

## 毕赤酵母对甲醇胁迫的响应及其对蛋白表达的影响

韩铭海, 王未鲜, 付相荣, 彭意, 康丽娟, 龚勋, 许存宾 (贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵州贵阳 550000)

**摘要** 醇氧化酶 AOX1 的启动子( $P_{AOX1}$ )被广泛应用于毕赤酵母表达外源蛋白, 甲醇诱导可以使其表现出高效的转录活性, 但甲醇诱导又可使毕赤酵母细胞产生过多的活性氧物质(ROS), 诱发氧化胁迫响应和其他不利的生化生理响应, 从而抑制蛋白的高效表达。综述了毕赤酵母对甲醇胁迫的响应及缓解甲醇胁迫的技术, 并提出了 UPR 与甲醇胁迫响应交互作用机制的研究路线。

**关键词** 毕赤酵母; 甲醇胁迫响应; 氧化胁迫响应; 非折叠蛋白响应

中图分类号 Q 78 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)16-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.16.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Research Progress on the Effect of Methanol Stress Response on Production of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*

HAN Ming-hai, WANG Wei-xian, FU Xiang-rong et al (College of Food and Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang, Guizhou 550000)

**Abstract** The promoter of alcohol oxidase AOX1 ( $P_{AOX1}$ ) is widely used in *Pichia pastoris* to express heterologous proteins. Methanol induction will lead to its high transcriptional activity. However, the induction with methanol gives rise to the abundance of reactive oxygen species (ROS) in *Pichia pastoris* cells, resulting in oxidative stress response and other adverse biochemical and physiological responses. Accordingly, high-efficiency expression of proteins would be inhibited. In this paper, the response of *Pichia pastoris* cells to methanol stress and the technique of alleviating methanol stress are reviewed. The authors look forward to the technical route of studying the mechanism of the interaction between UPR and methanol stress response, and the strategy of stimulating UPR to alleviate methanol stress is also raised.

**Key words** *Pichia pastoris*; Methanol stress response; Oxidative stress response; UPR

毕赤酵母(*Pichia pastoris*, 最新系统命名为 *Komagataella phaffii*)是当今科研和商业化生产重组蛋白最常用、最受欢迎的表达平台之一。毕赤酵母具有良好的生物安全性、易高密度培养、高转录活性的启动子、较强的蛋白合成分泌能力、胞外产物易分离纯化及与更高级真核细胞类似的翻译后修饰等诸多优点<sup>[1-2]</sup>。毕赤酵母相比酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)而言,其表达分泌蛋白的能力更卓越<sup>[1-2]</sup>。蛋白高水平表达技术和策略一直是该领域的研究热点,当前,提高蛋白表达的主要技术有<sup>[3-4]</sup>:一是优化发酵条件,包括培养基优化、诱导策略优化、高密度培养等手段;二是优化分子生物学技术,包括密码子优化、选用强启动子和高效信号肽、增加基因拷贝数等;三是改造蛋白折叠、修饰和分泌途径等。

在发酵过程中,毕赤酵母细胞会受到环境中的各种胁迫,例如代谢产物、不适温度、pH 和离子强度等胁迫,这些胁迫可能会显著影响细胞的生理特性,包括蛋白合成和分泌表达能力,该问题已经受到越来越多的科研工作者的关注。毕赤酵母是甲基营养型酵母,能以甲醇作为唯一碳源和能源,同时,甲醇也是诱导毕赤酵母外源蛋白表达最常用的诱导物,但甲醇本身对宿主也会产生胁迫效应。因此,若要获得甲醇诱导外源蛋白的高水平表达,甲醇胁迫是需要关注的一个问题。

## 1 $P_{AOX1}$ 的甲醇诱导

**1.1  $P_{AOX1}$  的活性** 毕赤酵母外源蛋白表达的启动子主要有醇氧化酶 I (AOX1)、磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)、醇脱氢酶

(ADH3)、甲醛脱氢酶(FLD1)等基因的启动子,其中, AOX1 的启动子( $P_{AOX1}$ )最常使用<sup>[5]</sup>。醇氧化酶包括 AOX1 和 AOX2 两种酶蛋白,毕赤酵母细胞 85% 的醇氧化酶活力来自 AOX1,该酶蛋白催化甲醇转化为甲醛,是甲醇代谢途径中的关键酶;醇氧化酶与氧的亲合力较弱,因此,细胞需要合成大量的此酶蛋白来完成相应的催化功能<sup>[6]</sup>。在细胞利用甲醇生长过程中, $P_{AOX1}$  表现出极强的转录活性, AOX1 占到了胞内蛋白的 30%<sup>[5-6]</sup>。

**1.2 诱导  $P_{AOX1}$  的甲醇浓度**  $P_{AOX1}$  在较低浓度甲醇条件下就可以被高效地诱导。例如,在 0.5% 浓度下,甲醇诱导毕赤酵母表达重组人豆荚蛋白(legumain)<sup>[7]</sup>、胰岛素前体(insulin precursor)<sup>[8]</sup>、耐热葡聚糖酶<sup>[9]</sup>和单链 Fv 抗体片段(single-chain Fv antibody fragment)<sup>[10]</sup> 均能获得理想的表达水平。Vanz 等<sup>[11]</sup> 报道,诱导表达乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen)的甲醇浓度为 0.6%。而 Ohsawa 等<sup>[12]</sup> 报道,0.1% 的甲醇浓度就能诱导  $P_{AOX1}$  表现出极强的转录活性。

虽然大部分文献报道甲醇诱导外源蛋白表达最适浓度范围为 0.5%~2.0%<sup>[1]</sup>,但是也有学者报道,转录组学研究结果表明稍高浓度(10 g/L)的甲醇反而会抑制  $P_{AOX1}$  的转录活性<sup>[12]</sup>。另外,除了  $P_{AOX1}$  以外,毕赤酵母利用甲醇诱导的启动子还有  $P_{DAS}$ 、 $P_{FLD1}$ 、 $P_{PEX8}$  等<sup>[5]</sup>,利用这些启动子表达外源蛋白时,甲醇胁迫的影响同样是必须要关注的问题。

## 2 甲醇胁迫响应

甲醇不仅作用于毕赤酵母的甲醇代谢途径,而且对整个细胞都有影响<sup>[11,13]</sup>。Vanz 等<sup>[11]</sup> 报道在分批培养模式下,毕赤酵母对较低浓度的甲醇(6 g/L)即可产生胁迫响应。基于转录组学研究结果,毕赤酵母甲醇胁迫响应影响多个代谢途径和细胞生理特性<sup>[11,13]</sup>。涂庭勇等<sup>[14]</sup> 也报道了采用“低甲

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31760022);贵州省科技计划项目(黔科合基础[2020]1Y148号);贵州理工学院高层次人才科研启动项目(XJGC20190626)。

**作者简介** 韩铭海(1976—),男,江苏无锡人,副教授,博士,从事毕赤酵母高效蛋白表达技术研究。

**收稿日期** 2022-04-11

醇浓度-高溶解氧浓度”策略诱导毕赤酵母能获得更高目标蛋白表达水平。由此,可以推测甲醇诱导外源蛋白表达的最佳浓度是甲醇诱导作用与甲醇胁迫效应两者平衡的结果。

**2.1 上调甲醇代谢途径** 毕赤酵母中,甲醇在过氧化氢酶体中被醇氧化酶(AOX1和AOX2)转化为甲醛和过氧化氢。甲醛在细胞质中被甲醛脱氢酶(FLD1)催化为甲酸,接着被甲酸脱氢酶转化为二氧化碳和水,并释放能量;或是甲醛在二羟丙酮合成酶(DAS1)作用下与5-磷酸木酮糖合成3-磷酸甘油醛和二羟丙酮,从而进入细胞同化代谢途径。在甲醇诱导阶段,70%~80%的甲醇进入了异代谢途径产生NADH和二氧化碳<sup>[11]</sup>。毕赤酵母甲醇诱导阶段甲醇代谢的关键酶类AOX1、甲酸脱氢酶(FDH1)、FLD1、甲酰谷胱甘肽水解酶(FGH1)和DAS1表达量上调<sup>[11,13]</sup>,说明细胞甲醇代谢途径更活跃。

**2.2 影响糖酵解途径、戊糖磷酸途径和TCA代谢途径** 在甲醇诱导阶段,碳代谢主要集中于甲醇的代谢<sup>[15]</sup>。TPII(磷酸甘油醛异构酶,引导甘油进入碳中心代谢途径)显著下调,糖酵解途径和戊糖磷酸途径酶类普遍下调;除了苹果酸脱氢酶(MDH1)显著下调外,TCA循环中的酶类变化不显著<sup>[11]</sup>。Li等<sup>[15]</sup>研究发现,在甲醇诱导阶段,毕赤酵母能量代谢途径普遍下调。

**2.3 诱发氧化胁迫响应(oxidative stress response)** 毕赤酵母需要提高过氧化物酶水平来抵御甲醇的毒害作用<sup>[16]</sup>。在甲醇代谢途径中,甲醇被AOX1和AOX2催化形成毒性更强的甲醛、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和其他过氧化物及活性氧物质(ROS),导致细胞遭受氧化胁迫(oxidative stress),细胞进而上调一些过氧化物酶类,比如CTA1(去除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和PMP20(去除烷基过氧化物,维护过氧化物酶体膜功能),来抵御氧化胁迫<sup>[11,13,15]</sup>。同时,氧化胁迫响应不仅提高毕赤酵母抵御氧化胁迫能力,也能增强其抗热应激能力<sup>[17-18]</sup>。

**2.4 激活MAPK信号通路** 一些特定的信号通路常常介导细胞对恶劣环境的应答,而这些信号通路大多数情况下与MAPK信号通路关联。毕赤酵母的甲醇诱导上调了MAPK信号通路相关基因的表达。MAPK信号通路与毕赤酵母细胞维持细胞壁的功能相关<sup>[19]</sup>,与细胞生理生化和相关基因调节都有关系<sup>[13]</sup>,影响细胞生长率;上调MAPK信号通路可有效地提高细胞抵御甲醇胁迫的能力,确保细胞的生存<sup>[13]</sup>。另外,对于外源蛋白表达来说,MAPK信号通路也影响P<sub>AOX1</sub>的活性<sup>[13]</sup>。

**2.5 诱发细胞UPR** 内质网对新生肽的合成及折叠效率对蛋白的高效表达至关重要<sup>[20-22]</sup>。在内质网中,新生肽经历极为复杂的折叠加工机制,而细胞严谨的质量控制机制确保了多肽的正确折叠。只有正确折叠的蛋白才能被细胞输送至高尔基体,接受进一步的修饰加工进而完成分泌表达,而非正确折叠多肽被内质网识别并进入ERAD途径,最终在细胞质中被蛋白酶体彻底消化。大量非正确折叠的多肽在内质网中集聚产生内质网胁迫(ER stress),上调细胞宿主未折叠蛋白响应(UPR)通路,以消除大量非正确折叠多肽对细胞的

毒害作用<sup>[20-22]</sup>。

UPR通路虽然与内质网胁迫关系最为密切,但是其他胁迫,比如高温、高渗透压、有机溶剂、DTT、重金属、病毒、营养物质饥饿等<sup>[20]</sup>都会激发此通路。UPR下游靶基因功能涵盖大部分新生肽合成、折叠、翻译后修饰、运输途径和ERAD途径等,对细胞生理特性影响也十分广泛,有些效应并不与蛋白表达有直接的关联。

有些报道虽然表明甲醇胁迫对UPR通路和ERAD途径的影响不显著<sup>[13]</sup>。但Vanz等<sup>[11]</sup>报道甲醇胁迫响应与毕赤酵母UPR通路和ERAD途径相关;PDI与SSC1蛋白(UPR通路关键蛋白)和CLPB与CDC48蛋白(ERAD途径功能蛋白)在甲醇诱导阶段上调了。而Li等<sup>[15]</sup>研究发现甲醇诱导阶段分子伴侣Hsp40上调了,表明激发了UPR;而ERAD途径是下调的。

**2.6 诱发细胞自噬** 在甲醇诱导阶段,细胞出现显著的自噬现象<sup>[11]</sup>;ATG1和其他与自噬相关的蛋白显著上调,而负调控细胞自噬途径的功能蛋白Tap42、Vps8、LCB1/2和Vps39则下调;天门冬酰胺蛋白酶(APR1)下调,标志着细胞液泡降解;与蛋白酶体相关基因表达上调<sup>[13]</sup>;通过电镜观察到液泡由规则球形改变为内陷不规则形态<sup>[11,13]</sup>;过氧化物酶体也呈现破坏并降解的现象<sup>[11,13]</sup>,这也与细胞自噬有关。

### 3 甲醇胁迫响应与UPR通路的交互作用

甲醇胁迫响应与UPR通路对毕赤酵母细胞的多个途径及生理特性都产生广泛的影响,两者之间存在交互作用的可能性。首先,甲醇胁迫导致上调细胞多个功能迥异的通路,包括上调与内质网应激机制相关的UPR通路,以缓解甲醇对细胞的胁迫,例如,甲醇诱导毕赤酵母表达一些外源蛋白上调了内质网中的分子伴侣蛋白,表明激发了UPR通路<sup>[11,13,23]</sup>;其次,UPR与甲醇胁迫响应作用于细胞若干相同的途径,比如两者都作用于糖酵解途径、戊糖磷酸途径和ERAD途径,同样影响蛋白合成、运输和分泌途径等<sup>[11,13,23-24]</sup>;最后,甲醇胁迫也会同时诱发UPR通路和氧化胁迫响应<sup>[11]</sup>,而且在毕赤酵母中激发UPR和缓解氧化胁迫这两种策略都可以促进外源蛋白表达<sup>[18,25]</sup>。在酿酒酵母中已证实了UPR与氧化胁迫响应通路之间存在密切关联性<sup>[26-28]</sup>,在毕赤酵母中可能也会存在类似的情况。因此,毕赤酵母UPR通路与甲醇胁迫响应存在交互作用的可能性,表1列举了介导甲醇胁迫响应与UPR交互作用可能的途径及其功能蛋白<sup>[11,24]</sup>。

### 4 缓解甲醇胁迫的策略及促进蛋白表达作用

低浓度的甲醇诱导即可产生活性氧物质(ROS),从而诱发毕赤酵母氧化胁迫响应,而氧化胁迫与毕赤酵母外源蛋白高水平表达密切相关<sup>[18]</sup>。因而有研究者试图寻求缓解甲醇诱导导致氧化胁迫的策略,并考察对蛋白表达的作用。

**4.1 表达转录因子Yap1p激发氧化胁迫响应** 激发氧化胁迫响应通路转录因子Yap1p(Gene ID:8200866)已经得到了鉴定<sup>[29-30]</sup>,并有学者发表了通过共表达转录因子Yap1p缓解甲醇胁迫促进蛋白表达的研究。例如,Delic等<sup>[31]</sup>报道,过表

达转录因子 Yap1p 促进了毕赤酵母外源重组蛋白的表达,而削弱 Yap1p 功能则导致 ROS 的聚集;转录组学研究表明,表达 Yap1p 影响超过 150 个基因的表达,其中包括了抗氧化酶类或是与氧化-还原生化过程相关的功能蛋白;胞内氧化细胞

内谷胱甘肽(GSSG)水平印证了过表达 Yap1p 能够使细胞维护一定的氧化还原状态;笔者推测调整细胞抗氧化能力以重建细胞适宜的氧化还原状态,能够降低细胞代谢负荷,缓解由蛋白氧化折叠导致的细胞胁迫,由此促进外源蛋白分泌表达。

表 1 介导甲醇胁迫响应与 UPR 交互作用可能的途径及其功能蛋白

Table 1 Pathway and functional proteins involved in crosstalk between methanol stress response and UPR

功能 Function	作用途径 Pathway	功能蛋白 Functional proteins
合成蛋白 Synthetic protein	肽的合成 核糖体合成 翻译起始因子;翻译延伸因子 转录控制蛋白 氨酰-tRNA 合成 糖基化合成	Rpl12Bp、Rpl24Bp、Rpl28Bp、Rpl35Bp、Rps10Ap、Rps20p、Rpl7Bp、Rpl11Ap、Rpl16Ap 等系列蛋白 Tif11p、Sui1p、Sui2p、Tif5p、Tif4p、Ged11p 等系列蛋白 Toa1p、Toa2p、chr2-2_0261 和 chr2-2_0177 Frs1p、Ded81p、Krs1p、Gln4p、Ils1p、Dps1p、Vas1p 和 Ses1p Mnn6p、Swp1p、Wbp1p 和 Sec53p
	肽的折叠 胞质基质分子伴侣 内质网中分子伴侣	Cct3p、Cct4p、Cct5p 和 Cct8p Pdi1p、Pdi2p、Cne1p、Lhs1p、Ssa3p 和 Hsp31p
	蛋白运输 参与形成移位蛋白复合体 分泌途径中囊泡运输	Sec1p 和 Sss1p 形成 COPI 的蛋白 Cop1p、Sec21p、Sec26p;形成 COPII 的蛋白 Sar1p、Sec24p、Sec11p;其他蛋白 Myo2p 和 Arf1p Ubc5p、Hrd3p、Sec61p、ClpB 和 Cdc48
	蛋白降解 ERAD 途径 泛素-蛋白酶体降解途径	Rpt4p、Rpt6p、Rpn1p、Rpn5p、Rpn7p、Cdc53 等 Aox1p、Das1p、Das2p 和 Fld1p
甲醇代谢 Methanol metabolism	甲醇代谢途径 甲醇代谢途径的解毒	Cat1p、Tas1p、Trx1p 和 Pmp20p
能量代谢 Energy metabolism	糖酵解途径 戊糖磷酸途径 三羧酸循环代谢途径 参与内膜电子传递系统	Hxt2p、Pkg2p 和 TPI1 Zwf1p、Sol1p 和 Gnd1p Ide1p、Yel047c、Sdh1p、Fum1p、Mdh1p 和 MDH1 Cox5p、Cox6p、Ppa2p、Atp20p 和 Vma5p
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	氨基酸代谢途径	Leu4p、Ilv5p、Lys1p、Lys2p、Cap2p 和 Arg5p 等
内质网压力 Endoplasmic reticulum pressure	UPR	以 Kar2p、PDI 为代表的内质网分子伴侣蛋白
氧化胁迫 Oxidative stress	氧化胁迫响应	Yap1p 和 Skn7p(该通路转录因子)、Cat1p 和 Pmp20p (消除过氧化物的酶类)以及 Cpr1

4.2 表达抗氧化酶或与氧化还原生化过程相关的蛋白 研究者发现,通过表达抗氧化酶或与氧化还原生化过程相关的蛋白可以有效地提高毕赤酵母抵御氧化胁迫的能力。Li 等<sup>[32]</sup>报道了通过表达铜-锌超氧化物歧化酶(SOD)提高了毕赤酵母对氧化胁迫和热应激的抵御能力;而 Zhang 等<sup>[33]</sup>报道了一种新的来源于耐热真菌(*Chaetomium thermophilum*)的热稳定性超氧化物歧化酶,在毕赤酵母中表达这种酶蛋白提高了宿主抵御来源于氧化试剂百草枯和甲萘醌导致的胁迫;Yang 等<sup>[34]</sup>则报道了表达漆酶提高了毕赤酵母对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导的氧化胁迫的抗性;Zámocký 等<sup>[35]</sup>报道了表达来源于 *Magnaporthe oryzae* 血红色过氧化酶(heme peroxidases)提高了宿主对氧化胁迫的抵御能力。

另外,还有研究者发表了通过共表达一些与氧化还原生化过程相关的功能蛋白缓解甲醇胁迫以促进蛋白表达的研究。Ibrahim 等<sup>[36]</sup>报道了在毕赤酵母 KM71H 中表达的卵铁传递蛋白(ovotransferrin)会出现自我剪切并呈现出类似于超氧化物歧化酶的活性,显著提高了细胞质的还原活性,从而通过表达卵铁传递蛋白提高了宿主抵御由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和顺丁烯二酸二乙酯(DEM)介导的氧化胁迫能力。Tomàs-Gamisans 等<sup>[37]</sup>报道,表达 NADH 激酶(*S. cerevisiae* POS5)提高了

NADPH/NADP<sup>+</sup> 比值,促进了抗体片段(Fab)的表达。Wu 等<sup>[38]</sup>报道,共表达 N-乙酰转移酶(N-acetyltransferase)能够保护细胞在甲醇诱导阶段免遭 ROS 的损伤,细胞生物量提高了 22.7%,目标蛋白 α-葡萄糖苷酶(α-glucosidase)表达水平提高了 21.5%,而且也显著缓解了目标蛋白的降解。

## 5 激发 UPR 缓解甲醇胁迫的研究展望

毕赤酵母是目前外源蛋白表达最受欢迎的宿主之一,提高外源蛋白表达水平的技术和策略一直是该领域研究的重要内容。甲醇诱导 P<sub>AOX1</sub> 是目前最成功、最广泛使用的外源蛋白表达强启动子,甲醇除了诱导作用外,本身对毕赤酵母细胞也造成胁迫效应,更可能影响细胞合成蛋白的各个环节。因此很有必要进一步弄清毕赤酵母对甲醇胁迫的响应,并寻求抵御甲醇胁迫的策略。弄清缓解甲醇胁迫对蛋白表达途径的抑制作用,这将有助于进一步推动毕赤酵母蛋白高效表达技术的发展。除了 P<sub>AOX1</sub> 以外,毕赤酵母甲醇诱导的启动子还有 P<sub>DAS</sub>、P<sub>FLD1</sub>、P<sub>PEX8</sub> 等<sup>[5]</sup>,如果能获得有效缓解甲醇胁迫策略,也将提升这些启动子的使用价值,扩充毕赤酵母外源蛋白表达启动子的选择范围。

另外,UPR 通路作用于蛋白合成、折叠和加工以及运输途径外,也广泛地作用于细胞的其他方面,而毕赤酵母 UPR

通路和甲醇胁迫响应存在交互作用的可能性。因此,笔者提出通过激发毕赤酵母 UPR 缓解甲醇胁迫促进蛋白表达的策略。

Guerfal 等<sup>[39]</sup>首次鉴定了毕赤酵母 UPR 通路的转录因子 Hac1p,而且笔者先前的研究工作也已验证了通过共表达 Hac1p 可有效地激发宿主的 UPR 途径<sup>[40-41]</sup>。根据甲醇胁迫响应与 UPR 通路的作用途径,厘清以下途径和功能有助于阐明 UPR 和甲醇胁迫响应之间的交互作用:① 蛋白合成相关的途径和功能。例如蛋白合成强度,内质网对新生肽合成、折叠和修饰加工的能力,分泌运输蛋白能力,ERAD 途径等。② 甲醇代谢及代谢产物的解毒。考察甲醇代谢途径中关键酶类,分析甲醇代谢途径强度情况,比较甲醇同化代谢与异化代谢调整的情况。考察范围包括催化甲醇转化为甲醛的 AOX1、甲醛同化代谢的关键酶二羧基丙酮酶 DAS1 和 DAS2 及甲醇异化代谢的关键酶乙醛脱氢酶 FLD1;考察甲醇代谢产生的毒害物质的关键解毒酶,比如消除过氧化物的 CTA1 和 PMP20,分析细胞的解毒能力。③ 能量代谢。主要考察糖酵解途径、戊糖磷酸途径、三羧酸循环代谢途径和内膜电子传递系统。④ 氨基酸代谢。主要考察氨基酸合成途径的关键酶类。其次,还需要考察细胞其他生理特性,主要关注氧化胁迫(oxidative stress)、内质网分子伴侣系统、过氧化物酶体、内质网形态、液泡和自噬、生长速率和死亡率。通过考察 UPR 与甲醇胁迫响应作用途径及其功能蛋白,不仅可以进一步完善 UPR 对细胞的作用机制,同时可有望阐明毕赤酵母 UPR 与甲醇胁迫响应交互作用的机制。

## 参考文献

- [1] KARBALAEI M, REZAEI S A, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins [J]. *Journal of cellular physiology*, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [2] BAGHBAN R, FARAJIA S, RAJABIBAZL M, et al. Yeast expression systems: Overview and recent advances [J]. *Molecular biotechnology*, 2019, 61(5): 365-384.
- [3] RASCHMANOVÁ H, WENINGER A, KNEJZLÍK Z, et al. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: Enhancing production of secreted recombinant proteins [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2021, 105(11): 4397-4414.
- [4] SCHRÖDER M. Engineering eukaryotic protein factories [J]. *Biotechnology letters*, 2008, 30(2): 187-196.
- [5] ÖZCELİK A T, YILMAZ S, INAN M. *Pichia pastoris* promoters [J]. *Methods in molecular biology*, 2019, 1923: 97-112.
- [6] VOGL T, GLIEDER A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production [J]. *New biotechnology*, 2013, 30(4): 385-404.
- [7] ZHAO T, LI Z P, GUO Z L, et al. Functional recombinant human Legumin protein expression in *Pichia pastoris* to enable screening for Legumin small molecule inhibitors [J]. *Protein expression and purification*, 2018, 150: 12-16.
- [8] WANG J J, WANG X L, SHI L, et al. Methanol-independent protein expression by *AOX1* promoter with *trans*-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris* [J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 1-12.
- [9] JAIN K K, KUMAR S, BHARDWAJ K N, et al. Functional expression of a thermostable endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK in *Pichia pastoris* X-33 and its characterization [J]. *Molecular biotechnology*, 2018, 60(10): 736-748.
- [10] DAMASCENO L M, PLA I, CHANG H J, et al. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris* [J]. *Protein expression and purification*, 2004, 37(1): 18

- 26.
- [11] VANZ A L, LÜNSDORF H, ADNAN A, et al. Physiological response of the *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: Catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes [J]. *Microbial cell factories*, 2012, 11: 1-11.
- [12] OHSAWA S, YURIMOTO H, SAKAI Y. Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Molecular microbiology*, 2017, 104(2): 349-363.
- [13] ZHANG C B, MA Y, MIAO H B, et al. Transcriptomic analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 during heterologous protein production using a high-cell-density fed-batch cultivation strategy [J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 1-17.
- [14] 涂庭勇, 贾禄强, 孙皎文, 等. “低甲醇浓度-高溶解氧浓度”策略诱导毕赤酵母高效表达 HSA-GCSF<sub>m</sub> 及其转录组学机理分析 [J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(3): 1-8.
- [15] LI T, MA J Y, XU Z H, et al. Transcriptomic analysis of the influence of methanol assimilation on the gene expression in the recombinant *Pichia pastoris* producing Hirudin variant 3 [J]. *Genes*, 2019, 10(8): 1-23.
- [16] LIANG S L, WANG B, PAN L, et al. Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing [J]. *BMC genomics*, 2012, 13: 1-14.
- [17] LIN N X, HE R Z, XU Y, et al. Augmented peroxisomal ROS buffering capacity renders oxidative and thermal stress cross-tolerance in yeast [J]. *Microbial cell factories*, 2021, 20(1): 1-14.
- [18] LIN N X, HE R Z, XU Y, et al. Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology for biofuels*, 2021, 14(1): 1-13.
- [19] COSANO I C, MARTÍN H, FLÁNDEZ M, et al. Pim1, a MAP kinase involved in cell wall integrity in *Pichia pastoris* [J]. *Molecular genetics and genomics*, 2001, 265(4): 604-614.
- [20] KITAMURA M. The unfolded protein response triggered by environmental factors [J]. *Seminars in immunopathology*, 2013, 35(3): 259-275.
- [21] TABARA K, IWATA Y, KOIZUMI N. The unfolded protein response [J]. *Methods in molecular biology*, 2018, 1691: 223-230.
- [22] IDIRIS A, TOHDA H, KUMAGAI H, et al. Engineering of protein secretion in yeast: Strategies and impact on protein production [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 86(2): 403-417.
- [23] RESINA D, BOLLÓK M, KHATRI N K, et al. Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction [J]. *Microbial cell factories*, 2007, 6: 1-11.
- [24] LIN X Q, LIANG S L, HAN S Y, et al. Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals the cellular response to heterologous protein overexpression and the regulation of HAC1 in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of proteomics*, 2013, 91: 58-72.
- [25] YU P, ZHU Q, CHEN K F, et al. Improving the secretory production of the heterologous protein in *Pichia pastoris* by focusing on protein folding [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2015, 175(1): 535-548.
- [26] KIMATA Y, ISHIWATA-KIMATA Y, YAMADA S, et al. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins [J]. *Genes to cells*, 2006, 11(1): 59-69.
- [27] ZHAO W, ZHENG H Z, NIU Y J, et al. CIA2 deficiency results in impaired oxidative stress response and enhanced intracellular basal UPR activity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS microbiology letter*, 2015, 362(6): 1-8.
- [28] ZHAO Y Y, SU R F, LI S Y, et al. Mechanistic analysis of cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* [J/OL]. *FEMS microbiology letter*, 2021, 368(15) [2021-01-15]. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab095>.
- [29] YANO T, TAKIGAMI E, YURIMOTO H, et al. Yap1-regulated glutathione redox system curtails accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris* [J]. *Eukaryotic cell*, 2009, 8(4): 540-549.
- [30] YANO T, YURIMOTO H, SAKAI Y. Activation of the oxidative stress regulator PpYap1 through conserved cysteine residues during methanol metabolism in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2009, 73(6): 1404-1411.
- [31] DELIC M, GRAF A B, KOELLENSPERGER G, et al. Overexpression of the transcription factor Yap1 modifies intracellular redox conditions and enhances recombinant protein secretion [J]. *Microbial cell*, 2014, 1(11): 376-386.

- applied microbiology, 1990, 36(5):295-302.
- [12] 范妙璇,董娇娇,王京辉,等.QuEChERS-超高效液相-三重四极杆串联质谱测定白茅根中 16 种真菌毒素[J].中国中药杂志, 2017, 42(19):3770-3775.
- [13] 邱文倩,林坚,陆秋艳.福建省售薏苡仁常见真菌毒素污染状况研究[J].海峡预防医学杂志, 2019, 25(6):8-12.
- [14] 申红红,杨美华,欧阳臻.高效液相色谱-二极管阵列检测器同时测定中药中玉米赤霉烯酮和 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇[J].中华中医药杂志, 2012, 27(5):1261-1265.
- [15] 毛丹,许勇,郑荣,等.中药中玉米赤霉烯酮的残留测定[J].齐鲁药事, 2012, 31(7):392-394.
- [16] 张晓飞,杨美华,欧阳臻.高效液相色谱-二极管阵列法对中药中玉米赤霉烯酮毒素的检测效果[J].贵州农业科学, 2012, 40(4):102-106.
- [17] KONG W J, SHEN H H, ZHANG X F, et al. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in 100 foods and medicinal plants determined by HPLC-FLD and positive confirmation by LC-MS-MS [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2013, 93(7):1584-1590.
- [18] 余诗琪.基于 MLPA 和 LC/MS<sup>2</sup> 筛查中药材多种毒源真菌污染的方法及应用[D].武汉:湖北中医药大学, 2019.
- [19] 赵祥升.“药食同源”南药——益智中外源性污染物检测及防霉变储藏规范研究[D].北京:北京协和医学院, 2016.
- [20] 王少敏,黄晓静,毛丹,等.QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法同时测定中药瓜蒌皮中 22 种真菌毒素[J].食品安全质量检测学报, 2018, 9(22):5843-5850.
- [21] 谭婧,郑润生,王文丽,等.中药药片中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的液质联用检测分析[J].时珍国医国药, 2012, 23(10):2469-2472.
- [22] 周文菊.不同储藏环境和包装形式对槟榔等药材质量影响的研究[D].镇江:江苏大学, 2017.
- [23] GRAY S L, LACKEY B R, TATE P L, et al. Mycotoxins in root extracts of American and Asian ginseng bind estrogen receptors alpha and beta [J]. Experimental biology and medicine, 2004, 229(6):560-568.
- [24] 赵仁勇,宋斌.玉米赤霉烯酮生物脱毒研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2018, 39(2):113-121.
- [25] XU Y, WANG Y F, JI J, et al. Chemical and toxicological alterations of zearalenone under ozone treatment [J]. Food additives and contaminants, 2019, 36(1):163-174.
- [26] 荣迪.酵母 $\beta$ -D-葡聚糖及衍生物对玉米赤霉烯酮吸附效果的研究[D].武汉:华中农业大学, 2012.
- [27] KRIFATON C, KRISZT B, RISA A, et al. Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes [J]. Journal of hazardous materials, 2013, 244/245:429-435.
- [28] 刘盼,蔡俊.玉米赤霉烯酮生物脱毒与降解的研究进展[J].中国酿造, 2017, 36(2):1-5.
- [29] 潘丽婷,徐圣佳,胡晓丹,等.玉米赤霉烯酮降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J].中国粮油学报, 2018, 33(6):113-119, 126.
- [30] 杨凡,张俊楠,王金全,等.玉米赤霉烯酮降解菌的筛选与鉴定[J].中国粮油学报, 2020, 35(7):104-108.
- [31] YU Y S, QIU L P, WU H, et al. Degradation of zearalenone by the extracellular extracts of *Acinetobacter* sp. SM04 liquid cultures [J]. Biodegradation, 2011, 22(3):613-622.
- [32] MOLNAR O, SCHATZMAYR G, FUCHS E, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., A new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins [J]. Systematic and applied microbiology, 2004, 27(6):661-671.
- [33] BRODEHL A, MÖLLER A, KUNTE H J, et al. Biotransformation of the mycotoxin zearalenone by fungi of the genera *Rhizopus* and *Aspergillus* [J]. FEMS microbiology letters, 2014, 359(1):124-130.
- [34] SUN X L, HE X X, XUE K X, et al. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10 [J]. Food and chemical toxicology, 2014, 72:76-82.
- [35] TAKAHASHI-ANDO N, OHSATO S, SHIBATA T, et al. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea* [J]. Applied and environmental microbiology, 2004, 70(6):3239-3245.
- [36] YU Y S, WU H, TANG Y Q, et al. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification [J]. Microbiological research, 2012, 167(3):121-126.
- [37] BORZEKOWSKI A, DREWITZ T, KELLER J, et al. Biosynthesis and characterization of zearalenone-14-sulfate, zearalenone-14-glucoside and zearalenone-16-glucoside using common fungal strains [J]. Toxins, 2018, 10(3):1-15.
- [38] VEKIRU E, HAMETNER C, MITTERBAUER R, et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite [J]. Applied and environmental microbiology, 2010, 76(7):2353-2359.
- [39] 黄哲.降解玉米赤霉烯酮微生物的筛选鉴定及降解机理研究[D].郑州:河南工业大学, 2013.

(上接第4页)

- [32] LI J R, YU P. Expression of Cu, Zn-superoxide dismutase gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* and its resistance to oxidative stress [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2007, 136(1):127-139.
- [33] ZHANG L Q, GUO F X, XIAN H Q, et al. Expression of a novel thermostable Cu, Zn-superoxide dismutase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* and its antioxidant properties [J]. Biotechnology letters, 2011, 33(6):1127-1132.
- [34] YANG Y, FAN F, ZHUO R, et al. Expression of the laccase gene from a white rot fungus in *Pichia pastoris* can enhance the resistance of this yeast to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system [J]. Applied and environmental microbiology, 2012, 78(16):5845-5854.
- [35] ZÁMČKÝ M, KAMLÁROVÁ A, MAREŠCH D, et al. Hybrid heme peroxidases from rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* involved in defence against oxidative stress [J]. Antioxidants, 2020, 9(8):1-19.
- [36] IBRAHIM H R, HOZONO A, FUKAMI M, et al. Expression of ovotransferrin enhances tolerance of yeast cells toward oxidative stress [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2013, 61(26):6358-6365.
- [37] TOMÁS-GAMISANS M, ANDRADE C C P, MARESCA F, et al. Redox engineering by ectopic overexpression of NADH kinase in recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): Impact on cell physiology and recombinant production of secreted proteins [J]. Applied and environmental microbiology, 2020, 86(6):02038-19.
- [38] WU D, ZHU H F, CHU J, et al. N-acetyltransferase co-expression increases  $\alpha$ -glucosidase expression level in *Pichia pastoris* [J]. Journal of biotechnology, 2019, 289:26-30.
- [39] GUERFAL M, RYCKAERT S, JACOBS P P, et al. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: Characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins [J]. Microbial cell factories, 2010, 9:1-12.
- [40] HAN M H, WANG W X, GONG X, et al. Increased expression of recombinant chitosanase by co-expression of Hac1p in the yeast *Pichia pastoris* [J]. Protein and peptide letters, 2021, 28(12):1434-1441.
- [41] HAN M H, WANG W X, ZHOU J L, et al. Activation of the unfolded protein response via co-expression of the *HAC1* gene enhances expression of recombinant elastase in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology and bioprocess engineering, 2020, 25:302-307.