

特异腐质霉角质酶在大肠杆菌中的表达和发酵优化

Expression of *Humicola insolens* Cutinase in *Escherichia coli* and its Optimization of Fermentation

孙益荣^{1,2,3} 吴敬^{1,2,3} 宿玲恰^{1,2,3}

SUN Yi-rong^{1,2,3} WU Jing^{1,2,3} SU Ling-qia^{1,2,3}

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 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; 3. 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education Jiangnan

University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 3. International Cooperation Laboratory of Food Science and

Technology of the Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:应用大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)BL21(DE3)表达系统实现特异腐质霉(*Humicola insolens*, *H.insolens*)来源角质酶的重组表达。对重组角质酶进行酶学性质研究,发现其最适pH为8.5、最适温度为80℃,并具有良好的pH稳定性和温度稳定性。经3L发酵罐中扩大培养并进行发酵条件优化,其最佳发酵条件:发酵前期控制菌体生长pH 7.0、温度37℃,培养时间12~14h;菌体浓度 OD_{600} 达到50时进入诱导期,调节温度降至30℃,恒速流加0.2 g/(L·h)的乳糖溶液进行诱导,总发酵周期为36h,最高酶活2 233 U/mL,是摇瓶水平酶活的13倍。

关键词:特异腐质霉;角质酶;重组大肠杆菌;发酵优化

Abstract: Cutinase is a kind of multifunctional hydrolase, which has important application value in the food processing and textile refining industry. The recombinant expression system of *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) was used to achieve the recombinant expression of *Humicola insolens* cutinase in *E. coli*, and the activity of extracellular supernatant in shaking flask level reached 170 U/mL. The recombinant cutinase was characterized. The optimum pH was 8.5, the optimum temperature was 80℃, with good pH stability and temperature stability. In order to further improve the possibility of the industrial application of *H.insolens* cutinase, the recombinant *E. coli* was cultured in 3 L fermentor and the cultivation condition is optimized. The optimum fermentation conditions: maintain pH 7.0 and

37℃ in early culture phases about 12~14 h; when the cell concentration OD_{600} up to 50, fermentation entered induced phases, adjust the temperature to 30℃, 0.2 g/(L·h) lactose solution were added with constant flow rate. The total fermentation period was about 36 h. The highest activity of enzyme reached to 2 233 U/mL, which is 13 times about the enzyme activity in shake flask level.

Keywords: *Humicola insolens*; Cutinase; Recombinant *E.coli*; Fermentation Optimization

角质酶是一种多功能水解酶,可用于水解短链或长链脂肪酸酯类和甘油三酯,也可用于降解植物的多聚体角质^[1-2]。相较于普通的脂肪酶,角质酶缺少了盖子结构,更易于降解聚酯。基于以上功能特点,角质酶在食品加工和纺织工业等方面具有广泛的应用前景^[3-6],尤其在棉织物的生物精炼和人造纤维的表面改性中,角质酶有望替代传统的化学碱处理,对环境保护有重要意义。

目前角质酶的主要来源包括微生物和花粉2种,其中微生物来源又可细分为致病真菌、部分细菌和少数放线菌三部分^[7]。国内外的研究早期集中在植物病原真菌 *Fusarium solani pisi*^[8]、*Pyrenopeziza brassicae*^[9] 来源的角质酶上,后续又筛选得到放线菌 *Thermobifida fusca*^[11]、*Streptomyces acidiscabies*^[3] 和细菌 *Pseudomonas putida*^[10] 等产角质酶菌株。绝大多数角质酶,诸如 *Thermobifida Fusca* 角质酶,适用温度范围为30~60℃。而特异腐质霉(*Humicola insolens*, *H.insolens*)角质酶最适温度为80℃,并具有良好的耐热性。在此应用温度下,棉纤维表层的蜡质会因高温融化,有利于角质酶与角质的结合,提升酶应用效能。因此,特异腐质霉来源的角质酶具有更好的应用前景。为了更好地

基金项目:国家杰出青年基金(编号:31425020)

作者简介:孙益荣,男,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:吴敬(1969—),女,江南大学教授,博士。

E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-01-30

生产角质酶,构建工程菌生产重组蛋白是目前研究的主要方式。因而选择合适的表达宿主显得尤为重要。大肠杆菌表达系统作为目前研究最深入、开发最成熟的一种表达系统,具有培养周期短、表达效率高、遗传相对稳定、操作相对简便的特点^[11],是生产异源蛋白最常用的系统之一。

本试验拟将 *Humicola insolens* 来源的角质酶基因在大肠杆菌中进行克隆表达,测定其酶学性质,并在 3 L 发酵罐的水平上进行扩大培养及条件优化,为 *H.insolens* 角质酶在工业中的应用及后续的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒

H.insolens 角质酶基因、克隆宿主 *E.coli* JM109、表达宿主 *E.coli* BL21(DE3)、表达载体 pET 20b(+);作者所在实验室保藏;

克隆载体 pMD18-T simple vector:宝生物工程(大连)有限公司;

PCR 引物:生工生物工程(上海)有限公司。

1.1.2 主要试剂

DNA Marker、琼脂糖、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III、碱性磷酸酶(CIAP)及 PCR 聚合酶 PrimeSTAR:宝生物(大连)工程有限公司;

氨苄青霉素(Amp):分析纯,生工生物(上海)工程有限公司;

异丙基硫代半乳糖苷(IPTG):分析纯,阿拉丁生化(上海)科技有限公司;

普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒:天根生化(上海)科技有限公司;

分子级胰蛋白酶和酵母粉:英国 Oxoid 公司;

蛋白分子量标准品、蛋白质凝胶电泳试剂盒:碧云天(上海)生物科技有限公司;

其它试剂:分析纯,国药集团(上海)化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基:胰蛋白酶 10.0 g/L、酵母粉 5.0 g/L、NaCl 10.0 g/L;

TB 培养基:甘油 5.0 g/L、胰蛋白酶 12.0 g/L、酵母粉 24.0 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43 g/L、 KH_2PO_4 2.35 g/L;

3 L 罐发酵培养基:工业级蛋白胨 1.2 g/L、工业级酵母粉 2.4 g/L、甘油 8.0 g/L、 KH_2PO_4 13.5 g/L、 $(NH_4)_2HPO_4$ 4.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.4 g/L、柠檬酸 1.7 g/L、微量元素液 10 mL,用氨水(氢氧化铵)调 pH 7.0;

3 L 罐补料培养基:工业级蛋白胨 2.4 g/L、工业级酵母粉 4.8 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 18.35 g/L、甘油 600.0 g/L;

微量元素液: $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 2.0 g/L、 $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.75 g/L、 H_3BO_3 0.5 g/L、 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 24.0 g/L、 Na_2MoO_4 3.0 g/L、 $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 3.0 g/L、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 大肠杆菌表达质粒的构建

设计带有酶切位点 *Nco* I

和 *Hind* III 的引物,使用 PCR 仪扩增特异腐质霉角质酶对 pET20b(+)载体使用 *Nco* I、*Hind* III 双酶切,CIAP 处理防止载体自连,胶回收后获得线性化的载体。在 T4 ligase 体系下将基因同载体连接过夜,转化 JM109 感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选,获得阳性转化子。对获得的转化子提质粒,经 *Nco* I、*Hind* III 双酶切验证正确,即质粒 pET20b(+)/HIC。质粒由生工生物工程(上海)有限公司测序。将验证正确的质粒 pET20b(+)/HIC 转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选和 LB/AMP 培养基培养后,使用浓度为 15% 的甘油管保藏菌种,于 -80 °C 冷冻保藏。

1.2.2 重组菌诱导表达 取保藏的特异腐质霉角质酶重组菌接种于 LB/AMP 培养基中,37 °C、150 r/min 震荡培养 8 h 后,转接至 TB 培养基中,接种体积分数 5%;37 °C、150 r/min 培养至 OD_{600} 约为 1.5 时,加入终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG,于 25 °C、150 r/min 条件下培养 24 h 左右,直至发酵液中的角质酶酶活不再增高。

1.2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 洗净并组装制胶装置,用水检漏,确保装置不漏水。依据试剂盒配方配置分离胶,混匀后加入到装置内,用水液封。于 37 °C 烘箱静置 30 min,待分离胶凝固后用滤纸除去装置中残留的水。配置浓缩胶,加入到槽内,插入梳子,室温下等待浓缩胶凝固。取 1 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μ L 和 5 μ L 的上样缓冲液混匀,沸水浴 10 min,上样 8 μ L。设置电泳仪电压 300 V,电流 60 mA,运行 20 min 左右,当蓝色条带到达凝胶底部时停止。轻轻地将凝胶与制胶板分开,剥下的胶用考马斯亮蓝染液染色 45 min 左右。按照水、乙醇、冰乙酸 16:1:3 的比例配置脱色液,用于蛋白胶脱色,约 12~20 h 可脱色完全。

1.2.4 酶活力测定方法 ρ NPB 水解酶活性:在 37 °C 下,使用连续分光光度法测定酶活力。反应总体积为 1.5 mL,包括 30 μ L 50 mmol/L 对硝基苯丁酸酯(ρ NPB)的底物,30 μ L 酶液,和 1 440 μ L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)。在 405 nm 波长下,记录对硝基酚的增长速率,反应时间 1 min。酶活定义:37 °C 下,每分钟将对硝基苯丁酸酯(ρ NPB)催化水解生成 1 μ mol 对硝基酚的酶量,即为一个酶活力单位(U)。

1.2.5 重组菌最适温度及最适 pH 测定

(1) 最适温度:分别在不同温度条件下测定同等量的角质酶活力,最高酶活力定义为 100%,计算不同温度条件下的相对酶活,探究最适温度。

(2) 最适 pH:在不同 pH 条件下(pH 5.0~10.0)测定等量酶液的酶活,定义最高酶活为 100%,计算不同条件下角质酶的相对酶活,探究最适 pH。

(3) 缓冲体系为: Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲体系(5.0~7.0)、Tris-HCl 缓冲体系(pH 7.0~9.0)和 Gly-NaOH 缓冲体系(pH 9.0~10.0)。

1.2.6 重组菌温度稳定性及 pH 稳定性测定

(1) 温度稳定性:取同等量的酶液,分别置于 60,80 °C 的水浴锅中保温处理,60 °C 样品间隔 120 min 取样一次,

80 ℃ 样品间隔 5 min 取样一次,测定样品酶活力。定义 0 h 样品的酶活为最高酶活 100%,计算角质酶残留酶活在不同温度下随时间的变化情况,探究该酶的温度稳定性。

(2) pH 稳定性:取不同 pH 值(pH 5.0~10.0)条件下的酶液,于室温静置 48 h,取等量酶液测定酶活,最高酶活定义为 100%,计算不同 pH 条件下的角质酶残留酶活变化情况,探究角质酶的 pH 稳定性。缓冲体系同 1.2.5(3)。

1.2.7 3 L 发酵罐扩大培养 将保藏的甘油管,以 2% 的接种体积分数转接至 50 mL 工业级 LB 培养基中,并添加终浓度为 0.1 g/L 的氨苄青霉素,37 ℃、200 r/min 培养 8 h。取上述种子以 10% 的接种体积分数,转接至 3 L NBS BioFlo-115 型发酵罐中,起始装液量为 1 L(包括 900 mL 的 3 L 罐发酵培养基和 100 mL 种子)。维持生长温度 37 ℃、溶氧 30%,通过补加氨水的方式维持 pH 7.0。培养 5~7 h 后,上罐培养基中的碳源耗尽,溶氧反弹。此后以指数流加的方式向发酵罐中加入补料培养基至发酵结束,比生长速率控制在 $\mu=0.18\text{ h}^{-1}$ 。补料阶段 6~8 h,在菌体生长至特定 OD 后进入乳糖诱导阶段,恒速流加 0.2 g/(L·h) 的乳糖溶液,诱导时间、诱导温度由对应的发酵策略决定。诱导后,间隔一定时间取样,测定样品的菌浓(OD_{600})和酶活,当酶活出现显著下降趋势后结束发酵。

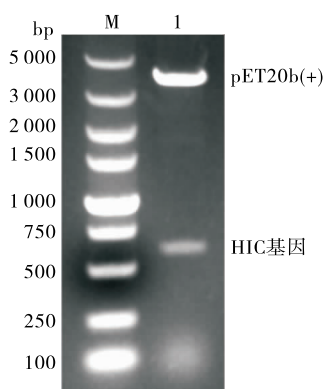
2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建

设计带有酶切位点 *Nco* I 和 *Hind* III 的引物,使用 PCR 仪克隆并扩增目的基因 *HIC*。同 pET20b(+) 载体连接后,转入 JM109 感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选,获得阳性转化子。对获得的转化子提质粒,*Nco* I、*Hind* III 双酶切验证,结果见图 1。从图 1 可知,600 bp 处出现目的条带,与 *H. insolens* 角质酶基因的理论大小相符,重组质粒 pET20b(+)/*HIC* 构建完成。

2.2 重组角质酶在大肠杆菌中的表达

将构建完成的重组质粒 pET20b(+)/*HIC* 转入 BL21

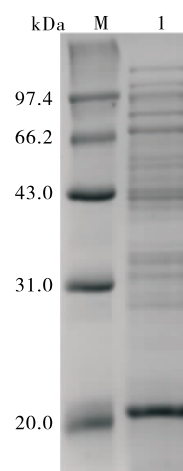


M. DNA Marker 1. 质粒 pET20b(+)/*HIC* 经 *Nco* I/*Hind* III 双酶切后的条带

图 1 重组质粒 pET20b(+)/*HIC* *Nco* I、*Hind* III 双酶切电泳图

Figure 1 Restriction enzyme digestion analysis of pET20b(+)/*HIC*

(DE3)感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选,获得阳性转化子。将转化子转接至摇瓶中,依据 1.2.2 所述方法进行诱导表达,24 h 酶活达到最大值,此后保持稳定,据此结束发酵。发酵液中的胞外酶活为 170 U/mL、胞内酶活 <1 U/mL,总酶活 170 U/mL。发酵上清液的蛋白电泳图见图 2。从图 2 可知,20 kDa 处有明显的条带,与 *HIC* 的理论相对分子质量一致,表明 *H. insolens* 来源的角质酶基因 *HIC* 已在大肠杆菌中正确表达。



M. 蛋白质分子量标准(高) 1. *H. insolens* 角质酶重组菌发酵培养基上清液组分

图 2 重组菌摇瓶发酵胞外上清液 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of culture supernatant of recombinant strains

2.3 重组角质酶的酶学性质

2.3.1 最适 pH 和 pH 稳定性 从图 3(a)可知,伴随 pH 值的改变,重组角质酶酶活出现明显变化,pH 处于 5.0~8.5 时,相对酶活逐渐上升;pH 处于 8.5~10.0 时,相对酶活逐渐降低;说明重组酶最适 pH 值为 8.5。从图 3(b)可知,pH 5.0~10.0 时,放置 48 h 酶活几乎无变化。

2.3.2 最适温度和温度稳定性 从图 4(a)可知,30~80 ℃ 时,相对酶活呈逐渐上升趋势;80~85 ℃ 时,相对酶活逐渐下降,说明重组酶的最适反应温度为 80 ℃。从图 4(b)、(c)可知,重组角质酶 80 ℃ 条件下的温度半衰期为 11 min,60 ℃ 条件下温度半衰期为 14 h。

2.4 重组角质酶在 3 L 发酵罐中的发酵优化

2.4.1 诱导时间对高密度发酵的影响 重组菌于 3 L 罐发酵过程中,诱导时间会显著地影响到菌体浓度和异源蛋白的表达量。诱导时间过早,会对宿主菌的生长造成负担,降低细胞生长速率,影响到异源蛋白的正常表达。诱导时间过晚,会导致诱导强度不足,最终影响到蛋白表达量^[12]。为探求最佳的诱导时间,获得最高的重组角质酶蛋白表达量,本研究中统一控制发酵罐诱导温度为 30 ℃、乳糖浓度为 0.2 g/(L·h),分别在菌浓 OD_{600} 为 30,40,50,65 时开始恒速流加乳糖溶液,测定各诱导阶段的菌体生长情况和蛋白表达情况,结果见图 5。

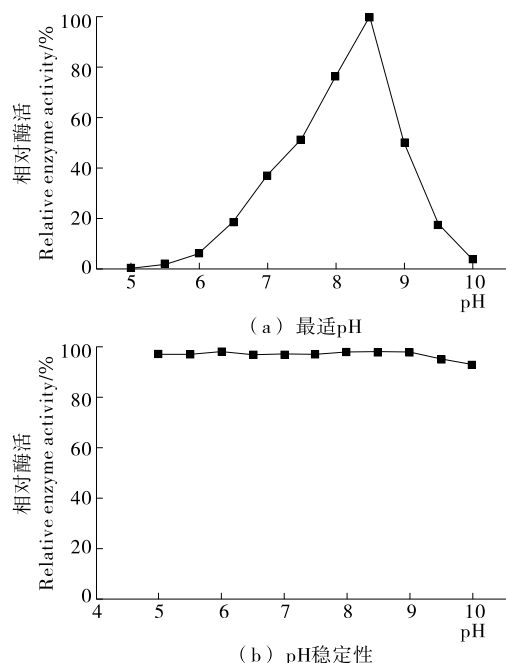


图3 重组角质酶的最适 pH 和 pH 稳定性

Figure 3 Optimum pH and pH stability of recombinant cutinase

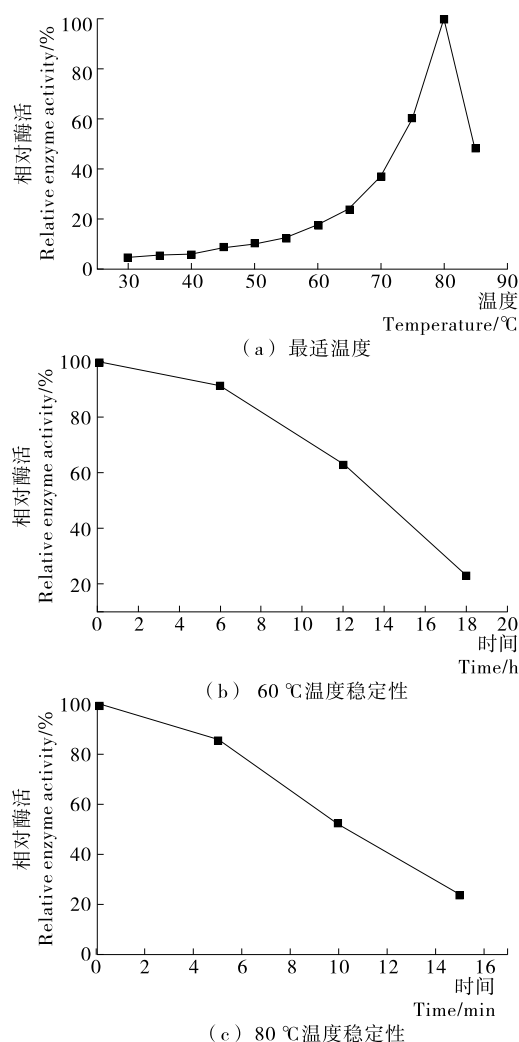


图4 重组角质酶的最适温度和温度稳定性

Figure 4 Optimum temperature and thermostability of HIC

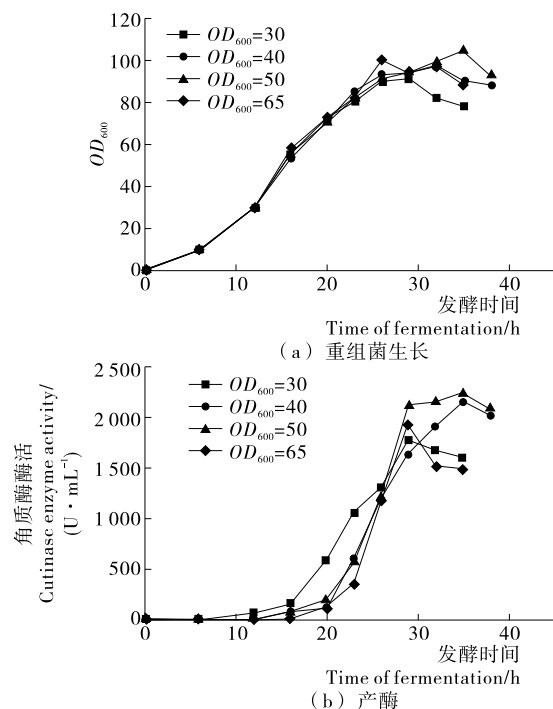


图5 诱导时间对重组菌生长和产酶的影响

Figure 5 Effect of induced time on OD_{600} and cutinase production of recombinant bacteria

从图5可知,当菌体浓度 OD_{600} 为30时开始乳糖诱导,菌体生长和蛋白表达受到显著影响,最终导致重组菌于 OD_{600} 为82时即停止生长,其最高酶活仅为1766 U/mL;当菌体浓度 OD_{600} 为40时开始乳糖诱导,菌体最终生物量 (OD_{600}) 和蛋白表达情况亦受到一定影响,重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-HIC 的最高酶活为2150 U/mL;当菌体浓度 OD_{600} 为50时开始乳糖诱导,菌体生长状况良好,蛋白正常表达,重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-HIC 的最高酶活为2233 U/mL;当菌体浓度 OD_{600} 为65时开始乳糖诱导, OD_{600} 为100后菌体生物量达到最高,此后逐渐下降,重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-HIC 的最高酶活为1934 U/mL。 OD_{600} 为50时诱导的菌体生长及蛋白表达情况均优于 OD_{600} 为30,40,65时诱导的,故本研究认为 OD_{600} 为50时进行诱导为最佳诱导时间。

2.4.2 诱导温度对高密度发酵的影响 诱导温度是影响菌体生长和重组蛋白产量的因素之一。温度较低时菌体生长速率降低,菌体浓度低,进而影响重组蛋白的表达;温度过高,细胞内多肽链合成速度加快,当合成速率大于折叠速率后,会造成多肽链聚集而无法正确折叠,最终以不溶性包涵体的形式沉积。故选择最合适的诱导温度,对提高重组菌株在3 L发酵罐中的产酶量有重要意义。

依据2.4.1的试验结果,当菌体浓度 OD_{600} 达到50后进入诱导阶段,此时分别选择3种不同的温度(25,30,35℃),统一恒速流加[0.2 g/(L·h)]乳糖溶液进行诱导,以测定不同诱导温度对重组蛋白表达的影响,结果见图6。从图6可知,当诱导温度为25℃时,菌体生长缓慢,菌体生物量 OD_{600} 为84时即停止生长,蛋白表达亦受到抑制,重组菌 *E. coli*

BL21(DE3)/pET20b(+)-HIC 最高酶活为 1 565 U/mL,为 3 种温度下的最低值。当诱导温度为 30 °C 时,菌体生物量 OD_{600} 最高为 104,重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-HIC 最高酶活为 2 233 U/mL。当诱导温度为 35 °C 时,菌体生长情况最好,菌体生物量 OD_{600} 最高达到 114,但是重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-HIC 最高酶活仅为 1 772 U/mL,明显低于 30 °C 时的,其原因可能是过高的温度和过快的菌体生长速度,导致蛋白不正常折叠形成大量没有活性的包涵体,故认为 30 °C 为最佳诱导温度。

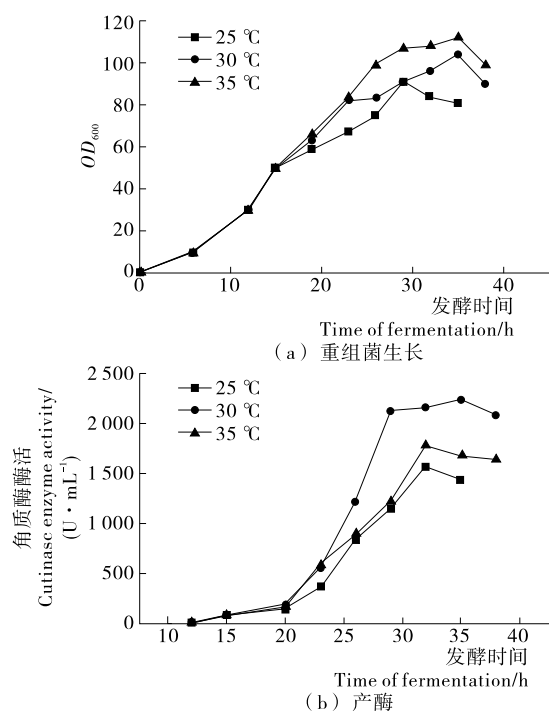


图 6 诱导温度对重组菌生长和产酶的影响

Figure 6 Effect of induced temperature on OD_{600} and cutinase production of recombinant bacteria

3 结论

角质酶可有效降解棉纤维表层角质,增强纤维润湿性,在纺织工业中有很好的应用前景。但是,工业中处理棉纤维的常用方法,均需在高温环境下进行才能保证处理效果。而目前已报到的角质酶基因来源,催化温度偏低,在实际使用时需多次改变温度、工艺复杂,工业化应用受到了明显的限制。本试验为解决上述问题,尝试在 *E.coli* 中重组表达了 *H.insolens* 来源的角质酶基因,重组后的角质酶最适温度高达 80 °C,在高温应用环境下可保持一段时间的稳定。进一步将重组酶在 3 L 罐中进行发酵优化,确定了重组酶的最佳诱导温度为 30 °C,菌体浓度 OD_{600} 为 50 时进行诱导为最佳诱导时间,获得的最高酶活可达 2 233 U/mL。本研究可为角质酶在棉织物精练工业中的应用提供新的研究思路,而且简化工艺流程、降低生产成本。

但由于本试验在 3 L 罐中的发酵罐数较少,存在优化不彻底的问题,重组酶的表达仍处于较低水平。因此,在后续研究中,应围绕诱导强度和重组蛋白表达量之间的关系进一

步优化发酵工艺。其次,在优化过程中,还应考虑到该角质酶具有磷脂水解活性的特点,在重组菌发酵过程中可能会对宿主细胞膜造成损伤,因而发酵过程中平衡诱导强度、菌体浓度及蛋白表达量之间的关系也是十分关键的。如果能很好地解决上述问题,获得更好的蛋白表达及更短的发酵周期,将会对降低角质酶生产成本有重要的意义。

参考文献

- [1] CHEN Sheng, TONG Xing, WOODARD R W, et al. Identification and characterization of bacterial cutinase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(38): 25 854-25 862.
- [2] 李江华, 刘龙, 陈晟, 等. 角质酶的研究进展[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1 829-1 837.
- [3] FETT W F, GÉRARD H C, MOREAU R A. Cutinase production by *Streptomyces spp* [J]. Curr Microbiol, 1992, 25(3): 165-171.
- [4] JOHAN S. Laundry detergent and/or fabric care compositions comprising a modified transferase: US, 6410498 [P]. 2002-06-25.
- [5] CHEN Sheng, SU Ling-qia, CHEN Jian, et al. Cutinase: characteristics, preparation, and application[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1 754-1 767.
- [6] LOOMER S, ADLERCREUTZ P, MATTIASSON B. Triglyceride interesterification by lipases 1: Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil[J]. J Am Oil Chem Soc, 1990, 67: 519-524.
- [7] KOLATTUKKUDY P E P R E, MAITI I B. Cutinases from fungi and pollen[J]. Methods Enzymol, 1981, 71(81): 652-664.
- [8] MANDY A M A H, WOLFGANG Z. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(1): 681-685.
- [9] LI Dong, ASHBY A M, JOHNSTONE K. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oil seed rape [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2003, 16(6): 545-552.
- [10] SEBASTIAN J C A K, KOLATTUKKUDY P E. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas sp.* cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium sp.* in the phyllosphere[J]. J Bacteriol, 1987, 169(1): 131-136.
- [11] CORREA A, OPPEZZO P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: advantages of high-throughput screening[J]. Biotechnol J., 2011, 6(6): 715-730.
- [12] 姜琪, 宿玲恰, 吴敬, 等. 共表达磷脂酶 C 促进葡萄糖异构酶在大肠杆菌中的胞外表达[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(3): 236-242.