DOI:10.12441/spyswjs.20240321002 [文章编号] 1673-1689(2025)10-0103-10

重组毕赤酵母发酵合成抗紫外线化合物 gadusol

左文杰[1,2,3] 张 萍[1,2] 胥睿睿[1,2] 张乐奕[1,2] 康 振[1,2] 李江华[1,2,3*]

(1. 江南大学未来食品科学中心,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 3. 嘉兴未来食品研究院,浙江 嘉兴 314001)

摘要:【目的】通过合成生物学和代谢工程技术改造毕赤酵母(*Pichia pastoris*,*P. pastoris*),实现抗紫外线化合物 gadusol 的高效异源合成。**【方法】**基于对斑马鱼 gadusol 生物合成途径中基因的生物信息学分析和密码子优化,通过启动子工程、代谢工程技术和发酵优化等策略,在 *P. pastoris* 中构建 gadusol 发酵合成途径。**【结果】**通过优化提取和色谱分离制备了高纯度的 gadusol 标准品。重组菌株 *P. pastoris* HME 的 gadusol 产量达到 105 mg/L。通过进一步筛选基因表达启动子并优化发酵培养基组分,最终工程菌株 *P. pastoris* GME 的 gadusol 产量达到了约 175 mg/L。**【结论】**该研究构建了 *P. pastoris* GME 菌株,实现了 gadusol 的高效合成,为加快 gadusol 的工业化发酵生产和在食品与化妆品中的应用研究提供了支撑和参考。

关键词:毕赤酵母;gadusol;代谢工程;细胞工厂;抗紫外线化合物

Recombinant *Pichia pastoris* Fermentation for Biosynthesis of the UV Resistant Compound Gadusol

ZUO Wenjie[1,2,3] *ZHANG Ping*[1,2] *XU Ruirui*[1,2] *ZHANG Leyi*[1,2] *KANG Zhen*[1,2] *LI Jianghua*[1,2,3*]

(1. Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiaxing Institute of Future Food, Jiaxing 314001, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to employ synthetic biology and metabolic engineering techniques to engineer *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) for the efficient heterologous synthesis of the UV resistant compound gadusol. [**Method**] On the basis of a bioinformatic analysis and codon optimization of the genes involved in the gadusol biosynthetic pathway in *Danio rerio*, the gadusol fermentation pathway was constructed in *P. pastoris via* strategies such as promoter engineering, metabolic engineering, and fermentation optimization. [**Result**] A high-purity gadusol standard was prepared through optimized extraction and chromatographic separation. The gadusol yield in the recombinant strain *P. pastoris* HME reached 105 mg/L. By screening of gene expression promoters and optimization of the fermentation medium components, the engineered strain, *P. pastoris* GME, achieved a gadusol yield of approximately 175 mg/L. [**Conclusion**] This study successfully constructed the strain *P. pastoris* GME capable of efficiently synthesizing gadusol, providing support and a reference for accelerating the industrial production of gadusol by fermentation and the research on the application of this compound in the food and cosmetic industries.

Keywords: *Pichia pastoris*; gadusol; metabolic engineering; cell factory; UV resistant compound

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP622003);江南大学双一流学科与支撑学科协同发展支持计划项目(QGJC20230202)。

通信作者:李江华(1966—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事发酵工程和酶工程等领域研究。 E-mail: lijianghua@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-03-21 **修回日期:**2024-04-28

Gadusol（1，4，5-三羟基-5-羟甲基-2-甲氧基环己-3-酮）是与类菌孢素氨基酸（MAAs）相似的一类紫外线防护物质，主要存在于藻类、鱼类、爬行动物、两栖动物及鸟类中[1]。在藻类中，gadusol与MAAs的合成途径高度相关[2-4]。Gadusol主要通过磷酸戊糖途径（PPP）进行合成，其重要合成前体是7-磷酸景天庚酮糖（sedoheptulose 7-phosphate，S7P）。S7P通过环己酮合成酶（2-epi-5-epi-valiolone synthetase，EEVS）催化合成2-epi-5-epi-valiolone，随后，2-epi-5-epi-valiolone经过甲氧基转移酶（MT-Ox）催化形成gadusol。

目前，关于gadusol的生理学功能已有较深入的研究。Rice等[5]发现，敲除gadusol合成途径相关基因的鱼卵孵化率降低，易受到紫外线辐射损伤，证实gadusol在鱼类发育过程中有重要的紫外线防护作用。Gadusol是鱼类自带的“防晒霜”。在不同酸碱环境下，gadusol具有不同的构象，例如在pH为7时，gadusol会解离为gadusolate阴离子。形成的gadusolate阴离子具有更好的生理活性，可吸收具有强穿透力的紫外线B（UVB）（约280~320 nm），从而预防UVB引起的蛋白质损伤、色素沉着与皮肤老化[6-8]。Arbeloa等[9]研究发现，gadusol不仅能保护细胞免受紫外线辐射的伤害，而且在抗氧化方面可与抗坏血酸（维生素C）相媲美，具有对水溶性自由基的强还原能力。由于鱼卵中gadusol含量高，人们将其视为具有抗氧化价值的食物[10]。作为一类天然的防晒抗氧化物质[11]，gadusol在未来功能食品与化妆品中具有广阔的应用前景[12]。

以往，gadusol主要从特定发育阶段的鱼卵或组织中提取，提取工艺烦琐、成本高昂，限制了其进一步应用[5]。相比之下，采用合成生物学技术构建的gadusol生物合成微生物细胞工厂更具吸引力和竞争力。2015年，研究人员首次在大肠杆菌中分别表达了EEVS和MT-Ox，并初步表征了其酶学性质；在此基础上，构建了重组酿酒酵母，实现了gadusol的发酵法合成。通过5 d发酵，gadusol最高产量达到20 mg/L[1]，证明了构建微生物细胞工厂用于gadusol发酵生产的可行性。此外，针对MAAs家族分子的相似性，可利用gadusol作为骨架分子，经过代谢工程技术，在链霉菌细胞中产生多样化的新型MAAs分子[13]。

近年来，*P. pastoris*因蛋白质表达效率高、培养基组分简单、易实现高密度发酵且拥有快速发展的合成生物学工具箱等[14-16]，已被广泛应用于各类重组蛋白、萜类、微生物多糖等高价值产物的生产[17-22]。

基于以上分析，作者拟在*P. pastoris*中重构gadusol生物合成途径，并通过合成生物学、代谢工程等技术方法实现gadusol的高效生产，以期加快gadusol的工业化发酵生产和在食品与化妆品中的应用研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 引物、菌株和质粒

研究中使用的引物见表1，菌株见表2，质粒见表3。

1.1.2 培养基

LB液体培养基：蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、氯化钠5 g/L，115 ℃灭菌21 min。

YPD液体培养基：蛋白胨20 g/L、酵母粉10 g/L、葡萄糖20 g/L，115 ℃灭菌21 min。

MD培养基：葡萄糖20 g/L，115 ℃灭菌21 min；使用时加入10×Yeast Nitrogen Base（YNB）母液，用无菌水定容。

BMGY培养基：蛋白胨20 g/L、酵母粉10 g/L、磷酸二氢钾11.8 g/L、三水磷酸氢二钾3 g/L、10×YNB母液100 mL、500×生物素2 mL。

碳源：50 g/L甘油，或40 g/L葡萄糖，或25 g/L甘油和20 g/L葡萄糖。

本研究中所用固体培养基：在上述培养基基础上添加15 g/L的琼脂粉。

1.1.3 试剂

2×*Taq* PCR Master Mix：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PrimeSTAR Max DNA Polymerase：宝日医生物技术（北京）有限公司；快速质粒小提试剂盒、抗生素：生工生物工程（上海）股份有限公司；DNA纯化试剂盒：美国Thermo Fisher Scientific公司；一步法快速克隆试剂盒：翌圣生物科技（上海）股份有限公司；体积

表1　本研究中使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称	序列（5′—3′）
F1	AATTGAACAACTATCAAACGCAAACGATGCATCATCATCATCATCATC
R1	TCACCGCATGTTAGGAGTGACCCACGTCCCTCTCCACTCCCCCATAGGGACTGGCCGC
F2	ACTCCTAACATGCGGTGATGTAGAAGAGAATCCGGGCCCTATGGAGAGACCCGACGAGAC
R2	TCAATGATGATGATGATGATGTTGCAAACTGC
F	CATCATCATCATCATCATTGAGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGTTCCT
R	CGTTTGATAGTTGTTCAATTGATTGAAATAGGG
14-F	CAGGTGAACCCACCTAACTATTTTTAACTGG
14-R	TGATGATGATGATGATGCATCGTTTGTTTTGTTGTTGAGTGAAGCG
G-F	AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCCTCGTC
G-R	GTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACTATTTTTAATTACAAA
H-F	GCAGTCGAACTGACTCTAATAGTGACTC
H-R	TATTCAGAAAAAAAATTTTGTAAACTATTGTATTACTATTACACAGCGC
14-GFP-F	ACTCAACAACAAAATTTTAATTACAAAATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCACT
14-GFP-R	AGTTAGGTGGGTTCACCTGGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAG
G-GFP-F	TCAATCAATTGAACAACTATTTTTAATTACAAAATGGGTAAGGGAGAAGAACTT
G-GFP-R	CCAAGACATTTCTACAAAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTT
H-GFP-F	AAAATTTTTTTTCTGAATAATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCACT
H-GFP-R	ATTAGAGTCAGTTCGACTGCGGGCCTCGTGATACGCC
T-GFP-F	GCAATCTAATCTAAGTTTTAATTACAAAATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCAC
T-GFP-R	TTGAAGCTATGGTGTGTGGGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAG

表2　本研究中使用的菌株

Table 2　Strains used in this study

菌株	特征	来源
Escherichia coli JM109	*Escherichia coli* K-12 F' *tra*D36 *proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q} Δ(*lacZ*)*M15*/Δ(*lac-proAB*) *glnV44 e14*$^-$ *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17*，克隆菌株	实验室保藏
P. pastoris GS115	*his4*筛选标记，Mut$^+$，原始菌株	实验室保藏
P. pastoris HME	*P. pastoris* GS115整合pPIC-P$_{HIS4}$-ME质粒	本研究
P. pastoris GME	*P. pastoris* GS115整合pPIC-P$_{GAP}$-ME质粒	本研究
P. pastoris 14ME	*P. pastoris* GS115整合pPIC-P$_{GCW14}$-ME质粒	本研究

表3　本研究中使用的质粒

Table 3　Plasmids used in this study

质粒	特征	来源
pPIC3.5K	氨苄抗性，遗传霉素抗性，ColE1复制位点，*his4*筛选标记	实验室保藏
pAO815-GFP	氨苄抗性，ColE1复制位点，*his4*筛选标记，包含绿色荧光蛋白编码基因	实验室保藏
pUC57	氨苄抗性，ColE1复制位点	实验室保藏
pUC-E	pUC57衍生质粒，包含EEVS编码基因	本研究
pUC-M	pUC57衍生质粒，包含MT-Ox编码基因	本研究
pPIC-P$_{GAP}$-GFP	氨苄抗性，ColE1复制位点，*his4*筛选标记，包含P$_{GAP}$控制下的绿色荧光蛋白编码基因	本研究
pPIC-P$_{GCW14}$-GFP	氨苄抗性，ColE1复制位点，*his4*筛选标记，包含P$_{GCW14}$控制下的绿色荧光蛋白编码基因	本研究
pPIC-P$_{TEF1}$-GFP	氨苄抗性，ColE1复制位点，*his4*筛选标记，包含P$_{TEF1}$控制下的绿色荧光蛋白编码基因	本研究
pPIC-P$_{HIS4}$-GFP	氨苄抗性，ColE1复制位点，*his4*筛选标记，包含P$_{HIS4}$控制下的绿色荧光蛋白编码基因	本研究
pPIC-P$_{HIS4}$-ME	pPIC3.5K衍生质粒，包含P$_{HIS4}$控制下的MT-Ox与EEVS的编码基因，基因间连接GSG-linker与T2A序列	本研究
pPIC-P$_{GCW14}$-ME	pPIC3.5K衍生质粒，包含P$_{GCW14}$控制下的MT-Ox与EEVS的编码基因，基因间连接GSG-linker与T2A序列	本研究
pPIC-P$_{GAP}$-ME	pPIC3.5K衍生质粒，包含P$_{GAP}$控制下的MT-Ox与EEVS的编码基因，基因间连接GSG-linker与T2A序列	本研究

分数98%甲酸（分析纯）、体积分数100%乙腈（分析纯）等试剂：国药控股股份有限公司。

氨苄青霉素按照质量浓度100 mg/mL配制母液，遗传霉素（G418）按照质量浓度400 mg/mL配制母液，使用时均按体积分数0.1%添加至培养基。10×YNB母液：YNB 17 g、$(NH_4)_2SO_4$ 50 g，溶于1 L蒸馏水中，过滤除菌；使用时按体积分数10%添加至培养基。PBS溶液：NaCl 8 g/L、KCl 0.2 g/L、Na_2HPO_4 1.44 g/L、KH_2PO_4 0.24 g/L。

1.2 仪器与设备

色谱仪：WATERS UPLC型，美国沃特世公司；质谱仪：WATERS QUATTRO PREMIER XE型，美国沃特世公司；微量UV-Vis分光光度计：NanoDrop One型，美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析

通过NCBI数据库，查找斑马鱼的gadusol合成途径中EEVS、MT-Ox的编码基因序列，用SignalP[23]（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测这2个基因编码的蛋白质是否具有信号肽，通过TMHMM[24]（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）预测这2种蛋白质是否具备跨膜结构域。

1.3.2 *P. pastoris*感受态细胞制备

将*P. pastoris* GS115细胞划线于YPD固体培养基上，30 ℃恒温培养2~3 d。用无菌接种环挑取生长良好的菌落，接种于5 mL YPD液体培养基，30 ℃、220 r/min培养16 h。按照体积分数2%将种子液接种于含有100 mL培养基的250 mL摇瓶中，30 ℃、220 r/min培养至菌液OD_{600}值约为1.2。冰上静置15 min，4 ℃、4 000 r/min离心5 min，收集细胞，用预冷的无菌水悬浮细胞，相同条件下离心收集细胞，重复一次。用1 mol/L无菌山梨醇溶液悬浮细胞，相同条件下离心收集细胞，重复一次后，以适量1 mol/L山梨醇悬浮细胞，混匀后分装至无菌1.5 mL离心管，于−80 ℃保存。

1.3.3 组成型表达质粒与重组菌株构建

EEVS编码基因（Gene ID编号100003999）、MT-Ox编码基因（Gene ID编号541322），按照*P. pastoris*密码子偏好性进行优化并规避常用酶切位点，由天霖生物科技无锡有限公司合成并分别插入质粒pUC-E和pUC-M。

Gadusol合成重组质粒及菌株构建：1）以质粒pUC-E、pUC-M与pPIC3.5K为模板，PCR扩增MT-Ox与EEVS的编码基因，并通过引物在MT-Ox和EEVS的编码基因之间删除终止密码子，同时连接上GSG-Linker和T2A序列。GSG-linker和T2A序列的使用，可以使2个基因置于同一个启动子的表达框之下，有利于维持基因表达量的平衡[18]。在此步骤中，使用引物H-F和H-R，将pPIC3.5K质粒上的P_{AOX1}替换为组成型启动子P_{HIS4}，使其成为组成型表达质粒，以便菌株在发酵过程中利用甘油等碳源持续表达目标基因。使用一步法快速克隆试剂盒连接DNA片段，构建*P. pastoris*表达质粒pPIC-P_{HIS4}-ME，转化至大肠杆菌*Escherichia coli* JM109，挑取转化子进行菌落PCR验证并测序。2）挑取测序正确的大肠杆菌转化子，接种于5 mL LB培养基，37 ℃、220 r/min过夜培养后，收集菌体，提取重组质粒，使用限制性内切核酸酶*Sal* I对重组质粒上*HIS4*基因的酶切位点进行酶切，使质粒pPIC-P_{HIS4}-ME线性化，电转化入*P. pastoris* GS115细胞，涂布MD固体培养基筛选平板。将转化子进行测序验证后得到菌株*P. pastoris* HME。如未特别说明，本研究中其余表达质粒和重组菌株也通过上述方法进行构建。

启动子活性检测质粒构建：以质粒pAO815-GFP为模板，通过使用引物14-F/R、G-F/R、H-F/R和引物14-GFP-R/F、G-GFP-R/F、H-GFP-R/F、T-GFP-R/F替换绿色荧光蛋白编码基因上游启动子序列，构建可用荧光强度检测启动子活性的质粒pPIC-P_{GAP}-GFP、pPIC-P_{GCW14}-GFP、pPIC-P_{TEF1}-GFP、pPIC-P_{HIS4}-GFP。

1.3.4 启动子活性检测方法

挑取启动子活性检测质粒的转化子，接种到5 mL YPD液体培养基，培养16 h后，以体积分数1%接入含有新鲜50 mL YPD液体培养基的250 mL摇瓶中，30 ℃、220 r/min培养24 h后收集细胞，悬浮于PBS溶液中，稀释适当倍数后，用酶标仪测定OD_{600}值和荧光强度。荧光测定时，激发光波长为490 nm，发射光波长为530 nm，增益值为55。启动子的相对荧光强度定义为：细胞荧光强度与OD_{600}值的比值。

1.3.5 重组菌株发酵培养

挑取重组*P. pastoris*转化子，接种到5 mL YPD液体培养基，培养16 h后，以体积分数1%接入含有50 mL YPD液体培养基的250 mL摇瓶中，30 ℃、220 r/min培养12 h后，以体积分数2%接种至含有500 mL BMGY培养基的2 L摇瓶中，30 ℃、220 r/min避光培养7 d。在发酵过程中，每隔一定时间测量一次OD_{600}值，记录其生长状态。

1.3.6 液相-质谱（LC-MS）条件

液相采用PDA检测器，检测波长268 nm。分析柱BEH C18，2.1 mm×150 mm×1.7 μm。流动相A相为体积分数0.1%的甲酸溶液，B相为100%乙腈，梯度洗脱程序设置：0~4.0 min，A相100%；4.0~4.5 min，B相30%；4.5~5.0 min，B相80%；5.0~5.5 min，B相100%；5.5~10.0 min，A相100%。柱温45 ℃，流量0.3 mL/min，进样体积5 μL。

质谱条件：ESI-负离子模式；毛细管电压3.0 kV；锥孔电压20 kV；离子源温度100 ℃，脱溶剂温度400 ℃。

1.3.7 Gadusol标准品的制备

Gadusol溶液提取方法参照文献[1]，并进行了优化改良。将发酵得到的重组菌体用PBS溶液清洗2次，用体积分数80%的甲醇溶液振荡悬浮，菌悬液通过高压匀浆仪进行破碎处理（100 Mpa，5~10 min），收集细胞破碎液至50 mL离心管，10 000 r/min离心10 min后取上清液，振荡10 min，−20 ℃冷冻过夜后取出，冰上放置，于4 ℃、10 000 r/min离心10 min后取上清液，通过真空离心浓缩将上清液浓缩至无明显液体状态，以原溶液体积2%的蒸馏水充分复溶后，于13 000 r/min离心5 min，吸取上清液，即得到gadusol粗提取液。在粗提取液中加入终体积分数为80%的乙腈，充分振荡混匀后，于13 000 r/min离心5 min，吸取上清液，得到gadusol样品溶液，此时gadusol溶液的pH约为2.5。将gadusol溶液经制备液相分离，收集目标峰馏分，真空干燥后得到gadusol标准品。

2 结果与讨论

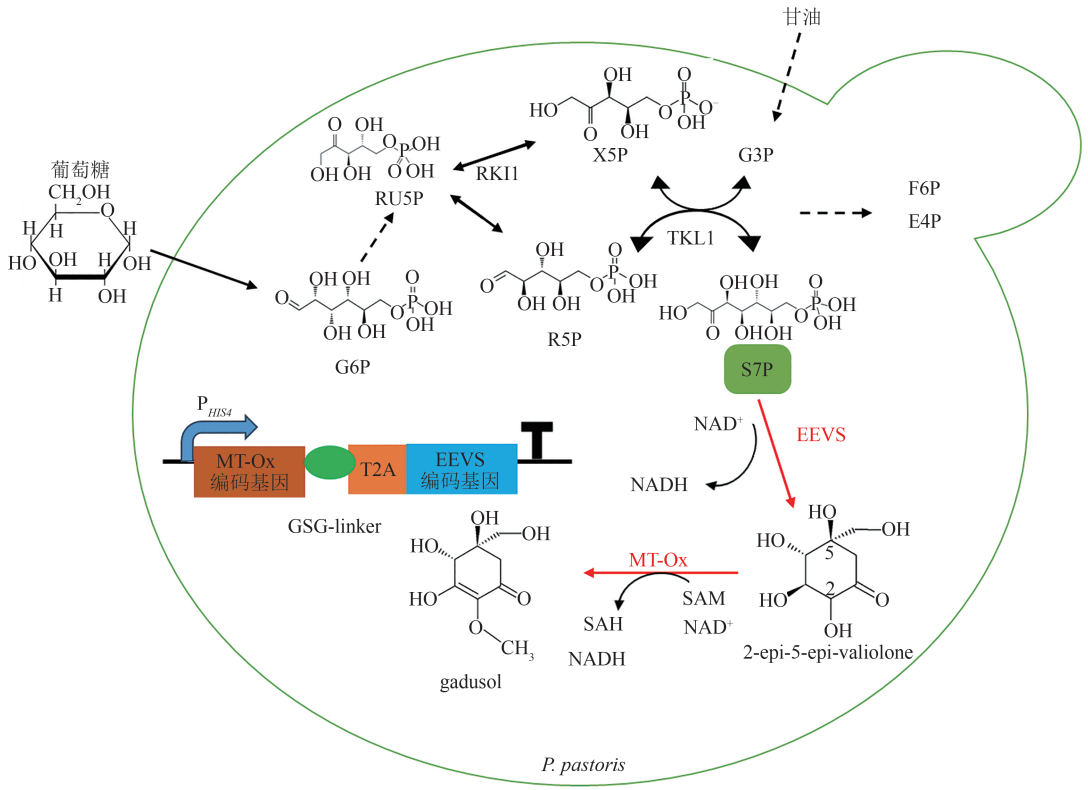
2.1 Gadusol合成途径在*P. pastoris*中的重构

为实现gadusol合成途径在*P. pastoris*中的重构，首先分析了*P. pastoris*中相关合成路径。如图1所示，在*P. pastoris*中，葡萄糖或甘油等碳源可以通过PPP转化为gadusol前体S7P，但*P. pastoris*细胞缺失EEVS和MT-Ox的编码基因，故对来自斑马鱼的EEVS和MT-Ox蛋白质序列进行了生物信息学分析。通过HMHMM与SignalP模型对2种蛋白质的信号肽、跨膜区进行预测分析，分析结果提示EEVS和MT-Ox不存在跨膜结构域，具有信号肽的概率分别为0.087%和0.031%。因此，基于*P. pastoris*的密码子偏好性，优化合成了EEVS与MT-Ox的编码基因。按照1.2.3节的方法，将GSG-linker和T2A序列与EEVS编码基因和MT-Ox编码基因串联，使用组成型启动子P_{HIS4}构建外源基因表达框，成功将EEVS与MT-Ox的编码基因整合至*P. pastoris*基因组，从而获得了gadusol从头合成菌株，命名为*P. pastoris* HME。

2.2 Gadusol的分离纯化与定量化分析

在获得gadusol合成菌株*P. pastoris* HME后，采用1.3.5节的方法对重组菌株进行摇瓶培养。依照1.3.7节步骤，破碎菌体后离心，收集含有gadusol的上清液。取2 μL *P. pastoris* HME胞内上清液，通过微量UV-Vis分光光度计分析特征光的吸收曲线。如图2（a）所示，与对照菌株*P. pastoris* GS115胞内上清液相比，重组菌株*P. pastoris* HME的胞内上清液在波长260~270 nm处具有差异明显的特征吸收峰，这与Arbeloa等[9]报道的含有gadusol的鱼类组织破碎提取液所特有的紫外吸收光谱一致，该结果证明了gadusol在重组菌株*P. pastoris* HME中成功实现了从头合成。

为进一步定量化表征gadusol合成菌株的产量，通过优化流动相，实现了液相色谱对含有gadusol提取液的分离。如图2（b）所示，以原始菌株*P. pastoris* GS115为对照，可见重组菌株的特征峰。通过收集gadusol特征峰馏分并经真空浓缩干燥，成功获得了gadusol标准品，该标准品的HPLC图谱见图2（c）。随后，对制备的gadusol样品进行了质谱分析。如图2（d）所示，二级质谱图显示了gadusol的碎片峰和母离子峰。在此基础上，通过液相色谱测定不同质量浓度（0.01、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/mL）的标准品，进一步得到gadusol标准曲线，其回归方程为y=2 958.1x+



黑色虚线代表多个反应步骤；G6P—葡糖-6-磷酸；RU5P—核酮糖-5-磷酸；R5P—核糖-5-磷酸；X5P—木酮糖-5-磷酸；G3P—甘油醛-3-磷酸；F6P—果糖-6-磷酸；E4P—赤藓糖-4-磷酸。

图 1　Gadusol 在重组 *P. pastoris* 中的合成途径

Fig. 1　Synthesis pathway of gadusol in recombinant *P. pastoris*

458.73，R^2=0.991 4。根据绘制的标准曲线，计算出重组菌株 *P. pastoris* HME 合成的 gadusol 产量为 105 mg/L。

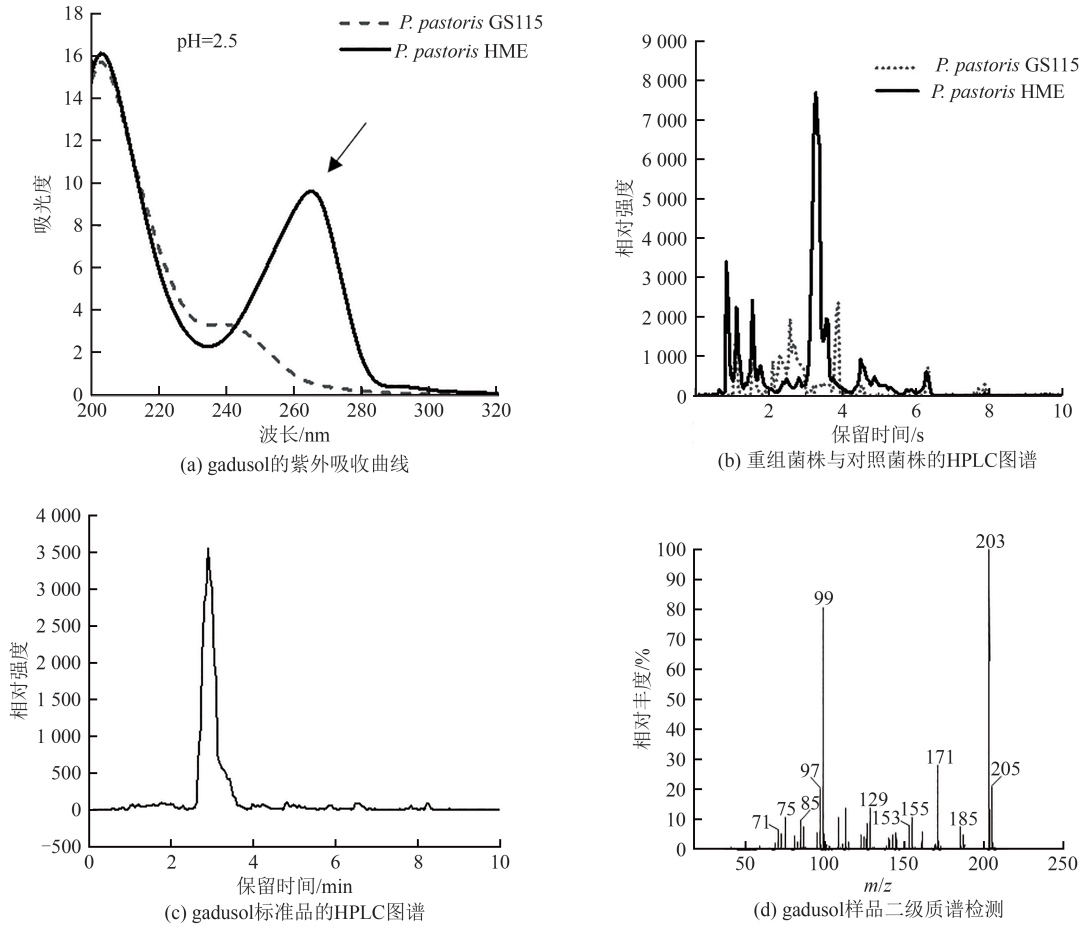
2.3　*P. pastoris* GS115 中组成型启动子筛选与表征

组成型启动子能够持续且稳定地表达目标蛋白质，已被广泛运用[25-26]。如前所述，*P. pastoris* HME 菌株使用的 P_{HIS4} 是一个较弱的组成型启动子，可能限制了关键酶的表达。为此，拟通过比较、筛选不同强度的组成型启动子以解除可能存在的关键酶表达限制：在 *P. pastoris* GS115 细胞中以绿色荧光蛋白报告系统表征组成型启动子 P_{GCW14}[27]、P_{GAP}[28]、P_{TEF1}[29]、P_{HIS4}[30] 的活性强度，筛选高活性强度启动子用于提升 gadusol 产量。

其中，P_{GCW14} 为 *P. pastoris* 磷脂酰肌醇锚定蛋白质编码基因（基因编号为 PAS_chr1-4_0586）起始密码子上游 822 bp 处开始的序列；P_{GAP} 为 *P. pastoris* 甘油醛-3-磷酸脱氢酶编码基因（基因编号为 U62648.1）起始密码子上游 477 bp 处开始的序列；P_{TEF1} 为 *P. pastoris* 翻译延伸因子编码基因（基因编号为 EF014948.1）起始密码子上游 420 bp 处开始的序列；P_{HIS4} 为 *P. pastoris* 组氨酸脱氢酶编码基因（基因编号为 U14126.1）起始密码子上游 350 bp 处开始的序列。采用 1.3.3 节所述方法，构建了启动子活性检测质粒 pPIC-P_{GAP}-GFP、pPIC-P_{GCW14}-GFP、pPIC-P_{TEF1}-GFP、pPIC-P_{HIS4}-GFP。如 1.3.4 节所述，使用绿色荧光蛋白对这些启动子活性进行表征。试验结果如图 3 所示，P_{GCW14} 的相对荧光强度最强，P_{GAP} 次之。因此，后续研究以 P_{GAP} 和 P_{GCW14} 作为 gadusol 合成基因表达框的候选启动子。

2.4　基于强组成型启动子优化 gadusol 合成

如图 4（a）所示，采用 1.3.3 节所述方法，分别使用引物 14-F/R 和 G-F/R 以组成型启动子 P_{GAP} 和 P_{GCW14} 替换 P_{HIS4}，构建至 gadusol 合成基因表达框。构建质粒 pPIC-P_{GAP}-ME 与 pPIC-P_{GCW14}-ME，挑取转



(a) gadusol的紫外吸收曲线　(b) 重组菌株与对照菌株的HPLC图谱

(c) gadusol标准品的HPLC图谱　(d) gadusol样品二级质谱检测

图2　Gadusol的分离纯化与定量检测

Fig. 2　Isolation, purification, and quantitation of gadusol

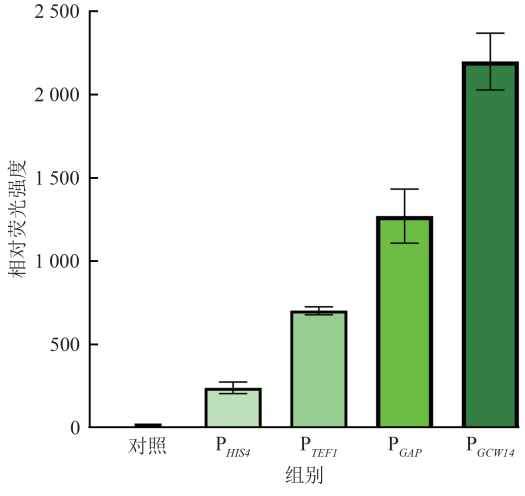


图3　*P. pastoris* GS115中组成型启动子相对荧光强度

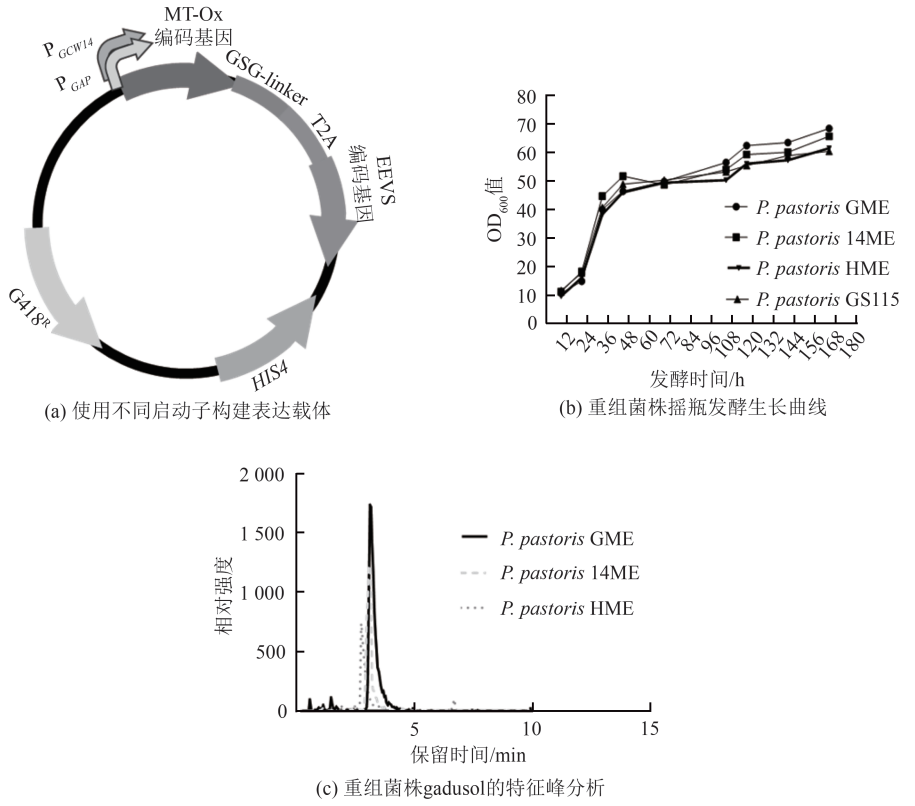
Fig. 3　Relative fluorescence intensity of constitutive promoters in *P. pastoris* GS115

化子并经目标基因测序确认，得到重组菌株*P. pastoris* GME和*P. pastoris* 14ME。

如图4(b)所示，以BMGY培养基为发酵培养基，添加甘油为碳源，对重组菌株进行摇瓶发酵。通过观察发酵菌株生长曲线，发现发酵168 h后，重组菌株OD_{600}值比野生型菌株略高，推测gadusol的产生可能影响菌体生长。收集发酵菌体进行破碎提取，gadusol提取液经LC-MS进行检测，检测条件见1.3.6节。如图4(c)所示，对不同菌株gadusol分子进行归一化显示，*P. pastoris* GME菌株的gadusol目标峰相对强度最高。该结果表明，选用活性较强的启动子可以有效提升gadusol产量。此外，虽然P_{GCW14}荧光强度最强，但却不是gadusol产量的最优选启动子，推测启动子的强度还会受到下游表达基因的种类影响[31]。因此，选择*P. pastoris* GME菌株进行后续发酵培养基组分的优化研究。

2.5　Gadusol合成菌株*P. pastoris* GME的发酵优化

如上述图1所示，*P. pastoris*发酵常以甘油为



(a) 使用不同启动子构建表达载体

(b) 重组菌株摇瓶发酵生长曲线

(c) 重组菌株gadusol的特征峰分析

图 4　使用强组成型启动子提升重组菌株的 gadusol 产量

Fig. 4　The substitution of strong constitutive promoters increased the gadusol yields of recombinant strains

碳源，甘油可以通过胞内代谢生成 G3P 进入 PPP，从而合成 gadusol。此外，gadusol 还可以通过葡萄糖代谢从 PPP 合成，gadusol 合成的重要前体为 S7P。不同碳源供给将影响细胞内 PPP 的代谢水平，从而影响 gadusol 的合成。为探究不同碳源对于重组菌株合成 gadusol 的影响，对培养基组分中的碳源进行了优化。以 *P. pastoris* GME 菌株为发酵菌株，BMGY 培养基为发酵培养基，分别以葡萄糖和甘油组成不同的碳源供给组合进行发酵，通过比较 gadusol 的产量，确定适宜发酵法合成 gadusol 的碳源。

结果如图 5 所示，当添加 25 g/L 甘油和 20 g/L 葡萄糖作为碳源时，菌株 *P. pastoris* GME 的 gadusol 产量达到约 175 mg/L，优于添加单一甘油或葡萄糖的发酵条件。根据以上结果，推测在 25 g/L 甘油和 20 g/L 葡萄糖的存在下，*P. pastoris* 细胞内 PPP 的碳流量提高，进而增加 gadusol 合成前体 S7P 的供应，从而提升 gadusol 产量。

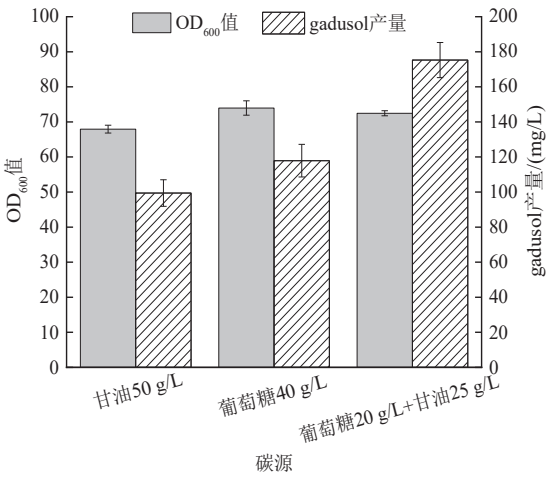


图 5　添加不同碳源对 gadusol 产量的影响

Fig. 5　Effects of adding different carbon sources on the yields of gadusol

3　结论

作者首先通过生物信息学从多方面分析了斑马鱼来源的 EEVS、MT-Ox 的编码基因，结果提示这 2 种蛋白质适合胞内表达。以此为参考，对

目的基因序列进行密码子优化合成，构建入表达载体，转化 *P. pastoris* 细胞，成功在重组 *P. pastoris* 细胞裂解提取液中检测到gadusol。重组菌株 *P. pastoris* HME 的gadusol产量达到105 mg/L。为进一步确定适合gadusol表达的启动子，对gadusol基因表达盒的启动子进行替换，通过绿色荧光蛋白表征发现 P_{GCW14} 强度高于 P_{GAP}，但菌株 *P. pastoris* 14ME 的gadusol产量低于 *P. pastoris* GME，因此以 *P. pastoris* GME 进行后续试验。最后，针对 *P. pastoris* GME 的碳源进行进一步优化。在相同试验条件下，分别比较了单独添加50 g/L甘油、单独添加40 g/L葡萄糖、同时添加25 g/L甘油和20 g/L葡萄糖作为碳源时，对重组菌株合成gadusol的影响。最终发现，当添加25 g/L甘油和20 g/L葡萄糖作为碳源时，重组 *P. pastoris* 细胞的gadusol产量最高，达到约175 mg/L。

该研究为gadusol的生物发酵合成提供了基础，对推进新型天然防晒物质的使用具有重要参考意义。

参考文献

[1] OSBORN A R, ALMABRUK K H, HOLZWARTH G, et al. *De novo* synthesis of a sunscreen compound in vertebrates[J]. eLife, 2015, 4: e05919.

[2] 陈小兰，邓国宾，刘开庆，等. 水生生物的紫外光防护剂：类菌胞素氨基酸[J]. 植物学通报，2006，41(1)：78-86.
CHEN X L, DENG G B, LIU K Q, et al. UV-protective metabolites in aquatic organisms: mycosporine-like amino acids[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2006, 41(1): 78-86.(in Chinese)

[3] FAVRE-BONVIN J, BERNILLON J, SALIN N, et al. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*[J]. Phytochemistry, 1987, 26(9): 2509-2514.

[4] PENG J H, GUO F Y, LIU S S, et al. Recent advances and future prospects of mycosporine-like amino acids[J]. Molecules, 2023, 28(14): 5588.

[5] RICE M C, LITTLE J H, FORRISTER D L, et al. Gadusol is a maternally provided sunscreen that protects fish embryos from DNA damage[J]. Current Biology, 2023, 33(15): 3229-3237.

[6] ORALLO D E, LORES N J, ARBELOA E M, et al. Sensitized photo-oxidation of gadusol species mediated by singlet oxygen[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2020, 213: 112078.

[7] LOSANTOS R, CHURIO M S, SAMPEDRO D. Computational exploration of the photoprotective potential of gadusol[J]. ChemistryOpen, 2015, 4(2): 155-160.

[8] FANG Y, CHEN L, WANG X, et al. UVB irradiation differential regulate miRNAs expression in skin photoaging[J]. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2022, 97(4): 458-466.

[9] ARBELOA E M, UEZ M J, BERTOLOTTI S G, et al. Antioxidant activity of gadusol and occurrence in fish roes from Argentine Sea[J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 586-591.

[10] GUEDES M, GONÇALVES V M F, TIRITAN M E, et al. Aqueous extracts of fish roe as a source of several bioactive compounds[J]. Separations, 2022, 9(8): 210.

[11] ROSIC N N. Mycosporine-like amino acids: making the foundation for organic personalised sunscreens[J]. Marine Drugs, 2019, 17(11): 638.

[12] COUTEAU C, COIFFARD L. Phycocosmetics and other marine cosmetics, specific cosmetics formulated using marine resources[J]. Marine Drugs, 2020, 18(6): 322.

[13] OSBORN A R, MAHMUD T. Interkingdom genetic mix-and-match to produce novel sunscreens[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(11): 2464-2471.

[14] ZHA J, LIU D, REN J, et al. Advances in metabolic engineering of *Pichia pastoris* strains as powerful cell factories[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(10): 1027.

[15] VIJAYAKUMAR V E, VENKATARAMAN K. A systematic review of the potential of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as an alternative host for biologics production[J]. Molecular Biotechnology, 2024, 66(7): 1621-1639.

[16] 阚劲松，张敏，徐涛. 短小芽孢杆菌碱性β-葡萄糖苷酶在毕赤酵母中的表达及酶学性质研究[J]. 食品与机械，2019，35(9)：39-44.
KAN J S, ZHANG M, XU T. Expression and characterization of alkaline β-glucosidase in *Pichia pastoris* from *Bacillus pumilus*[J]. Food & Machinery, 2019, 35(9): 39-44.(in Chinese)

[17] 刘宇飞，曹颖，常立业，等. 毕赤酵母细胞工厂工程化改造与应用[J]. 生物工程学报，2023，39(11)：4376-4396.
LIU Y F, CAO Y, CHANG L Y, et al. Engineering and application of *Komagataella phaffii* as a cell factory[J].

Chinese Journal of Biotechnology，2023，39（11）：4376-4396.（in Chinese）

[18] JIN X R，ZHANG W J，WANG Y，et al. Biosynthesis of non-animal chondroitin sulfate from methanol using genetically engineered *Pichia pastoris*[J]. Green Chemistry，2021，23（12）：4365-4374.

[19] ZHANG Y L，WANG Y，ZHOU Z X，et al. Synthesis of bioengineered heparin by recombinant yeast *Pichia pastoris*[J]. Green Chemistry，2022，24（8）：3180-3192.

[20] 金树霞，王力，朱莉，等. 基因突变提高毕赤酵母表达内切β-1，3-葡聚糖酶活性[J]. 食品与生物技术学报，2021，40（2）：57-64.
JIN S X，WANG L，ZHU L，et al. Endo-β-1，3-glucanase expression in *P. pastoris* improved by gene mutation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40（2）：57-64.（in Chinese）

[21] 刘叶，巩旭，康振，等. 代谢工程改造毕赤酵母生产葡萄糖二酸[J]. 食品与生物技术学报，2018，37（9）：955-961.
LIU Y，GONG X，KANG Z，et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of glucaric acid[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2018，37（9）：955-961.（in Chinese）

[22] GAO J C，JIANG L H，LIAN J Z. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products[J]. Synthetic and Systems Biotechnology，2021，6（2）：110-119.

[23] ALMAGRO-ARMENTEROS J J，TSIRIGOS K D，SØNDERBY C K，et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nature Biotechnology，2019，37：420-423.

[24] KAHSAY R Y，GAO G，LIAO L. An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes[J]. Bioinformatics，2005，21（9）：1853-1858.

[25] TÜRKANOĞLU-ÖZÇELIK A，YıLMAZ S，INAN M. *Pichia pastoris* promoters [M]//GASSER B，MATTANOVICH D. Recombinant protein production in yeast. New York：Humana Press，2019：97-112.

[26] 农璐源，梁书利. 毕赤酵母强启动子P_{CAT1}的改造及转录因子结合位点分析[J]. 现代食品科技，2021，37（4）：72-78，71.
NONG L Y，LIANG S L. Modification of strong promoter P_{CAT1} of *Pichia pastoris* and analysis of transcription factor binding sites[J]. Modern Food Science and Technology，2021，37（4）：72-78，71.（in Chinese）

[27] LIANG S L，ZOU C J，LIN Y，et al. Identification and characterization of P_{GCW14}：a novel，strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Letters，2013，35：1865-1871.

[28] WATERHAM H R，DIGAN M E，KOUTZ P J，et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. Gene，1997，186（1）：37-44.

[29] AHN J，HONG J，LEE H，et al. Translation elongation factor 1-α gene from *Pichia pastoris*：molecular cloning，sequence，and use of its promoter[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2007，74（3）：601-608.

[30] CRANE D I，GOULD S J. The *Pichia pastoris HIS4* gene：nucleotide sequence，creation of a non-reverting *his4* deletion mutant，and development of *HIS4*-based replicating and integrating plasmids[J]. Current Genetics，1994，26：443-450.

[31] TRAN T T，CHARLES T C. Sequence polarity between the promoter and the adjacent gene modulates promoter activity[J]. Plasmid，2021，117：102598.

（责任编辑：周玥）