

• 工业生物技术 •

代谢工程改造酿酒酵母合成葡萄糖二酸

巩旭^{1,2}, 刘叶^{1,2}, 王磊^{1,2}, 李江华^{1,2}, 康振^{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 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

巩旭, 刘叶, 王磊, 等. 代谢工程改造酿酒酵母合成葡萄糖二酸. 生物工程学报, 2017, 33(2): 228–236.

Gong X, Liu Y, Wang C, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of glucaric acid. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 228–236.

摘 要: 葡萄糖二酸是一种高附加值的有机酸, 广泛用于食品、医药和化工领域。为获得生产葡萄糖二酸的微生物细胞工厂, 通过共表达小鼠来源的肌醇加氧酶 (MIOX) 及恶臭假单胞菌来源的醛酸脱氢酶 (Udh), 在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C 中构建了葡萄糖二酸合成途径, 产量为 (28.28 ± 3.15) mg/L。在此基础上, 通过调控前体肌醇的合成途径, 发现肌醇-1-磷酸合成酶 (INO1) 是葡萄糖二酸合成途径的限速酶, 过量表达 *INO1*, 葡萄糖二酸产量达到 (107.51 ± 10.87) mg/L, 提高了 2.8 倍。进一步弱化竞争支路中磷酸果糖激酶 (PFK1) 的表达, 最终葡萄糖二酸的产量达到 (230.22 ± 10.75) mg/L, 为进一步获得高产葡萄糖二酸细胞工厂提供基础。

关键词: 葡萄糖二酸, 肌醇-1-磷酸合成酶, 磷酸果糖激酶, 酿酒酵母, 代谢工程

Received: July 28, 2016; **Accepted:** September 13, 2016

Supported by: Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province, China (No. BE2014607), Program for Chang Jiang Scholar and Innovative Research Team in University (No. IRT_15R26), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20141107)

Corresponding authors: Zhen Kang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

Jianghua Li. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918309; E-mail: lijianhua@jiangnan.edu.cn

江苏省科技支撑计划项目 (No. BE2014607), 长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT_15R26), 江苏省自然科学基金 (No. BK20141107) 资助。

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of glucaric acid

Xu Gong^{1,2}, Ye Liu^{1,2}, Cui Wang^{1,2}, Jianghua Li^{1,2} and Zhen Kang^{1,2}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

Abstract: Glucaric acid, a high value-added organic acid, is widely used in food, pharmaceutical and chemical industries. For microbial production of glucaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*, we constructed a synthetic glucaric acid biosynthetic pathway by coexpressing the genes encoding myo-inositol oxygenase from mice and uronate dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. Moreover, myo-inositol-1-phosphate synthase was identified as a rate-limiting enzyme in glucaric acid pathway and was upregulated, resulting in the production of glucaric acid of (107.51 ± 10.87) mg/L, a 2.8-fold increase compared to the parent strain. Then, by repressing the activity of phosphofructokinase, the concentration of glucaric acid further increased to (230.22 ± 10.75) mg/L. The strategy could be further used to construct cell factories for glucaric acid production.

Keywords: glucaric acid, myo-inositol-1-phosphate synthase, phosphofructokinase, *Saccharomyces cerevisiae*, metabolic engineering

葡萄糖二酸 (Glucaric acid, GA) 是一种天然有机酸,广泛存在于水果、蔬菜和哺乳动物中,可应用于降低胆固醇^[1]、治疗肥胖^[2]和癌症^[3]等。此外,葡萄糖二酸作为聚合物的合成成分,被大量用于新型羟基化尼龙材料的制造,又因其具备可与金属螯合的特性,葡萄糖二酸催化法为合成染料的生物降解提供了新思路^[4-5]。众多附加应用使得葡萄糖二酸在 2004 年被美国能源部确定为“最具价值的生物炼制产品”^[6]。

葡萄糖二酸主要通过化学氧化葡萄糖的方法制备,包括硝酸氧化法及 2,2,6,6-四甲基哌啶氧自由基 (TEMPO) 氧化法等^[7]。但因其存在试剂耗费量大、环境污染等问题,使得化学法应用受到限制。生物法制备葡萄糖二酸因其长足的发展空间,逐渐受到研究者的重视。哺乳动物体内,葡萄糖到葡萄糖二酸至少需要 10 步酶催化反应^[8]。Prather 团队通过组合表达不同来源的

途径酶,在大肠杆菌和酿酒酵母中成功构建了葡萄糖二酸合成途径,实现了微生物合成葡萄糖二酸^[9-10];Liu 等以肌醇为底物,在毕赤酵母中生产葡萄糖二酸,产量达到目前最高值 (6.61 ± 0.30) g/L^[11];Lee 等通过多步酶法降解半纤维素,同时将水解产物进行转化,成功获得葡萄糖二酸^[12]。

目前,关于微生物法生产葡萄糖二酸的研究,多依赖于其前体肌醇的添加,造成生产成本较高;酶法降解虽然以生物质原料为底物,但产量较低,只达到微摩尔每升级别。为进一步获得葡萄糖二酸的高产菌株,同时使产品获得更广泛的应用,本研究对食品安全菌株酿酒酵母进行代谢工程改造,实现以葡萄糖为唯一前体合成葡萄糖二酸。首先在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C 中共表达小鼠来源的肌醇加氧酶 (MIOX) 及恶臭假单胞

菌来源的醛酸脱氢酶 (Udh) ,成功构建葡萄糖二酸合成途径 ,在此基础上 ,通过过量表达肌醇-1-磷酸合成酶 (INO1) ,强化其前体肌醇的合成。最后 ,通过敲除磷酸果糖激酶 (PFK1) 弱化竞争支路——糖酵解途径 ,进一步提高葡萄糖二酸的产量 ,重组菌在摇瓶中产量达到 (230.22 ± 10.75) mg/L。

表 1 本文所用的质粒与菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pUC57-mM	pUC57 carrying codon-optimized <i>MIOX</i> from mouse, Ap ^r	[11]
pY26-GPD-TEF	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> shuttle vector, <i>ScURA3</i> , 2 μ m, Ap ^r	This study
pY26 -MIOX-Udh	<i>P_{GPD}-MIOX-T_{CYC1}</i> and <i>P_{TEF}-Udh-T_{ADH1}</i> in pY26-GPD-TEF	This study
pFA6a-HIS3MX6	Gene deletion vector, <i>HIS3</i> , Ap ^r	[13]
pFA6a-INM1	<i>P_{TEF}-INM1-T_{TEF}</i> in pFA6a-HIS3MX6	This study
pFA6a-INM2	<i>P_{TEF}-INM2-T_{TEF}</i> in pFA6a-HIS3MX6	This study
pFA6a-INO1	<i>P_{TEF}-INO1-T_{TEF}</i> in pFA6a-HIS3MX6	This study
YEp351	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> shuttle vector, <i>ScLEU2</i> , 2 μ m, Ap ^r	[14]
YEp351-INM1	<i>P_{TEF}-INM1-T_{TEF}</i> in YEp351	This study
YEp351-INM2	<i>P_{TEF}-INM2-T_{TEF}</i> in YEp351	This study
YEp351-INO1	<i>P_{TEF}-INO1-T_{TEF}</i> in YEp351	This study
YEp351-INM1-INO1	<i>P_{TEF}-INM1-T_{TEF}</i> and <i>P_{TEF}-INO1-T_{TEF}</i> in YEp351	This study
Strains		
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-289</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3Δ 1</i> ; <i>MAL2-8^C</i> ; <i>SUC2</i>	Lab stock
S-UM	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/pY26-MIOX-Udh	This study
S	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351	This study
S-INM1	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INM1	This study
S-INM2	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INM2	This study
S-INO1	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INO1	This study
S-INM1+INO1	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INM1-INO1	This study
S0	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351, pY26-MIOX-Udh	This study
S-INM1-UM	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INM1, pY26-MIOX-Udh	This study
S-INM2-UM	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INM2, pY26-MIOX-Udh	This study
S-INO1-UM	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INO1, pY26-MIOX-Udh	This study
S-INM1+INO1-UM	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C/YEp351-INM1-INO1, pY26-MIOX-Udh	This study
S1	S-INO1-UM derivate, Δ <i>PFK1</i>	This study
S2	S-INO1-UM derivate, Δ <i>PFK2</i>	This study

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

本研究所用菌株和质粒均为作者所在实验室购买和保存 , 详见表 1。

1.1.2 酶、引物、DNA marker 及相关试剂盒

Primer STAR DNA 聚合酶、DNA marker、

T4 DNA 连接酶和大肠杆菌感受态细胞制备试剂盒均购自 TaKaRa (大连); 各种限制性内切酶购自 Thermo 公司; PCR 引物 (表 2) 由生工生物 (上海) 有限公司合成; 质粒小量抽提试剂盒和细菌总 DNA 提取试剂盒均购自生工生物 (上海) 有限公司; 酵母基因组提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 葡萄糖二酸钾色谱级标准品购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 (g/L)

蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5, 自然 pH。制备固体培养基时添加 2% 的琼脂。

1.2.2 YPD 培养基 (g/L)

葡萄糖 40, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 自然 pH。

1.2.3 SD 筛选培养基 (g/L)

Yeast Nitrogen Base 6.7, 葡萄糖 20, 根据需要添加亮氨酸、组氨酸、色氨酸及尿嘧啶, 使其在培养基中终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 自然 pH。制备固体培养基时添加 2% 的琼脂。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养

挑取生长良好的单菌落接种于含 25 mL 的 YPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h。

1.3.2 摇瓶培养

将种子培养液按 1% 接种量转接至 50 mL (摇瓶容量为 500 mL) 的发酵培养基 YPD 中, 培养 96 h。

1.4 方法

1.4.1 基因的扩增与质粒的构建

以从 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C 中提取的基因组 DNA 为模板, 利用引物对 INM1-6a-F/R、

INM2-6a-F/R 和 INO1-6a-F/R 分别扩增 *INM1*、*INM2* 和 *INO1* 基因; 以从恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* KT2440 中提取的基因组 DNA 为模板, 利用引物对 TEF-Udh-F/R 扩增 *Udh* 基因; 以 pUC57-mmol/L 质粒为模板, 利用引物对 GPD-MIOX-F/R 扩增小鼠来源的 *MIOX* 基因。pFA6a-His-F/R 引物对用于扩增 pFA6a 质粒。

将扩增得到的 *MIOX* 基因用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 连接至相应切口的质粒 pY26-GPD-TEF 中, 转化验证后再将该质粒用 *Not* I 和 *Bgl* II 双酶切, 与经相同限制性内切酶酶切后的 *Udh* 基因连接, 转化验证后得到质粒 pY26-MIOX-Udh。

将扩增得到的 *INM1*、*INM2* 和 *INO1* 基因用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切, 与扩增得到并用相同内切酶酶切后的 pFA6a 质粒连接, 转化验证后分别得到 pFA6a-INM1、pFA6a-INM2 及 pFA6a-INO1 质粒。再分别以 pFA6a-INM1、pFA6a-INM2 及 pFA6a-INO1 质粒为模板, TEF-INM1 (*Bam* H I) F/R、TEF-INM2 (*Hind* III) F/R、TEF-INO1 (*Sam* I) F 为引物, 分别扩增 *INM1*、*INM2* 和 *INO1* 表达框。得到的表达框分别经 *Bam* H I、*Hind* III 及 *Sam* I 单酶切后, 连接至相应单酶切后的 YEp351 质粒上, 转化验证后分别得到 YEp351-INM1、YEp351-INM2 及 YEp351-INO1 质粒。

将单酶切后的 *INM1* 表达框连接至 *Bam* H I 酶切后的 YEp351-INO1 质粒上, 得到质粒 YEp351-INM1-INO1。

以 pFA6a-HIS3MX6 为模板, 分别以 *Pfk1-disrup-F/R* 及 *Pfk2-disrup-F/R* 引物对扩增 *PFK1* 及 *PFK2* 敲除框。

引物见表 2。

表 2 本文使用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
GPD-MIOX-F	CCGGAATTCATGAAGGTCGACGTAGGTCCAGATC
GPD-MIOX-R	CCCAAGCTTTTACCAGGACAGAGTGCCAGGG
TEF-Udh-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGACCACTACCCCCTTCAATCG
TEF-Udh-R	GGAAGATCTTTAGTTGAACGGGCCGGCCACG
pFA6a-His-F	GCATGCTAGCGAGTACTGACAATAAAAAGATTCTTG
pFA6a-His-R	GTACCTCGAGGGTTGTTTATGTTCCGATGTG
INM1-6a-F	CCGCTCGAGATGACCATTGATCTAGCTTCTATCG
INM1-6a-R	GCATGCTAGCTCAGTCATATTTCAAATGGCC
INM2-6a-F	CCGCTCGAGATGGTATTAACGAGGCAAGTAC
INM2-6a-R	GCATGCTAGCTTAGTATTCTAACTACCCGC
INO1-6a-F	CCGCTCGAGATGACAGAAGATAATATTGCTCCA
INO1-6a-R	GCATGCTAGCTTACAACAATCTCTCTTCGAATCT
TEF-INM1(<i>Bam</i> H I) F	CGGGATCCCGCCAGATCTGTTTAGCTTG
TEF-INM1(<i>Bam</i> H I) R	TCGGATCCCTGGATGGCGGCGTTAGTATC
TEF-INM2(<i>Hind</i> III) F	CGCAAGCTTCGCCAGATCTGTTTAGCTTG
TEF-INM2(<i>Hind</i> III) R	CCCAAGCTTCTGGATGGCGGCGTTAGTATC
TEF-INO1(<i>Sam</i> I) F	TCCCGCGGGCGCCAGATCTGTTTAGCTTG
TEF-INO1(<i>Sam</i> I) R	GTACCGGGCTGGATGGCGGCGTTAGTATC
Pfk1-disrup-F	ATGCAATCTCAAGATTCATGCTACGGTGTGCATTGATCTATCATCACGACATG GAGGCCAGAATACCCTC
Pfk1-disrup-R	TCATTTGTTTTAGCGGCTAAAGCGGCTACCTCAGCTCTCAACTTTAATCTGGATG GCGGCGTTAGTATCG
Pfk2-disrup-F	ATGACTGTTACTACTCCTTTTGTGAATGGTACTTCTTATTGTACCGTCACGACATGG AGGCCAGAATACCCTC
Pfk2-disrup-R	TTAATCAACTCTCTTTCTTCCAACCAAATGGTCAGCAATGAGTCTGGTAGTGGATG GCGGCGTTAGTATCG

Underlined letters are restriction enzyme cut sites.

1.4.2 酵母的转化和重组子的筛选

酿酒酵母的转化采用 LiAc/SSDNA/PEG 法^[15]。转化后涂布于相应氨基酸缺陷的 SD 筛选平板，挑选转化子，提取基因组或质粒进行 PCR 验证。

1.4.3 葡萄糖二酸的定量检测

采用 HPLC 定量检测葡萄糖二酸，具体参见文献[10]。HPLC 分析条件：流动相为 5 mmol/L 稀硫酸，色谱柱为 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA) 流速 0.5 mL/min 柱温 55 °C 进样量 10 μL，检测器为紫外检测器，检测波长为 210 nm。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母中葡萄糖二酸合成途径的构建

为实现酿酒酵母中葡萄糖二酸的从头合成，首先需要在菌株中构建 1 条由葡萄糖到葡萄糖二酸的通路。如图 1 所示，在酿酒酵母中存在从葡萄糖到肌醇完整的合成途径，包含 3 个途径酶 INO1、INM1 和 INM2，因此只需要异源表达肌醇加氧酶 (MIOX) 和醛酸脱氢酶 (Udh)。

质粒 pY26-MIOX-Udh 同时含有 *MIOX* 表达

框和 *Udh* 表达框, 通过将该质粒转化 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C 得到产葡萄糖二酸的菌株 S-UM, 在 *S. cerevisiae* 中成功构建了从葡萄糖到葡萄糖二酸的合成途径。将该重组菌株培养 96 h 后, 取发酵液进行 HPLC 检测产物, HPLC 检测结果如图 2B 所示。

通过对不同浓度的葡萄糖二酸标准品的 HPLC (图 2A) 分析, 确定其保留时间约为 9.154 min, 并确定其标准曲线为 $C=1.761\ 6S+7.954\ 9$ (C 代表 GA 浓度, 单位: mg/L; S 代表峰面积), 相关系数 $R=0.995$ 。据此, 确定菌株 S-UM 葡萄糖二酸的产量为 (28.28 ± 3.15) mg/L。

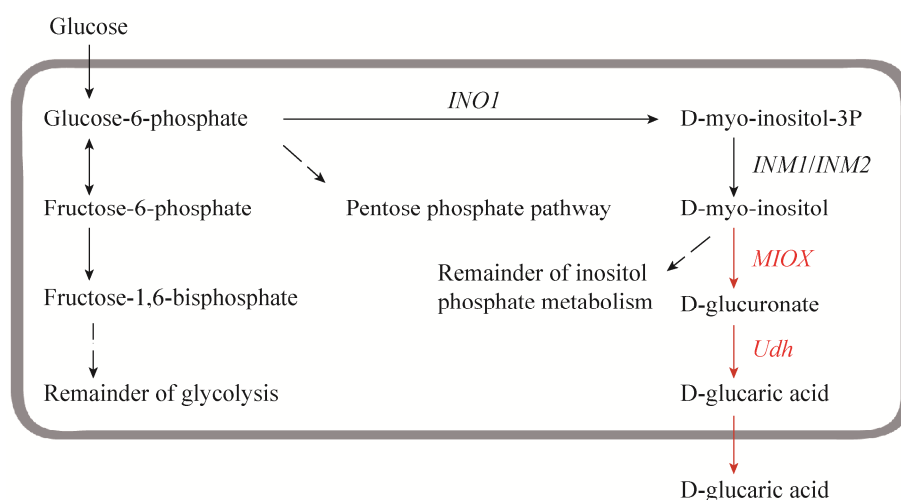


图 1 酿酒酵母中葡萄糖二酸合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of GA in *S. cerevisiae*. The native pathways are in black while the heterologous GA biosynthetic pathway is in red.

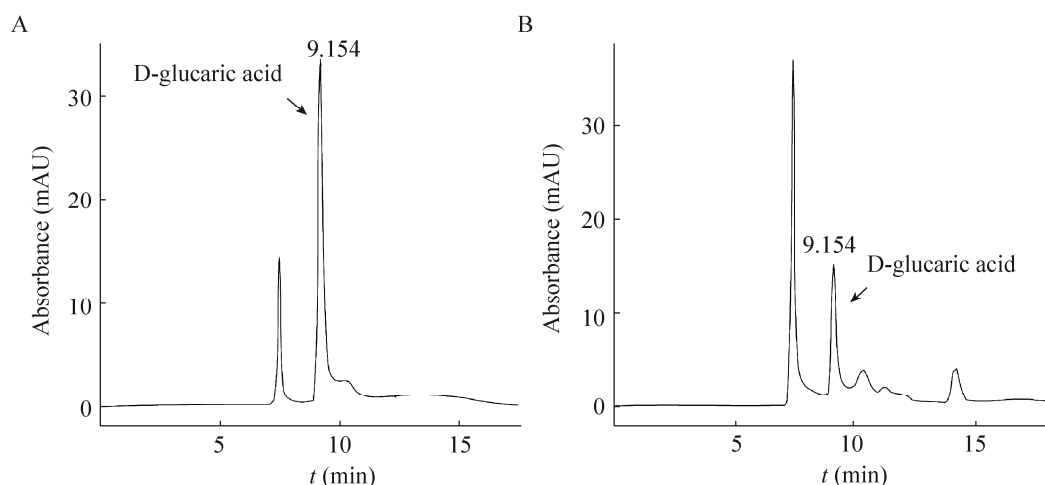


图 2 葡萄糖二酸标准品和重组菌发酵液的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of the standard sample and the product from recombinant *S. cerevisiae*. (A) GA. (B) The product from S-UM.

2.2 过量表达肌醇合成途径关键酶强化葡萄糖二酸的合成

肌醇不仅是合成葡萄糖二酸的重要前体,而且胞内肌醇的含量在一定范围内的提升能增强 MIOX 的活性^[16]。因此,在一定程度上,肌醇的含量与葡萄糖二酸的产量存在正相关性。但是,在酿酒酵母细胞内,有限的肌醇不仅要生产目标产物,还要合成众多磷脂酰化合物和胆碱等^[17-18],严重制约了利用微生物作为生产平台合成葡萄糖二酸。因此,为进一步提高葡萄糖二酸产量,过量表达肌醇合成途径不同基因,强化葡萄糖二酸代谢流。

如图1所示,在肌醇合成途径中,首先由INO1将6-磷酸葡萄糖转化为3-磷酸肌醇,再由INM1或其同工酶INM2将3-磷酸肌醇转化为肌醇。本研究通过分别过量表达INO1、INM1及INM2,分析对葡萄糖二酸合成的影响。分别将含有INO1、INM1及INM2基因的重组菌株S-INO1-UM、S-INM1-UM、S-INM2-UM及对照菌株S0在摇瓶中培养,葡萄糖二酸产量如图3所示。

从图3中可以看出,与对照菌株S0相比,S-INO1-UM的葡萄糖二酸产量有明显提升,96 h产量达到 (107.51 ± 10.87) mg/L,是对照菌S0的3.8倍,说明过量表达INO1有利于葡萄糖二酸的生成。而重组菌株S-INM1-UM及S-INM2-UM中葡萄糖二酸的产量没有明显变化。上述结果说明INO1编码的是葡萄糖二酸合成途径中的一个限速酶,而INM1和INM2虽然也是肌醇合成途径的必需基因,但酿酒酵母自身含有的肌醇单磷酸酶(INM1/INM2)已足够催化3-磷酸肌醇到肌醇的反应。

为进一步验证以上推论,将过量表达INM1和INO1的重组菌株S-INO1+INM1-UM培养,该重组菌葡萄糖二酸产量与S-INO1-UM相近

(图3)。由此可以进一步证明,过量表达INO1可以强化葡萄糖二酸的上游代谢流,进而提高其产量。这与大肠杆菌合成葡萄糖二酸的相关研究一致^[16]。

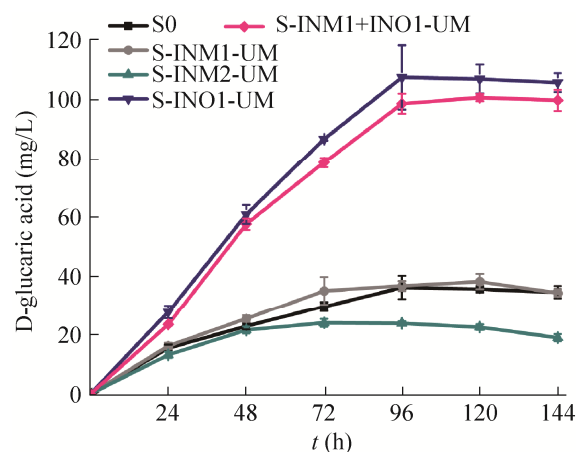


图3 过表达肌醇合成途径不同基因对葡萄糖二酸产量的影响

Fig. 3 Effect of overexpression of inositol biosynthetic pathway genes on GA production.

另外,有研究表明INO1是肌醇合成途径的限速酶^[18]。为验证过量表达INO1是通过增加胞内肌醇含量,进而提升葡萄糖二酸含量,本研究用HPLC法^[19]分别检测菌株S、S-INM1、S-INM2、S-INO1和S-INM1+INO1胞内肌醇含量,但均因含量较低无法量化。可能是因为肌醇作为酿酒酵母的代谢中间产物,多流向磷脂酰肌醇代谢途径中,很少积累,故未获得相应的有效数据。

2.3 敲除PFK1/PFK2基因强化葡萄糖二酸的合成

在酿酒酵母中,6-磷酸葡萄糖作为葡萄糖二酸的前体是一个重要的分支点,除了参与肌醇磷酸代谢途径,还参与其竞争支路——糖酵解及磷酸戊糖途径(图1)。为进一步提高重组菌中葡萄糖二酸的产量,需要更多的6-磷酸葡萄糖进入肌醇磷酸代谢途径中。因此,通过弱化其竞争途径

的关键酶——磷酸果糖激酶的活性抑制糖酵解途径,是减少 6-磷酸葡萄糖消耗的一个重要策略。有研究表明,*PFK1* 和 *PFK2* 分别编码磷酸果糖激酶的 α 亚基和 β 亚基,两者中任一亚基突变失活后,另一亚基也能单独完成该酶的功能,同时使胞内 6-磷酸葡萄糖含量上升^[20-21]。本研究分别敲除重组菌中 *PFK1* 和 *PFK2* 基因,即将 *PFK1* 敲除框和 *PFK2* 敲除框分别转化到 S-INO1-UM 中,验证正确后得到重组菌 S1 和 S2。图 4 为 S1 和 S2 缺陷菌株的 PCR 鉴定凝胶电泳图。

S1 及 S2 重组菌摇瓶培养 96 h 后葡萄糖二酸产量如图 5 所示。敲除 *PFK1* 或 *PFK2* 基因后,重组菌葡萄糖二酸产量均有明显提高,分别为 (230.22 ± 10.75) mg/L 及 (178.99 ± 9.21) mg/L。该结果表明,弱化糖酵解途径能有效促进葡萄糖二酸的合成。

其中,S1 比 S2 产量更高,故敲除 *PFK1* 对葡萄糖二酸的合成有更好的促进作用。在磷酸果糖激酶中, α 亚基主要作用为调节功能,而 β 亚基行使催化功能^[20]。因此推测重组菌 S1 和 S2 葡萄糖二酸产量存在差异可能是由两亚基功能不同,失活后对磷酸果糖激酶活性的抑制效果不同而造成的。

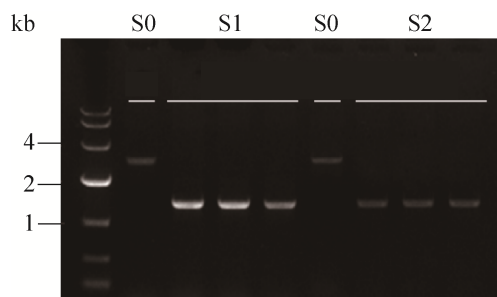


图 4 *PFK1/PFK2* 基因敲除菌株的鉴定
Fig. 4 Identification of *PFK1/PFK2* mutant *S. cerevisiae*.

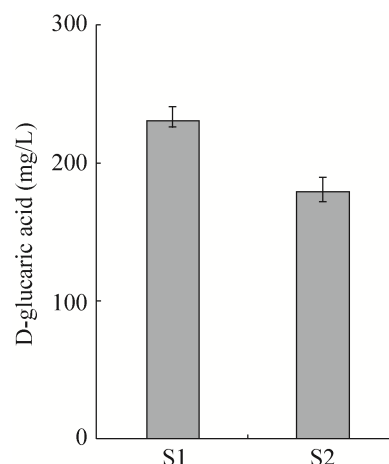


图 5 敲除 *PFK1/PFK2* 对葡萄糖二酸产量的影响
Fig. 5 Effect of *PFK1/PFK2* deletion on the GA production.

3 结语

葡萄糖二酸作为一种自然界存在的高附加值有机酸,具有重要的生理功能。通过共表达小鼠来源的肌醇加氧酶 (MIOX) 及恶臭假单胞菌来源的醛酸脱氢酶 (Udh),在酿酒酵母中成功构建了葡萄糖二酸合成途径。通过调控其前体肌醇合成途径,发现肌醇-1-磷酸合成酶 (INO1) 是葡萄糖二酸合成途径的限速酶。在此基础上,通过使 *PFK1* 酶失活,弱化竞争支路,使产量达到 (230.22 ± 10.75) mg/L,是相同条件下原始菌株产量的 8.14 倍。为进一步提高葡萄糖二酸的产量,通过抑制磷酸戊糖支路、磷脂酰肌醇支路以及改造葡萄糖二酸途径限速酶,成为后续研究的重点。

REFERENCES

- [1] Walaszek Z, Szemraj J, Hanausek M, et al. D-Glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat. *Nutr Res*, 1996, 16(4): 673–681.

- [2] Bhattacharya S, Manna P, Gachhui R, et al. D-Saccharic acid 1,4-lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF- κ B and PKC signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 267(1): 16–29.
- [3] Gupta KP, Singh J. Modulation of carcinogen metabolism and DNA interaction by calcium glucarate in mouse skin. *Toxicol Sci*, 2004, 79(1): 47–55.
- [4] Kiely DE, Chen L, Lin TH. Simple preparation of hydroxylated nylons-polyamides derived from aldaric acids//Fishman ML, Friedman RB, Huang SJ, Eds. *Polymers from Agricultural Coproducts*. Washington: American Chemical Society, 1994: 149–158.
- [5] Polen T, Spelberg M, Bott M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. *J Biotechnol*, 2013, 167(2): 75–84.
- [6] Werpy T, Petersen G, Aden A, et al. Top value added chemicals from biomass, volume 1: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Washington, DC: US Department of Energy, 2004.
- [7] Kochkar H, Lassalle L, Morawietz M, et al. Regioselective oxidation of hydroxyl groups of sugar and its derivatives using silver catalysts mediated by TEMPO and peroxodisulfate in water. *J Catal*, 2000, 194(2): 343–351.
- [8] Linster CL, Van Schaftingen E. Glucuronate, the precursor of vitamin C, is directly formed from UDP-glucuronate in liver. *FEBS J*, 2006, 273(7): 1516–1527.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Lee CC, Kibblewhite RE, Paavola CD, et al. Production of glucaric acid from hemicellulose substrate by rosettasome enzyme assemblies. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(7): 489–496.
- [13] Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, et al. Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, 13(11): 1065–1075.
- [14] Hill JE, Myers AF, Koerner TJ, et al. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 1986, 2(3): 163–167.
- [15] Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 31–34.
- [16] Moon TS, Dueber JE, Shiue E, et al. Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2010, 12(3): 298–305.
- [17] 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.
- [18] Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1348(1/2): 245–256.
- [19] Shiue E, Brockman IM, Prather KLJ. Improving product yields on D-glucose in *Escherichia coli* via knockout of *pgi* and *zwf* and feeding of supplemental carbon sources. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(3): 579–587.
- [20] Heinisch J. Construction and physiological characterization of mutants disrupted in the phosphofructokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1986, 11(3): 227–234.
- [21] Nishino S, Okahashi N, Matsuda F, et al. Absolute quantitation of glycolytic intermediates reveals thermodynamic shifts in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking *PFK1* or *ZWF1* genes. *J Biosci Bioeng*, 2015, 120(3): 280–286.

(本文责编 陈宏宇)