

岩藻黄质关键前体新黄质的代谢工程合成

张桂林¹, 张亚亭¹, 姜 宏¹, 刘 振¹, 毛相朝^{1,2}

1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 岩藻黄质是海洋藻类中常见的叶黄素之一, 尤其在褐藻中含量较高, 具有抑菌、抗炎、抗肥胖、抗糖尿病、抗肿瘤、调节肠道菌群和抗器官纤维化等多种生理活性。新黄质是岩藻黄质的可能前体物质, 首次在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中构建新黄质合成途径, 首先构建了 pTrc99a-crtEBIYZ 质粒, 该质粒携带 5 个来自于菠萝泛菌 (*Pantoea ananatis*) 的基因 *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY* 和 *crtZ*, 编码的蛋白分别是牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶、八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素脱氢酶、番茄红素环化酶和 β -胡萝卜素羟化酶。将该质粒转入大肠杆菌中, 得到了产玉米黄质的工程菌 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ, 玉米黄质产量 (细胞干质量, 下同) 为 $0.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。以产玉米黄质工程菌为宿主, 将来自三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 的 ZEP3 基因去信号肽之后转入, 得到产紫黄质的工程菌 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3。在紫黄质工程菌 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3 的基础上转入新黄质合酶基因 NSY, 成功获得了产新黄质的工程菌 *E. coli* BL21 NEO, 新黄质产量为 $99.27 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 紫黄质产量为 $150.30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 玉米黄质产量为 $119.77 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

关键词: 大肠杆菌; 岩藻黄质; 玉米黄质; 紫黄质; 新黄质; 代谢工程

中图分类号: Q 812

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Metabolic engineering synthesis of neoxanthin, a key precursor of fucoxanthin

ZHANG Guilin¹, ZHANG Yating¹, JIANG Hong¹, LIU Zhen¹, MAO Xiangzhao^{1,2}

1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China

Abstract: Fucoxanthin is one of the common luteins in marine algae, especially in brown algae, which has antibacterial, anti-inflammatory, anti-obesity, anti-diabetes, anti-cancer, regulating intestinal flora, anti-organ fibrosis and other physiological activities. Neoxanthin is a possible precursor of fucoxanthin. In this paper, we constructed a neoxanthin synthesis pathway in *Escherichia coli* for the first time and the plasmid pTrc99a-crtEBIYZ, which carries five genes (*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* and *crtZ*) from *Pantoea ananatis*, and codes for proteins (geranylgeranyl pyrophosphate synthase, phytoene synthase, lycopene cyclase and β -carotene hydroxylase). We transferred the plasmid into *E. coli*, and obtained the zeaxanthin-producing *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ. The yield of zeaxanthin (dry cell mass) was $0.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. We obtained *E. coli* pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3 strain by transferring ZEP3 gene from *Phaeodactylum tricornutum* without signal peptide, and obtained *E. coli* BL21 NEO successfully by transferring the neoxanthin synthase gene NSY into *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3. The

收稿日期: 2021-10-29; 修回日期: 2022-01-14

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD0901904)

作者简介: 张桂林 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物代谢工程。E-mail: 2571258329@qq.com

通信作者: 刘 振 (1981—), 男, 副教授, 博士, 从事海洋食品合成生物学研究。E-mail: liuzhenyq@ouc.edu.cn

concentrations of neoxanthin, violaxanthin and zeaxanthin were 99.27, 150.30 and 119.77 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry cell mass, respectively.

Keywords: *Escherichia coli*; Fucoxanthin; Zeaxanthin; Violaxanthin; Neoxanthin; Metabolic engineering

岩藻黄质是一种类胡萝卜素，在自然界中分布广泛，主要存在于藻类、贝类中，尤其在褐藻、硅藻中含量较高。岩藻黄质可以与叶绿素、蛋白质形成捕光复合体，是硅藻中发挥捕光作用的重要化合物^[1]。目前有关岩藻黄质活性的报道较多，研究表明岩藻黄质具有抑菌、抗炎、抗肥胖、抗糖尿病、抗肿瘤、调节肠道菌群和抗器官纤维化等生理活性^[2-6]。

目前岩藻黄质的最主要来源依旧是海藻^[7]，例如海带 (*Laminaria japonica*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)^[8]。岩藻黄质是一种优质的海洋来源功能因子，但由于其合成途径目前尚未得到完全解析，其生产及产量调控尚缺乏理论依据^[9-12]，合成生物学是发掘未知合成途径的重要手段，通常需要首先在微生物中异源构建目标化合物的上游已知中间物的合成途径，然后利用合成该中间物的工程菌株探索下游未知途径^[13]。目前已知合成途径且结构上最接近岩藻黄质的中间物是新黄质^[14]。作为岩藻黄质的可能前体物质，新黄质的结构与岩藻黄质很相似(图1)，两者均含有1条多烯链，2个六元环和1个累积双键，但存在着双键、羟基和羰基、乙酰氧基的区别。

新黄质的合成途径见图2。甲羟戊酸(MVA)途径主要存在于真核生物、古生菌和植物的细胞质中，甲基赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径主要存在于

细菌和植物叶绿体中，丙酮酸、甘油醛-3-磷酸和乙酰辅酶A分别通过MEP途径和MVA途径生成MEP和MVA，再经由其他酶催化生成异戊烯焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)^[15-17]。大肠杆菌中含有MEP途径，并有法尼基焦磷酸(FPP)可以作为岩藻黄质的底物^[15,18]。

目前尚未见以微生物宿主生产新黄质的报道，因此构建合成新黄质的微生物细胞工厂成为发掘岩藻黄质的未知途径，并进一步成为海藻高效生产岩藻黄质提供理论依据的关键环节。本研究以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为宿主，按照代谢途径逐步构建番茄红素、 β -胡萝卜素、玉米黄质、紫黄质的合成途径，最终实现了新黄质的代谢工程合成，为进一步发掘岩藻黄质合成的未知途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

1.1.1 菌株及质粒

本文所用菌株的基因型、功能及来源见表1，质粒的基因型、功能及来源见表2。

1.1.2 生化试剂及药品

番茄红素标准品、 β -胡萝卜素标准品、玉米黄质标准品、紫黄质标准品和新黄质标准品购于Sigma-Aldrich公司。高保真DNA聚合酶试剂Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、DNA聚合酶试剂

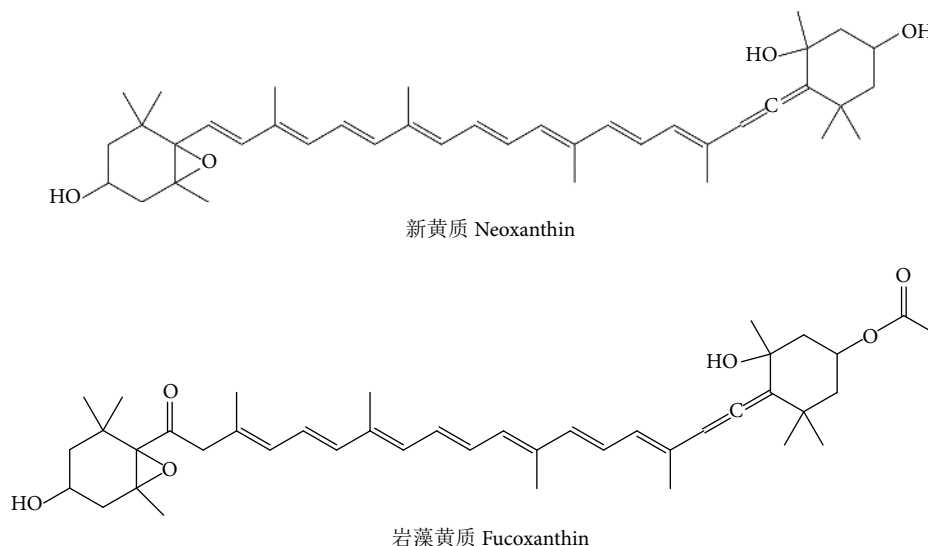


图1 新黄质与岩藻黄质的结构式

Fig. 1 Structural formula of neoxanthin and fucoxanthin

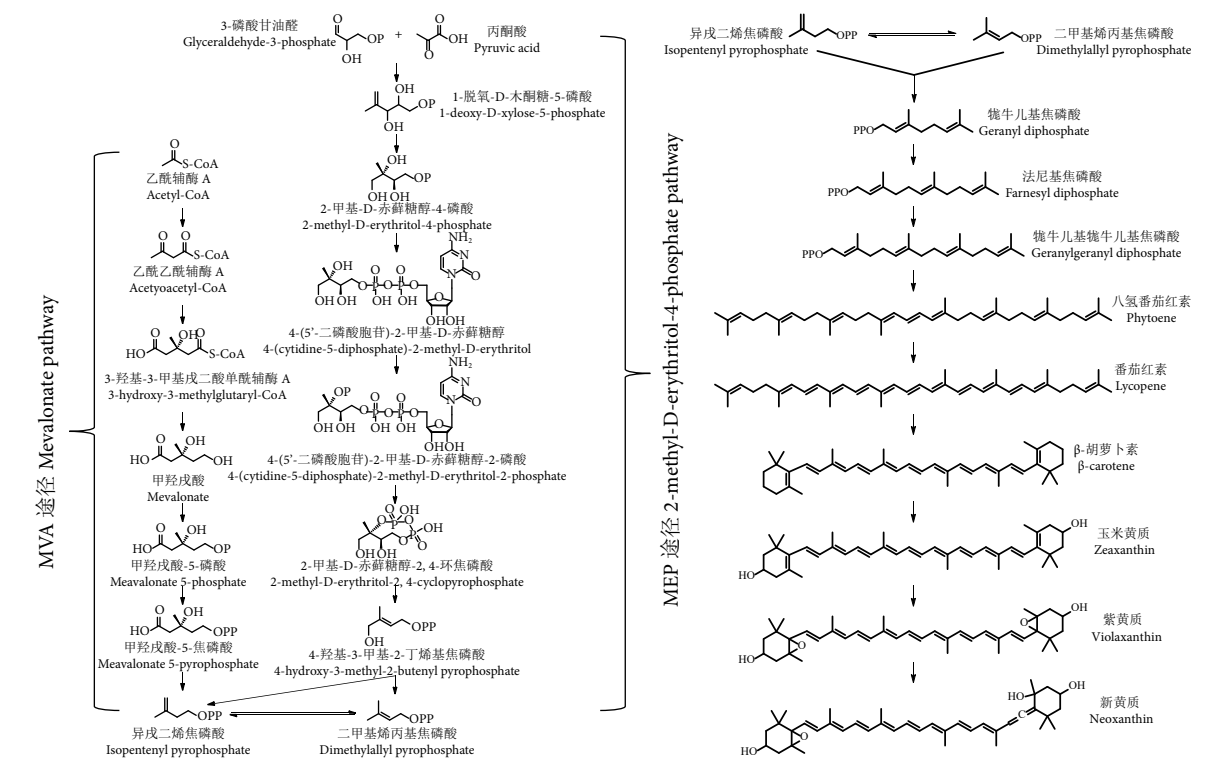


图2 新黄质合成途径

Fig. 2 Synthetic pathway of neoxanthin

表1 本文所用菌株

Table 1 Strains in this study

菌株 Strain	基因型 Genotype	功能 Function	来源 Source
Trelief TM 5α化学感受态细胞 Trelief TM 5α Chemically competent cell	F ⁻ , ϕ80d ^{lacZ} Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	质粒克隆	擎科生物
BL21 (DE3) 化学感受态细胞 BL21 (DE3) Chemically competent cell	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	高效表达	擎科生物
菠萝泛菌 <i>Pantoea ananatis</i>	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ</i>	获取 <i>crtE</i> 、 <i>crtB</i> 、 <i>crtI</i> 、 <i>crtY</i> 和 <i>crtZ</i> 基因	中国工业微生物菌种保藏管理中心
<i>E. coli</i> BL21 pTrc99a-crtEBI	<i>lacI</i> , P _{trc} - <i>crtE</i> - <i>crtB</i> - <i>crtI</i> -T _{rrnB} , <i>AmpR</i>	生产番茄红素	本实验构建
<i>E. coli</i> BL21 pTrc99a-crtEBIY	<i>lacI</i> , P _{trc} - <i>crtE</i> - <i>crtB</i> - <i>crtI</i> - <i>crtY</i> -T _{rrnB} , <i>AmpR</i>	生产β-胡萝卜素	本实验构建
<i>E. coli</i> BL21 pTrc99a-crtEBIYZ	<i>lacI</i> , P _{trc} - <i>crtE</i> - <i>crtB</i> - <i>crtI</i> - <i>crtY</i> - <i>crtZ</i> -T _{rrnB} , <i>AmpR</i>	生产玉米黄质	本实验构建
<i>E. coli</i> BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3	<i>lacI</i> , P _{trc} - <i>crtE</i> - <i>crtB</i> - <i>crtI</i> - <i>crtY</i> - <i>crtZ</i> -T _{rrnB} , P _{T7} -QZEP3-T _{T7} , <i>AmpR</i> , <i>CmR</i>	生产紫黄质	本实验构建
<i>E. coli</i> BL21 NEO	<i>lacI</i> , P _{trc} - <i>crtE</i> - <i>crtB</i> - <i>crtI</i> - <i>crtY</i> - <i>crtZ</i> -T _{rrnB} , P _{T7} -QZEP3-NSY-T _{T7} , <i>AmpR</i> , <i>CmR</i>	生产新黄质	本实验构建

注: *crtE*. 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因; *crtB*. 八氢番茄红素合成酶基因; *crtI*. 八氢番茄红素脱氢酶基因; *crtY*. 番茄红素环化酶基因; *crtZ*. β-胡萝卜素羟化酶基因; *ZEP3*. 玉米黄质环氧化酶基因; *QZEP3*. 去除叶绿体转运肽的玉米黄质环氧化酶基因; *NSY*. 新黄质合酶基因; 后表同此。

Note: *crtE*. The gene of Geranylgeranyl diphosphate synthase; *crtB*. The gene of phytoene synthase; *crtI*. The gene of phytoene desaturase; *crtY*. The gene of Lycopene cyclase; *crtZ*. The gene of β-carotene hydroxylase; *ZEP3*. The gene of zeaxanthin epoxidase; *QZEP3*. The gene of zeaxanthin epoxidase without chloroplast transport peptide; *NSY*. The gene of neoxanthin synthase. The same case below.

2×Taq Master Mix (Dye Plus)、重组克隆试剂 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 购于诺唯赞生物公司。凝胶萃取试剂盒 E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit 购于 Omega Bio-Tek 公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、快速质粒小提试剂盒购于天根生化科技公司。酵母粉、蛋白胨、琼脂粉、氨苄青霉素、氯

表2 本文所用质粒
Table 2 Plasmids in this study

质粒 Plasmid	基因型 Genotype	功能 Function	来源 Source
pTrc99a	<i>lacI</i> , P_{trc} - T_{rrnB} , <i>AmpR</i>	载体	本实验室
pTrc99a-crtEBI	<i>lacI</i> , P_{trc} -crtE-crtB-crtI- T_{rrnB} , <i>AmpR</i>	在 <i>E. coli</i> BL21中生产番茄红素	本实验构建
pTrc99a-crtEBIY	<i>lacI</i> , P_{trc} -crtE-crtB-crtI-crtY- T_{rrnB} , <i>AmpR</i>	在 <i>E. coli</i> BL21中生产 β -胡萝卜素	本实验构建
pTrc99a-crtEBIYZ	<i>lacI</i> , P_{trc} -crtE-crtB-crtI-crtY-crtZ- T_{rrnB} , <i>AmpR</i>	在 <i>E. coli</i> BL21中生产玉米黄质	本实验构建
pACYCDuet-1	<i>lacI</i> , P_{T7} - T_{T7} , <i>CmR</i>	载体	本实验室
pACYCDuet-1-ZEP3	<i>lacI</i> , P_{T7} -ZEP3- T_{T7} , <i>CmR</i>	在 <i>E. coli</i> BL21中生产紫黄质	本实验构建
pACYCDuet-1-QZEP3	<i>lacI</i> , P_{T7} -QZEP3- T_{T7} , <i>CmR</i>	在 <i>E. coli</i> BL21中生产紫黄质	本实验构建
pACYCDuet-1-QZEP3-NSY	<i>lacI</i> , P_{T7} -QZEP3-NSY- T_{T7} , <i>CmR</i>	在 <i>E. coli</i> BL21中生产新黄质	本实验构建

霉素购于索莱宝科技公司。SSCS Solution 感受态制备液购于上海捷瑞生物公司。其他试剂及药品未作特殊说明均为国药化试分析纯。PCR 引物合成及测序由青岛擎科公司提供。

1.1.3 试剂及培养基配方

LB 培养基：0.5% 酵母粉，1% 蛋白胨，1% 的氯化钠 (NaCl，固体培养基中加入 2% 琼脂粉)，115 ℃ 灭菌 30 min。

ZYP-5052 培养基：0.5% 酵母粉，1% 蛋白胨，8.1 g·L⁻¹ 磷酸氢钠 (Na₂HPO₄)，6.8 g·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)，3.3 g·L⁻¹ 磷酸铵 [(NH₄)₂SO₄]，0.2% 的 0.5 mol·L⁻¹ 硫酸镁 (MgSO₄)，2% 的 50×5052 母液 (50×5052 母液：25% 甘油，2.5% 葡萄糖，10% 的 α -乳糖)，115 ℃ 灭菌 30 min。

氨苄青霉素溶液：溶剂为水，在培养基中使用的终质量浓度为 100 μ g·mL⁻¹。

氯霉素溶液：溶剂为乙醇，在培养基中使用的终质量浓度为 25 μ g·mL⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 DNA 目的片段 PCR 扩增

考虑到一个质粒上需要加入多个目的片段，为了保证每个片段能够正确表达，本研究在构建质粒的过程中会在 2 个目的片段的中间加入一段核糖体结合位点 (RBS)。在 NCBI 查找了菠萝泛菌中 *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ* 目的片段的 CDS 序列^[19]。设计引物见表 3，从菠萝泛菌基因组中通过 PCR 扩增得到了这 5 个基因。*ZEP3* 基因来自三角褐指藻^[20]，*NSY* 基因来源于番茄^[21]，由华大基因全基因合成。

1.2.2 质粒的构建

同源重组法构建质粒：利用高保真 DNA 聚合

表3 引物序列
Table 3 Primer sequence

引物名称 Primer	序列 (5'—3') Sequence (5'—3')
crtE-F	CCGGAATTCATGACGGTCTGCGCAAAA
crtE-R	TCCCCCGGGTTAACTGACGGCAGCGAG
crtB-F	TCCCCCGGGCAGGAACAGATGAATAATCCGTCGTTA
crtB-R	CTAGTCTAGACTAGAGCGGGCGCTGCCA
crtI-F	CTAGTCTAGACAGGAACAGATGAAACCAACTACGGTA
crtI-R	CCCAAGCTTTCATATCAGATCCTCCAG
crtY-F	GAGGATCTGATATGAAAGCTTCACAGGAAACA GACCATGCAACCGCATTAT
crtY-R	GGTCTGTTTCCTGTGTTAACGATGAGTCGT
crtZ-F	CACAGGAAACAGACCATGTTGTGGATTG
crtZ-R	TCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTTACTTCCCGG ATGCGG
ZEP3-F	CACCACAGCCAGGATCCTATGAGTGAAGAAAA AGTGGA
ZEP3-R	TGCGGCCCGCAAGCTTTTACAGGCCTGCTGC
NSY-F	AGATATACATATGGCAGATCTATGGAAACCCT GCTGAAAC
NSY-R	GGTTTCTTTACCAGACTCGAGTTACAGGCTTTC AATTGC

酶 PCR 扩增目的基因片段与质粒片段，使得各片段连接处留有 15~20 bp 同源序列，使用重组克隆试剂进行重组连接，将重组产物转入 *E. coli* Tre-lief™5 α 感受态中，涂布至对应抗生素的 LB 固体培养基上。12 h 后对固体培养基上生长的转化子进行菌落 PCR 验证并选取样品进行测序。LB 培养基培养测序正确的菌株，使用快速质粒小提试剂盒提取质粒。

1.2.3 工程菌的构建

单质粒工程菌的构建: 将 pTrc99a-crtEBI、pTrc99a-crtEBIY 和 pTrc99a-crtEBIYZ 质粒分别利用热激法直接转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中。

双质粒工程菌的构建: 将 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ 工程菌制备成感受态细胞, 再利用热激法将 pACYCDuet-1-QZEP3、pACYCDuet-1-QZEP3-NSY 质粒转入。感受态制备方法为: 将需制成感受态的菌株在 LB 培养基中培养 4~5 h (OD_{600} 达到 0.6 左右), 取菌液在 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min, 弃上清后加入 10% 原菌液体积的 10% 无菌甘油洗涤菌体, 再次离心弃上清, 再重复一次甘油洗涤和离心弃上清, 加入 2% 原菌液体积的 SSCS Solution 感受态制备液, 即得到感受态细胞。

1.2.4 工程菌株的发酵培养

将工程菌在含有对应抗生素的 LB 固体培养基上培养, 再挑取菌落在含有抗生素的 LB 培养基中培养 12 h, 得到种子液。按 2% 接菌量将种子液接入 50 mL ZYP-5052 培养基, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 发酵 48 h。

1.2.5 产物提取

大肠杆菌类胡萝卜素提取^[22]: 取 2.0 mL 的菌液, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 留菌体, 加入 1 mL 丙酮, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 萃取至菌体颜色全部变成白色, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min 留丙酮上清。萃取液采用氮吹法进行吹干, 获得类胡萝卜素产物, 用 200 μL 丙酮复溶, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙滤膜去除杂质, 得到待检测样品。

1.2.6 高效液相色谱 (HPLC) 和质谱法 (MS) 对产物的鉴定及定量分析

C30 检测方法^[23]: 使用 YMC Carotenoid 类胡萝卜素分析色谱柱 ($250\times 4.6\text{ mm}$) 对提取产物进行分析, 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$, 吸光值 476 nm , 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。具体的液相检测条件见表 4。用该方法绘制标准曲线 [y 为峰面积, x 为质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)]。番茄红素: $y=52.505x-1.670\,7$, $R^2=0.999$; β -胡萝卜素: $y=1\,312.9x-12.668$, $R^2=0.999$; 玉米黄质: $y=129.92x-39.204$, $R^2=0.999$; 紫黄质: $y=130.76x-33.414$, $R^2=0.999$ 。

上述 C30 色谱柱检测方法无法分离紫黄质和新黄质, 所以我们采用了另一种 C18 检测方法来达到分离目的。C18 检测方法^[24]: 使用 C18 ($250\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱检测, 流动相是 $V(\text{乙腈}): V(\text{乙酸乙酯}): V(\text{水})=74:16:10$, 采用等度洗

表4 YMC Carotenoid流动相条件

Table 4 YMC Carotenoid mobile phase conditions

t/min	甲醇比例 Methanol proportion/%	甲基叔丁醚比例 Methyl tertiary butyl ether/%
0	90	10
15	90	10
25	40	60
35	90	10

脱, 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$, 吸光值 440 nm , 柱温 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。用该方法绘制标准曲线 [y 为峰面积, x 为质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)]。紫黄质: $y=76.889x-140.93$, $R^2=0.997$; 新黄质: $y=357.07x+2.392$, $R^2=0.991$ 。

四极杆飞行时间质谱条件: 离子源为电喷雾电离源 (ESI); 电离化方式为 ESI^+ ; 毛细管温度为 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; 雾化器压力为 276 kPa ; 干燥气流速为 $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 扫描范围为 $m/z\ 20\sim 1\,000$ 。

1.2.7 细胞干质量的测量方法

取 2 mL 发酵后的菌液, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 置于 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干 24 h, 测量细胞干质量^[25]。根据产物浓度与细胞干质量, 计算出产量单位 (细胞干质量, 下同) 为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄质工程菌的构建

质粒 pTrc99a-crtEBI、pTrc99a-crtEBIY 和 pTrc99a-crtEBIYZ 成功转入 *E. coli* BL21 后, 对应的工程菌 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBI、*E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIY 和 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ 发酵后菌体发生了颜色变化, 对菌体内物质进行 HPLC 分析 (图 3), 结果表明成功产出了番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄质。根据标准曲线及细胞干质量计算出各产物浓度, 其中 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBI 的番茄红素产量为 $3.20\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIY 的 β -胡萝卜素产量为 $1.35\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ 的玉米黄质产量为 $0.70\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

在 T7 启动子的作用下, 基因 *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY* 和 *crtZ* 成功表达, 产出目标产物。根据 HPLC 结果, *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIY 和 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ 中并没有发现中间产物的积累, 可能原因是产物浓度较低, CRTI、CRTY 和 CRTZ 蛋白水平相较于低浓度产物来说催化能力较强, 导

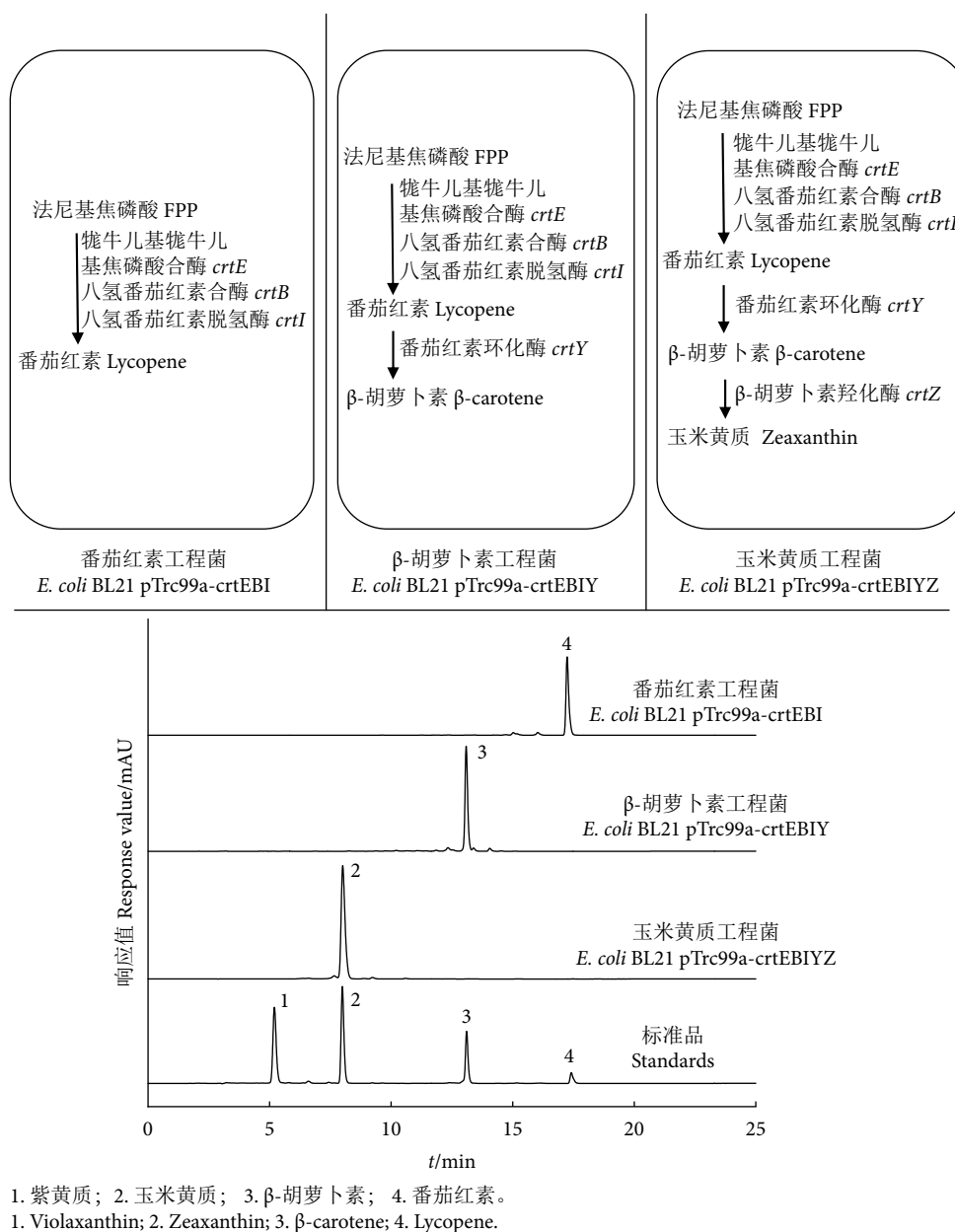


图3 番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄质工程菌的构建

Fig. 3 Construction of lycopene, β -carotene and zeaxanthin engineered bacteria

致没有中间产物的积累,也可能与菌株本身以及生长状况有关,不同菌株在不同生长状况下产物积累量存在差异。

2.2 紫黄质和新黄质工程菌株的构建

以产玉米黄质的菌株 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtE-BIYZ 为宿主菌株,转入 pACYCDuet-1-ZEP3 质粒,构建产紫黄质菌株 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtE-BIYZ pACYCDuet-1-ZEP3。但 HPLC 检测结果显示并无紫黄质产生。分析原因可能为 ZEP3 基因来源于三角褐指藻,是真核生物来源的基因,可能存在信号肽或叶绿体转运肽的编码区,但原核生物无法实现真核生物对蛋白的加工,导致蛋白折叠错误,

使活性减弱甚至消失。

因此利用网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> 预测叶绿体转运肽,预测前 54 个氨基酸为 cTP 区域。去除 ZEP3 基因的 cTP 后得到 QZEP3,重新构建 pACYCDuet-1-QZEP3 质粒再转入产玉米黄质的工程菌中,HPLC 分析菌体内产物有紫黄质存在(图 4),进一步证实了以上猜想。

根据标准曲线及细胞干质量计算出产物浓度,*E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3 的紫黄质的产量为 $114.70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,玉米黄质产量为 $289.45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。该工程菌中不仅有紫黄质生成,还有 β -胡萝卜素和玉米黄质中间产物的积累,但并

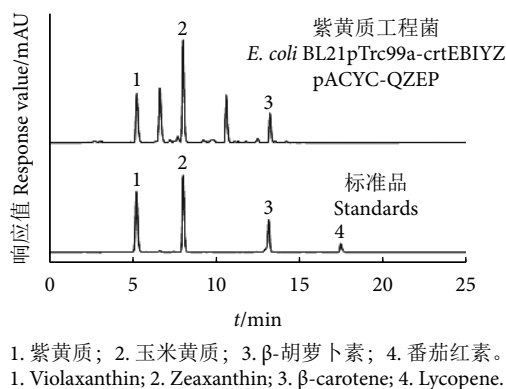


图4 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3 工程菌发酵产物HPLC结果

Fig. 4 HPLC results of fermentation products of *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3

未检测到番茄红素的积累, 可能原因是 QZEP3 的蛋白水平并不高, 使得玉米黄质有较多积累, 而番茄红素和 β-胡萝卜素的积累可能与菌株生长状况相关, 在不同生长状况下产物积累量存在差异, 致使菌体内存在中间产物的积累。进一步分析 HPLC 结果, 该工程菌不仅产出预期的 β-胡萝卜素、玉米黄质和紫黄质, 还有未知的产物 (保留时间 6.2 和 10.6 min) 被检测到, 猜测可能是 QZEP3 催化玉米黄质生成紫黄质时还生成了中间体产物。

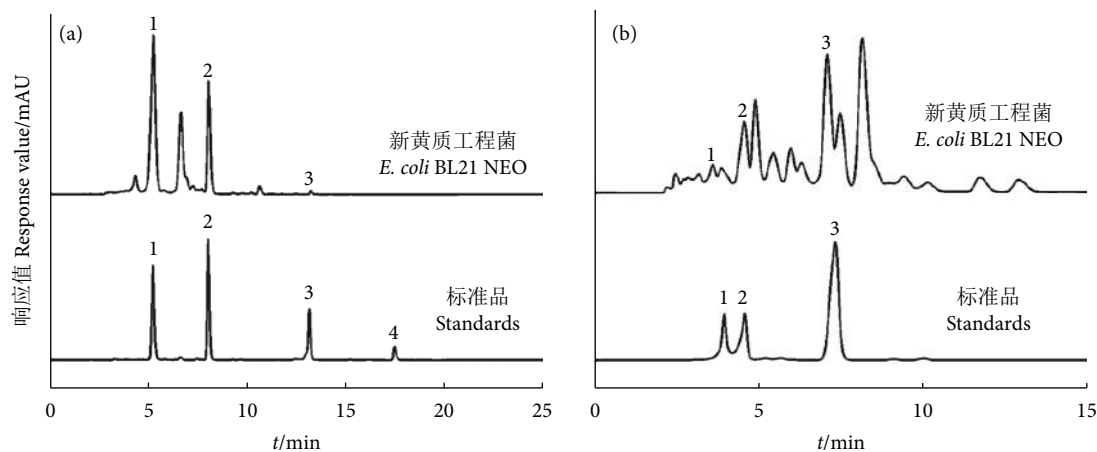
以产紫黄质的菌株 *E. coli* BL21 pTrc99a-crtEBIYZ pACYCDuet-1-QZEP3 为宿主菌株, 转入 pACYCDuet-1-QZEP3-NSY 质粒, 构建产新黄质菌株 *E. coli* BL21 NEO。用 C30 和 C18 色谱柱的方法对 *E. coli* BL21 NEO 菌体内产物进行检测 (图 5)。紫黄质与新黄质是同分异构体, 分子式为 $C_{40}H_{56}O_4$,

分子量为 600.417 9。*E. coli* BL21 NEO 中的新黄质和紫黄质质谱结果 (图 6) 显示, 新黄质对应分子离子峰的 m/z 为 600.414 6, 紫黄质对应分子离子峰的 m/z 为 600.413 8, 这与紫黄质和新黄质分子量基本相当。HPLC 与 MS 结果表明 *E. coli* BL21 NEO 成功产出新黄质。根据标准曲线及细胞干质量计算出各产物浓度, 其中新黄质的产量为 $99.27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 紫黄质的产量为 $150.30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 玉米黄质的产量为 $119.77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。*E. coli* BL21 NEO 不仅产出预期的新黄质, 还有 β-胡萝卜素、玉米黄质和紫黄质的积累, 也有未知的中间体产物生成。

本文以产玉米黄质的工程菌为宿主, 并将 QZEP3 和 NSY 导入, 实现了新黄质的合成, 但是 QZEP3 和 NSY 基因导入后的紫黄质和新黄质产量浓度不高, 可能是上游途径的底物含量少, 酶的催化效果不高, 后续可以通过理性设计或定向进化对 QZEP3 和 NSY 进行改造, 提高 QZEP3 和 NSY 在大肠杆菌中的活性来提高紫黄质和新黄质的产量, 或者通过更换启动子, 调节 MEP 上游通路途径, 基因的过表达等方法^[26-29], 进一步提升紫黄质和新黄质的产量。

3 结论

本文以大肠杆菌为表达菌株, 进行了新黄质合成途径的构建。以含有 crtEBIYZ 基因的产玉米黄质的 *E. coli* BL21 为宿主, 引入了 QZEP3 和 NSY 基因, 成功在大肠杆菌中建立了新黄质合成途径。有



a. C30 液相柱条件下检测结果: 1. 紫黄质和新黄质; 2. 玉米黄质; 3. β-胡萝卜素; 4. 番茄红素;

b. C18 液相柱条件下检测结果: 1. 新黄质; 2. 紫黄质; 3. 玉米黄质。

a. Test results under C30 liquid column conditions: 1. Violaxanthin or neoxanthin; 2. Zeaxanthin; 3. β-carotene; 4. Lycopene;

b. Test results under C18 liquid column condition: 1. Neoxanthin; 2. Violaxanthin; 3. Zeaxanthin.

图5 *E. coli* BL21 NEO工程菌HPLC检测结果

Fig. 5 Detection of *E. coli* BL21 NEO by HPLC

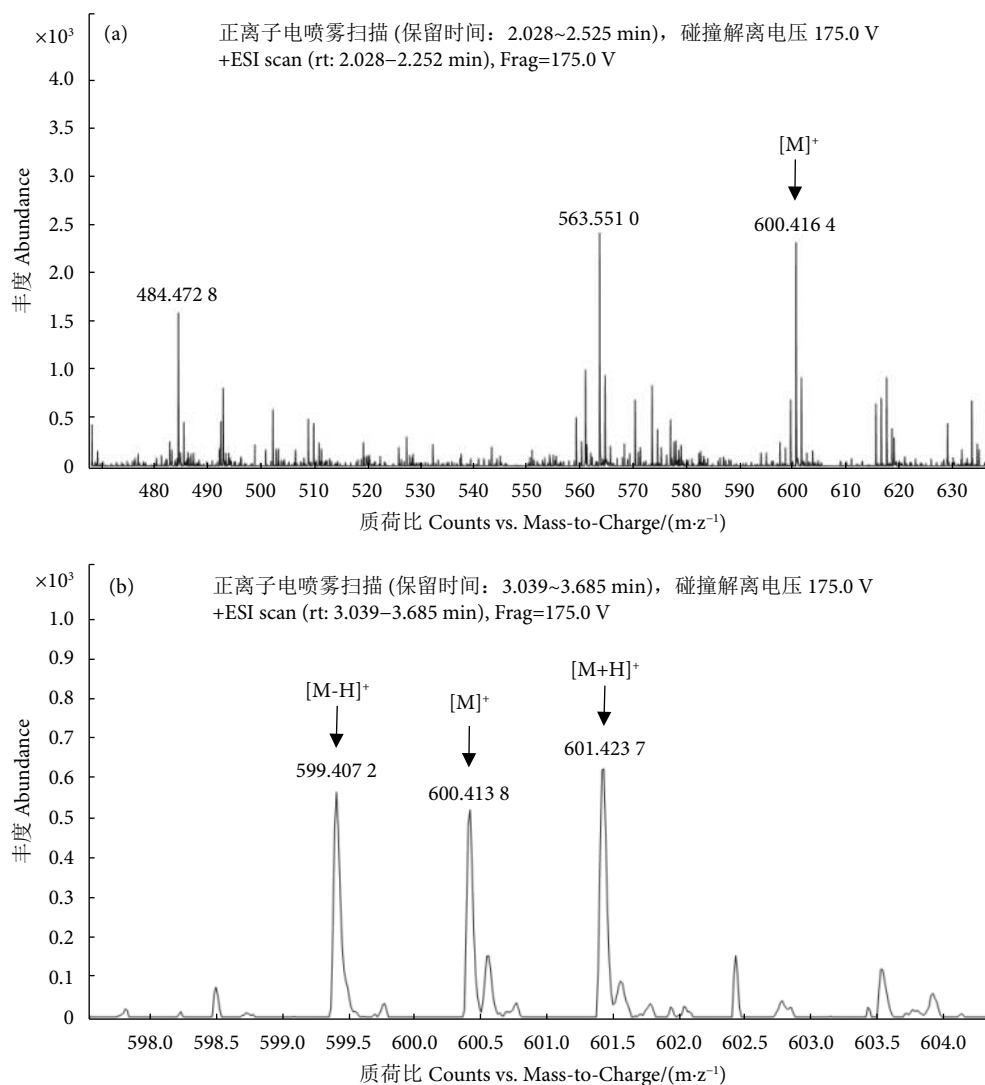


图6 *E. coli* BL21 NEO工程菌新黄质 (a) 和紫黄质 (b) 的质谱检测结果

Fig. 6 Detection results of neoxanthin (a) and violaxanthin (b) in *E. coli* BL21 NEO by MS

关新黄质本身的生理活性研究并不多^[30-32], 以微生物生产新黄质可提供新的生产途径, 为研究新黄质的生理活性等提供便利, 也为进一步探究岩藻黄质的合成途径奠定了基础。岩藻黄质的合成途径可以指导褐藻等海藻中岩藻黄质等物质的高值化利用, 如通过理性设计改造获得高产岩藻黄质的藻类。

参考文献:

- [1] GELZINIS A, BUTKUS V, SONGAILA E, et al. Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1847(2): 241-247.
- [2] KARPINSKI T M, ADAMCZAK A. Fucoxanthin-an antibacterial carotenoid[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 1-8.
- [3] MIYASHITA K, HOSOKAWA M. Fucoxanthin in the management of obesity and its related disorders[J]. *J Funct Foods*, 2017, 36: 195-202.
- [4] WANG J, MA Y H, YANG J S, et al. Fucoxanthin inhibits tumour-related lymphangiogenesis and growth of breast cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3): 2219-2229.
- [5] XIAO H, ZHAO J R, FANG C, et al. Advances in studies on the pharmacological activities of fucoxanthin[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(12): 1-20.
- [6] YE G L, WANG L L, YANG K, et al. Fucoxanthin may inhibit cervical cancer cell proliferation via downregulation of HIST1H3D[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(10): 1-14.
- [7] GUO B B, LIU B, YANG B, et al. Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer[J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(7): 1-14.
- [8] WU H L, LI T, WANG G H, et al. A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricornutum* strains from different origins[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2016, 34(2): 391-398.
- [9] 王丽娟. 三角褐指藻富含岩藻黄质突变株的高通量筛选及评价[D]. 青岛: 青岛大学, 2018: 3-5.
- [10] 章丽, 龚一富, 朱帅旗, 等. 乙酰水杨酸对三角褐指藻岩藻黄质

- 含量的影响及其分子机理研究[J]. 核农学报, 2020, 34(7): 1432-1439.
- [11] 张南南, 罗玲, 陈卓, 等. 三角褐指藻岩藻黄素合成途径及其关键基因对高光照的响应[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(1): 128-136.
- [12] 朱帅旗, 龚一富, 刘浩, 等. 硫酸铈铵对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响及转录差异研究[J]. 中国稀土学报, 2014, 32(6): 750-757.
- [13] 邹丽秋, 匡雪君, 孙超, 等. 天然产物生物合成途径解析策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4119-4123.
- [14] MIKAMI K, HOSOKAWA M. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7): 13763-13781.
- [15] 郭静, 曹玉锦, 咸漠, 等. 大肠杆菌生产异戊二烯的代谢工程研究进展[J]. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1026-1037.
- [16] LI Z J, WANG Y Z, WANG L R, et al. Advanced strategies for the synthesis of terpenoids in *Yarrowia lipolytica*[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(8): 2367-2381.
- [17] WANG Q, QUAN S, XIAO H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply[J]. Bioresour Bioprocess, 2019, 6(6): 1-13.
- [18] 王丽平, 湛琴琴, 梁瑾, 等. 千里光法尼基焦磷酸合酶基因的克隆及功能鉴定[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5677-5685.
- [19] LI X R, TIAN G Q, SHEN H J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce zeaxanthin[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2015, 42(4): 627-636.
- [20] CATALDO V F, ARENAS N, SALGADO V, et al. Heterologous production of the epoxycarotenoid violaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metab Eng, 2020, 59: 53-63.
- [21] BOUVIER F, D'HARLINGUE A, BACKHAUS R A, et al. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(21): 6346-6352.
- [22] 武陶, 张柏林, 毕昌昊. 细胞膜合成途径模块化调控与形态改造提高大肠杆菌 β -胡萝卜素的积累与产量[J]. 生物工程学报, 2018, 34(5): 703-711.
- [23] 颜少宾, 张好艳, 马瑞娟, 等. 桃果实类胡萝卜素测定方法的研究[J]. 果树学报, 2012, 29(6): 1127-1133.
- [24] 王小龙, 郁继华, 吴天珍, 等. 辣椒叶片中新黄质、紫黄质组分分离及含量的测定方法[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(3): 307-312.
- [25] GAO S, TONG Y, ZHU L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production[J]. Metab Eng, 2017, 41: 192-201.
- [26] SHEN H J, CHENG B Y, ZHANG Y M, et al. Dynamic control of the mevalonate pathway expression for improved zeaxanthin production in *Escherichia coli* and comparative proteome analysis[J]. Metab Eng, 2016, 38: 180-190.
- [27] 李哲. 酿酒酵母和大肠杆菌的启动子特性及其代谢工程应用研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2015: 2-4.
- [28] 杨帆, 苏卜利, 王永红, 等. 启动子对重组大肠杆菌合成番茄红素能力的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 27-32.
- [29] 王岩岩, 邢建民, 陈红歌. β -胡萝卜素合成的代谢工程研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(4): 578-590.
- [30] CHANG J M, CHEN W C, HONG D J, et al. The inhibition of dmba-induced carcinogenesis by neoxanthin in hamster buccal pouch[J]. Nutr Cancer, 1995, 24(3): 325-333.
- [31] MASARU T, AKIRA A, HONG Z, et al. A highly polar xanthophyll of 9'-cis-neoxanthin induces apoptosis in HCT116 human colon cancer cells through mitochondrial dysfunction[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 300(1/2): 227-237.
- [32] EIICHI K N, AKIRA A, AKIHIKO N. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells[J]. Cancer Lett, 2005, 220(1): 75-84.