



## 短梗霉普鲁兰多糖合成和调控的研究进展

徐澜<sup>1#</sup>, 王宇杰<sup>1#</sup>, 池振明<sup>1,2</sup>, 刘光磊<sup>1,2\*</sup>

1 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003

2 海洋生物多样性与进化教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

徐澜, 王宇杰, 池振明, 刘光磊. 短梗霉普鲁兰多糖合成和调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3633-3646.

XU Lan, WANG Yujie, CHI Zhenming, LIU Guanglei. Research progress in the synthesis and regulation of pullulan in *Aureobasidium* spp.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3633-3646.

**摘要:** 普鲁兰多糖是一种由短梗霉属真菌合成的胞外多糖。虽然普鲁兰多糖在生物技术的各个领域有着广泛的应用,但其生物合成与调控的具体机制有待进一步研究。近年来,研究人员利用分子生物学方法对普鲁兰多糖的合成与调控的分子机制进行阐明,发现以跨膜蛋白 AmAgs2 为关键多糖合成酶的合成途径,并揭示 cAMP-Protein kinase A (cAMP-PKA)、Target of rapamycin 1 (TORC1)、High osmotic glycerol 1 (HOG1)和 Sucrose nonfermentable 1 (Snf1)信号通路参与普鲁兰多糖合成的调控。因此,本文对近年来该领域的研究进行综述,为真菌胞外多糖合成调控的机制提供研究参考,并为高产普鲁兰多糖细胞工厂的构建提供理论支持。

**关键词:** 短梗霉; 普鲁兰多糖; 合成途径; 调控机制; 信号通路

## Research progress in the synthesis and regulation of pullulan in *Aureobasidium* spp.

XU Lan<sup>1#</sup>, WANG Yujie<sup>1#</sup>, CHI Zhenming<sup>1,2</sup>, LIU Guanglei<sup>1,2\*</sup>

1 College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

2 MOE Key Laboratory of Evolution and Marine Biodiversity, Qingdao 266003, Shandong, China

**Abstract:** Pullulan is an exopolysaccharide produced by *Aureobasidium* spp. Despite its

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103200).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: liugl@ouc.edu.cn

Received: 2024-04-05; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-05-23

widespread biotechnological applications, the mechanisms underlying the biosynthesis and regulation of pullulan remain to be studied. In recent years, researchers have employed molecular biological techniques to elucidate the molecular mechanisms of pullulan synthesis and regulation. The transmembrane protein AmAgs2 is identified as a key enzyme for the synthesis of pullulan, and the cAMP-protein kinase A (cAMP-PKA), target of rapamycin 1 (TORC1), high osmotic glycerol 1 (HOG1), and sucrose nonfermentable 1 (Snf1) signaling pathways are involved in the regulation of pullulan synthesis. We reviewed the research progress in this field, aiming to give insights into the research on the synthesis and regulation mechanisms of fungal extracellular polysaccharide and provide theoretical support for building cell factories with high yields of pullulan.

**Keywords:** *Aureobasidium* spp.; pullulan; synthetic pathway; regulatory mechanism; signaling pathway

短梗霉(*Aureobasidium* spp.)属于子囊菌门,是一种双态型真菌,既有主要形态酵母样细胞,也有次要形态丝状细胞<sup>[1]</sup>。短梗霉属菌株在全球广泛分布,因其能够合成黑色素又被称为“黑酵母”<sup>[2]</sup>。目前经 DNA 鉴定的短梗霉属菌株多达 32 种<sup>[3]</sup>,包括广为人知的产黑色素短梗霉(*Aureobasidium melanogenum*)和出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)等多个种,它们因具有高水平的普鲁兰多糖合成与分泌能力而闻名<sup>[1,4]</sup>。短梗霉有极端环境耐受性,可抵御多种环境胁迫<sup>[5-8]</sup>,还具有广泛的酶谱以利用不同的底物<sup>[9]</sup>。

普鲁兰多糖(pullulan)是短梗霉发酵过程中的主要产物之一,能够协助细胞在不同环境下聚集、絮凝和黏附<sup>[1,10]</sup>。作为一种水溶性胞外多糖,普鲁兰多糖无臭、无味,并且无任何毒性和诱变性<sup>[11]</sup>。普鲁兰多糖因其生物可降解性、生物相容性、水溶性和无毒性等特点成为制药、化妆品和食品等行业的重要原料<sup>[12]</sup>,其特性还能够通过与其他材料结合或化学修饰来调节改变<sup>[13]</sup>。近年来,普鲁兰多糖在食品工业、制药领域、水处理领域的应用还在不断扩大,消费市场不断增长<sup>[10]</sup>。因此,对于普鲁兰多糖的合成与调控机制的研究十分有意义。

目前,短梗霉是生产普鲁兰多糖的主要菌株。对于短梗霉中普鲁兰多糖合成途径的研究经历了漫长的探索过程。*A. melanogenum* 中的普鲁兰多糖合成途径已经基本解析,研究发现  $\alpha$ -葡聚糖合成酶( $\alpha$ -glucan synthetase2, AmAgs2)是普鲁兰多糖合成的关键酶<sup>[4]</sup>。在合成调控方面,已有研究证明普鲁兰多糖的合成受多个信号通路的影响,包括 cAMP-Protein kinase A (cAMP-PKA)信号通路、Target of rapamycin 1 (TORC1)信号通路、High osmotic glycerol 1 (HOG1)信号通路和 Sucrose nonfermentable 1 (Snf1)信号通路<sup>[9]</sup>,对这些途径中关键基因的上调和下调也影响着普鲁兰多糖的产量,是普鲁兰多糖合成代谢工程改造的重点。

本文综述了不同短梗霉菌株普鲁兰多糖的生物合成途径、合成调控及以上两个过程中的关键酶及其编码基因等方面的研究进展,列出了目前为提高产量而进行的短梗霉中普鲁兰合成途径的改造,以期提高人们对短梗霉及普鲁兰多糖在工业生物技术上的意义及发展前景的关注。

## 1 普鲁兰多糖

### 1.1 普鲁兰多糖的结构、性质与应用

普鲁兰多糖最早于 1938 年由 Bauer 发现<sup>[14]</sup>,

后经水解实验确认其结构,并命名为普鲁兰多糖<sup>[15]</sup>。普鲁兰多糖是一种线性的  $\alpha$ -D-葡聚糖,其分子量大小为  $4.5 \times 10^4$ – $4.5 \times 10^5$  Da,由 2 个  $\alpha$ -1,4-糖苷键连结的麦芽三糖亚基通过  $\alpha$ -1,6 键连接而成<sup>[2]</sup>。普鲁兰多糖的分子式为  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ,其化学结构如图 1 所示。 $\alpha$ -1,4 和  $\alpha$ -1,6 键的规律性交替使其结构柔韧性及溶解度增加,使得普鲁兰多糖具有其他多糖所没有的独特的成膜特性<sup>[2,16]</sup>。据报道,普鲁兰多糖中也存在一小部分随机分布的麦芽四糖亚基<sup>[16]</sup>。

外观方面,普鲁兰多糖是一种介于灰白色与白色之间的细颗粒粉末。在发酵过程中,普鲁兰多糖以无定形黏液的形式积累于产普鲁兰多糖菌株细胞的表面<sup>[17]</sup>。普鲁兰多糖溶液的黏度相对较低,其黏度在相当广泛的 pH 范围内(pH 2.0–11.0)保持稳定,并且在大多数金属离子存在的条件下保持稳定<sup>[3]</sup>。普鲁兰多糖对其生产菌株具有重要的生理意义<sup>[2]</sup>:包括为细胞提供碳源和能量,保护细胞免受紫外线、重金属、氧化剂和有机污染物的损害等。

普鲁兰多糖被美国食品药品监督管理局列为一般认为安全类(generally recognised as safe, GRAS)生物聚合物。由于其 GRAS 地位和独特的性质,它被认为是工业领域的重要聚合物。普鲁兰多糖是

一种白色、水溶性、无臭无味的生物黏合剂,主要用作食品添加剂,起到增稠剂、稳定剂、填料、胶凝剂和黏合剂的作用<sup>[18–19]</sup>。用于食品包装材料的普鲁兰多糖能够有效防止食品氧化。鉴于普鲁兰多糖的独特结构和对人体无毒、无刺激的特性,其还可以作为一种载体,控制药物在体内环境的释放,因此成为制药和化妆品领域的潜力菌株<sup>[17]</sup>。

## 1.2 普鲁兰多糖的生产菌株

普鲁兰多糖的生产菌株在自然界分布广泛,许多微生物被报道为普鲁兰多糖的生产菌株,包括短梗霉(*Aureobasidium* spp.)<sup>[4]</sup>、黄金银耳(*Tremella mesenterica*)<sup>[20]</sup>、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)<sup>[21]</sup>、浅黄枝衣(*Teloschistes flavicans*)<sup>[22]</sup>和浆果红酵母(*Rhodototula bacarum*)<sup>[23]</sup>等。短梗霉是普鲁兰多糖的主要微生物来源,目前以 *A. pullulans* 和 *A. melanogenum* 进行普鲁兰多糖生产的研究较多<sup>[4]</sup>。如表 1 所示,*A. pullulans* MTCC 1991 以蔗糖为碳源所得的普鲁兰多糖产量为 125.7 g/L, *A. melanogenum* TN3-1 以葡萄糖(glucose, Glc)为碳源所得的普鲁兰多糖产量为 110.3 g/L, *A. melanogenum* EI36 以菊粉为碳源所得的普鲁兰多糖产量为 110.3 g/L。由表 1 中所示的参数可知,短梗霉能够利用多种底物进行普鲁兰多糖的合成。

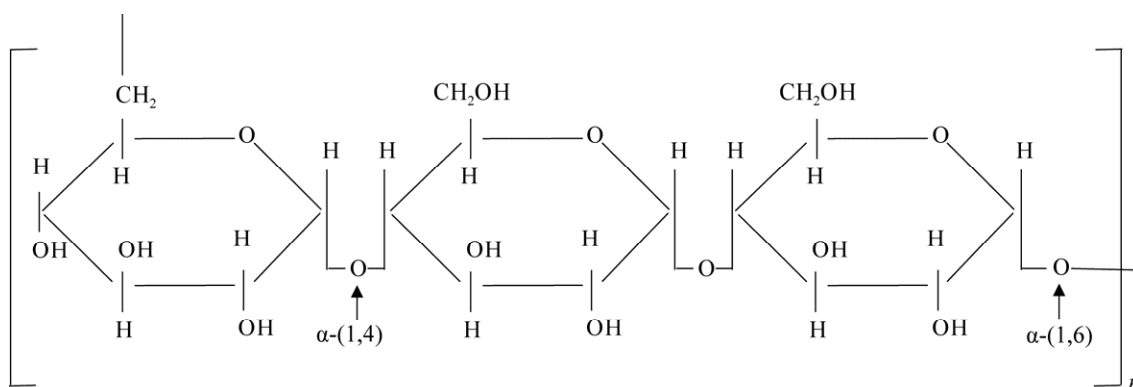


图 1 普鲁兰多糖的化学结构

Figure 1 Chemical structure of the pullulan.

表 1 不同 *Aureobasidium* spp. 菌株的普鲁兰多糖产量和产率Table 1 The pullulan titers and yields produced by different strains of *Aureobasidium* spp.

Strains	Substrates	Pullulan titers (g/L)	Yields (g/g substrates)	References
<i>A. pullulans</i> MTCC 1991	Sucrose	125.7	4.1	[24]
<i>A. melanogenum</i> TN3-1	Glucose	110.3	0.8	[7]
<i>A. melanogenum</i> AMY-PKS-11	Glucose	103.5	0.8	[25]
<i>A. pullulans</i> RBF 4A3	Sucrose	88.6	0.6	[26]
<i>A. melanogenum</i> EI36	Inulin	70.6	0.6	[27]
<i>A. pullulans</i> RM1603	Sucrose	62.5	0.8	[28]
<i>A. melanogenum</i> TN2-1-2	Xylose and glucose	55.1	0.5	[29]
<i>A. pullulans</i> P56	Beet molasses	49.0	0.5	[30]
<i>A. pullulans</i> BL06	Sucrose	37.9	0.2	[31]
<i>A. pullulans</i> NG	Glucose	18.3	0.3	[32]

## 2 短梗霉产普鲁兰多糖的合成途径

虽然早在 20 世纪 60 年代就已经将普鲁兰多糖的分子结构解析清楚<sup>[15]</sup>, 而且普鲁兰多糖应用于食品、化妆品领域已有 40 余年历史, 但其合成途径的研究却进展缓慢。直至 2020 年, Chen 等的研究对 *A. melanogenum* P16 普鲁兰多糖的合成途径、相关酶及其编码基因进行了解析<sup>[33-34]</sup>。本节对短梗霉中普鲁兰多糖的合成机制的研究进行简单概述。

1982 年, Catley 等<sup>[35]</sup>利用 D-<sup>[14]C</sup>葡萄糖对 *A. pullulans* 进行产普鲁兰多糖发酵, 并对细胞进行脉冲处理以提取含放射性标记的糖脂; 淀粉葡萄糖苷酶能够水解异麦芽糖、潘糖中的  $\alpha$ -1,4 和  $\alpha$ -1,6 糖苷键; 其对所得糖脂催化后释放的物质中有 60% 放射性低聚糖被水解为 D-葡萄糖, 表明产物中存在  $\alpha$ -1,4 和  $\alpha$ -1,6 糖苷键。1998 年, Simon 等<sup>[36]</sup>发现在 *A. pullulans* 细胞的生长过程中, 普鲁兰多糖的合成增加, 而糖原的合成减少, 猜测这可能是由于这两种分布于细胞中不同位置的多糖的产生动力学存在相关性; 为了验证这一假设, 设计实验对生长过程中定期提取的发酵液进行生化分析和微观研究; 超微结构数据表明, 糖原存在于所有不同的细胞类型(分生孢子、

膨大细胞和厚垣孢子)以及细胞发育的所有阶段; 然而, 其合成水平具有时间依赖性, 在指数期早期下降, 而此时普鲁兰多糖的合成增加, 用  $\chi^2$  方法计算所得的胞内糖原与胞外普鲁兰多糖水平的相关系数  $r$  表明两者呈负相关, 这些结果表明糖原可能参与了普鲁兰多糖的生物合成途径。Duan 等<sup>[37]</sup>研究了 *A. pullulans* Y68 中不同的碳源对于普鲁兰多糖的合成、尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)-Glc 的水平、 $\alpha$ -葡萄糖磷酸变位酶、尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)-焦磷酸化酶和葡萄糖基转移酶的活性的影响。实验结果表明, 在葡萄糖培养基中的普鲁兰多糖产量最高, 当有更多的普鲁兰多糖合成时, 细胞中的 UDP-Glc 会减少,  $\alpha$ -葡萄糖磷酸变位酶、UDPG-焦磷酸化酶和葡萄糖基转移酶的活性提高<sup>[37]</sup>。因此得出结论,  $\alpha$ -葡萄糖磷酸变位酶、UDPG-焦磷酸化酶和葡萄糖基转移酶是参与普鲁兰多糖生物合成途径的关键酶<sup>[37]</sup>。

Kang 等<sup>[38]</sup>通过敲除 *A. pullulans* IMS822 KCTC11179BP 的普鲁兰多糖合成基因(*PUL1*)获得菌株 *A. pullulans* NP1221; *A. pullulans* NP1221 的菌落为白色, 而野生型菌株为黑色, 该突变菌株失去产普鲁兰多糖的能力, 转而生产  $\beta$ -葡聚糖; 实验结果证实了 *PUL1* 基因编码的普鲁兰多

糖合成酶在 *A. pullulans* IMS822 KCTC 11179BP 中参与普鲁兰多糖的生物合成。同样地, Ma 等<sup>[39]</sup> 在 *A. pullulans* HN6.2 中敲除 *PUL1* 基因后, 获得的突变体 DPS1 的普鲁兰多糖产量下降, 进一步证明了该基因对普鲁兰多糖的生物合成至关重要, 但详细机制仍有待研究。Li 等<sup>[2]</sup> 结合之前的研究, 推测普鲁兰多糖的生物合成为以下过程:  $\alpha$ -磷酸葡萄糖异构酶将葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate, Glc-6-P) 转化为葡萄糖-1-磷酸 (glucose-1-phosphate, Glc-1-P), 然后由 UDPG-焦磷酸化酶将其转为 UDP-Glc, 它是普鲁兰多糖合成的前体物质; 随后, 葡萄糖基转移酶借助磷酸二酯键将葡萄糖-1-磷酸结合至脂质过氧化物上, 形成脂质连接的异麦芽糖和异潘糖, 再经由普鲁兰多糖合成酶的作用形成普鲁兰多糖。

Liu 等<sup>[40]</sup> 对 *A. melanogenum* P16 菌株产普鲁兰多糖培养基进行优化后, 产物普鲁兰多糖的分子量上升; 而与之相对应的,  $\alpha$ -淀粉酶、葡糖淀粉酶和普鲁兰多糖酶的活性下降, 编码这些酶的基因的相对转录水平降低。由 *UGT1* 编码的葡萄糖基转移酶 (UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase-like protein, Ugt1) 也被证明与普鲁兰多糖的生物合成有关<sup>[41]</sup>。在 P16 菌株中, 敲除 *UGT1* 后会使普鲁兰多糖的产量大大降低, 过表达 *UGT1* 会使普鲁兰多糖的产量显著提升。Ugt1 可能作为“折叠传感器”对参与普鲁兰多糖合成的不完全折叠糖蛋白进行糖基化<sup>[34]</sup>。

普鲁兰多糖被认为是细胞壁中少量存在的成分<sup>[42]</sup>, 研究发现其定位于厚垣孢子的外表面<sup>[36]</sup>。高产普鲁兰多糖的 *A. melanogenum* P16 菌株细胞壁组分合成基因的缺失及回补实验表明, 编码不同  $\alpha$ -1,2 甘露糖基转移酶的 *GT6* 和 *GT7* 基因对于维持细胞完整性有重要作用, 并且每个基因的敲除都会导致普鲁兰多糖产量下降及其合成

相关基因表达量的下降<sup>[43]</sup>。这表明 P16 菌株中, 普鲁兰多糖的生物合成依赖于细胞壁的完整性, 这一过程可能发生于细胞壁和周质空间。

由于糖原、淀粉、葡聚糖和普鲁兰多糖中同时存在  $\alpha$ -1,4 和  $\alpha$ -1,6 糖苷键, 已有充分的研究证明真菌中糖原的合成必须由糖原引物合成蛋白 Glycogenin isoform 1 (Glg1) 和 Glycogenin isoform 2 (Glg2) 合成的短链  $\alpha$ -1,4-葡聚糖 (short  $\alpha$ -(1,4)-glucosyl chain) 开始, 糖原合酶 (glycogen synthetase, Gys) 将 UDPG 糖基添加至其非还原端<sup>[4]</sup>。甾醇葡萄糖基转移酶 (sterol glucosyltransferase, Sgt1) 和神经酰胺  $\beta$ -葡萄糖基转移酶 (ceramide  $\beta$ -glucosyltransferase, Gcs1) 已被证明是 *A. melanogenum* P16 菌株合成普鲁兰多糖所必需的<sup>[33]</sup>。然而, 这些相关基因的缺失并不会导致普鲁兰多糖合成能力完全丧失, 这表明与糖原合成一样, 普鲁兰多糖合成可以使用任何其他未知的替代引物进行。在组织胞浆菌、黑曲霉和构巢曲霉中,  $\alpha$ -淀粉酶被认为参与  $\alpha$ -1,3-葡聚糖合成的引物短链  $\alpha$ -1,4-葡聚糖的合成<sup>[44]</sup>。这些研究结果表明短链  $\alpha$ -1,4-葡聚糖是一种常见的引物, 可用于包括普鲁兰多糖在内的多种  $\alpha$ -葡聚糖的合成。因此, P16 菌株细胞内的  $\alpha$ -淀粉酶也可能与普鲁兰多糖引物的合成有关。

裂殖酵母细胞壁中的  $\alpha$ -葡聚糖由 *AGS1* 和 *AGS3* 编码的完整膜  $\alpha$ -(1,3)-葡聚糖合成酶 Ags1 和 Ags3 合成<sup>[45]</sup>。这种酶蛋白包括一个用于  $\alpha$ -葡聚糖重构的胞外结构域和一个用于  $\alpha$ -葡聚糖跨膜运输的多通道跨膜结构域; 这些酶还可以催化  $\alpha$ -1,4 或  $\alpha$ -1,6 糖苷键的水解, 以及转糖基化形成  $\alpha$ -1,4 或  $\alpha$ -1,6 糖苷键<sup>[45]</sup>。此外, 有充分证据表明, 酿酒酵母和其他出芽酵母的细胞壁不含  $\alpha$ -葡聚糖, 因为它们的基因组中无 *AGS* 同源基因<sup>[44]</sup>。推测该家族的酶可能在 *A. melanogenum* P16 菌株的普鲁兰多糖合成中起作用, 在 P16 基

基因组 DNA 中寻找 *AGS* 同源基因, 发现存在 *AGS1*、*AGS2* 和 *AGS3* 这 3 个同源基因。*AGS1* 和 *AGS3* 基因的缺失并不影响 P16 中普鲁兰多糖的合成, 而 *AGS2* (现被称为 *AmAGS2*) 基因的完全敲除菌株不能合成普鲁兰多糖, 回补 *AGS2* 基因后, 菌株恢复了普鲁兰多糖的合成能力<sup>[34]</sup>。因此, *AmAGS2* 基因被证明是 *A. melanogenum* P16 中普鲁兰多糖合成的关键基因。对 *AmAGS2* 基因编码的 *AmAgs2* 蛋白的氨基酸分析表明, 该蛋白质定位于细胞质膜上, 其保守结构域包括胞外  $\alpha$ -淀粉酶催化结构域(extracellular  $\alpha$ -amylase

catalytic domain, *Amy\_D*)、胞外糖原合成酶结构域(intracellular GT1\_glycogen\_synthetase domain, *Gys\_D*)和多次跨膜的胞外多糖转运结构域(*EPS\_sugtrans* domain, *EPST\_D*)。此外, *PUL* 基因编码的普鲁兰多糖合成酶被认为可能是 *AmAgs2* 活性所需的一种辅助蛋白<sup>[4]</sup>。

结合现有研究, 对短梗霉中的普鲁兰多糖合成途径的总结如图 2 所示<sup>[4]</sup>: 葡萄糖经己糖转运蛋白(hexose transporter, HXT)进入细胞后被磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,  $\alpha$ -磷酸葡萄糖异构酶将葡萄糖-6-磷酸转化为葡萄糖-1-磷酸, 然后

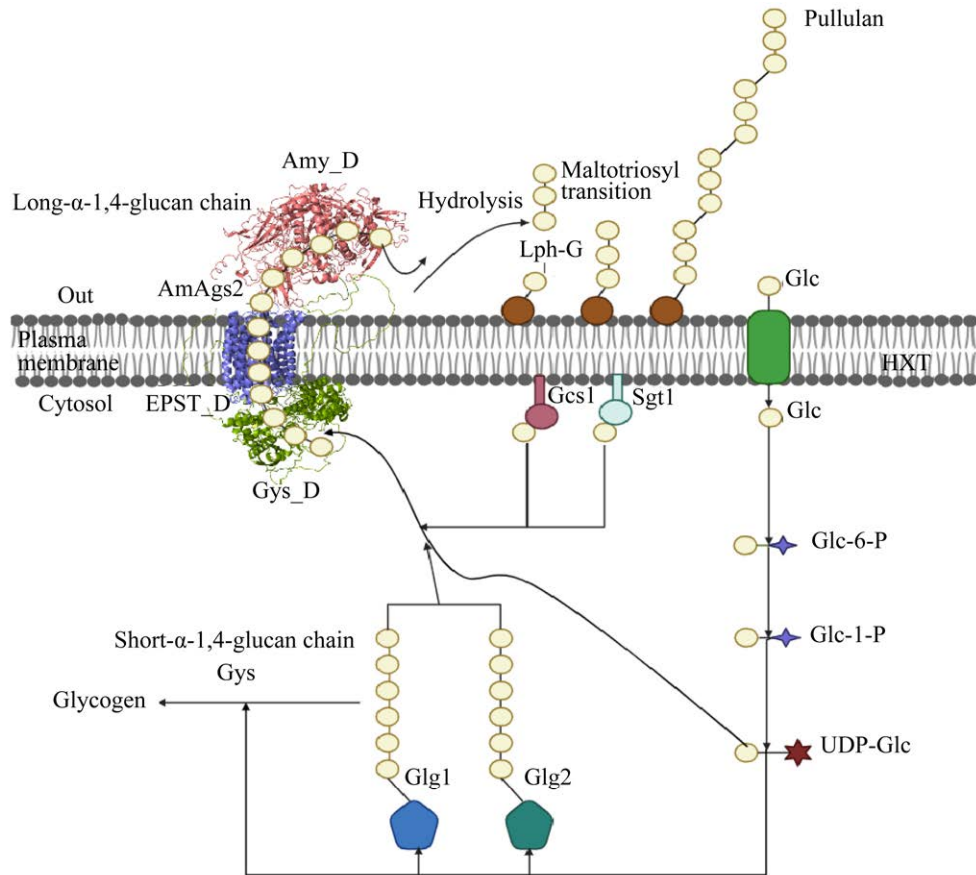


图 2 *Aureobasidium melanogenum* 中普鲁兰多糖的合成途径

Figure 2 The pullulan synthesis pathway in *Aureobasidium melanogenum*. *AmAgs2*:  $\alpha$ -glucan synthetase2; *Amy\_D*: Extracellular  $\alpha$ -amylase catalytic domain; *Gys\_D*: Intracellular GT1\_Glycogen\_synthetase domain; *EPST\_D*: *EPS\_sugtrans* domain (*EPST\_D*) embedded in multiple transmembrane regions; *Gys*: Glycogen synthetase; *Glg1* and *Glg2*: Glycogenin isoforms; *Gcs1*: Ceramide  $\beta$ -glucosyltransferase; *Sgt1*: Sterol glucosyltransferase; Short  $\alpha$ -(1,4)-glucosyl chain: Pullulan primer; Long  $\alpha$ -(1,4)-glucosyl chain: Pullulan precursor; *Lph-G*: Phospholipid intermediate-glucose; *HXT*: Hexose transporter; *Glc*: Glucose; *Glc-6-P*: Glucose-6-phosphate; *Glc-1-P*: Glucose-1-phosphate; *UDP-Glc*: UDP-glucose.

由 UDPG-焦磷酸化酶将其转为 UDP-葡萄糖, 再经由糖原引物合成蛋白 Glg1 和 Glg2、甾醇葡萄糖基转移酶 Sgt1 和神经酰胺  $\beta$ -葡萄糖基转移酶 Gcs1 合成普鲁兰多糖的合成引物短链  $\alpha$ -1,4-葡聚糖; 然后, AmAgs2 的胞内 Gys\_D 结构域在普鲁兰多糖合成引物的基础上催化形成普鲁兰多糖前体长链  $\alpha$ -1,4-葡聚糖(long  $\alpha$ -(1,4)-glucosyl chain); 合成的胞内普鲁兰多糖前体通过多次跨膜结构域 EPST\_D 进行跨膜转运, 穿过质膜到达质周空间; 最后, 胞外 Amy\_D 结构域负责水解普鲁兰多糖前体中  $\alpha$ -1,4 糖苷键以释放麦芽三糖, 并将释放的麦芽三糖转移到 Phospholipid intermediate-glucose (Lph-G) 中生成  $\alpha$ -1,6 糖苷键, 重复此过程最终合成普鲁兰多糖。

研究发现, 虽然许多真菌中  $\alpha$ -葡聚糖合成酶是催化细胞壁  $\alpha$ -1,3-葡聚糖合成的多结构域蛋白<sup>[44]</sup>, 并且含有一个 Big\_5 结构域, 但只有 *A. melanogenum* TN3-1 和 *A. melanogenum* P16 中含有保守氨基酸 LQS 的 Big\_5 结构域才能催化高水平的普鲁兰多糖生物合成<sup>[46]</sup>。已有研究证明, Big\_5 结构域可以增强酶与其底物的结合亲和力, 维持酶的正常功能<sup>[47]</sup>。因此, 具有保守氨基酸 LQS 的 Big\_5 结构域在普鲁兰多糖生物合成中具有特定功能是合理的。

从图 2 可以看出, 普鲁兰多糖的合成发生在短梗霉细胞的细胞壁和周质空间中。Wei 等<sup>[4]</sup>提出的普鲁兰合成途径可以解释为什么敲除 AmAGS2 以外的其他许多基因不能够使菌株完全失去产普鲁兰多糖的能力<sup>[33,39,41]</sup>。阐明整个普鲁兰多糖合成途径在生物技术领域具有重要意义, 这有助于进一步提高普鲁兰多糖的产量、编辑普鲁兰多糖分子、修饰普鲁兰多糖的化学性质, 以及利用代谢工程和合成生物学手段了解普鲁兰多糖生物合成及其调控的详细机制。如图 2 所示, AmAgs2 的每个结构域的详细功能还需进一步探究, AmAGS2 基因可用于大大提高重组菌

株的普鲁兰多糖的产量。

### 3 短梗霉产普鲁兰多糖的调控

短梗霉是一种多态型真菌, 具有 4 种不同的形态: 芽生孢子(酵母样细胞)、菌丝体、具隔膜的无色厚垣孢子和具隔膜的黑色厚垣孢子, 其中酵母样细胞是生产普鲁兰多糖的形态<sup>[48]</sup>。此外, 也有研究发现 *A. melanogenum* TN3-1 菌株具隔膜的无色厚垣孢子形态与高产普鲁兰多糖有关<sup>[49]</sup>。因此, 普鲁兰多糖的生物合成可以通过不同的细胞形态控制。图 3 列出了短梗霉中普鲁兰多糖合成调控涉及的信号通路。

#### 3.1 cAMP-PKA 信号通路

如图 3 所示, cAMP-PKA 信号通路的主要成分包括 Gpr1 (葡萄糖传感器、腺苷酸环化酶激活因子)、Mep2 (氨渗透酶/氨传感器)、Ras、Cyr1 (腺苷酸环化酶)、Tpk1-3 (蛋白激酶 A 的催化亚基)、Bcy1-2 (PKA-调节亚基)、Pde1 和 Pde2 (cAMP 水解酶)<sup>[9]</sup>。PKA 是一种异四聚体蛋白, 由 2 个催化亚基和 2 个调节亚基组成, 前者由 *TPK1-3* 编码, 后者由 *BCY1* 编码<sup>[50]</sup>。在 Gpr1 感知糖信号后, Cyr1 被激活, 其信号分子 cAMP 的水平提高; cAMP 与调节亚基结合, 使其与催化亚基分离, 从而激活 PKA<sup>[50]</sup>。cAMP 分别被低亲和力和高亲和力磷酸二酯酶 Pde1 和 Pde2 降解为 AMP<sup>[51]</sup>。Msn2 是 cAMP-PKA 信号通路的下游靶标, 是一种含有 DNA 结合结构域的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指蛋白, 可以识别被调控基因启动子序列中的 AGGGG 和 CCCCT<sup>[9]</sup>。Msn2 的活性已被证实是通过多种信号通路, 包括 HOG1、Snf1、cAMP-PKA 信号通路的磷酸化及去磷酸化来调节的<sup>[52-53]</sup>。cAMP-PKA 通路通过调控 Msn2 氨基酸序列上的 S66、S452 和 S500 磷酸化位点来调控 Msn2 的亚细胞定位, 从而调控其功能<sup>[54]</sup>。Yang 等通过实验证明了 cAMP-PKA 信号

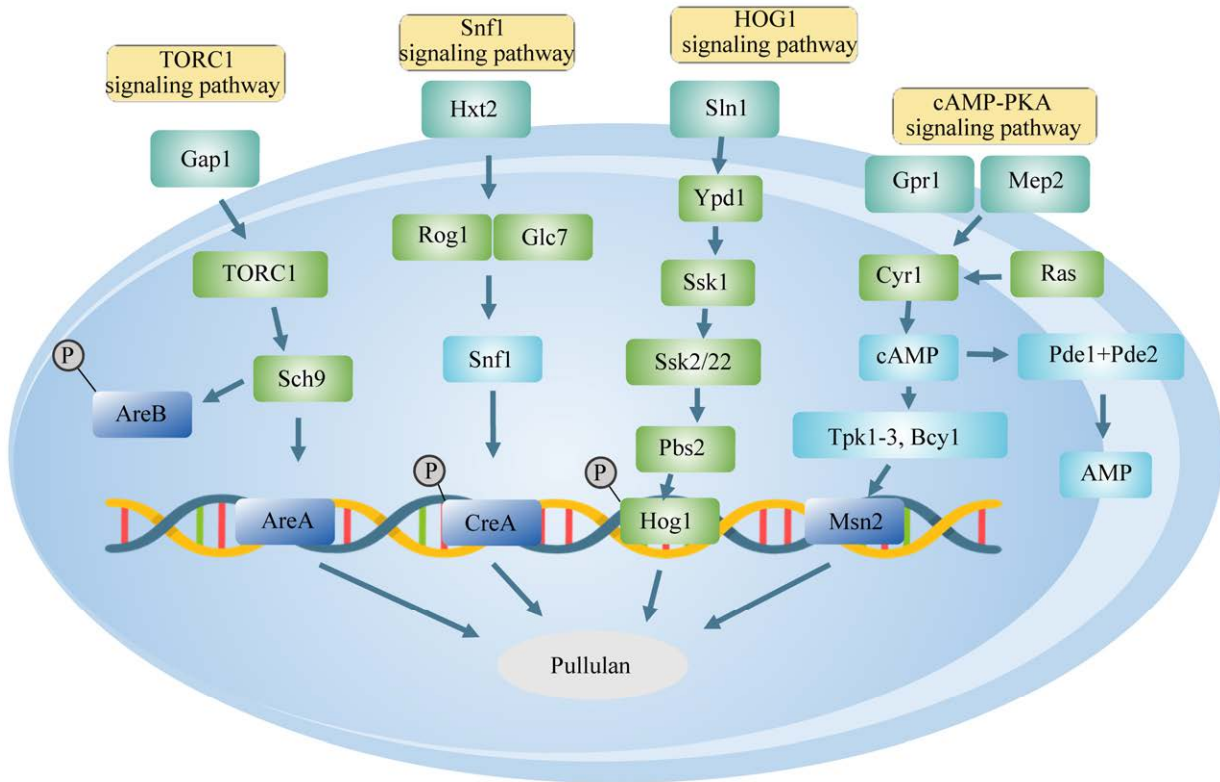


图 3 短梗霉普鲁兰多糖合成中涉及的各种信号通路

Figure 3 The various signaling pathways that are involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium* spp.

通路对于普鲁兰多糖合成的负调控作用：当在 *A. melanogenum* P16 菌株中敲除 cAMP-PKA 通路中的某些基因使得 PKA 活性增高时，突变体基本失去产普鲁兰多糖的能力，此时 Msn2 定位于细胞质；当敲除某些基因使得 PKA 活性降低时，普鲁兰多糖产量上升，此时 Msn2 定位于细胞核<sup>[54]</sup>。UGP1 编码的 UDPG-焦磷酸化酶是普鲁兰多糖生物合成的限速酶，UGP1 基因受 Msn2 激活调控<sup>[54]</sup>。当 Msn2 定位于细胞质或 Msn2 缺失时，UGP1 基因无法正常表达，进而导致 UDP-葡萄糖的形成大大减少。UDP-葡萄糖是普鲁兰多糖生物合成的前体，因此普鲁兰多糖的生物合成受损<sup>[54]</sup>。

### 3.2 TORC1 信号通路

TORC1 信号通路可以感知培养基中的氮

源，如培养基中的首选氮(谷氨酰胺、铵和氨基酸)或非首选氮(脯氨酸)。在酿酒酵母中，TORC1 信号通路中的关键成分包括 TORC1 (氮刺激的关键调节因子，可磷酸化激活 Sch9、Gat1、Gln3 和 Msn2/4 (转录激活因子)、Deh1 和 Dal80 (转录抑制因子)<sup>[9]</sup>。在丰富的氮源和氨基酸存在下，TORC1 使转录激活因子磷酸化和转录抑制因子去磷酸化。磷酸化的转录激活因子定位在细胞质中，而去磷酸化的转录抑制因子定位在细胞核中，抑制许多与氮抑制相关的基因的表达<sup>[53]</sup>。激活的氮信号通路抑制许多应激相关基因的表达，而失活的氮信号通路刺激许多应激相关基因的表达。在短梗霉中，只有一个 GATA 型转录激活因子 AreA，相当于酿酒酵母中的 Gat1 或 Gln3，当氮源缺乏时，AreA 激



活其调控基因的转录；在富氮条件下，AreA 被转移至细胞质中，失去激活作用<sup>[9]</sup>。还有一个 GATA 型转录抑制因子 AreB，相当于 *S. cerevisiae* 中的 Deh1 或 Dal80<sup>[55]</sup>，其对 AREA 基因具有负调控作用<sup>[56]</sup>。这两种转录因子调控细胞对氮源的利用<sup>[55]</sup>。*A. pullulans* 的普鲁兰多糖合成受氮浓度影响，当培养基中有氮源存在时，碳通量会优先流向生物质生产，使得细胞生物量增加，进而抑制了普鲁兰多糖的合成<sup>[57]</sup>。在 *A. melanogenum* P16 野生型菌株中，随着培养基中氮源浓度的增加，普鲁兰多糖的产量不断降低<sup>[55]</sup>，这表明 *A. melanogenum* P16 中也存在氮抑制现象。菌株的生长需要氮源，但氮源又会抑制普鲁兰多糖的合成。在 P16 菌株中敲除 AREA 和 AREB 基因后，表达具有非磷酸化残基的 AREA 基因，使得转录激活因子 AreA 始终定位于细胞核内，进而发挥转录激活作用，这样充分解除了氮源阻遏效应<sup>[55]</sup>。实验结果显示，突变菌株普鲁兰多糖的产量和普鲁兰多糖合成相关基因的表达量明显上升，且生物量并未受到显著影响<sup>[55]</sup>。这表明解除氮阻遏效应可以促进普鲁兰多糖的合成。

### 3.3 HOG1 信号通路

在短梗霉中，负责 HOG1 信号通路的蛋白为 Sln1；Sln1 是一种能够感知渗透压等胞外信号的跨膜蛋白，是一种负调节因子；在正常情况下，Sln1 具有激酶活性，可导致自磷酸化，磷酸基团通过磷酸化蛋白 Ypd1 传递给反应调节蛋白 Ssk1，Ssk1 通过磷酸化保持无活性状态；在有渗透压胁迫时，Sln1 失活，Ypd1 和 Ssk1 去磷酸化；在去磷酸化状态下，Ssk1 与 Ssk2 和 Ssk22 相互作用，并减轻其自身抑制作用；Ssk2 和 Ssk22 可自磷酸化并激活自身，使得它们能够激活 Pbs2<sup>[58-59]</sup>。激活的 Pbs2 使 Hog1 (Hog1 通路中的另一个重要蛋白)磷酸化；活化后的

Hog1 在细胞核内积累，刺激了甘油生物合成的高渗透胁迫基因 *GPD1*、*GPP1* 和 *GPP2*，以及转录激活因子 *SKO1*、*HOT1* 和 *MSN2* 等基因的表达<sup>[60-61]</sup>。*GPD1* 基因编码的甘油-3-磷酸脱氢酶，*GPP1* 和 *GPP2* 基因编码的甘油-3-磷酸酶，都与甘油生物合成有关；积累的甘油在高渗透压胁迫下可以发挥重要作用<sup>[58]</sup>。Hog1 信号通路已被证明主要感知和响应高渗透压，也能够感知和响应高 ROS 浓度、细胞壁损伤和热应激<sup>[52]</sup>。在天然的高渗透压耐受性菌株 *A. melanogenum* TN3-1 中同时敲除 *VSP11* 和 *VSP12* 基因，发现双敲除菌株的普鲁兰多糖产量显著下降，甘油积累量和渗透压耐受性也降低<sup>[9]</sup>。然而，双敲除突变菌株失去了在质量体积分数 40%葡萄糖培养基上生长的能力，而野生型菌株能够在质量体积分数 60%葡萄糖培养基上生长<sup>[62]</sup>。这些结果表明，受 HOG1 信号通路控制的细胞内甘油的合成对于在高浓度葡萄糖条件下生长的 *A. melanogenum* TN3-1 菌株的高普鲁兰多糖产量和渗透压耐受性中发挥了关键作用。

### 3.4 Snf1 信号通路

真菌中的 Snf1 信号通路能够感知和响应培养基中不同浓度的葡萄糖，是低浓度葡萄糖条件下利用半乳糖、蔗糖、麦芽糖和不可发酵碳源(乙酸、甘油和乙醇等)所必需的。据报道，普鲁兰多糖的生产通常在含有高浓度蔗糖的培养基中进行，而非葡萄糖<sup>[63]</sup>。这是由于普鲁兰多糖的合成相关基因受到高浓度葡萄糖的抑制<sup>[64]</sup>。在短梗霉中，编码葡萄糖阻遏因子的是 *CREA* 基因；CreA 是 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指蛋白，能够结合多种受葡萄糖阻遏的基因(包括普鲁兰多糖合成基因)启动子中的 5'-SYGGRG-3'序列<sup>[53,65-66]</sup>，研究发现 *CREA* 基因的敲除会使菌株的普鲁兰多糖产量显著上升<sup>[64]</sup>。因此，葡萄糖阻遏是调节普鲁兰多糖生物合成的途径之一。此外，Hxk2

(己糖激酶)、Reg1-Glc7 (蛋白激酶)、Med8、Cyc8-Tup1、Snf1 (蛋白激酶)、Adr1 和 Cat8 都参与了葡萄糖阻遏与去阻遏<sup>[53]</sup>。

## 4 短梗霉产普鲁兰多糖合成途径的改造

普鲁兰多糖应用广泛,为提高其产量并降低成本,以及满足不同应用场景的多糖分子量需求,当前对普鲁兰多糖生产菌株的代谢工程改造受到越来越多研究者的关注。例如,在 *A. melanogenum* P16 菌株中同时敲除 cAMP-PKA 通路中的关键基因 *TPK1* 和 *TPK2*,普鲁兰多糖的产量提高 12%;当敲除编码腺苷酸环化酶的基因 *AC* 后,普鲁兰多糖的产量提高 9%,cAMP-PKA 通路的改造对于促进普鲁兰多糖的生物合成有重要意义<sup>[54]</sup>。当敲除 *A. melanogenum* P16 菌株中编码葡萄糖阻遏因子的 *CREA* 基因,菌株的普鲁兰多糖产量为 65 g/L,而野生型菌株的产量仅为 52 g/L<sup>[64]</sup>,表明在 Snf1 通路中抑制葡萄糖对普鲁兰多糖合成的影响可提高其产量,这也为利用基因工程技术提高普鲁兰多糖的工业化生产提供了可能。P16 菌株只有 1 个 GATA 型转录激活因子 AreA 和 1 个 GATA 型转录抑制因子 AreB,在对这 2 个转录因子进行同时敲除,并表达一个无磷酸化残基的 AreA 后,普鲁兰多糖的产量提高了 21%,这是首次报道的通过解除氮阻遏效应来促进普鲁兰多糖的生物合成<sup>[55]</sup>。在 *A. melanogenum* P16 菌株中分别过表达优化后的异源血红蛋白 (VHb) 和天然黄素血红蛋白 (FHb) 能够使普鲁兰多糖的产量由野生菌株的 72 g/L 提高到 102 g/L 和 101 g/L<sup>[49]</sup>,普鲁兰多糖的产量、生产力和糖利用率得到显著提高,这是提高氧利用率和普鲁兰多糖生物合成的一种高效、经济的改造方法。通过

在 *A. melanogenum* P16 菌株中过表达 *AmAGS2* 基因,突变体 PA-8 普鲁兰多糖的产量由野生型菌株的 53.7 g/L 上升至 72.5 g/L<sup>[34]</sup>;在过表达编码葡萄糖基转移酶基因 *UGT1* 后,P16 菌株的普鲁兰多糖产量上升 23.1%<sup>[41]</sup>,这对开展代谢工程和利用分子编辑技术来修饰普鲁兰的产物及其理化性质也具有重要意义。在 *A. melanogenum* P16 菌株中敲除编码  $\alpha$ -淀粉酶、葡糖淀粉酶和普鲁兰多糖酶的基因,获得的三突变体 DT15 的普鲁兰多糖分子量由  $2.6 \times 10^6$  Da 上升至  $3.02 \times 10^6$  Da<sup>[67]</sup>;在 *A. melanogenum* TN3-1 中敲除编码  $\alpha$ -淀粉酶的基因 *AMY1* 和负责黑色素生成的 *PKS1* 基因,突变体 AMY-PKS-11 的普鲁兰多糖产量由 72 g/L 提升至 104 g/L,分子量也由  $1.6 \times 10^5$  g/mol 提升至  $3.2 \times 10^5$  g/mol<sup>[25]</sup>,经改造后所得的高分子量普鲁兰多糖是一种良好的生物材料,在食品和制药工业有很大的应用潜力。

## 5 结语

普鲁兰多糖完整的生物合成途径尚未被完全揭示,图 2 中 AmAgs2 各个结构域的具体功能有待利用分子生物学的方法进一步研究。此外,通过过表达 *AmAGS2* 基因有望大大提高短梗霉属菌株的普鲁兰多糖产量。为了获得所需的高质量药物胶囊和化妆品的活性成分,可以通过基因编辑的方法对编码  $\alpha$ -淀粉酶、葡糖淀粉酶和异普鲁兰多糖酶的编码基因进行敲除。在调控方面,论述了普鲁兰多糖合成过程中受调控的主要信号通路,信号通路中的转录激活因子和转录抑制因子可以分别上调和下调许多基因的表达,因此,这些调控因子在代谢工程和合成生物学中具有许多潜在的应用前景。其他转录因子和信号传导途径对于普鲁兰多糖合成的调节还有待进一步阐明。

## 参考文献

- [1] WANG P, JIA SL, LIU GL, CHI Z, CHI ZM. *Aureobasidium* spp. and their applications in biotechnology[J]. Process Biochemistry, 2022, 116: 72-83.
- [2] LI Y, CHI Z, WANG GY, WANG ZP, LIU GL, LEE CF, MA ZC, CHI ZM. Taxonomy of *Aureobasidium* spp. and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2015, 41(2): 228-237.
- [3] RENSINK S, van NIEUWENHUIJZEN EJ, SAILER MF, STRUCK C, WÖSTEN HAB. Use of *Aureobasidium* in a sustainable economy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 202.
- [4] WEI X, LIU GL, JIA SL, CHI Z, HU Z, CHI ZM. Pullulan biosynthesis and its regulation in *Aureobasidium* spp.[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117076.
- [5] GOSTINČAR C, TURK M, ZAJC J, GUNDE-CIMERMAN N. Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(10): 3638-3652.
- [6] JIANG H, LIU NN, LIU GL, CHI Z, WANG JM, ZHANG LL, CHI ZM. Melanin production by a yeast strain XJ5-1 of *Aureobasidium melanogenum* isolated from the Taklimakan Desert and its role in the yeast survival in stress environments[J]. Extremophiles, 2016, 20(4): 567-577.
- [7] XUE SJ, CHEN L, JIANG H, LIU GL, CHI ZM, HU Z, CHI Z. High pullulan biosynthesis from high concentration of glucose by a hyperosmotic resistant, yeast-like fungal strain isolated from a natural comb-honey[J]. Food Chemistry, 2019, 286: 123-128.
- [8] GUNDE-CIMERMANA N, ZALARB P, DE HS, PLEMENITASD A. Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32(3): 235-240.
- [9] CHI Z, KONG CC, WANG ZZ, WANG Z, LIU GL, HU Z, CHI ZM. The signaling pathways involved in metabolic regulation and stress responses of the yeast-like fungi *Aureobasidium* spp.[J]. Biotechnology Advances, 2022, 55: 107898.
- [10] CRUZ-SANTOS MM, ANTUNES FAF, ARRUDA GL, SHIBUKAWA VP, PRADO CA, ORTIZ-SILOS N, CASTRO-ALONSO MJ, MARCELINO PRF, SANTOS JC. Production and applications of pullulan from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives[J]. Bioresource Technology, 2023, 385: 129460.
- [11] SINGH RS, KAUR N, HASSAN M, KENNEDY JF. Pullulan in biomedical research and development: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 694-706.
- [12] AGRAWAL S, BUDHWANI D, GURJAR P, TELANGE D, LAMBOLE V. Pullulan based derivatives: synthesis, enhanced physicochemical properties, and applications[J]. Drug Delivery, 2022, 29(1): 3328-3339.
- [13] de CARVALHO LT, da S PAULA ML, de MORAES RM, ALVES GM, LACERDA TM, SANTOS JCD, dos SANTOS AM, MEDEIROS SF. Chemical modification of pullulan exopolysaccharide by grafting poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) via click chemistry[J]. Polymers, 2020, 12(11): 2527.
- [14] BAUER R. Physiology of *Dematium pullulans* de Bary[J]. Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionski Hyg Abt, 1938, 98: 133-167.
- [15] WALLENFELS K, BENDER H, KEILICH G, BECHTLER G. On pullulan, the glucan of the slime coat of *Pullularia pullulans*[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1961, 73: 245-246.
- [16] LEATHERS TD. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(5): 468-473.
- [17] SINGH RS, KAUR N, SINGH D, PUREWAL SS, KENNEDY JF. Pullulan in pharmaceutical and cosmeceutical formulations: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 231: 123353.
- [18] MUTHUSAMY S, ANANDHARAJ SJ, KUMAR PS, MEGANATHAN Y, VO D-VN, VAIDYANATHAN VK, MUTHUSAMY S. Microbial pullulan for food, biomedicine, cosmetic, and water treatment: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2022, 20(5): 3199-3234.
- [19] PRAJAPATI VD, JANI GK, KHANDA SM. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1): 540-549.
- [20] FRASER CG, JENNINGS HJ. A glucan from *Tremella mesenterica* NRRL-Y6158[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1971, 49(11): 1804-1807.

- [21] DELBEN F, FORABOSCO A, GUERRINI M, LIUT G, TORRI G. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*—II. Nuclear magnetic resonance evidence[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63(4): 545-554.
- [22] REIS RA, TISCHER CA, GORIN PAJ, IACOMINI M. A new pullulan and a branched (1: >3)-, (1: >6)-linked beta-glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 210(1): 1-5.
- [23] CHI ZM, ZHAO SZ. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(2/3): 206-211.
- [24] SHEORAN SK, DUBEY KK, TIWARI DP, SINGH BP. Directive production of pullulan by altering cheap source of carbons and nitrogen at 5 L bioreactor level[J]. *ISRN Chemical Engineering*, 2012, 2012: 867198.
- [25] CHEN L, CHI Z, LIU GL, XUE SJ, WANG ZP, HU Z, CHI ZM. Improved pullulan production by a mutant of *Aureobasidium melanogenum* TN3-1 from a natural honey and capsule shell preparation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 268-277.
- [26] SHARMA N, PRASAD GS, CHOUDHURY AR. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93(1): 95-101.
- [27] MA ZC, LIU NN, CHI Z, LIU GL, CHI ZM. Genetic modification of the marine-isolated yeast *Aureobasidium melanogenum* P16 for efficient pullulan production from inulin[J]. *Marine Biotechnology*, 2015, 17(4): 511-522.
- [28] CHEN JL, LU Y, LIU L, BAI RX, ZHANG ST, HAO YQ, XU FX, WEI BY, ZHAO HX. Characteristic analysis and fermentation optimization of a novel *Aureobasidium pullulans* RM1603 with high pullulan yield[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2024, 137(5): 335-343.
- [29] LIU GL, ZHAO XX, CHEN C, CHI Z, ZHANG YD, CUI Q, CHI ZM, LIU YJ. Robust production of pigment-free pullulan from lignocellulosic hydrolysate by a new fungus co-utilizing glucose and xylose[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 241: 116400.
- [30] LAZARIDOU A, BILIADERIS CG, ROUKAS T, IZYDORCZYK M. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a nonpigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, 97(1): 1-22.
- [31] CHEN SY, ZHENG HC, GAO JQ, SONG H, BAI WQ. High-level production of pullulan and its biosynthesis regulation in *Aureobasidium pullulans* BL06[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1131875.
- [32] ZENG N, ZHANG N, WANG DD, LONG JJ, WANG YJ, ZHANG YT, PU FX, LI ZJ, BALOCH FB, LI BX. Regulation of cell differentiation to promote pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* NG[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(22): 6761-6773.
- [33] CHEN TJ, LIU GL, CHEN L, YANG G, HU Z, CHI ZM, CHI Z. Alternative primers are required for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 10-17.
- [34] CHEN TJ, LIU GL, WEI X, WANG K, HU Z, CHI Z, CHI ZM. A multidomain  $\alpha$ -glucan synthetase 2 (AmAgs2) is the key enzyme for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 1037-1045.
- [35] CATLEY BJ, McDOWELL W. Lipid-linked saccharides formed during pullulan biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*[J]. *Carbohydrate Research*, 1982, 103(1): 65-75.
- [36] SIMON L, BOUCHET B, BREMOND K, GALLANT DJ, BOUCHONNEAU M. Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in *Aureobasidium pullulans*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(12): 1193-1199.
- [37] DUAN XH, CHI ZM, WANG L, WANG XH. Influence of different sugars on pullulan production and activities of  $\alpha$ -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 73(4): 587-593.
- [38] KANG BK, YANG HJ, CHOI NS, AHN KH, PARK CS, YOON BD, KIM MS. Production of pure beta-glucan by *Aureobasidium pullulans* after pullulan synthetase gene disruption[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(1): 137-142.
- [39] MA ZC, CHI Z, GENG Q, ZHANG F, CHI ZM. Disruption of the pullulan synthetase gene in

- siderophore-producing *Aureobasidium pullulans* enhances siderophore production and simplifies siderophore extraction[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 1807-1812.
- [40] LIU NN, CHI Z, WANG QQ, HONG J, LIU GL, HU Z, CHI ZM. Simultaneous production of both high molecular weight pullulan and oligosaccharides by *Aureobasidium melanogenum* P16 isolated from a mangrove ecosystem[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 1016-1024.
- [41] CHEN X, WANG QQ, LIU NN, LIU GL, CHI Z, CHI ZM. A glycosyltransferase gene responsible for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 539-549.
- [42] RUIZ-HERRERA J, ORTIZ-CASTELLANOS L. Cell wall glucans of fungi: a review[J]. *The Cell Surface*, 2019, 5: 100022.
- [43] CHEN TJ, CHI Z, JIANG H, LIU GL, HU Z, CHI ZM. Cell wall integrity is required for pullulan biosynthesis and glycogen accumulation in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 2018, 1862(6): 1516-1526.
- [44] YOSHIMI A, MIYAZAWA K, ABE K. Function and biosynthesis of cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan in fungi[J]. *Journal of Fungi*, 2017, 3(4): 63.
- [45] HOCHSTENBACH F, KLIS FM, van den ENDE H, van DONSELAAR E, PETERS PJ, KLAUSNER RD. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(16): 9161-9166.
- [46] QI CY, JIA SL, WEI X, YANG G, CHI Z, LIU GL, HU Z, CHI ZM. The differences between fungal  $\alpha$ -glucan synthase determining pullulan synthesis and that controlling cell wall  $\alpha$ -1,3 glucan synthesis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 436-444.
- [47] HAN Q, LIU N, ROBINSON H, CAO L, QIAN CL, WANG QF, XIE L, DING HZ, WANG Q, HUANG YP, LI JY, ZHOU ZH. Biochemical characterization and crystal structure of a GH10 xylanase from termite gut bacteria reveal a novel structural feature and significance of its bacterial Ig-like domain[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(12): 3093-3103.
- [48] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A, ČERNÁKOVÁ M, SLÁVIKOVÁ E. Morphological changes during the life cycle of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud[J]. *Folia Microbiologica*, 1980, 25(1): 56-67.
- [49] XUE SJ, JIANG H, CHEN L, GE N, LIU GL, HU Z, CHI ZM, CHI Z. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) and flavohemoglobin (FHb) genes greatly enhances pullulan production[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 701-709.
- [50] CONRAD M, SCHOTHORST J, KANKIPATI HN, van ZEEBROECK G, RUBIO-TEXEIRA M, THEVELEIN JM. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(2): 254-299.
- [51] NIKAWA J, SASS P, WIGLER M. Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(10): 3629-3636.
- [52] ENGELBERG D, PERLMAN R, LEVITZKI A. Transmembrane signaling in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for signaling in metazoans: state of the art after 25 years[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(12): 2865-2878.
- [53] RØDKÆR SV, FÆRGEMAN NJ. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(5): 683-696.
- [54] YANG G, LIU GL, WANG SJ, CHI ZM, CHI Z. Pullulan biosynthesis in yeast-like fungal cells is regulated by the transcriptional activator Msn2 and cAMP-PKA signaling pathway[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 591-603.
- [55] KANG XX, WANG QQ, CHI Z, LIU GL, HU Z, CHI ZM. The GATA type transcriptional factors regulate pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 161-168.
- [56] WONG KH, HYNES MJ, TODD RB, DAVIS MA. Deletion and overexpression of the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreB reveals unexpected pleiotropy[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 12): 3868-3880.
- [57] SHENG L, ZHU GL, TONG QY. Comparative proteomic analysis of *Aureobasidium pullulans* in the presence of high and low levels of nitrogen source[J].

- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(43): 10529-10534.
- [58] HOHMANN S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system[J]. *Current Genetics*, 2015, 61(3): 373-382.
- [59] TATEBAYASHI K, SAITO H. Two activating phosphorylation sites of Pbs2 MAP2K in the yeast HOG pathway are differentially dephosphorylated by four PP2C phosphatases Ptc1-Ptc4[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(4): 104569.
- [60] PROFT M, MAS G, de NADAL E, VENDRELL A, NORIEGA N, STRUHL K, POSAS F. The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress[J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(2): 241-250.
- [61] ALEPUZ PM, JOVANOVIĆ A, REISER V, AMMERER G. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes[J]. *Molecular Cell*, 2001, 7(4): 767-777.
- [62] CHEN L, WEI X, LIU GL, HU Z, CHI ZM, CHI Z. Glycerol, trehalose and vacuoles had relations to pullulan synthesis and osmotic tolerance by the whole genome duplicated strain *Aureobasidium melanogenum* TN3-1 isolated from natural honey[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165(Pt A): 131-140.
- [63] SUGUMARAN KR, PONNUSAMI V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 173: 573-591.
- [64] WANG QQ, LU Y, REN ZY, CHI Z, LIU GL, CHI ZM. CreA is directly involved in pullulan biosynthesis and regulation of *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *Current Genetics*, 2017, 63(3): 471-485.
- [65] CHI ZM, LI JF, WANG XH, YAO SM. Inositol and phosphatidylinositol mediated glucose derepression, gene expression and invertase secretion in yeasts[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(7): 443-449.
- [66] GANCEDO JM. Yeast carbon catabolite repression[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(2): 334-361.
- [67] LIU NN, CHI Z, LIU GL, CHEN TJ, JIANG H, HU Z, CHI ZM.  $\alpha$ -Amylase, glucoamylase and isopullulanase determine molecular weight of pullulan produced by *Aureobasidium melanogenum* P16[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 727-734.