

人溶菌酶基因在乳酸克鲁维酵母中的表达

刘思彤, 徐龙龙, 衣泽浩, 刘晓静, 惠丰立

(南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南南阳 473061)

摘要: 人溶菌酶是一种天然广谱抑菌物质, 在食品和医药工业有潜在应用前景。为获得高活性的人溶菌酶制剂, 采用乳酸克鲁维酵母表达系统, 对经密码子优化的人溶菌酶基因(hLYZ)进行分泌表达。将人工合成hLYZ插入到乳酸克鲁维酵母表达载体pKLAC1, 构建重组载体pKLAC1-hLYZ, 并用电脉冲法将Sac II线性化的重组质粒转化到乳酸克鲁维酵母GG799中。通过全细胞PCR鉴定, 最后获得了一株多拷贝整合的基因工程菌hLYZ1。工程菌可以分泌表达分子量约14 ku的目的蛋白质, 与预期大小相符。摇瓶发酵培养128 h, 酶活最高达到1430 U/mL。抗菌活性检测结果显示, 重组人溶菌酶对溶壁微球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有较好的溶菌活性。本研究成功地在乳酸克鲁维酵母中表达了重组人溶菌酶, 表达的蛋白具有较高的酶活性, 试验结果为利用乳酸克鲁维酵母表达系统规模化生产重组人溶菌酶奠定了基础。

关键词: 人溶菌酶; 乳酸克鲁维酵母; 分泌表达; 抗菌活性

文章编号: 1673-9078(2017)3-105-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.017

Expression of the Human Lysozyme Gene in *Kluyveromyces lactis*

LIU Si-tong, XU Long-long, YI Ze-hao, LIU Xiao-jing, HUI Feng-li

(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: Human lysozyme, an enzyme with natural broad-spectrum antimicrobial activity, has potential applications in the food and pharmaceutical industries. To obtain human lysozyme preparations with high activity, a *Kluyveromyces lactis* yeast expression system was used for soluble expression of the human lysozyme gene (hLYZ) with optimized codons. An artificial hLYZ gene was cloned into the *K. lactis* expression vector pKLAC1, resulting in the recombinant vector pKLAC1-hLYZ, which was then linearized with SacII and transformed into *K. lactis* GG799 by electroporation. Following whole-cell PCR, a multicopy recombinant strain (named hLYZ1) was obtained. The engineered strain secreted a target protein of approximately 14 ku in molecular weight, which agreed with that of the expected product. The maximum activity of hLYZ in the culture supernatant reached 1430 U/mL after 128 h of culture. Antibacterial activity testing confirmed that the recombinant human lysozyme was effective against *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis*. In conclusion, a recombinant hLYZ with high enzyme activity was successfully expressed in *K. lactis* GG799, thereby providing a basis for studies on the large-scale production of recombinant human lysozyme using the *K. lactis* expression system.

Key words: human lysozyme; *Kluyveromyces lactis*; secretory expression; antibiotic activity

溶菌酶 (Lysozyme, LYZ) 是一种从人的唾沫、眼泪和鼻涕中首先发现的碱性球蛋白, 它可以专一地切断肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta,1-4$ 糖苷键, 破坏肽聚糖支架, 引起细菌裂解, 因此该酶被广泛应用于食品和医药工业^[1-3]。目前市场上销售的商品溶菌酶主要是鸡蛋清溶菌酶, 对人体来说是它一种异源蛋白, 会在人体内产生免疫原性和副作用, 这些缺陷无疑限制鸡蛋清溶菌酶在临床中的应用^[3]。

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370073); 河南省基础与前沿技术研究院计划 (102300410146)

作者简介: 刘思彤 (1990-), 女, 硕士生, 研究方向: 微生物工程

通讯作者: 惠丰立 (1965-), 男, 教授, 研究方向: 食品微生物学

人溶菌酶 (Human lysozyme, hLYZ) 是广泛分布于人体多种组织中的 c 型溶菌酶, 由 130 个氨基酸残基组成, 分子量为 14.4 ku, 含 4 个二硫键, 活性中心由 Glu₃₅ 和 Asp₅₃ 构成^[4,5]。由于人溶菌酶是人体自身的蛋白质, 与人体具有天然的相容性, 因此比其他溶菌酶更安全。另外, 人溶菌酶具有更高的生物学活性和热稳定性, 其抗菌活性是目前常用的鸡蛋清溶菌酶的 3 倍, 在偏酸性 (pH 4~6) 条件下 100 °C 处理 1 min, 仍保留其原有的活性^[5]。同时人溶菌酶还具有抗真菌^[1,4]、抗病毒^[1,4]、增强免疫力和抗肿瘤的功功效^[6,7], 具有更广泛的应用价值。

目前人溶菌酶主要来源于人乳汁或人胎盘等, 因原料来源受限及分离纯化成本较高, 无法进行工业化生产^[4,5]。利用基因工程技术发酵生产重组人溶菌酶,

是目前较为经济且有效的方法, 不仅便于生产, 还可以改造及合成新型人溶菌酶。国内外已经在大肠杆菌^[8]、酿酒酵母^[9]、毕赤酵母^[3,5]和黑曲霉^[10]等不同的表达系统表达了人溶菌酶基因, 但酶产量和活性均较低, 且质量不稳定, 难于用于工业化生产^[3]。

乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 表达体系是近年来发展起来一种优良的真核表达系统, 该系统具有超强的外源蛋白分泌能力、营养要求低、生长快和适于高密度发酵, 获得包括美国 FDA 认证的 GRAS 地位, 允许在多种食品和饲料中应用, 已广泛用于外源蛋白表达^[11,12]。本研究拟通过基因工程手段, 利用乳酸克鲁维酵母系统表达具有生物活性的人溶菌酶, 以期降低生产成本解决溶菌酶应用受限的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 本实验室保存; 乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) GG799 与表达载体 pKLAC1 购自 NEW England Biolabs 公司。

1.1.2 酶与试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒等购自 Thermo Scientific Biolabs 公司; 人溶菌酶标准品购自 Solarbio 公司; 酵母基本碳源(YCB)培养基和乙酰胺溶液(100×)购自 NEW England Biolabs 公司; 蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid 公司; 人溶菌酶标准品购自 SIGMA 公司; 其他试剂均为国产分析纯或国外进口分装。

1.1.3 培养基

LB: 胰蛋白胨 1%、酵母浸提物 0.5% 和氯化钠 1%。YPD: 酵母浸提物 1%、蛋白胨 2% 和葡萄糖 2%。发酵培养基: 乳糖 4%、酵母浸提物 1.25%、蛋白胨 0.5%、酵母氮基础 0.4% 和酵母营养盐 0.0125%。

1.2 试验设备

TC-512 型 PCR 扩增仪, Techne; DYY-12 型电泳仪, 北京六一仪器厂; Gel DOC XR 型凝胶成像系统, BioRad; Electroporator 2510 型电转仪, Eppendorf; 5810R 型高速冷冻离心机, Eppendorf; ZHWY-200B 型全温摇床, 上海智城分析仪器公司; TU-1900 型紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器公司; iMark 酶标仪, Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 目的基因的合成

根据人溶菌酶基因序列(GenBank Accession no. NM_000239)以及乳酸克鲁维酵母密码子的偏爱性, 设计了编码 hLYZ 成熟蛋白氨基酸的全长 DNA 序列, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并构建于载体 PUC57。

1.3.2 重组表达载体 pKLAC1-hLYZ 的构建

以 PUC57-hLYZ 为模板, hLYZ-F: 5'-CCGAGATCTTTGGTCGCTTATTGGCAGC-3' (引入 *Xho* I 位点) 和 hLYZ-R: 5'-GACTCGAGGCTGAAGGAGACAATGGTAAT-3' (引入 *Bgl* II 位点) 为引物, PCR 扩增 hLYZ 基因。PCR 反应条件: 94 °C、2 min; 94 °C、30 s, 56 °C、30 s, 72 °C、30 s, 30 个循环; 72 °C、6 min。回收 PCR 产物, 将获得的片段经 *Xho* I/*Bgl* II 双酶切后亚克隆至 pKLAC1 载体的 *Xho* I/*Bgl* II 位点之间, 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 转化子经菌落 PCR 鉴定筛选出符合要求的阳性克隆, 对阳性克隆进行测序及 *Xho* I/*Bgl* II 双酶切验证, 将构建正确的重组质粒命名为 pKLAC1-hLYZ。

1.3.3 电转化乳酸克鲁维酵母 GG799

重组质粒 pKLAC1-hLYZ 经 *Sac* II 酶切线性化后, 通过电脉冲法 (电压 2500 V) 转化到乳酸克鲁维酵母 GG799 感受态细胞中。将电击后的酵母细胞立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液中, 经 30 °C 水浴 2 h, 离心收集酵母菌体, 重悬于 1 mL 无菌水中, 均匀涂布于含有 5 mmol/L 乙酰胺的 YCB 平板上。

1.3.4 重组酵母菌株的 PCR 鉴定

以阳性转化子细胞裂解液作为 PCR 反应的模板, 引物 Inter1 (5'-TACCGACGTATATCAAGCCCA-3') 和 Inter2 (5'-ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC-3') 用于单拷贝整合子的筛选, 引物 Inter2 和 Inter3 (5'-CAGTGATTACATGCATATTGT-3') 用于多拷贝整合子的筛选^[13]。PCR 条件为: 95 °C、5 min; 95 °C、30 s, 50 °C、30 s, 72 °C、2 min, 30 个循环; 72 °C、10 min。

1.3.5 重组酵母菌株的摇瓶表达

挑取阳性克隆, 接种于 5 mL YPD 培养基, 28 °C, 200 r/min, 培养 18 h。按照 10% 的接种量接种于 50 mL YPD 培养基中, 相同条件下培养 144 h。每隔 16 h 取样, 5000 r/min, 离心 5 min, 沉淀进行适当稀释用于测定重组菌株的生物量 (OD₆₀₀), 发酵上清液用于测定溶菌酶活力。

1.3.6 重组人溶菌酶活性的测定

重组人溶菌酶活性的测定参照鸡蛋清中溶菌酶活力测定方法^[14]。溶壁微球菌用 0.2 mol/L、pH 6.2 磷酸盐缓冲液悬浮，调至 OD₄₅₀ 约为 1.3 的菌悬液。将样品及底物置于 25 °C 水浴中保温，用 1 cm 石英比色皿装 2 mL 底物，加入 0.4 mL 样品，充分混匀，在 OD₄₅₀ 下记录 15 s 和 75 s 时的读数 A₁ 和 A₂，按每分钟 OD₄₅₀ 值下降 0.001 为一个活力单位 (U) 的定义，样品中每毫升溶菌酶的活力用以下公式计算：

$$\text{酶活力 (U/mL)} = \Delta E_{450} / 0.001 \times V$$

式中：ΔE₄₅₀ 为 450 nm 波长处吸光度 A₁ 和 A₂ 之差；V 为参与反应酶液的体积。

1.3.7 SDS-PAGE 电泳分析表达产物

配制 5% 的 SDS-PAGE 浓缩胶和 12% 的分离胶，将表达上清与 6×Loading Buffer 混合，煮沸 10 min 后进行电泳，考马斯亮蓝染色，脱色。

1.3.8 重组人溶菌酶的活性检测

分别取 100 μL 预制的溶壁微球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌菌悬液加入聚苯乙烯微量孔板中（每种细菌 5 次重复），然后在每个微孔中迅速加入 20 μL 的重组人溶菌酶样品或 PBS (PH 为 7)，将微孔板置于 37 °C 恒温箱中 20 min 后取出，观察重组人溶菌酶对三种不同细菌的溶菌活性。

2 结果与讨论

2.1 目的基因的合成

Native	ATG AAG GTC TTT GAA AGG TGT GAG TTG GCC AGA ACT CTG AAA AGA TTG GGA ATG GAT GGC
Optimized	ATG AAG GTT TTT GAA AGA TGT GAA TTG GCA AGA ACA TTG AAG AGA TTG GGT ATG GAT GGT
	MET Lys Val Phe Glu Arg CYS Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Gly MET Asp Gly
Native	TAC AGG GGA ATC AGC CTA GCA AAC TGG ATG TGT TTG GCC AAA TGG GAG AGT GGT TAC AAC
Optimized	ATC AGA GGT ATA TCA TTG CGT AAC TGG ATG TGT TTG GCT AAA TGG GAA TCT GGT TAC AAC
	Tyz Arg Gly Ile Ser Leu Ala Asn Trp MET Cys Leu Ala Lys Trp Glu Ser Gly Tyz Asn
Native	ACA CGA GCT ACA AAC TAC AAT GCT GGA GAC AGA AGC ACT GAT TAT GGG ATA TTT CAG ATC
Optimized	ACT AGA GCT ACA AAC TAC AAC GCA GGT GAT AGA TCA ACC GAT TAC GGT ATA TTC CAA ATC
	Thr Arg Ala Thr Asn Tyz Asn Ala Gly Asp Arg Ser Thr Asp Tyz Gly Ile Phe Gln Ile
Native	AAT AGC CGC TAC TGG TGT AAT GAT GGC AAA ACC CCA GGA GCA GTT AAT GCC TGT CAT TTA
Optimized	AAT TCA AGA TAC TGG TGT AAC GAT GGT AAA ACT CCA GGT GCT GTT AAT GCA TGT CAT TTG
	Asn Ser Arg Tyr Trp Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Gly Ala Val Asn Ala Cys His Leu
Native	TCC TGC AGT GCT TTG CTG CAA GAT AAC ATC GCT GAT GCT GTA GCT TGT GCA AAG AGG GTT
Optimized	TCT TGT TCA GCT TGT TTG CAA GAT AAC ATA GCT GAT GCA GTT GCT TGT GCA AAG AGA GTT
	Ser Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asn Ile Ala Asp Ala Val Ala Cys Ala Lys Arg Val
Native	GTC GGT GAT CCA CAA GGC ATT AGA GCA TGG GTG GCA TGG AGA AAT CGT TGT CAA AAC AGA
Optimized	GTC AGA GAT CCI CAA GGT ATC AGA GCT TGG GTC GCA TGG AGA AAT AGA TGT CAA AAC AGA
	Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp Arg Asn Arg Cys Gln Asn Arg
Native	GAT GTC CGT CAG TAT GTT CAA GGT TGT GGA GTG TAA
Optimized	GAT GTT AGA CAA TAT GTC CAA GGT TGT GGT GTT TAA
	Asp Val Arg Gln Tyz Val Gln Gly Cys Gly Val ...

图1 hLYZ天然序列及其优化后DNA序列比较

Fig.1 Comparison of original and optimized sequences of hLYZ

注：Native表示The wild type sequence；optimized表示The optimized sequence of hLYZ。

根据乳酸克鲁维酵母密码子的偏爱性，改变了天然hLYZ基因序列的74个位点，约占hLYZ基因碱基总数的18.6%，G+C含量由46.0%下降至39.7%。改造前后hLYZ基因CDS序列所翻译的氨基酸序列比对结果显示，其氨基酸序列没有发生变化（图1）。二级结构预测及Nc值计算显示，hLYZ基因能够在乳酸克鲁维

酵母中高效表达。

2.2 目的基因PCR 扩增产物的鉴定

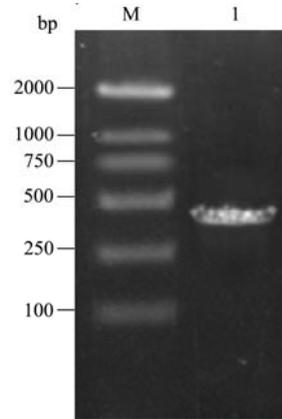


图2 人溶菌酶基因PCR产物

Fig.2 Electrophoretic profile of the PCR product of hLYZ

注：M表示DNA marker DL2000；1表示PCR product of hLYZ。

以质粒PUC57-hLYZ为模板，用引物LYZ-F和LYZ-R PCR扩增hLYZ基因，PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳，可见约400 bp的特异性条带(图2)，大小与预期相符。

2.3 重组表达载体pKLAC1-hLYZ的鉴定

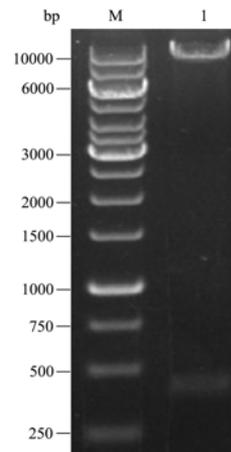


图3 重组表达质粒pKLAC1-hLYZ的酶切鉴定

Fig.3 Identification of the pKLAC1-hLYZ plasmid digested with *Xho*I and *Bgl*II

注：M表示DNA marker 1kb plus；1表示The plasmid of pKLAC1-hLYZ digested with *Xho*I and *Bgl*II。

重组表达载体pKLAC1-hLYZ经*Xho*I/*Bgl*II双酶切，0.7%琼脂糖凝胶电泳分析，可见约9.3 kb的载体片段和400 bp的目的基因片段(图3)。对重组表达载体pKLAC1-hLYZ进行DNA测序，结果显示插入基因序列与设计序列完全一致，成功构建了重组表达载体pKLAC1-hLYZ。

2.4 多拷贝整合重组菌株的鉴定

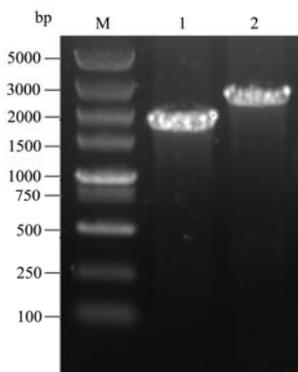


图4 重组菌株多拷贝整合表达框的PCR鉴定

Fig.4 Identification of multicopy transformants of recombinant strain hLYZ1 by PCR

注: M表示1 kb DNA ladder marker; 1表示PCR products of recombinant strain hLYZ 1 with single-copy primer; 2表示PCR products of recombinant strain hLYZ 1 with multi-copy primer.

以阳性转化子细胞裂解液作为PCR反应的模板, 利用多个表达框插入鉴定整合引物进行全细胞PCR鉴定, 分别扩增出了大小分别约为1.9 kb和2.3 kb的片段(图4), 实验结果证实hLYZ已成功整合到乳酸克鲁维酵母GG799的基因组中, 而且菌株hLYZ 1为多拷贝整合表达框的重组菌株。

2.5 重组人溶菌酶活力测定方法的建立

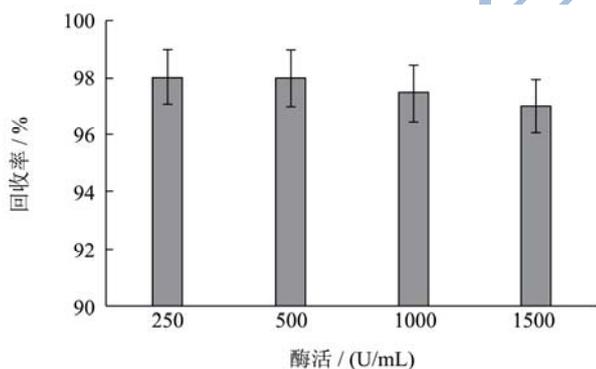


图5 人溶菌酶标准品回收试验

Fig.5 Recovery test of the human lysozyme standard

通过已知酶活力人溶菌酶标准品在乳酸克鲁维酵母GG799发酵上清液中的加样回收试验, 用人溶菌酶的回收率($R = M/A \times 100\%$ 其中, M为回收溶菌酶活力; A为添加溶菌酶活力)表示方法的准确度, 回收率越接近100%, 表示方法准确度越高。以乳酸克鲁维酵母GG799发酵上清液配制250、500、1000和1500 U/mL人溶菌酶溶液, 添加回收率计算结果见图5, 4种浓度人溶菌酶的添加回收率都在95%以上。回收试验方差分析见表1, $p > 0.05$ 说明发酵上清液中杂蛋白

对测定结果影响不大, 该测定方法准确度较高, 方法可靠。

表1 回收试验的方差分析

Table 1 ANOVA for the recovery test

差异源	SS	DF	MS	F	P
组间	229298.4	3	76432.81	0.412089	0.74734
组内	2225720	12	185476.7		
总计	2455018	15			

2.6 重组菌株生物量及产酶活性

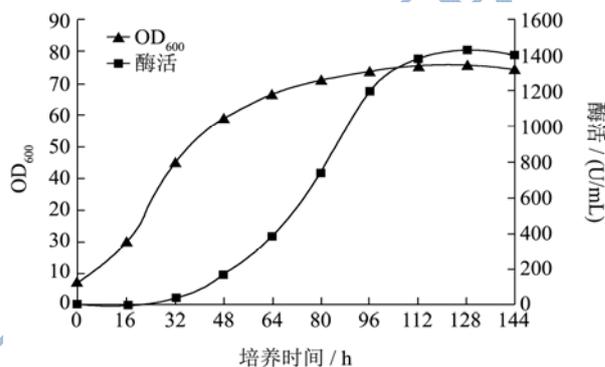


图6 重组菌株hLYZ1生长曲线及产酶活力曲线

Fig.6 Growth and enzyme activity curves of recombinant strain hLYZ1

重组菌株hLYZ 1进行摇瓶发酵, 每隔16 h取样, 测定生物量和溶菌酶活性。重组菌株hLYZ 1在16 h内进入对数生长期, 96 h以后进入稳定生长期, 菌液OD₆₀₀维持在70左右。产酶曲线明显滞后于生长曲线, 在48 h时产酶有明显上升趋势, 128 h酶活达到最大值, 为1430 U/mL(图6), 之后酶活性明显下降, 可能是由于酵母自身分泌的蛋白酶导致酶活的降解。

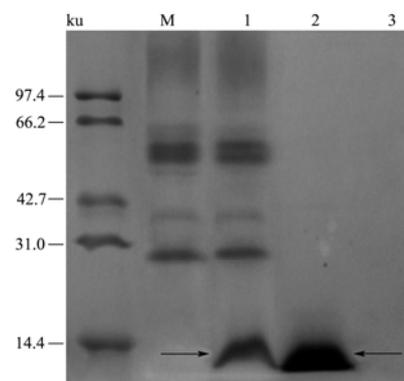


图7 重组乳酸克鲁维酵母表达产物的SDS-PAGE电泳图

Fig.7 SDS-PAGE analysis of recombinant *K. lactis* strain hLYZ1

注: 1表示Supernatant from *K. lactis* strain GG799; 2表示Supernatant from recombinant strain hLYZ 1; 3表示Human lysozyme standard; M表示Protein marker.

2.7 重组菌株表达产物的SDS-PAGE电泳分析

对重组菌株hLYZ 1摇瓶表达上清进行SDS-PAGE分析,实验结果如图7所示。与对照菌株乳酸克鲁维酵母GG799相比,重组菌株hLYZ 1样品在分子量约在14 ku处有明显的高水平表达的特征性条带,与hLYZ蛋白预期大小一致。

2.8 重组人溶菌酶活性检测

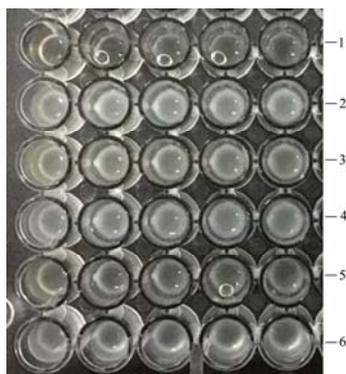


图8 重组人溶菌酶活性检测

Fig.8 Antibacterial activity of recombinant hLYZ

注: 1表示Recombinant hLYZ and *M. lysodeikticus*; 2表示PBS buffer solution and *M. lysodeikticus*; 3表示Recombinant hLYZ and *E. coli*; 4表示PBS buffer solution and *E.coli*; 5表示Recombinant hLYZ and *B. subtilis*; 6表示PBS buffer solution and *B.subtilis*。

选用溶壁微球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌作为底物,检测重组人溶菌酶对三种不同细菌的溶菌效果。结果显示,重组人溶菌酶对三种不同细菌均有明显的溶壁作用(图8),其中对溶壁微球菌的溶菌效果最显著,其次是枯草芽孢杆菌,对大肠杆菌溶菌作用效果较弱,提示溶壁微球菌可能是人溶菌酶的一种最适酶活反应底物。

3 结论

3.1 乳酸克鲁维酵母是公认的食品安全级微生物,被广泛应用于食品工业和生物医药业等研究领域。由于人溶菌酶基因中编码部分氨基酸的密码子在乳酸克鲁维酵母中的使用频率很低,因此天然序列的基因在乳酸克鲁维酵母中难以高效表达。本研究在不改变hLYZ基因编码氨基酸序列的前提下,按照乳酸克鲁维酵母的密码子使用规则,对hLYZ基因密码子进行优化设计,得到适合在乳酸克鲁维酵母中高效特异性表达的人溶菌酶基因序列。

3.2 本研究将经密码子优化的人溶菌酶基因通过同源重组整合到乳酸克鲁维酵母基因组中,实现了人溶

菌酶基因在乳酸克鲁维酵母中的外源分泌表达。经过转化子筛选鉴定,获得了具有多拷贝整合表达框的重组菌株。重组菌株人溶菌酶活力在摇瓶发酵128 h时达到1430 U/mL,高于目前已报道的水平。重组人溶菌酶对溶壁微球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有较好的溶菌活性,具有潜在的应用价值。在此基础上通过产酶条件的优化及进一步的放大工艺研究,将有助于重组人溶菌酶生产成本的降低,并为人溶菌酶的进一步开发和工业应用提供基础。

参考文献

- [1] Li G, Shi W, Chen G, et al. Construction and *in vivo* evaluation of a mammary gland-specific expression vector for human lysozyme [J]. *Plasmid*, 2014, 76: 47-53
- [2] Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety [J]. *Oral. Dis.*, 2002, 8(1): 23-29
- [3] Wei J T, Tang C D, Wu M C, et al. Cloning and functional expression of a human lysozyme gene (hly) from human leukocytes in *Pichia pastoris* [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 6(1): 173-186
- [4] Yu H, Chen J, Liu S, et al. Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats [J]. *J Biotechnol*, 2013, 168(4): 676-683
- [5] 唐存多,高金湖,郭敏辰.人溶菌酶基因在毕赤酵母中的表达及发酵条件的优化[J].*中国生物制品学杂志*,2010,23(9): 953-956
TANG Cun-duo, GAO Jin-hu, WU Min-chen. Expression of human lysozyme gene in *pichia pastoris* and optimization of condition for fermentation [J]. *Chin. J. Biologicals* September, 2010, 23(9): 953-956
- [6] Dumoulin M, Johnson R J K, Bellotti V, et al. Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases. Part B: molecular mechanisms of conformational diseases [M]. New York: Springer US, 2007
- [7] Matano M, Nakajima K, Kashiwagi Y, et al. Sweetness characterization of recombinant human lysozyme [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2015, 188: 8-14
- [8] Lamppa J W, Tanyos S A, Griswold K E. Engineering *Escherichia coli* for soluble expression and single step purification of active human lysozyme [J]. *J. Biotechnol.*, 2013, 164(1): 1-8
- [9] Castanon M J, Spevak W, Adolf G R, et al. Cloning of human lysozyme gene and expression in the yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae* [J]. Gene, 1988, 66(2): 223-234
- [10] Spencer A, Morozov-Roche L A, Noppe W, et al. Expression, purification, and characterization of the recombinant calcium-binding equine lysozyme secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niger*: comparisons with the production of hen and human lysozymes [J]. Protein Expr. Purif, 1999, 16(1): 171-180
- [11] Van Ooyen A J, Dekker P, Huang M, et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis* [J]. FEMS Yeast Res., 2006, 6(3): 381-392
- [12] Šiekštelė R, Veteikytė A, Tvaska B, et al. Yeast *Kluyveromyces lactis* as host for expression of the bacterial lipase: cloning and adaptation of the new lipase gene from *Serratia* sp [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2015, 42(10): 1309-1317
- [13] Ipswich: N E BioLabs, Instruction manual of *Kluyveromyces lactis* protein expression kit [M]. New England Biolabs., 2005
- [14] 侯启瑞, 王金玉, 谢凯舟, 等. 测定鸡蛋蛋清中溶菌酶含量和活力标准方法的建立[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(3): 49-52
- HOU Qi-ru, WANG Jin-yu, XIE Kai-zhou, et al. Effects of Chinese herb additives on growth performance and intestinal microflora of weaned piglets [J]. Chinese Journal of Animal Sciences, 2010, 46(3): 49-52