

工业生物技术

代谢工程改造酿酒酵母生产 β -胡萝卜素

王贝贝^{1,2,3}, 施明雨^{1,2,3}, 王冬^{1,2,3}, 许骄阳^{2,3}, 刘怡^{2,3}, 杨洪江¹, 戴住波^{2,3}, 张学礼^{2,3}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

王贝贝, 施明雨, 王冬, 等. 代谢工程改造酿酒酵母生产 β -胡萝卜素. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1204-1216.

Wang BB, Shi MY, Wang D, et al. Production of β -carotene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1204-1216.

摘要: β -胡萝卜素在食品、药品和化妆品领域有广泛用途。为获得生产 β -胡萝卜素的微生物细胞工厂, 本研究首先在酿酒酵母 BY4742 中过表达甲羟戊酸 (MVA) 途径的限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因及二萜化合物合成的关键酶牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 (GGPS) 基因, 来提高牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP) 的供给。在酿酒酵母底盘菌 BY4742-T2 的基础上整合来源于成团泛菌和红法夫酵母的 β -胡萝卜素合成基因, 比较酿酒酵母工程菌生产 β -胡萝卜素的差别。结果表明提高酿酒酵母中 HMGR 和 GGPS 酶基因的表达能将工程菌中 β -胡萝卜素的产量提高 26.0 倍。另外, 来源于真核生物红法夫酵母的合成基因相比成团泛菌, 更有利于酿酒酵母生产 β -胡萝卜素。最终获得的酿酒酵母工程菌 BW02 能生产 1.56 mg/g 细胞干重的 β -胡萝卜素, 为进一步获得高产 β -胡萝卜素细胞工厂提供基础。

关键词: β -胡萝卜素, 成团泛菌, 红法夫酵母, 酿酒酵母

Received: November 18, 2013; **Accepted:** January 22, 2014

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2012AA02A704), National Natural Science Foundation of China (No. 81202864), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00800), Hundred Talent Program of the Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Xueli Zhang. Tel/Fax: +86-22-84861983; E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn

Zhubo Dai. Tel/Fax: +86-22-84861946; E-mail: dai_zb@tib.cas.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA02A704), 国家自然科学基金 (No. 81202864), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00800), 中国科学院百人计划资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130582.html>

Production of β -carotene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*

Beibei Wang^{1,2,3}, Mingyu Shi^{1,2,3}, Dong Wang^{1,2,3}, Jiaoyang Xu^{2,3}, Yi Liu^{2,3},
Hongjiang Yang¹, Zhubo Dai^{2,3}, and Xueli Zhang^{2,3}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: β -carotene has a wide range of application in food, pharmaceutical and cosmetic industries. For microbial production of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae*, the supply of geranylgeranyl diphosphate (GGPP) was firstly increased in *S. cerevisiae* BY4742 to obtain strain BY4742-T2 through over-expressing truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (tHMGR), which is the major rate-limiting enzyme in the mevalonate (MVA) pathway, and GGPP synthase (GGPS), which is a key enzyme in the diterpenoid synthetic pathway. The β -carotene synthetic genes of *Pantoea agglomerans* and *Xanthophyllomyces dendrorhous* were further integrated into strain BY4742-T2 for comparing β -carotene production. Over-expression of tHMGR and GGPS genes led to 26.0-fold increase of β -carotene production. In addition, genes from *X. dendrorhous* was more efficient than those from *P. agglomerans* for β -carotene production in *S. cerevisiae*. Strain BW02 was obtained which produced 1.56 mg/g (dry cell weight) β -carotene, which could be used further for constructing cell factories for β -carotene production.

Keywords: β -carotene, *Pantoea agglomerans*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Saccharomyces cerevisiae*

类胡萝卜素 (Carotenoids) 是一类重要的天然色素, 主要包括 β -胡萝卜素 (β -carotene)、番茄红素(Lycopene)、玉米黄素(Zeaxanthin)、角黄素(Canthaxanthin)和虾青素 (Astaxanthin) 等^[1]。其中 β -胡萝卜素是一种抗氧化剂, 在人体内能转化为维生素 A, 活性显著, 在药品、保健品、化妆品和食品上已有广泛的应用^[2]; 在红法夫酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* 或雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 等生物体中被作为中间体进一步生物催化为抗氧化活性更强的虾青素^[1,3-4]。天然来源的 β -胡萝卜素优于化学合成, 更能被市场接受, 目前市场上销售的 β -胡萝卜素 90%是通过化学合成法获得, 但随着国内外对天然 β -胡萝卜素市场需求的增加, 采用微生物

发酵法生产具有广阔的应用前景^[5]。自然界很多微生物能合成 β -胡萝卜素, 例如红法夫酵母 *X. dendrorhous*、三孢布拉氏霉菌 *Blakeslea trispora*、噬夏孢欧文氏菌 *Erwinia uredovora* 和成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 等, 但由于自然产量低, 很难工业化。

基于这类化合物的重要性, 目前类胡萝卜素生物合成途径已经基本解析清楚: 如来源于真菌红法夫酵母 *XdCrtBY*、*XdCrtI*、*XdCrtR* 和 *XdCrtS* 基因组成的合成途径能将其体内二萜的基本前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP) 依次催化获得番茄红素、 β -胡萝卜素和虾青素等类胡萝卜素^[1,3]; 细菌来源的成团泛菌中由 *PagCrtB*、*PagCrtI* 和 *PagCrtY* 基因组成的合成

途径能生产番茄红素和 β -胡萝卜素等类胡萝卜素^[6](图 1)。

酿酒酵母为安全的模式微生物, 已成功被遗传改造为能生产青蒿酸^[7]、丹参酮类^[8-9]、白藜芦醇^[10]和人参皂苷^[11]等多种天然产物的工程菌株。酿酒酵母中存在能生物合成萜类的甲羟戊酸 (MVA) 途径, 其能利用乙醇、半乳糖和葡萄糖等简单碳源合成萜类基本单元异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP), 这两个萜类单元能被法呢烯焦磷酸合酶 (FPPS, *ERG20* 基因编码) 和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 (GGPS, *BTS1* 基因编码) 依次催化得到二

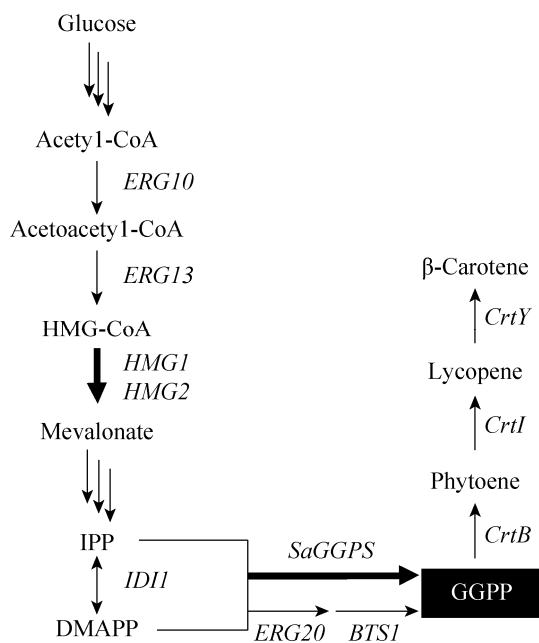


图 1 酿酒酵母中 MVA 途径及引入的 β -胡萝卜素合成途径

Fig. 1 MVA pathway for isoprenoid biosynthesis in yeast and heterologous β -carotene synthetic pathway. Abbreviation: HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP, Isopentenyl diphosphate; DMAPP, Dimethylallyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate.

萜类的通用前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP); GGPP 能继续被 *CrtB*、*CrtI* 和 *CrtY* 等胡萝卜素基因编码的酶催化形成 β -胡萝卜素 (图 1)。Yamano 等利用嗜夏孢欧文氏菌的 β -胡萝卜素合成途径基因, 在酿酒酵母中构建出能生产 0.1 mg/g 细胞干重的工程菌^[12]; Verwaal 等利用红法夫酵母的 β -胡萝卜素合成途径基因, 在酿酒酵母中构建出生产 5.9 mg/g 干重细胞的工程菌^[13]; Li 等在酿酒酵母中通过对红法夫酵母 β -胡萝卜素合成途径的 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* 基因中的相关密码子进行优化, 结合过量表达 MVA 途径中的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因的策略, 获得产量为 0.39 mg/g 干重细胞的工程菌^[2]。

我们前期在大肠杆菌中引入成团泛菌的 β -胡萝卜素合成途径, 再通过对大肠杆菌的 MEP、 β -胡萝卜素合成、三羧酸循环、磷酸戊糖途径和 ATP 合成 5 个功能模块的组合调控, 将 β -胡萝卜素的生产能力提高了 74 倍。最终 β -胡萝卜素产量达 2.1 g/L, 含量达 60 mg/g 干重细胞^[6]。在本研究中, 我们首先构建了一个高产 GGPP 的底盘酿酒酵母细胞, 在此基础上, 比较了来源于原核生物成团泛菌和来源于真核生物红法夫酵母的两条 β -胡萝卜素合成途径, 发现红法夫酵母的基因更适合酿酒酵母生产 β -胡萝卜素, 为构建高产 β -胡萝卜素的酿酒酵母工程菌提供了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 工具酶与试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶和 RNA 反转录试剂盒 (PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis

Kit) 购自大连宝生物工程公司; 限制性内切酶 *SexA* I、*Pac* I 和 *Asc* I 购自 Fermentas 公司; 快连酶购自 NEB 公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; 酵母 DNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; DNA 回收试剂盒购自美国 Biomiga 公司; 氨苄青霉素购自上海生工生物工程有限公司; 酵母选择培养基 (四缺, Ura-Trp-Leu-His) 购自北京泛基诺(功能基因组)科技有限公司; 番茄红素标品、 β -胡萝卜素标品和 5-FOA 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

PCR 扩增仪, Eppendorf Mastercycler gradient; 全自动凝胶成像系统, Bio-Rad Molecular Imager Gel DOC XR; 台式高速离心机, Eppendorf 5415D; 紫外可见分光光度计, Shimadzu UV-2550; 高速冷冻离心机, Thermo Sorvall

Evolution RC; 高效液相色谱, Agilent Technologies Series 1260。

1.1.3 菌株、引物和质粒

本次研究所用菌株、引物和质粒已经分别在表 1-3 中列出。

1.1.4 培养基

LB 培养基: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏, 1% 氯化钠, 100 mg/L 氨苄青霉素; SM-URA 筛选培养基: 0.8% 酵母选择培养基 (四缺, Ura-Trp-Leu-His), 2% 葡萄糖, 0.01% His, 0.01% Trp, 0.01% Leu; SM-HIS 筛选培养基: 0.8% 酵母选择培养基 (四缺, Ura-Trp-Leu-His), 2% 葡萄糖, 0.01% Trp, 0.01% Leu, 0.01% Ura; YPD 培养基: 2% 蛋白胨, 1% 酵母膏, 2% 葡萄糖; SM-5FOA 筛选培养基: YPD 培养基, 0.1% 5-FOA。上述液体培养基加 1.5% 的琼脂配成固体培养基。

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this work

Name	Description	Source
<i>Pantoea agglomerans</i>	Be used to clone the gene of <i>pagCrtB</i> , <i>pagCrtI</i> and <i>pagCrtY</i>	CGMCC ^a
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Be used to clone the gene of <i>XdCrtBY</i> and <i>XdCrtI</i>	CGMCC
BY4742	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>MET15</i> , <i>ura3Δ0</i>	[14]
BY4742-T	<i>P_{PGK1-tHMG1-T_{ADH1}}</i> cassette integrated into δ DNA site of BY4742	This study
BY4742-T2	<i>P_{PGK1-SaGGPS-T_{ADH1}}</i> and <i>P_{PGK1-tHMG1-T_{ADH1}}</i> cassettes integrated into δ DNA site of BY4742	This study
BW01	<i>P_{PGK-pagCrtB-T_{ADH1}}</i> , <i>P_{TEF1-pagCrtI-T_{CYC1}}</i> and <i>P_{TDH3-pagCrtY-T_{TPH1}}</i> cassettes integrated into <i>trp1</i> site of BY4742-T2	This study
BW02	<i>P_{PGK1-XdCrtBY-T_{ADH1}}</i> and <i>P_{TEF1-XdCrtI-T_{CYC1}}</i> cassettes integrated into <i>trp1</i> site of BY4742-T2	This study
BW03	<i>P_{PGK-pagCrtB-T_{ADH1}}</i> , <i>P_{TDH3-pagCrtY-T_{TPH1}}</i> and <i>P_{TEF1-XdCrtI-T_{CYC1}}</i> cassettes integrated into <i>trp1</i> site of BY4742-T2	This study
BW04	<i>P_{PGK1-XdCrtBY-T_{ADH1}}</i> and <i>P_{TEF1-pagCrtI-T_{CYC1}}</i> cassettes integrated into <i>trp1</i> site of BY4742-T2	This study
BW-CK	<i>P_{PGK1-XdCrtBY-T_{ADH1}}</i> and <i>P_{TEF1-XdCrtI-T_{CYC1}}</i> cassettes integrated into <i>trp1</i> site of BY4742	This study

^a CGMCC: China general microbiological culture collection center.

表 2 本研究所用到的引物

Table 2 Primers used in this work

Primer name	Sequence (5'-3')
Sac11-pGK1	GCGCCGCGGACGCACAGATATTATAACATC
Asc1-HMG1	TCGCGGCGCGCCTTAGGATTTAATGCAGGTGACGGAC
SexA-CrtBI	GCGACCWGGTAAAACAATGGAGGTGGGATCGAAAAGTTTTG
Asc1-CrtB	GCGGCGCGCCTTAAACGGGGCGCTGCCAGAGATC
SexA-CrtI	GCGACCWGGTAAAACAATGAATAGAACTACAGTAATTG
Asc1-CrtB/I	TCGCGGCGCGCCTCAAGCCAGATCCTCCAGCATCAATC
Pac1-PagCrtY	GCGTTAATTAATGCCGCGGTATGATCTGATTCTGG
PagCrtY-ASC1	GCGGCGCGCCTCATTGCATCGCCTGTTGACGGTGA
SexA-XdCrtI	GCGACCWGGTATGGGAAAAGAACAAGATCAGGATA
XdCrtI-ASC	GCGGCGCGCCTCAGAAAAGCAAGAACACCAACGGAT
SexA-XdCrtYB	GCGACCWGGTATGACGGCTCTCGCATATTACCAGA
XdCrtYB-ASC-2	GCGGCGCGCCTTACTGCCCTTCCCATCCGCTCATGACC
SexA-SaGGPS	GTGCGACCWGGTAAAACAATGTCATACTTCGATAACTACT
Asc1-SaGGPS	TGTCGCGGCGCGCCTTATTTCTTCTTCTGATAGTGA
X1-M-pEASY-r-t-F	CTTGCAAATGCCTATTGTGCAGATGTTATAATATCTGTGCGTTAATTAAGGCTC GTATGTTGTGTGGAATTGT
X1-r-t-R-Trp1	GCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGT
1-M-pEASY-PGK1-F	CTGTTTCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCC TTAATTAACGCACAGATATTATAAC
3G-1-M-ADHt-TDH3-R	CCTCCGCGTCATTAACCTTCTTGTGTTGACGCTAACATCAACGCTAGTATTCG GCATGCCGGTAGAGGTGTGG
3G-3-M-ADHt-TDH3-F	CAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGAAT ACTAGCGTTGAATGTTAGCGTC
3G-3-M-TPI1t-TEF1-R	AGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTGTGTGGGGGATCACTTTAATTA TCTATATAACAGTTGAAATTTGGA
3G-2-M-TPI1t-TEF1-F	GTCATTTTCGCGTTGAGAAGATGTTCTTATCCAAATTTCAACTGTTATATAGATT AATTAAGTGATCCCCCACAC
M-CYC1t-pEASY-R	CGTATTACAATTCCTGCGGCTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG GCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC
X2-r-t-F-Trp1	CACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGA
X2-M-pEASY-r-t-R	CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGCGGCCCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCG CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
1-M-ADHt-TEF1-R	GGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTGTGTGGGGGATCACTTTAATTAATCGG CATGCCGGTAGAGGTG
2-M-ADHt-TEF1-F	GGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGATTAAT TAAAGTGATCCCCCA

表 3 本研究所用的质粒

Table 3 Plasmids used in this study

Name	Description	Source
pEASY-Blunt	Cloning vector with multiple cloning sites, <i>Amp</i> , <i>Km</i>	TransGen Biotech
pEASY-Blunt Simple	Cloning vector for blunt ligation, <i>Amp</i> , <i>Km</i>	TransGen Biotech
p δ -tHMG1	δ DNA site, Containing <i>P_{PGK1}-tHMG1-T_{ADH1}</i> cassette, <i>URA3</i>	[11]
pM3-SynPgPPDS	Cloning <i>P_{TEF1}-SynPgPPDS-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	[11]
pM11-ERG1	Cloning <i>P_{TDH3}-ERG1-T_{TPI1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	[11]
pLHis-ERG20/BTS1-SaGGPS	Containing <i>P_{ADH1}-ERG20/BTS1-T_{ADH1}</i> and <i>P_{PGK1}-SaGGPS-T_{ADH1}</i> cassettes, CEN6/ARSH4, <i>HIS3</i>	[8]
p δ -SaGGPS	δ DNA site, Containing <i>P_{PGK1}-SaGGPS-T_{ADH1}</i> cassette, <i>URA3</i>	This study
p δ -XdCrtBY	Cloning <i>P_{PGK1}-XdCrtBY-T_{ADH1}</i> cassette into p δ -UB	This study
pM3-XdCrtI	Cloning <i>P_{TEF1}-XdCrtI-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	This study
p δ -pagCrtB	Cloning <i>P_{PGK1}-pagCrtB-T_{ADH1}</i> cassette into p δ -UB	This study
pM3-pagCrtI	Cloning <i>P_{TEF1}-pagCrtI-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	This study
pM11-pagCrtY	Cloning <i>P_{TDH3}-pagCrtY-T_{TPI1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	This study
pTrp-HIS	Cloning <i>Trp1</i> and <i>HIS3</i> marker into pEASY-Blunt	[11]

1.2 方法

1.2.1 功能基因克隆与分析

于 YPD 液体培养基中, 20 °C 振荡培养红法夫酵母 *X. dendrorhous*, 10 000×g 离心收集菌体, 液氮研磨后, 用 Trizol 法提取总 RNA 和用 RNA 反转录试剂盒 (PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 获得红法夫酵母 cDNA 模板^[15], 分别用引物组合 XdCrtI-ASC/SexA-XdCrtI, SexA-XdCrtYB/XdCrtYB-ASC-2 扩增获得 *XdCrtI* 和 *XdCrtBY* 基因。

于 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养成团泛菌 *P. agglomerans*, 10 000×g 离心收集菌体, 用 DNA 提取试剂盒提取扩增模板基因组, 分别用引物组合 SexA-CrtBI/Asc1-CrtB、SexA-CrtI/Asc1-CrtB/I 和 Pac1-PagCrtY/PagCrtY-ASC1 扩增获得 *pagCrtB*、*pagCrtI* 和 *pagCrtY* 基因。

将获得的红法夫酵母和成团泛菌 β -胡萝卜

素合成途径基因序列导入 CAIcal 在线服务器中 (<http://genomes.urv.es/CAIcal>) 计算密码子适应指数(Codon Adaptation Index, CAI)^[16]。

1.2.2 表达功能模块构建

以质粒 pLHis-ERG20/BTS1-SaGGPS 为模板, SexA-SaGGPS/Asc1-SaGGPS 为引物扩增到 *SaGGPS* 基因片段。用 *SexA* I 和 *Asc* I 分别双酶切 p δ -tHMG1 质粒, *SaGGPS* 基因片段, 及方法“1.2.1”中获得的 *pagCrtB* 和 *XdCrtBY* 基因片段, 割胶回收目的片段, 分别酶连得到重组载体 p δ -SaGGPS、p δ -pagCrtB 和 p δ -XdCrtBY (表 3)。用 *SexA* I 和 *Asc* I 分别双酶切 pM3-SynPgPPDS 质粒和方法“1.2.1”中获得的 *pagCrtI* 和 *XdCrtI* 基因片段, 割胶回收目的片段, 分别酶连得到重组载体 pM3-pagCrtI 和 pM3-XdCrtI。用 *Pac* I 和 *Asc* I 分别双酶切 pM11-ERG1 质粒和方法“1.2.1”中获得的

pagCrtY 基因片段, 割胶回收目的片段, 酶连得到重组载体 pM11-*pagCrtY*。以上质粒均由华大基因测序验证。

1.2.3 二萜底盘菌构建

BY4742 感受态细胞制备和转化用醋酸锂方法^[11]。p δ -tHMG1 和 p δ -SaGGPS 分别用 *Xho* I 酶切和胶回收。酶切后的 δ -tHMG1 基因片段, 转入 BY4742 感受态细胞中, 用 SM-URA 固体筛选培养基培养 48 h, 阳性克隆再经过 SM-5FOA 固体筛选培养基筛选和 PCR 验证 (引物 Sac11-pGK1/Asc1-HMG1) 获得工程菌 BY4742-T; 进一步, 酶切后的 δ -SaGGPS 基因片段转入 BY4742-T 感受态细胞中, 用 SM-URA 固体筛选培养基培养 48 h, 阳性克隆再经过 SM-5FOA 固体筛选培养基筛选和 PCR 验证 (引

物 Sac11-pGK1/Asc1-SaGGPS) 获得工程菌 BY4742-T2。

1.2.4 产 β -胡萝卜素工程菌构建

β -胡萝卜素工程菌的构建使用多片段同源重组方法^[11]。首先, 按照表 4 中 DNA 模板和引物搭配方案, 用 PrimeSTAR HS DNA 高保真酶 PCR 分别扩增获得用于同源重组的基因模块。BY4742 或 BY4742-T2 感受态细胞用醋酸锂方法制备, 按照表 4 中的 Group A 和图 2A 所示进行搭配转化后, 在 SM-HIS 筛选培养基筛选分别获得工程菌 BW01 和 BW03; 按照表 4 中的 Group B 和图 2B 所示进行搭配转化后, 在 SM-HIS 筛选培养基筛选分别获得工程菌 BW02、BW04 和 BW-CK, 阳性克隆根据菌斑的颜色来直接鉴定 (产胡萝卜素的菌显黄色)。

表 4 多片段酵母同源重组信息表

Table 4 Information of the DNA assembler

DNA Template	Primer Name	Overlap A	Cassette	Overlap B
Group A				
p δ - <i>pagCrtB</i>	1-M-pEASY-PGK1-F 3G-1-M-ADHt-TDH3-R	<i>LP1-F</i>	<i>P_{PGK1}-pagCrtB-T_{ADHI}</i>	<i>LP1-R</i>
pM3- <i>pagCrtI</i> or pM3- <i>XdCrtI</i>	3G-2-M-TPI1t-TEF1-F M-CYC1t-pEASY-R	<i>LP2-F</i>	<i>P_{TEF1}-pagCrtI-T_{CYC1} or P_{TEF1}-XdCrtI-T_{CYC1}</i>	<i>LP2-R</i>
pM4- <i>pagCrtY</i>	3G-3-M-ADHt-TDH3-F 3G-3-M-TPI1t-TEF1-R	<i>LP3-F</i>	<i>P_{TDH3}-pagCrtY-T_{TPI1}</i>	<i>LP3-R</i>
pTrp-HIS	X1-M-pEASY-r-t-F X1-r-t-R-Trp1	<i>up-R</i>	HIS3 marker and the helper fragment of Trp1 DNA Site	<i>Trp1 DNA -up</i>
pTrp-HIS	X2-r-t-F-Trp1 X2-M-pEASY-r-t-R	<i>Trp1 DNA-Down</i>	Helper fragment of Trp1 DNA Site	<i>down-F</i>
Group B				
p δ - <i>XdCrtBY</i>	1-M-pEASY-PGK1-F 1-M-ADHt-TEF1-R	<i>LP1-F</i>	<i>P_{PGK1}-XdCrtBY-T_{ADHI}</i>	<i>LP1-R</i>
pM3- <i>XdCrtI</i> or pM3- <i>pagCrtI</i>	2-M-ADHt-TEF1-F M-CYC1t-pEASY-R	<i>LP2-F</i>	<i>P_{TEF1}-pagCrtI-T_{CYC1} or P_{TEF1}-XdCrtI-T_{CYC1}</i>	<i>LP2-R</i>
pTrp-HIS	X1-M-pEASY-r-t-F X1-r-t-R-Trp1	<i>up-R</i>	HIS3 marker and the helper fragment of Trp1 DNA Site	<i>Trp1 DNA -up</i>
pTrp-HIS	X2-r-t-F-Trp1 X2-M-pEASY-r-t-R	<i>Trp1 DNA-Down</i>	Helper fragment of Trp1 DNA Site	<i>down-F</i>

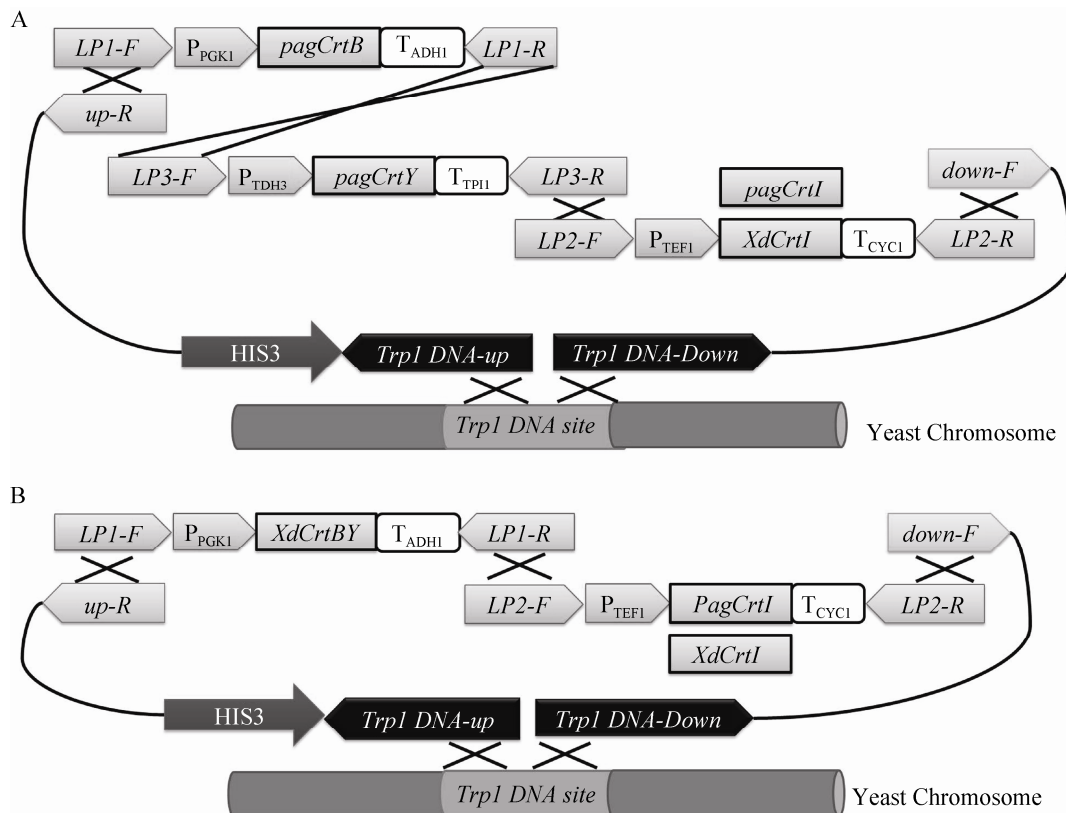


图 2 多片段同源重组法在酿酒酵母 *Trp1* 基因位点整合 β -胡萝卜素生物合成途径基因的示意图 (A: 整合 *PagCrtB*、*PagCrtY* 和 *PagCrtI* (或 *XdCrtI*) 基因; B: 整合 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* (或 *PagCrtI*) 基因)

Fig. 2 Strains construction using the DNA assembler method. (A) The *PagCrtB*, *PagCrtY* and *PagCrtI* (or *XdCrtI*) genes were integrated into *Trp1* site of BY4742-T2. (B) The *XdCrtBY*, *XdCrtI* (or *PagCrtI*) genes were integrated into *Trp1* site of BY4742-T2.

1.2.5 摇瓶发酵方法

挑取平板活化的单克隆菌株于相应的液体筛选培养基中制备发酵种子液 (30 °C, 250 r/min, 16 h); 离心收集菌体, 转移至含 10 mL YPD 液体培养基 100 mL 三角瓶中, 调 *OD* 至 0.1, 30 °C、250 r/min 振荡培养 4 d, 检测 *OD*₆₀₀ 及产物含量。

1.2.6 β -胡萝卜素产量的检测方法

取 2 mL 培养的发酵液于 12 000×g 离心 3 min, 无菌水清洗后, 加适量玻璃珠 (0.5 mm) 和 1 mL 提取液 (甲醇: 乙腈: 二氯甲烷=

21 : 21 : 8), 振荡破碎 5 min, 冰水中超声 30 min, 10 000×g 离心 5 min, 取上清液 (提取二次, 合并上清液); 上清液过 0.22 μ m 有机膜后用高效液相色谱分析番茄红素和 β -胡萝卜素的产量。检测条件: DAD 检测器, Waters Symmetry[®] C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇: 乙腈: 二氯甲烷 (21 : 21 : 8), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 450 nm; 每个待测样品进行 3 个生物学重复试验; 番茄红素和 β -胡萝卜素标准品用于定量分析。

2 结果与分析

2.1 生产二萜化合物的底盘酿酒酵母细胞的构建

菌株 BY4742 来源于酿酒酵母 S288C 标准菌株, 其萜类生物合成途径中存在合成二萜的通用前体 GGPP。野生型酿酒酵母细胞合成 GGPP 的能力很差^[8]。已有实验表明, 过表达酿酒酵母的 *tHMG1* 基因 (截去了酵母 *HMG1* 基因中编码 N-端含反馈抑制区的相关序列) 和嗜酸热硫化叶菌 *SaGGPS* 基因能有效提高酿酒酵母合成 GGPP 和二萜化合物的能力^[8]。为获得高产 GGPP 的底盘酿酒酵母细胞, 通过同源重组法^[11], 携带强启动子 *PGK1* 的 *tHMG1* 基因和 *SaGGPS* 基因被整合到酿酒酵母 BY4742 的 δ DNA 位点。阳性克隆经过特异引物验证后 (图 3), 获得生产二萜化合物的底盘酿酒酵母细胞 BY4742-T2。

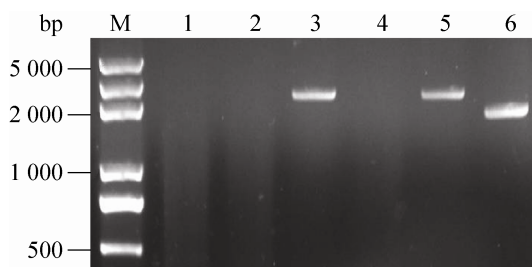


图 3 工程菌 BY4742-T 和 BY4742-T2 的 PCR 验证
Fig. 3 PCR verification of strains BY4742-T and BY4742-T2. M: DNA marker; Lane 1 and 2 are PCR products amplified from control strain BY4742; Lane 3 and 4 are PCR products amplified from BY4742-T; Lane 5 and 6 are PCR products amplified from BY4742-T2. Primer set Sac11-pGK1/Asc1-HMG1 was used to amplify *tHMG1* gene (Lane 1, 3 and 5). Primer set Sac11-pGK1/Asc1-SaGGPS was used to amplify *SaGGPS* gene (Lane 2, 4 and 6).

2.2 底盘酿酒酵母细胞 BY4742-T2 中引入成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径

成团泛菌能合成 β -胡萝卜素, 实验室前期研究表明成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径的基因在大肠杆菌中能被很好地表达。利用成团泛菌的基因, 在系统优化的大肠杆菌中 β -胡萝卜素产量能达到 2.1g/L^[6]。在本研究中, 通过多片段同源重组法^[11,17], 来源于成团泛菌的 *pagCrtB*、*pagCrtI* 和 *pagCrtY* 基因, 和对应的 *PGK1*、*TEF1* 和 *TDH3* 强启动子, 被整合到底盘酿酒酵母细胞 BY4742-T2 的 *Trp1* 位点, 获得工程菌 BW01。该菌发酵 96 h, 能生产 0.04 mg/g 的 β -胡萝卜素和 0.06 mg/g 的番茄红素 (图 4)。

2.3 底盘酿酒酵母细胞 BY4742-T2 中引入红法夫酵母的 β -胡萝卜素合成途径

红法夫酵母能合成强抗氧化活性物质虾青

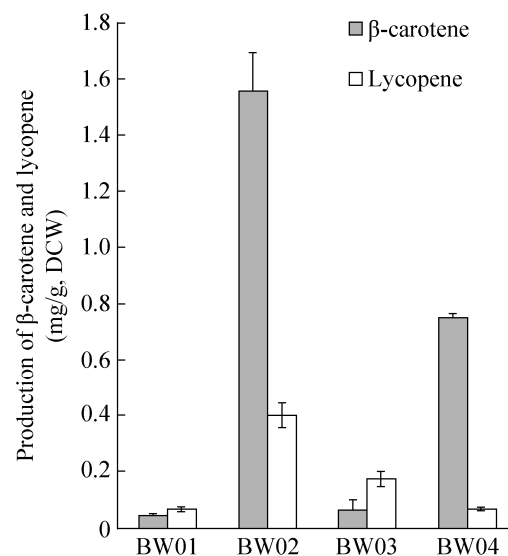


图 4 酿酒酵母工程菌发酵生产 β -胡萝卜素和番茄红素

Fig. 4 Production of β -carotene and lycopene by metabolically engineered *S. cerevisiae* strains.

素,同时中间产物 β -胡萝卜素由 *XdCrtI* 和双功能基因 *XdCrtBY* 催化获得。在本研究中,通过多片段同源重组法,来源于红法夫酵母的 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* 基因,和对应的 *PGK1* 和 *TEF1* 强启动子,被整合到底盘酿酒酵母细胞 BY4742-T2 的 *Trp1* 位点,获得工程菌 BW02。该菌发酵 96 h,能生产 1.56 mg/g 的 β -胡萝卜素和 0.4 mg/g 的番茄红素,其含量分别是 BW01 菌的 39.0 倍和 6.7 倍(图 4)。

2.4 过表达 *tHMG1* 基因和 *SaGGPS* 基因的作用

为了进一步验证过表达 *tHMG1* 基因和 *SaGGPS* 基因对生产类胡萝卜素化合物的影响,通过多片段同源重组法,来源于红法夫酵母的 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* 基因和对应的 *PGK1* 和 *TEF1* 强启动子,被整合到酵母细胞 BY4742 的 *Trp1* 位点,获得工程菌 BW-CK。该菌发酵 96 h,能生产 0.06 mg/g 的 β -胡萝卜素和 0.01 mg/g 的番茄红素。过表达 *tHMG1* 基因和 *SaGGPS* 基因后, β -胡萝卜素和番茄红素的含量分别提高了 26.0 和 40.0 倍,总类胡萝卜素化合物含量提高了 28.0 倍,进一步证明这两个基因的过表达能提高酿酒酵母细胞中 GGPP 的供给。

2.5 红法夫酵母和成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径基因的组合

为了进一步研究红法夫酵母的 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* 基因是否比对应的成团泛菌的基因更有利于 β -胡萝卜素合成,我们对红法夫酵母和成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径的基因进行了组合。红法夫酵母 *XdCrtI* 基因和成团泛菌 *pagCrtB* 与 *pagCrtY* 基因组合后,获得工程菌 BW03。其

β -胡萝卜素和番茄红素的含量分别为 0.06 mg/g 和 0.17 mg/g。

红法夫酵母的双功能基因 *XdCrtBY* 和成团泛菌 *pagCrtI* 基因组合后,获得工程菌 BW04。其 β -胡萝卜素和番茄红素的含量分别为 0.75 mg/g 和 0.07 mg/g。

相比全部使用成团泛菌基因的工程菌 BW01、BW03 和 BW04 中 β -胡萝卜素和番茄红素的含量有不同程度提高,但均低于全部使用红法夫酵母基因的工程菌 BW02 的产量(图 4)。这表明红法夫酵母的 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* 基因都比对应的成团泛菌的基因更有利于酿酒酵母中 β -胡萝卜素的合成。

2.6 红法夫酵母和成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径基因的密码子适应指数(CAI)分析

密码子适应指数(Codon adaptation index. CAI)能评估某基因的密码子与宿主细胞中高表达基因集所用密码子的接近程度(0-1.0, 值越接近 1.0 程度越高),它一般用来预测基因的表达水平^[16,18-19]。根据 CAIcal 服务器中提供的模式物种酿酒酵母和大肠杆菌的密码子使用参考数据库^[16,20],分别计算红法夫酵母 *XdCrtBY* 和 *XdCrtI* 基因,及成团泛菌 *pagCrtB*、*pagCrtI* 和 *pagCrtY* 基因的密码子适应指数。结果表明在真核宿主酿酒酵母中红法夫酵母来源基因的 CAI 值(分别为 0.68 和 0.69)均高于成团泛菌来源基因的 CAI 值(分别为 0.62、0.63 和 0.61);然而,在原核生物大肠杆菌中成团泛菌来源基因的 CAI 值(分别为 0.82、0.82 和 0.81)均高于红法夫酵母来源基因的 CAI 值(分别为 0.68 和 0.70)(表 5)。

表 5 密码子适应指数分析

Table 5 Analysis of Codon Adaptation Index

Genes	CAI-1 ^a	CAI-2 ^b
<i>X. dendrorhous</i>		
<i>XdCrtBY</i>	0.68	0.68
<i>XdCrtI</i>	0.69	0.70
<i>P. agglomerans</i>		
<i>pagCrtB</i>	0.62	0.82
<i>pagCrtI</i>	0.63	0.82
<i>pagCrtY</i>	0.61	0.81

^aCAI-1, Codon adaption index, *S. cerevisiae* codon usage database as a reference set^[20]; ^bCAI-2, Codon adaption index, *Escherichia coli* codon usage database as a reference set^[20].

3 讨论

萜类化合物在自然界广泛存在, 目前发现的萜类就超过 5 万多种^[21], 其中大部分是药用植物中的活性成分。由 4 个 IPP 单元组成的 GGPP 能在各种二萜环合酶的作用下, 生产多样的二萜类化合物。功能基因组分析结合工程菌构建生产目标产品已经被广泛用于天然产物的生物合成途径解析和产物合成, 如次丹参酮二烯^[8-9]、齐墩果酸^[22-23]和原人参二醇^[11,24]等。HMGR 是酵母 MVA 途径中的第一个关键酶, 提高其编码基因 *HMGI* 的表达水平能显著提高整个萜类的生物合成通量^[8-9,11,15,25]。编码 GGPS 酶的 *BTSI* 基因是酵母合成二萜类产物的另一关键酶, 在工程菌中一般过表达 *BTSI* 基因能提高二萜合成分支的代谢通量^[9,13]。本研究通过对 *tHMGI* 基因和 *SaGGPS* 基因的过表达调控, 构建了底盘酿酒酵母细胞 BY4742-T2。其能显著提高胞内 GGPP 的供给, 不仅可以作为构建高

产二萜化合物和类胡萝卜素化合物的出发菌, 而且能作为底盘细胞, 用于解析新二萜化合物的生物合成途径。

在高产 GGPP 的底盘酿酒酵母细胞中引入红法夫酵母 β -胡萝卜素合成途径后, β -胡萝卜素和番茄红素的含量比引入成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径的要高 39.0 倍和 6.7 倍, 表明红法夫酵母 β -胡萝卜素合成途径在酿酒酵母中的活性更高。然而, 在大肠杆菌中引入成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径能获得很高的 β -胡萝卜素的产量 (60 mg/g)^[6], 这种差异可能是由于来源于原核生物的基因在真核生物中存在密码子使用的偏好性问题, 使其不能很好地表达^[18-19]。对各基因的密码子适应指数 (CAI 值) 进一步分析发现, 成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径基因在真核生物酿酒酵母中的 CAI 值 (平均值 0.62) 均低于红法夫酵母来源基因 (平均值 0.69), 但在原核生物大肠杆菌中有较高的 CAI 值, 平均值为 0.82, 结果提示红法夫酵母来源基因可能更容易在酿酒酵母中表达, 而成团泛菌来源基因更适于在大肠杆菌中表达^[16]。另一方面, 红法夫酵母的 *XdCrtBY* 是一个双功能酶, 其能使上一步反应的底物更快地结合到第二个酶的催化位点, 加快第二个反应的进行, 从而在空间上更有利于两个催化反应的进行^[9,26]。

与前人的研究结果比较, 本研究获得的工程菌生产 β -胡萝卜素能力低于 Verwaal 等在酿酒酵母 CEN.PK 中构建的工程菌^[13]。可能原因是 Verwaal 等应用了不同遗传改造策略: 如过表达红法夫酵母来源的 *CrtE* 基因和进一步增加了 *CrtI* 基因的拷贝数等^[13]; 另外, 不同的酿酒酵母细胞株系合成萜类的能力也存在区别, CEN.PK 株系可能有较强的合成萜类化合物前

体的能力^[2,27]。

本研究构建的酿酒酵母工程菌为发酵生产 β -胡萝卜素提供了良好的菌株基础。下一步拟采用密码子优化来提高成团泛菌 β -胡萝卜素合成途径的基因在酿酒酵母中的表达强度。同时,还将在酿酒酵母中测试更多不同真核与原核生物的 β -胡萝卜素合成途径,挖掘出更合适酿酒酵母的 β -胡萝卜素合成基因。

REFERENCES

- [1] Ukibe K, Hashida K, Yoshida N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(22): 7205–7211.
- [2] Li Q, Sun Z, Li J, et al. Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 345(2): 94–101.
- [3] Lodato P, Alcaino J, Barahona S, et al. Alternative splicing of transcripts from crtI and crtYB genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4676–4682.
- [4] Yoo JJ, Choi SP, Kim BW, et al. Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototrophic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35(1/2): 309–315.
- [5] Zhao J, Liu Y, Li QY, et al. Modulation of isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts for improved beta-carotene production. *Chin J Biotech*, 2013, 29(1): 41–55 (in Chinese).
赵婧, 刘怡, 李清艳, 等. 多个调控元件调控萜类合成途径基因表达提高 β -胡萝卜素的生产. *生物工程学报*, 2013, 29(1): 41–55.
- [6] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving beta-carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50.
- [7] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528–532.
- [8] Dai Z, Liu Y, Huang L, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(11): 2845–2853.
- [9] Zhou YJ, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(6): 3234–3241.
- [10] Sydor T, Schaffer S, Boles E. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(10): 3361–3363.
- [11] Dai Z, Liu Y, Zhang X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng*, 2013, 20: 146–156.
- [12] Yamano S, Ishii T, Nakagawa M, et al. Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(6): 1112–1114.
- [13] Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, et al. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(13): 4342–4350.
- [14] Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 1998, 14(2): 115–132.
- [15] Dai Z, Cui G, Zhou SF, et al. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation. *J Plant Physiol*, 2011, 168(2): 148–157.
- [16] Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol Direct*, 2008, 3: 38.

- [17] Shao Z, Zhao H. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): e16.
- [18] Quan J, Saaem I, Tang N, et al. Parallel on-chip gene synthesis and application to optimization of protein expression. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(5): 449–452.
- [19] Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(3): 1281–1295.
- [20] Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 292.
- [21] Chang MC, Keasling JD. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(12): 674–681.
- [22] Dai Z, Wang B, Liu Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast. *Sci Rep*, 2014, 4: 3698.
- [23] Carelli M, Biazzi E, Panara F, et al. *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins. *Plant Cell*, 2011, 23(8): 3070–3081.
- [24] Han JY, Kim HJ, Kwon YS, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2062–2073.
- [25] Sun MX, Liu JD, Du GH, et al. Regulation of isoprenoid pathway for enhanced production of linalool in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(6): 751–759 (in Chinese).
孙明雪, 刘继栋, 堵国成, 等. 调控酿酒酵母类异戊二烯合成途径强化芳樟醇合成. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 751–759.
- [26] Tokuhiro K, Muramatsu M, Ohto C, et al. Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(17): 5536–5543.
- [27] Daum G, Tuller G, Nemeč T, et al. Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast*, 1999, 15(7): 601–614.

(本文责编 郝丽芳)