

# 共表达透明颤菌血红蛋白提高脂肪酶在毕赤酵母中的表达

卢俊裕, 林影, 梁书利, 叶燕锐

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 为了克服巴斯德毕赤酵母高密度发酵过程中的溶氧限制, 提高外源蛋白的表达量, 本文以启动子 YPT 介导透明颤菌血红蛋白 (VHb) 在培养过程中组成型表达。同时以启动子 AOX1 介导的南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB) 基因作为报告基因, 使 CALB 在甲醇诱导阶段表达。另外, 还将绿色荧光蛋白在过氧化物表面表达, 将红色荧光蛋白在过氧化物基质中表达以检测信号肽能否定位在相应的位置。最后, 将 VHb 分别在过氧化物酶体表面和基质两个位置表达, 以观察表达位置的不同所产生的影响。通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析表明, CALB 和 VHb 在重组菌中成功实现了共表达。在限氧条件下, 重组菌株 GS115/ExVHb、GS115/VHbSKL 的外源蛋白 CALB 的表达量比对照菌株 GS115/CALB 分别提高了 27.57% 和 20.52%。这说明 VHb 与外源基因共表达可以改善酵母在发酵过程中的摄氧情况, 提高外源蛋白的表达量。

**关键词:** 透明颤菌血红蛋白; 脂肪酶; 氧限制; 毕赤酵母; 分泌表达

文章编号: 1673-9078(2014)6-110-115

## Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Improves CALB Production in *Pichiapastoris*

LU Jun-yu, LIN Ying, LIANG Shu-li, YE Yan-rui

(College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** To alleviate the dissolved oxygen (DO) limitation and improve *Candida antarctica* lipase B (CALB) production during high-cell density fermentation, the CALB gene and *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) gene *vgb* were co-expressed in *Pichiapastoris* under the AOX1 and YPT promoter control, respectively. In addition, to detect the effect of signal peptide, GFP was expressed on the surface of peroxide, while RFP was expressed in the peroxide matrix. Finally, GFP or RFP was replaced by VHb protein to find out the impact of the different positions. SDS-PAGE and Western Blot analysis results indicated that VHb and CALB were successfully co-expressed in recombinant strains. Compared with the control strain, expression of CALB in GS115/ExVHb and GS115/VHbSKL under oxygen limitation was improved by 27.57% and 20.52%, respectively. Therefore, expression of VHb in *P. pastoris* is an effective strategy to improve CALB production.

**Key words:** *Vitreoscilla* hemoglobin; lipase; oxygen limitation; *Pichiapastoris*; expression

氧是好气性微生物进行能量代谢的重要物质, 毕赤酵母利用甲醇生长时, 每利用 1 mol 甲醇需要消耗 1.08 mol 的 O<sub>2</sub>, 因此毕赤酵母生长过程对氧的需求量非常大, 即使控制甲醇的浓度在较低的水平 (4 g/L), 其需氧量也可以高达 2000 mmol/(L·h)<sup>[1]</sup>。但大规模发酵罐通氧设备的最大氧传输速率约为 300 mmol/(L·h), 无法满足毕赤酵母的需氧量, 通过提高搅拌速度和通纯氧可以提高氧的传输速率, 但效果有限, 而且受设

学备和成本的限制。用于通气和搅拌的能耗已占整个发酵成本的 1/3, 使发酵工业成为高能耗的行业。

透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 是一种专性好氧的革兰氏阴性丝状菌在低氧环境中产生的一种分子量约为 15.8 kDa 的可溶性蛋白, 具有较高的氧吸附和解离常数<sup>[2-4]</sup>。在毕赤酵母中共表达目的蛋白和 VHb 是改善高密度发酵过程中溶氧限制的一种有效方式。在氧供应正常的情况下, β-半乳糖苷酶与 VHb 在毕赤酵母中共表达对细胞生长没有明显促进作用, 但重组菌中 β-半乳糖苷酶的表达量提高了 4 倍<sup>[5]</sup>。此外, 有研究表明, VHb 在毕赤酵母中的表达不仅能提高氧的利用率和 S-腺苷甲硫氨酸的

收稿日期: 2014-01-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31000027)

作者简介: 卢俊裕 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酶学

通讯作者: 叶燕锐 (1981-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 分子生物

产率,还能促进 ATP 合成,增强甲醇代谢活性<sup>[6]</sup>。2011年,汪小峰等在毕赤酵母中共表达 VHb 和 YLIp2 使后者的酶活在摇瓶和 10 L 发酵罐分别提高 25%和 83%<sup>[7]</sup>。

为了改善高密度发酵过程中的溶氧限制,提高外源蛋白的表达量。本研究将 CALB 基因和透明颤菌血球蛋白 (VHb) 的基因 vgb 分别置于 AOX1 启动子和 YPT 启动子的调控之下,使 CALB 被甲醇诱导表达,而 VHb 在培养过程中组成型表达。讨论了限氧条件下共表达 VHb 蛋白及其表达位置对重菌株的细胞生长和脂肪酶的表达水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

*Pichiapastoris*GS115/CALB 为实验室保存。mRFP 和 vgb 基因由南京金斯瑞公司合成。

#### 1.1.2 试剂和培养基

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和限制性内切酶,购自 TaKaRa 公司;生物素和蛋白

质分子量标准,购自美津生物公司;酵母氮源 YNB(Yeast Nitrogen Base)、蛋白胨;均购自 Difco 公司;酵母抽提物;购自 Oxoid 公司;其他试剂均为市售国产分析纯。质粒提取试剂盒 (Plasmid Miniprep Kit),购自 Biomiga 公司;胶回收试剂盒,PCR 纯化试剂盒,为 Qiagen 产品。

LB 培养基:每 100 mL 中含有 1 g 胰蛋白胨,0.5 g 酵母抽提物,1 g NaCl (低盐时为 0.5 g),根据需要添加 zeocin 使终浓度为 25 mg/mL。培养基 YPD (根据需要加 zeocin 使终浓度为 100 mg/mL)、MM、BMGY、BMMY 参考 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。

#### 1.1.3 引物与培养基

根据 NCBI 公布的 DNA 序列设计引物,所有普通 PCR 引物均由上海捷瑞生物公司合成。

表 1 本文用到的引物(酶切位点用下划线标注)

Table 1 Primers used in this study (Restriction enzyme cutting sites are marked by underline)

Primers	Sequences (5'-3')	Size	Restriction site
YPT-F	AGCAGATCTCCAACCAGGTGTTTTGATTC	29	<i>Bgl</i> II
YPT-R	TACGAATCTATTATCTCTGTGTGTATGTG	30	<i>EcoR</i> I
Ex-eGFP-F	CGTTCGAAAGGATCCAAACGATGAAATCCACAAAGAGAA ACACTTTTTTTGGCTTGGCAGCCCTTGG	43	<i>Bam</i> H I
Ex-eGFP-R	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACGTAACAGAGTACCCCA GTCCTAGTGCCCAAGGGCTGCCAAGCCAAA	43	
eGFP-F	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT	23	
eGFP-R	CCGAATTCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA CTTGTACAGCTCGTCCATGC	58	<i>EcoR</i> I
mRFP-SKL-F	AAGAGAATTCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAA	36	<i>EcoR</i> I
mRFP-SKL-R	TAATCTCGAGTTACAGCTTAGAGGCGCCGGTGGAGTGG	38	<i>Xho</i> I
VHb-SKL-F	CCAGGAATTCATGTTAGACCAGCAAACCATTAAC	34	<i>EcoR</i> I
VHb-SKL-R	CAGTCTCGAGTTACAGCTTAGACTTATCGTCGTCAT CCTTGTAATCTTCAACCGCTGAGCGTACA	66	<i>Xho</i> I
Ex-VHb-F	CGGAATTCATGAAATCCACAAAGAGAAACACTTTTTTTG GCTTGGCAGCCCTTGG	55	<i>EcoR</i> I
Ex-VHb-R	TTAATGGTTTCTGGTCTAAGTAAACAGAGTACCCAGTCCT AGTGCCCAAGGGCTGCCAAGCCAAA	68	
VHb-F	ATGTTAGACCAGCAAACCATTAACA	25	
VHb-R	CAGGCTCGAGTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTTCAAC CGCTTGAGCGTACAAA	59	<i>Xho</i> I
RT-TUB-F	GGTAGACAATGAGGCTATT	19	

RT-TUB-R	GTTACTGAAGAGACGACTT	19
RT-vgb-F	GTTACCATTACCACGACTT	19
RT-vgb-R	TTAGGCTGCTCCAAAGAT	18

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组质粒的构建与转化

以引物 Ex-eGFP-F、Ex-eGFP-R、eGFP-F 和 eGFP-R 通过重叠延伸 PCR 的方法扩增得到产物定位于过氧化物酶体表面的信号肽与 eGFP 融合的基因片段。此片段和商业载体 pPIC9K 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后连接得到重组质粒 pGFP。pGFP 经 *Sac* I 线性化后，电转至 GS115 得到重组菌株 GS115/GFP。

以 mRFP-SKL-F、mRFP-SKL-R 为引物，以合成的 mRFP 为模板扩增得到产物定位于过氧化物酶体基质的信号肽与 mRFP 融合的基因片段。此片段和商业载体 pPICZA 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后连接得到重组质粒 pRFP。

pRFP 经 *Mss* I 线性化电转至 GS115/GFP 得到重组菌株 GS115/GFP-RFP。

以酵母基因组为模板，利用 YPT-F 和 YPT-R 为引物扩增启动子 YPT。PCR 产物与 pPICZA 经酶切后，连接形成载体 pYPT。

以引物 Ex-VHb-F、Ex-VHb-R、VHb-F 和 VHb-R 通过重叠延伸 PCR 的方法扩增得到产物定位于过氧化物酶体表面的信号肽与 VHb 融合的基因片段。此片段和重组载体 pYPT 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后连接得到重组质粒 pExVHb。pExVHb 经 *Pst* I 线性化后，电转至 GS115/CALB 得到重组菌株 GS115/ExVHb。

以 VHb-SKL-F、VHb-SKL-R 为引物，以合成的 VHb 基因为模板扩增得到产物定位于过氧化物酶体基质的信号肽与 VHb 融合的基因片段。此片段和重组载体 pPICZA 经 *Eco*R I 和 *Xho*I 双酶切后连接得到重组质粒 pVHbSKL。

重组质粒 pVHbSKL 经 *Pst* I 线性化后，电转至 GS115/CALB 得到重组菌株 GS115/VHbSKL。

### 1.2.2 菌株的筛选与摇瓶发酵

将菌株及对照菌株转移到 MM 水解平板上，30 °C 下培养 2 d。挑取水解圈较大的菌株接种于装有 25 mL BMGY 培养基的 50 mL 摇瓶中，30 °C、250 r/min 下培养 18-24 h，离心收集菌体转移至 25 mL BMMY 培养基的 50 mL 摇瓶中，并使初始 OD 为 30。28 °C、100 r/min 下诱导培养，每隔 24 h 添加 2% (V/V) 的甲醇，并取样检测生物量和发酵液上清的酶活力。

### 1.2.3 脂肪酶水解活力测定与蛋白分析

采用对硝基苯酚法测定脂肪酶活性，以取上清以

对硝基苯酚丁酸酯作为底物，在 pH 8.0 45 °C 条件下反应 5 min，用酶标仪测吸光度<sup>[8]</sup>。水解酶活力单位 (1U) 定义为：在当前反应条件下，每 1 分钟水解底物对硝基苯酚丁酸酯所生成的 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

重组转化子连续诱导培养 96 h，取发酵上清液分别取 20 μL 上样，进行 12% SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R250 染色，分析重组蛋白分子量。SDS-PAGE 电泳方法和 Western Blot 参考《分子克隆手册》。

### 1.2.4 vgb 基因拷贝数的检测

利用 Takara 公司的 Yeast DNaiso Kit 提取重组菌株 GS115/ExVHb 和 GS115/VHbSKL 的基因组。使用 Takara 公司的 One Step SYBR<sup>®</sup>PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) 试剂盒测定 vgb 的拷贝数。得到的数据用双标准曲线计算基因 vgb 的拷贝数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 表达载体的构建

#### 2.1.1 信号肽定位质粒的构建

mPTS1 与 eGFP 通过重叠 PCR 的方法融合为 861 bp 的基因序列，经测序验证正确后插入到 pPIC9K 质粒中，获得重组质粒 pGFP (图 1a)。SKL 信号肽通过引物扩增添加到 mRFP 基因序列的 3' 端，经测序验证正确后插入至 pGFP 载体中，获得重组质粒 pRFP (图 1b)。通过 PCR 和测序证实所有的重组质粒构建正确。

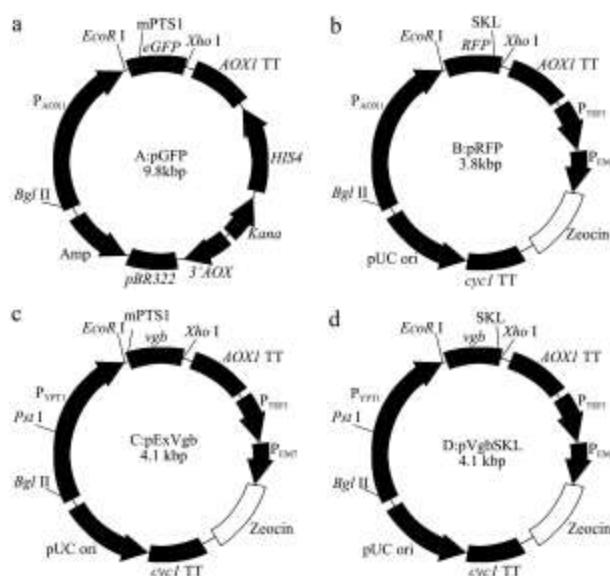


图 1 表达载体的构建

Fig.1 Construction of express vector

注: a: pGFP; b: pRFP; c: pExVgb; d: pVgbSKL。

### 2.1.2 定量表达不同位置 vhb 载体的构建

YPT 启动子替代 pPICZA 中的 AOX 启动子, 获得重组质粒 pYPT。mPTS1 与 vgb 通过重叠 PCR 的方法融合长为 549 bp 的基因序列, 经测序验证正确后插入到 pYPT 质粒中, 获得重组质粒 pExVHb (图 1c)。SKL 信号肽通过引物扩增添加到 vgb 基因序列的 3' 端, 经测序验证正确后插入 pYPT 质粒中, 获得重组质粒 pVHbSKL (图 1d)。

### 2.2 透明颤菌血红蛋白 VHb 的定位

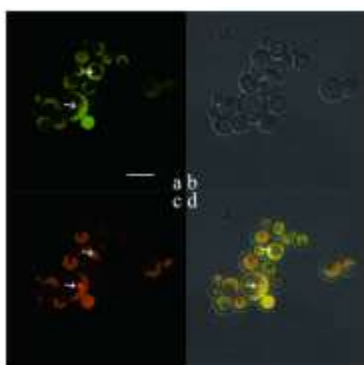


图 2 激光共聚焦各视图场图

Fig.2 The View of LSMC

注: a: GFP 通道; b: RFP 通道; c: 明视图场图; d: 三种视图场的叠加; 比例尺为 5 μm。

毕赤酵母中以甲醇为碳源时, 甲醇代谢途径在过氧化物酶体中进行, 此过程耗氧剧烈, 需氧量大, 而透明菌血红蛋白具有运输和携带氧气的功能, 通过将 VHb 定位于过氧化物的表面和基质来促进氧气在细胞内的扩散。另据报道, mPTS1 信号肽定位可过氧化物酶体表面<sup>[9]</sup>, SKL 信号肽可定位至过氧化物酶体基质<sup>[10]</sup>中。将重组质粒 pGFP 转化至毕赤酵母中, 随机挑取 95 个克隆子在 96 孔酶标板上发培养 3 d。测量荧光值, 得到阳性菌株, 再将重组质粒 pRFP 转化至此阳性菌株中, 得到 GS115/GFP-RFP。在此菌株中, mRFP 蛋白分泌至过氧化物酶体基质中, 而 eGFP 锚定在过氧化物酶体表面。

通过激光共聚焦显微, 我们可以观察到在图 2b 明视场中, 酵母正处于出芽时期。在图 2a 的 GFP 通道中, 可以时显地观察到绿色荧光蛋白, 其中白色箭头所指的区域呈现较为明显的框架图形, 标示了过氧化物酶体的表面。

在图 2c 的 RFP 通道中, 同样可以明显地观察到红色荧光蛋白。其中白色箭头所指的区域呈现出较为集中的圆点状, 说明红色荧光蛋白已经运输到过氧化物酶体的基质中。最后在图 2d 的三个视场的叠加图,

可以观察到红点周遭有绿色的边框出现, 交接处呈黄色。这与实验设计所符。说明 mPTS1 信号肽可将绿色荧光蛋白定位至过氧化物酶体表面, SKL 信号肽可将红色荧光蛋白定位至过氧化物酶体基质。

### 2.3 CALB 和 Vhb 在酵母中的表达

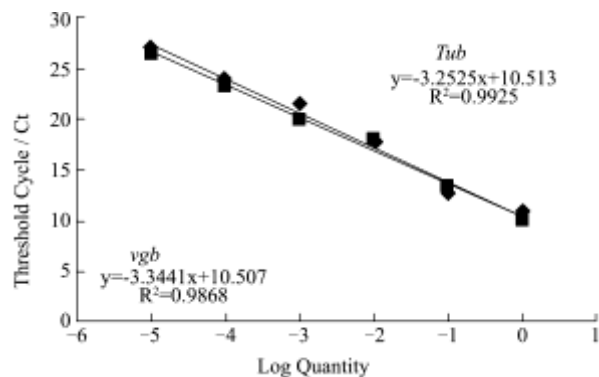


图 3 TUB 和 vgb 的标准曲线

Fig.3 The standard curve of gene TUB and vgb

表 2 GS115/ExVHb 和 GS115/VHbSKL 的 Ct 值和拷贝数

Table 2 The Ct and copy number of GS 115/ExVHb and GS 115/VHbSKL

重组菌株	VHbSKL	
	GS115/VHbSKL	GS115/ExVHb
Tub 的 Ct 值	1	18.93
	2	18.72
	3	18.64
	Mean	18.77±0.12
vgb 的 Ct 值	1	19.27
	2	19.23
	3	19.29
	Mean	19.26±0.02
拷贝数	1.03	1.04

选取 α 微管蛋白基因 (TUB) 为管家基因, 依据双标准曲线法测定重组菌株中 vgb 基因组的拷贝数。构建标准质粒 Tub 和 vgb 基因拷贝数均为 1。以此质粒测定双标准曲线如图 2 所示。分别提取 GS115/EXVHb 和 GS115/VHbSKL 的基因组, 使用 SYBR 法测得重组菌株 GS115/EXVHb 中 vgb 基因的拷贝数为 1.04, GS115/VHbSKL 中 vgb 基因的拷贝数为 1.03。

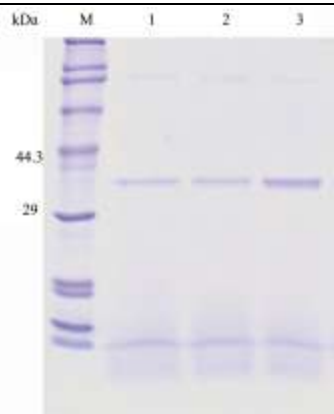


图4 SDS-PAGE 分析 CALB 在毕赤酵母中的表达

Fig.4 SDS-PAGE analysis of CALB

注: M:protein marker; 1: GS115/CALB; 2: GS115/VHbSKL; 3: GS115/ExVHb。

取重组菌株 GS115/ExVHb、GS115/VHbSKL 和对照菌株 GS115/CALB 发酵 96 h 的发酵液为样品。离心后的上清作为样品。对发酵液上清 SDS-PAGE 分析。CALB 理论大小为 33 kDa, 在图 4 中观察到在 29 kDa 和 44.3 kDa 之间有相应的条带。这说明 CALB 在各菌株中都有表达。

对离心后的菌体进行破碎提取胞内蛋白。对胞内表达的蛋白作 Western Blot 分析。在图 5 中可以看到在对应的位置上, 对照菌株 GS115/CALB 没有条带, 而重组菌株 GS115/ExVHb、GS115/VHbSKL 都有条带。说明蛋白 VHb 成功表达。

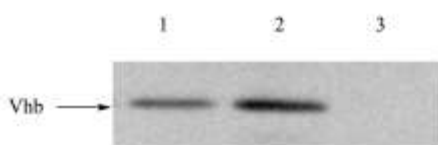


图5 Western Blot 分析 VHb 在毕赤酵母中的表达

Fig.5 Western Blot analysis of VHb

注: 1: GS115/VHbSKL; 2: GS115/ExVHb; 3: GS115/CALB。

#### 2.4 VHb 的表达对重组细胞的生长和 CALB 表达的影响

重组质粒 pExVHb 和 pVHbSKL 分别电转化至毕赤酵母 GS115/CALB。得到重组菌株 GS115/ExVHb 和 GS115/VHbSKL。将克隆子转移到 MM 水解平板中, 并挑取水解圈较大的菌株发酵。培养条件为: 100 r/min、28 °C、装液量为 25 mL/50 mL、2% 甲醇诱导。

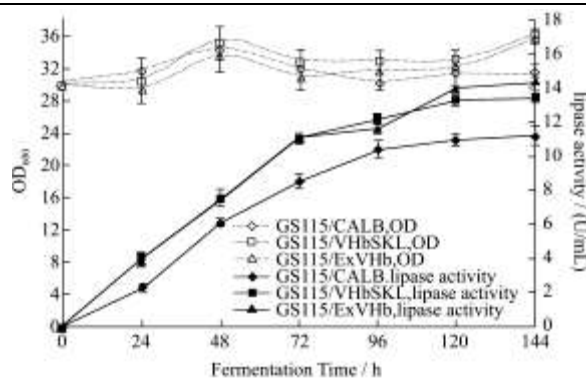


图6 对照菌 GS115/CALB 和重组菌 GS115/VHbSKL、GS115/ExVHb 细胞生长和脂肪酶活力的对比

Fig.6 Comparison of cell growth and lipase activity between GS115/CALB, GS115/VHbSKL and GS115/ExVHb

重组菌株 GS115/ExVHb 和 GS115/VHbSKL 及对照菌株 GS115/CALB 在 BMMY 培养基中的生长情况如图 6。从图上看, 重组菌株 GS115/ExVHb、

GS115/VHbSKL 与对照菌株 GS115/CALB 的生长情况并无区别, 说明 VHb 的表达对宿主的生长没有影响, 与唐辉桂等人的报道<sup>[11]</sup>一致。同时, 发酵上清中的酶活逐渐升高。其中重组菌株的酶活一直高于对照菌株, 两株重组菌的酶活并没有明显区别。三株菌株均在 144 h 达到最大值。相比对照菌株的最大酶活 11.22 U/mL, 重组菌株 GS115/ExVHb 的酶活提高了 27.57%, 达到 14.32 U/mL, GS115/VHbSKL 的酶活提高了 20.52%, 达到 13.53 U/mL。这说明在限氧条件下, 表达 VHb 可以提高菌株的酶活, 改善发酵过程中供氧不足的情况。将 VHb 定位于过氧化物酶体表面的效果比定位于基质略好。

### 3 结论

3.1 毕赤酵母在甲醇诱导时常处于高密度发酵的状态。这时通常会引起溶氧的限制, 虽然可以提高提高搅拌转速、通气量和调节甲醇补料速率等手段改善溶氧。但这些方法都不能从根本上解决溶氧限制的问题, 并且会间接增加发酵过程的成本。

3.2 1994 年, Chen R 等的研究<sup>[12]</sup>表明 VHb 的表达对 *Saccharomyces Cerevisiae* 的 ATP 水平影响不明显, 但是 ATP 的积累速率则要高于对照菌株 1.68 倍。Chen R 等人猜测 VHb 可能对和氧有关的代谢途径的产物有直接的作用。1995 年, Tsai PS<sup>[13]</sup>等发现 VHb 能提高大肠杆菌中末端氧化酶 Cyo 的生物活性及浓度, 从而提高了氧的传递效率, 因此提高了大肠杆菌的氧亲和能力。2002 年, Park KW<sup>[14]</sup>等人利用酵母双杂交系统以 VHb 为诱饵蛋白, 细胞色素 bo 末端氧化酶为捕

捉蛋白进行研究。研究发现,两者存在相互作用。并据此猜测,细胞色素 bo 通过末端氧化酶亚基 I 与氧进行结合,然后通过 VHb 进行传送,最后把氧还原。但详细具体的机制还有待进一步的研究。经应用发现透明颤菌血红蛋白与外源共表达,能有效提高重组细胞对氧的利用率,从根本上改善溶氧限制。

3.3 本文用基因工程手段把透明颤菌血红蛋白 vgb 基因分别在过氧化物酶体基质和过氧化物酶体表面两个不同位置表达。成功构建了 VHb 和 CALB 共表达的重组工程菌株。经激光共聚焦检测可以确定信号肽可以将 VHb 分泌至指定的位置上。在限氧条件培养下,重组菌 GS115/ExVHb 的最大酶活达到 14.32 U/mL,比对照菌株提高了 27.57%。GS115/VHbSKL 的最大酶活达到 13.53 U/mL,比对照菌株提高了 20.52%。这说明 VHb 的表达提高了 CALB 的表达量。VHb 与外源蛋白共表达增加外源蛋白的表达量这一策略是具有应

用前景。同时也为 VHb 的机制研究提供了实验材料。

#### 参考文献

- [1] Curvers Simon, Brixius Peter, Klauser Thomas, et al. Human chymotrypsinogen B production with pichiapastoris by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1 [J]. Fermentation. Biotechnology Progress, 2001; 17: 495-502
- [2] Khosla Chaitan, Bailey James E. The vitreoscilla hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in Escherichia coli [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1988, 214: 158-161
- [3] Zhang Lei, Li Yingjun, Wang Zinan, et al. Recent developments and future prospects of Vitreoscilla hemoglobin application in metabolic engineering [J]. Biotechnology Advances, 2007, 25: 123-136
- [4] Wei Xiao-Xing, Chen Guo-Qiang. Applications of the VHb gene vgb for improved microbial fermentation processes [J]. Methods in Enzymology, 2008, 436: 273-287
- [5] Wu Jyh-Ming, Hsu Tsu-An, Lee Cheng-Kang. Expression of the gene coding for bacterial hemoglobin improves  $\beta$ -galactosidase production in a recombinant Pichia pastoris [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25: 1457-1462
- [6] Chen Huaxin, Chu Ju, Zhang Siliang, et al. Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant Pichia pastoris [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 74: 1205-1212
- [7] 汪小锋,孙永川,申旭光,等.毕赤酵母中表达透明颤菌血红蛋白提高重组脂肪酶的表达[J].生物工程学报,2011;27:1755-1764  
WANG Xiao-feng, SUN Yong-chuan, SHEN Xu-guang. Expression of Vitreoscilla hemoglobin improves recombinant lipase production in Pichia pastoris [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(12): 1755-1764
- [8] Jin Zi, Han Shuang-Yan, Zhang Li, et al. Combined utilization of lipase-displaying Pichia pastoris whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media [J]. Bioresource Technology, 2013, 130: 102-109
- [9] Isarankura-Na-Ayudhya Chartchalerms, Panpumthong Patchare e, Tangkosakul Teerawit, et al. Shedding light on the role of Vitreoscilla hemoglobin on cellular catabolic regulation by proteomic analysis [J]. Int. J. Biol. Sci., 2008, 4: 71-80
- [10] Wu Jyh-Ming, Fu Wei-Chang. Intracellular co-expression of Vitreoscilla hemoglobin enhances cell performance and  $\beta$ -galactosidase production in Pichia pastoris [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113: 332-337
- [11] 唐辉桂,黄火清,罗会颖,等.利用透明颤菌血红蛋白在低氧条件下提高毕赤酵母中植酸酶的表达[J].中国农业科技导报, 2008,10:84-89  
TANG Hui-gui, HUANG Huo-qing, LUO hui-ying, et al. Expression of bacterial hemoglobin with a low O<sub>2</sub>-induced promoter improves recombinant phytase production in Pichia pastoris [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008, 10(3): 84-89
- [12] Chen Ruizhen, Bailey James E. Energetic Effect of Vitreoscilla hemoglobin expression in Escherichia coli: An online 31P NMR and a saturation transfer study [J]. Biotechnology Progress, 1994, 10: 360-364
- [13] Tsai Philip S, Kallio Pauli T, Bailey James E. Fnr, a global transcriptional regulator of Escherichia coli, activates the Vitreoscilla hemoglobin (VHb) promoter and intracellular VHb expression increases cytochrome d promoter activity [J]. Biotechnology Progress, 1995, 11: 288-293
- [14] Park Kyung-Won, Kim Kyung-Jin, Howard Andrew J, et al. Vitreoscilla hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 33334-33333