

## 研究报告

# 酿酒酵母肌醇转运蛋白突变体的构建及其在葡萄糖二酸合成中的应用

左方雨<sup>1,2</sup>, 赵运英<sup>1,2</sup>, 邓禹<sup>\*1,2</sup>

1 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

左方雨, 赵运英, 邓禹. 酿酒酵母肌醇转运蛋白突变体的构建及其在葡萄糖二酸合成中的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4429-4450.

ZUO Fangyu, ZHAO Yunying, DENG Yu. The *myo*-inositol transporter mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: construction and application in glucaric acid production[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4429-4450.

**摘要:**【背景】酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)自身具有高亲和力的肌醇转运蛋白 Itr1, 前期构建的酿酒酵母工程菌在合成葡萄糖二酸时可通过 Itr1 蛋白对外源肌醇进行转运。但肌醇会诱导 Itr1 蛋白的降解, 因此对外源肌醇的低转运效率限制了葡萄糖二酸产量的进一步提高。【目的】研究肌醇转运蛋白 Itr1 的 N 端和 C 端潜在的泛素化位点-赖氨酸残基突变对该蛋白降解的影响, 并进一步分析这些突变体对酿酒酵母细胞摄取胞外肌醇的能力和葡萄糖二酸生物合成的影响。【方法】使用融合 PCR 方法将不同基因元件进行融合, 得到用于基因组整合的片段。再通过同源重组在酿酒酵母基因组上整合这些片段, 分别构建含 Itr1 突变体、含 Itr1 和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合蛋白的工程菌。通过荧光显微镜观察确定融合蛋白的膜定位情况, 高效液相色谱(HPLC)方法检测葡萄糖二酸的合成情况, 转录组测序和实时荧光定量 PCR 方法检测胞内基因转录水平的变化。【结果】发现了 C 端突变对 Itr1 蛋白降解具有明显的弱化作用, 在发酵条件下, N 端突变菌株中 Itr1 蛋白膜定位完整的细胞比例在短期内也有所增加。摇瓶发酵过程中 N 端突变菌株的葡萄糖二酸产量和菌体生物量较对照菌株都明显提高。进一步发现 N 端突变菌株中基因 *ino1*、*inm1* 被上调, *pis1* 的表达被下调, 提高了胞内肌醇的积累并促进了肌醇流向葡萄糖二酸合成的代谢流。在此基础上, 进一步进行发酵条件优化, 葡萄糖二酸产量达到 3.30 g/L, 较对照菌株提高了 95.3%。【结论】本研究确定了 C 端突变对肌醇转运蛋白 Itr1 降解的弱化作用, 并发现 N 端突变可以促进葡萄糖二酸产量的提高, 为深入研究肌醇利用及进一步提高葡萄糖二酸产量奠定了理论基础。

**关键词:** 酿酒酵母; 葡萄糖二酸; 肌醇; 肌醇转运蛋白; 荧光定位

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFA0911800); 国家自然科学基金(22377039); 江苏省杰出青年基金(BK20220089)  
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFA0911800), the National Natural Science Foundation of China (22377039), and the Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK20220089).

\*Corresponding author. E-mail: dengyu@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-03-11; Accepted: 2024-03-29; Published online: 2024-04-28

# The *myo*-inositol transporter mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: construction and application in glucaric acid production

ZUO Fangyu<sup>1,2</sup>, ZHAO Yunying<sup>1,2</sup>, DENG Yu<sup>\*1,2</sup>

1 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

**Abstract:** **[Background]** *Saccharomyces cerevisiae* has the high-affinity *myo*-inositol transporter Itr1, and we have constructed a *S. cerevisiae* strain capable of transporting exogenous *myo*-inositol via Itr1 during the synthesis of glucaric acid. However, the Itr1 degradation induced by *myo*-inositol hinders the efficient transport of exogenous *myo*-inositol, limiting the potential for increasing the glucaric acid production. **[Objective]** To study the effects of mutating lysine residues at potential ubiquitination sites located at the N-terminus and C-terminus of Itr1 on the degradation of Itr1 and further investigate the effects of these mutations on extracellular *myo*-inositol uptake and glucaric acid biosynthesis in budding yeast cells. **[Methods]** Different genetic elements were fused by fusion PCR, and the obtained fragments were then integrated on the *S. cerevisiae* genome by homologous recombination to construct engineered stains containing Itr1 mutants and Itr1 and GFP (green fluorescent protein, GFP) fusion protein, respectively. The membrane localization of the fusion protein was visualized by fluorescence microscopy. The production of glucaric acid was quantified by HPLC, RNA sequencing and qRT-PCR were employed to analyze changes in the intracellular gene transcription levels. **[Results]** The C-terminal mutation weakened Itr1 degradation. The proportion of cells with complete Itr1 membrane localization in the N-terminal mutant strain increased in a short term of fermentation. The glucaric acid production and biomass of the N-terminal mutant strain during shake flask fermentation significantly increased compared with those of the control strain. Furthermore, the N-terminal mutant strain presented up-regulated expression of *ino1* and *inm1* and down-regulated expression of *pis1*, which increased the accumulation of intracellular *myo*-inositol and facilitated the flow of *myo*-inositol to glucaric acid synthesis. On this basis, the fermentation conditions were optimized, after which the glucaric acid titer reached 3.30 g/L, 95.3% higher than that of the control strain. **[Conclusion]** This study confirmed the weakening effect of the C-terminal mutation on the degradation of Itr1 and discovered that the N-terminal mutation increased glucaric acid production. The findings lay a theoretical foundation for further improving *myo*-inositol utilization and glucaric acid production.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; glucaric acid; *myo*-inositol; *myo*-inositol transporter; fluorescence localization

葡萄糖二酸(glucaric acid, GA)是一种自然界中天然存在的二元有机酸,在食品、医药、化工等领域有着广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。目前,葡萄糖二酸及其衍生物可以作为单体被用于聚合物的合成<sup>[3]</sup>,参与癌症的辅助治疗<sup>[4]</sup>,充当食品添加剂<sup>[5]</sup>或金属防腐的螯合剂<sup>[6]</sup>等。葡萄糖二酸被美国能源部列举为“最具价值的生物炼制产品”(top value added chemicals from biomass)之一<sup>[7]</sup>,预计到2024年葡萄糖二酸的市场将超过4.4亿美元<sup>[8]</sup>。

天然存在的葡萄糖二酸含量很低,获取困难,远远不能满足市场的实际需求。因此人工合成葡萄糖二酸是工业生产的主要方式。在工业上,化学催化氧化是生产葡萄糖二酸的主要形式,早期的葡萄糖二酸生产是通过硝酸氧化来实现的,这种方法的得率低,污染很大<sup>[9-10]</sup>。随着化合物2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO)的发现与运用,葡萄糖二酸的化学生产得到了发展,但仍存在产物选择性低,污染环境等问题<sup>[11-12]</sup>。生物法生产有机酸是被研究者们广泛关注的研究领域,该类方法在环境友好和产物控制等方面具有明显优势。在2009年, Moon等<sup>[13]</sup>在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中构建了第一个葡萄糖二酸的生物合成途径以后,以大肠杆菌和酵母为主的工程菌株被广泛用于构建葡萄糖二酸的合成途径。在这些途径中,肌醇加氧酶(*myo*-inositol oxygenase, Miox)和糖醛酸脱氢酶(uronate dehydrogenase, Udh)被普遍当作途径中的关键酶催化底物肌醇(*myo*-inositol, MI)生成葡萄糖二酸,肌醇加氧酶主要催化肌醇合成葡萄糖醛酸,而糖醛酸脱氢酶催化葡萄糖醛酸合成葡萄糖二酸(图1),且肌醇对肌醇加氧酶有激活作用<sup>[13]</sup>。2016年, Gupta等<sup>[14]</sup>使用了来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 Miox 和来源于丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的

Udh 在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中构建了葡萄糖二酸的生物合成途径,该工程菌株的葡萄糖二酸最高产量为1.60 g/L。Marques等<sup>[15]</sup>通过表达马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffeii*)来源的 Miox 在酿酒酵母中构建了葡萄糖二酸合成途径,使葡萄糖二酸的产量达到了1.85 g/L。Chen等<sup>[16]</sup>将 *A. thaliana* 来源的 Miox 和 *P. syringae* 来源的 Udh 整合到酿酒酵母的 delta 位点构建了菌株 Bga-3,在5 L 发酵罐中葡萄糖二酸产量达到6.0 g/L。近年来,不少研究者开始关注细胞水平的工程改造。微生物细胞活力(microbial cell viability, MCV)是工业微生物过程性能的重要决定因素<sup>[17]</sup>, Guo等<sup>[18]</sup>通过第二密码子工程微调细胞寿命有关的神经酰胺合成酶(Lag1)减少胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累,进而提高酿酒酵母细胞的 MCV,使得葡萄糖二酸的产量达到了9.50 g/L。Zhao等<sup>[19]</sup>在菌株 Bga-3 基础上通过发酵工艺优化和代谢改造,使葡萄糖二酸产量提高到了15.6 g/L。

肌醇是酿酒酵母必需的营养物质,参与细胞生长和分裂,也是葡萄糖二酸生物合成过程中的关键前体物质。酿酒酵母细胞主要通过2种途径获得肌醇:一种是通过肌醇转运蛋白从胞外摄取肌醇,另一种是细胞通过2个酶的催化自身合成肌醇。在酵母细胞中肌醇由葡萄糖-6-磷酸经内源性肌醇-1-磷酸合成酶(Ino1)和肌醇单磷酸酶(Inm1/2, Inm1 起主要作用)催化合成<sup>[14]</sup>(图1)。酿酒酵母中存在2种肌醇转运蛋白 Itr1 和 Itr2。Itr1 在肌醇转运中起主要作用,对肌醇具有高亲和力; Itr2 是一个肌醇低亲和力转运蛋白。有研究表明,肌醇转运蛋白(Itr1)转录水平的表达受到肌醇的抑制,并且在对数期时会被肌醇诱导而发生降解<sup>[20]</sup>,这极大地限制了外源肌醇向胞内的转运。进一步的研究显示,该蛋白的降解过程和泛素化修饰有关<sup>[21]</sup>。葡萄糖

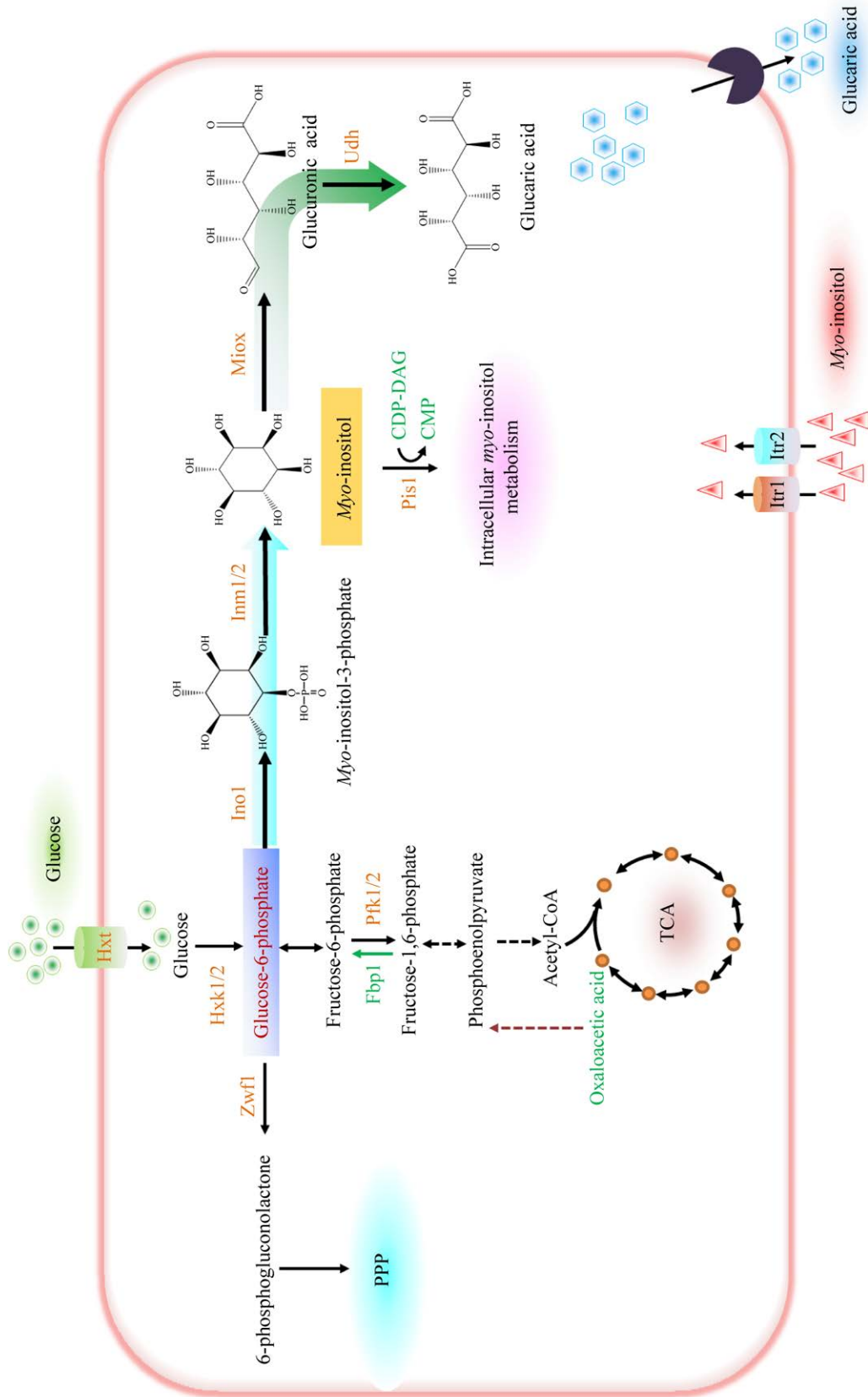


图 1 酿酒酵母葡萄糖二酸生物合成途径

Figure 1 The glucaric acid biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.

二酸的合成途径建立在胞内肌醇的合成上,而肌醇合成主要来源于糖异生作用积累的葡萄糖-6-磷酸<sup>[16]</sup>,从而导致葡萄糖到葡萄糖二酸的转化率非常低。另一方面,肌醇的价格(3–5 万元/t)较葡萄糖二酸(纯品)的价格(1–3 万元/kg)低很多,由肌醇合成葡萄糖二酸具有很高的经济性,因此,迫切需要提高酵母细胞转运胞外肌醇的能力。

本研究以构建的葡萄糖二酸合成菌株 Bga-3 为出发菌株,对肌醇转运蛋白 Itr1 的降解机制进行研究,针对该蛋白可能的泛素化位点进行点突变,并将其过量表达,提高 Itr1 蛋白在肌醇诱导条件下的基因表达和蛋白水平,以提高发酵过程中的肌醇转运率,并将其应用于葡萄糖二酸的生物合成。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

本研究所用菌株和质粒详见表 1。

### 1.2 培养基

酿酒酵母普通培养使用酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)。大肠杆菌培养使用 LB 培养基,以上培养基按参考文献[19]进行配制。G418 抗性筛选在 YPD 培养基中添加终浓度为 200.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 G418 硫酸盐溶液。发酵培养基在普通培养基的基础上添加一定量肌醇和 0.1 mol/L 氯化镁。观察荧光定位的酿酒酵母分别使用以半乳糖为碳源的 YPD 培养基(其他成分不变)和普通 YPD 培养基进行培养。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Characteristic	Source
Strain		
JM109	For plasmid construction	Lab preserved
BY4741 <i>opi1Δ</i>	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, opi1Δ0</i>	Lab preserved
Bga-3	BY4741 <i>opi1Δ</i> carrying <i>miox4, udh</i> and <i>his3</i>	Lab preserved
Bga-3- <i>itr1Δ</i>	Bga-3::leu2, <i>itr1Δ</i>	This study
$P_{idh3}$ -Itr1	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i>	This study
Itr1-N	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -N::ura3	This study
Itr1-C	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -C::ura3	This study
Itr1-NC	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -NC::ura3	This study
$P_{gal1}$ -GFP-I	Bga-3::leu2::kanMX- $P_{gal1}$ -gfp- <i>itr1</i> ::ura3	This study
$P_{gal1}$ -GFP-N	Bga-3::leu2::kanMX- $P_{gal1}$ -gfp- <i>itr1</i> -N::ura3	This study
$P_{gal1}$ -GFP-C	Bga-3::leu2::kanMX- $P_{gal1}$ -gfp- <i>itr1</i> -C::ura3	This study
$P_{gal1}$ -GFP-NC	Bga-3::leu2::kanMX- $P_{gal1}$ -gfp- <i>itr1</i> -NC::ura3	This study
I-GFP	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -gfp::kanMX	This study
N-GFP	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -N-gfp::kanMX	This study
C-GFP	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -C-gfp::kanMX	This study
NC-GFP	Bga-3::leu2:: $P_{idh3}$ - <i>itr1</i> -NC-gfp::kanMX	This study
Plasmid		
pHAC181	<i>E. coli</i> and <i>S. cerevisiae</i> shuttle plasmid, Amp, <i>leu2</i>	Lab preserved
pGFP33	<i>E. coli</i> and <i>S. cerevisiae</i> shuttle plasmid, Amp, <i>ura3, gfp</i>	Lab preserved
pRS316	<i>E. coli</i> and <i>S. cerevisiae</i> shuttle plasmid, Amp, <i>ura3</i>	Lab preserved
p414-Cas9-KanMX	Cas9 protein expression plasmid, Amp <sup>R</sup> , <i>kanMX</i>	Lab preserved
pFA6a- $P_{gal1}$ -GFP	GFP expression plasmid, Amp <sup>R</sup> , <i>kanMX</i>	Lab preserved

SD-LEU 和 SD-URA 培养基的配方为: 0.17%无氮基酸酵母氮源, 2%葡萄糖, 0.5%硫酸铵, 1×不含亮氨酸或尿嘧啶的氨基酸混合物<sup>[16]</sup>。配制固体培养基时加入 2%琼脂。

### 1.3 主要试剂和仪器

本研究所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 2)。

DNA 聚合酶、同源重组酶和 HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒, 南京诺唯赞生物科

技股份有限公司; DNA 纯化和质粒提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 葡萄糖二酸标准品, Sigma 公司; 肌醇标准品, Solarbio 公司; Ultra-Pure RNA Kit、Ultra SYBR Mixture 试剂盒, 康为世纪生物科技股份有限公司。基因扩增仪, 艾本德公司; 凝胶成像仪、实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 多功能酶标仪, Bio-Tek 公司; 荧光显微镜, 尼康公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦公司。

表 2 本研究所用引物信息

Table 2 Primer information used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
LEU-F	AGGTCGCCGCGCATATAC
LEU-R	GAGAAGAACGGCATAGTGCGTG
URA-F	TACAGGCAAGCGATCCGTC
URA-R	CCATCGCCCTGATAGACGG
418-F	GACATGGAGGCCAGAATACC
418-R	CAGTATAGCGACCAGCATTACAT
GFP-F	ATGTCTTAATTAACAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC
GFP-R	TTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATC
PTDH3-F	CTATTTTCGAGGACCTTGTCACCTTGAG
PTDH3-R	TTTGTTTGTTTATGTGTGTTTATTCGAAACTAAGTTC
IC3-F	ATGGGAATACACATACCATATCTCACG
G8-F	TTGAAATATGAACCAACTCAAGAGATTATAGAGGATATA
8G-F	CAGTATAGCGACCAGCATTACATAC
GAL1-F	<u>CGCTTAACTGCTCATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCCGAG</u>
GAL1-R	<u>TAAAGACATTTTGAGATCCGGGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAAT</u>
1G-F	<u>TACACATGGCATGGATGAACTATACAAAATGGGAATACACATACCATATCTCACG</u>
81-R	<u>CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGAATTCCTATATATCCTCTATAATCTCTTGAGTTGGTTCATATTTCAA</u>
Y-ICU-F	AGGTTTTGGATGCAGGTATCAGAAC
Y-ICU-R	GGTAGGCATCTCATCTCATCCCAG
Y-CGFP-F1	GCTACAAACTGGGCTGGTTC
Y-CGFP-R1	GCACGTTCCCTTATATGTAGCTTTCGAC
Y-NGFP-R	TCGAGATCAGCGCACTGG
INO1-F	AGGAAGGCGTTAAGCAACCA
INO1-R	CACCAAGGACATCTTCGCCT
INM1-F	ATCCAAGTCCGGCACTCAAA
INM1-R	GAGCCCAAGAGAGGTACAGC
PIS1-F	CTACTGGATGCGCTAGACGG
PIS1-R	AACACATCAAGCCAGCGGTA
ALG9-F	GTAGGTGCCACCAGACACTC
ALG9-R	CAGGAGCAAGCTTCCCGTAA

下划线为同源臂

Underline is the homologous arm.

## 1.4 整合片段的构建

野生型 *itr1* 的敲除片段构建: 基因敲除使用 LEU2 标记, 以 pHAC181 质粒为模板, LEU-F 和 LEU-R 为引物, 扩增得到该标记的基因 *leu2*。提取酿酒酵母基因组<sup>[22]</sup>为模板, PTDH3-F 和 PTDH3-R 为引物, 扩增得到  $P_{tdh3}$  片段, 并将该片段与 *leu2* 片段进行融合 PCR 得到 *leu2-P\_{tdh3}* 融合片段, 再在片段两端加上同源臂对野生型 *itr1* 进行敲除, 在敲除的同时整合  $P_{tdh3}$  作为后续整合突变体和野生型 *itr1* 的启动子。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, DNA (50–200 ng/ $\mu$ L) 0.5–2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 0.5–2.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。

突变体及野生型 *itr1* 的整合片段构建: 泛素分子的 C 末端可与底物蛋白的赖氨酸残基结合导致底物蛋白的泛素化, 这些可被结合的赖氨酸残基主要都出现在蛋白的末端, 而将赖氨酸残基突变为精氨酸残基后可以阻断这种结合, 使底物蛋白不能被泛素化<sup>[23–24]</sup>。通过查询 UniProt 数据库确定 Itr1 蛋白 N 端(1–243 bp, K11R, K38R, K41R, K64R)和 C 端(1 594–1 755 bp, K547R, K553R, K556R, K560R, K561R, 563R, K573R)的胞内序列及赖氨酸位点, 针对这 2 个小片段中的所有赖氨酸残基设计单突变碱基, 将该氨基酸突变为精氨酸, 其余碱基序列不变。设计完成后的突变片段由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成。获得突变片段后通过融合 PCR 分别构建 N 端突变、C 端突变、NC 两端突变的 Itr1 蛋白的基因序列。此外, 以 pGFP33 质粒为模板扩增  $T_{cyc1}$  片段, 以 pRS316 质粒为模板扩增基因 *ura3*, 通过融合 PCR 得到含有突变的 *itr1-T\_{cyc1-ura3}* 片段, 无突变片段中的 *itr1* 片段以酿酒酵母 BY4741 *opi1 $\Delta$*  基因组为模板扩增得到。

含 GFP 整合片段的构建: 以 GFP 为标记指示 Itr1 蛋白的降解过程是常见的研究方法, 这种方法被广泛应用于研究目的蛋白的亚细胞定位和蛋白稳定性<sup>[25]</sup>。因此本研究中以 pGFP33 质粒为模板扩增 GFP 的基因片段, 以 p414-Cas9-KanMX 质粒为模板扩增基因 *kanMX*, 以 pFA6a- $P_{gal1}$ -GFP 质粒为模板扩增  $P_{gal1}$  片段, 以上片段分别通过融合 PCR 得到 *gfp-kanMX*、*kanMX-P\_{gal1-gfp}* 片段, 用于后续基因组整合。

## 1.5 重组菌株的构建

通过同源重组的方式进行重组菌株的构建。将携带同源臂的 *leu2-P\_{tdh3}* 片段转化到菌株 Bga-3 中用于敲除 *itr1*。在 SD-LEU 固体培养基上挑取转化子进行 PCR 验证(PCR 反应体系和条件见 1.4), 条带正确的表示 *itr1* 被敲除, 即得到 Bga-3-*itr1 $\Delta$* 。

分别向菌株 Bga-3-*itr1 $\Delta$*  中转化 4 种 *itr1-T\_{cyc1-ura3}* 片段(含无突变片段), 涂布 SD-URA 固体培养基, 挑取转化子进行 PCR 验证, 条带正确后进行测序验证, 测序正确的转化子即分别为菌株  $P_{tdh3}$ -Itr1、Itr1-N、Itr1-C、Itr1-NC。

向菌株  $P_{tdh3}$ -Itr1、Itr1-N、Itr1-C、Itr1-NC 中分别转化 *gfp-kanMX* 和 *kanMX-P\_{gal1-gfp}* 融合片段, 涂布 G418 固体培养基后挑取转化子进行 PCR 验证, 验证正确的即分别为菌株  $P_{gal1}$ -GFP-I、 $P_{gal1}$ -GFP-N、 $P_{gal1}$ -GFP-C、 $P_{gal1}$ -GFP-NC、I-GFP、N-GFP、C-GFP 和 NC-GFP。

## 1.6 绿色荧光观察

将固体培养基上活化的菌株  $P_{gal1}$ -GFP-I、 $P_{gal1}$ -GFP-N、 $P_{gal1}$ -GFP-C、 $P_{gal1}$ -GFP-NC、I-GFP、N-GFP、C-GFP、NC-GFP 接种到液体 YPD 培养基中, 30  $^{\circ}$ C、250 r/min 条件下培养过夜后转接到新鲜液体 YPD 培养基中(葡萄糖或半乳糖为碳源), 同样条件下培养 6 h 后添加 60 mmol/L

(10.8 g/L)肌醇溶液(以半乳糖为碳源的培养基中同时添加 2%的葡萄糖),将该时刻记为零点,之后每隔一定时间取样 100  $\mu$ L, 5 000 r/min 离心 5 min 后取沉淀稀释适当倍数后制片,通过荧光显微镜观察荧光定位情况并进行细胞计数。

### 1.7 转录组测序

挑取固体培养基上活化的菌株  $P_{tdh3}$ -Itr1 和 Itr1-N 接种于 2 $\times$ YPD 培养基, 30  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜后作为种子液,再以 7.5%接种量接种于发酵培养基中培养至对数期(12 h)后 5 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,液氮冷冻处理后送样测序, RNA 提取及转录组测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

### 1.8 实时荧光定量 PCR

按 1.7 方法培养细胞,分别在培养的 12、24、36、48 h 取样经液氮冷冻后参照 Ultra-Pure RNA Kit 的说明书提取 RNA。参照 HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒的说明书,以 RNA 为模板逆转录合成 cDNA。得到 cDNA 后根据试剂盒 Ultra SYBR Mixture 的说明书配制反应体系(10  $\mu$ L): 2 $\times$ Ultra SYBR Mixture 5  $\mu$ L, 引物 INO1-F/INO1-R、INM1-F/INM1-R、PIS1-F/PIS1-R、ALG9-F/ALG9-R (10  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ L, cDNA (5 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, RNase-free water 补足 10  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环;之后进行熔解曲线分析。通过程序采集数据得到内参和目的基因的  $C_t$  值,这些结果再通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对基因的转录水平进行相对定量。以 *alg9* 为内参基因,每个反应至少包括 3 个生物学重复。所用引物序列见表 2。

### 1.9 发酵方法

挑取重组菌株的单菌落活化在 YPD 固体培养基上,48 h 后挑取适量菌体接种到装有 30 mL YPD 的 100 mL 锥形瓶中, 30  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜,然后转接到装有 50 mL YPD 的 250 mL 锥

形瓶中,同时添加终浓度为 60 mmol/L (10.8 g/L)的肌醇, 30  $^{\circ}$ C、250 r/min 的条件下进行发酵。在 24 h 和 48 h 分别补加 5 g/L 的葡萄糖,每 12 h 或 24 h 取样检测  $OD_{600}$  及代谢物的浓度。

### 1.10 代谢物含量的测定

标准样品的准备:分别称取一定质量的葡萄糖二酸钾、肌醇标样溶于超纯水中,定容到终浓度为 20 g/L 的标准品溶液,存放于 -20  $^{\circ}$ C 条件下,使用时梯度稀释到 1 g/L,经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后使用。

样品处理:取一定量的发酵液于 12 000 r/min 转速离心 10 min,从中吸取适量上清液用 10 mmol/L  $H_2SO_4$  溶液稀释 3-4 倍后于 12 000 r/min 转速离心 5 min 混匀,使用 1 mL 注射器吸取适量经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后供液相分析。

HPLC 分析条件:流动相为 5 mmol/L  $H_2SO_4$  溶液,色谱柱为 Bio-Rad HPX-87H,进样量 10  $\mu$ L,流速 0.6 mL/min,柱温 50  $^{\circ}$ C,通过示差检测器进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 整合片段的构建结果

为了构建肌醇转运蛋白 Itr1 的 N 端和 C 端可能泛素化位点突变体及其与 GFP 的融合蛋白,使用醋酸锂转化法向 Bga-3 菌株中转入不同的整合片段,利用同源重组的原理使它们整合到基因组上。为了对构建后的菌株进行鉴定,每次进行同源重组所使用的整合片段中都包含一个筛选标记,分别为 LEU2、URA3 和 KanMX,首先分别以质粒 pHAC181、pRS316、p414-Cas9-KanMX 为模板扩增上述标记的基因片段,同时,以质粒 pGFP33 为模板扩增 GFP 蛋白的基因序列用于后续融合(图 2A)。

再以人工合成的 *itr1* 的 N 端和 C 端突变的小片段和扩增出的 *itr1* 的其他未突变部分为模



板进行融合 PCR, 得到含突变的 *itr1* 融合片段。野生型 *itr1* 片段和  $P_{tdh3}$  以酿酒酵母 BY4741 *opi1Δ* 基因组为模板直接扩增,  $T_{cyc1}$  以 pGFP33 质粒为模板扩增。使用上述含突变的融合片段和  $T_{cyc1}$ 、*ura3* 的片段进行 3 片段的融合并添加同源臂, 得到 N-*itr1*/C-*itr1*/NC-*itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* (图 2B)。同样地, 使用相应的片段进行融合 PCR, 分别得到野生型的 *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* 片段以及 *leu2*- $P_{tdh3}$ 、*gfp*-*kanMX*、*kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* 融合片段并在引物序列上添加同源臂(图 2C)。

## 2.2 重组菌株的构建结果

首先通过 *leu2*- $P_{tdh3}$  融合片段敲除葡萄糖二酸工程菌 Bga-3 中的 *itr1*, 获得菌株 Bga-3-*itr1Δ*。再向菌株 Bga-3-*itr1Δ* 中分别转入 4 种含有或不含有部分突变的 *itr1*/N-*itr1*/C-*itr1*/NC-*itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* 片段, 通过 URA3 标记整合在  $P_{tdh3}$  启动子的后面(图 3A), 得到 4 株重组菌株, 分别是  $P_{tdh3}$ -Itr1

(野生型)、Itr1-N (N 端突变)、Itr1-C (C 端突变) 和 Itr1-NC (N 端和 C 端双突变)。其次, 向上述 4 种菌株中转入 *kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* 片段, 将其整合到基因组上构成半乳糖诱导表达的 GFP-Itr1 融合蛋白(图 3B)。另外, 为了探究发酵条件下目的蛋白的降解情况, 向  $P_{tdh3}$ -Itr1 (野生型)、Itr1-N (N 端突变) 等 4 种菌中转入 *gfp*-*kanMX* 融合片段, 构建  $P_{tdh3}$  介导表达的 Itr1-GFP 融合蛋白(图 3C)。

转化后按照筛选标记分别在 SD-URA 固体培养基和 G418 抗性固体培养基上进行筛选, 对固体培养基上长出的转化子进行 PCR 验证。突变及无突变的 *itr1* 重组菌株的验证结果如图 4A 所示。进一步扩增该基因及其附近序列并进行测序, 确认突变位点正确即重组菌株成功构建。表达融合蛋白的重组菌株的验证结果分别见图 4B、4C, PCR 结果显示扩增的 DNA 片段大小与预期结果一致。

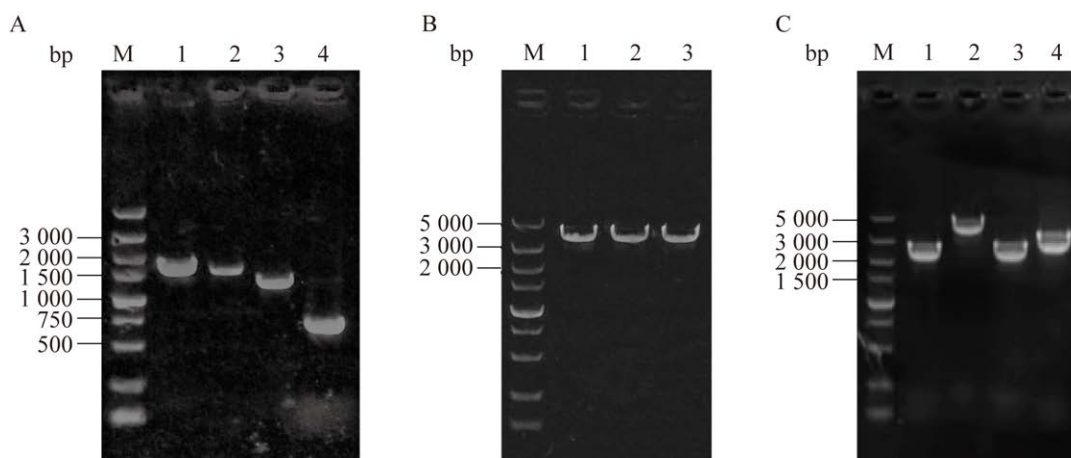


图 2 基因组整合片段的扩增 A: *leu2*、*ura3*、*kanMX* 和 *gfp* 的片段. B: 依次获得 N 端突变、C 端突变、NC 两端突变的 *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* 片段. C: 依次获得融合片段 *leu2*- $P_{tdh3}$ 、无突变的 *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3*、*gfp*-*kanMX*、*kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp*. M: DNA marker; 1-4: 扩增或融合片段编号

Figure 2 Amplification of genomic integration fragments. A: Fragments of *leu2*, *ura3*, *kanMX*, and *gfp*. B: *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* fragments with N-terminal mutation, C-terminal mutation, and NC two-terminal mutation were obtained sequentially. C: The fusion fragments *leu2*- $P_{tdh3}$ , *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* without mutation, *gfp*-*kanMX*, and *kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* were obtained sequentially. M: DNA marker; 1-4: Amplification or fusion fragment number.

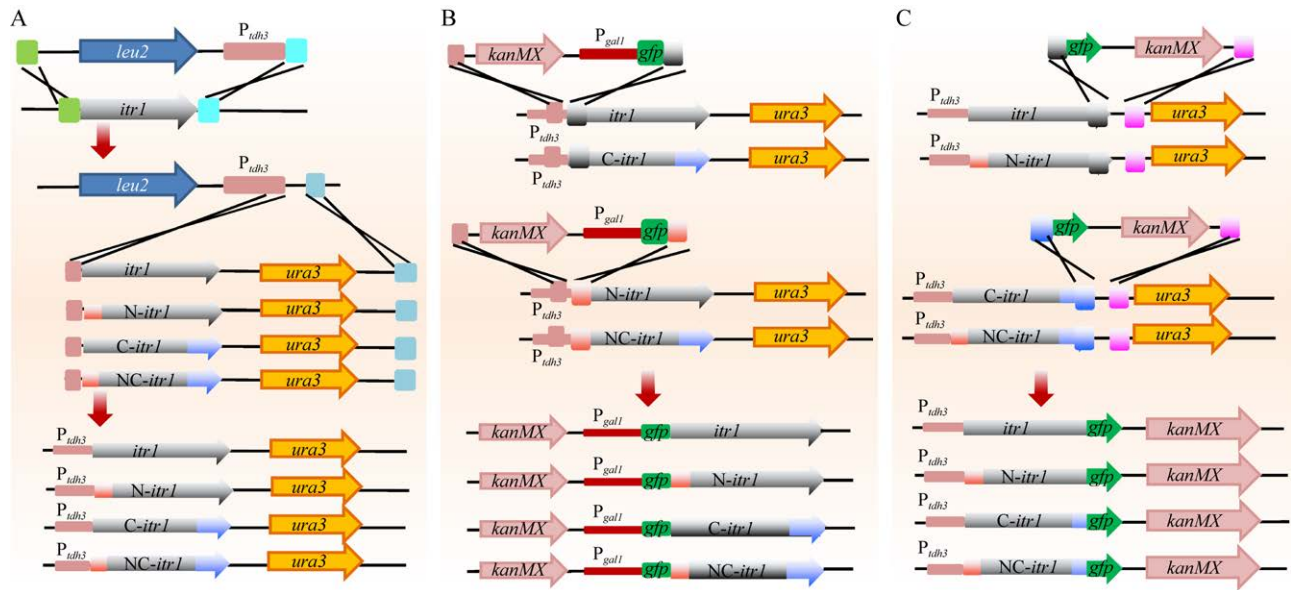


图3 重组菌株构建示意图 A: *leu2*- $P_{tdh3}$  融合片段及不同的 *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* 片段的整合策略. B: *kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* 融合片段的整合策略. C: *gfp*-*kanMX* 融合片段的整合策略

Figure 3 Schematic diagram of recombinant strain construction. A: Integration strategy of *leu2*- $P_{tdh3}$  fusion fragments and different *itr1*- $T_{cyc1}$ -*ura3* fragments. B: Integration strategy of *kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* fusion fragments. C: Integration strategy of *gfp*-*kanMX* fusion fragments.

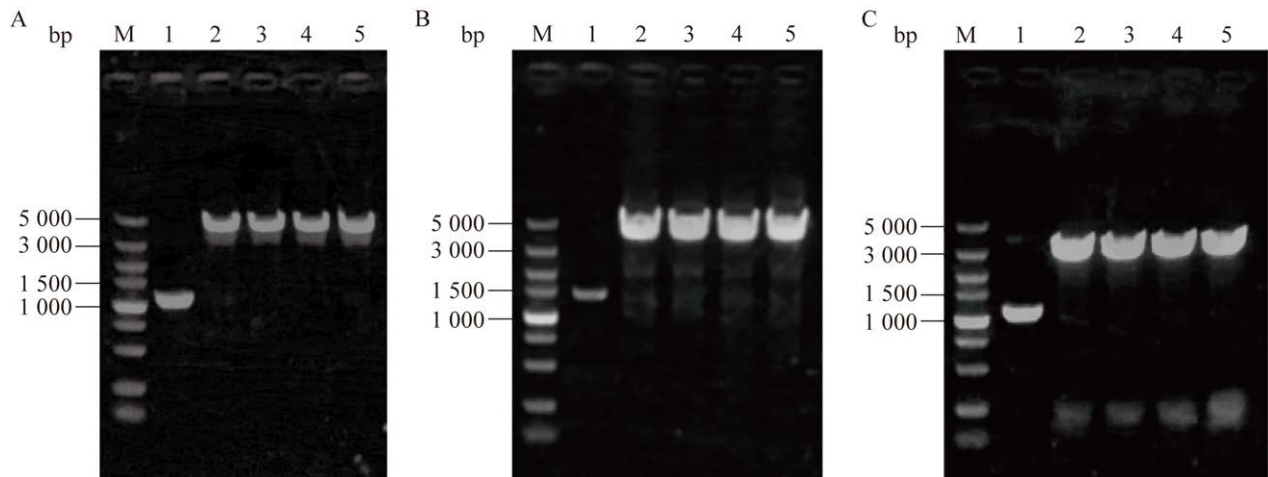


图4 重组菌株的验证 A: *itr1* 重组验证. B: *kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* 片段重组验证. C: *gfp*-*kanMX* 片段重组验证. M: DNA marker; 1: 阴性对照; 2-5: 依次为无突变、N端突变、C端突变、NC两端突变菌株的重组验证

Figure 4 Validation of recombinant strains. A: Verification of *itr1* gene recombination. B: Reconstitution validation of *kanMX*- $P_{gal1}$ -*gfp* fragments. C: Reconstitution validation of *gfp*-*kanMX* fragments. M: DNA marker; 1: Negative control; 2-5: Validation of recombination of strains with no mutation, N-terminal mutation, C-terminal mutation, and NC two-terminal mutation in turn.

## 2.3 肌醇转运蛋白 Itr1 潜在泛素化位点突变对其细胞膜定位稳定性的影响

### 2.3.1 半乳糖诱导 GFP 表达

为了精确地观察肌醇处理条件下肌醇转运蛋白 Itr1 的降解情况, 选用半乳糖诱导型启动子  $P_{gal1}$  启动 GFP-Itr1 融合蛋白的表达。该启动子在半乳糖存在时启动后续基因的表达, 而当葡萄糖存在时表达停止, 基于此可以实现 GFP-Itr1 融合蛋白的实时表达。对加入肌醇后的培养液每隔一定时间进行取样制片, 通过荧光显微镜观察蛋白降解情况(图 5)。在加入肌醇后的 3 h 内野生型及 N 端突变菌株的荧光逐渐消失, 而 Itr1 蛋白 C 端突变及 NC 两端

突变菌株的 GFP 荧光信号依然存在。继续取样至 7 h 并进行观察, 情况依旧保持一致, 说明 C 端突变改善了 Itr1 蛋白受肌醇诱导的降解过程。

### 2.3.2 发酵条件下肌醇转运蛋白 Itr1 及其突变体的细胞膜定位情况分析

在发酵菌株中, Itr1 蛋白由组成型启动子  $P_{tdh3}$  介导表达, 本研究在 Itr1 蛋白及其突变体的 C 端融合 GFP 蛋白, 以进一步探索发酵过程中 Itr1 蛋白的降解情况。将构建完成的菌株接种 YPD 培养基一段时间后添加肌醇启动 Itr1 蛋白的降解过程, 将添加肌醇的时刻设为 0 h, 之后间隔一定时间取样观察。

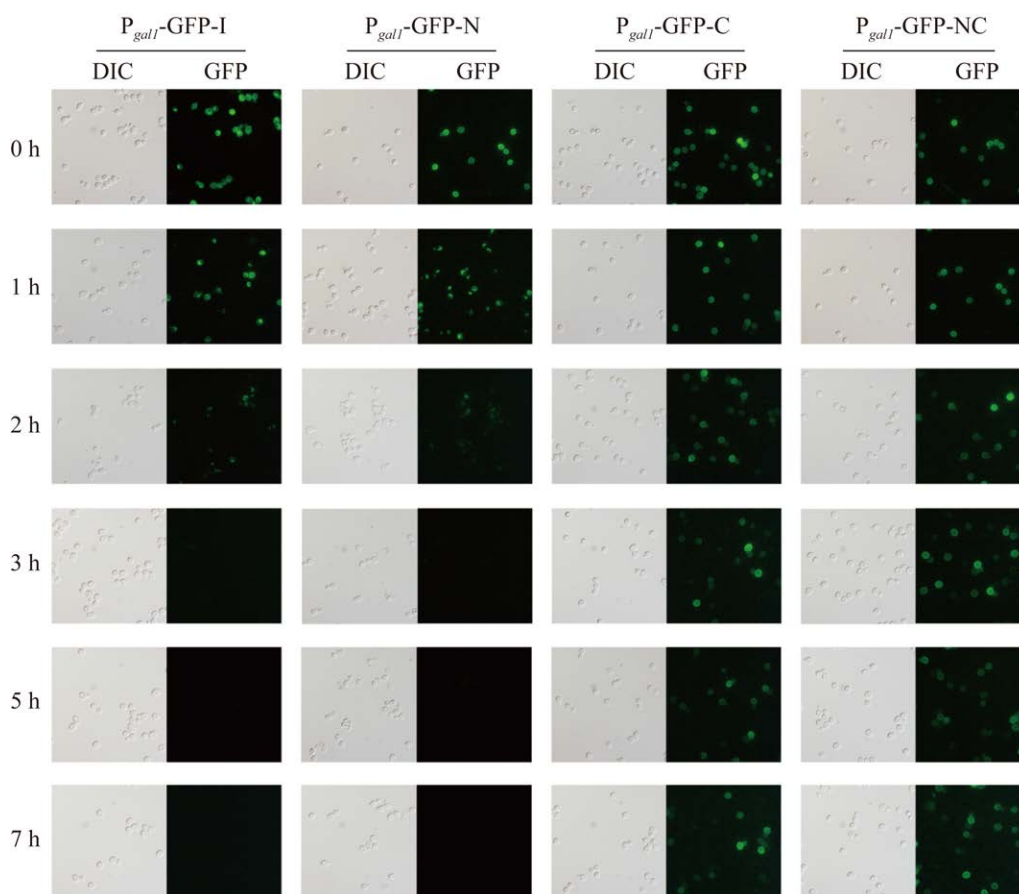


图 5 半乳糖诱导的菌株的荧光定位观察 DIC: 微分干涉差

Figure 5 Observation on fluorescence localization of galactose induced strains. DIC: Differential interference contrast.

为了更好地分析 Itr1 蛋白的降解情况, 针对膜上 Itr1-GFP 融合蛋白分布完整的细胞进行细胞计数, 并计算占比。从图 6 可以看出, 未加入肌醇时野生型菌株中的占比最高, 达到 92.1%, 这说明 Itr1 蛋白突变体在接种后的短时间内的细胞膜定位信号弱于野生型 Itr1 蛋白。在培养前期, 野生型菌株中的荧光占比持续下降, 而 C 端突变菌株中的荧光占比则渐增至稳定, 这与半乳糖诱导的情况相对应。在培养中后期, 野生型和 N 端突变菌株的蛋白分布完整细胞的占比下降明显, 而 C 端突变和 NC 两端突变菌株的蛋白分布完整细胞的占比一直较

高。另外, 可以看出 NC 两端突变菌株的改善效果是最明显的。总体来看, 单独的 C 端突变可以起到在发酵过程中改善 Itr1 蛋白降解的作用, N 端突变短时间内也可以提高 Itr1 蛋白膜定位完整的细胞比例, 并且同时突变 N 端和 C 端时能够达到最大的改善效果。

## 2.4 重组菌株的摇瓶发酵及基因转录水平分析

### 2.4.1 重组菌株的摇瓶发酵

将 4 个重组菌株  $P_{tdh3}$ -Itr1、Itr1-N、Itr1-C、Itr1-NC 与出发菌株 Bga-3 一起进行摇瓶发酵, 比较其菌体生长、底物消耗及代谢物生产情况。

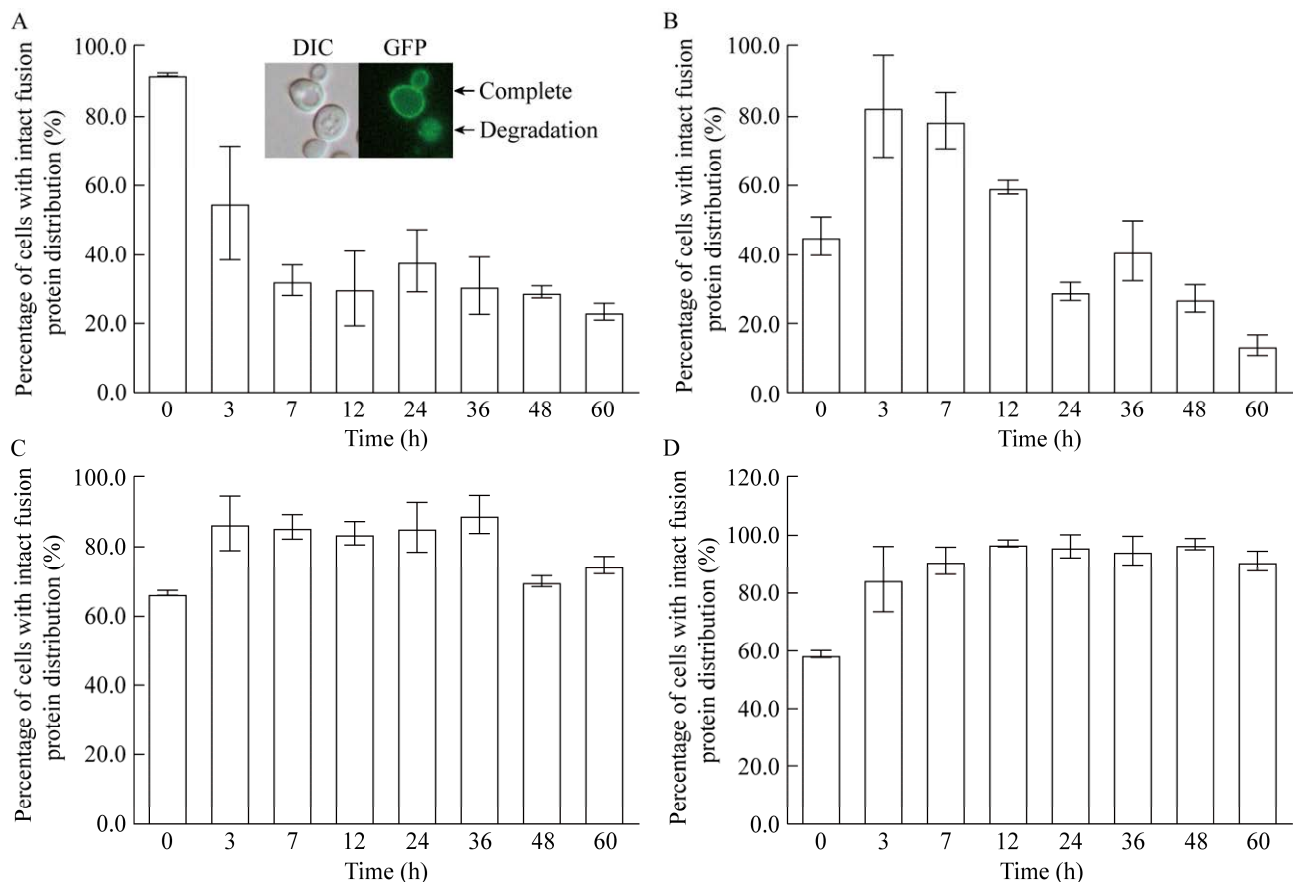


图 6 膜上融合蛋白分布完整的细胞占比 A: 无突变菌株. B: N 端突变菌株. C: C 端突变菌株. D: NC 两端突变菌株. DIC: 微分干涉差

Figure 6 Proportion of cells with intact distribution of fusion proteins on the membrane. A: Mutant free strain. B: N-terminal mutant strain. C: C-terminal mutant strain. D: NC two-terminal mutant strain. DIC: Differential interference contrast.

发酵 168 h 时, N 端突变菌株 Itr1-N 的葡萄糖二酸产量最高, 达到 2.68 g/L, 较出发菌株的产量(1.69 g/L)提高了 58.6%, Itr1-C 和 Itr1-NC 突变株的产量也均有提高(图 7A)。在肌醇消耗方面, 同样是菌株 Itr1-N 的消耗量最高, 为 2.44 g/L, 较出发菌株的消耗量(2.03 g/L)提高了 20.2% (图 7B)。发酵 72 h 时, 葡萄糖被完全消耗, 副产物乙醇积累量基本达到最高, 之后乙醇被细胞重新利用, 用于合成葡萄糖二酸(图 7C)。突变株的菌体生长整体趋势近似, 均较出发菌株和未突变株有着更高的菌体量(图 7D)。基于这

些研究结果, 选择 Itr1 蛋白 N 端突变菌株 Itr1-N 为研究对象进行摇瓶水平的发酵优化。

#### 2.4.2 重组菌株的不同生长时期对肌醇转运的影响

摇瓶发酵发现重组菌对外源肌醇的消耗只在 72 h 前, 其中 C 端和 NC 两端突变菌株弱化了 Itr1 蛋白的降解, 也未能带来更多或更长时间的肌醇消耗, 而肌醇与细胞生长有关, 因此推测肌醇的转运受细胞生长的影响。为了验证这个推测, 考察了不同生长时期细胞的肌醇转运能力, 分别在 24、48、72、96 h 添加 10.8 g/L

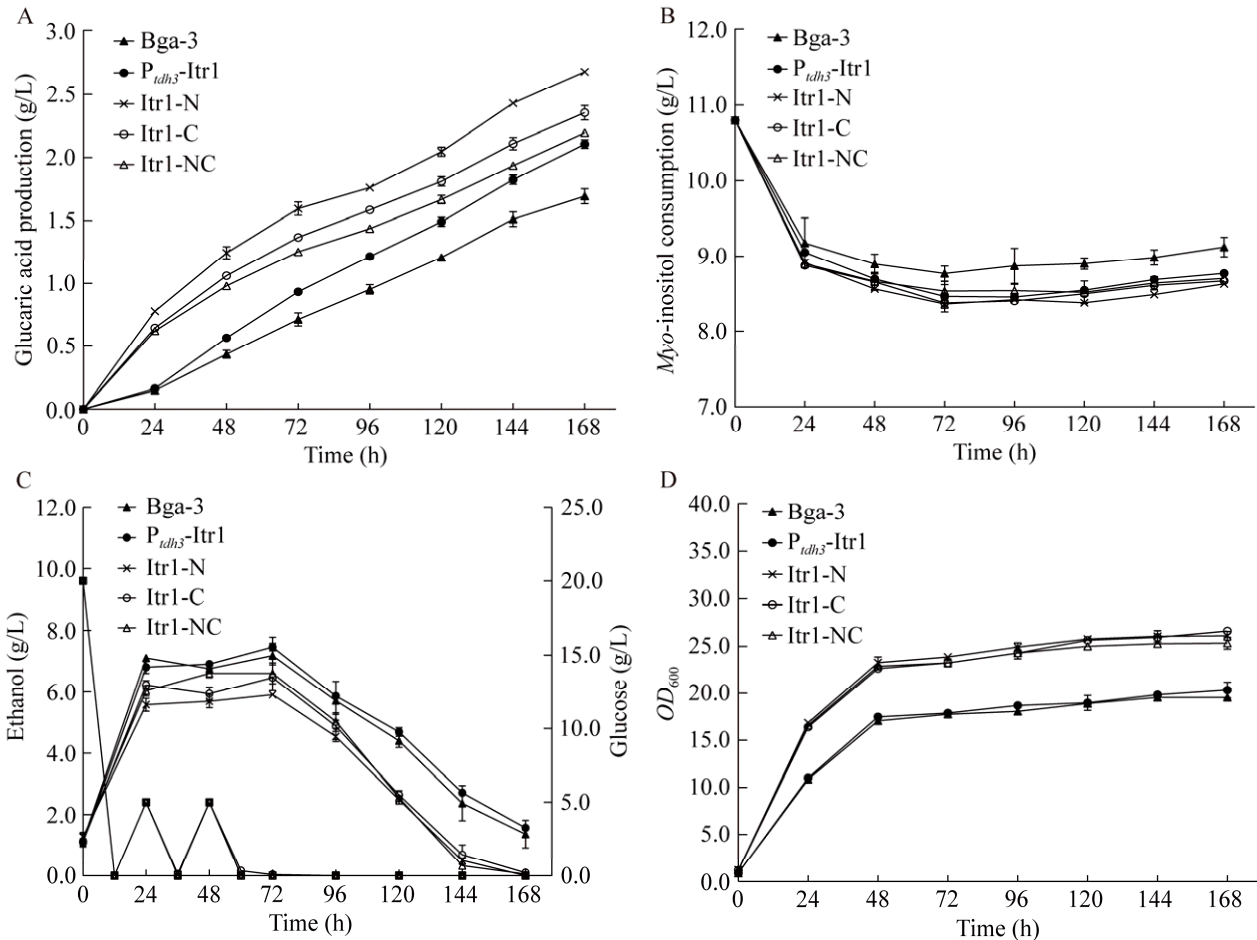


图 7 重组菌株摇瓶发酵 A: 葡萄糖二酸产量. B: 肌醇消耗. C: 乙醇与葡萄糖消耗. D: 菌体生长  
Figure 7 Shake flask fermentation of recombinant strains. A: Glucaric acid production. B: *Myo*-inositol consumption. C: Ethanol and glucose consumption. D: Bacterial growth.

肌醇(其他条件保持不变)检测肌醇消耗情况。结果如图 8 所示, 细胞生长的 96 h 内 C 端和 NC 两端突变的 GFP 融合蛋白的细胞膜定位都维持在 50% 以上。然而, 在 24 h 和 48 h 添加肌醇时, 有少量肌醇被利用, 并且在 24 h 时添加的肌醇被消耗得更多。在 72 h 和 96 h 添加的肌醇则完全未被消耗。这说明工程菌株对外源肌醇的消耗与菌体生长时期相关。

### 2.4.3 N 端突变菌株的转录组测序分析

在摇瓶发酵结果中, N 端突变菌株的葡萄糖二酸产量最高, 而且其生物量较出发菌株和对照菌株都明显提高。为了进一步了解出现这种结果的原因, 以无突变菌株为对照, 对该菌株进行转录组测序分析。结果如图 9 所示, 差异表达基因(differentially expressed genes, DEG)共有 531 个, 其中 239 个基因的表达被上调, 另外 292 个基因的表达则被下调。通过对 GO 功能进行生物学过程、细胞组分和分子功能等的富集。生物学过程 GO 富集结果显示, DEG 主要集中在离子跨膜运输、UMP 生物合成、氧

水平反应和跨膜运输等; 在细胞组分的 GO 富集中, 大多数 DEG 与细胞膜、细胞壁、核糖核苷二磷酸还原酶复合体等有关; 分子功能 GO 富集分析显示, DEG 主要与离子运输相关 ATPase 的活性、核糖核苷二磷酸还原酶的活性和丝氨酸蛋白酶的活性等代谢关键酶的活性相关。

Itr1 蛋白作为跨膜转运蛋白, 它的活性和稳定性的变化可能对细胞的跨膜运输和能量代谢等活动造成影响。有研究指出, Itr1 蛋白的膜定位与肌醇及葡萄糖转运关系密切, 进而影响到胞内代谢<sup>[26]</sup>, 说明该蛋白的变化会影响到与之相关的多种基因的表达进而产生调整代谢流等的效果。在 N 端突变菌株中, 编码不同转运蛋白的 *ena1*、*vba3*、*vba5*、*hxt5*、*sit1* 等的表达均有提高, 与细胞壁修复或重塑有关的 *chs1*、*ncw2* 等的表达也被提高, 与诱导细胞周期停滞有关的 *mfa2* 及短寿命蛋白质的泛素依赖性降解有关的 *ssa2* 等的表达被下调。这些差异表达涉及范围较广, 但总体来说这些变化有利于提高菌体与外界的物质交换, 促进菌体生长及

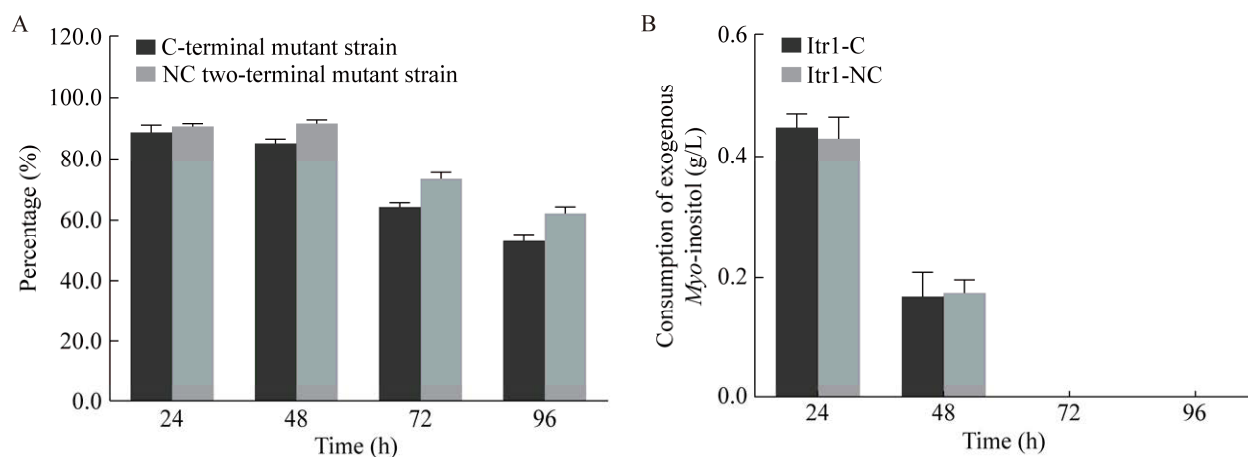


图 8 细胞生长时期对肌醇消耗的影响 A: 膜上融合蛋白分布完整的细胞占比. B: 不同时间点添加肌醇后的消耗情况

Figure 8 Effect of cell growth period on *myo*-inositol consumption. A: Proportion of cells with intact distribution of fusion proteins on the membrane. B: Consumption after *myo*-inositol addition at different time points.

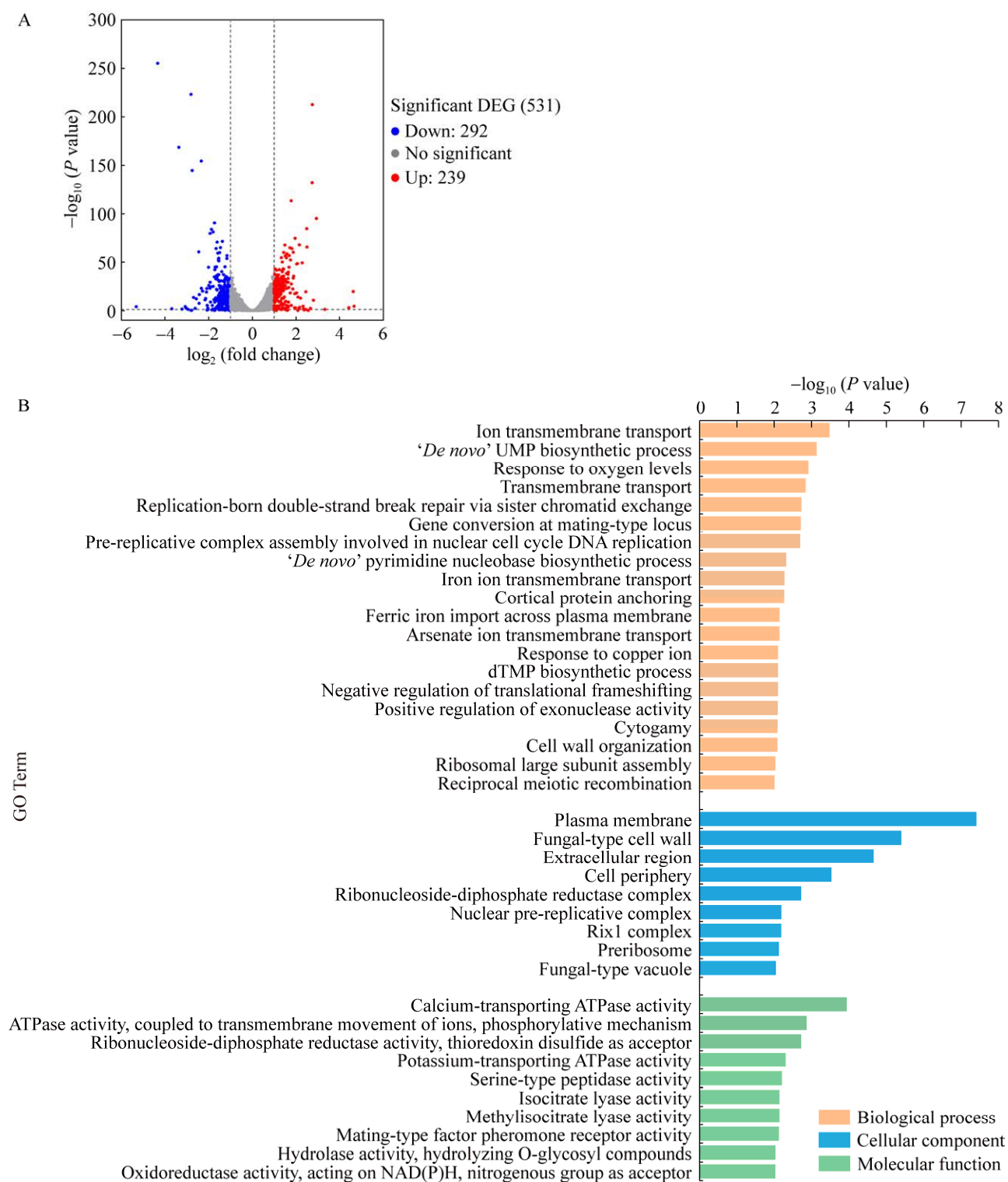


图 9 差异表达基因分析 A: 差异基因表达火山图. B: GO 富集结果

Figure 9 Analysis of the differentially expressed genes. A: Differential gene expression volcano map. B: GO enrichment results.

对部分蛋白质的降解等过程产生影响。N 端突变菌株在发酵中的生物量和转运的外源肌醇都要高于无突变的菌株( $P_{tdh3}$ -Itr1), 这些表现与上述等变化可能有关, 并进一步促进了葡萄糖二酸的合成。

#### 2.4.4 肌醇合成与代谢有关基因表达水平分析

转录组测序结果显示相关基因的差异表达可能提高 N 端突变菌株葡萄糖二酸的合成, 肌醇与细胞生长关联密切, 与肌醇合成有关的部分基因(*ino1*、*inm1* 等)的表达可能随着细胞生长时期的变化而变化, 因此通过实时荧光定量 PCR 对肌醇合成基因(*ino1*、*inm1*)、肌醇下游代谢基因(*pis1*)在对数期(48 h)内的转录水平进行了分析。在 24 h 和 36 h 时, 3 株突变重组菌的 *ino1* 的相对表达较对照有所提高, 在 36 h 时, 3 种突变重组菌的 *inm1* 的相对表达显著提高, 并且 N 端突变菌株中这 2 个基因的表达提高程度最大, 这更有助于细胞内肌醇的合成(图 10)。另外, 肌醇下游代谢基因 *pis1* 在突变株中的表达呈现出先上调后下调的趋势, 这可能与细胞生长有关。在这一过程中, C 端突变菌株的上调幅度较大, 会使相对较多的肌醇流向下流的胞内代谢途径(磷脂酰肌醇的合成等), 而 N 端突变菌株中 *pis1* 的表达相对较弱, 有利于肌醇流向葡萄糖二酸合成途径。综合来看, N 端突变菌株中, 肌醇的合成被加强, 同时它的下游消耗被降低, 这提高了胞内肌醇的积累并使更多的肌醇能够流向葡萄糖二酸合成方向, 促进葡萄糖二酸产量的提高。

### 2.5 重组菌株的摇瓶发酵优化

#### 2.5.1 初始葡萄糖浓度的优化

葡萄糖是发酵过程中菌体的主要碳源, 其浓度的高低对细胞生长有着直接的影响。此外, 其下游代谢产物葡萄糖-6-磷酸是酿酒酵母合成肌醇以及进行其他生命活动的重要中间体, 而

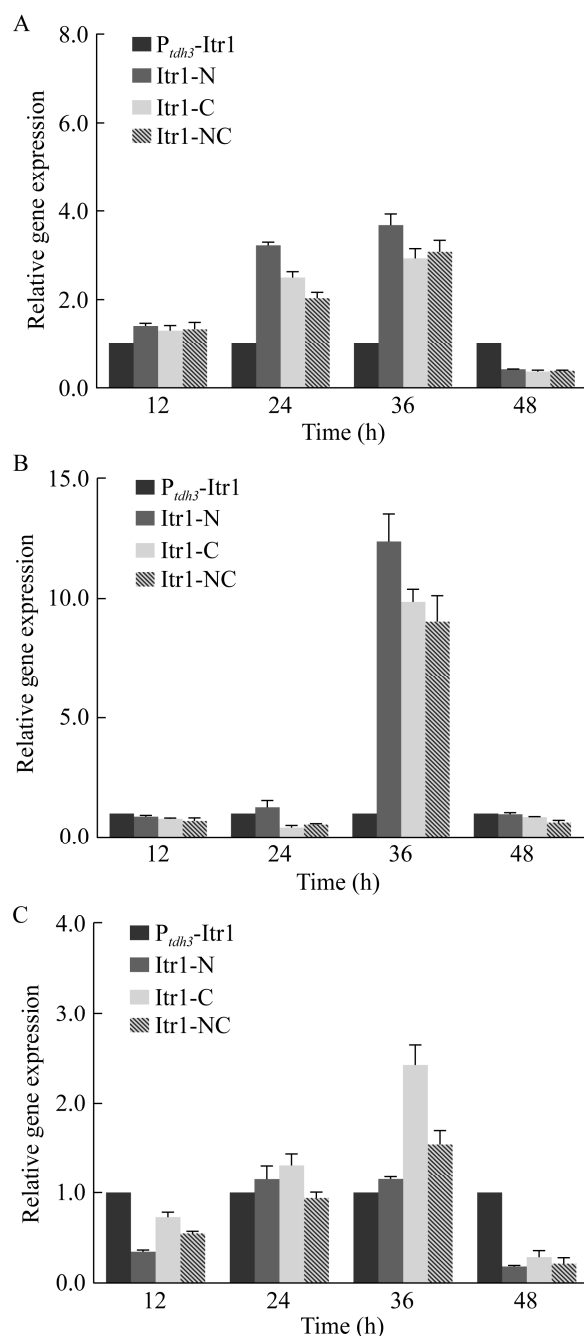


图 10 肌醇代谢有关基因的相对表达水平 A: *ino1* 的相对表达水平. B: *inm1* 的相对表达水平. C: *pis1* 的相对表达水平

Figure 10 Relative expression levels of genes involved in *myo*-inositol metabolism. A: Relative expression level of the *ino1* gene. B: Relative expression level of the *inm1* gene. C: Relative expression level of the *pis1* gene.



肌醇是合成葡萄糖二酸的直接底物，因此葡萄糖浓度的改变对葡萄糖二酸产量的影响很大。因此，选择不同的葡萄糖浓度进行摇瓶发酵，结果如图 11 所示。从图 11 可以看出，初始葡萄糖浓度在 5–30 g/L 时，葡萄糖浓度的增加有利于葡萄糖二酸的积累和菌体的生长，当初始葡萄糖浓度高于 30 g/L 时，葡萄糖二酸产量逐渐降低。肌醇消耗最高为 2.85 g/L，葡萄糖二酸产量最高达 2.92 g/L。

### 2.5.2 肌醇浓度的优化

肌醇是酿酒酵母自身可以合成的代谢产物，也是细胞生长过程中必要的成分。肌醇作为葡萄糖二酸合成的直接底物，为了探究肌醇添加量与葡萄糖二酸生物合成之间的关系，选择不同浓度的肌醇作为底物进行发酵。结果如图 12 所示，不添加肌醇时葡萄糖二酸的产量很低，当肌醇浓度在 30–60 mmol/L 时，葡萄糖二酸的产量随着肌醇添加浓度的增加而升高，当肌醇添加量达到 60 mmol/L 时葡萄糖二酸产量最高，为 3.04 g/L。当发酵体系中肌醇添加量为 75 mmol/L 和 90 mmol/L 时，虽然肌醇消耗量在

增加，但葡萄糖二酸产量并未提高，这可能是由于过多的肌醇可能被用于细胞生长代谢。

### 2.5.3 接种量的优化

在酿酒酵母的发酵过程中，接种量的高低会直接影响到菌体的生长速度，使得微生物不同生长阶段的时间发生改变，比如迟滞期。同时，这种改变还会影响到细胞对葡萄糖、肌醇等的消耗，进而对葡萄糖二酸的生产造成影响，因此考察了不同接种量对葡萄糖二酸生物合成和肌醇消耗的影响，结果如图 13 所示。当接种量为 7.5% 时葡萄糖二酸达到最高的产量 3.05 g/L。随着接种量的增加，肌醇消耗量逐渐增加，当接种量为 15.0% 时肌醇消耗量最高为 3.40 g/L，这可能是由于发酵初期，细胞生长代谢非常旺盛，细胞越多需要的肌醇也越多。

### 2.5.4 培养温度的优化

野生型酿酒酵母的培养温度一般为 30 °C 左右，但在基因工程菌株中，由于引入了外来基因的代谢途径，细胞自身的代谢活动会受到一定的影响。另外，外源酶在酿酒酵母中表达后，其活性也可能受到不同温度的影响。从图 14A 可以看

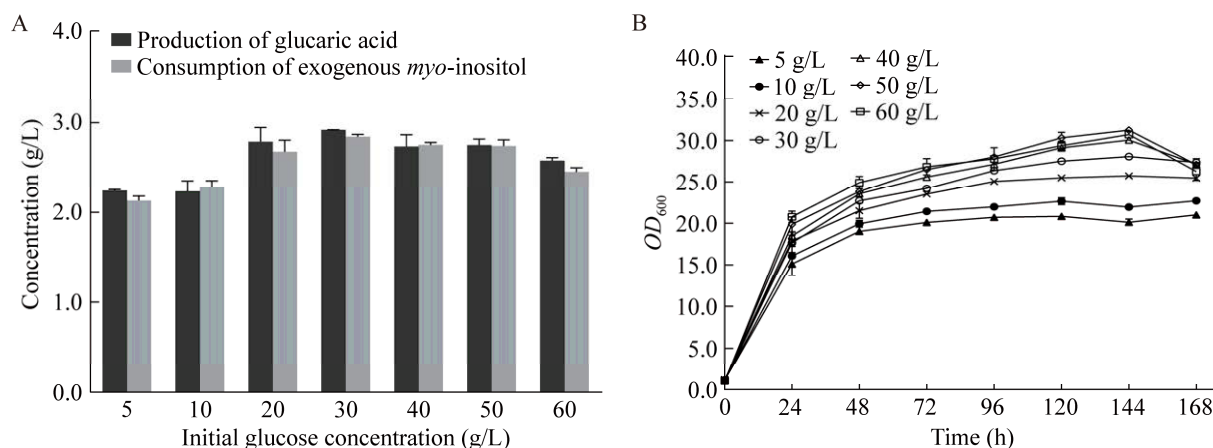


图 11 不同初始糖浓度下的摇瓶发酵 A: 葡萄糖二酸生产和外源肌醇消耗. B: 菌体生长

Figure 11 Shake flask fermentation under different initial sugar concentrations. A: Production of glucaric acid and consumption of exogenous myo-inositol. B: Bacterial growth.

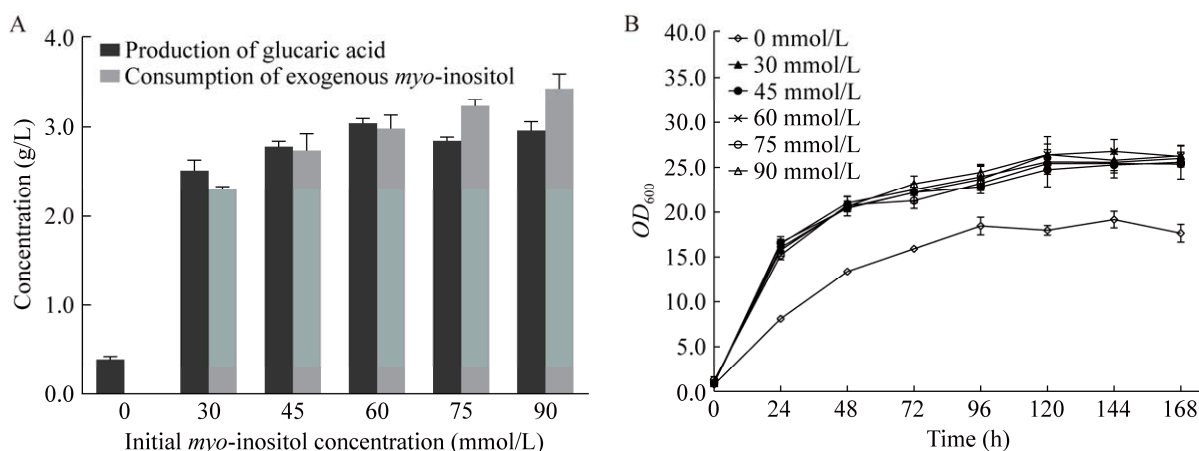


图 12 不同肌醇浓度下的摇瓶发酵 A: 葡萄糖二酸生产和外源肌醇消耗. B: 菌体生长

Figure 12 Shake flask fermentation under different *myo*-inositol concentrations. A: Production of GA and consumption of exogenous *myo*-inositol. B: Bacterial growth.

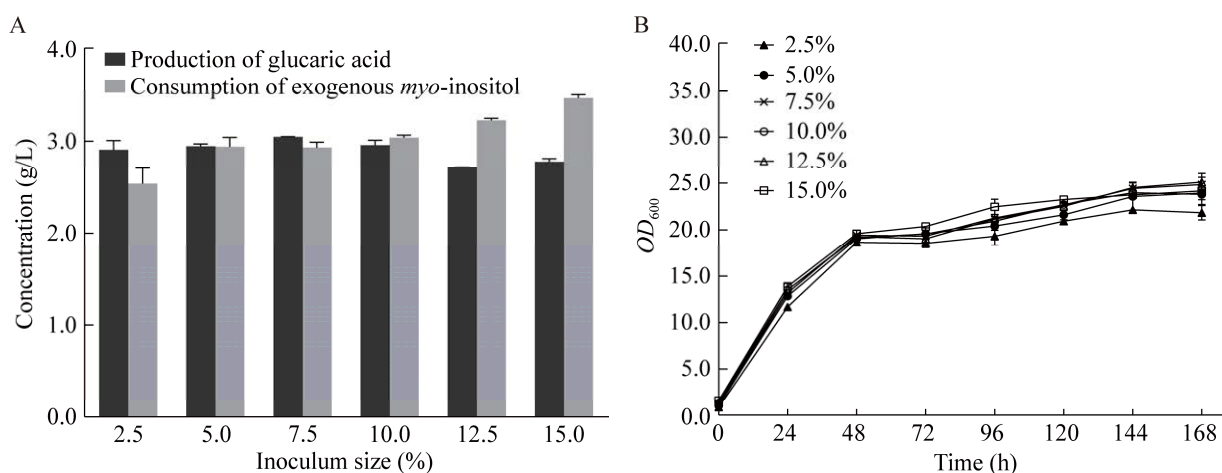


图 13 不同接种量下的摇瓶发酵 A: 葡萄糖二酸生产和外源肌醇消耗. B: 菌体生长

Figure 13 Shake flask fermentation under different inoculation concentrations. A: Production of GA and consumption of exogenous *myo*-inositol. B: Bacterial growth.

出, 在培养温度为 27 °C 的条件下葡萄糖二酸产量和肌醇消耗量都最高, 葡萄糖二酸产量为 3.10 g/L, 当培养温度高于 30 °C 时, 随着培养温度的提高葡萄糖二酸的产量和肌醇消耗量都逐渐降低, 由此可见较高的培养温度不利于葡萄糖二酸的生产。同时, 温度过高(36 °C)和过低(24 °C)也会影响重组菌株的生长(图 14B), 这可能是由于酿酒酵母细胞对过冷或过热的生长环

境比较敏感导致的。

### 2.5.5 初始 pH 值的优化

酿酒酵母具有一定的耐酸性, 可以在酸性环境中生长, 因此之前发酵过程中并不关注 pH 对酿酒酵母发酵能力的影响。但在实际发酵过程中, 随着代谢产物的积累, 外部环境的 pH 变化可能会对细胞代谢等方面造成一定的影响, 所以通过稀盐酸和稀 KOH 溶液对培养基的

初始 pH 进行调整, 设置梯度进行发酵。从图 15 可以看出, 随着发酵初始 pH 值的升高, 在初始 pH 值达到 7.0 之前, 葡萄糖二酸产量和肌醇消耗量都不断提高, 当培养基初始 pH 值为 6.5 时葡萄糖二酸产量最高, 达到 2.72 g/L。

### 2.5.6 单因素正交优化

经过单因素试验得到各因素对产物生产的影响水平, 但未对各因素总体的影响进行考虑,

因此通过正交试验进一步评估各个因素的影响程度, 得出发酵条件的最优组合。根据表 3 进行五因素四水平的正交试验。结果如表 4 所示, 通过极差分析可以看出各因素对产物产量的影响程度为  $D>A>E>B>C$ , 最优组合为  $A_4B_1C_3D_2E_4$ , 实验组中达到的最大产量为 3.23 g/L。进一步使用最优组合的条件进行摇瓶发酵, 葡萄糖二酸产量为 3.30 g/L, 是所有组合中最高的, 说明该条

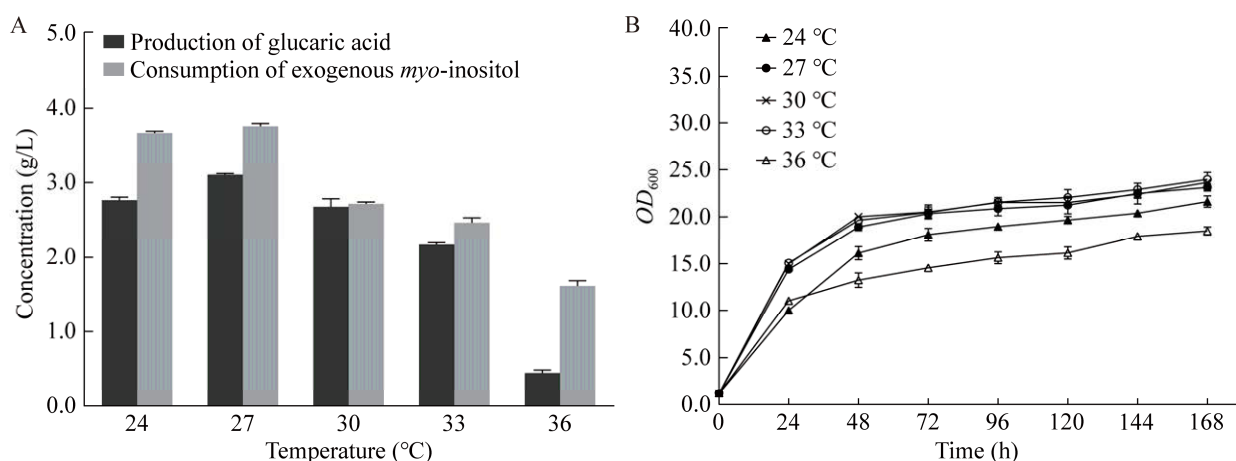


图 14 不同温度下的摇瓶发酵 A: 葡萄糖二酸生产和外源肌醇消耗. B: 菌体生长

Figure 14 Shake flask fermentation at different temperatures. A: Production of GA and consumption of exogenous myo-inositol. B: Bacterial growth.

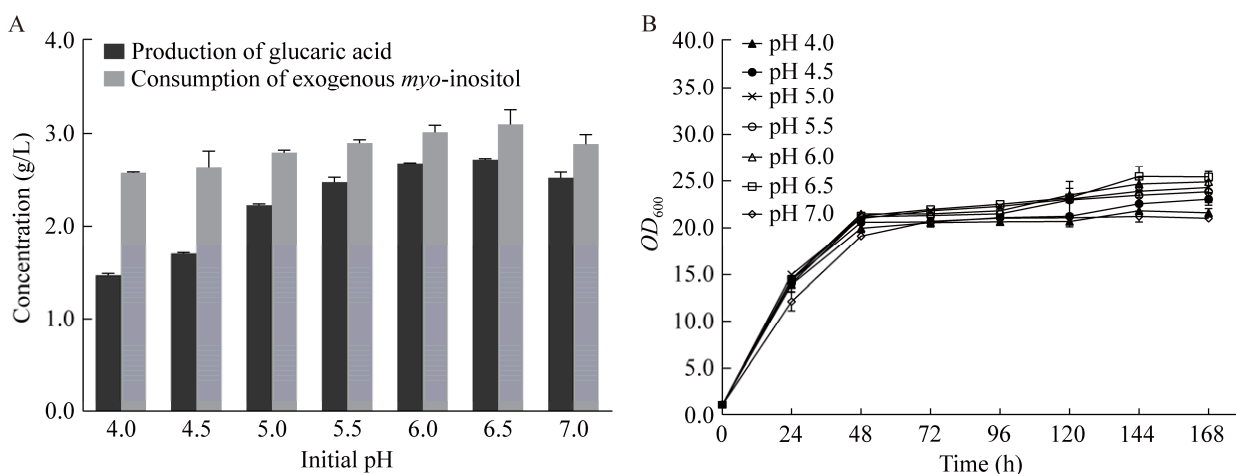


图 15 不同初始 pH 下的摇瓶发酵 A: 葡萄糖二酸生产和外源肌醇消耗. B: 菌体生长

Figure 15 Shake flask fermentation at different initial pH. A: Production of GA and consumption of exogenous myo-inositol. B: Bacterial growth.

件最利于本研究中的重组酿酒酵母菌株生产葡萄糖二酸。

### 3 讨论与结论

本研究针对酿酒酵母肌醇转运蛋白 *Itr1* 的 N 端和 C 端潜在的泛素化位点进行突变, 考察了这些位点突变对其细胞膜定位的影响, 确定了 C 端突变可以有效减弱肌醇转运蛋白被肌醇诱导降解的过程, 发现了 N 端突变对提高葡萄

糖二酸的产量效果最好, 为后续改造肌醇转运蛋白或者其他转运蛋白提供了研究思路。在此基础上, 通过单因素发酵优化和正交试验, 确定了重组酿酒酵母菌株发酵的最优条件, 该条件下葡萄糖二酸的产量可以达到 3.30 g/L, 较对照菌株提高了 95.3%。

利用酿酒酵母合成葡萄糖二酸同时涉及转运胞外肌醇合成葡萄糖二酸和工程菌细胞利用自身合成的肌醇合成葡萄糖二酸 2 个过程, 这

表 3 五因素四水平

Table 3 Five factors and four levels

Level	A: Glucose (g/L)	B: <i>myo</i> -inositol (mmol/L)	C: Inoculum proportion (%)	D: Temperature (°C)	E: Initial pH
1	20	45	2.5	24	5.5
2	30	60	5.0	27	6.0
3	40	75	7.5	30	6.5
4	50	90	10.0	33	7.0

表 4 正交试验条件及结果

Table 4 Orthogonal experimental conditions and results

Item	A	B	C	D	E	Titer (g/L)
1	1	1	1	1	1	2.63
2	1	2	2	2	2	3.03
3	1	3	3	3	3	2.35
4	1	4	4	4	4	1.37
5	2	1	2	3	4	2.59
6	2	2	1	4	3	1.24
7	2	3	4	1	2	2.62
8	2	4	3	2	1	2.62
9	3	1	3	4	2	1.42
10	3	2	4	3	1	1.48
11	3	3	1	2	4	2.29
12	3	4	2	1	3	2.57
13	4	1	4	2	3	3.23
14	4	2	3	1	4	3.15
15	4	3	2	4	1	1.09
16	4	4	1	3	2	2.29
$k_1$	2.345	2.467 5	2.112 5	2.742 5	1.955	
$k_2$	2.267 5	2.225	2.32	2.792 5	2.34	
$k_3$	1.94	2.087 5	2.385	2.177 5	2.347 5	
$k_4$	2.44	2.212 5	2.175	1.28	2.35	
R	0.5	0.38	0.272 5	1.512 5	0.395	

2 个过程既相互独立又相互联系, 外源肌醇的摄取有利于细胞的生长、葡萄糖二酸合成途径关键酶-肌醇加氧酶的激活和葡萄糖二酸的合成。在本研究中, C 端突变对肌醇转运中起主要作用的 Itr1 蛋白的降解起到了弱化作用, 但经过发酵发现这并未直接提高或延长肌醇的消耗, 进一步实验证明外源肌醇的转运与细胞生长密切相关, 即使 Itr1 蛋白的降解被弱化也依旧受限, 这可能是由于肌醇转运需要胞内代谢的内在动力。在胞内肌醇合成葡萄糖二酸方面, N 端突变菌株中的胞内肌醇合成被增强, 并有相对更多的肌醇流向葡萄糖二酸合成, 而 C 端和 NC 端突变虽也增强胞内的肌醇合成, 但较 N 端突变的低, 并且 C 端突变使肌醇下游代谢相关基因 *pis1* 的表达上调, 肌醇下游代谢途径被增强, 不利于葡萄糖二酸的进一步积累, 这可能是 N 端突变菌株的葡萄糖二酸产量高于 C 端和 NC 两端突变菌株的重要原因。本研究主要针对工程菌细胞摄取胞外肌醇的能力进行了初步的探索, 后续可以对细胞如何利用葡萄糖在稳定期快速合成葡萄糖二酸进行深入研究, 包括如何通过代谢改造提高工程菌自身合成肌醇的能力, 如何通过对工程菌进入发酵稳定期后改变发酵工艺参数, 如碳源种类和流加策略等进一步提高葡萄糖二酸的产量。

## REFERENCES

- [1] WALASZEK Z, SZEMRAJ J, HANAUSEK M, ADAMS AK, SHERMAN U. D-glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat[J]. Nutrition Research, 1996, 16(4): 673-681.
- [2] PALAZZOTTO E, TONG YJ, LEE SY, WEBER T. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(6): 107366.
- [3] CHEN L, KIELY DE. D-glucaric acid esters/lactones used in condensation polymerization to produce hydroxylated nylons-aqualitative equilibrium study in acidic and basic alcohol-solutions[J]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 1994, 13(4): 585-601.
- [4] SINGH J, GUPTA KP. Induction of apoptosis by calcium D-glucarate in 7,12-dimethyl benz[a]anthracene-exposed mouse skin[J]. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer, 2007, 26(1): 63-73.
- [5] KAPANJI KK, FARZAD S, GÖRGENS JF. Life cycle and sustainability assessments of biorefineries producing glucaric acid, sorbitol or levulinic acid annexed to a sugar mill[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 295: 126339.
- [6] DIJKGRAAF PJM, VERKUYLEN MECG, van der WIELE K. Complexation of calcium ions by complexes of glucaric acid and boric acid[J]. Carbohydrate Research, 1987, 163(1): 127-131.
- [7] BOZELL JJ, PETERSEN GR. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates: the US Department of Energy's "Top 10" revisited[J]. Green Chemistry, 2010, 12(4): 539-554.
- [8] SU HH, PENG F, OU XY, ZENG YJ, ZONG MH, LOU WY. Combinatorial synthetic pathway fine-tuning and cofactor regeneration for metabolic engineering of *Escherichia coli* significantly improve production of D-glucaric acid[J]. New Biotechnology, 2020, 59: 51-58.
- [9] SMITH TN, HASH K, DAVEY CL, MILLS H, WILLIAMS H, KIELY DE. Modifications in the nitric acid oxidation of D-glucose[J]. Carbohydrate Research, 2012, 350: 6-13.
- [10] KIELY DE, CHEN L, LIN TH. Hydroxylated nylons based on unprotected esterified D-glucaric acid by simple condensation reactions[J]. Journal of the American Chemical Society, 1994, 116(2): 571-578.
- [11] IBERT M, FUERTÈS P, MERBOUH N, FIOL-PETIT C, FEASSON C, MARSAIS F. Improved preparative electrochemical oxidation of D-glucose to D-glucaric acid[J]. Electrochimica Acta, 2010, 55(10): 3589-3594.
- [12] IBERT M, FUERTÈS P, MERBOUH N, FEASSON C, MARSAIS F. Evidence of benzilic rearrangement during the electrochemical oxidation of D-glucose to D-glucaric acid[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(4): 512-518.
- [13] MOON TS, YOON SH, LANZA AM, ROY-MAYHEW JD, JONES PRATHER KL. Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(3): 589-595.

- [14] GUPTA A, HICKS MA, MANCHESTER SP, PRATHER KLJ. Porting the synthetic D-glucaric acid pathway from *Escherichia coli* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(9): 1201-1208.
- [15] MARQUES WL, ANDERSON LA, SANDOVAL L, HICKS MA, PRATHER KLJ. Sequence-based bioprospecting of *myo*-inositol oxygenase (Miox) reveals new homologues that increase glucaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 140: 109623.
- [16] CHEN N, WANG JY, ZHAO YY, DENG Y. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of glucaric acid at high titer[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 67.
- [17] LO TM, TEO WS, LING H, CHEN BB, KANG A, CHANG MW. Microbial engineering strategies to improve cell viability for biochemical production[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 903-914.
- [18] GUO L, QI MY, GAO C, YE C, HU GP, SONG W, WU J, LIU LM, CHEN XL. Engineering microbial cell viability for enhancing chemical production by second codon engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 235-246.
- [19] ZHAO YY, ZUO FY, SHU QX, YANG XY, DENG Y. Efficient production of glucaric acid by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(6): e0053523.
- [20] ROBINSON KS, LAI K, CANNON TA, MCGRAW P. Inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by transcriptional and degradative endocytic mechanisms during the growth cycle that are distinct from inositol-induced regulation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1996, 7(1): 81-89.
- [21] NIKKO E, PELHAM HRB. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters[J]. *Traffic*, 2009, 10(12): 1856-1867.
- [22] 赵运英. 酵母细胞基因组中与钙离子稳态相关基因的功能研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2012.
- ZHAO YY. Functional study of genes related to calcium homeostasis in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2012 (in Chinese).
- [23] PICKART CM. Mechanisms underlying ubiquitination[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 503-533.
- [24] YE YH, RAPE M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10: 755-764.
- [25] MIYASHITA M, SHUGYO M, NIKAWA JI. Mutational analysis and localization of the inositol transporters of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(3): 291-297.
- [26] NIKAWA J, TSUKAGOSHI Y, YAMASHITA S. Isolation and characterization of two distinct *myo*-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(17): 11184-11191.