doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2016.01.019

米黑根毛霉脂肪酶在毕赤酵母中的高效表达及酶学性质研究

LUO Wen

罗 文[1,2],王治元[1],苗长林[1],吕鹏梅[1],何 东[1],李惠文[1],杨玲梅[1],袁振宏[1*]

(1. 中国科学院 广州能源研究所;中国科学院 可再生能源与天然气水合物重点实验室,广东 广州 510640; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 根据毕赤酵母(*Pichia pastoris*)密码子使用偏爱性,对米黑根毛霉脂肪酶(RML)成熟肽基因进行全面密码子优化,以提高RML基因在酵母细胞中表达的水平,并对重组脂肪酶的酶学性质进行了研究。运用重叠延伸PCR合成优化后的RML成熟肽基因,并进一步构建毕赤酵母表达载体pPIC9K-RML,通过电击法转化毕赤酵母GS115菌株,经G418抗性和PCR筛选获得高拷贝转化重组子。重组酵母菌用0.5%甲醇诱导异源基因表达,在28 ℃摇瓶培养168 h后酶活力达到122 U/mL,较未优化的原始菌株的表达酶活提高了10倍。重组脂肪酶最适温度为45 ℃,最适pH值为7,甲醇体积分数为40%以下时重组RML具有较好的稳定性。

关键词: 米黑根毛霉脂肪酶;毕赤酵母;密码子优化;酶学性质

中图分类号:TQ35; Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2417(2016)01-0135-06

引文格式:罗文,王治元,苗长林,等. 米黑根毛霉脂肪酶在毕赤酵母中的高效表达及酶学性质研究[J]. 林产化学与工业,2016,36(1): 135-140.

Expression of Lipase Gene from *Rhizomucor miehei* in *Pichia pastoris* and Properties of Lipase

LUO Wen[1,2], WANG Zhi-yuan[1], MIAO Chang-lin[1], LÜ Peng-mei[1], HE Dong[1], LI Hui-wen[1], YANG Ling-mei[1], YUAN Zhen-hong[1]

(1. Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate, Guangzhou Institute of Energy Conversion, CAS, Guangzhou 510640, China; 2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Rhizomucor miehei* lipase (RML) gene was designed using yeast's prefered codon to improve its expression level in *Pichia pastoris* Vector and the properties of RML was studied. According to the bias in codon choice of the high expression gene in *P. pastoris*, the mature portion of RML gene with high specific activity was optimized and artificially synthesized by overlap extension PCR without changing the amino acid sequence. The RML gene was subcloned into expression vector pPIC9K to yield the recombinant expression vector pPIC9K-RML. The recombinant plasmid was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation. Subsequently, the positive clone was selected by G418 and PCR and the high expression recombinant *P. pastoris* GS115-RML was obtained. After induced by 0.5% methanol for 168 h at 28 ℃, the activity of lipase achieved 122 U/mL and was 10 times higher than that of the unoptimized wild type *R. miehei*. The expression of RML gene in *P. pastoris* could be successfully improved by using codon optimization. The optimum reaction conditions of recombinant RML were temperature 45 ℃ and pH value 7. At these conditions, when RML reacted in 40% methanol for 100 min, the remaining activity was 96.9%. This showed that RML displayed a good stability in methanol.

Key words: *Rhizomucor miehei* lipase; *Pichia pastoris*; codon optimized; enzymatic properties

---

收稿日期:2014-12-26

基金项目:"十二五"国家科技支撑计划资助(2015BAD21B03);中科院广州能源研究所创新基金(Y307P11001)

作者简介:罗 文(1981—),女,湖南涟源人,助理研究员,硕士,主要从事生物柴油及脂肪酶的研究;**E-mail:**luowen@ms.giec.ac.cn

* **通讯作者:**袁振宏(1953—),男,江苏金坛人,研究员,博士生导师,主要从事生物柴油、纤维素乙醇、沼气及微藻等生物质能的研究;**E-mail:**yuanzh@ms.giec.ac.cn。

米黑根毛霉脂肪酶(RML)是一条由269个氨基酸残基组成的α/β型单链多肽,分子质量为31.6 ku[1]。RML具有优良的立体选择性、转化率和稳定性,是一种重要的生物催化剂,能催化水相及非水相中甘油三酯和酯类的水解、醇解、酸解及酯化等反应,可广泛应用于食品加工、饲料添加剂、洗涤剂添加剂、精细化工以及生物柴油合成等领域[2],尤其在天然产物及光学活性化合物合成、手性化合物拆分等方面具有良好的应用前景[3-5]。目前商业化的RML有2种,分别为丹麦诺维信公司生产的Palatase 2000 L及LipozymeRM IM,价格十分昂贵,限制了其规模化商业应用。而最近文献报道的摇瓶培养的RML酶活力仅为50 U/mL[6],与其他脂肪酶如*Rhizopus chinensis*脂肪酶(161 U/mL)[7]、*Rhizopus oryzae*脂肪酶(500 U/mL)[8]相比,还存在较大的改进空间。巴斯德毕赤酵母表达系统能高效表达异源蛋白,具有异源蛋白表达量高且易于纯化、营养要求低、生长快、适于高密度发酵等优点,因而广泛用于工业化生产[9-10],目前已有多种脂肪酶在毕赤酵母中成功实现了活性表达。王永杰等[11]通过PCR技术扩增低温脂肪酶基因lip-948,将其与表达载体pPIC9K连接后转化巴斯德毕赤酵母GS115,通过筛选发酵48 h后上清液中脂肪酶活力达到27.5 U/mL,普遍高于其他细菌低温脂肪酶在毕赤酵母中的表达活性。阎金勇等[12]将白地霉Y162脂肪酶基因克隆到pPIC9K表达载体上,转化毕赤酵母GS115,摇瓶发酵96 h后毕赤酵母能够分泌表达55 U/mL重组脂肪酶。在基因表达研究中,基因本身与载体和宿主系统匹配性也是重要的影响因素。Akcapinar等[13-15]研究表明,毕赤酵母对密码子存在明显的偏爱性,对同义密码子使用显示出非随机性,导致同义密码子在巴斯德毕赤酵母表达时出现不同的异源表达效率。当异源基因含有低频密码子时,如丙氨酸密码子GCG、甘氨酸密码子GGG、脯氨酸密码子CCG,会对基因转录及蛋白翻译效果产生影响,从而严重阻碍基因的表达[16]。因此,本研究采用毕赤酵母偏爱的密码子,将米黑根毛霉脂肪酶基因中使用频率低的密码子进行优化,人工合成后克隆至分泌型表达载体pPIC9K中,构建重组表达载体pPIC9K-RML,电转化毕赤酵母GS115,实现米黑根毛霉脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达,并进一步研究了RML的酶学性质,旨在为高密度发酵制RML提供一定的理论基础。

1 实验

1.1 材料

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115、质粒pPIC9K、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α由本实验室提供。Pfu DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶(EcoR Ⅰ、Not Ⅰ、Sal Ⅰ),宝生物工程(大连)有限公司。PCR产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒,英潍捷基(上海)贸易有限公司。无氨基酸酵母基础氮源YNB,上海生工生物工程技术服务有限公司;生物素、遗传霉素G418,美津生物公司;过硫酸铵、丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠及N,N′-甲叉双丙烯酰胺等,均为市售分析纯。

酵母培养基(MD)、基本培养基(MM)、酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(YPD)、最小缓冲丙三醇复合培养基(BMGY)及最小缓冲甲醇复合培养基(BMMY),按In-vitrogen公司操作手册推荐方法配制。

1.2 实验方法

1.2.1 *RML基因的密码子优化及重叠延伸PCR合成* 将米黑根毛霉脂肪酶(RML)的核苷酸序列(A02536),通过密码子分析网站(http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis)进行分析,同时利用DNAMAN软件以毕赤酵母密码子使用频率表为基准,对除去5′端94 bp前导肽和信号肽编码序列RML的密码子进行优化,并结合Primer Premier 5.0、BLAST数据平台分析设计30条首尾各有20~25个相互重叠的寡核苷酸片段为引物,通过重叠延伸PCR合成全基因序列,引物及基因合成方法详见参考文献[17]。

1.2.2 *重组酵母表达质粒pPIC9K-RML的构建* 扩增RML基因的上下游引物分别为:上游5′-CGGCGAATTCATGTCCATTGACGGTGG TATCAG-3′(下划线为EcoR Ⅰ酶切位点);下游5′-CAGCGCGGCCGCTTAAGTACACAAACCAGTGTTGA TACCGAAGTAGGACAA GTGAT-3′(下划线为Not Ⅰ酶切位点)。PCR产物及pPIC9K载体经EcoR Ⅰ和Not Ⅰ双酶切,并经试剂盒回收纯化后,用T4 DNA连接酶连接,构建重组质粒pPIC9K-RML。

1.2.3 *高拷贝重组毕赤酵母菌的构建与筛选*　采用质粒制备试剂盒提取 pPIC9K-RML,经 Sal Ⅰ线性化后电转化至毕赤酵母 GS115 中,转化液涂布于 MD 平板上,28 ℃培养 2 ~ 3 d;挑取 MD 平板上长势良好的转化子接种至 G418-YPD 平板上,28 ℃培养 3 ~ 4 d,筛选高浓度 G418 正常生长的菌落为高拷贝整合菌株,再将 G418-YPD 平板上出现的转化子接种于含有溴甲酚绿、三丁酸甘油酯的 MM 平板上,28 ℃培养 3 ~ 4 d,每隔 24 h 添加甲醇诱导;挑取经活性平板筛选的转化子,PCR 鉴定质粒是否导入,并选择最佳转化子进行诱导表达[18]。

1.2.4 *重组酵母摇瓶培养及诱导表达*　挑取水解透明圈较大菌落、对照菌株 GS115/pPIC9K 及原始菌株接种于 50 mL BMGY 培养液中,28 ℃振荡培养 48 ~ 72 h 至 600 nm 处的吸光值(OD_{600})为 2 ~ 6,离心收集酵母细胞,加入 BMMY 培养基重悬至 OD_{600} 为 1,28 ℃下 200 r/min 振荡培养,每隔 24 h 添加甲醇,使甲醇体积分数达0.5 %进行诱导表达。分别在 24、48、72、96、120、144、168 及 192 h 取样测定脂肪酶活力[19]。取 1 mL 发酵液于 4 ℃下 6 000 r/min 离心 10 min,超滤浓缩至体积为原来的 1/5,以 10 μL 上样,进行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R250 染色,分析检测目的蛋白的表达水平和分子质量。

1.2.5 *重组脂肪酶的酶活测定*　采用橄榄油乳化法[20]测定发酵上清液中 RML 的活力。酶活单位定义为:每分钟分解底物产生 1 μmol 脂肪酸的酶量定义为 1 个脂肪酶国际单位 U。

1.2.6 *脂肪酶纯化*　采用硫酸铵沉淀法纯化发酵上清液中的脂肪酶。100 mL 酶液中缓慢加入硫酸铵直至饱和度为 70%,于 4 ℃冰箱中静置过夜后,12 000 r/min 离心 5 min,取沉淀用去离子水溶解,于渗透袋中透析 2 ~ 3 d 后获得脂肪酶酶液。

1.2.7 *酶学性质的测定*　最适反应温度:将酶反应体系分别在 20、30、40、50、60 和 70 ℃反应 10 min 后测定其活性,比较不同反应温度下酶的相对活力,确定最适反应温度。

最适反应 pH 值:配制 pH 值 为 2.5 ~ 9.0 的底物溶液,测定在不同 pH 值条件下 RML 的酶活力,优化出最适反应 pH 值。

耐甲醇稳定性:将酶液在不同甲醇体积分数(0 ~ 70%)下放置 100 min 后测定相对酶活。

2　结果与讨论

2.1　密码子优化结果

在氨基酸序列保持不变的前提下,密码子优化使基因序列共改变了 192 个碱基,密码子适应指数(CAI)由 0.61 提高到 0.90,GC 含量由 47.85% 下降到 46.52%,密码子使用频率分布(CFD)从 9% 降低到 0。

2.2　RML 基因片段的获得

合成的 RML 基因在 Taq DNA 聚合酶的作用下进行末端加 A 处理后,将其连接到载体 pMD18-T 上,并对阳性克隆子的插入片段进行琼脂糖凝胶电泳检测及序列分析。RML 基因的 PCR 扩增结果见图 1。由图 1 可知,插入片段序列大小为 800 bp 左右,与预期设计一致。

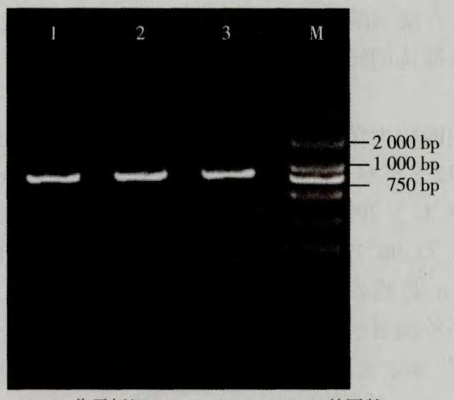
2.3　重组表达质粒的鉴定

重组表达质粒 pPIC9K-RML 经 EcoR Ⅰ和 Not Ⅰ双酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳分析,可见约 800 bp 的目的基因片段和载体片段。测序结果与 GenBank 中登录的序列(A02536)完全一致。

2.4　重组毕赤酵母构建及高拷贝菌株的筛选鉴定

电转化获得的重组酵母在 MD 平板上培养,得到 200 个 His^+ 转化菌落。将宿主菌 GS115、质粒 pPIC9K 转化菌(对照组)及重组质粒 pPIC9K-RML 转化的 His^+ 菌落,逐个点至 YPD 平板(含 G418 质量浓度分别为 1、2、3、4 和 5 g/L)。结果发现,在 G418 质量浓度为 1 和 2 g/L 的平板上所有 His^+ 菌生长无显著差异;而当 G418 质量浓度为 3 和 4 g/L 时,GS115 生长缓慢;当 G418 质量浓度为 5 g/L 时,只有极少数 GS115 His^+ 菌生长,即得到高拷贝的整合菌株。在 5 g/L G418 平板上挑选生长良好的转化子,用三丁酸甘油酯平板检测活性,菌落周围可观察到明显的透明圈,而对照组(质粒 pPIC9K 转化菌)未见明显透明圈(见图 2),说明重组构建的毕赤酵母菌,能够催化油脂转化。用酵母基因组提取试剂盒提取具

有明显透明圈的菌落基因组,通过 PCR 及凝胶电泳鉴定,发现在 800 bp 左右位置处扩增出与目的基因片段大小一致的特异性条带(图略)。说明 RML 已正确整合到重组酵母的基因组中。DNA 测序结果也表明,插入到毕赤酵母中的 RML 基因与设计序列完全一致。



M.DNA 分子标记DNA marker; 1~3.RML基因的PCR产物PCR products of RML gene

图1 RML 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 The PCR of RML genes

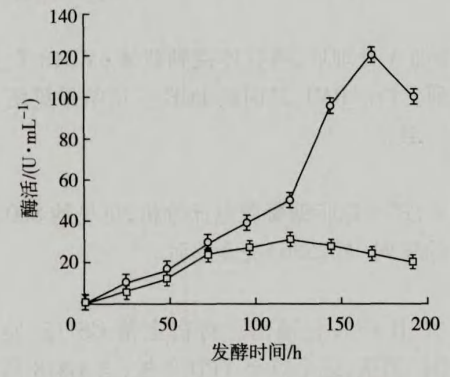
1.显色圈colour circle; 2.对照组contral

图2 重组毕赤酵母胞外脂肪酶活性检测

Fig. 2 Assay of extracellular lipase activity in recombinant *Pichia* strains

2.5 酵母菌的诱导表达

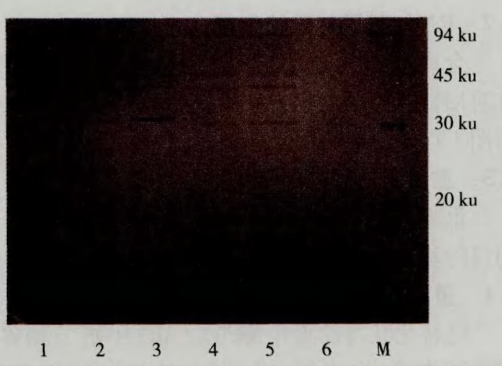
挑取三丁酸甘油酯平板上具有明显透明圈的重组酵母进行摇瓶发酵,以 0.5% 甲醇进行诱导表达,分析重组酵母的产酶能力。取发酵液离心收集上清液,以橄榄油为底物,用 NaOH 滴定法对纯化后的 RML 蛋白测定酶活性,结果见图 3。由图 3 可知,表达前期,因碳源由甘油转变为甲醇,对甲醇存在一个缓慢适应期,因而原始菌株和优化菌株发酵液酶活均偏低,随着发酵时间的增加,发酵体系适应以甲醇为底物后,两者酶活均增加,优化菌株经密码子优化后,突显出蛋白表达的优势,发酵液酶活迅速增加。由图 3 可知,当甲醇诱导表达时间为 168 h 时,改造的重组酵母的发酵液酶活达 122 U/mL,较未优化的原始菌株提高了 10 倍。从发酵上清液中蛋白质的 SDS-PAGE 检测结果(图 4)可以看出,重组菌诱导表达的 RML 蛋白分子质量约为 30 ku,与 RML 的理论分子质量大小一致,与文献[21]研究结果相符,这表明 RML 基因在毕赤酵母 GS115 中实现了分泌性表达,而对照组 GS115/pPIC9K 的诱导表达产物则未见 RML 蛋白条带。



-o- 优化菌株 recombinant strain; -□- 原始菌株 wild strain

图3 重组毕赤酵母发酵产酶曲线

Fig. 3 Lipase activity fermented from recombinant *Pichia* strains



M.蛋白质分子质量标准protein maker; 1~5.重组酵母表达产物fermentation products of recombinant Pichia strains; 6.GS115/pPIC9K对照blank

图4 重组酵母发酵上清液的 SDS-PAGE 分析

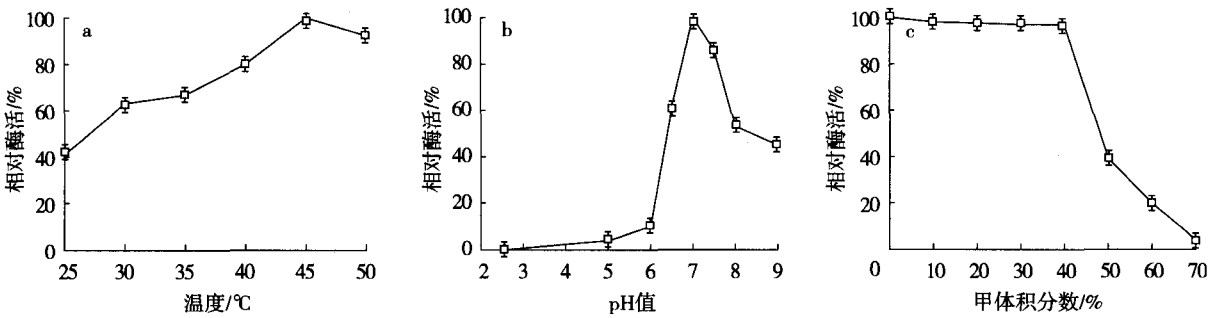
Fig. 4 SDS-PAGE of the supernatant of recombinant *Pichia* strains

2.6 脂肪酶酶学性质

2.6.1 最适反应温度　将酶液置于不同温度下进行反应,测定其酶活,结果见图 5(a)。由图 5(a)可知,25 ~45 ℃之间酶活力逐渐升高,45 ℃时 RML 的活力达到最高,50 ℃酶相对活力下降为 92.3%。

2.6.2 最适反应 pH 值　将酶液置于不同 pH 值的底物溶液中进行反应,测定其酶活,结果见图 5(b)。由图可知,pH 值为 2.5 ~6 范围内,随着 pH 值的上升,RML 酶活力呈小幅度上升,当 pH 值上升至 7 时,酶活力急剧上升,达到最大值,随后又迅速下降,表明 RML 在酸碱环境下极不稳定,适于在中性条件下反应。

2.6.3 耐甲醇稳定性　RML 在不同甲醇体积分数下的稳定性结果见图 5(c)。由图可知,甲醇体积分数在 0 ~40% 范围内,RML 对甲醇有非常好的耐受性,RML 酶活力仅下降了 3.1%。当甲醇体积分数超过 40% 后,RML 酶活力迅速下降。可见,RML 可以耐受 40% 以下的甲醇,可以考虑将 RML 应用于生物柴油制备等需要大量甲醇存在的反应。



a.温度temperature; b. pH值pH value; c.甲醇体积分数volume fraction of methanol

图 5　RML 的酶学性质

Fig. 5　Enzymological characterization of RML

3 结 论

3.1 以毕赤酵母密码子使用频率表为依据,在不改变氨基酸序列的前提下,设计并通过重叠延伸 PCR 技术合成了由毕赤酵母偏爱密码子组成的米黑根毛霉脂肪酶(RML)基因序列,成功构建了毕赤酵母表达载体质粒 pPIC9K-RML,经活性平板及 G418 抗性筛选获得了高拷贝的菌株,实现了 RML 在毕赤酵母中的活性表达。

3.2 在 28 ℃摇瓶发酵 168 h 后,脂肪酶活性达到 122 U/mL,较未优化原始菌株的表达量提高了 10 倍,RML 最适反应温度为 45 ℃、最适反应 pH 值为 7,甲醇为 40% 的条件下 RML 仍具有较好的稳定性。表明该重组菌具有良好的甲醇耐受能力,可应用于需要大量甲醇存在的反应,尤其是在以林木果实油脂为原料的生物柴油生产中具有较大的开发潜力。

参考文献:

[1]TORRES C,OTERO C. Part III. Direct enzymatic esterification of lactic acid with fatty acids[J]. Enzyme and Microbial Technology,2001,29(1):3-12.

[2]杨姣,耿红冉,江凌,等. 脂肪酶催化性能强化研究进展[J]. 现代化工,2011,31(9):23-27,29.
YANG Jiao,GENG Hong-ran,JIANG Ling,et al. Research progress in enhancement of catalytic performance of lipase[J]. Modern Chemical Industry,2011,31(9):23-27,29.

[3]ALC NTARA A R,DE FUENTES I E,SINISTERRA J V. *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: An overview[J]. Chemistry and Physics of Lipids,1998,93(1/2):169-184.

[4]HARI KRISHNA S,DIVAKAR S,PRAPULLA S G,et al. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*[J]. Journal of Biotechnology,2001,87(3):193-201.

[5]HAN Zhen-lin,HAN Shuang-yan,ZHENG Sui-ping,et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2009,85(1):117-126.

[6]NIU Wei-ning, LI Zao-peng, TAN Tian-wei. Secretion of pro- and mature *Rhizopus arrhizus* lipases by *Pichia pastoris* and properties of the proteins[J]. Molecular Biotechnology, 2006, 32(1): 73-81.

[7]王乐乐,喻晓蔚,徐岩华. 根霉(*Rhizopus chinensis*)前导肽脂肪酶基因的克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达[J]. 高技术通讯, 2009, 19(1): 105-110, 161.
WANG Le-le, YU Xiao-wei, XU Yan-hua. Cloning and expression of pro- and mature *Rhizopus chinensis* lipase in *Pichia pastoris*[J]. High Technology Letters, 2009, 19(1): 105-110, 161.

[8]MINNING S, SCHMIDT-DANNERT C, SCHMID S. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: High-level production and some properties[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 66(2/3): 147-156.

[9]孙金鹏,钱圣一,敬科举,等. 南极假丝酵母脂肪酶 B 在毕赤酵母的表达及酶学性质研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2011, 50(4): 765-771.
SUN Jin-peng, QIAN Sheng-yi, JING Ke-ju, et al. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and studying of enzyme properties[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2011, 50(4): 765-771.

[10]杨梅,温真,林丽玉,等. 毕赤酵母蛋白表达系统研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(4): 46-51.
YANG Mei, WEN Zhen, LIN Li-yu, et al. Advances of expression system of *Pichia pastoris* protein[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(4): 46-51.

[11]王永杰,沈继红,丛柏林,等. 低温脂肪酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达[J]. 极地研究, 2011, 23(4): 283-288.
WANG Yong-jie, SHEN Ji-hong, CONG Bai-lin, et al. High-level expression of a cold-adaptive lipase gene in *Pichia pastoris* [J]. Chinese Journal of Polar Research, 2011, 23(4): 283-288.

[12]阎金勇,杨江科,徐莉,等. 白地霉 Y162 脂肪酶基因克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 184-190.
YAN Jin-yong, YANG Jiang-ke, XU Li, et al. Cloning and overexpression of lipase gene from *Geotrichum candidum* Y162 [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(2): 184-190.

[13]AKCAPINAR G B, GUL O, SEZERMAN U. Effect of codon optimization on the expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Progrogress, 2011, 27 (5): 1257-1263.

[14]ÖBERGA F, SJÖHAMN J, CONNER M T, et al. Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection[J]. Molcular Membrane Biology, 2011, 28(6): 398-411.

[15]KANG Chao, YU Xiao-wei, XU Yan. A codon-optimized endoprotease *Endo-Pro-Aspergillus niger*: Over expression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 104(6): 64-69.

[16]陆益新,王瑞鲲,田永杰,等. 密码子优化的隔孢伏革菌植酸酶基因在毕赤酵母中高效表达[J]. 饲料广角, 2015(12): 27-30.
LU Yi-xin, WANG Rui-kun, TIAN Yong-jie, et al. Expression of optimized *Peniophora incarnata* phytase gene in *Pichia pastoris*[J]. Feed China, 2015(12): 27-30.

[17]苗长林,罗文,吕鹏梅,等. 米黑根毛霉脂肪酶基因密码子优化及重叠延伸 PCR 合成[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(1): 47-48, 112.
MIAO Chang-lin, LUO Wen, LV Peng-mei, et al. Codon optimization of *Rhizomucor miehei* lipase gene and its synthesis by overlapping PCR[J]. Journal of Anhui Agricalture, 2013, 41(1): 47-48, 112.

[18]李强. 扩展青霉 FS1884 脂肪酶基因在毕赤酵母 GS115 中的表达和定向进化研究[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2009.
LI Qiang. Expression of *Penieillium expansum* FS1884 lipase gene in *Pichia pastoris* GS115 and its directed evolution[D]. Fuzhou: Master Degree Thesis of Fujian Normal University, 2009.

[19]QUYEN D T, SCHMIDT-DANNERT C, SCHMID R D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(1): 102-110.

[20]滕宏飞,王丹静,徐青,等. 橄榄油乳化法测定脂肪酶活性的优化研究[J]. 食品工业, 2011(6): 80-83.
TENG Hong-fei, WANG Dan-jing, XU Qing, et al. Optimization study of olive oil emulsification method detemining lipase acitivity [J]. Food Industry, 2011(6): 80-83.

[21]WU Xiao-yan, JÄÄSKELÄINEN S, LINKO W Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, 59(2): 145-158.