



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170332

## 载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 对普鲁兰多糖合成的影响

郭建, 黄思瑶, 郑鹏, 陈叶福, 郭学武, 肖冬光  
(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 普鲁兰多糖在食品、医药、化工等行业应用广泛. 糖脂中间体 lipid-G 是普鲁兰多糖合成的基本单元, 它由脂类物质和尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 结合而成. 载脂蛋白负责调控脂类物质的合成, 结果表明载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 能够调节普鲁兰多糖合成, 整合过表达 *apo* 或 *gltP* 能使多糖产量分别增加 7.78% 和 15.23%, 而敲除 *apo* 或 *gltP* 则使多糖产量分别降低 21.35% 和 35.07%. 强化普鲁兰多糖合成的传统思路多从增加 UDPG 供给入手, 而本研究发现, 通过调控脂类物质来增强糖脂中间体 lipid-G 的合成也能够促进普鲁兰多糖的生产, 这为通过代谢工程手段强化普鲁兰多糖合成提供了新的思路.

**关键词:** 载脂蛋白; 出芽短梗霉; 普鲁兰多糖

中图分类号: Q939.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2019)02-0012-07

## Effect of Apolipoprotein Genes *apo* and *gltP* on Pullulan Synthesis

GUO Jian, HUANG Siyao, ZHENG Peng, CHEN Yefu, GUO Xuwu, XIAO Dongguang  
(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Pullulan has been widely used in food, pharmaceutical, and chemical industry. The glycolipid intermediate lipid-G is the basic unit for pullulan synthesis, and it was formed through combining lipid and UDPG. Apolipoprotein can regulate the synthesis of lipid. In the present study, the effect of two kinds of apolipoprotein genes (*apo* and *gltP*) on pullulan synthesis was examined. It was indicated that *apo* and *gltP* can regulate pullulan synthesis, but the molecular weight and the structure of the pullulan produced was not regulated by *apo* and *gltP*. Overexpression of *apo* or *gltP* could result in 7.78% and 15.23% increase in pullulan production, respectively, while the pullulan production decreased by 21.35% and 35.07% respectively after deletion of *apo* or *gltP*. In order to strengthen the formation of pullulan, the traditional method is to increase the amount of UDPG. In this research, we found out that by regulating the lipid synthesis, the glycolipid intermediate can be increased, thus leading to an increase in pullulan production. The present work provides a new way for increasing pullulan production through metabolic engineering.

**Key words:** apolipoprotein; *Aureobasidium pullulans*; pullulan

普鲁兰多糖是由出芽短梗霉合成的一种胞外多糖, 它由麦芽三糖以  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键反复连接而成<sup>[1]</sup>. 特殊的化学结构赋予普鲁兰多糖优良的性质, 它黏度大、水溶性极强, 在化工、食品、医药等行业应用广泛. 普鲁兰多糖可作为增稠剂, 也能用于生产可被微生物降解的薄膜, 还可作为低卡路里食品直接食用<sup>[2]</sup>.

普鲁兰多糖的合成是一个复杂过程. 磷酸葡萄糖变位酶、葡萄糖焦磷酸化酶、葡萄糖基转移酶可能是普鲁兰多糖合成过程中的关键酶<sup>[1]</sup>. Li 等<sup>[3]</sup>过表达葡萄糖焦磷酸化酶基因后发现, 普鲁兰多糖产量提升了 1.3 倍. Chen 等<sup>[4]</sup>验证了几个葡萄糖基转移酶基因的功能, 发现其中 1 个葡萄糖基转移酶基因对普鲁兰多糖产量有促进作用. 以上实验结果同推测的普鲁

收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2017-12-18

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT1166); “十二五” 国家科技计划农村领域资助项目 (2012AA101805)

作者简介: 郭建 (1987—), 男, 四川眉山人, 博士研究生; 通信作者: 陈叶福, 教授, yfchen@tust.edu.cn

兰多糖合成途径相互印证. 除了上述关键酶外, 糖脂中间体 lipid-G 对多糖的合成也至关重要<sup>[5]</sup>. 糖脂中间体 lipid-G 是由脂类物质与尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 结合而成的<sup>[5]</sup>. 已有的文献[3-4]报道都是从增加 UDPG 含量的角度来增强普鲁兰多糖的合成, 并未考虑脂类物质对糖脂中间体 lipid-G 的影响.

载脂蛋白 (apolipoprotein) 对脂类物质的合成和运输均有较大影响<sup>[5-6]</sup>, 脂类物质对于糖脂中间体的形成至关重要. 脂类物质含量的增加能够促进糖脂中间体的形成, 作为普鲁兰多糖合成的基本单元, 足量的糖脂中间体无疑会促进普鲁兰多糖的合成. 出芽短梗霉所产脂类物质的主要成分为重油<sup>[1]</sup>, 但是重油在普鲁兰多糖合成中的作用还未见报道, 由此可以推测其可能参与糖脂中间体 lipid-G 的合成. 基于以上认识, 本研究以出芽短梗霉 (*A. pullulans*) CBS110374 菌株为研究对象, 通过敲除和整合过表达, 考察了出芽短梗霉载脂蛋白基因 *apo* 和 *glp* 对普鲁兰多糖及重油合成的影响, 这有助于深入认识普鲁兰多糖合成过程.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

出芽短梗霉 (*A. pullulans*) CBS110374 购自荷兰 CBS 菌种保藏中心, 所用工程菌株 OA21、OG5、 $\Delta apo$  和  $\Delta glp$  为本实验构建.

DNA 聚合酶、dNTP, Takara 公司; D9515 崩溃

酶、L4025 消解酶、Trizma 碱, Sigma 公司; 潮霉素 B, 上海索宝生物科技有限公司; 山梨醇, 上海迈瑞尔化学技术有限公司; 甲醇, 天津市北方天医化学试剂厂; 无水乙醇, 天津市申泰化学试剂有限公司.

### 1.2 培养基及培养条件

YEPA 培养基 (g/L): 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 葡萄糖 20, 固体培养基中加入琼脂粉 15, 121 °C 灭菌 20 min.

HCS 培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 酵母浸粉 3, 牛肉粉 1, 蛋白胨 10, 麦芽粉 3, 固体培养基中加入琼脂粉 15, pH 5.7, 115 °C 灭菌 20 min. HCS 培养基双层培养基的下层 HCS 培养基添加终质量浓度为 50 mg/L 的潮霉素, 上层 HCS 培养基不添加潮霉素.

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 硫酸镁 0.4, 酵母粉 1.2, 硫酸铵 1.0, NaCl 4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4, pH 6.0, 115 °C 灭菌 20 min.

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 50, 硫酸镁 0.2, 酵母粉 0.8, 硫酸铵 0.8, NaCl 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6, pH 6.5, 115 °C 灭菌 20 min.

种子培养条件为 28 °C、200 r/min 培养 24 h, 发酵培养条件为 28 °C、220 r/min 培养 7 d.

### 1.3 重组菌株构建

重组菌株的构建采用同源重组依赖型 DNA 装配方法<sup>[7]</sup>, 过表达 *glp* 基因的菌株的构建过程参考文献[7]. 所用引物 (表 1) 由金维智生物技术有限公司合成, 下划线表示片段间重叠的碱基.

表 1 引物

Tab. 1 Primers

引物	引物序列 (5'→3')
PGK <sup>3</sup> F	<u>CTGTCCGACCTAGTGAAAGGGAAGAC</u> ATTGCTCACTTAGGTAACC
PGK <sup>3</sup> 5R	<u>GCCGTAGGAGGGGCTGGAAGGCCA</u> TTGTGACTGAATCGAGTGTGTGTCAG
apoU	<u>GTCTGACACACTCGATT</u> CAGTCACAATGGCCTTCCAGCCCCCTCCTAC
apoD	<u>TTTTGAAAAAACACTCTGATGAG</u> TTTATTTGCCCTTTCTAACCC
PGK <sup>5</sup> F	<u>GGAGTGGGTTAGAAAGGGCAAATAA</u> ACTCATCAGAGTGTTTTTTTC
PGK <sup>5</sup> R	<u>GACGGCACCAATACCAAGCATAGC</u> CTCAAAAATGGTTAAAAGAC
ApoUs	GATCTCATAGATGACAATAGAC
ApoUa	<u>GTGTTCCCGTTCTTGCTGTCTTGAC</u> GTGCTATCTACAGACAAGAC
HPT3s	<u>CCTTCGTCTTGCTGTAGATAGCACT</u> CAAGACAGCAAGAACGGG
HPT3a	<u>AACGAAATGCCATTCTTGTAAGCA</u> GTCTTCCCTTTCCTAGGTCG
ApoDs	<u>CTGTCCGACCTAGTGAAAGGGAAG</u> ACTGCTTACAAGAATGGCATTTC
ApoDa	GTGGTTTGATCCTATCACTG
glpU1s	CGTTGTCAAACCACACCTCAGTC
glpU1a	<u>GTGTTCCCGTTCTTGCTGTCTTGAC</u> GTGCTATTGTGGTTGTTGTAGAG
HPT4s	<u>CAATCCTCTACAACAACCACAATA</u> CTCAAGACAGCAAGAACGGG
HPT4a	<u>GCGAAAAGACACCAATCACATAAG</u> TCTTCCCTTTCCTAGGTCG
glpD1s	<u>CTGTCCGACCTAGTGAAAGGGAAG</u> ACTTATGTGATTGGTGTCTTTTC
glpD1a	CTCGCATGAGTGGGTGGGGTAG
APOs	CTTGTCTCTACCCTCAGAGAACCCTAC

续表

引物	引物序列(5'→3')
APOa	CTTTTGAGGCTTGGGATTGGTTGTCGC
gltPa	GCACCACAGCTTCATGATCAAGC
gltPs	GCACCAAGCTCTTTCTCAAC

同源重组依赖型 DNA 装配方法为相邻片段引物设计方法,在 rDNA 基因(Genbank NO. AY139394.1)位点整合过表达 *apo* 或 *gltP* 基因,如图 1 所示.前期研究<sup>[7]</sup>发现出芽短梗霉拥有高效的同源重组修复机制,基于这种机制在设计引物时于引物末端加入同源序列,然后将待整合片段导入细胞内,即可在细胞内完成片段连接并整合到设计好的位点.

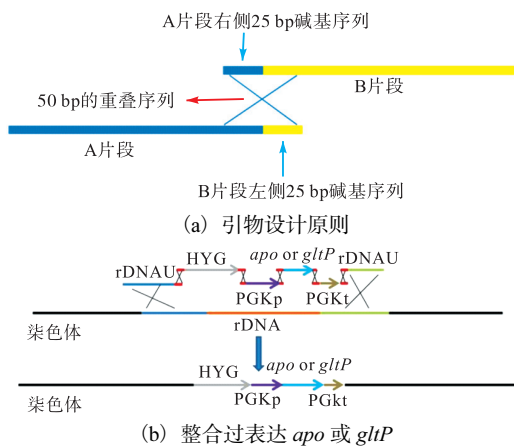


图 1 同源重组依赖型 DNA 装配方法引物设计原则及整合过表达 *apo* 或 *gltP* 示意图

Fig. 1 Principles of homologous recombination dependent DNA assembly method and the schema of integrating overexpression of *apo* or *gltP*

### 1.3.1 转化片段准备

在 rDNA 位点过表达 *apo* 基因(JGI protein ID: 84794)需要 6 个片段,即 HPT 片段、rDNAU 片段和 rDNAD 片段,PGKP5(磷酸甘油酸激酶基因启动子)用引物 PGKPF/PGKP5R 扩增,*apo* 片段(*apo* 基因)用引物 apoU/apoD 扩增,PGKt5(磷酸甘油酸激酶基因终止子)用引物 PGK5tF/PGKtR 扩增.敲除 *apo* 基因需要 3 个片段,*apo* 基因上同源臂用引物 ApoUs/ApoUa 扩增,*apo* 基因下同源臂用引物 ApoDs/ApoDa 扩增,潮霉素抗性基因用引物 HPT3s/HPT3a 扩增.

敲除 *gltP* 基因需要 3 个片段,*gltP* 基因上同源臂用引物 gltPU1s/gltPU1a 扩增,*gltP* 基因下同源臂用引物 gltPD1s/gltPD1a 扩增,潮霉素抗性基因用引物 HPT4s/HPT4a 扩增.

### 1.3.2 出芽短梗霉转化

出芽短梗霉采用电转化方法:取 1 环出芽短梗霉

接种于 5 mL 的 YEPD 试管中,28 °C、200 r/min 培养 24 h;取 2 mL 菌液接种于装液量为 50 mL YEPD 的 250 mL 三角瓶中,28 °C、200 r/min 培养 24 h;2 mL 菌液移至 2 mL 灭菌离心管,4 °C、12 000 r/min 离心 2 min,收集菌体,可重复多次以获得足量菌体;用 1 mol/L 山梨醇溶液将菌体重悬,4 °C、12 000 r/min 离心 2 min,收集菌体;加入 1 mL 溶液 I (1 mol/L 山梨醇和 50 mmol/L 柠檬酸钠混合液,pH 5.8)将菌体重悬,并加入适量的 D9515 崩溃酶和 L4 025 消解酶(703 U/mg)处理细胞,28 °C、100 r/min 酶解 10 min 后迅速拿出,4 °C、2 500 r/min 离心 10 min,收集菌体;菌体用 2 mL 溶液 I 重悬,4 °C、2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,重复 1 次;菌体用 2 mL 1 mol/L 山梨醇溶液重悬,4 °C、2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,重复 1 次;菌体用 100 μL 1 mol/L 山梨醇溶液混匀,并加入预冷的待转片段,冰浴放置 10 min;将混合液加入已经预冷好的电转杯中,冰浴放置 10 min;1 500 V、200 Ω 条件下进行电转,电转完毕后将菌体用 1 mol/L 山梨醇溶液洗出,30 °C 培养箱中修复培养 2~4 h;修复培养后将全部菌体涂布于 HCS 双层平板(初筛平板)中,30 °C 培养箱中培养 2~3 d 即可见转化子;将初筛平板长出的单菌落点板到 YEPD 潮霉素抗性平板(复筛平板)上,30 °C 培养箱中培养 2 d 即可见转化子.

### 1.4 出芽短梗霉生物量和葡萄糖含量的测定

取 10 mL 菌液,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;菌体用纯净水洗涤 2 次,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;所得菌体用纯净水悬浮后,转入干净的平皿中,70 °C 烘干至质量恒定,计算出芽短梗霉的生物量.

采用高效液相色谱法测定发酵液中葡萄糖含量:色谱柱为 Aglient HPX-87H(300 × 7.8 mm),检测器为示差检测器(RID),检测器温度 55 °C,柱温 65 °C,流动相为 5 mmol/L 硫酸溶液,流量 0.6 mL/min,进样量 10 μL.

### 1.5 普鲁兰多糖产量的测定

取 10 mL 菌液,12 000 r/min 离心 2 min 取上清液 5 mL,加入 2 倍体积的无水乙醇,4 °C 放置 12 h,5 000 r/min 离心 8 min 去上清液;沉淀出来的多糖再

用无水乙醇清洗2次;70℃烘箱烘干至质量恒定,计算多糖产量。

### 1.6 酶活力测定

依据 McCleary 等<sup>[8]</sup>的方法测定葡萄糖基转移酶活力。将适当稀释的待测样本(0.2 mL)与预平衡的对硝基苯基 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(0.2 mL, 10 mmol/L)置于 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.0)中,40℃处理 5 min。通过加入 Trizma 碱(3.0 mL, 2.0%)的水溶液终止反应,测量 410 nm 处的吸光度。酶活力用对硝基苯酚释放量( $\mu$ mol/L)表示,并通过参考标准曲线计算(通过用不同浓度的对硝基苯酚测量溶液的  $A_{410}$  值来测定标准曲线)。使用在 100℃加热 5 min 的样本和反应液的混合物作为对照。

根据 Dutra 等<sup>[9]</sup>的方法测定 UDPG 焦磷酸化酶活力。酶活力单位定义为在测定条件下在 1 min 内催化 1.0  $\mu$ mol/L 底物转化的酶量。使用在 100℃加热 5 min 的样本和反应液的混合物作为对照。

根据 Qian 等<sup>[10]</sup>的方法测定磷酸葡萄糖变位酶活力。酶活力单位定义为在测定条件下在 1 min 内催化 1.0  $\mu$ mol/L 底物转化的酶量。使用在 100℃加热 5 min 的无细胞提取物的混合物作为对照。

### 1.7 重油含量的测定

取 20 mL 发酵液,加入等体积的氯仿-甲醇混合液(1:1),在 50 mL 离心管中来回颠倒混匀;然后将混合液在 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,将上清液倒入分液漏斗,待分层后将下层含有重油的液体分出;将含有重油的液体经氮吹仪氮吹,去除有机溶剂;得到的重油用氯仿-甲醇溶液再反复处理 2 次,用以纯化重油;重油烘干至质量恒定,计算重油含量。

### 1.8 普鲁兰多糖结构的测定

普鲁兰多糖的结构采用傅里叶红外光谱仪进行分析。将 10 mg 样品与 250 mg 溴化钾混合均匀,用制片机在高压条件下制成薄片,仪器扫描波长范围为 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.9 mRNA 水平的测定

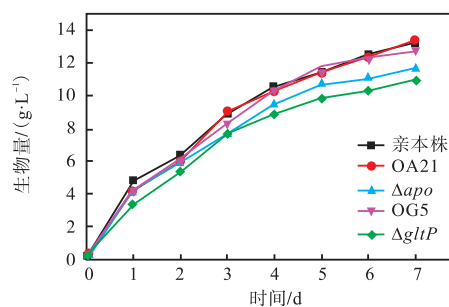
mRNA 水平的测定方法参见文献[7]。测定 *apo* 基因用引物 APOs/APOa,测定 *gltP* 基因用引物 *gltPa/gltPs*。

## 2 结果与分析

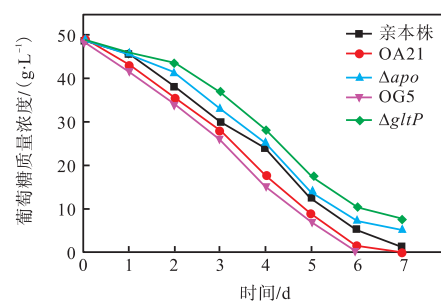
### 2.1 *apo* 和 *gltP* 对出芽短梗霉菌株生长性能的影响

通过 NCBI 查询到出芽短梗霉包含两个载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP*,分别构建了整合过表达 *apo* 或

*gltP* 基因的菌株 OA21 和 OG5,以及单敲 *apo* 或者 *gltP* 基因的菌株  $\Delta apo$  和  $\Delta gltP$ 。重组菌株的生长情况和葡萄糖利用能力如图 2 所示。敲除 *apo* 或 *gltP* 后,菌株生长受到抑制,生物量分别较亲本株减少了 10.85% 和 16.84%,而整合过表达 *apo* 或 *gltP* 对生物量没有显著影响。敲除 *apo* 或 *gltP* 降低了菌株对葡萄糖的利用能力,发酵 7 d 消耗的葡萄糖分别较亲本株减少了 4.5% 和 13.3%,而整合过表达 *apo* 或 *gltP* 增强了菌株的葡萄糖利用能力,发酵 6 d 后整合过表达 *apo* 或 *gltP* 基因的菌株已经将葡萄糖消耗殆尽。



(a) 生物量



(b) 葡萄糖利用能力

图 2 重组菌株生物量和葡萄糖利用能力同亲本株的比较

Fig. 2 Comparison of the cell growth and glucose utilization ability

### 2.2 *apo* 和 *gltP* 对普鲁兰多糖合成的影响

为了考察载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 与普鲁兰多糖合成的关系,对所得重组菌株的普鲁兰多糖合成能力进行了测定,如图 3 所示。整合过表达 *apo* 或 *gltP* 后,普鲁兰多糖产量分别较亲本株增加了 7.78% 和 15.23%。敲除 *apo* 或 *gltP* 抑制了普鲁兰多糖的合成,普鲁兰多糖产量分别较亲本株降低了 21.35% 和 35.07%。由此可知,相较于 *apo* 基因,*gltP* 基因对于普鲁兰多糖的合成更为重要。

### 2.3 普鲁兰多糖合成途径关键酶活力

为了深入探究 *apo* 和 *gltP* 与普鲁兰多糖合成的关系,对普鲁兰多糖合成途径中的 3 个关键酶的酶活力进行了测定,结果见表 2。由表 2 可知:整合过表



达 *apo* 后,磷酸葡萄糖变位酶活力、UDPG 焦磷酸化酶活力和葡萄糖基转移酶活力分别较亲本株增加了 18.52%、16.60% 和 15.79%。整合过表达 *gltP* 后,磷酸葡萄糖变位酶活力、UDPG 焦磷酸化酶活力和葡萄糖基转移酶活力分别较亲本株增加了 25.93%、30.23% 和 36.84%。敲除 *apo* 或 *gltP* 后,磷酸葡萄糖变位酶活力、UDPG 焦磷酸化酶活力和葡萄糖基转移酶活力均出现不同程度的降低。

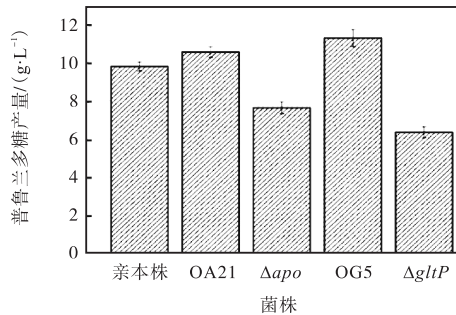


图 3 *apo* 和 *gltP* 对普鲁兰多糖合成的影响

Fig. 3 Effect of *apo* and *gltP* genes on the synthesis of pullulan

表 2 重组菌株普鲁兰多糖合成途径关键酶活力

Tab. 2 Enzyme activity of the key enzymes in the pullulan synthesis pathway

菌株	酶活力/(mU·mg <sup>-1</sup> )		
	磷酸葡萄糖变位酶	UDPG 焦磷酸化酶	葡萄糖基转移酶
亲本株	0.27 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.38 ± 0.04
OA21	0.32 ± 0.04	0.51 ± 0.06	0.44 ± 0.02
$\Delta apo$	0.23 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.27 ± 0.04
OG5	0.34 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.52 ± 0.05
$\Delta gltP$	0.22 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.03

### 2.4 *apo* 和 *gltP* 对以重油为代表的脂类物质合成的影响

载脂蛋白与脂类物质的合成密切相关。出芽短梗霉所产脂类的主要成分为重油<sup>[1]</sup>。为了考察载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 与脂类物质合成之间的关系,选取重油作为脂类物质的代表进行研究。出芽短梗霉分泌的重油是一种脂类物质,在医药、化工等行业有巨大的应用前景,*apo* 和 *gltP* 对以重油为代表的脂类物质合成的影响如图 4 所示。由图 4 可知:整合过表达 *apo* 或 *gltP* 后,重油产量分别较亲本株增加了 41.38% 和 3.5 倍。敲除 *apo* 或 *gltP* 抑制了脂类物质的合成,重油产量分别较亲本株降低了 17.24% 和 28.74%。这些结果表明,*apo* 和 *gltP* 都能影响出芽短梗霉对重油的合成,但是 *gltP* 基因的影响更显著。

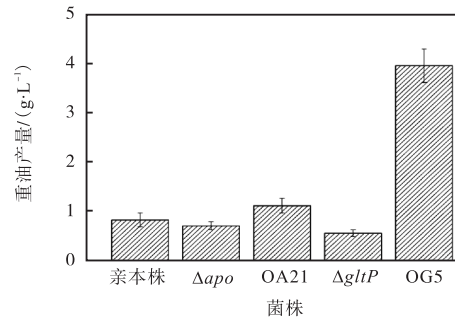
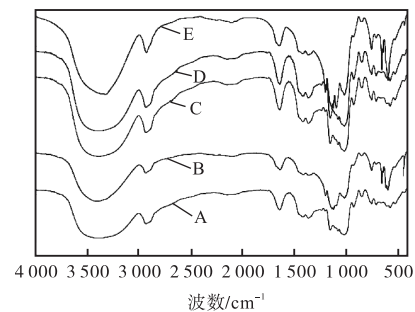


图 4 *apo* 和 *gltP* 对重油合成的影响

Fig. 4 Effect of *apo* and *gltP* genes on the synthesis of heavy oil

### 2.5 普鲁兰多糖结构鉴定

采用傅里叶红外光谱仪对重组菌株所产普鲁兰多糖结构进行了鉴定,并同普鲁兰多糖标品进行比对,结果如图 5 所示。由图 5 可知:所有样品均在 755 cm<sup>-1</sup> 和 915 cm<sup>-1</sup> 处有吸收峰,这些特征峰证实了  $\alpha$ -(1→4) 和  $\alpha$ -(1→6) 糖苷键的存在,而这个键型结构是构成普鲁兰多糖最基本的结构。同普鲁兰多糖标品的红外光谱图比对发现,所有重组菌株与标品结构基本一致,确认了所产胞外多糖为普鲁兰多糖。



A. 普鲁兰多糖标品; B. OA21 菌株所产多糖; C.  $\Delta apo$  菌株所产多糖; D. OG5 菌株所产多糖; E.  $\Delta gltP$  菌株所产多糖

图 5 重组菌株所产普鲁兰多糖与普鲁兰多糖标品红外光谱的比对

Fig. 5 Comparison of the IR spectra of pullulan produced by the recombinant strains with that of the standard pullulan

### 2.6 获得的重组菌株 *apo* 和 *gltP* 基因相对表达量

对敲除或整合过表达 *apo*, 以及敲除或整合过表达 *gltP* 基因的菌株所对应基因的转录水平进行了检测,见图 6。从图 6 中可知,敲除 *apo* 或 *gltP* 基因后 *apo* 或 *gltP* 基因转录几乎检测不到,进一步证实了 *apo* 或 *gltP* 基因已经被敲除。整合过表达 *apo* 或 *gltP* 则显著增强了对应基因的转录水平,OA21 菌株的 *apo* 转录水平较原始菌株增加了 4.1 倍,OG5 菌株的 *gltP* 转录水平较原始菌株增加了 3.9 倍。

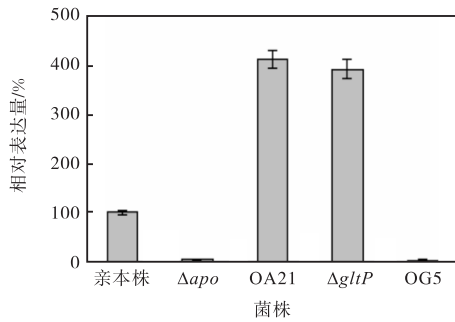
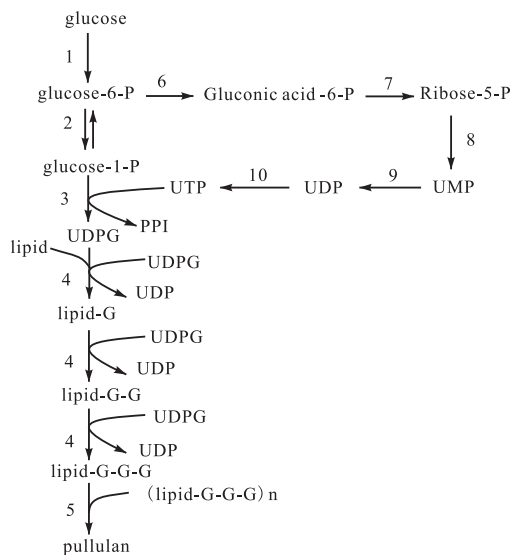


图6 重组菌株对应基因转录水平与亲本株的比较

Fig. 6 Comparison of the transcription levels of the recombinant strains with parent strains

### 3 讨论

普鲁兰多糖理化性能独特,在食品、化工、医药等行业应用广泛<sup>[1]</sup>。经文献汇总,本文绘制普鲁兰多糖合成途径(图7)。



1. 己糖激酶; 2. 磷酸葡萄糖变位酶; 3. UDPG 焦磷酸化酶;
4. 磷酸葡萄糖基转移酶; 5. 普鲁兰合酶; 6. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶;
7. 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶; 8. 磷酸核糖激酶; 9. 尿苷酸激酶;
10. 二磷酸尿苷激酶

图7 普鲁兰多糖合成途径

Fig. 7 The proposed pullulan synthesis pathway

已有的文献报道部分印证了该合成途径,葡萄糖基转移酶、磷酸葡萄糖变位酶、UDPG 焦磷酸化酶和普鲁兰合酶被认为是普鲁兰多糖合成途径中的关键酶<sup>[1, 3-4]</sup>。除了上述关键酶外,脂类物质也同普鲁兰多糖合成密不可分。脂类物质与 UDPG 的结合形成普鲁兰多糖合成的基本单元 lipid-G<sup>[5]</sup>,而这是普鲁兰多糖合成所必须的。载脂蛋白负责调控脂类物质的生物合成<sup>[6]</sup>,那么载脂蛋白势必会影响普鲁兰多糖的合

成。多位研究者<sup>[5-6, 11]</sup>也认为胞外多糖的合成与脂类物质紧密相关。

为了确认脂类物质是否参与普鲁兰多糖的合成过程,本文考察了载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 对普鲁兰多糖合成的影响。载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 能够影响出芽短梗霉生长性能和葡萄糖利用能力。*apo* 或者 *gltP* 的敲除抑制了菌株的生长,这可能是由载脂蛋白对胞内多种细胞器膜的调控引起的<sup>[12]</sup>。敲除 *apo* 或者 *gltP* 后菌株葡萄糖利用能力降低,这是由较慢的菌株生长和生成产物的减少引起的(图3和图4)。

载脂蛋白能调节脂类物质的合成和运输<sup>[13]</sup>。本文研究结果表明整合过表达 *apo* 或者 *gltP* 能够促进以重油为代表的脂类物质和普鲁兰多糖的合成,而敲除 *apo* 或者 *gltP* 则抑制了重油和普鲁兰多糖的生成。由此可知,适量增强出芽短梗霉脂类物质的合成有助于提高普鲁兰多糖产量,这与 Sutherland<sup>[11]</sup>和 Simon 等<sup>[6]</sup>的推测是相符合的。Price 等<sup>[14]</sup>的研究表明,过度强化出芽短梗霉脂类物质的合成不利于普鲁兰多糖合成。研究结果还发现,虽然 *apo* 和 *gltP* 能够调控普鲁兰多糖的产量,但是并不引起普鲁兰多糖结构的改变。

通过测定重组菌株普鲁兰多糖合成途径中关键酶的酶活力,发现整合过表达 *apo* 或者 *gltP* 能够促进葡萄糖基转移酶、磷酸葡萄糖变位酶和 UDPG 焦磷酸化酶的活力,而敲除 *apo* 或者 *gltP* 则降低了3个关键酶的活性。葡萄糖基转移酶、磷酸葡萄糖变位酶和 UDPG 焦磷酸化酶对普鲁兰多糖合成至关重要<sup>[1, 3-4]</sup>,这3个关键酶活力的改变能直接影响普鲁兰多糖的合成。

重油是普鲁兰多糖所产脂类物质的主要成分。研究结果显示普鲁兰多糖产量和重油产量呈正相关,这预示着重油可能参与普鲁兰多糖合成所需基本单元糖脂中间体 lipid-G 的生成。但是,并非重油合成能力越强普鲁兰多糖合成能力越强,比如 Price 等<sup>[14]</sup>就发现过度强化的重油合成能力能够抑制普鲁兰多糖的生成。

*apo* 和 *gltP* 对出芽短梗霉普鲁兰多糖合成的调节作用可以从以下几点来解释。第一,*apo* 和 *gltP* 调控脂类物质的合成,进而影响普鲁兰多糖合成所需基本单元糖脂中间体 lipid-G 的生成,最终改变普鲁兰多糖合成。第二,*apo* 和 *gltP* 表达量的改变引起了脂类物质含量的改变,某些脂类物质作为反式作用因子强化了 UDPG 的合成<sup>[15]</sup>,导致普鲁兰多糖合成途径

中关键酶活力性的增加。第三,出芽短梗霉重油是一种表面活性剂<sup>[16]</sup>,重油合成的增强有助于改善出芽短梗霉细胞膜通透性<sup>[17]</sup>,有利于普鲁兰多糖的外泌。

综上,本文研究结果表明载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 能够调节出芽短梗霉普鲁兰多糖的合成,并且 *gltP* 对普鲁兰多糖合成的影响大于 *apo*。*gltP* 和 *apo* 都负责介导脂类物质的转运,但 *gltP* 主要负责脂类物质向胞外转运<sup>[7]</sup>,而 *apo* 负责胞内转运<sup>[18]</sup>,不同的分工导致了这两个基因对于脂类物质合成的作用相区别。

#### 4 结 语

本文研究结果显示,整合过表达 *apo* 或 *gltP* 能使普鲁兰多糖产量分别增加 7.78% 和 15.23%,而分别敲除 *apo* 或 *gltP* 则使普鲁兰多糖产量降低 21.35% 和 35.07%;证实了脂类物质和普鲁兰多糖合成紧密相关,丰富和完善了普鲁兰多糖合成途径,为增加普鲁兰多糖合成基本单元糖脂中间体 lipid-G 的来源提供了新的思路。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Chi Z, Wang F, Chi Z, et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(5): 793-804.
- [ 2 ] Singh R S, Saini G K, Kennedy J F. Pullulan: Microbial sources, production and applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 73(4): 515-531.
- [ 3 ] Li H, Zhang Y, Gao Y, et al. Characterization of UGPase from *Aureobasidium pullulans*, NRRL Y-12974 and application in enhanced pullulan production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(6): 1141-1153.
- [ 4 ] Chen X, Wang Q Q, Liu N N, et al. A glycosyltransferase gene responsible for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 95(5): 539-547.
- [ 5 ] Donot F, Fontana A, Baccou J C, et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 951-962.
- [ 6 ] Simon L, Bouchet B, Bremond K, et al. Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in *Aureobasidium pullulans*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(12): 1193-1199.
- [ 7 ] Guo J, Wang Y, Li B, et al. Development of a one-step gene knock-out and knock-in method for metabolic engineering of *Aureobasidium pullulans*[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 251(138): 145-150.
- [ 8 ] Mccleary B V, Gibson T S, Sheehan H, et al. Purification, properties, and industrial significance of transglucosidase from *Aspergillus niger*[J]. Carbohydrate Research, 1989, 185(1): 147-162.
- [ 9 ] Dutra M B, Silva J T, Mattos D C, et al. Regulation of UDPG-pyrophosphorylase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* and their roles in trehalose metabolism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1289(2): 261-275.
- [ 10 ] Qian N, Stanley G A, Hahnhägerdal B, et al. Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and their regulation in maltose-and glucose-utilizing cells[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(17): 5304-5326.
- [ 11 ] Sutherland I W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides[J]. Advances in Microbial Physiology, 1982, 23: 79-150.
- [ 12 ] Dreux M, Bosen B, Ricard-Blum S, et al. The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(44): 32357-32369.
- [ 13 ] Mahley R W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology[J]. Science, 1988, 240(4852): 622-630.
- [ 14 ] Price N P, Manitchotpisit P, Vermillion K E, et al. Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380[J]. Carbohydrate Research, 2013, 370: 24-32.
- [ 15 ] Kalinowska M, Wojciechowski Z A. Modulation of activities of steryl glucoside hydrolase and UDPG: Sterol glucosyltransferase from *Sinapis alba*, by detergents and lipids[J]. Phytochemistry, 1985, 25(1): 45-49.
- [ 16 ] Manitchotpisit P, Price N P, Leathers T D, et al. Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(6): 1151-1159.
- [ 17 ] 刘新露, 潘训海, 谯康全. 表面活性剂对红细胞膜的作用研究[J]. 四川理工学院学报: 自科版, 2007, 20(4): 96-98.
- [ 18 ] Mahley R W, Rall S C. Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2000, 1: 507-537.

责任编辑: 郎婧