵母表达猪 α 干扰素的性能及其碳源代谢关键酶活性的影响

丁健¹, 高敏杰¹, 侯国力¹, 梁克学¹, 史仲平^{1,*}, 于瑞嵩², 李震²

(1. 江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122;

2. 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

摘要: 本研究将细胞培养末期乙醇积累浓度低于 2g/L 的两个批次作为对照, 探讨了长时间 (大于 4h) 和瞬时的高乙醇浓度 (10g/L 以上) 对猪 α 干扰素表达性能以及碳源代谢关键酶活性的影响。结果表明, 长时间的高乙醇环境会大幅度降低甘油以及甲醇代谢过程中关键酶的比活性, 最终导致猪 α 干扰素表达水平比对照组降低约 4~12 倍; 高乙醇浓度的瞬时冲击后, 上述关键酶比活性也会有一定程度的降低, 猪 α 干扰素表达水平降低约 8 倍。

关键词: 毕赤酵母, 乙醇积累, 猪 α 干扰素, 酶活

Effect of ethanol accumulation on porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* and activities of key enzymes in carbon metabolism

DING Jian¹, GAO Min-jie¹, HOU Guo-li¹, LIANG Ke-xue¹, SHI Zhong-ping^{1,*}, YU Rui-song², LI Zhen²

(1. The key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China)

Abstract: In the present study, taking two batches with low ethanol accumulation under 2g/L as control group, effect of long-term (> 4h) and instantaneous high ethanol concentration (> 10g/L) on porcine interferon α production and activities of key enzymes in carbon metabolism was discussed. As a result, long-term high ethanol concentration severely deteriorated specific activities of the enzymes, and pIFN- α expression level was decreased about 4~12 folds. Similarly, instantaneous high ethanol concentration also deteriorated specific activities of the enzymes, and pIFN- α expression level was decreased about 8 folds.

Key words: *P. pastoris*; ethanol accumulation; porcine interferon α ; enzymes activities

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)21-0150-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.21.024

毕赤酵母表达系统是一类应用广泛的真核表达系统, 因其具有表达效率高、外源基因遗传稳定、易实现高密度培养、产物可分泌和蛋白翻译后加工等众多其它表达载体所无法比拟的优点, 受到越来越多的重视和应用^[1-2]。重组毕赤酵母发酵生产外源蛋白的发酵过程, 主要包括前期的细胞培养以及后期的甲醇诱导两个阶段。在细胞培养阶段, 通常以甘油作为碳源, 促使菌体大量增殖。经过 30~35h 的培养, 细胞可达到 130~150g-DCW/L 的较高浓度。在诱导阶段, 向发酵体系中添加诱导剂甲醇, 诱导外源蛋白的表达^[3]。近年来, 细胞培养阶段的研究工作主要集中于通过优化甘油流加工艺, 提高细胞的比

生长速率, 为后期的诱导表达过程提供尽可能多的菌体^[4]。然而, 在相同的诱导条件下, 影响目的蛋白表达水平的主要因素并非只有细胞浓度, 细胞的生理活性与功能同样重要。本研究室在前期工作中发现, 毕赤酵母发酵细胞培养阶段末期甘油过量添加会导致乙醇大量积累, 并且提出了改良型的 DO-Stat 甘油流加策略, 有效抑制乙醇的积累, 提高了猪 α 干扰素的表达水平^[5]。在前期研究的基础上, 本研究进一步探讨了甘油流加末期长时间的高乙醇浓度环境以及短时间内高乙醇浓度冲击对目的蛋白表达水平以及碳源代谢途径中关键酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甲醇利用慢型菌株 *Pichia pastoris* KM71H。由上海农业科学院畜牧所构建, 载体为 pPICZa。

平板培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 营养琼脂 2.5%; 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10; 罐发酵初始培养基 (g/L):

收稿日期: 2014-01-23

作者简介: 丁健 (1983-), 男, 博士研究生, 研究方向: 发酵过程控制。

* 通讯作者: 史仲平 (1962-), 男, 教授, 研究方向: 发酵过程控制。

基金项目: 国家自然科学基金 (#31301408); 江苏省自然科学基金 (#BK20130122)。

甘油 20, $MgSO_4$ 1, K_2SO_4 1, $(NH_4)_2SO_4$ 5, $CaSO_4$ 0.1, H_3PO_4 2 (% , v/v), PTM_1 10 (mL/L), pH6.0; 甘油流加培养基 (g/L): 甘油 500, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.03, PTM_1 10 (mL/L); 甲醇诱导培养基: 甲醇 500, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.03, PTM_1 10 (mL/L); 山梨醇 (共混) 流加培养基 (g/L): 山梨醇 500。

BIOTECH-2002 5L 发酵罐 上海保兴生物设备工程有限公司; pH 和 DO 电极 梅特勒公司; LKM2000A 尾气分析仪 韩国 LOKAS 公司; 小型垂直电泳仪 美国 Bio-Rad 公司; G: Box 生物成像系统和 Gene Tools 软件 英国 SynGene 公司; FC-2002 甲醇电极流加控制器 华东理工大学研制; GC112A 气相色谱仪 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 细胞培养与猪 α 干扰素的诱导表达

1.2.1 高密度细胞流加培养方法 细胞培养在 5L 发酵罐内进行。初始装液量 1.5L, 接种量 20%, 通气速度 4vvm, 温度 30℃。使用 25% 的氨水将 pH 自动控制于 6.0, 调节搅拌转速将溶氧浓度 (Dissolved oxygen, DO) 维持在 10% 以上。甘油耗尽时 DO 迅速上升, 启动文献中报道的改良型 DO-Stat 控制程序^[5]、流加甘油培养基。空气供氧无法控制 DO 时, 使用纯氧供氧。甘油流加末期 (诱导前 16h), 按照实验设计的要求在不同的实验批次中, 分别采用三种乙醇控制模式: 批次 1 和批次 2 中使用改良型 DO-Stat 甘油流加控制程序^[5], 乙醇浓度的控制水平设定为 2g/L, 始终将乙醇控制在较低浓度; 批次 3 和批次 4 中, 在诱导前 8h 人为添加乙醇, 将发酵液中的乙醇浓度迅速提高至 10g/L 以上的较高浓度, 之后继续采用改良型 DO-Stat 控制过程控制甘油流加, 将乙醇浓度维持在 10g/L 以上, 持续 4~5h; 批次 5 中, 在诱导前 12h 人为添加乙醇, 将乙醇浓度迅速提高至 12g/L 以上, 之后停止流加甘油, 菌体开始利用乙醇。直至诱导前 9.5h, 乙醇自然耗尽, 继续采用改良型 DO-Stat 控制程序将乙醇浓度控制在低水平。细胞浓度达到“高密度”要求 (130~150g-DCW/L) 后, 停止甘油流加、进行 1~2h 的“饥饿培养”, 直到发酵液中的甘油和其它有可能充当替代碳源的中间代谢物质全部消耗殆尽后开始诱导。

1.2.2 猪 α 干扰素诱导表达方法 根据甲醇电极读数手动调节甲醇诱导培养基的流加速度, 将甲醇浓度控制于约 5g/L 的水平。同时, 按照 1:1 的体积比加入山梨醇流加培养基。诱导期全程通空气供氧、通气速度 4vvm, pH5.5, 温度 30℃。

1.3 分析方法

1.3.1 菌浓测定 测量方法与参考文献^[6]相同。

1.3.2 乙醇和甲醇浓度的离线测定 测量方法与参考文献^[7]相同。

1.3.3 摄氧速率 (Oxygen uptake rate, OUR) 的测定 测量方法与参考文献^[8]相同。

1.3.4 总蛋白以及猪 α 干扰素浓度测定 发酵液中的总蛋白浓度采用考马斯亮蓝比色法测定^[9]。使用软件分析 SDS-PAGE 凝胶图像, 计算得到猪 α 干扰

素浓度。

1.3.5 碳源 (甘油、甲醇) 代谢关键酶活性的测定 破壁方法: 取 1mL 发酵液加水定容至 10mL, 10000r/min 离心 20min 后收集菌体。加入 10mL 含有蜗牛酶的 pH7.5 的磷酸缓冲液将菌体悬浮, 0℃ 超声破碎 90 次 (运行 5s 间隔 5s, 功率 400W)。最后, 10000r/min 离心 20min, 上清液即为无细胞酶液。甲醇代谢途径中的关键酶包括: 醇氧化酶 (AOX)、甲醛脱氢酶 (FLD)、甲酸脱氢酶 (FDH); 甘油代谢途径中的关键酶为甘油激酶 (GK)。上述各酶比活性按照文献中报道的方法测定^[10-12]。

1.3.6 基因转录水平测定 本研究所用菌株中, AOX 由 *aox2* 基因编码。提取 RNA, 采用 RT-PCR 与实时定量 PCR 方法测定 *aox2* 基因转录水平。测定工作委托上海康成生物工程有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 细胞培养末期高乙醇浓度对猪 α 干扰素表达水平的影响

批次 1~批次 4 诱导前 16h 内的乙醇控制水平如图 1A 所示。批次 1 和批次 2 的乙醇浓度始终低于 2g/L; 批次 3 中, 在诱导前 7~3h, 乙醇浓度始终维持在 10g/L 左右; 批次 4 中, 诱导前 8~3h, 乙醇浓度始终维持在 12~15g/L 之间。当菌体浓度达到 130~150g/L 时, 停止流加甘油。经过短暂的饥饿培养, 待发酵液中以及细胞内部残留的乙醇以及其它可以作为替代碳源的中间代谢产物完全耗尽后, 流加甲醇诱导培养基开始诱导猪 α 干扰素表达。

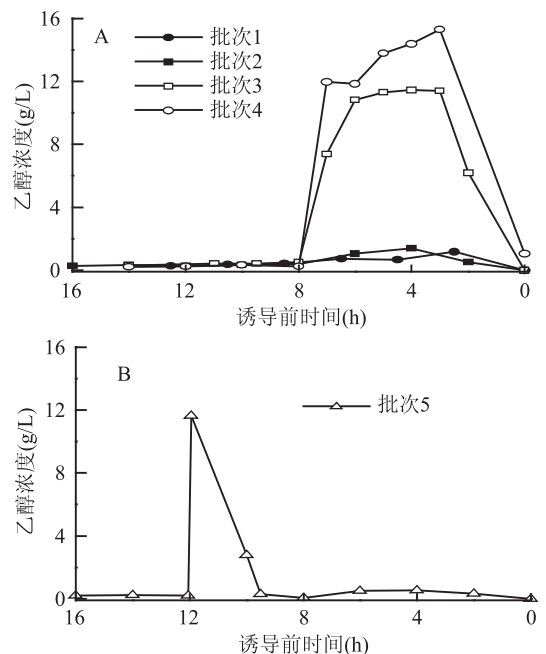


图 1 诱导前 16h 内乙醇浓度

Fig.1 Ethanol concentrations in 16 h before induction

注: A: 批次 1~批次 4 甘油流加末期乙醇浓度;

B: 批次 5 甘油流加末期乙醇浓度。

在诱导的起始阶段, 菌体需要约 5~8h 的时间, 用来合成甲醇代谢途径中的各个关键酶, 以适应代谢甲醇的需求。在这一段适应期内, 细胞活性很低, 主要表

现为 OUR 不断降低或者始终维持在较低水平。如图 2 所示,在批次 1 和批次 2 诱导起始的 5~8h 内,OUR 始终维持在较低水平,约 40mmol/(L·h)。之后 OUR 开始稳步上升,在诱导 20h 时达到约 140mmol/(L·h),一直维持至诱导结束(70h),同时甲醇消耗速率分别达到 3.42g/(L·h)和 3.23g/(L·h)。在批次 3 起始诱导的前 8h 内 OUR 略有提高,之后始终维持于 80mmol/(L·h)的水平。直至诱导 20h,OUR 未见明显提高,且甲醇消耗速度极低,仅为 0.84g/(L·h)(图 3),发酵被迫停止。在批次 4 起始诱导的前 20h 内,OUR 由起始的 80~90mmol/(L·h) 稳步下降至 20mmol/(L·h) 以下,同时甲醇消耗速度下降至 0.28g/(L·h)(图 3),于 20h 时结束发酵。

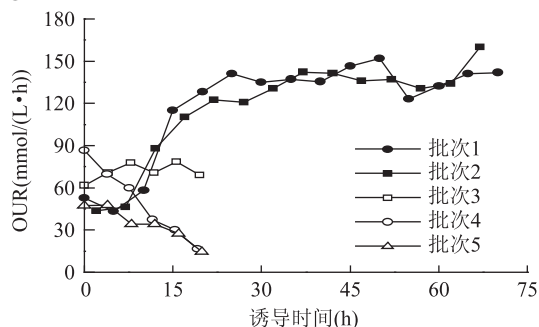


图 2 诱导期 OUR 变化

Fig.2 OUR in the whole induction phase

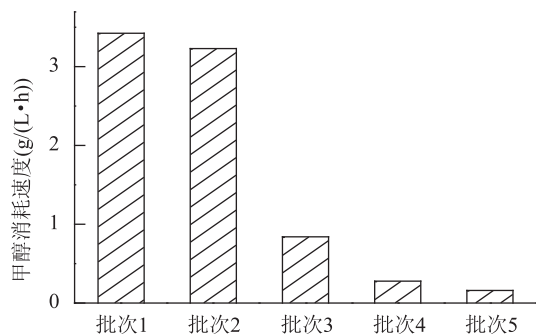


图 3 诱导 20h 时甲醇消耗速率

Fig.3 Methanol consumption rate at 20h of induction

图 4 中比较了 5 个批次诱导阶段发酵液中总蛋白浓度的变化情况:批次 1 和批次 2 的最高总蛋白浓度分别达到 5.51g/L 和 4.71g/L;提前结束的批次 3 和批次 4,在发酵结束时的总蛋白浓度分别达到 0.84g/L 和 0.63g/L。选取各批次发酵结束时的样品,使用 SDS-PAGE 测定其中的目标蛋白浓度,结果如图 5 所示。使用图像分析软件,分析得到批次 1~批次 5 的猪 α 干扰素最终浓度分别为:3.65、3.08、0.75、0.20 和 0.42g/L。由此可见,生长末期的低乙醇浓度有利于诱导阶段细胞生理活性的恢复以及目的蛋白的高效表达。相反地,生长末期的高乙醇浓度,会导致菌体在诱导阶段无法恢复生理活性,最终导致发酵的失败。虽然,经过诱导前的饥饿培养后,乙醇已经完全耗尽,但是高乙醇浓度对外源蛋白表达的抑制作用是不可逆的,不会随着乙醇的耗尽而消除。

2.2 细胞培养末期高乙醇浓度对碳源代谢关键酶活性的影响

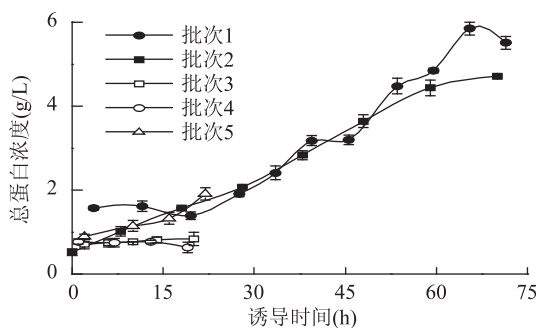


图 4 诱导期总蛋白变化

Fig.4 Total protein concentration in induction phase

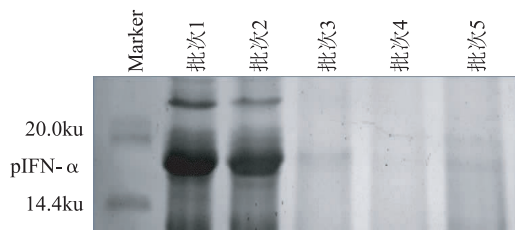


图 5 发酵最终样品 SDS-PAGE 检验结果

Fig.5 Results of SDS-PAGE of final samples

由前期报导可知,重组毕赤酵母发酵过程中,乙醇积累主要出现在甘油流加末期^[5],而在此阶段,细胞的比生长速率与碳源甘油的消耗密切相关。因此,乙醇积累是否会影响甘油的正常利用是关键问题。以批次 2 和批次 4 为例,比较了低乙醇浓度和高乙醇浓度环境下甘油代谢关键酶 GK 的比活性。比较结果如图 6A 所示,批次 2 诱导前 4h GK 的比活性达到 1.84U/g-DCW,而批次 4 诱导前 4h GK 的比活性远远低于批次 2,仅达到批次 2 的 12.5%。由此可以推断,甘油流加末期乙醇的大量积累,会大幅度降低菌体代谢甘油的速度。

从图 1A 和图 3 中可以看出,甘油流加末期的高乙醇浓度会降低诱导阶段甲醇的消耗速率。即使乙醇在诱导前已经被耗尽,它对诱导期的影响仍然无法消除,这可能是由于乙醇影响了功能性细胞骨架的生成、破坏了细胞的正常结构而造成的。在图 6B~D 中,以批次 2 和批次 4 为例,进一步比较了整个诱导阶段甲醇代谢途径中关键酶 AOX、FLD 以及 FDH 的比活性。从图中可知,批次 2 诱导阶段 AOX、FLD 以及 FDH 三种酶的比活性均远远高于批次 4,达到批次 4 的数十倍。外源蛋白诱导表达的过程中,甲醇既作为诱导剂,同时又为蛋白合成的过程提供碳源和能量。批次 4 中,甘油流加阶段末期的高乙醇浓度大大降低了诱导阶段甲醇代谢途径中各个关键酶的比活性,使得细胞甲醇代谢途径受阻,减少了对蛋白合成途径碳源和能源的供应。蛋白合成途径无法正常运转,最终导致发酵过程提前结束,最终的目的蛋白产量仅达到批次 2 的 6.5%。

在甲醇代谢的关键酶中, AOX 最为重要,它催化甲醇代谢途径中的第一步反应,直接影响菌体利用甲醇的能力。本研究中所用菌株为 Mut⁺ 型毕赤酵母,因此 AOX 由 *aox2* 基因编码。批次 1~4 中,诱导

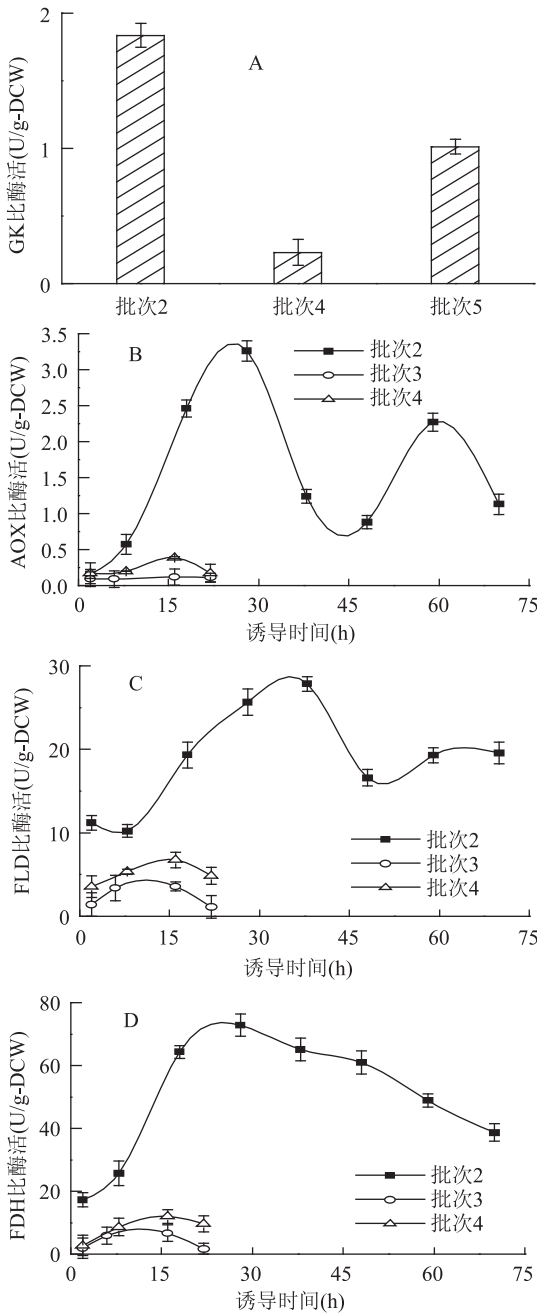


图6 甘油以及甲醇代谢关键酶比活性
Fig.6 Specific activities of enzymes in glycerol and methanol metabolism

20h 时菌体 *aox2* 基因的转录水平如图 7 所示。批次 2 最高, 达到 14.4, 分别是批次 3 和批次 4 的 17.1 倍和 25.7 倍。由此可知, 诱导阶段末期的高乙醇浓度会抑制诱导期 *aox2* 基因的转录, 从而降低菌体内部 AOX 比活性, 影响甲醇的正常利用, 最终降低目的蛋白的表达水平。

2.3 高乙醇浓度的短期冲击对发酵性能及酶活的影响

如图 2 所示, 批次 5 诱导前 20h 内, OUR 由 48mmol/(L·h) 降低至 15mmol/(L·h)。并且, 在诱导 20h 时, 甲醇消耗速度仅有 0.16g/(L·h) (图 3), 甲醇消耗几乎停止, 发酵实验被迫终止。如图 4 所示, 诱导期内发酵液中最高总蛋白浓度达到 1.9g/L,

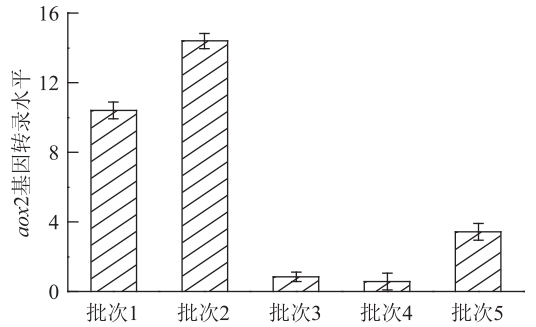


图7 *aox2* 基因转录水平
Fig.7 Transcriptional level of *aox2* gene

远远高于批次 3 和批次 4, 与批次 1 和批次 2 同一时刻的总蛋白浓度相近。但是, 使用 SDS-PAGE 测定该样品后发现, 发酵液中有大量杂蛋白存在, 猪 α 干扰素浓度只达到 0.42g/L (图 5)。从图 6A 中可以看出, 批次 5 诱导前 4h GK 比活性为 1.01U/g-DCW, 高于批次 4, 但是低于批次 2。同样地, 批次 5 诱导期内 AOX、FLD 以及 FDH 比活性也高于批次 4 和批次 5, 低于批次 1 和批次 2 (图 6B、6C、6D)。最后, 从图 7 中可以看出, 诱导 20h 时批次 5 的 *aox2* 基因转录水平虽然高于批次 4, 但是仍然处于较低水平。由此可以得出结论, 高乙醇浓度冲击对发酵性能以及各关键酶比活性的破坏作用会随着持续时间的延长而增加。但是, 即使是极短时间的高乙醇浓度冲击, 仍然会导致发酵过程的失败。因此, 在重组毕赤酵母发酵生产外源蛋白的过程中, 必须避免细胞培养末期的乙醇积累。

3 结论

本论文研究了毕赤酵母发酵细胞培养末期乙醇积累对猪 α 干扰素表达性能以及碳源代谢关键酶比活性的影响。结果表明, 低乙醇浓度对猪 α 干扰素的表达最有利, 猪 α 干扰素最高浓度可以达到 3.65g/L。而 10g/L 以上的高乙醇浓度, 不论持续时间长短, 均会大幅度抑制甘油和甲醇代谢关键酶的活性, 使得猪 α 干扰素浓度始终维持在 0.20~0.75g/L 的低水平。

参考文献

[1] 高力虎, 杨树林, 储卫华, 等. 人胶原蛋白表达载体的构建及在毕赤酵母中的表达[J]. 南京理工大学学报: 自然科学版, 2008, 32(2): 252-256.
 [2] 梁达奉, 黄曾慰, 曾练强, 等. α -葡聚糖酶在毕赤酵母中的组成型表达[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2012, 40(5): 96-100.
 [3] Jin H, G Liu, X Ye, et al. Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration[J]. Biochem Eng J, 2010, 52(1): 91-98.
 [4] Jin H, Z Y Zheng, M J Gao. Effective induction of phytase in *Pichia pastoris* fed-batch culture using an ANN pattern recognition model-based on-line adaptive control strategy[J]. Biochem Eng J, 2007, 37(1): 26-33.

(下转第 158 页)

温育时间 8h。在此基础上进行的检出率实验说明,前处理对检出率有显著影响,恰当的前处理措施可以使得检出限(以检出率大于 95% 为指标)降低到转基因含量 0.001%,是荧光 PCR 通常认为的检出限 0.01% 的 10 倍,且 PCR 检测的 Ct 值平均数($n=48$)都在阳性结果判断值(36)以下[参考转基因检测标准 SN/T 2584-2010]。说明恰当的样品前处理措施加上优化的荧光 PCR 反应体系条件可使不同转基因含量样品检出效果更为理想,并能在一定程度上降低检测限,这将对检测相关产品的深加工转基因食品的检测具有重要参考意义,实践证明应用该条件在本实验室检测米粉干等深加工产品的转基因成分中起到较好的效果。

参考文献

- [1] 蒋家煊,郭奕明,杨映根,等.转基因水稻的研究和应用[J].植物学报,2003,20(6):736-744.
- [2] 姚方印,朱常香,李广贤,等.Bt 水稻的抗虫性鉴定及转基因的遗传分析[J].中国农业科学,2002,35(2):142-145.
- [3] 姬华,乐国伟,王洪新,等.转基因食品的营养学评价研究进展[J].食品研究与开发,2009,36(7):73-74.
- [4] Hernandez M, Esteve T, Pla M. Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of badey, rice, sunflower, and wheat [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(18):7003-7009.
- [5] Lemt S, England LS, Vincet M, et al. Real-time polymerase chain reaction qualification of the transgenes for roundup ready corn and ready soybean in soil samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5):1337-1342.
- [6] 王国英.转基因植物的安全性评价[J].农业生物技术学报,2001(9):205-207.
- [7] Nickson TE. Editor's choice aeries on the next generation of biotech crops: planning environmental risk assessment for genetically modified crops: problem formulation for stress, toleranterops[J]. Plant Physiology, 2008, 147:494-502.
- [8] Kaepler HF. Food safety assessment of genetically modified crops[J]. Agronomy Journal, 2000, 92:793-797.
- [9] Joanne E, Barton MD. Genetically modified crops and the environment[J]. Agronomy Journal, 2000, 92:797-803.
- [10] 吴志毅,张明哲,陈曦.大米和米制品 Bt63 转基因检测 PCR 方法的灵敏度研究[J].浙江农业学报,2009,21(6):549-554.
- [11] 邓鸿铃,郭新东,吴玉璠.利用 PCR 方法检测转 BT 基因水[J].现代食品科技,2008,23(4):71-74.
- [12] 谭慧,王洋,潘峰,等.植物源性转基因食品 PCR 检测技术研究[J].中国卫生检验检疫杂志,2004,14(4):407-409.
- [13] 李文涛,王俊东,杨利峰,等.实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J].生物技术通讯,2006,17(1):112-114.
- [14] 陈文炳,王志明,李寿崧,等.分子标记在动植物检验检疫与 GMO 产品检测中的应用[J].福建农林大学学报,2004,33(4):494-500.
- [15] 陈颖,徐宝梁,苏宁,等.实时荧光定量 PCR 技术在转基因玉米检测中的应用研究[J].作物学报,2004,30(6):602-607.
- [16] 吴孝横,路勇.利用实时荧光 PCR 方法检测转 Bt 基因大米[J].现代食品科技,2009,25(2):211-216.
- [17] 农业部 953 号公告-6-2007,转基因植物及其产品成分检测抗虫转 Bt 基因水稻定性 PCR 方法[S].
- [18] Made D, Degner C, Grohmann L. Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequence from transgenic Bt rice [J]. Eur Food Res Technol, 2006, 224:217-278.
- [19] 蒋春燕,王泰健,王琴,等.实时荧光定量 PCR 技术[J].动物医学进展,2005,26(12):97-101.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF, Mainiatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金东雁,黎孟枫译.北京:科学出版社,1989,690-692.
- [21] 冯仁峰.分析灵敏度(检测限)[J].上海医学检验杂志,2002,17(3):133-136.
- [22] 李金明.实时荧光 PCR 技术[M].北京:人民军医出版社,2007,120-123.
- [5] Ding J, M Gao, G Hou, et al. Stabilizing porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* with an ethanol on-line measurement based DO-Stat glycerol feeding strategy[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2013, DOI 10.1002/jctb.4281.
- [6] Yu R, S Dong, Y Zhu, et al. Effective and stable porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2010, 33(4):473-483.
- [7] Gao M, Z Li, R Yu, et al. Methanol/sorbitol co-feeding induction enhanced porcine interferon- α production by *P. pastoris* associated with energy metabolism shift [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2012, 35(7):1125-1136.
- [8] Shi H D, K Shimizu. On-line metabolic pathway analysis based on metabolic signal flow diagram [J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 58(2-3):139-148.
- [9] Sedmak J J, S E Grossberg. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250 [J]. Anal Biochem, 1977, 79(1-2):544-552.
- [10] Suye S, A Ogawa, S Yokoyama. Screening and identification of *Candida methanosorbosa* as alcohol oxidase-producing methanol using yeast [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(5):1297-1298.
- [11] Schute H, J Flossdorf, H Sahn, et al. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii* [J]. Eur J Biochem, 1976, 62(1):151-160.
- [12] 辛渝. *Debaryomyces sp.* 甘油激酶的分离纯化及基本性质研究[D].成都:四川大学,2006.

(上接第 153 页)