

双缺陷型毕赤酵母 X33 突变株的诱变育种

顾鹏飞^{1,2}, 李萌^{1,2}, 朱瑞宇^{1,2}, 金坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为促进 *Pichia pastoris* X33 α -1,6-甘露糖转移酶 (OCH1p) 与 α -1,3-甘露糖转移酶 (ALG3p) 双突变菌株 (*och1 alg3* mX33) 作为蛋白质表达宿主菌的应用, 为双突变菌株进一步糖基化的研究奠定基础。作者通过紫外诱变和常压室温等离子体 (ARTP) 诱变的方法来增加双突变菌株的生长速度以及适应能力。经过 4 轮筛选发现了生长速度提高 15%、温度敏感性有所降低、细胞存活率有所提高的双突变菌株。

关键词: 糖基化; 诱变; 生长表型; 甘露糖转移酶

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)02—0129—07

Mutation Breeding of Double Deficient Mutant *Pichia pastoris* X33 Strain

GU Pengfei^{1,2}, LI Meng^{1,2}, ZHU Ruiyu^{1,2}, JIN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To promote the application of α -1, 6-mannose transferase (OCH1p) and α -1, 3-mannose transferase (ALG3p) double mutant strain of *Pichia pastoris* X33 (*och1 alg3* mX33) as host for protein expression and to lay the foundation for the further glycosylation of the double mutant strain, this study wants to increase the growth rate as well as the ability to adapt of the double mutant strain through ultraviolet mutagenesis and Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis methods. At last, after four rounds of screening, a double mutant strain was found to be 15% increase in growth speed, the decrease in temperature sensitivity, and the improvement in cell survival rate.

Keywords: glycosylation, mutagenesis, growth phenotype, mannose transferase

毕赤酵母作为生产重组蛋白药物的宿主菌, 已广泛用于重组蛋白质的表达^[1-2]。但其对蛋白质的过度糖基化修饰, 可产生不同于哺乳动物细胞的高甘露糖型糖基^[3]。酵母与哺乳动物细胞对糖蛋白的糖基化过程, 在内质网中的起始过程相同, 都会形成

相同的核心糖链结构 Man8GlcNAc2, 但在转移至高尔基体进行后续的糖基化时, 酵母与哺乳动物细胞的糖基化过程存在明显差异^[4-5]。研究发现, 在毕赤酵母高尔基体中, 蛋白糖基在 α -1,6-甘露糖转移酶 (OCH1p) 和 α -1,3-甘露糖转移酶 (ALG3p) 的作

收稿日期: 2014-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(81101667); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK2009071)。

* 通信作者: 金坚(1930—), 男, 江苏苏州人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事长效重组蛋白药物与肿瘤多药耐药机制方面的研究。E-mail: jinjian31@126.com

用下,继续添加甘露糖,导致过度糖基化^[6-7]。

作者所在课题组已成功获得—OCH1 (α -1,6-甘露糖转移酶)基因和 ALG3 (α -1,3-甘露糖转移酶)基因双敲除菌株,并利用突变菌株作为宿主工程菌对 GM-CSF 进行表达。结果显示,*Pichia pastoris* X33 双突变菌株对外源蛋白质的表达具有毕赤酵母表达系统的大多优点^[8]。但是,双突变菌株的生长速度与野生菌相比显著降低,对于 GM-CSF 的表达水平与野生菌相比也明显下降,极大地限制了突变菌作为宿主工程菌的应用。因此,作者通过诱变育种的方法提高双突变菌的生长速度和适应能力^[9-11],以进一步提高 *Pichia pastoris* X33 双突变菌株作为宿主工程菌应用的可行性,为双突变菌株进一步糖基化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 *Pichia pastoris* X33 野生型菌株:作者所在研究室保存;*Pichia pastoris* X33 双突变菌株:作者所在研究室构建。

1.1.2 试剂 蛋白胨、酵母提取物、无氨基酸酵母氮源(YNB):加拿大 BIO BASIC INC 公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾:国药集团化学试剂有限公司。台盼蓝(Trypan blue)、山梨醇(Sorbitol)、阿利新兰(Alcian blue)和刚果红(Congo red):上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.3 培养基及溶液的配制

1)YPD 培养基:1 g/dL 酵母提取物,2 g/dL 蛋白胨,2 g/dL 葡萄糖,固体培养基添加 1.5 g/dL 琼脂粉。

2)YPD+sorbitol 培养基:1 g/dL 酵母提取物,2 g/dL 蛋白胨,2 g/dL 葡萄糖,0.4 mol/L sorbitol,固体培养基添加 1.5 g/dL 琼脂粉,1 mol/L sorbitol。

3)PBS 缓冲液 (pH 7.3):135 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,4.3 mmol/L Na_2HPO_4 ,1.4 mmol/L K_2HPO_4 。

4)Tris 缓冲液 (pH 7.5):50 mmol/L Tris,用 HCl 调 pH 值至 7.5。

5)吕氏碱性美蓝染色液:美蓝 0.3 g 溶于 30 mL 95%乙醇后与 100 mL 0.01%氢氧化钾溶液混合。

1.2 实验方法

1.2.1 诱变实验方法

1)制作紫外诱变致死率标准曲线:从 YPD 平板上挑取 *P. pastoris* X33 双突变菌株的单菌落,在 YPD 液体培养基中 28 °C、215 r/min 培养 48 h,将酵母菌悬液稀释到 1 000 个/mL,分别在紫外灯下暴露 10、20、30、40、50、60、70、80、90 s,期间用转子搅拌。诱变后涂板,并避光培养 3~7 d。长出菌落后进行菌落计数,制作致死率标准曲线。

2)双突变菌的紫外诱变育种:紫外诱变 40 s 时死亡率达到 90%,故将诱变时间设在 40 s。将酵母菌悬液稀释到 1 000 个/mL,打开紫外灯照射 40 s,完后涂板,并避光培养 3~7 d,每天查看菌落生长情况,寻找生长速度加快的菌株并保藏菌种。

3)制作 ARTP 等离子诱变致死率标准曲线:从 YPD 平板上挑取 *P. pastoris* X33 紫外诱变菌株的单菌落,在 YPD 液体培养基中 28 °C、215 r/min 培养 48 h,将酵母菌悬液调节 OD 至 6~8,分别在等离子体下照射 20、40、60、80、100 s。诱变完后涂板,培养 5~7 d。长出菌落后进行菌落计数,制作致死率标准曲线。

4)紫外诱变菌的 ARTP 诱变育种:诱变 60 s 时死亡率达到 80%,故将诱变时间设在 60 s。等离子态照射 60 s,之后 10 倍系列稀释涂板,培养 3~7 d,每天查看菌落生长情况,寻找生长速度加快的菌株并保种。

1.2.2 对诱变菌生长情况的研究方法

1)种子活化及生长曲线测定:从 YPD 平板上挑取 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株的单菌落,在 YPD 液体培养基中 28 °C、215 r/min 活化培养 48 h。将活化的种子转接至新鲜的 YPD 液体培养基中,分别取培养 12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、36、40、44、48、52、56 h 菌液于 A_{600} 测定吸光度,并绘制种子生长曲线。

2)温度敏感性试验:分别取 500 μL 稳定期的 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株菌液,调整菌体 A_{600} 值至 3.0 左右,分别用 YPD 液体培养基 10 倍系列稀释,取 2 μL 稀释的菌悬液,分别点在 YPD 及 YPD-sorbitol 平板上,分别于 28、37 °C 下培养,5~7 d 后观察菌落生长情况。

3)刚果红敏感性试验:分别取 500 μL 稳定期的 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株菌液,调整 A_{600} 值至 5.0 左右,分别用新鲜的 YPD 液体培养基 10 倍系列稀释,取 5 μL 稀释的菌

悬液,分别点在 YPD 和 YPD + Congo red(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板上,置 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养 5~7 d 后,观察菌落生长情况。

4) 菌体形态观察:分别取 5 μL 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养的 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株菌液,点于载玻片上,将涂片在火焰上固定,待冷,滴加染液,染 1~3 min,水洗,待干,镜检。用华东师范大学电子显微镜中心投射电子显微镜(HIT7700HITACHI,是日立高新技术公司为生物、制药、纳米技术和软材料等领域而开发的最先进的投射电子显微镜)进行拍照,对比 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株的细胞形态。

5) 细胞存活率检测:分别挑取 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株,接种于 YPD 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养至对数生长期时,以 1:10 的比例转接至新鲜的 YPD 液体培养基中,同时接种于 YPD-sorbitol 液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。分别于 0、10、20、30、40、50、60 h 时取样,稀释,台盼蓝染色,镜检,计数死细胞和总细胞数,计算存活率。每个样品共计数 500 个细胞,绘制细胞存活率—时间曲线。

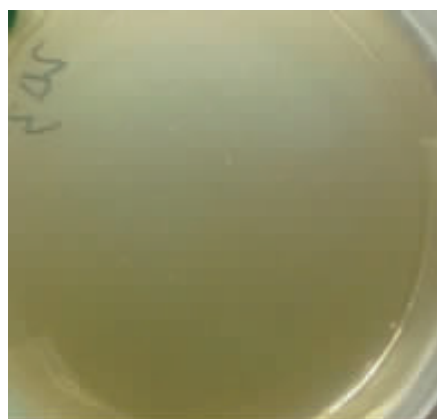
6) GM-CSF 在菌株中的表达与分析:将双突变菌、诱变菌、野生菌和单敲除菌接种到 2 mL 的 YPD(蛋白胨 2 g/dL,酵母提取物 1 g/dL,葡萄糖 2 g/dL)培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,以 2% 的接种体积分数接种到 100 mL 的 BMGY(蛋白胨 2 g/dL,酵母提取物 1 g/dL,YNB 1.34 g/dL,甘油 2%,100 mmol/L 磷酸盐缓冲液,pH 6.0)培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,离心去上清液并重悬于 15 mL 的 BMMY(酵母提取物 1 g/dL,YNB 1.34 g/dL,蛋白胨 2 g/dL,100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液,pH 6.0)培养基中,同时加入 2% 的甲醇开始诱导表达,诱导 72 h 结束后离心取上清液,超滤浓缩后用于蛋白质的 SDS-PAGE 分析。

2 结果与讨论

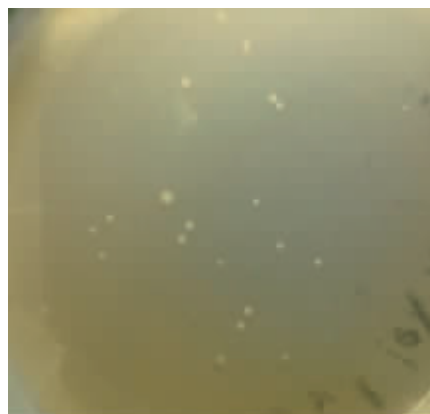
2.1 诱变实验富集结果

2.1.1 紫外诱变实验富集结果 每一轮紫外诱变后都进行数次富集筛选,具体做法是将一轮诱变后生长速度较快的毕赤酵母菌混合,再涂板,以寻找其中生长速度最快的,筛选条件主要是观察菌落直径和菌落生长速度。这样经过 3 轮紫外诱变,十

几次富集筛选,筛选到了一些生速度加快的菌株。由图 1 可以看出,经过三轮紫外诱变的菌的菌落比双突变菌大。



(a) 突变菌



(b) 紫外诱变菌

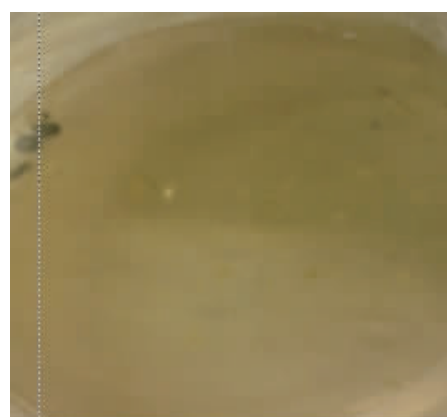
图 1 第三轮紫外诱变富集结果(培养 5 d)

Fig. 1 Third round of ultraviolet mutagenesis enrichment results (cultured for 5 days)

2.1.2 ARTP 诱变实验富集结果 同样,一轮 ARTP 诱变后也进行数次富集筛选,寻找生长速度最快的菌株,这样再经过一轮 ARTP 诱变实验,筛选到了比紫外诱变菌株生长速度更快的菌株。由图 2 可知,经过 3 轮紫外诱变,再经过一轮 ARTP 诱变后,得到了生长速度更快的菌株。

2.2 诱变实验富集结果

2.2.1 菌株的生长情况 将 X-33 双突变菌株和 X-33 诱变菌株分别接种于新鲜的 YPD+sorbitol 培养基中,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、215 r/min 振荡培养,测定 A_{600} 值,以时间(h)为横坐标, A_{600} 值为纵坐标,作生长曲线,见图 3。



(a)ARTP诱变菌



(b)紫外诱变菌

图2 ARTP 诱变富集结果(培养 7 d)

Fig. 2 Results of enrichment of ARTP mutagenesis (cultured for 7 days)

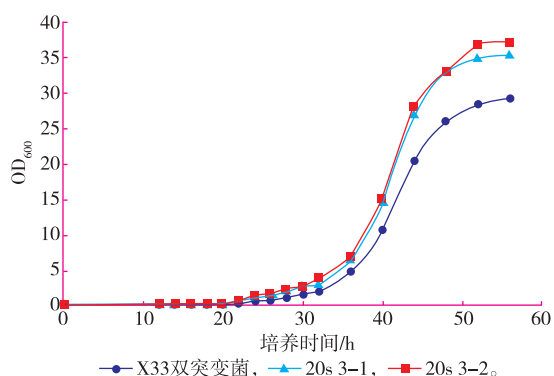
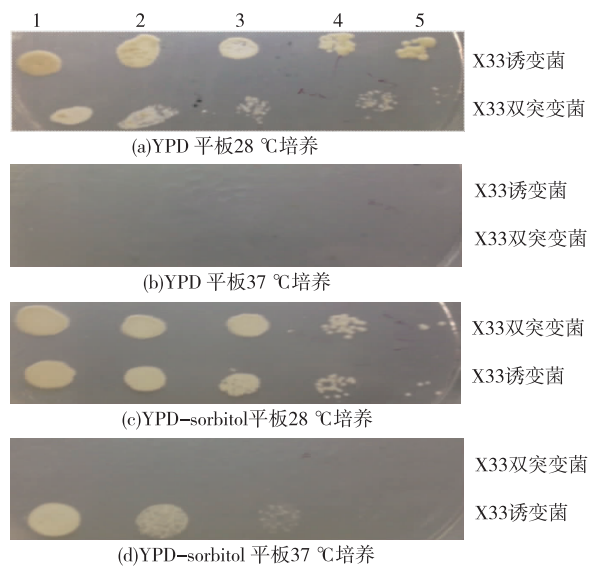
图3 标准条件下 *P. pastoris* X33 双突变菌株和 *P. pastoris* X33 诱变菌株的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of the double mutant X33 and mutagenesis X33 under standardized conditions

由图3可以看出,在同等培养条件下,在一定的时间内, *P. pastoris* X33 诱变菌株的生长情况,与 *P. pastoris* X33 双突变菌株相比,生长速度加快了约 15%,对数期缩短,斜率更大,菌液浓度提高

了约 20%。说明诱变对酵母细胞的生长产生了影响,使毕赤酵母细胞的生长速度增加、细胞密度增加,具体原因有待进一步分析。

2.2.2 温度对生长情况的影响 温度对毕赤酵母的生长影响比较大,在不同的温度下,毕赤酵母的生长速度会有明显差异,在最适温度时,毕赤酵母的生长繁殖非常旺盛。但是敲除了必需基因后,毕赤酵母的生长能力明显下降,即使在有 1 mol/L sorbitol 的情况下,生长速度也显著降低,见图4。



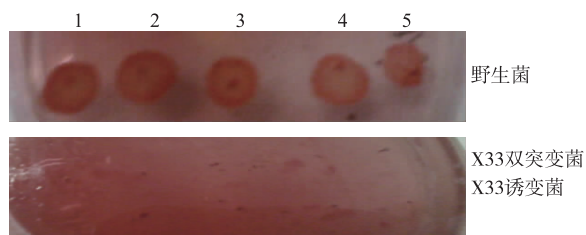
1~5: 菌体浓度分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}

图4 X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株对温度的敏感性
Fig. 4 Sensitivities of the double mutant X33 and mutagenesis X33 to temperature

结果显示, X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株对温度都比较敏感,在 28 °C 培养时,菌株生长状况较好;当培养温度升至 37 °C 后,菌株的生长受到抑制,未见生长。在 37 °C 时补加 1.0 mol/L sorbitol 后, X33 诱变菌株的致死性生长受到抑制,说明 X33 诱变菌对渗透压的适应能力有了一定提高。

2.2.3 菌株对渗透压的敏感性 在正常的情况,不同的渗透压对毕赤酵母的影响不是很大,因为毕赤酵母细胞膜有一定的缓冲能力,但是对于双敲除菌株,它的细胞膜不完整,导致对渗透压的适应能力明显下降,见图5。

检测结果显示,用刚果红染菌落,野生菌细胞壁完整,双突变菌株细胞壁不完整,诱变菌适应能力有所改善,但刚果红仍为阳性,说明细胞壁也不完整。

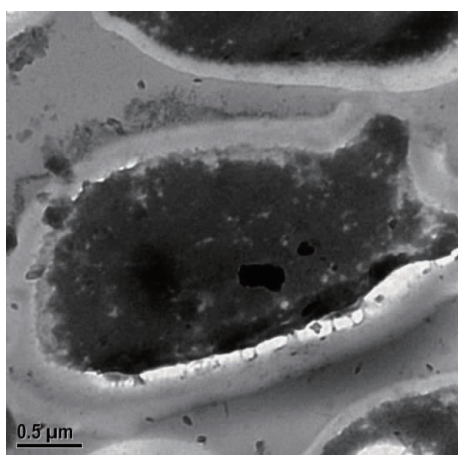


1~5: 菌体浓度分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}

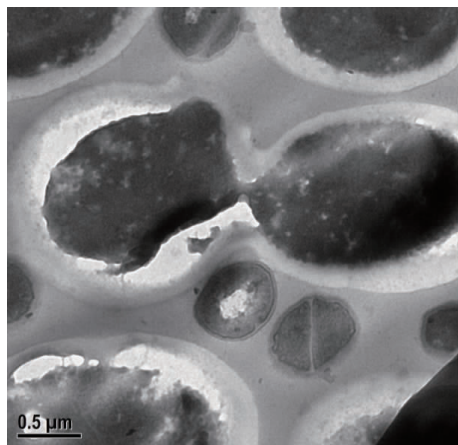
图 5 野生菌、X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株对刚果红的敏感性

Fig. 5 Sensitivities of wild strain, the double mutant X33 and mutagenesis X33 to Congo red

2.2.4 菌体形态观察 细胞的形态直接反映了菌株的具体生存情况,在正常情况下,菌株的细胞应该是球形或者椭球形,表面比较平滑均匀。但是对于缺乏重要细胞膜相关基因的双敲除菌株来说,它的细胞形态有了明显的改变,见图 6—7。



(a)X33双突变菌株



(b)X33诱变菌株

图 6 X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株细胞形态的电镜观察
Fig. 6 Electron microscopy of cell morphology caused by the double mutant X33 and mutagenesis X33



(a)X33双突变菌株



(b)X33诱变菌株

图 7 X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株细胞形态变化的显微镜观察(美蓝染色, $\times 100$)

Fig. 7 Optical microscopy of cell morphology caused by the double mutant X33 and mutagenesis X33 (methylene blue dyeing, $\times 100$)

从电镜照片上可以看出,在进入稳定期后,X33 诱变菌株与 X33 双突变菌株相比,母细胞未与子细胞完全分离就又重新出芽的现象有所好转,见图 6。美蓝染色结果同样验证了上面的结论,见图 7。

2.2.5 菌株的存活率 将 X-33 双突变菌株和 X-33 诱变菌株分别接种于新鲜的 YPD+sorbitol 培养基中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 215 r/min 振荡培养,每 10 小时测定一次细胞存活率,以培养时间(h)为横坐标,存活率为纵坐标,作存活率曲线,见图 8。

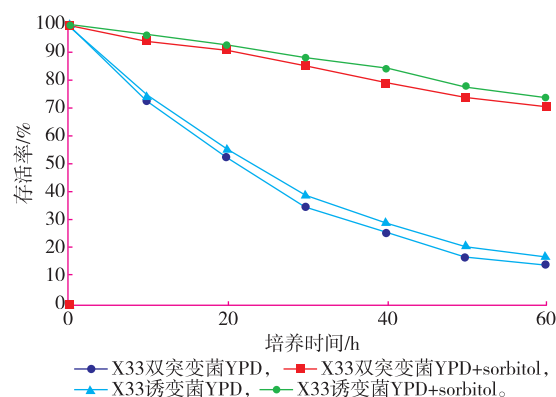
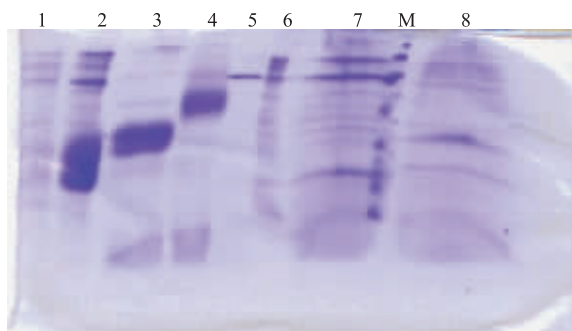


图 8 X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株的存活率-时间曲线
Fig. 8 Survival rate-time curve of the double mutant X33 and mutagenesis X33

细胞存活率-时间曲线显示,X33 双突变菌株细胞存活率低于 X33 诱变菌株;在用 YPD+sorbitol 培养基培养时,X33 双突变菌株和 X33 诱变菌株的

细胞存活率均明显高于用 YPD 培养基培养时的细胞存活率,且 X33 诱变菌株细胞存活率比 X33 双突变菌株高。

2.2.6 GM-CSF 在菌株中的表达与分析 由图 9 可知,GM-CSF 可以在野生菌和单敲除菌中良好表达,不需要浓缩;GM-CSF 在双突变菌和诱变菌中表达的上清液分别浓缩 500 倍后进行 SDS-PAGE 分析,可以得到表达量良好的图谱,并且诱变菌的表达量要比双突变菌高,见图 9。同时也说明,敲除了两个必需基因后,菌株的表达水平降低了许多。经过冷冻干燥后由于盐浓度太高,条带比较宽,但是希望通过冷冻干燥来浓缩的目的并没有达到。



1,2:X-33 双突变阳性表达菌株;3:X-33 单突变阳性表达菌株;4:X-33 野生菌阳性表达菌株;5-8:X-33(Mns I)阳性表达菌株,其中 7,8 经过冷冻干燥;M:1KD DNA maker

图 9 GM-CSF 在菌株中的表达

Fig. 9 Expression of GM-CSF in strains

3 结 语

毕赤酵母表达系统 N-糖基化代谢途径改造的进行使得通过发酵工程大规模生产复杂型糖蛋白药物成为了可能,拓宽了酵母表达系统的应用范围。然而,在酵母的标准培养条件下,*P. pastoris* X33 突变菌株与野生型菌株相比,生长速度很慢,可能是由于敲除了酵母的 *och1* 基因和 *alg3* 基因对酵母的生理调节和细胞壁的形成造成了重大缺陷,从而使得生长状态受到影响^[12]。甘露糖蛋白是酵母细胞壁的主要组分,其中的甘露糖是影响细胞活性的重要组成成分,甘露糖蛋白可在细胞外形成一层保护层,维持细胞壁结构的完整,保护细胞免受外源物

质的破坏,因此,敲除了 *och1* 基因和 *alg3* 基因,酵母的 α -1,6-甘露糖转移酶和 α -1,3 甘露糖转移酶功能缺失,这会导致甘露糖蛋白的糖基化出现缺陷,进而破坏细胞壁的结构^[3]。另外,糖基化对细胞壁结构的破坏还可以通过影响合成细胞壁其他成分的功能蛋白的折叠、转运以及活性^[13]。

通过紫外诱变的方法,可以改变酵母的一系列基因,这样就有可能打开正常情况下不开启的代谢途径。基因突变可以增强一些酶的活性以及改变一些酶的性质,进而有可能使现有代谢途径的效率提高或者发生有益的改变。经过 4 轮诱变后,发现 *P. pastoris* X33 诱变菌株的生长速度比 *P. pastoris* X33 双突变菌株提高了 20% 左右。在 37 °C 培养时, X33 诱变菌株可以在带有 1 mol/L sorbitol 的 YPD 培养基上生长,而 X33 双突变菌株不能。细胞壁完整性的破坏增加了细胞对一些细胞壁抑制性药物(如刚果红)及环境因素(如温度)的敏感性。细胞形态观察显示,处于稳定期的 X33 双突变菌株母细胞仍未与子细胞完全分离,就又有新的子细胞出现,这一现象在 X33 诱变菌株中有所改善。另外菌株的表达量也有所提升。

毕赤酵母具有表达水平高、基因操作简单、生产成本低、不产生内毒素和可以大规模生产等优点,又具有真核细胞许多翻译后修饰功能如糖基化修饰,已经广泛应用于各种外源重组蛋白的表达。但是毕赤酵母对蛋白糖基化修饰后形成高甘露糖型糖链,不同于哺乳动物细胞产生的复杂型糖链,因此毕赤酵母表达的蛋白尤其是药用糖蛋白在用作治疗时,会产生很多问题,如半衰期短、产生较高的免疫原性、易被清除等,严重限制了毕赤酵母在生产药用蛋白中的应用。因此人们希望通过改变毕赤酵母的糖基化代谢途径,使产生类似于哺乳动物细胞的复杂型糖链,以提高它的使用价值。

综上所述,作者研究了 *P. pastoris* X33 双突变菌株与 *P. pastoris* X33 诱变菌株的生理特性,为该菌株进一步糖基化的研究奠定了一些基础。相信随着研究的深入、方法的改进、社会需求的提高,毕赤酵母作为宿主菌生产动物乃至人类的糖蛋白产品的愿望一定会更快实现。

参考文献:

[1] Juergen H Nett, Terrance A Stadheim, Huijuan Li, et al. A combinatorial genetic library approach to target heterologous

- glycosylation enzymes to the endoplasmic reticulum or the golgi apparatus of *Pichia pastoris*[J]. **Yeast**, 2011, 28:237-252.
- [2] Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE et al. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris* [J]. **Journal of Biotechnology**, 2009, 139(4):318-325.
- [3] Liu B, Gong X, Chang SH et al. Disruption of the OCH1 and MNN1 genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2009, 143:95-102.
- [4] Jacobs PP, Geysens S, Verweken W et al. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology[J]. **Nature Protocol**, 2009, 4:58-70.
- [5] 罗竞红, 游自立. 巴斯德毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007, 3:75-79.
LUO Jinghong, YOU Zili. Study on expression of heterologous gene in *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2007, 3:75-79. (in Chinese)
- [6] Wildt S, Gerngross T U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast[J]. **Nat Microbiol**, 2005, 3(2):119-128.
- [7] Hamilton R, Gerngross U. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2007, 18(5):387-392.
- [8] Bobrowicz P, Davidson RC, Li H et al. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose [J]. **Glycobiology**, 2004, 14(9):757-766.
- [9] 王书全, 李明, 马鸣潇. 一种新型杂合抗菌肽在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(2):173-175, 178.
WANG Shuquan, LI Ming, MA Mingxiao. Expression of a novel hybrid antibacterial peptide in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity[J]. **Chin J Biological**, 2011, 24(2):173-175, 178. (in Chinese)
- [10] Hashimoto S, Ogura M, Aritomi K et al. Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71(1):312-319.
- [11] Stephen R Hughes, William R Gibbons. Random UV-C mutagenesis of *Scheversomyces* (formerly *Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 to improve anaerobic growth on lignocellulosic sugars[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2012, 39:163-173.
- [12] 许永利, 张大成, 朱瑞宇, 等. 毕赤酵母 X-33 糖基化突变菌株的生理特性[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(4):439-442.
XU Yongli, ZHANG Dacheng, ZHU Ruiyu, et al. Physiological property of *Pichia pastoris* X-33 glycosylation mutant[J]. **Chin J Biological**, 2011, 24(4):439-442. (in Chinese)
- [13] Martin Schmidt, Meghan E Strenk et al. Importance of cell wall mannoproteins for septum formation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Yeast**, 2005, 22(9):715-723.