类芽孢杆菌碱性果胶裂解酶 Pel 在毕赤酵母中的高效表达

刘晓肖，郑学云，梁书利，韩双艳，林影
（华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：本研究全基因合成了来源于类芽孢杆菌的碱性果胶酶基因 *pel*，克隆至 pHKA 载体上，成功实现其在毕赤酵母 GS115 中的分泌表达；并对信号肽和启动子进行优化，使得摇瓶发酵诱导 168 h 果胶裂解酶酶活达到 432.36 U/mL。初步测定了果胶裂解酶 Pel 的基本酶学性质，其最适反应温度和 pH 分别为 60 ℃、10.0；在 50 ℃下处理 300 min 裂解酶活力保留 90%以上，而在 60 ℃下处理 210 min，酶活力剩余约 50%；在 pH 9~12 的 50 mM 各缓冲液中处理酶液 16 h，酶活力仍然保留 90%以上，该酶耐碱性强，但在偏酸性缓冲液中处理该酶，酶活力有所下降；同时研究了二价金属离子对果胶裂解酶活性力的影响，Ca^{2+}对 Pel 发挥裂解作用是必需的，Fe^{2+}、Mg^{2+}、Ni^{2+}对 Pel 均有激活作用，而金属离子螯合物 EDTA 的存在则使酶活力完全丧失；该酶在碱性条件下较好的稳定性决定了其潜在的工业应用前景。

关键词：毕赤酵母；果胶裂解酶；异源表达；启动子；信号肽
文章篇号：1673-9078(2015)11-74-79 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.013

Expression of the Alkaline Pectate Lyase Gene *pel* from *Paenibacillus campinasensis* BL-11 in *Pichia pastoris*

LIU Xiao-xiao, ZHENG Xue-yun, LIANG Shu-li, HAN Shuang-yan, LIN Ying
(South China University of Technology Biological Sciences and Engineering, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The alkaline pectate lyase gene *pel* from *Paenibacillus campinasensis* BL-11 was synthesized by total gene synthesis, cloned on a pHKA carrier, and actively expressed in *Pichia pastoris* GS115. The signal peptide and promoter were optimized, so that the pectate lyase activity reached 432.36 U/mL after induction was carried out by 168-h shake flask fermentation. The basic enzymatic properties of the recombinant pectate lyase were preliminarily measured, and the optimal pH and temperature were 10.0 and 60 ℃, respectively. The residual enzyme activity was still higher than 90% when it was incubated at 50 ℃ for 300 min, while the residual enzyme activity was only about 50% after the treatment was carried out at 60 ℃ for 210 min. The enzyme activity remained more than 90% after the recombinant pectate lyase was treated with different buffer solutions ranging from pH 9~12 for 16 h. This enzyme had strong alkali resistance, but the enzyme activity was slightly decreased after being treated in slightly acidic buffers. Meanwhile, the effects of divalent metal ions on *pel* expression were also determined. The results showed that Ca^{2+} was essential for the trans-elimination reaction, and Fe^{2+}, Mg^{2+} and Ni^{2+} had activating effects on *pel* activity, while the enzyme was completely inactivated with metal ion-ethylenediaminetetraacetic acid complexes. In summary, pectate lyase exhibits potential industrial application owing to its good stability under alkali conditions.

Key words: *Pichia pastoris*; Pectate lyase; heterologous expression; promoter; signal peptide

果胶质作为植物细胞壁多糖主要成分之一，是植物细胞间质和初生细胞壁的重要组分；其骨架为由 α-1，4 糖苷键连接的半乳糖醛酸残基，部分甲酯化，在富含聚 L-鼠李糖区域有木聚糖和阿拉伯半乳聚糖侧链[1]。果胶多糖存在于饲料中增加动物肠道粘度，阻碍营养的吸收[2]；在果蔬汁加工及果酒酿造过程中，果胶质会形成胶体悬浮微粒、增加粘稠度、影响过滤效率、引起果蔬汁和果酒浑浊；如何有效地去除果胶质、促进果蔬汁的过滤和澄清成为重要的研究课题[3]。

果胶酶是分解果胶质的多种酶的复合物，按其作用方式和底物类型可分为原果胶酶（Protopectinase）、酯酶（Pectinesterase）和解聚酶（Depolymerizing enzymes）。果胶裂解酶 (Pectate lyase)是解聚酶的一种，最适底物为甲酯化程度低的果胶[4]，通过 β-消除

收稿日期：2015-01-16
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31470159，31400062）
作者简介：刘晓肖（1989-），女，硕士，研究方向：酶学与酶工程
通讯作者：林影（1962-），女，博士，教授，研究方向：酶学与酶工程

反应作用于果胶质中聚半乳糖醛酸的 α-1,4 糖苷键，并在生成的寡聚半乳糖醛酸的非还原末端形成 Δ-4,5 不饱和键[5]。碱性果胶酶在食品、纺织、造纸行业及环境领域均有应用；其可通过破坏茶叶中的果胶物质来改善速溶茶粉在冲泡过程中形成泡沫的性能，将碱性果胶酶用于黄姜提取可促使黄姜有效成分释放，在动物饲料中添加果胶酶可降解抗营养因子果胶质从而增加营养吸收[2]，在果汁与酒的澄清中碱性果胶酶也发挥重要作用[6]。筛选并高效表达具有优良性能的果胶酶对于促进其在果蔬汁澄清等食品加工过程中的应用大为必要。

类芽孢杆菌 BL-11 是从高温、碱性环境中分离得到[7]，其产生的果胶酶具有耐高温耐碱性的优良特性，但其野生菌及重组大肠工程菌均存在表达量低、分离纯化困难等问题，增加了工业应用成本，利用基因工程策略提高果胶酶表达量成为目前亟待解决的问题。毕赤酵母表达系统具有表达量高、稳定型强、成本低易放大、适当的蛋白翻译后修饰等优点[8]，已有近千种外源蛋白实现了在毕赤酵母中的高效表达。通过密码子优化、启动子改造、分泌信号肽筛选和增加基因剂量等策略能显著提高外源蛋白的表达量。本研究全基因合成了密码子优化后的类芽孢杆菌果胶裂解酶基因 pel，实现了其在毕赤酵母中的分泌表达；同时通过优化分泌信号肽和启动子，显著提高其表达量；并初步研究了重组果胶裂解酶的酶学性质，为类芽孢杆菌果胶裂解酶的工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *Pichia pastoris* GS115 及 *E.coli* TOP10 感受态购自 Invitrogen 公司，表达载体 pHKA 由华南理工大学生物科学与工程学院微生物酶学实验室构建并保存。

1.1.2 培养基

BMGY 生长培养基：1%酵母膏，2%蛋白胨，1.34%YNB，1%甘油，100 mM pH 6.0 磷酸盐缓冲液；BMMY 诱导培养基：1%酵母膏，2%蛋白胨，1.34% YNB，1%甲醇，100 mM pH 6.0 磷酸盐缓冲液；MD 筛选平板：1.34%YNB，2%葡萄糖，2%琼脂粉，4×10^{-5}% Biotin。

1.1.3 试剂及其它

聚半乳糖醛酸 Polygalacturonic acid (PGA)购自 Sigma-aldrich®，小量质粒提取试剂盒购自博迈德生物（北京），琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒及 Bradford 法蛋白定量试剂盒购自捷瑞生物工程有限公司（上海），限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA Marker 均购自 TaKaRa Clontech(大连)，PageRuler™ Prestained Protein Ladder 购自 Thermo Scientific， UV-2102C/PC/PCS 型紫外可见分光光度计购自 UNICO 公司；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 *pel* 的扩增

根据果胶裂解酶 Pel 的蛋白序列（GU206787）[9]，按照毕赤酵母密码子偏好性对其编码序列进行了优化，并在上海金斯瑞公司进行全基因合成：利用 SignalP 4.1 Server（ http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测果胶裂解酶 Pel 自身信号肽序列，结果显示其肽链的 N 端 35 个氨基酸为前导肽序列；以全基因合成的果胶裂解酶基因为模版，设计引物经 PCR 扩增得到含预测的信号肽及不含预测信号肽的果胶酶基因，PCR 扩增体系如下：5 μL 10×PCRMix，0.4 μM 上下游引物，0.2 μL 模版，加入无菌水至总体积 50 μl；扩增条件：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.2 重组质粒的构建及酶切鉴定

EcoR Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切目的基因 *pel* 及载体 pHKA，构建含 sp (预测目的基因自身信号肽)及酿酒酵母 α-factor 的重组质粒 pHKA-sp-pel、pHKA-α-pel，用 $CaCl_2$ 转化法转化 *E.coli* TOP10 感受态细胞，利用含 50 μg/mL Kan 的 LB 平板进行转化子筛选；挑取阳性转化子接种于含 50 μg/mL Kan 的 LB 液体培养基，37 ℃、200 r/min 培养 12~15 h，提取质粒后进行 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切鉴定，委托上海生工生物工程有限公司进行测序。在已构建重组质粒基础上，对 *AOX*1 启动子进行改造，构建表达载体 pHKA-AOXm-α-pel，检测其对果胶酶表达水平的影响。

1.2.3 重组毕赤酵母菌株的构建

利用 *Kpn2* I 单酶切线性化三个重组载体，采用电击法转化 *P. pastoris* GS115 感受态，构建重组酵母 G/pHKA-sp-pel、G/pHKA-α-pel、G/pHKA-AOXm-α-pel，电压 1.5 kV，电击时间 5 ms，涂布 MD 平板进行筛选，30 ℃培养 3 d，进行菌落 PCR 鉴定，并挑取阳性转化子进行甲醇诱导发酵。

1.2.4 重组菌株的诱导表达

挑取 MD 平板上阳性转化子接种于 BMGY 中培养，50 mL 三角瓶中装液量为 10%，于 30 ℃、250 r/min

摇床培养 20 h；离心收集部分菌体转入 BMMY 中进行甲醇诱导培养，250 mL 三角瓶装液量为 10%，控制起始 OD600=1，于 30 ℃、250 r/min 摇床培养，每 24 h 补加 1%甲醇。

1.2.5 果胶裂解酶酶活测定[10]

取适量发酵液 10000 r/min 离心 5 min，适当稀释上清液，取出 10 μL 至 2 mL 50 mM Gly-NaOH 反应体系（pH 10.0，含 0.5% PGA，0.5 mM $CaCl_2$）中，60 ℃反应 15 min，加入 3 mL 0.03 mol/L H_3PO_4 溶液终止反应，测定 235 nm 处吸收值；以煮沸灭活酶液为空白对照。一个标准酶活力单位定义为：每分钟使聚半乳糖醛酸裂解产生 1 μmol 不饱和聚半乳糖醛酸所需的酶量，不饱和聚半乳糖醛酸在 235 nm 处的摩尔吸光系数为 4600 L/mol cm^{-1}。

1.2.6 SDS-PAGE 分析及蛋白浓度测定

对照菌 G/pHKA 及重组菌 G/pHKA-sp-pel、G/pHKA-α-pel、G/pHKA-AOXm-α-pel 诱导培养 168 h，取适量发酵液，10000 r/min 离心 5 min，对上清液进行预处理，利用 6%的浓缩胶和 12%分离胶进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，检测目的蛋白的表达，利用考马斯亮蓝 R-250 染色观察，初步判定 Pel 的大小；并利用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定发酵上清中的总蛋白量。

1.2.7 Pel 的基本酶学特性分析

最适温度和 pH 测定：在 60 ℃下，不同缓冲液体系中按照如上酶活测定方法测定 pH 对酶活性的影响，所用缓冲体系为 50 mM NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 5.8~8.0)、Gly-NaOH (pH 8.6~10.6)、Na_2HPO_4-NaOH (pH 10.9~12)；在测得的最适 pH 条件下，设置温度梯度 50、55、60、65、70 ℃测定酶活力随温度的变化；以最大活力作为 100%。

Pel 的 pH 和温度稳定性测定[11]：取 10 μL 酶液置于 1 mL 不同 pH 缓冲液中，常温（25 ℃）处理 16 h，在标准条件下测定剩余酶活力，观察 Pel 对酸碱的耐受性，以未经处理的酶液作为 100%；将酶液在不同的温度下(30~60 ℃)处理 5 h，每隔 30 min 取样在最适条件下测定剩余酶活力，以未经处理的酶液作为 100%。

二价金属离子对 Pel 活性的影响：在 50 mM pH 10.0 Gly-NaOH 缓冲体系中分别加入不同二价金属离子使终浓度为 0.5 mM[11]，测定二价金属离子对 Pel 活性的影响；同时测定表面活性剂 SDS 及金属离子螯合剂 EDTA 的存在对果胶裂解酶作用的影响。

1.2.8 数据分析

每株菌重复发酵三次，且每个试验点重复三次测定，试验数据均以平均值表示，标准偏差以误差线表示。

2 结果与讨论

2.1 果胶裂解酶基因片段的克隆

利用软件 Primer Premier 5 进行引物设计，引物序列信息如下，上游引物 sppel F (5’-CGCGCCGAATTCATGAAGAGAACTTTGTCA-3’，含 *EcoR*Ⅰ酶切位点，下划线示出)、pel F (5’-CGCGGAATTCGATGGTGACGGAACTACAGC-3’，含 *EcoR*Ⅰ酶切位点)，下游引物 pel R (5’-ATTTGCGGCCGCTTTAGAACAATGAAGCAGGC-3’，含 *Not*Ⅰ酶切位点)，分别利用两对引物 sppel F/pel R、pel F/pel R 按照如上方法，扩增含预测信号肽及不含预测信号肽的果胶酶基因序列，利用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，结果如图 1，在 750 bp 和 1 kb 间均仅有一条带，两条目的带相差 105 bp，大小符合预期，且无其他明显条带。

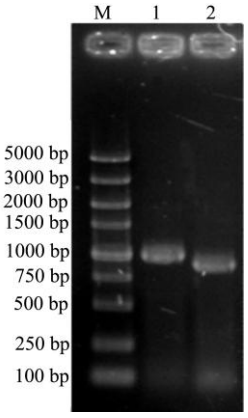


图 1 果胶裂解酶基因 *pel* 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of pectate lyase gene *pel*

注：M-DL5000，1-包含预测信号肽pel片段，2-不包含预测信号肽pel片段。

2.2 重组质粒的构建

按照方法 1.2.2，构建重组载体 pHKA-sp-pel、pHKA-α-pel、pHKA-AOXm-α-pel，利用 *EcoR*Ⅰ、*Not*Ⅰ进行双酶切鉴定，0.8%琼脂糖凝胶电泳检测，两条带中载体片段位于 7.5 kb 和 10 kb 间，目的基因条带位于 750 bp 和 1 kb 间，均符合预期，同时送样至上海生工生物工程公司测序，利用 ClustalX 软件对测序结果进行比对，结果显示插入的果胶酶基因片段未发生基因突变和移码。

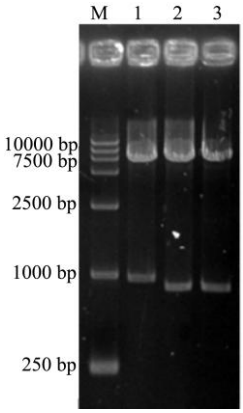


图 2 重组载体的双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmids after double digestion

注：M-DL15000 DNA marker, 1-pHKA-sp-pel, 2-pHKA-α-pel, 3-pHKA-AOXm-α-pel。

2.3 重组毕赤酵母的诱导表达

利用 *Kpn2* I 线性化 3 个重组表达载体，电击转化 *P. pastoris* GS115，构建 3 个分泌型重组毕赤酵母菌株 G/pHKA-sp-pel、G/pHKA-α-pel、G/pHKA-AOXm-α-pel。挑取毕赤酵母阳性转化子，按照方法 1.2.4 对重组毕赤酵母进行诱导表达，测定 3 种重组酵母的生长情况及产酶曲线，并比较信号肽及启动子改造对重组毕赤酵母产酶能力的影响。由图 3 可知，3 株重组毕赤酵母长势基本相同，信号肽及启动子的改造并没有影响菌体的生长，而重组菌体间的产酶能力却有很大差别。

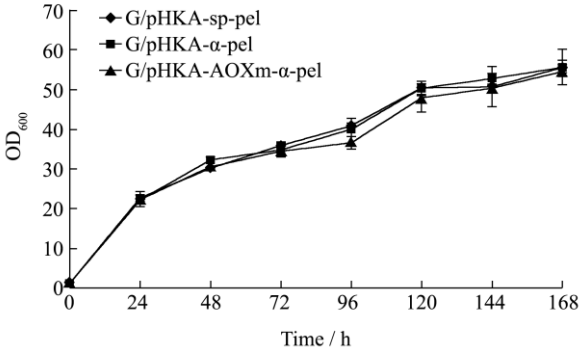


图 3 重组毕赤酵母生长曲线

Fig.3 Growth curve of recombinant *P. pastoris*

从图 4 可以看出，α-factor 的分泌能力远高于 sp，诱导 168 h 时，酶活达到 307.25 U/mL，是 sp 作为信号肽时酶活力的 14.65 倍；而在 α-factor 基础上，对 *AOX*1 启动子进行改造，发酵上清中酶活力达到了 432.36 U/mL，比启动子未改造时提高了 40.72%，比诸葛斌[12]报道的摇瓶水平酶活力提高了约 2.09 倍，进一步降低了工业生产的成本；甲醇诱导至 120 h 后，菌体浓度已基本维持不变，持续诱导至 168 h，果胶裂解酶活性仍缓慢持续上升，即该酶在发酵过程中稳定性良好，未检测到酶解现象的发生。

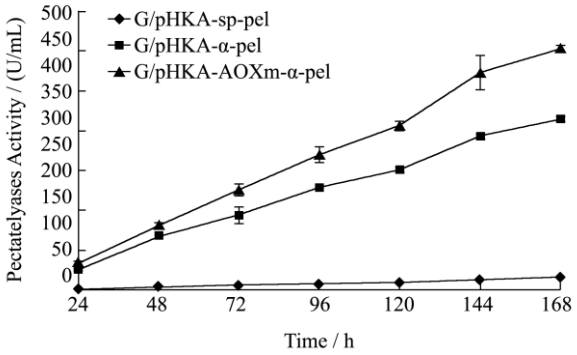


图 4 重组酵母产酶曲线

Fig.4 Pectate lyase activity curves for recombinant *P. pastoris*

2.4 表达产物的浓度测定及 SDS-PAGE 分析

对重组酵母发酵 168 h 的上清液进行预处理，取 10 μL 上样，经 SDS-PAGE 分析，Pel 略小于 35 ku，与预测 32.6 ku 基本相符，且条带单一，杂蛋白量极少，为后续对果胶裂解酶纯化分析提供了便利。由蛋白条带可以定性观察出 3 个重组酵母表达 Pel 的分泌量的差异，利用 Bradford 法测定 3 个重组菌发酵上清中的总蛋白量，G/pHKA-sp-pel 为 0.15 mg/mL，GS115/pHKA-α-pel 为 0.505 mg/mL，GS115/pHKA-AOXm-α-pel 为 0.55 mg/mL。

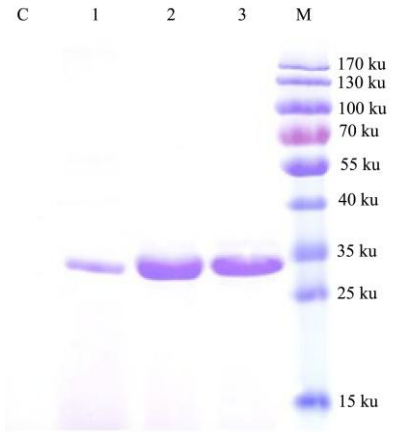


图 5 Pel 的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant *pel*

注：M-Prestained Protein Ladder, C-Control (G/pHKA), 1-G/pHKA-sp-pel, 2-G/pHKA-α-pel, 3-G/pHKA-AOXm-α-pel。

2.5 重组果胶酶 Pel 酶学性质分析

根据方法 1.2.7 和 1.2.8，测定了温度和 pH 对果胶裂解酶 Pel 活性的影响，结果如图 6，Pel 的最适温度为 60 ℃，最适 pH 为 10.0，最适温度高于该酶在大肠

杆菌 *E.coli* HMS174 (DE3)中表达时显示出的最适温度 50 ℃[9]，可能原因是毕赤酵母作为真核表达系统，对果胶裂解酶 Pel 进行了翻译后修饰，使得其耐热性能有所提高，另外利用蛋白质结构分析网站 http://web.expasy.org/compute_pi/预测到该酶的等电点为 9.12，这可能是导致该酶在 pH 为 9 时酶活较低的原因。

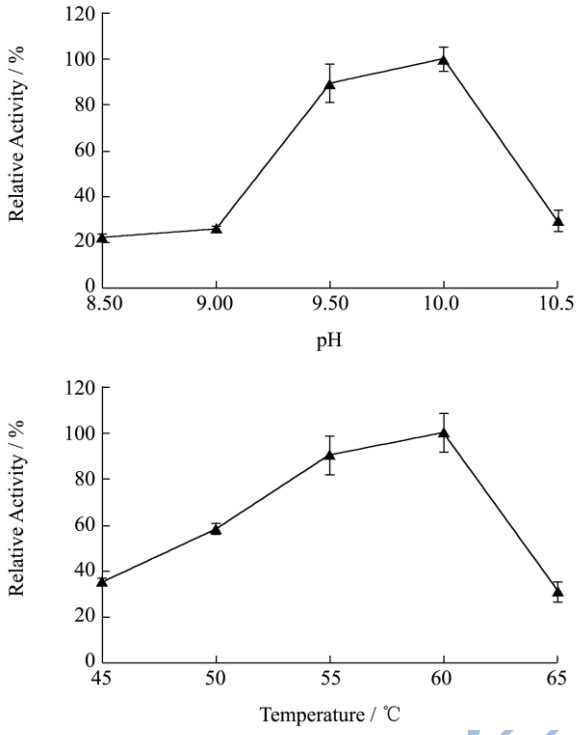


图 6 pH 和温度对重组果胶裂解酶活力的影响

Fig.6 Effects of pH and temperature on the activity of recombinant pectate lyase

对 Pel 的 pH 及温度稳定性分析结果显示，该酶在 30~50 ℃内稳定性良好，处理 300 min 剩余酶活力均在 80%以上，而在 60 ℃处理 210 min，酶活力剩余约 50%，处理 210 min，酶活力剩余约 38%，与 Chengjie Zhang[13]报道的果胶裂解酶 PEL168 在 60 ℃处理 20 min 酶活基本完全丧失相比，Pel 具有良好的热稳定性；在 pH 9~12 下处理 16 h 后剩余酶活力仍在 90%以上，证明 Pel 在偏碱性条件下具有较好的稳定性。

Ca^{2+}存在时，Pel 活力是不加金属离子时的 6.13 倍，是其他金属离子不可取代的，可知 Ca^{2+}对 Pel 发挥裂解活性是必需的，这与 Steven R. Herron 报道的果胶裂解酶结构中存在 Ca^{2+}结合位点的结论相符，其推测 Ca^{2+}在催化过程中可能发挥两个作用：1) 共价连接 PGA 的羧基和酶的酸性基团；2) 共价连接不同 PGA 链的两个羧基基团，使相互靠近，便于酶的作用[14]。另外 Fe^{2+}、Mg^{2+}、Ni^{2+}对 Pel 均有激活作用，均使酶活力提高了 60%~90%，其它金属离子对 Pel 有轻微抑制作用或无明显作用；而金属离子螯合物 EDTA 存在时，酶活完全丧失，表面活性剂 SDS 对酶活也有一定的促进作用。

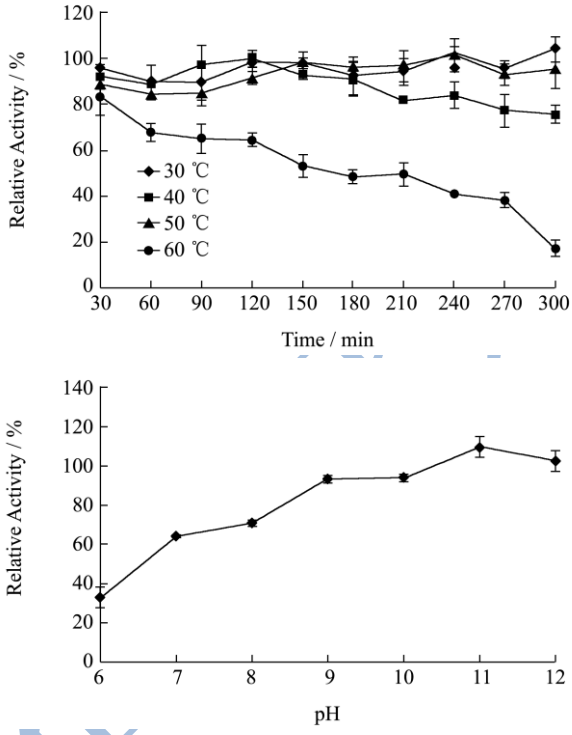


图 7 Pel 的温度和 pH 稳定性

Fig.7 Effect of temperature and pH on pectate lyase stability

表 1 二价金属离子及化学试剂对酶活性的影响

Table 1 Effects of divalent metal ions and chemicals on the activity of pectate lyase *pel*

Metal ions or chemicals	Concentration	Relative activity/%
No addition	-	100
Ba^{2+}	0.5 mM	64.09±7.71
Ca^{2+}	0.5 mM	613.13±20.27
Co^{2+}	0.5 mM	71.43±9.71
Cu^{2+}	0.5 mM	82.63±9.98
Fe^{2+}	0.5 mM	189.96±9.57
Mg^{2+}	0.5 mM	168.73±6.58
Ni^{2+}	0.5 mM	156.37±19.13
Zn^{2+}	0.5 mM	73.36±4.38
EDTA	0.5 mM	0
SDS	0.1%	166.80±25.61

3 结论

本研究将来源于类芽孢杆菌的果胶裂解酶基因 *pel* 通过同源重组整合到毕赤酵母基因组中，实现了果胶裂解酶基因在毕赤酵母中的外源分泌表达。去除自身分泌信号肽 sp，利用酿酒酵母来源的 α-factor 及毕赤酵母强的甲醇诱导型 *AOX1* 启动子，使酶活有很大

的提高；利用突变的增强型启动子 AOXm 进一步提高表达量，使得果胶裂解酶活力在摇瓶诱导 168 h 时达到 432.37 U/mL，高于目前已报道的水平。该酶在 50 ℃处理 300 min 酶活仍保留 90%以上，热稳定性高于报道的果胶裂解酶 PEL168[13]，且在碱性条件下处理 16 h 后，酶活力基本没有降低，具有良好的耐碱性。在此基础上通过增加基因剂量及共表达分子伴侣等手段进一步提高 Pel 表达量，将有助于碱性果胶裂解酶生产成本的降低，并为果胶裂解酶的进一步开发和工业应用提供基础。

参考文献

[1] Jesper Harholt, Anongpat Suttangkakul, Henrik Vibe Scheller: Biosynthesis of pectin [J]. Plant Physiology, June 2010, 153: 384-395

[2] Mingan Choct: Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance [J]. Feed Milling International, 1997, June Issue pp. 13-26

[3] 杨敏.碱性果胶酶在蔗汁澄清过程中的应用研究[D].昆明:昆明理工大学,2010

YANG Min. Studys on the application of alkaline pectinase in cane juice clarification [D]. KunMing: KunMing University of Science and Technology, 2010

[4] Whitake JR, Whitaker JR, Hendrickx M, et.al. Handbook of food enzymology. [J]. New York, Marcel Dekker, 2003

[5] Hui-Chen Wu, Tsung-Luo Jinn: Heat shock-triggered Ca^{2+} mobilization accompanied by pectin methylesterase activity and cytosolic Ca^{2+} oscillation are crucial for plant thermotolerance [J]. Plant Signaling & Behavior, October 2010, 5: 10, 1252-1256

[6] 梁琳侦,郭丹,胡卓炎,等.图解法优化荔枝果浆酶解澄清的工艺[J].现代食品科技,2012,28(6):655-658

LIANG Lin-zhen, GUO Dan, HU Zhuo-yan, et al. Graphical approach for the optimization of the production of clarified lychee juice by pectinase treatment [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(6): 655-658

[7] Chun-Han Ko, Wen-Luen Chen, Chung-Hong Tsai, et.al. *Paenibacillus campinasensis* BL11: a wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 2727-2733

[8] 张五魁,范清林,宋礼华.毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展及应用[J].中国生物工程杂志, 2006, 26(1): 87-91

ZHANG Wu-kui, FAN Qing-lin, SONG Li-hua. Research progress and application of heterologous gene expression in *pichia pastoris*. [J]. China Biotechnology, 2006, 26(1): 87-91

[9] C H Ko, C H Tsai, J Tu, et al. Expression and thermostability of *Paenibacillus campinasensis* BL11 pectate lyase and its applications in bast fibre processing [J]. Annals of Applied Biology, 2011, 158(2): 218-225

[10] 王芸,华兆哲,刘立明,等.重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略[J].生物工程学报,2008,24(4):635-639

Wang Yun, Hua Zhao-zhe, Liu Li-ming, et al. High-level production of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *pichia pastoris* [J]. Chin. J. Biotech., 2008, 24(4): 635-639

[11] Akhilesh Thakur, Roma Pahwa, Smarika Smarika Singh, et. al. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from Mucor circinelloides ITCC 6025 [J]. Enzyme Research, 2010, Article ID170549, 7pages, 2010. doi:10.4061/2010/170549.

[12] Zhuge Bin, Du Guo-Cheng, Shen Wei, et.al. Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 40(1): 92-98

[13] Chengjie Zhang, Jia Yao, Cheng Zhou, et. al. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber [J]. BMC Biotechnology, 2013, 13: 26

[14] Steven R Herron, Jacques A E Benen, Robert D Scavetta, et al. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(16): 8762-8769