

# 高效合成葡萄糖二酸酿酒酵母工程菌的构建

李杰<sup>1,2</sup>, 赵运英<sup>1,2</sup>, 邓禹<sup>1,2</sup>

1 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

李杰, 赵运英, 邓禹. 高效合成葡萄糖二酸酿酒酵母工程菌的构建. 生物工程学报, 2022, 38(2): 705-718.

LI J, ZHAO YY, DENG Y. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of glucaric acid. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 705-718.

**摘要:** 葡萄糖二酸是天然存在的一种重要二元酸, 其在医疗保健和化工工业等领域具有很高的实际应用价值, 因此被称为“最具价值的生物炼制产品之一”。以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为底盘微生物, 文中考察了过量表达肌醇转运蛋白 Itr1、融合表达肌醇加氧酶和葡萄糖醛酸脱氢酶以及弱化表达葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1* 三种策略对葡萄糖二酸产量的影响。研究结果显示, 过量表达肌醇转运蛋白 Itr1 使葡萄糖二酸产量在摇瓶发酵条件下较出发菌株 Bga-3 提高了 26%; MIOX4-Udh 融合蛋白的表达使葡萄糖二酸的产量较 Bga-3 菌株提高了 40%; 在此基础上, 弱化表达葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1* 后, 葡萄糖二酸的产量达 5.5 g/L, 较相同发酵条件下 Bga-3 菌株提高了 60%。在 5 L 发酵罐中, 该菌株葡萄糖二酸的最高产量达 10.85 g/L, 较 Bga-3 菌株提高了 80%。由此可见, 上述代谢改造策略的应用在很大程度上提高了葡萄糖二酸的途径效率和产量, 为通过代谢工程方法在酿酒酵母中合成其他化合物的研究提供了参考。

**关键词:** 酿酒酵母; 葡萄糖二酸; 肌醇转运蛋白; 融合表达; 代谢改造

**Received:** February 21, 2021; **Accepted:** March 28, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905502); National Natural Science Foundation of China (21877053); Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (NBK20181345)

**Corresponding authors:** ZHAO Yunying. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918312; E-mail: yunyingzhao@jiangnan.edu.cn  
DENG Yu. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918312; E-mail: dengyu@jiangnan.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2019YFA0905502); 国家自然科学基金 (21877053); 江苏省自然科学基金 (NBK20181345)

# Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of glucaric acid

LI Jie<sup>1,2</sup>, ZHAO Yunying<sup>1,2</sup>, DENG Yu<sup>1,2</sup>

1 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** As an important dicarboxylic acids existing in nature, glucaric acid has been widely used in medical, health, and polymer materials industry, therefore it is considered as one of the “top value-added chemicals from biomass”. In this study, using *Saccharomyces cerevisiae* as a chassis microorganism, the effects of overexpression of *myo*-inositol transporter *Itr1*, fusional expression of inositol oxygenase *MIOX4* and uronate dehydrogenase *Udh*, and down-expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene *ZWF1* on the glucaric acid production were investigated. The results showed that the yield of glucaric acid was increased by 26% compared with the original strain Bga-3 under shake flask fermentation after overexpressing *myo*-inositol transporter *Itr1*. The yield of glucaric acid was increased by 40% compared with Bga-3 strain by expressing the *MIOX4-Udh* fusion protein. On these basis, the production of glucaric acid reached 5.5 g/L, which was 60% higher than that of Bga-3 strain. In a 5 L fermenter, the highest yield of glucaric acid was 10.85 g/L, which was increased 80% compared with that of Bga-3 strain. The application of the above metabolic engineering strategy improved the pathway efficiency and the yield of glucaric acid, which may serve as a reference for engineering *S. cerevisiae* to produce other chemicals.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; glucaric acid; inositol transporter; fusional expression; metabolic engineering

D-葡萄糖二酸 (D-glucaric acid) 是存在于自然界中的一种具有高附加值的有机酸, 被广泛应用于食品、化工和医药等领域, 如降低类固醇和部分非类固醇, 化学防癌等<sup>[1]</sup>。根据2004年美国能源部发布的十佳最具价值的利用生物法生产生物基产品的研究报告, 葡萄糖二酸被认为是“最具价值的生物炼制产品 (top value-added chemicals from biomass) 之一”<sup>[2]</sup>。目前, 葡萄糖二酸的工业生产主要通过化学氧化法, 包括硝酸和 TEMPO 电化学氧化法<sup>[3]</sup>, 但是化学法生产的反应条件非常苛刻, 同时会对环境产生较大的污染<sup>[4]</sup>。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 具有出色的抗逆性和低 pH 发酵能力, 并具有相对清晰的遗传背景和基因组易于遗传改造的特点, 因此被认为是代谢工程改造生产有机酸的优秀真核微生物模型<sup>[5]</sup>。Shiue 等将外源 *miox4* 和 *udh* 基因引入酿酒酵母细胞进行异源表达, 实现了通过葡萄糖和外加肌醇在酿酒酵母细胞中产葡萄糖二酸, 之后又利用蛋白融合技术提高了此代谢途径中 *MIOX4* 的稳定性, 使葡萄糖二酸的产量提高了 65%<sup>[6]</sup>。将难以表达的蛋白质融合到亲和标签上, 在许多情况下可促进蛋白质的正确折叠, 并增加蛋白质的表达、溶解

度和半衰期<sup>[7]</sup>。本实验室前期工作中利用酵母基因组含有大量 *delta* 重复序列这一特点, 将拟南芥的肌醇加氧酶基因 *miox4* 和丁香假单胞菌的葡萄糖醛酸脱氢酶基因 *udh* 在 *delta* 位点高效表达, 并敲除了肌醇-1-磷酸合成酶 (Ino1) 的转录抑制因子 *Opi1*, 得到了工程菌 Bga-3, 该菌株在 5 L 发酵罐中能够积累 6.0 g/L 的葡萄糖二酸<sup>[8]</sup>。前期研究发现, 在该途径中葡萄糖二酸合成途径中关键酶 MIOX4 和 Udh 的表达量和活性都较低, 而且酵母细胞中肌醇的转运效率也非常低<sup>[8]</sup>, 这些因素都限制了葡萄糖二酸的合成。因此, 如何强化葡萄糖二酸合成途径和提高肌醇转运效率, 都是进一步提高工程菌 Bga-3 产葡萄糖二酸能力需要解决的关键问题。本研究首先过量表达酵母细胞自身的肌醇转运蛋白 *Itr1*, 通过提高工程菌摄取胞外肌醇的能力来促进葡萄糖二酸的积累。然后通过不同的寡肽连接子 (linker) 将 MIOX4 和 Udh 进行融合表达, 筛选效率最高的 MIOX4-Udh 融合蛋白, 进一步提高葡萄糖

二酸合成途径的效率。最后弱化表达葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1*, 大幅度提高了葡萄糖二酸的产量, 为酿酒酵母菌的代谢改造提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

本实验所用菌株和质粒见表 1。

### 1.2 培养基

大肠杆菌培养用 LB 培养基, 酿酒酵母用 YPD、SD-URA 和 SD-HIS 培养基的配制见参考文献[8]。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 *ITR1* 启动子的替换

为了将肌醇转运蛋白编码基因 *ITR1* 的启动子换成组成型强启动子, 首先以 pHAC181 质粒<sup>[9]</sup>为模板, 通过引物 LEU2-2F/LEU2-2R 扩增获得 *LEU2* 片段, 以 BY4741 基因组为模板, 通过引物 P<sub>TDH3</sub>-F/P<sub>TDH3</sub>-R 扩增获得的 *TDH3* 基因的启动子 P<sub>TDH3</sub>, 最后通过引物 LEU2-2F/

表 1 本研究中所使用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Relevant genotypes	Sources
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Lab store
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	<i>MATa leu2-3, 112, ura3-52, trp1-289, his3-Δ1, MAL2-8c</i>	Lab store
BY4741 <i>opi1Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, opi1Δ</i>	[8]
Bga-0	BY474 <i>opi1Δ</i> contains the episome pY26- <i>miox4-udh</i> plasmid	[8]
Bga-3	Integrating the exogenous genes <i>miox4</i> and <i>udh</i> into the <i>delta</i> locus of BY474 <i>opi1Δ</i> strain	[8]
Bga-3-Itr1	Replace the promoter of the inositol transporter to P <sub>TDH3</sub> of Bga-3 strain	This study
A3	Integrate the MIOX4-Udh fusion protein (linker 4) into the <i>delta</i> site of the Bga3-Itr1 strain	This study
K3	Integrate the MIOX4-Udh fusion protein (linker 9) into the <i>delta</i> site of the Bga3-Itr1 strain	This study
L3	Integrate the MIOX4-Udh fusion protein (linker 12) into the <i>delta</i> site of the Bga3-Itr1 strain	This study
A3-D <sub>ZWF1</sub>	Replace the promoter of the <i>ZWF1</i> gene of the A3 strain with P <sub>BBP1</sub>	This study
K3-D <sub>ZWF1</sub>	Replace the promoter of the <i>ZWF1</i> gene of the K3 strain with P <sub>BBP1</sub>	This study
L3-D <sub>ZWF1</sub>	Replace the promoter of the <i>ZWF1</i> gene of the L3 strain with P <sub>BBP1</sub>	This study

$P_{TDH3}$ -R 将上述 2 个片段进行融合, 获得  $LEU2$ - $P_{TDH3}$  片段。通过 ITR1-NF/ITR1-NR 引物扩增整带有 ITR1 启动子同源臂的  $LEU2$ - $P_{TDH3}$  片段, 并转化到 Bga-3 菌株中, 提取转化子的基因组, 通过引物 PTDH3-CHECK-F2/ITR1-CHECK-R2 进行 PCR 检测, 正确的转化子再通过测序进行进一步确认。将 ITR1 基因的启动子替换为 TDH3 的启动子的菌株命名为 Bga3-Itr1。

### 1.3.2 *miox4-udh* 融合片段的构建和筛选

分别以 Bga-3<sup>[8]</sup> 的基因组为模板, 先以 MIOX4-LF/MIOX4-LR 为引物扩增  $P_{TEF1}$ -*miox4*, 分别以 UDH-F0、UDH-F1、UDH-F2、UDH-F3、UDH-F4、UDH-F5、UDH-F6、UDH-F7、UDH-F8、UDH-F9、UDH-F10、UDH-F11、UDH-F12/UDH-R 为引物扩增获得 13 个带有不同寡肽连接子的 *udh*- $T_{CYC1}$  片段。将上述  $P_{TEF1}$ -*miox4* 和带不同 linker 的 *udh*- $T_{CYC1}$ , 通过引物 MIOX4-LF/UDH-R 两个片段进行融合 PCR, 获得 13 个不同的  $P_{TEF1}$ -*miox4-udh*- $T_{CYC1}$ -*delta2* 片段, 再通过 MIOX4-LF/ $T_{CYC1}$ -(*opi1*)R 引物扩增获得带有 *OPI1* 基因启动子同源臂的  $P_{TEF1}$ -*miox4-udh*- $T_{CYC1}$  片段; 以 Bga-3 的基因组为模板, 通过 HIS3-(*opi1*)F/HIS3-(*opi1*)R 引物扩增 *HIS3* 片段。所有引物序列见表 2。

将上述带有同源臂的 *HIS3* 和  $P_{TEF1}$ -*miox4*-

*udh*- $T_{CYC1}$  的 2 个整合片段转化 BY4741*opi1*Δ 菌株, 将其整合到酿酒酵母 BY4741*opi1*Δ 菌株中 *OPI1* 基因的启动子上, 涂布 SD-HIS 平板, 以组氨酸为标记进行筛选。挑取转化子菌株进行发酵后, 通过葡萄糖二酸的产量筛选最优的 MIOX4-Udh 融合蛋白。

### 1.3.3 MIOX4-Udh 融合蛋白的 delta 位点整合

以 Bga-3 基因组为模板, 通过引物 delta1-F/ $T_{ADHI}$ -R 扩增获得 *delta1* 片段; 再以 MIOX4-LF/MIOX4-LR 为引物扩增  $P_{TEF1}$ -*miox4* 片段, 以 UDH-F4、UDH-F9、UDH-F12 和 UDH-R 为引物扩增获得 3 个带有不同寡肽连接子的扩增 *udh*- $T_{CYC1}$ -*delta2* 序列, 然后通过引物 MIOX4-LF 和 UDH-R 将上述 2 个片段进行融合, 获得 3 个带有不同寡肽连接子的  $P_{TEF1}$ -*miox4-udh*- $T_{CYC1}$ -*delta2* 片段; 以 pRS316 质粒<sup>[10]</sup>为模板, 通过引物 URA3-MU-F/URA3-MU-R 扩增获得 *URA3* 序列。最后将上述 3 个片段用引物 delta1-F 和 UDH-R3 进行融合 PCR, 获得 *delta1*-*URA3*- $P_{TEF1}$ -*miox4-linker*(4,9,12)*udh*- $T_{CYC1}$ -*delta2*。所有引物序列见表 2。

将上述 *delta1*-*URA3*- $P_{TEF1}$ -*miox4-linker*(4,9,12)*udh*- $T_{CYC1}$ -*delta2* 片段转化 Bga3-Itr1 菌株。将其整合至酿酒酵母 Bga3-Itr1 菌株的 delta 位点, 涂布 SD-URA 平板。挑取转化子菌株进行发酵后, 通过葡萄糖二酸的产量筛选最优菌株。

表 2 本研究中所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Sequences (5'→3')
MIOX4-LF	CGTTGTA AAAACGACGGCCAGTGAATTCAGCTGGAGCTC
MIOX4-LR	CCAACGCAGATTTTCAGGG
UDH-F0	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F1	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGGCTCTGGCATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F2	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGGAAGTGGCGGTGGAGGTTCAATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F3	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGGCAGTGGTGAGGCGGCAGCTAAAATGGCCTCCGCTCATACTACGC

(待续)

(续表 2)

Primer names	Sequences (5'→3')
UDH-F4	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGGTTCTGGAGAGGCGGCTGCTAAAGAAGCCGCAGCGAAGATG GCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F5	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGGCAGTGGGATGGGTTTCATCAAGCAATATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F6	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGCCGACGCCACGCCCATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F7	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGCCTACCCCTACCCCGACGCCCACTCCGATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F8	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGCCACGCCTACTCCCACACCCACGCCACGCCAACACCGACAC CTATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F9	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGAAGCTAAAAAGAAAATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F10	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGAGGCCAAAAAAGAAAGCCAAAAAGAAAATGGCCTCCGCT CATACTACGC
UDH-F11	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGGAGGCCAAAAAAGAAAGCCAAAAAAGGAAGCCAAAAA GAAAATGGCCTCCGCTCATACTACGC
UDH-F12	TCCCTGAAAATCTGCGTTGGTCTCATCCAATAACAACAATAACAACAACAACAATATGGC CTCCGCTCATACTACGC
UDH-R	ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTAAAAGGGAATCTGCAATTCTACAC
delta1-F	GGCTGGCAACTAATAGGGAC
pHAC181-F	AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
pHAC181-R	GAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC
HIS3-(opi1)F	AAATCAATGGGAGGTCATCG
HIS3-(opi1)R	CCCACGTTACTCCTCGAGATAAGTTGGTCAACATTGATTTTCGAGATTCCGACGCATCTGTGCGG TATTC
MD-Check-(opi1)R2	ACGTTCTGGCCTGATATGC
MD-Check-(opi1)F2	TGATGATCTTACCCGTTTGC
MD-Check-(opi1)HisR	ATCACACCACTGAAGACTGCG
TCYC1-(opi1)R	GAGGTGGAAAAAATAAAGAACGCCGATTTTACCCGTTGCATATCCCAAACCTTC TCAAGCAAG
LEU2-2F	ACGTCTAAGAAACCATTATTATCATG
LEU2-2R	AAAGCGTTCCGAAAACGAG
PTDH3-F	GCGCTCGTTTTTCGAAACGCTTTTGCCTCATCAGTAAGACCCG
PTDH3-R	TTTGTGTTTATGTGTGTTTATTCG
ITR1-NF	TAGTTGAGAAAAGACCTTTCACACTGGGCTTTCTTTGGCAGGTGTTGACGTCTAAGAAAC CATTATTATCATG
ITR1-NR	ACATTTGATTGCGATGTCTTTGACGTGAGATATGGTATGTGTATTCCATTTTGTGTTTATGTG TGTTTATTCG
PTDH3-CHECK-F2	AGCGCAACTACAGAGAACAGG
ITR1-CHECK-R2	TTTGACGTGAGATATGGTATGTG
delta1-F	GGCTGGCAACTAATAGGGAC
TADH1-R	GCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAATAATTTAATTAACAATTCTTCGCCAGAGG
URA3-MU-F	GGCGCTGAGCATCATTTAGCTACAGGCAAGCGATCCGTC
URA3-MU-R	CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTTTCGCCCTTTGACGTTG
UDH-R3	AAAAGGGAATCTGCAATTCTACAC
ZWF1-RT-F	CTACCAAGATCTTCGGTTATGCC
ZWF1-RT-R	GCAAGGCCAGATAGAAGAGACGG
PGK1-RT-F	TACGTTGTCTTGCTTCTCACTTGG
PGK1-RT-R	TTGGAAGCCTTGACCTTTTGACC

### 1.3.4 *ZWF1* 基因的弱化表达

为了弱化表达磷酸戊糖途径中的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1*, 通过以下方法将其启动子替换为 *BBPI* 基因的启动子: 首先以酵母菌 CEN.PK2-1C 的基因组为模板, 以 MET-F/MET-R 为引物扩增获得 MET 筛选标签, 然后以 BY4741 基因组为模板, 通过引物 P<sub>BBPI</sub>-F/P<sub>BBPI</sub>-R 扩增获得 *BBPI* 基因的启动子 P<sub>BBPI</sub>, 通过引物 MET-F/P<sub>BBPI</sub>-R 将上述 2 个片段进行融合, 获得 MET-P<sub>BBPI</sub> 片段。通过 P<sub>BBPI</sub>-MET-F/ZWF1-NR 引物扩增带有 *ZWF1* 启动子同源臂的 MET-P<sub>BBPI</sub> 片段, 并转化到 A3、K4 和 L3 菌株中, 提取转化子的基因组, 通过引物 P<sub>BBPI</sub>-check-F/ZWF1-check-R 进行 PCR 检测, 正确的转化子通过测序方法进行进一步确认。

### 1.3.5 酵母基因组提取方法

(1) 挑取酵母单个转化子, 接种于 YPD 培养基中, 30 °C 培养至饱和。

(2) 将过夜培养的菌体收集到 1.5 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体 (约 30–50  $\mu$ L)。

(3) 加入与收集的细胞体积相当的酸性玻璃珠、400 mL STES 溶液 (0.2 mol/L pH 7.6 的 Tris-Cl, 0.5 mol/L NaCl, 0.1% (M/V) SDS, 0.01 mol/L EDTA), 400  $\mu$ L 酚/氯仿/异戊醇。

(4) 重复振荡 5 $\times$ 30 s, 中间把离心管置于冰水上。加入 TE 缓冲液 200  $\mu$ L, 迅速混合后, 80 000 r/min 离心 5 min。

(5) 将上清溶液转移到新的 1.5 mL 离心管中, 加入 1/10 体积 3.0 mol/L 的 NaAc 溶液, 2 倍体积无水乙醇, 混匀, 置于 -20 °C 大约 1 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。

(6) 加入 1 000  $\mu$ L 75% 的乙醇洗涤, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。

(7) 室温干燥 DNA 10 min, 加入 50  $\mu$ L 的 TE 缓冲液或 ddH<sub>2</sub>O (含 RNase, 终浓度为 20  $\mu$ g/mL), 55 °C 消化 30 min。电泳检测, 置于 -20 °C 备用。

### 1.3.6 RT-qPCR 检测 *ZWF1* 基因的表达量

通过热酚法提取酿酒酵母的总 RNA: 将菌株培养到对数生长期后, 8 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 并用 DEPC 水洗一遍。向菌体内加入等量的酸性玻璃珠, 并加入 400  $\mu$ L TES 溶液 (200 mmol/L Tris-Cl (pH 7.6), 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0)) 和 400  $\mu$ L 水饱和酚溶液, 放置振荡器上振荡 1 min, 65 °C 预热 5 min, 然后振荡 30 s。循环 5 次。放置在冰上 5 min, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 收集上层水相部分并将其转移到一个新的 1.5 mL EP 管中, 加入 400  $\mu$ L 酸酚溶液, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 收集上层水相, 加入 400  $\mu$ L 氯仿溶液, 以 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min。将上层的水相部分转移到一个新的 1.5 mL EP 管中, 加入 40  $\mu$ L 的 3 mol/L NaAc 溶液和 1 mL 预冷无水乙醇溶液, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min。弃掉上清液, 用 70% 乙醇溶清洗一遍, 晾干后加入 50  $\mu$ L 的 DEPC 水溶解 RNA。

根据 CW Biotech 提供的 HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit 中用户操作手册按步骤去除基因组 DNA 并逆转录合成 cDNA。根据 CW Biotech 提供的 UltraSYBR Mixture (lyophilized powder) 中用户操作手册进行 qRT-PCR。分别对 Bga-3 和 K4-DZWF1 菌株中 *ZWF1* 基因和内参基因 *PGK1* 进行 PCR 扩增。数据通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行处理<sup>[11]</sup>。

### 1.3.7 酿酒酵母摇瓶和 5 L 发酵罐发酵培养方法

酿酒酵母摇瓶和 5 L 发酵罐发酵培养方法见参考文献[8]。

## 1.4 分析方法

取发酵液之后通过高效液相色谱 (HPLC)<sup>[12]</sup> 检测葡萄糖二酸的浓度, 检测方法见参考文献[8]。

## 2 结果与分析

### 2.1 肌醇转运蛋白的过量表达有利于葡萄糖二酸的积累

酿酒酵母细胞中有 2 个肌醇转运蛋白, Itr1 和 Itr2<sup>[13]</sup>。Itr1 对肌醇具有高亲和力, 是主要的肌醇转运蛋白, Itr2 是一个肌醇低亲和力转运蛋白<sup>[14]</sup>。为了提高工程菌摄取胞外肌醇的能力, 本研究将 Itr1 的启动子换成组成型启动子  $P_{TDH3}$  进行过量表达, 以提高肌醇的转运效率。将 pHAC181 质粒<sup>[9]</sup>上扩增的 *LEU2* 与以 BY4741 为模板扩增的  $P_{TDH3}$  融合获得 *LEU2-P\_{TDH3}* 2 951 bp (图 1A), 并转化 Bga-3 菌株, 正确的转化子通过引物 PTDH3-CHECK-F2/ITR1-CHECK-R2 检测后能够扩增出 550 bp 片段 (图 1B), 获得 Bga3-Itr1 菌株。以没有替换启动子的 Bga-3 作为对照, 在相同培养条件下进行摇瓶发酵。结果显示, 发酵 240 h 后, 过量表达 *ITR1* 基因的酿酒酵母菌株培养基中的肌醇浓度较 Bga-3 降低了 10% (图 2A), 被转运到胞内的肌醇增加了 0.63 g/L, 葡萄糖二酸积累量提高了 26%, 浓度达到 3.79 g/L (图 2B)。菌体的生长情况也较好 (图 2C)。这也

说明胞外肌醇摄取量的提高有利于葡萄糖二酸的合成。

### 2.2 MIOX4-Udh 融合蛋白的构建及筛选

本研究设计了 12 个可以连接多种蛋白的寡肽连接子将 MIOX4 和 Udh 连接进行融合表达 (1–12), 同时以无寡肽连接子, 即将 MIOX4 和 Udh 直接进行融合表达的情况作为对照 (0) (图 3A–3B)。扩增 *HIS3* 片段 (1 445 bp) 和上述 13 个融合片段  $P_{TEF1}$ -*miox4*-*udh*- $T_{CYC1}$  电泳结果如图 3C–3D 所示。将上述片段整合到 BY4741*opi1* $\Delta$ 缺失株的 *OPI1* 基因的启动子上, 正确的转化子通过引物 MIOX-RT-R/UDH-RT-R 检测后能够扩增出 525 bp 片段 (图 3E)。筛选整合成功的转化子与 Bga-0 菌株 (BY474 *opi1* $\Delta$ 菌株含有游离质粒 (pY26-*miox4*-*udh*)) 在相同培养条件下进行摇瓶发酵 (图 4), 测定整合了不同寡肽连接子连接的 MIOX4-Udh 融合蛋白对葡萄糖二酸产量的影响。结果显示, 通过寡肽连接子 GSG(EAAAK)<sub>2</sub>、(PT)<sub>7</sub>P、(EA3K)<sub>3</sub> (linker4、9、12) 融合表达 MIOX4-Udh 的菌株与游离质粒表达相比葡萄糖二酸积累量显著提高, 其中 linker12(EA3K)<sub>3</sub> 连接子的效果最强, 其葡萄糖二酸产量达到 1.46 g/L, 是表达游离质粒菌株 Bga-0 的 4.84 倍, 较没有连接子连接的 MIOX4-Udh 的菌株 (linker0) 葡萄糖二酸的产量提高近一倍。

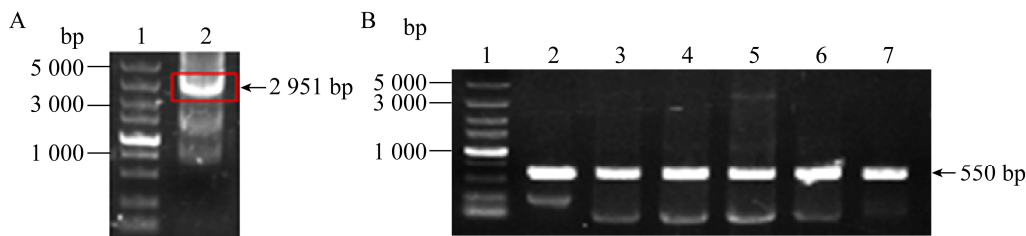


图 1 在 Bga-3 工程菌种过量表达肌醇转运蛋白 Itr1

Figure 1 Overexpression of the inositol transporter Itr1 in Bga-3 strain. (A) PCR amplification of *LEU2-P\_{TDH3}*. (B) Detection of the integration of  $P_{TDH3}$ . Lane 1 is DL5000 marker.

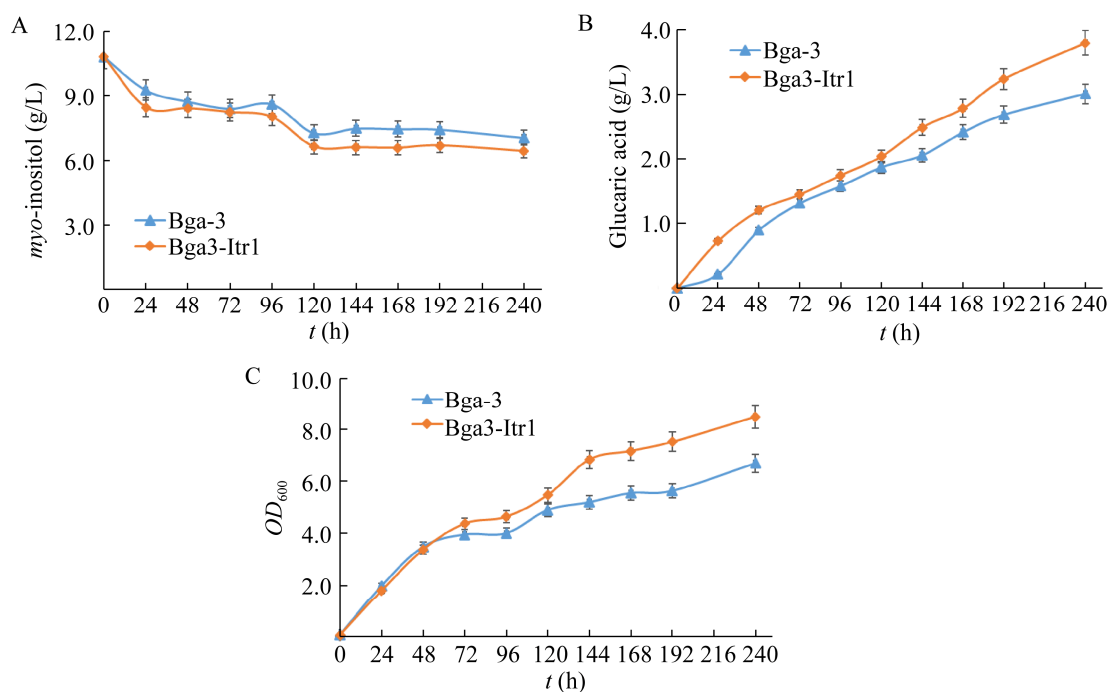


图2 过量表达 *Itr1* 对葡萄糖二酸产量的影响

Figure 2 Effect of overexpression *Itr1* on the production of glucaric acid (A), cell growth rate (B), and residual *myo*-inositol in the culture medium (C).

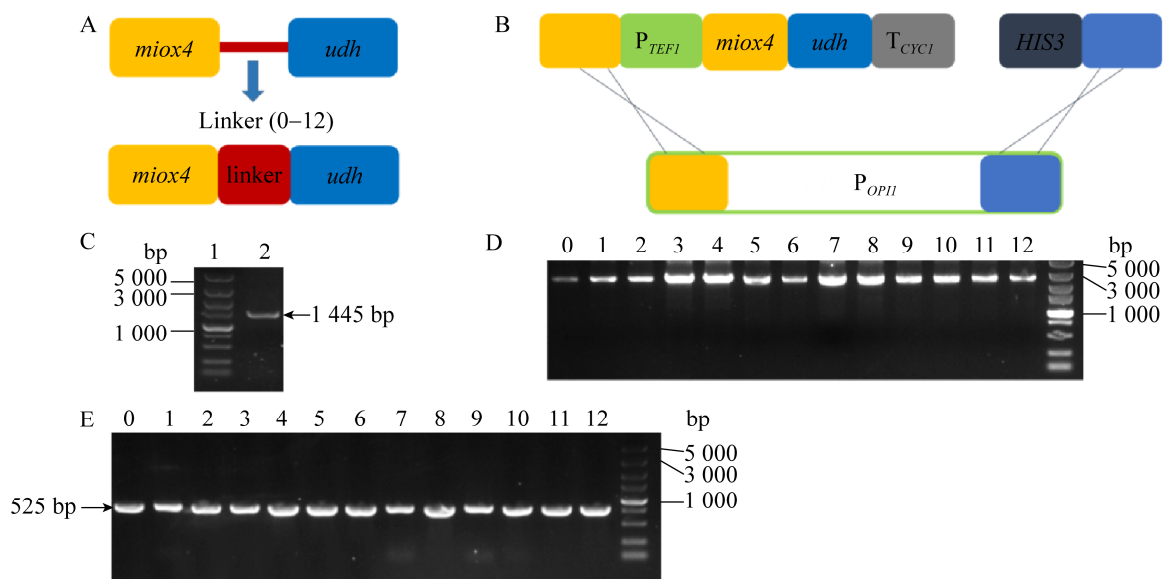


图3 MIOX4-Udh 融合蛋白的构建

Figure 3 Construction of MIOX4-Udh fusion protein. (A) Schematic diagram of *miox4* and *udh* fusion connection with different linkers. (B) Schematic diagram of integrating the MIOX4-Udh fusion protein to the *opil1* promoter of *opilA*. (C) PCR amplification of *HIS3* from Bga-3. Lane 1 is DL5000 marker, lane 2 is *HIS3*. (D) PCR amplification of *P<sub>TEF1</sub>-miox4-udh-T<sub>CYC1</sub>* from Bga-3. Lane 0-12 is MIOX4-Udh fusion protein. (E) Detection of the integration of MIOX4-Udh fusion protein with different linkers. The DNA molecular weight standards is DL5000 marker.



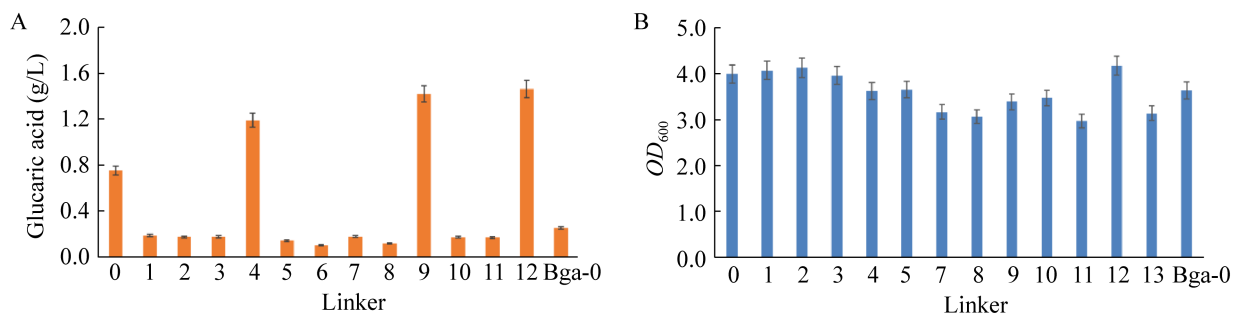


图4 MIOX4-Udh 融合蛋白的筛选结果

Figure 4 Screening of MIOX4-Udh fusion protein. (A) Glucaric acid production. (B) Cell growth rate.

### 2.3 MIOX4-Udh 融合蛋白的 delta 位点整合与筛选

Delta 序列位于酿酒酵母的逆转录转座子 Ty 上的长末端, 是一类高重复率的 DNA 序列, 酿酒酵母染色体 DNA 中至少含有 100 个 delta 重复序列<sup>[15]</sup>。目前, 可将外源基因插入酿酒酵母基因组的 *delta* 序列上使其稳定表达, 这种方法相对比较成熟且重组效率较高。本研究基于同源重组原理, 将前期筛选到的 3 个连接子 GSG(EAAAK)<sub>2</sub>、(PT)<sub>7</sub>P、(EA3K)<sub>3</sub>(linker4、9、12) 连接的活性较高的 MIOX4-Udh 融合蛋白整合到过量表达 *ITR1* Bga3-Itr1 菌株的 *delta* 位点进行高效表达 (图 5), 以提高葡萄糖二酸的产量。酿酒酵母中的 *delta* 位点较多, 拷贝数有差异, 转化整合模块时整合位置是随机的<sup>[16]</sup>。随机挑取约 300 个转化子在试管培养条件下发酵后, 最终获得葡萄糖二酸产量较高的 3 株菌株, 分别命名为 A3、K4、L3 (图 6A)。

以没有用 linker 连接的 Bga-3 为对照菌株, 将上述筛选到的产葡萄糖二酸产量较高的 3 株菌株 A3、K4、L3 进行补料分批发酵, 培养基为添加 60 mmol/L 肌醇的 YPD 培养基, 分别在发酵 24 h 和 48 h 时添加 5 g/L 葡萄糖, 取发酵后的样品通过 HPLC 检测葡萄糖二酸的产量,

最终发酵结果如图 6B 和 6C 所示。实验结果显示, A3、K4 和 L3 菌株的生长情况较对照菌株 Bga-3 没有明显的差异。K4 菌株发酵后的葡萄糖二酸产量最高, 在发酵 240 h 时葡萄糖二酸的产量达 4.3 g/L, 较对照菌株 Bga-3 的葡萄糖二酸产量提高了约 40%。

### 2.4 弱化葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1* 高产葡萄糖二酸

为了进一步提高葡萄糖二酸的产量, 我们将上述筛选到的 A3、K4、L3 菌株的编码磷酸戊糖途径中葡萄糖 6-磷酸脱氢酶的 *ZWF1* 基因的启动子替换为 *BBP1* 基因的启动子进行弱化表达。把融合片段 MET-P<sub>BBP1</sub> (2 900 bp) (图 7A) 整合到 A3、K4、L3 菌株的基因组上, 在 SD-MET 的平板上进行筛选。提取转化子的基因组进行 PCR 检测 (图 7B, lane 2-4), 获得重组菌 A3-D<sub>ZWF1</sub>、K4-D<sub>ZWF1</sub> 和 L3-D<sub>ZWF1</sub>。

以 Bga-3 为对照菌株, 上述 3 个重组菌在摇瓶发酵时, K4-D<sub>ZWF1</sub> 菌株在发酵 240 h 时葡萄糖二酸的产量最高, 可以达到为 5.5 g/L (图 8), 较 K4 菌株提高了 27.9%, 较对照菌株 Bga-3 产量提高了约 60%。qRT-PCR 检测结果显示, K4-D<sub>ZWF1</sub> 菌株中 *ZWF1* 基因的表达量较 K4 菌株降低了近 3 倍 (图 9)。

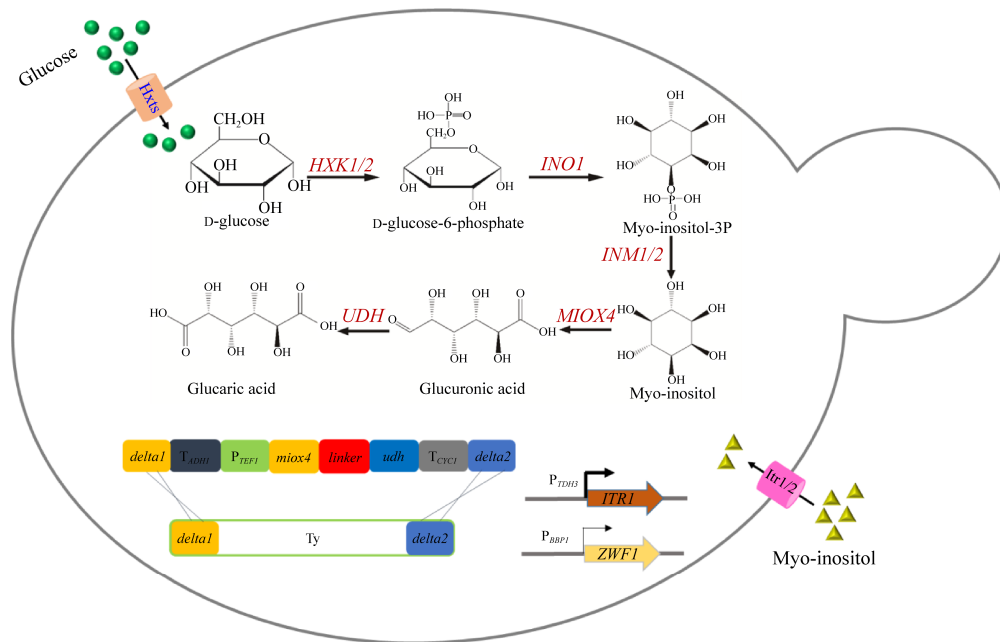


图5 酿酒酵母中葡萄糖二酸高效生物合成途径的构建策略

Figure 5 Construction strategies for over-producing glucaric acid in *S. cerevisiae*.

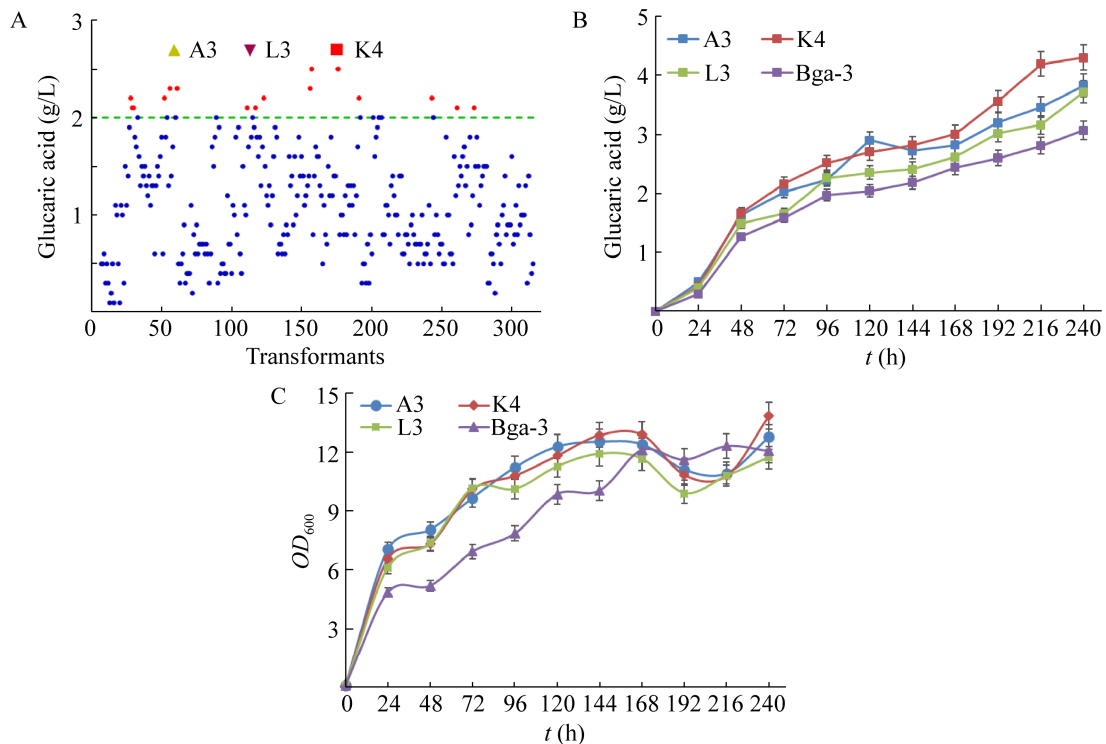


图6 表达 MIOX4-Udh 融合蛋白的酿酒酵母重组菌的筛选及摇瓶发酵结果

Figure 6 Screening and shake flask fermentation of the recombinant *S. cerevisiae* strains that express the MIOX4-Udh fusion protein. (A) Screening result of the recombinant strains. (B) Glucaric acid production. (C) Cell growth rate.

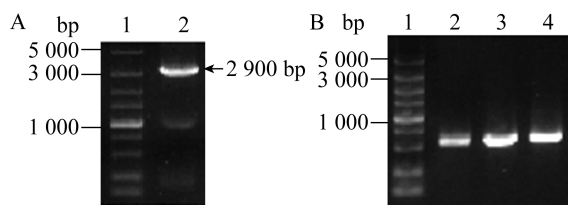


图 7 在 A3、K4 和 L3 菌株中弱化表达 *ZWF1* 基因的验证结果

Figure 7 Attenuated expression of *ZWF1* gene in selected A3, K4 and L3 strains. (A) PCR amplification result of MET- $P_{BBP1}$ . (B) Detection results of the integration of  $P_{BBP1}$ . Lane 1 is DL5000 marker. Lane 2–4 is the detection of A3- $D_{ZWF1}$ , K4- $D_{ZWF1}$ , and L3- $D_{ZWF1}$ , respectively.

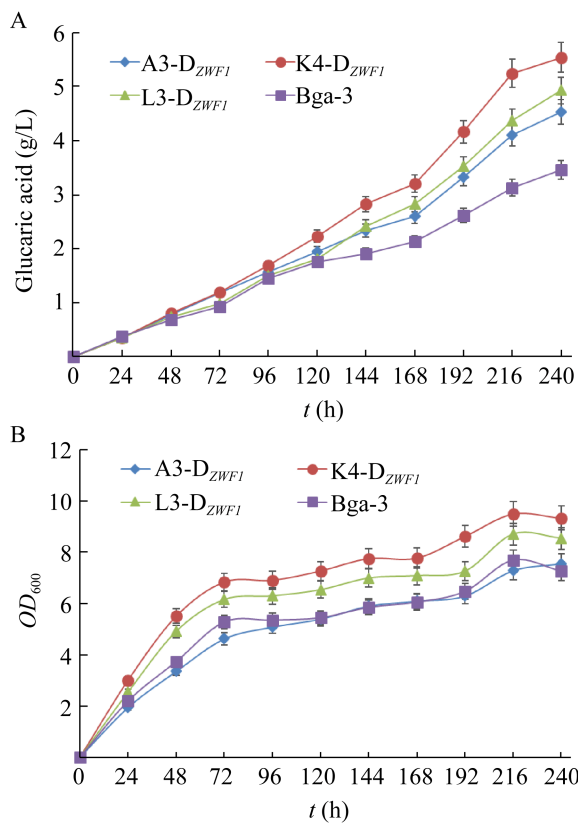


图 8 弱化表达 *ZWF1* 基因的酿酒酵母重组菌的摇瓶发酵结果

Figure 8 Shake flask fermentation of the recombinant *S. cerevisiae* strains with weakened expression of *ZWF1* gene. (A) Glucaric acid production. (B) Cell growth rate.

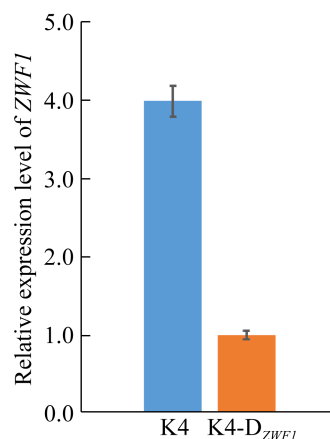


图 9 *ZWF1* 的相对转录水平检测结果

Figure 9 Relative transcription expression levels of *ZWF1*.

## 2.5 5 L 发酵罐中葡萄糖二酸产量的检测

将 K4- $D_{ZWF1}$  菌株在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵。在发酵过程中，肌醇浓度添加量为 60 mmol/L。当菌株生长进入对数期后，分别在 24 h 进行第一次补料，浓度为 5 g/L 葡萄糖，发酵 48 h 再一次补加 5 g/L 葡萄糖。结果显示，在发酵 264 h 时，葡萄糖二酸产量最高，达到 10.85 g/L，较前期研究报道的 6.0 g/L<sup>[8]</sup>提高了 80% (图 10)。

## 3 讨论

酿酒酵母具有耐受低温、可低 pH 发酵、没有噬菌体感染、适合大规模发酵、易分离和高抗逆性等特点，且可以作为单细胞蛋白用于饲料、食品等行业。因而酿酒酵母已经广泛用于产有机酸的相关研究<sup>[17]</sup>。Prather 课题组将外源 *miox4* 和 *udh* 基因引入酿酒酵母细胞进行异源表达，实现了在酿酒酵母细胞中利用葡萄糖和外加肌醇产葡萄糖二酸<sup>[18]</sup>。

肌醇作为一种许多生物生长的必需营养物质，同时也是磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI)

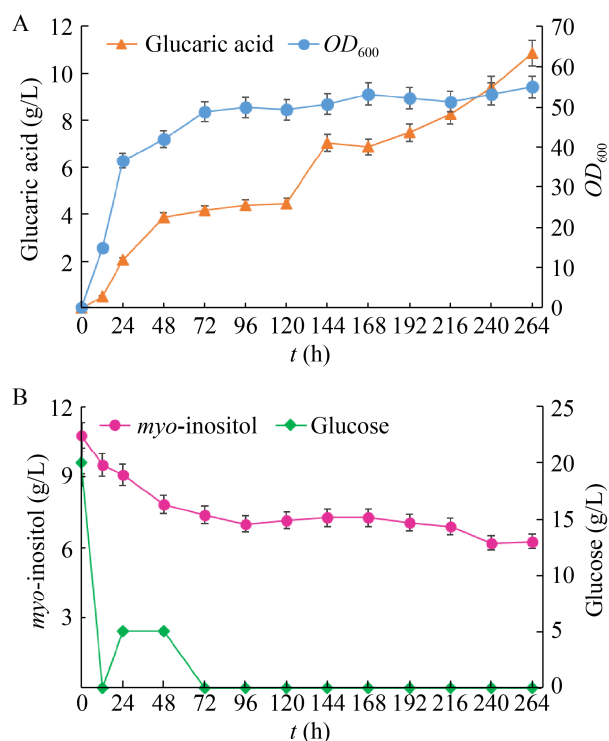


图 10 酿酒酵母重组菌 5 L 发酵罐分批发酵结果  
Figure 10 Fed-batch fermentation of the recombinant *S. cerevisiae* strains in a 5 L fermenter. (A) Glucaric acid production and cell growth rate. (B) Glucose consumption and residual *myo*-inositol.

合成的前体, PI 在细胞信号转导和细胞内结构方面亦具有重要作用<sup>[19]</sup>。人体和一些微生物主要通过 2 种途径获得肌醇。一种是通过肌醇转运蛋白将肌醇从细胞外转运到细胞内,另一种是细胞通过两个关键酶的催化自身合成肌醇<sup>[20]</sup>。酿酒酵母细胞有肌醇合成途径,可以通过 Ino1 (肌醇-3-磷酸合成酶) 和 Inm1/2 (肌醇单磷酸酶) 将葡萄糖-6-磷酸转化为肌醇<sup>[20-21]</sup>, 其中 *INO1* 基因的表达受肌醇浓度的负调控<sup>[22]</sup>, 而 *INM1* 基因受肌醇正调控<sup>[23-24]</sup>。在葡萄糖二酸合成过程中, 肌醇是肌醇加氧酶 MIOX4 的底物, 由于 MIOX4 的不稳定性, 细胞内高浓度的肌醇有助于维持其稳定性。本研究发现, 通过将酿酒酵母自身

的肌醇转运蛋白编码基因 *ITR1* 的启动子替换为组成型启动子  $P_{TDH3}$  进行过量表达后, 细胞摄取胞外肌醇的能力有所提高, 从而使肌醇更多地流向葡萄糖二酸合成途径。在 YPD 培养基中进行补料分批发酵时, 肌醇的利用率和葡萄糖二酸的产量都有明显的提高。

有研究发现, 在该代谢途径中 MIOX4 表达水平远低于 Ino1 和 Udh, 由于 MIOX4 的不稳定性, 在稳定期时即使在没有葡萄糖二酸的情况下, MIOX4 的活力也会迅速下降<sup>[1]</sup>。因此, MIOX4 的稳定性是葡萄糖二酸合成途径的限速步骤。本研究运用寡肽连接子将肌醇加氧酶 MIOX4 和糖醛酸脱氢酶 Udh 进行融合表达, 有效地提高了葡萄糖二酸合成途径的效率和葡萄糖二酸的产量。此外, 途径基因的拷贝数及表达的稳定性也会影响酵母菌株葡萄糖二酸的积累。本研究选择酵母基因组中的 delta 序列作为整合位点进行外源基因的表达, 获得多拷贝 delta 位点整合型的表达菌株, 从而增加了葡萄糖二酸合成途径相关基因的拷贝数。

葡萄糖-6-磷酸是合成肌醇的前体, 本研究通过弱化表达葡萄糖 6-磷酸脱氢酶基因 *ZWF1*, 使葡萄糖二酸的产量在摇瓶发酵条件下提高到 5.5 g/L, 较相同发酵条件下的出发菌株 Bga-3 提高了 60%; 在 5 L 发酵罐中, 该菌株的葡萄糖二酸最高产量达 10.85 g/L, 为目前报道的最高值 (表 3)。在后续的实验中, 可以从以下两个方面继续展开研究。

(1) 葡萄糖二酸的前体物质肌醇有内源合成途径和外源转运途径, 后续研究可以削弱与肌醇竞争葡萄糖的其他途径以增加内源肌醇的积累, 同时通过增加外源肌醇添加量<sup>[25]</sup>来提高葡萄糖二酸的产量。

表3 不同宿主菌中葡萄糖二酸的产量

Table 3 Production of glucaric acid in different hosts

Hosts	Pathways or genes	Production (g/L)	Carbon sources	References
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>mMIOX, udh</i>	6.61	glucose, <i>myo</i> -inositol	[26]
<i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	<i>INO1, SUMO-mMIOX, udh</i>	4.85	<i>myo</i> -inositol	[6]
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1	<i>mMIOX, udh</i>	1.60	glucose, <i>myo</i> -inositol	[18]
<i>E. coli</i> cell-free lysates	<i>mMIOX, udh</i>	7.30	sucrose	[27]
<i>E. coli</i> cell-free lysates	<i>udh</i>	9.60	glucuronic acid	[28]
<i>S. cerevisiae</i> BY4471	<i>AtMIOX, udh</i>	6.00	glucose, <i>myo</i> -inositol	[8]
<i>S. cerevisiae</i> BY4471	<i>AtMIOX, udh</i>	10.85	glucose, <i>myo</i> -inositol	This study

(2) 在发酵过程中,培养基成分差异会影响菌体的生长和葡萄糖二酸的产量,后续可以通过对肌醇浓度、补料时间浓度进行优化来提高葡萄糖二酸的生产能力。

## REFERENCES

- [1] Moon TS, Yoon SH, Lanza AM, et al. Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(3): 589-595.
- [2] Bozell JJ, Petersen GR. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem*, 2010, 12(4): 539-554.
- [3] Pamuk V, Yilmaz M, Alicilar A, et al. The preparation of D-glucaric acid by oxidation of molasses in packed beds. *J Chem Technol Biotechnol*, 2001, 76(2): 186-190.
- [4] Lakatos A, Bertani R, Kiss T, et al. Al<sup>III</sup> ion complexes of saccharic acid and mucic acid: a solution and solid-state study. *Chem Eur J*, 2004, 10(5): 1281-1290.
- [5] Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16015.
- [6] Shiue E, Prather KLJ. Improving D-glucaric acid production from *myo*-inositol in *E. coli* by increasing MIOX stability and *myo*-inositol transport. *Metab Eng*, 2014, 22: 22-31.
- [7] Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*, 2012, 7(5): 620-634.
- [8] 陈娜. 代谢改造酿酒酵母生产葡萄糖二酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [9] Chen N. Study on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of glucaric acid[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [9] Jiang L, Niu S, Clines KL, et al. Analyses of the effects of Rck2p mutants on Pbs2p<sup>DD</sup>-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* identify a MAP kinase docking motif, and unexpected functional inactivation due to acidic substitution of T379. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271(2): 208-219.
- [10] Zhao Y, Du J, Xiong B, et al. ESCRT components regulate the expression of the ER/Golgi calcium pump gene *PMRI* through the Rim101/Nrg1 pathway in budding yeast. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(5): 336-344.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 1998, 393(6683): 365-369.
- [13] Wang Y, Liu TB, Delmas G, et al. Two major inositol transporters and their role in cryptococcal virulence. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(5): 618-628.
- [14] Robinson KS, Lai K, Cannon TA, et al. Inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by transcriptional and degradative endocytic mechanisms during the growth cycle that are distinct from inositol-induced regulation. *Mol Biol Cell*, 1996, 7(1): 81-89.
- [15] Lee FW, da Silva NA. Sequential delta-integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*, 1997, 13(4): 368-373.
- [16] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Nat Biotechnol*, 1994, 12(2): 181-184.

- [17] Borodina I, Nielsen J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol J*, 2014, 9(5): 609-620.
- [18] Gupta A, Hicks MA, Manchester SP, et al. Porting the synthetic D-glucaric acid pathway from *Escherichia coli* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J*, 2016, 11(9): 1201-1208.
- [19] Henry SA, Gaspar ML, Jesch SA. The response to inositol: regulation of glycerolipid metabolism and stress response signaling in yeast. *Chem Phys Lipids*, 2014, 180: 23-43.
- [20] Ye C, Bandara WM, Greenberg ML. Regulation of inositol metabolism is fine-tuned by inositol pyrophosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2013, 288(34): 24898-24908.
- [21] Marques WL, Anderson LA, Sandoval L, et al. Sequence-based bioprospecting of *myo*-inositol oxygenase (Miox) reveals new homologues that increase glucaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 140: 109623.
- [22] Graves JA, Henry SA. Regulation of the yeast *INO1* gene: the products of the *INO2*, *INO4* and *OPI1* regulatory genes are not required for repression in response to inositol. *Genetics*, 2000, 154(4): 1485-1495.
- [23] Zhang L, Di J. The transcriptional activator Ino2p dissociates from the yeast *INM1* promoter in induction. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(12): 863-868.
- [24] Murray M, Greenberg ML. Expression of yeast *INM1* encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. *Mol Microbiol*, 2000, 36(3): 651-661.
- [25] Teng F, You R, Hu M, et al. Production of D-glucuronic acid from *myo*-inositol using *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst overexpressing a novel *myo*-inositol oxygenase from *Thermothelomyces thermophile*. *Enzyme Microb Technol*, 2019, 127: 70-74.
- [26] Liu Y, Gong X, Wang C, et al. Production of glucaric acid from *myo*-inositol in engineered *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 91: 8-16.
- [27] Su HH, Guo ZW, Wu XL, et al. Efficient bioconversion of sucrose to high-value-added glucaric acid by *in vitro* metabolic engineering. *Chem Sus Chem*, 2019, 12(10): 2278-2285.
- [28] Petroll K, Care A, Waterstraat M, et al. Mixed-mode liquid chromatography for the rapid analysis of biocatalytic glucaric acid reaction pathways. *Anal Chim Acta*, 2019, 1066: 136-145.

(本文责编 陈宏宇)