

热点专题综述

**李寅** 博士、研究员、博士生导师。《生物工程学报》第三、四届副主编。2006年入选中国科学院“百人计划”，主要从事工业微生物分子生理学和系统生物技术研究。任中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室主任，中国科学院国际化战略专家咨询委员会委员，中国科学院-发展中国家科学院生物技术卓越中心主任，*Biotechnology Journal* 等5种国际期刊编委。



## 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势

朱泰承, 李寅

中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

朱泰承, 李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势. 生物工程学报, 2015, 31(6): 929-938.

Zhu TC, Li Y. Recent development of *Pichia pastoris* system: current status and future perspective. Chin J Biotech, 2015, 31(6): 929-938.

**摘要:** 毕赤酵母经过 20 多年的发展, 在实验室和工业规模都取得了广泛的应用。文中从工业技术应用的角  
度, 综述了近年来毕赤酵母在蛋白表达、遗传操作方法以及化学品生产方面取得的成果, 同时对毕赤酵母系统  
存在的问题以及未来的研究方向进行了分析和展望。

**关键词:** 毕赤酵母, 拷贝数, 蛋白分泌表达, 化学品生产, 分泌工程, 合成生物学

## Recent development of *Pichia pastoris* system: current status and future perspective

Taicheng Zhu, and Yin Li

CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** With more than 20 years of development, *Pichia pastoris* system has been extensively used both on a lab and

**Received:** April 16, 2015; **Accepted:** June 8, 2015

**Supported by:** Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 5132024).

**Corresponding author:** Yin Li. Tel/Fax: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

北京市自然科学基金 (No. 5132024) 资助。

industrial scale. This review outlines the progress made on *P. pastoris* from aspects of protein expression, molecular engineering tools and methods, and biochemical production. This review also provides perspectives on the current challenges and future directions of this important system.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, copy number, secretory expression, biochemicals, secretion pathway engineering, synthetic biology

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 目前已是仅次于大肠杆菌的最常用蛋白表达系统, 广泛应用于实验室规模的蛋白质制备、表征以及结构解析等方面, 已有上千种蛋白在毕赤酵母系统中得到成功地表达。近些年, 毕赤酵母被美国 FDA 认定为 GRAS (Generally recognized as safe) 微生物, 为其在食品和医药上的应用铺平了道路。在医药蛋白领域, 已有胰岛素、乙肝表面抗原、人血清白蛋白、表皮生长因子等多种蛋白使用毕赤酵母表达实现商品化制备<sup>[1]</sup>。在工业酶制剂领域, 也有许多酶制剂包括植酸酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶等利用毕赤酵母实现了产业化规模的生产<sup>[2]</sup>。关于毕赤酵母表达系统的基本元素、优势特点以及生理特性等, 之前已有很多综述进行过系统的阐述<sup>[3-6]</sup>, 本文不再赘述。本文旨在从工业技术应用的角度综述毕赤酵母近些年取得的进展, 同时就毕赤酵母系统存在的问题以及未来的研究方向进行分析和展望。

## 1 毕赤酵母系统的进展

### 1.1 蛋白质表达方面的进展

回顾毕赤酵母表达系统 20 多年的发展, 从总体上决定毕赤酵母蛋白表达水平的因素主要有两个: 1) 基因剂量, 即外源基因的拷贝数; 2) 蛋白质的分泌。毕赤酵母系统开发前期, 集中解决的是基因剂量的问题, 近 10 年研究的热点是蛋白分泌的问题。以下将就这两方面进行

简要的阐述。

#### 1.1.1 基因剂量

与大肠杆菌和酿酒酵母等宿主不同, 毕赤酵母自身没有稳定存在的游离型载体, 所有的表达载体都要整合到酵母的基因组上。虽然有  $P_{AOX1}$ 、 $P_{GAP}$  等强启动子, 但由于整体上拷贝数较低, 外源表达量不足。因此, 早期的研究为了提高蛋白表达水平, 主要是通过构建和筛选载体发生多次整合的多拷贝菌株来提高外源蛋白的产量。为了得到多拷贝菌株, 人们设计了体外法和体内法两种策略<sup>[7]</sup>。体外法是在体外构建多拷贝载体, 再将其转化至酵母宿主中。该方法优点是多拷贝转化子筛选到的几率较高, 但缺点是分子克隆工作量大, 由于载体大小的限制, 一般最多可获得 6-8 个拷贝的载体。体内法是通过在载体上加入抗生素标记, 如 Zeocin、G418 抗性基因等, 将载体转化入宿主之后, 可以通过提高培养基中抗生素浓度筛选多次整合的多拷贝转化子。该方法的优点是构建较为简单, 缺点是筛选工作量较大、假阳性比率较高、拷贝数鉴定较为麻烦。

近些年, 筛选多拷贝数转化子的方法不断得到改进。例如, Sunga 等报道了 PTVA (Post-transformational vector amplification) 的方法<sup>[8]</sup>, 发现可以通过将低拷贝菌株不断在抗性平板上反复传代促使载体在体内的多次重组, 从而显著降低了筛选的工作量, 提高了筛选到多

拷贝转化子的几率。在此基础上, Marx 等<sup>[9]</sup>使用 rDNA 作为载体整合位点 (替代常用的 *HIS4*、*AOX1*、*GAPDH* 基因位点), 由于 rDNA 在毕赤酵母基因组中高度重复 (150 个拷贝左右), 因此大幅提高了表达载体的整合效率。Zhu 等<sup>[10]</sup>报道了将体内法和体外法相结合的策略, 从而显著增加了筛选到多拷贝菌株的效率, 并建立了基于荧光定量 PCR 的准确鉴定拷贝数的方法。由此筛选到了高达 52 拷贝的转化子。总之, 由于近些年拷贝数构建策略的进步和荧光定量 PCR 方法的普及, 基因剂量已基本不再是毕赤酵母蛋白表达的限制性的瓶颈。

但与此同时应当注意到, 外源基因剂量过高也会引起一系列的生理问题。首先, 外源基因不稳定性增加。过去一般认为与游离状态相比载体整合到染色体中是很稳定的。但无论是体内法还是体外法, 所有的载体都是整合在相邻近的位点, 研究表明这种方式是不稳定的, 在一定条件下可能通过同源重组而丢失<sup>[11]</sup>。其次, 折叠胁迫对于生理造成不利影响。前人研究发现高拷贝重组菌株的生长速率、存活率都有降低的现象<sup>[10,12]</sup>。通常认为蛋白质过量表达会消耗宿主细胞的碳源和能源, 因此会给宿主带来代谢负担。但是对于毕赤酵母来说, 分泌表达蛋白的量通常不超过胞内总蛋白的 5%。因此, 很难仅用代谢负担来解释蛋白表达对于酵母的生理影响。近些年研究发现, 蛋白分泌表达会消耗内质网中大量的蛋白伴侣, 干扰细胞自身蛋白的正确折叠, 这种现状统称为折叠胁迫<sup>[13]</sup>。折叠胁迫会改变细胞的正常代谢, 降低细胞的抗逆性, 甚至造成细胞的死亡<sup>[14]</sup>。因此, 在实际应用和生产上, 高拷贝菌株对于细胞生

理的影响不应被忽视, 必要时应当对于培养工艺进行相应的调整。

### 1.1.2 蛋白质分泌

人们在研究拷贝数时, 发现拷贝数提高到一定程度, 蛋白表达量并不是线性增加的, 甚至有可能不变或降低。许多研究发现, 当将这些宿主细胞破碎后, 有相当大比例的新合成蛋白积累在细胞内无法分泌出来<sup>[15]</sup>。因此, 研究者逐渐意识到蛋白表达在分泌步骤上很易受到限制。

与基因剂量问题不同, 分泌问题是一个表达系统分泌表达的共性问题, 不仅限于毕赤酵母系统, 而且分泌问题比拷贝数问题复杂的多, 分泌过程包括蛋白的折叠、修饰、运输、修复以及降解等多个步骤<sup>[16]</sup>, 涉及基因多达上千个<sup>[17]</sup>。当外源蛋白过量表达时, 大量新合成的多肽需要折叠和修饰, 这就会占用大量宿主细胞分泌途径中的蛋白伴侣等辅助因子, 使得细胞对于外源蛋白的加工能力很快趋于饱和, 结果有相当比例的重组蛋白因缺乏足够的伴侣因子而无法折叠成正确构象, 这些未折叠或错误折叠的蛋白将无法通过细胞自身的蛋白质质检系统, 因而或被保留在内质网中继续折叠, 或被运转到细胞质中降解<sup>[13,18]</sup>。为了解决分泌的限制, 提高蛋白质的分泌表达水平, 前人进行了大量的研究和尝试, 主要工作可分为理性改造和反向工程两个思路。

1) 分泌途径的理性改造。即基于既有的认识和经验, 对一些目前认为在分泌途径中可能起限制性作用的分泌因子基因进行过表达或敲除。改造目标基因可分为 3 大类: ①在内质网中的蛋白折叠相关基因, 如 BiP (Hsp70 类伴侣

蛋白, 辅助分泌蛋白折叠的重要因子)、Pdi (负责二硫键形成) 等蛋白伴侣因子。过表达 BiP 因子, 使得酿酒酵母 *Saccharomyce cerevisiae* 中表达 Hirudin 提高了 2.5 倍<sup>[19]</sup>。Pdi 的过表达使得抗体蛋白 2F5 Fab 在 *P. pastoris* 的表达水平提高了 2 倍<sup>[20]</sup>。②蛋白转位和转运相关的基因。如 Ruohonen 等<sup>[21]</sup>报道了在酿酒酵母中过表达 Sso1p 和 Sso2p 因子 (与高尔基体-细胞膜转运囊泡定位和融合有关), 使得淀粉酶表达量分别提高了 4 倍和 6 倍; Zhang 等<sup>[22]</sup>在用 *P. pastoris* 表达 GCSF 蛋白时, 分别过表达了与蛋白转运相关的 3 个因子 (Sec63、Ydj、Ssa1p), 结果发现这些因子对于 GCSF 的表达有 2.8、3.6 和 6.8 倍不等的提高。③与蛋白降解或降解途径相关的基因。这些基因改造时主要通过敲除这些基因来提高蛋白的分泌表达量。如 *PEP4* (编码蛋白酶 PrA) 和 *PRB1* (编码蛋白酶 PrB) 基因的缺失酵母菌株很早就用于蛋白表达。将 Vps10 (液泡降解途径的重要分选蛋白) 进行敲除, 可使得粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中的重组人生长激素产量提高约 2 倍<sup>[23]</sup>。

这些工作虽然取得了一定程度的成功, 但存在的很多问题仍未能解决, 主要表现在以下几个方面: 首先, 与分泌相关的基因有上千个之多, 限于目前对蛋白分泌的认识, 如何从中识别出有效的改造靶点存在较大的问题。其次, 由于蛋白伴侣具有特异性, 即对于不同的外源蛋白, 限制其表达的分泌因子也不相同, 这使得成功案例的借鉴价值也有限。如 Pdi 的过表达并不能使得 A33scFv 抗体蛋白在 *P. pastoris* 中的产量提高<sup>[24]</sup>, BiP 的过表达无法提高 *P. pastoris* 中甘露聚糖酶的表达量<sup>[25]</sup>, 甚至使得葡萄糖氧化酶在汉逊酵母 *Hansenula polymorpha* 的产量

降低了 10 倍<sup>[26]</sup>。

2) 分泌途径的反向工程改造。为了克服理性改造中遇到的问题, 近年来人们也开始使用反向工程的策略进行分泌途径的改造。总体思路是利用组学手段比较蛋白过表达菌株与对照菌株, 识别出显著上调的基因, 这些基因即是改造的潜在靶点。转录水平上, Gasser 等<sup>[27]</sup>利用比较转录组识别出 *CUP5*、*SSA4*、*BMH2*、*KIN2* 等之前未报道的蛋白伴侣基因, 这些基因的过表达对于 2F5 Fab 抗体在 *P. pastoris* 中的分泌有显著促进作用。同一个研究组的 Stadlmayr 等<sup>[28]</sup>建立了毕赤酵母的过表达 cDNA 文库, 结合高通量分析手段和转录组分析, 成功地筛选到了 3 个新蛋白伴侣因子。蛋白质水平上, Huangfu 等<sup>[29]</sup>通过比较蛋白组分析识别出 6 个显著上调的基因, 其中 *TPX*、*FBA* 和 *PGAM* 基因的共表达使得报告基因表达量提高了 2.46、1.58 和 1.33 倍。Pfeffer 等还报道了利用相互作用组来筛选改造靶点的思路<sup>[30]</sup>。总之, 在目前对于分泌因子和分泌途径的认识都比较有限的情况下, 反向工程的手段使我们能够在表达宿主全基因组范围内挖掘新改造宿主分泌途径的新靶点, 同时能够拓宽和加深我们对于宿主分泌途径的认识。

## 1.2 遗传操作工具和方法的进展

毕赤酵母属于相对较易操作的系统, 但是与大肠杆菌、酿酒酵母等模式宿主相比, 无论是从操作工具还是操作方法上, 仍有较大差距。近些年, 研究者也在这些方面进行了许多工作, 也取得了很大的进展。

### 1.2.1 启动子

启动子是调控基因表达的最重要元件之一,  $P_{AOX1}$  启动子 (诱导型) 和  $P_{GAP}$  启动子 (组成型) 是毕赤酵母外源蛋白表达中最早也最具



代表性的启动子, 随后陆续有各种新的启动子被开发出来<sup>[31-32]</sup>。这些启动子主要有以下几个来源: 1) 将蛋白表达量较高的基因启动子开发成通用启动子, 例如 *TEF1*、*ICL1*、*FLD1*、*DAS*、*PEX8* 等启动子。这类工作多见于毕赤酵母研究的早期, 多是研究毕赤酵母功能基因的副产物。2) 对已知启动子进行理性改造。这部分工作主要集中在  $P_{AOX1}$  启动子上。研究者对  $P_{AOX1}$  启动子的调控模块进行了较为细致的解析<sup>[33-34]</sup>, 在此基础上对其进行了人工设计<sup>[35]</sup>。3) 启动子工程。通过易错 PCR 对启动子引入随机突变, 再结合高通量筛选, 可以得到不同强度的启动子的文库。目前已报道了  $P_{AOX1}$  和  $P_{GAP}$  启动子的文库的构建<sup>[36-37]</sup>。4) 基于转录组分析的筛选。随着毕赤酵母基因组序列的公布<sup>[38]</sup>, 借助转录组分析, 使得启动子元件的开发工作得到很大促进。目前已筛选到了许多颇有应用潜力的新的诱导型和组成型启动子<sup>[39-41]</sup>, 如  $P_{GTH1}$  启动子<sup>[39]</sup>, 其转录水平显著高于  $P_{GAP}$  启动子, 更重要的是其转录水平与葡萄糖浓度负相关, 因此可以通过培养过程中葡萄糖补料工艺的控制实现外源基因的诱导型表达。

### 1.2.2 Marker 回收系统

随着对毕赤酵母菌株改造的深入, 经常需要同时对毕赤酵母多个基因进行改造。毕赤酵母系统已有的抗生素 Marker, 如 Zeocin、G418、Blasticidin 等显然无法满足改造的需求, 因此对于抗生素 Marker 的回收非常必要。Yang 等报道了基于 MazF 反向筛选的回收体系。随后, 基于毕赤酵母的 Cre/loxP 的 Marker 回收系统也得到建立和应用<sup>[42-44]</sup>。

### 1.2.3 重组效率提升

目前已知, 毕赤酵母为代表的非传统酵母

与酿酒酵母相比, 非同源重组 (Non-homologous end joining, NHEJ) 途径要明显强于同源重组 (Homologous recombination, HR) 途径, 因此其基因定向整合的效率很低。对某些“顽固基因”如 *OCHI*<sup>[42]</sup>、*ADE1*<sup>[45]</sup>, 即使使用大于 1 kb 的同源臂, 也几乎很难筛选到双交换基因敲除的菌株。研究者不得不采用两步法等折衷的方法<sup>[42]</sup>, 操作非常繁琐。最近报道显示, 阻断 *KU70* 基因 (NHEJ 途径的关键基因) 的毕赤酵母菌株定向整合效率显著提升<sup>[45]</sup>, 如对 *ADE1* 基因, 150 bp 长度的同源臂也可以保证有 17.5% 的双交换几率。

## 1.3 在化学品研究上的进展

随着合成生物学的兴起, 酵母已成为重要的细胞工厂, 用以生产大宗或精细化学品。已报道的以酿酒酵母为宿主生产的化学品包括从简单的甘油、1,3-丙二醇、乳酸、琥珀酸等到需多步催化合成的聚酮、类固醇、类异戊二烯等化合物。毕赤酵母的中间代谢产物库覆盖了酿酒酵母的 90% 以上<sup>[46]</sup>, 再加上毕赤酵母极易高密度培养特性, 因而毕赤酵母具有相当的化学品高产潜质。目前, 已用毕赤酵母生产的化学品包括 *S*-腺苷甲硫氨酸<sup>[47]</sup>、谷胱甘肽<sup>[48-49]</sup>、木糖醇<sup>[50]</sup>、核黄素<sup>[43]</sup>、番茄红素<sup>[51]</sup>、 $\beta$ -胡萝卜素<sup>[52]</sup>、透明质酸<sup>[53]</sup>、聚酮类化合物<sup>[54]</sup>等。毕赤酵母也被开发为高效的 NADH 再生系统用于全细胞催化, 如将 3-羟基丁酮转化为 2,3-丁二醇<sup>[50]</sup>。

## 2 毕赤酵母系统的发展趋势

### 2.1 毕赤酵母合成生物学

无论是从蛋白质表达还是化学品生产角度, 未来的工作都将涉及对毕赤酵母细胞工厂的深度修饰, 而合成生物学无疑为毕赤酵母的发展提供了重大机遇, 将深刻影响该系统今后

发展的技术路线和应用推广。合成生物学的促进主要表现在以下方面。

### 2.1.1 标准化、模块化的调控元件

以启动子为例, 以上已经综述了这些年在启动子开发领域的进展, 但迄今为止, 毕赤酵母系统最常用、最可靠的启动子依然是  $P_{AOX1}$  和  $P_{GAP}$  启动子。虽然研究者已开发了许多新的启动子并用启动子工程构建了启动子文库, 但是总体上这些新启动子的通用性很少得到评价, 启动子的元件描述得也非常不清楚 (目前仅有  $P_{AOX1}$  启动子的调控模块研究的相对清楚), 这很大程度上限制了这些启动子的应用和改造。未来如果要满足合成生物学的应用, 毕赤酵母调控元件库的扩展和在一定程度的标准化、模块化将是不可或缺的。

### 2.1.2 DNA 克隆和组装技术的应用

毕赤酵母在分泌途径和代谢工程改造上的应用会经常需要多个基因的引入, 目前所使用的单个基因依次整合的策略显然无法满足今后操作的需求。可以预见, 目前在大肠杆菌和酿酒酵母系统中较为常用的, 如 TAR (Transformation associated recombination)<sup>[55]</sup>、Gibson assembly<sup>[56]</sup> 和 SLIC (Sequence and ligation independent cloning)<sup>[57]</sup> 等 DNA 组装技术将会在毕赤酵母系统中取得广泛的应用, 使得其遗传改造效率得到质的提高。

### 2.1.3 基因组规模的改造

对于菌株复杂表型的改造 (如温度耐受性、溶剂耐受性等) 由于涉及多个基因的调节和协调一直是代谢工程的难点, 从基因组规模引入扰动, 对于改造和理解复杂表型具有重要意义<sup>[58]</sup>。对于毕赤酵母系统, 蛋白质分泌涉及上

千个基因, 属于典型的复杂表型。迄今为止, 毕赤酵母系统中基因组规模的改造工作很少。Stadlmayr 等报道了通过构建 cDNA 过表达文库来筛选高分泌菌株<sup>[28]</sup>, 但该策略每个菌株中只有一个基因发生了扰动, 因此无法考察基因之间的协调作用。因此, 诸如 gTME (Global transcription machinery engineering)<sup>[59]</sup>, MAGE (Multiplex automated genome engineering)<sup>[60]</sup>, GREASE (Genome replication engineering assisted continuous evolution)<sup>[61]</sup> 等更加高效的基因组规模的扰动方法, 将为毕赤酵母分泌、耐受性等表型的改造提供重要保障。

## 2.2 分泌工程

克服蛋白的分泌限制, 提高毕赤酵母的分泌表达水平, 依然将是今后毕赤酵母在蛋白质表达方向的研究热点。所谓分泌工程, 是指对表达宿主的分泌途径进行系统的设计和改造, 它与之前的分泌途径改造工作相比应具有以下特点: 1) 对宿主更系统深入的改造。之前的工作基本是考察单个伴侣基因对于宿主的蛋白质分泌表达水平, 而对于分泌途径的系统改造显然需要同时对多个靶点基因进行改造。2) 引入改造的新思路。由于目前细胞分泌途径的认识仍有待加深, 对于分泌途径的改造思路和方法仍需要不断探索。例如, 前人对于分泌途径的改造基本都是从蛋白伴侣的角度来进行的, 而对于分泌途径来说, 除了各种蛋白因子在起作用, 同样重要但却容易被忽视的是脂类的作用。没有相应的脂类合成, 就无法为蛋白加工和运输提供足够的载体和基质, 也就很难有效提高细胞蛋白分泌的通量。前人的一些实验报道也初步显示了脂类在分泌中可能起到的重要作用<sup>[62-63]</sup>。

3) 不仅关注蛋白的“量”，还要关注表达蛋白的“质”。这对于医药蛋白的表达尤为重要，如 Wu 等<sup>[64]</sup>研究发现毕赤酵母表达的干扰素会有相当一部分无法完全生成二硫键，导致干扰素活力显著下降，因此提高表达蛋白的质量和均一性将是一个重要方向。另外，分泌途径的糖基化改造，以实现重组蛋白的人源糖基化也是目前研究的热点，这部分内容已有综述报道<sup>[65]</sup>，本文不再详细讨论。

### 2.3 提高原料利用效率和范围

原料是生物炼制体系中最为核心的问题之一。原料的利用效率（得率和产率问题）是判断一个生物转化过程是否能够实现商品化生产所需考虑的重要问题。另外，葡萄糖是目前生物炼制最为常用的原料，但葡萄糖的成本相对于大宗化学品的生产仍然较高，同时还涉及粮食安全问题。因此葡萄糖的替代原料也一直是研究的热点，目前葡萄糖的替代原料包括五碳糖、合成气、甲醇和二氧化碳等。

随着页岩气开发技术的突破，甲醇的生产成本逐年下降（近几年显著低于葡萄糖），甲醇已越来越被看好是未来生物炼制体系的重要原料之一<sup>[66]</sup>。甲醇利用无疑是毕赤酵母系统的显著特色，故提高甲醇的利用效率将是使用毕赤酵母系统作为细胞工厂生产大宗生物基产品的关键问题。Krainer 等<sup>[67]</sup>报道了甲醛脱氢酶基因（*FLD1*）和二羟丙酮合成酶（*DAS1*）的过表达，可显著提高毕赤酵母的蛋白产率，这表明毕赤酵母对于甲醇的利用效率仍有继续提高的空间。扩大毕赤酵母菌株的底物利用范围，无疑也是增强毕赤酵母系统竞争力的重要路径。Li

等构建了能够有效利用木糖的毕赤酵母<sup>[68]</sup>，为毕赤酵母系统利用木质纤维素原料奠定了基础。

## 3 结论

虽然毕赤酵母表达系统已经有 20 多年的研究，但与大肠杆菌、酿酒酵母等模式系统相比，对毕赤酵母系统的认识仍有待深入，合成生物学层次的改造还有待加强。但毕赤酵母具备其他系统不具备的特点，如甲醇利用、高密度发酵、副产物少等，相信未来随着上述问题的解决，毕赤酵母在生物炼制的细胞工厂中将占有重要的一席之地，应用前景非常广阔。

## REFERENCES

- [1] Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(4): 1043–1048.
- [2] Rabert C, Weinacker D, Pessoa A Jr, et al. Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(2): 351–356.
- [3] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5301–5317.
- [4] Damasceno LM, Huang C Jr, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 31–39.
- [5] Cos O, Ramón R, Montesinos JL, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 17.
- [6] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol*

- Recognit, 2005, 18(2): 119–138.
- [7] Guo MJ, Zhu TC, Zhang M, et al. Influences of methanol utilization phenotype and gene dosage on heterologous protein expression in recombinant *Pichia pastoris*. China Biotechnol, 2007, 27(7): 7–11 (in Chinese).  
郭美锦, 朱泰承, 张明, 等. 重组毕赤酵母甲醇利用表型与基因拷贝数对外源基因表达的影响. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7): 7–11.
- [8] Sunga AJ, Tolstorukov I, Cregg JM. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Res, 2008, 8(6): 870–876.
- [9] Marx H, Mecklenbräuker A, Gasser B, et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. FEMS Yeast Res, 2009, 9(8): 1260–1270.
- [10] Zhu T, Guo M, Tang Z, et al. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. J Appl Microbiol, 2009, 107(3): 954–963.
- [11] Zhu TC, Guo MJ, Sun C, et al. A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. Biotechnol Lett, 2009, 31(5): 679–684.
- [12] Cos O, Serrano A, Montesinos JL, et al. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. J Biotechnol, 2005, 116(4): 321–335.
- [13] Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. Microb Cell Fact, 2008, 7: 11.
- [14] Zhu TC, Guo MJ, Zhuang YP, et al. Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(4): 1127–1135.
- [15] Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. Biotechnol Bioeng, 2006, 93(4): 771–778.
- [16] Idiris A, Tohda H, Kumagai H, et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(2): 403–417.
- [17] Gilchrist A, Au CE, Hiding J, et al. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. Cell, 2006, 127(6): 1265–1281.
- [18] Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell, 2000, 101(3): 249–258.
- [19] Kim MD, Han KC, Kang HA, et al. Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol, 2003, 101(1): 81–87.
- [20] Gasser B, Maurer M, Gach J, et al. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. Biotechnol Bioeng, 2006, 94(2): 353–361.
- [21] Ruohonen L, Toikkanen J, Tieaho V, et al. Enhancement of protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae* by overproduction of Sso protein, a late-acting component of the secretory machinery. Yeast, 1997, 13(4): 337–351.
- [22] Zhang W, Zhao HL, Xue C, et al. Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins. Biotechnol Prog, 2006, 22(4): 1090–1095.
- [23] Idiris A, Tohda H, Sasaki M, et al. Enhanced protein secretion from multiprotease-deficient fission yeast by modification of its vacuolar protein sorting pathway. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(3): 667–677.
- [24] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, et al. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(2): 381–389.
- [25] Zhu TC, Sun HB, Li PF, et al. Constitutive expression of alkaline  $\beta$ -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*. Process Biochem, 2014, 49(12):



- 2025–2029.
- [26] van der Heide M, Hollenberg CP, van der Klei IJ, et al. Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(4): 487–494.
- [27] Gasser B, Sauer M, Maurer M, et al. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(20): 6499–6507.
- [28] Stadlmayr G, Benakovitsch K, Gasser B, et al. Genome-scale analysis of library sorting (GALibSo): isolation of secretion enhancing factors for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(3): 543–555.
- [29] Huangfu J, Qi F, Liu HW, et al. Novel helper factors influencing recombinant protein production in *Pichia pastoris* based on proteomic analysis under simulated microgravity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 653–665.
- [30] Pfeffer M, Maurer M, Stadlmann J, et al. Intracellular interactome of secreted antibody Fab fragment in *Pichia pastoris* reveals its routes of secretion and degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2503–2512.
- [31] Vogl T, Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol*, 2013, 30(4): 385–404.
- [32] Spohner SC, Müller H, Quitmann H, et al. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 2015, 202: 118–134.
- [33] Xuan YJ, Zhou XS, Zhang WW, et al. An upstream activation sequence controls the expression of AOX1 gene in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(8): 1271–1282.
- [34] Kumar NV, Rangarajan PN. The zinc finger proteins Mxr1p and repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase (ROP) have the same DNA binding specificity but regulate methanol metabolism antagonistically in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem*, 2012, 287(41): 34465–34473.
- [35] Vogl T, Ruth C, Pitzer J, et al. Synthetic core promoters for *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(3): 188–191.
- [36] Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(12): e76.
- [37] Qin XL, Qian JC, Yao GF, et al. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(11): 3600–3608.
- [38] De Schutter K, Lin YC, Tiels P, et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(6): 561–566.
- [39] Prielhofer R, Maurer M, Klein J, et al. Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 5.
- [40] Stadlmayr G, Mecklenbräuker A, Rothmüller M, et al. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J Biotechnol*, 2010, 150(4): 519–529.
- [41] Delic M, Mattanovich D, Gasser B. Repressible promoters—a novel tool to generate conditional mutants in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 6.
- [42] Chen Z, Sun HB, Li PF, et al. Enhancement of the gene targeting efficiency of non-conventional yeasts by increasing genetic redundancy. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e57952.
- [43] Marx H, Mattanovich D, Sauer M. Overexpression of the riboflavin biosynthetic pathway in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2008, 7: 23.
- [44] Pan RQ, Zhang J, Shen WL, et al. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette. *FEMS Yeast Res*, 2011, 11(3): 292–298.
- [45] Näätäsaari L, Mistlberger B, Ruth C, et al. Deletion of the *Pichia pastoris* *KU70* homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e39720.
- [46] Carnicer M, Canelas AB, Ten PA, et al. Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*. *Metabolomics*, 2012, 8(2): 284–298.

- [47] Chu J, Qian JC, Zhuang YP, et al. Progress in the research of *S*-adenosyl-L-methionine production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(1): 41–49.
- [48] Ge SL, Zhu TC, Li Y. Expression of bacterial GshF in *Pichia pastoris* for glutathione production. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(15): 5435–5439.
- [49] Fei LW, Wang Y, Chen SX. Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32(6): 729–735.
- [50] Cheng HR, Lv JY, Wang HW, et al. Genetically engineered *Pichia pastoris* yeast for conversion of glucose to xylitol by a single-fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(8): 3539–3552.
- [51] Bhataya A, Schmidt-Dannert C, Lee PC. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochem*, 2009, 44(10): 1095–1102.
- [52] Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Rosa-dos-Santos F, et al. Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2483–2492.
- [53] Jeong E, Shim WY, Kim JH. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J Biotechnol*, 2014, 185: 28–36.
- [54] Gao LM, Cai MH, Shen W, et al. Engineered fungal polyketide biosynthesis in *Pichia pastoris*: a potential excellent host for polyketide production. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 77.
- [55] Gibson DG. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(20): 6984–6990.
- [56] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 343–345.
- [57] Li MZ, Elledge SJ. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol*, 2012, 852: 51–59.
- [58] Santos CNS, Stephanopoulos G. Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(2): 168–176.
- [59] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, 314(5805): 1565–1568.
- [60] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460(7257): 894–898.
- [61] Luan GD, Cai Z, Li Y, et al. Genome replication engineering assisted continuous evolution (GREACE) to improve microbial tolerance for biofuels production. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 137.
- [62] Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, et al. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 141.
- [63] Baumann K, Maurer M, Dragosits M, et al. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(1): 177–183.
- [64] Wu D, Hao YY, Chu J, et al. Inhibition of degradation and aggregation of recombinant human consensus interferon- $\alpha$  mutant expressed in *Pichia pastoris* with complex medium in bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(6): 1063–1071.
- [65] Puxbaum V, Mattanovich D, Gasser B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(7): 2925–2938.
- [66] Schrader J, Schilling M, Holtmann D, et al. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(2): 107–115.
- [67] Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 22.
- [68] Li PF, Sun HB, Chen Z, et al. Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 22.

(本文责编 郝丽芳)