

• 工业生物技术 •

通过番茄红素环化酶的优化构建 β -胡萝卜素高产菌株

金应福^{1,2}, 韩莉¹, 张莎莎^{1,2}, 李世忠¹, 刘伟丰¹, 陶勇¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

金应福, 韩莉, 张莎莎, 等. 通过番茄红素环化酶的优化构建 β -胡萝卜素高产菌株. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1814–1826.

Jin YF, Han L, Zhang SS, et al. Construction of high-yield strain by optimizing lycopene cyclase for β -carotene production. Chin J Biotech, 2017, 33(11): 1814–1826.

摘要: 目标产物的合成途径往往需要对关键酶的来源、表达水平等因素进行系统性优化才能实现代谢通量的最大化。 β -胡萝卜素是一类具有重要应用价值的萜类化合物, 其中番茄红素环化酶 (Lycopene cyclase, CrtY) 是 β -胡萝卜素合成途径中的关键酶, 能够催化 FAD 依赖的环化反应将番茄红素转化合成 β -胡萝卜素。本研究通过对 CrtY 的系统优化提高 β -胡萝卜素的合成水平, 并确定 CrtY 的表达对代谢通路的影响。在大肠杆菌中以番茄红素合成模块为基础, 通过引入番茄红素环化酶基因 *crtY* 构建了 β -胡萝卜素合成模块。并进一步利用寡聚接头介导的 DNA 组装方法 (Oligo-linker mediated assembly method, OLMA) 引入一系列不同强度的人工设计的核糖体结合位点 (Ribosome-binding site, RBS), 对 CrtY 的表达强度、基因来源等因素进行高通量的优化。通过 OLMA 文库构建和平板筛选, 获得了 5 株高产 β -胡萝卜素的工程菌株。在摇瓶中, 5 株工程菌株的 β -胡萝卜素产量可达 15.79–18.90 mg/g DCW (Dry cell weight), 比优化前提高了 65%。进一步选取了其中的 CP12 菌株, 在 5 L 发酵罐上, 利用高密度培养技术验证工程菌株合成 β -胡萝卜素的能力。最终 β -胡萝卜素产量可达 1.9 g/L。RBS 强度分析及代谢中间体分析表明, 适当地降低 CrtY 表达强度能够有利于 β -胡萝卜素模块相关基因之间协同发挥作用。以上结果为 β -胡萝卜素合成途径的优化规律提供了理论指导。

关键词: 番茄红素环化酶 (CrtY), 大肠杆菌, β -胡萝卜素, 寡聚接头介导的 DNA 组装 (OLMA), 代谢工程

Received: February 14, 2017; **Accepted:** April 24, 2017

Supported by: Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. ZDRW-ZS-2016-3).

Corresponding authors: Weifeng Liu. Tel: +86-10-64807478; Fax: +86-10-64807419; E-mail: liuwfv@163.com

Yong Tao. Tel/Fax: +86-10-64807419; E-mail: taoyong@im.ac.cn

中国科学院重点部署项目 (No. ZDRW-ZS-2016-3) 资助。

Construction of high-yield strain by optimizing lycopene cyclase for β -carotene production

Yingfu Jin^{1,2}, Li Han¹, Shasha Zhang^{1,2}, Shizhong Li¹, Weifeng Liu¹, and Yong Tao¹

¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To optimize key enzymes, such as to explore the gene resources and to modify the expression level, can maximize metabolic pathways of target products. β -carotene is a terpenoid compound with important application value. Lycopene cyclase (CrtY) is the key enzyme in β -carotene biosynthesis pathway, catalyzing flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent cyclization reaction and β -carotene synthesis from lycopene precursor. We optimized lycopene cyclase (CrtY) to improve the synthesis of β -carotene and determined the effect of CrtY expression on metabolic pathways. First, we developed a β -carotene synthesis module by coexpressing the lycopene β -cyclase gene *crtY* with *crtEBI* module in *Escherichia coli*. Then we simultaneously optimized the ribosome-binding site (RBS) intensity and the species of *crtY* using oligo-linker mediated DNA assembly method (OLMA). Five strains with high β -carotene production capacity were screened out from the OLMA library. The β -carotene yields of these strains were up to 15.79–18.90 mg/g DCW (Dry cell weight), 65% higher than that of the original strain at shake flask level. The optimal strain CP12 was further identified and evaluated for β -carotene production at 5 L fermentation level. After process optimization, the final β -carotene yield could reach to 1.9 g/L. The results of RBS strength and metabolic intermediate analysis indicated that an appropriate expression level of CrtY could be beneficial for the function of the β -carotene synthesis module. The results of this study provide important insight into the optimization of β -carotene synthesis pathway in metabolic engineering.

Keywords: lycopene cyclase, *Escherichia coli*, β -carotene, oligo-linker mediated DNA assembly, metabolic engineering

β -胡萝卜素是自然界中一种重要的天然色素，属于萜类脂溶性化合物。 β -胡萝卜素具有很强的抗氧化活性，能够发挥多种重要的生理功能，其中包括体内维生素 A 的前体物质、预防肿瘤、延缓衰老、促进免疫功能^[1-4]。在食品、医药、保健品、化妆品、饲料等多个领域， β -胡萝卜素均具有重要的应用价值和广泛的市场前景^[5-6]。生产 β -胡萝卜素的手段主要包括天然提取法、化学合成法、生物合成法。其中天然提取法通过从胡萝卜等植物中提取获得 β -胡萝卜素，由于产率低、受季节影响等原因，无法满足市场需求。化学合成法虽然产量大、成本低，但具有毒化学物质残留等缺陷。相比而言，以微生物发酵为基础的生

物合成法，易大规模生产，具有天然、安全等特点，是最具有发展前景的生产手段。

目前在微生物发酵法生产 β -胡萝卜素的相关研究中，通过代谢工程手段改造 β -胡萝卜素合成途径，从而提高 β -胡萝卜素的生产水平一直是重要研究热点之一。其中大肠杆菌 *Escherichia coli* 因其易于培养和大规模发酵，同时具有完善的遗传改造手段，成为代谢工程合成 β -胡萝卜素的最主要宿主菌株。与所有萜类化合物一样， β -胡萝卜素的生物合成途径依赖两种五碳前体——异戊烯焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (Dimethyl allyl pyrophosphate, DMAPP)。IPP 与 DMAPP 通过类胡萝卜素

(Carotenoids) 合成基因簇编码蛋白的催化作用, 经多步缩合反应生成 β -胡萝卜素。在这一过程中, GGPP 合成酶 CrtE (Geranylgeranyl pyrophosphate synthase)、八氢番茄红素合成酶 CrtB (Phytoene synthase)、八氢番茄红素脱氢酶 CrtI (Phytoene desaturase) 能够首先催化合成 β -胡萝卜素的前体番茄红素。番茄红素进一步在番茄红素环化酶 CrtY 的作用下产生 β -胡萝卜素。

目前, 国内外 β -胡萝卜素合成途径的改造在提高 IPP 及 DMAPP 前体供应方面开展了大量工作^[7-10]。自然界中 IPP 和 DMAPP 主要有两条生物合成途径: 以乙酰 CoA 为前体的甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 和以丙酮酸及 3 磷酸甘油醛为前体的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径)。在大肠杆菌中构建异源 MVA 途径的工作以 Keasling JD 为代表^[11-13]。Keasling JD 等在大肠杆菌中引入了酿酒酵母的 MVA 途径基因, 并将 MVA 途径分解成上游模块及下游模块分别进行优化。经过 HMGR 等关键靶点的基因替换与改造等手段, 解除了 HMG-CoA 等中间体积累, 实现了在大肠杆菌中利用 MVA 途径高水平合成紫穗槐等萜类产物。大肠杆菌中 MEP 途径的改造则以 Stephanopoulos G 为代表^[14-15]。Stephanopoulos G 等通过代谢流分析、随机改造等办法, 验证了敲除 *gdhA*、*aceE*、*fdhF* 等对产物产量的提高。此外不同研究组通过改造 *pgi*、*gnd* 等靶点重构中央代谢途径, 或 *sucAB*、*sdhAB* 和 *talB* 的过表达, 均能改善 MEP 途径前体供应, 从而有效提高 β -胡萝卜素产量^[16-17]。

相对前体供应途径改造而言, 国内外对类胡萝卜素合成基因簇的优化工作还非常薄弱。大多数代谢工程合成 β -胡萝卜素的工作中, 直

接采用了泛菌属 *Pantoea* 等少数微生物来源的基因簇合成 β -胡萝卜素。本实验室前期研究中, 通过挖掘不同来源的 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 基因, 并利用不同强度的 RBS 对基因的表达水平同时进行调控, 从而显著提高了番茄红素的合成水平^[18]。以上结果表明, 蛋白表达的精细调控对类胡萝卜素合成基因簇功能优化具有重要作用。在代谢工程传统蛋白表达调控改造中, 通常采用随机突变或理性设计的办法构建不同强度的调控元件。但随机突变的调控元件强度无法控制; 而理性设计的调控元件无法实现大规模的设计与构建, 缺乏同时、高通量对多种因素进行优化的手段, 极大影响了途径和模块优化的效率。本研究以先期优化的番茄红素合成模块 (*crtEBI*) 为基础, 通过引入番茄红素环化酶基因 (*crtY*) 构建 β -胡萝卜素合成模块 (图 1), 利用高通量的寡聚接头介导的 DNA 组装方法 (Oligo-linker mediated assembly method, OLMA), 从大规模 RBS 序列设计、改变基因来源等多个方面对 *crtY* 的表达进行微调, 实现对 β -胡萝卜素合成模块的高通量优化, 并阐明 *crtY* 表达水平对模块和代谢途径中其他基因功能以及目标产物的影响。寡聚接头介导的 DNA 组装方法是一种将小片段调控序列引入在寡聚接头的 DNA 组装文库构建方法, 可同时调节大于 50 bp 和小于 50 bp 的影响因素^[18]。该方法的独特性在于寡聚接头 (小于 50 bp 因素) 既可以被用作介导组装的“桥梁”, 也可以被设计启动子、RBS 等调控元件。由于寡聚接头易于合成, 从而可以实现大规模的元件设计和组装。并且该方法可以同时基因来源、位置等因素 (大于 50 bp 因素) 进行调控。通过将小于 50 bp 的影响因

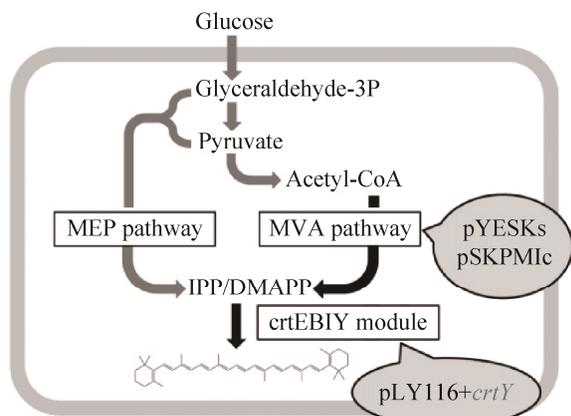


图1 β -胡萝卜素合成模块的构建

Fig. 1 Construction of β -carotene synthesis module.

素被设计在化学合成的寡聚接头中，而大于 50 bp 的影响因素则通过标准载体引入，通过 IIS 型限制性内切酶获得相应的互补片段进行一步组装，大大提高了文库的构建效率和丰度。本研究将有助于阐明 β -胡萝卜素合成模块表达的规律，为进一步提高 β -胡萝卜素产量及其在工业中的应用打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 菌株与amp;质粒

表达宿主菌 *Escherichia coli* BW25113 由本实验室保存；克隆宿主菌 *Escherichia coli* Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司；其他所有菌株和质粒见表 1。

1.1.2 仪器与amp;试剂

紫外可见光分光光度计，UV2500，日本岛津公司 (Shimadzu)；凝胶成像系统，Bio-pro 200E，美国西蒙公司 (SIM)；电转化仪，Micro-pulser，美国伯乐公司 (Bio-Rad)；PCR 仪，Mastercycler ProS，德国安本德公司 (Eppendorf)；微孔板恒温振荡器，MB100-4A，杭州州奥盛仪器有限公

司；酶标仪，Synergy MX/SMATC，美国伯腾仪器公司 (BioTek)；5 L 发酵罐，上海保兴生物设备工程有限公司；高效液相色谱 (HPLC)，Agilent 1220，美国安捷伦公司 (Agilent)。

胰蛋白胨、酵母粉购自 Oxoid 公司； β -胡萝卜素、番茄红素标准品购自 Sigma-Aldrich 公司；DNA 分子量标准购自 Thermo Scientific 公司；FastPfu DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司；Gibson 克隆试剂盒、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、磷酸化酶购自 NEB (北京) 公司；细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega (北京) 有限公司；其他常规生化试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基与amp;溶液

LB (Luria-Bertani) 培养基：1%胰蛋白胨，0.5%酵母粉，1% NaCl，其中 LB 固体培养基添加 1.5%琼脂粉。

ZYM 自诱导培养基：100 mL 培养基中含酵母粉 0.5 g，蛋白胨 1 g，甘油 0.5 g，葡萄糖 0.05 g，阿拉伯糖 0.2 g， Na_2SO_4 0.07 g， NH_4Cl 0.27 g， MgSO_4 0.024 g， KH_2PO_4 0.34 g， Na_2HPO_4 0.9 g，0.1 mL 微量元素，pH 7.0^[20]。

M9 培养基：100 mL 培养基中含终浓度 2 mmol/L MgSO_4 ，0.1 mmol/L CaCl_2 ，20 mL 5×M9 盐溶液 (200 mL 溶液中含 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g， KH_2PO_4 3.0 g，NaCl 0.5 g， NH_4Cl 1.0 g)，pH 7.0。

抗生素：培养基中根据菌株添加抗生素，不同抗生素的终浓度为：氯霉素 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，链霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，四环素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 方法

1.2.1 分子生物学构建

各种分子克隆反应按照所用酶、试剂盒说

说明书进行, 所用引物见表 2。其中 *crtY* 基因的 PCR 扩增以相应菌株的基因组为模板, 细菌基因组采用细菌基因组提取试剂盒提取。PCR 条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。启动子、终止子片段

分别以相应质粒为模板进行 PCR 扩增, PCR 条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。带有启动子、终止子的 *CrtY* 表达质粒或受体质粒的构建采用多片段 Gibson 组装方法, 按照文献[21]方法进行。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain/plasmid	Characteristics	Reference
Strain		
<i>Escherichia coli</i> Trans1-T1	F ⁻ φ80(<i>lacZ</i>) ΔM15Δ <i>lacX</i> 74 <i>hsdR</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) Δ <i>recA</i> 1398 <i>endA1 tonA</i>	TransGen Biotech
<i>Escherichia coli</i> BW25113	<i>lacI</i> ^q <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR</i> 514 Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	Our lab
<i>Pantoea agglomerans</i> GMCC1.2244	Pag <i>crtY</i>	Our lab
<i>Erythrobacter</i> sp. Nan35	Ery <i>crtY</i>	Our lab
<i>Escherichia coli</i> DB 3.1	F ⁻ <i>gyrA</i> 462 <i>endA1</i> Δ(<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyI-5λ-leu mtl1</i>	Life technology
CP00	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc)	This study
CP07	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, pCP07)	This study
CP08	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, pCP08)	This study
CP09	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, p1-G3)	This study
CP10	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, p2-A2)	This study
CP11	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, p2-D5)	This study
CP12	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, p2-G5)	This study
CP13	BW25113 (pYESKs, pSKPMIc, p3-A5)	This study
plasmid		
pLY116	RSF1030 origin, kan ^R , lycopene module containing <i>crtE</i> BI operon	[18]
pYESKs	p15A origin, str ^R , MVA upper module	[19]
pSKPMIc	pSC101 origin, cm ^R , MVA lower module	[19]
pSC7s	pSC101 origin, Str ^R , tac promoter, tL3 terminator	Our lab
pFUS	ColE origin, Spe ^R , <i>ccdB</i> operon	Our lab
pHD	ColE origin, tet ^R	Our lab
pOSIP	<i>ccdB</i>	Our lab
pCP07	pLY116, Pag <i>crtY</i>	This study
pCP08	pLY116, Ery <i>crtY</i>	This study
pHD07	pHD, Pag <i>crtY</i>	This study
pHD08	pHD, Ery <i>crtY</i>	This study
pLY116-TC	pLY116, tac promoter, tL3 terminator, <i>ccdB</i> operon	This study

表 2 文中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')
PagY-F	GTTTAACTTTCGCGCGCGTAACAGGAGGAATTAACCATGCCGCGGTATGATCTG
PagY-R	GATGCGTCATCGCCATTATCATTGCATCGCCTGTTG
EryY-F	GTTTAACTTTCGCGCGCGTAACAGGAGGAATTAACCATGAGCGAACGCGATTGC
EryY-R	GATGCGTCATCGCCATTATCATTGCATCGCCTGTTG
tac-F	CAGACGAAGAATCGTCGACACAGCTAACACCACGTC
tac-R	CGCGCGCGAAAAGTTAAACAAAA
tL3-F	AATGGCGATGACGCATCCTCAC
tL3-R	GCGGAAGAGCGCTGCATGTTTCTACTGGTATTGGCA
HPagY-F	CATCATGCCTCCTCTAGAGGTCTCATTAAATGCCGCGGTATGATCTG
HPagY-R	GATTTTGGTCATGGGTGGCTCGAGGGTCTCAATACTCATTGCATCGCCTGTTG
HEryY-F	CATCATGCCTCCTCTAGAGGTCTCATTAAATGAGCGAACGCGATTGC
HEryY-R	GATTTTGGTCATGGGTGGCTCGAGGGTCTCAATACTCATTGCATCGCCTGTTG
ccd-F	GTTTAACTTTCGCGCGCGTAACAGGAGGAATTAACCCAGGTGAGACCAGGAGGAATTAACCATG CAGTTTAAGGTTTAC
ccd-R	GATGCGTCATCGCCATTAACTGAGACCTTATATTCCCCAGAAC

1.2.2 OLMA 文库构建

OLMA 文库构建按照文献[18]进行。其中寡聚接头是通过将互补的两条单链 oligo 退火形成双链 oligo。反应条件为终浓度各为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的单链 oligo 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min, 然后以每秒 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 的速度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。退火后将双链 DNA 稀释至终浓度 100 nmol/L, 将不同强度的寡聚接头等比例混合, 利用磷酸化酶进行磷酸化反应, 获得最终的寡聚接头片段。

1.2.3 重组菌株的诱导表达及生物转化

挑取单克隆在新鲜的相应抗性的 LB 培养基中培养, 待 OD_{600} 值达到 0.6–0.8, 以 1% 的接种量转接到含有相应抗性的 ZYM 自诱导培养基中培养 12–14 h, 诱导 MVA 途径基因的表达。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 条件下离心, 弃去培养基, 然后用 M9 培养基和 1% 葡萄糖的转化液重悬菌体至 10 OD/L , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床进行生物转化 20 h。测定转化后 β -胡萝卜素产量水平。

1.2.4 β -胡萝卜素、番茄红素的测定

对生物转化后的菌体细胞测定菌体 OD_{600} , 取 1×10^8 CFU 细胞的培养液离心收集菌体, 双蒸水洗涤菌体 1 次, 于菌体中加入 1 mL 丙酮, 冰上萃取 2 h 后, 13 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液。 β -胡萝卜素的测定用分光光度计扫描 340–550 nm 的吸收光谱, 并读取 454 nm 处的特征吸收峰值, 再根据标准曲线计算 β -胡萝卜素的产量, 实验设计 3 次重复。用 β -胡萝卜素标准品制定标准曲线。 β -胡萝卜素、番茄红素产物的定性分析通过 HPLC 方法测定上述样品, 使用 Phenomenex Luna 5u C8(2) 100A 色谱柱, 流动相为水+丙酮 (体积比为 20:80), 以 β -胡萝卜素、番茄红素标准品标定。

1.2.5 OLMA 文库的筛选

平板筛选, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后将黄色克隆挑取于含有 200 μL LB 培养基的 96 孔深孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 的微孔板恒温振荡器中培养

10 h 后按 1:40 的比例接种于 200 μL 含诱导物的 ZYM 自诱导培养基的 96 孔深孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 的振荡器中恒温培养 16 h。将诱导后的培养液稀释 20 倍, 用酶标仪测定 OD_{600} 。同时取 20 μL 的培养液, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 400 μL 乙醇-丙酮混合液 (体积比 4:1) 冰上萃取 2 h。萃取完成后 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取 200 μL 上清液于 96 孔微孔板中 (平底), 用酶标仪读取 454 nm 处的吸光值, 计算吸光值与菌体 OD_{600} 的比值, 利用该值评判相应克隆的 β -胡萝卜素合成能力。

1.2.6 中间产物分析

对生物转化后的菌体细胞, 测定菌体 OD_{600} , 取 5×10^9 CFU 细胞的培养液离心收集菌体, 用 -80°C 预冷的甲醇重悬, 超声后离心收取上清, 经冷冻干燥制备样品。样品委托清华大学生物医学测试中心 UPLC-MS/MS 分析检测。

1.2.7 5 L 发酵水平生产 β -胡萝卜素

挑取单克隆在相应抗性的 LB 培养基中培养过夜, 5% 的接种量接入到装液量为 100 mL 的 LB 培养基中, 培养 5 h, 再接入装液量为 2 L 的 5 L 发酵罐中, 发酵培养基为 (L): 20 g 葡萄糖, 5 g 酵母粉, 0.6 g MgSO_4 , 9 g KH_2PO_4 , 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 及微量元素。生长温度控制在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 控制在 7.0, 空气流速为 4 L/min, 发酵过程中 DO 控制在 30%, 发酵过程中恒速补料。

2 结果与分析

2.1 产 β -胡萝卜素大肠杆菌菌株的构建

根据 NCBI 序列设计引物 PagY-F/PagY-R 和 EryY-F/EryY-R, 分别以提取的成团泛菌 *Pantoea agglomerans* CGMCC1.2244 和赤杆菌 *Erythrobacter* sp. Nan35 的基因组总 DNA 为模

板进行 PCR 扩增, 获得 Pag-*crtY* 和 Ery-*crtY* 基因片段。分别用 tac-F/tac-R 和 tL3-F/tL3-R 引物, 以质粒 pSC7s 为模板, 分别扩增出 tac 启动子片段 tac 和终止子片段 tL3。采用 *Sal* I 单酶切本实验室之前构建的含有番茄红素合成基因簇 *crtEBI* 的载体 pLY116, 回收载体大片段后, 采用 Gibson 方法分别与 tac/Pag-*crtY*/tL3 或 tac/Ery-*crtY*/tL3 进行多片段连接, 筛选阳性克隆, 得到具有完整合成途径的 β -胡萝卜素合成模块质粒 pCP07 和 pCP08。将 pCP07 及 pCP08 质粒和分别含有 MVA 上游途径基因的 pYESKs 质粒和 MVA 下游途径基因的 pSKPMIc 质粒共转, 获得具有合成 β -胡萝卜素能力的工程菌株 CP07 及 CP08 (图 2)。

为了验证 CP07 和 CP08 的功能, 将 CP07 和 CP08 接种于 ZYM 培养基中诱导表达 β -胡萝卜素合成途径蛋白, 收集菌体后重悬于 20 mL 含有 1% 葡萄糖的 M9 培养基中, 摇瓶生物转化 20 h。收集菌体后用丙酮萃取产物, 检测 β -胡萝卜素含量, 以无 β -胡萝卜素合成模块质粒的菌株 CP00 为对照。结果表明 (图 3, 7C), 经转化后 CP07 和 CP08 的色素产物均为单一的 β -胡萝卜素, β -胡萝卜素合成水平分别达到约 8.79 mg/g DCW 及 8.08 mg/g DCW。

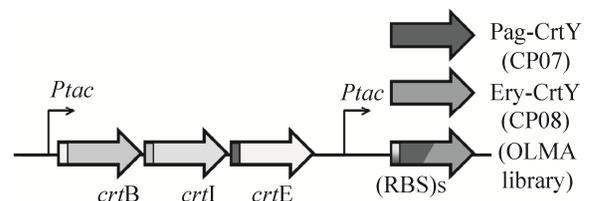


图 2 在番茄红素合成模块的基础上引入 *CrtY* 及 OLMA 文库

Fig. 2 Manipulation of *CrtY* and OLMA library based on lycopen synthesis module.

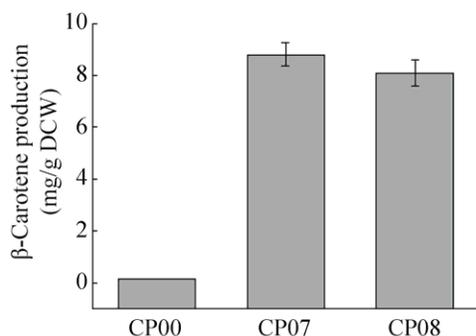


图3 CP07和CP08的 β -胡萝卜素合成水平
Fig. 3 β -carotene production of CP07 and CP08.

2.2 寡聚接头介导DNA组装(OLMA)文库的设计与构建

为了实现 β -胡萝卜素合成途径中基因表达的平衡,并进一步提高 β -胡萝卜素的合成水平,采用寡聚接头介导DNA组装(OLMA)文库构建的策略对 $crtY$ 的表达水平进行微调,OLMA文库的设计和构建过程如图2和图4所示。

选择Pag- $crtY$ 及Ery- $crtY$ 两种 $crtY$ 基因以

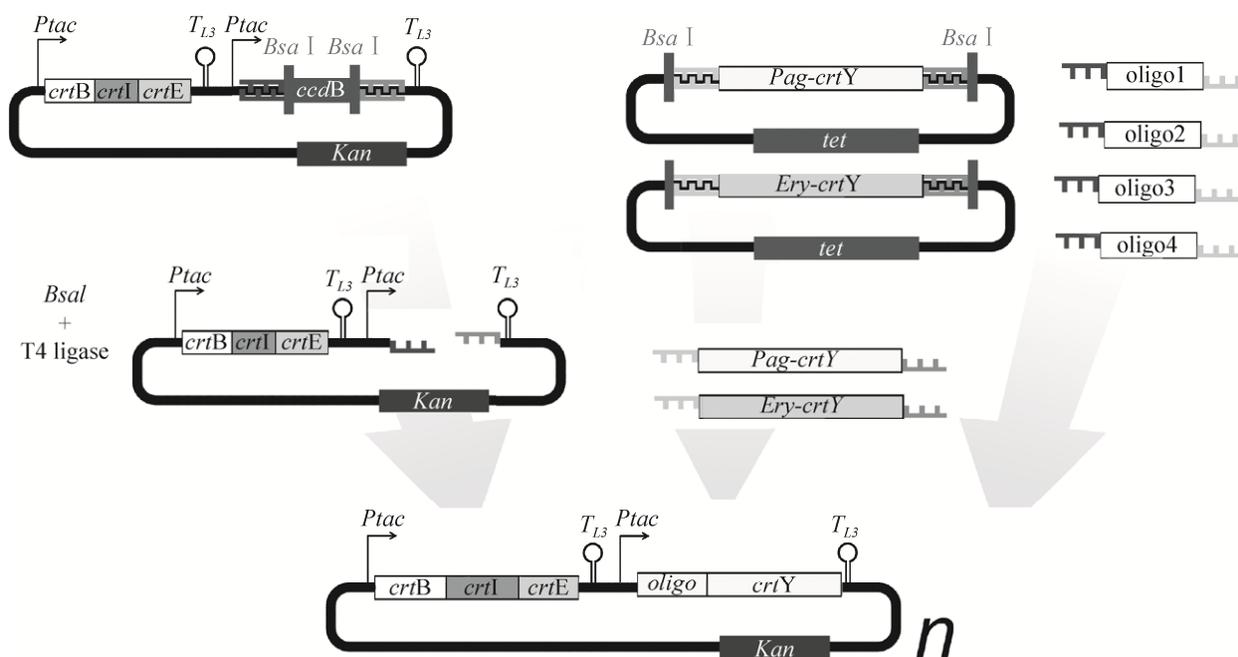


图4 利用OLMA优化 β -胡萝卜素合成模块的设计与构建
Fig. 4 Design and construction of OLMA library to optimize β -carotene synthesis module.

增加文库的多样性。分别采用引物HPagY-F/HPagY-R和HEryY-F/HEryY-R,以质粒pCP07和pCP08为模板,扩增HPag- $crtY$ 和HEry- $crtY$ 基因片段。采用Ava I和Xba I双酶切标准载体pHD,以Gibson方法分别与HPag- $crtY$ 和HEry- $crtY$ 连接,筛选阳性克隆,获得用于OLMA文库构建的Pag- $crtY$ 及Ery- $crtY$ 基因供体质粒pHD07和pHD08。其中 $crtY$ 基因序列两端分别带有Bsa I酶切位点,上下游酶切粘性末端分别为TTAA和GTAT。

进一步对于构建文库所用的RBS序列优化。根据文献中的设计原则,以Pag- $crtY$ 及Ery- $crtY$ 的序列为基础,利用RBS Calculator软件计算出不同强度的RBS^[18],并选取了50个可覆盖较大强度范围(~100-50 000)的RBS,将RBS核心序列、及上下游的粘性末端CAGG与TTAA设计在寡聚接头序列中。并制备磷酸化的寡聚接头。

以 pLY116 为基础构建受体质粒。利用引物 *ccd-F/ccd-R*, 以质粒 pOSIP 为模板, 扩增编码毒蛋白的 *ccdB* 基因片段, 采用 Gibson 方法与 *tac/tL3* 及经 *Sal I* 单酶切的 pLY116 进行多片段连接, 转化感受态细胞大肠杆菌 DB3.1 中, 筛选阳性克隆, 获得受体质粒 pLY116-TC。该质粒由于含有 *ccdB* 毒蛋白无法在 DB3.1 以外的正常大肠杆菌细胞中生长, 从而消除文库构建中的假阳性。其中 *ccdB* 基因序列两端分别带有 *Bsa I* 酶切位点, 上下游酶切粘性末端分别为 CAGG 和 GTAT。

将受体质粒 pLY116-TC、两种供体质粒及双链寡聚接头在含有 *Bsa I* 和 T4 DNA 连接酶的反应体系中实现一步组装, 电转化进入 T1 感受

态细胞。提取混合质粒, 并转入含有 pYESKs 质粒和 pSKPMIc 质粒的 BW25113 感受态细胞中, 用于下一步筛选。

2.3 OLMA 文库的筛选和鉴定

以 CP07 及 CP08 为对照, 随机挑取 33 个克隆于 96 孔深孔板中, 经 LB 培养基培养、ZYM 培养基自诱导后, 乙醇-丙酮检萃取, 并用酶标仪检测单位菌体的 β -胡萝卜素含量。结果如图 5A 所示, β -胡萝卜素产量为 0.47–1.04。根据相对产量数值分布看, 所构建的 OLMA 文库可以引起正态分布的 β -胡萝卜素产量变化, 说明该手段能够有效地调控 *crtY* 的活性从而得到不同的 β -胡萝卜素产量 (图 5B, C)。

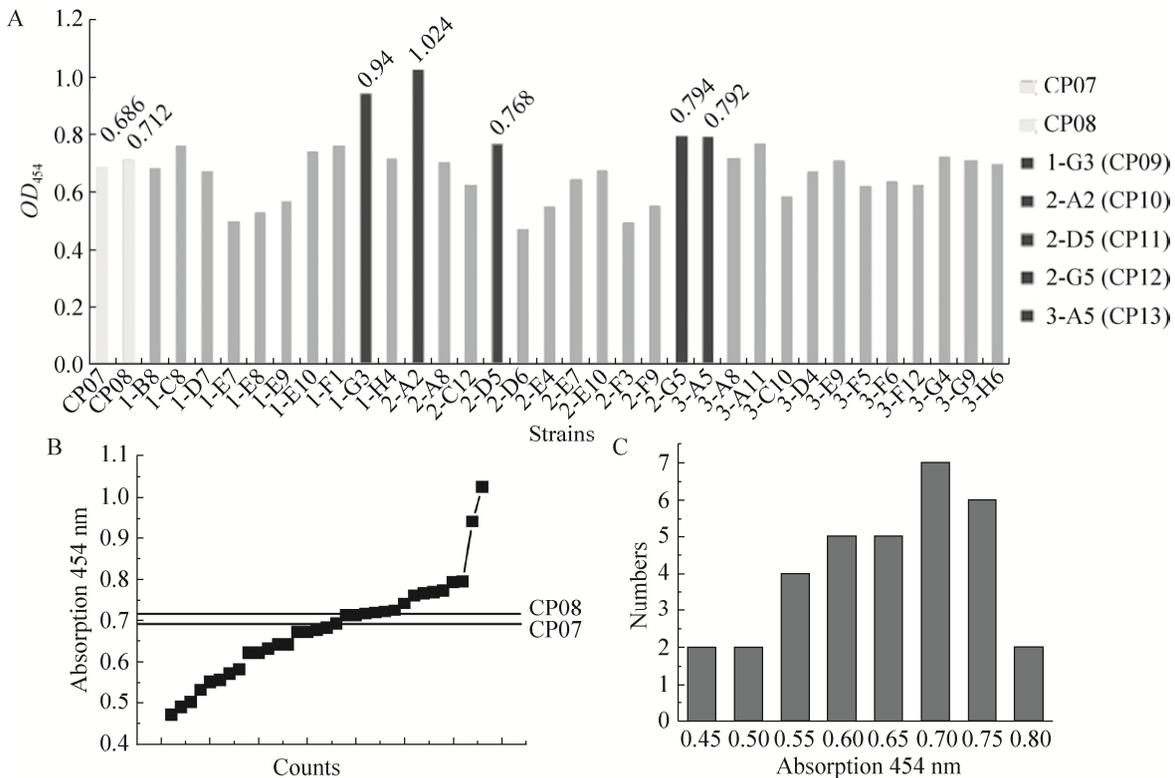


图 5 利用 96 孔板对 OLMA 文库的筛选和鉴定

Fig. 5 Screen and identification of OLMA library using 96 plates. (A) 33 clones were picked randomly and relative β -carotene production was determined. (B) Comparison of the relative β -carotene production of 33 strains with CP07 and CP08. (C) Statistics of strains.

挑选克隆中有 5 株 β -胡萝卜素产量明显超过 CP07 及 CP08。选择相应的克隆命名为 CP09–CP13，并进行复筛。将上述菌株在含有 ZYM 培养基的摇瓶中诱导后进行生物转化，检测 β -胡萝卜素产量。结果表明，5 株菌的 β -胡萝卜素产量分别为 16.89、16.89、15.79、18.89 和 16.96 mg/g DCW，其中最高的 CP12 的 β -胡萝卜素产量比对照菌株 CP07 和 CP08 分别提高了 65% 和 72% (图 6B)。同时对 ZYM 培养基中诱导后菌体量进行比较，发现 CP09–CP13 在诱导后的菌体量均比 CP07 和 CP08 有明显提高 (图 6A)。

为了进一步确定微调对 *crtY* 表达的作用，对上述菌株进一步对序列进行分析。5 株菌的 RBS 序列及相对强度见表 3。

为了进一步研究 *crtY* 表达调控对代谢途径的影响，选取 CP12 的生物转化后菌体进行中间产物分析，检测菌体细胞中 MVA 代谢中间产物 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A) 以及 IPP/DMAPP 的含量。结果表明 (图 7)，与优化前菌株 CP07 相比，CP12 的 HMG-CoA 含量提高约 30%，而同时 IPP/DMAPP 的含量下降了 4 倍。采用 HPLC 检测转化后 CP12 的色素产物类型，结果表明 CP12 的色素产物与 CP07、CP08 一致，均只含有 β -胡萝卜素 (图 7C)。

2.4 高产 β -胡萝卜素菌株的发酵验证

为了进一步验证所筛选的高产 β -胡萝卜素菌株的生产能力，选取 CP12 菌株在 5 L 发酵罐水平上进行发酵及 β -胡萝卜素的生产 (图 8)。开

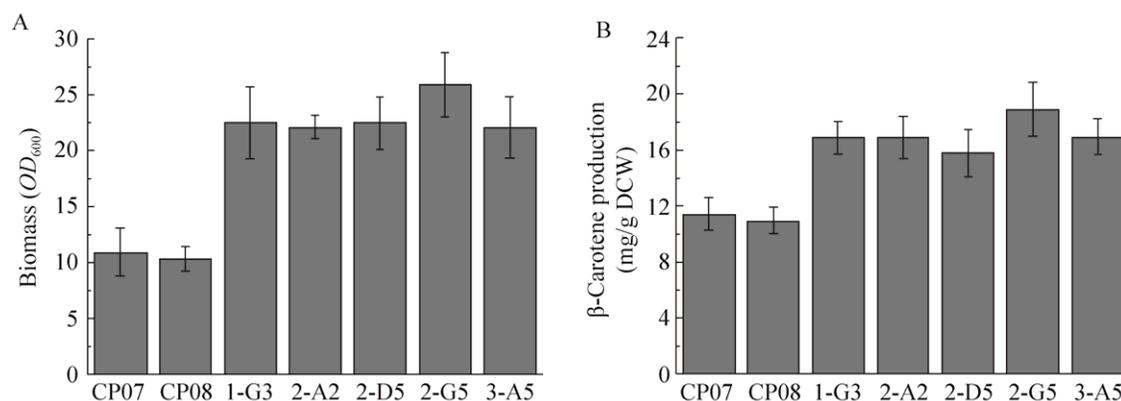


图 6 摇瓶中高产菌株的生物量 (A) 及 β -胡萝卜素产量 (B)

Fig. 6 Biomass (A) and β -carotene production (B) of the 5 high-yield strains.

表 3 高产菌株的 RBS、*CrtY* 信息

Table 3 Information of RBS and *CrtY* of high-yield strains

Strains	RBS sequence	RBS intensity	<i>crtY</i>
CP09	ATGAATGTATCAATTGAGGT TTAA	1 147	Pag <i>crtY</i>
CP10	CTATGAATTGAGCTAAGAGGTGAAA	2 059	Pag <i>crtY</i>
CP11	GGAAACCCTCAGGAGGTAAACCA	46 327	Pag <i>crtY</i>
CP12	ACTAAAACCTTGAATGAGGAAATT	3 088	Pag <i>crtY</i>
CP13	ATGAATGTATCAATTGAGGTTTAA	1 147	Ery <i>crtY</i>

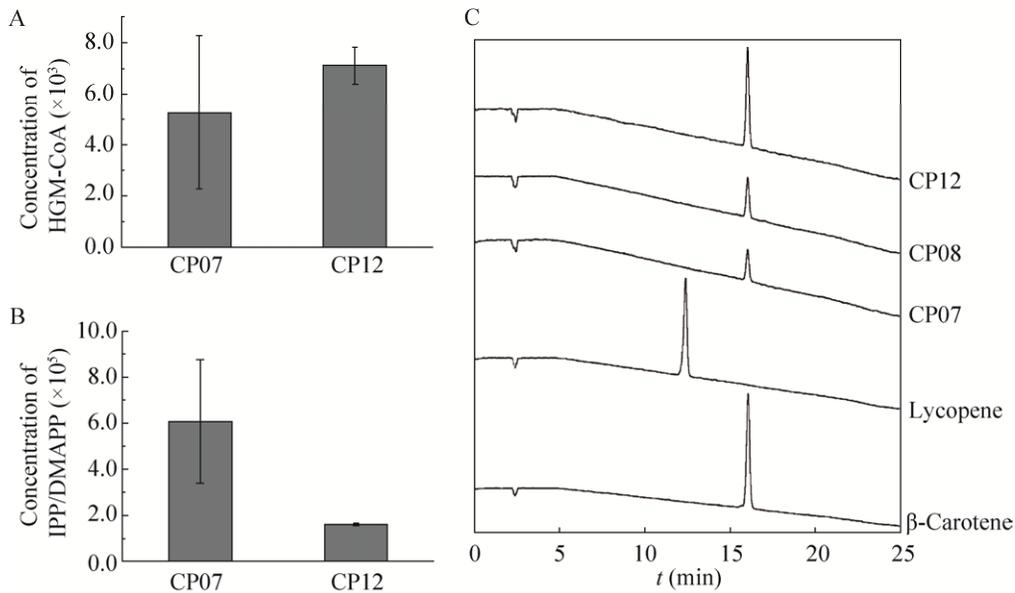


图7 菌株的代谢中间产物分析

Fig. 7 Analysis of metabolic intermediates of strains. (A) LC-MS/MS analysis of relative HMG-CoA concentrations. (B) LC-MS/MS analysis of relative IPP/DMAPP concentrations. (C) HPLC analysis of β -carotene and lycopene.

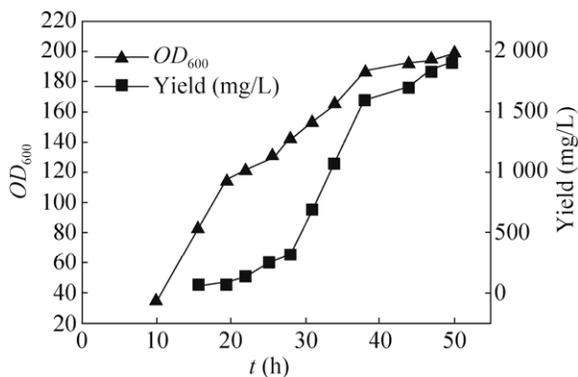


图8 CP12的 β -胡萝卜素发酵时间曲线

Fig. 8 Time curve of β -carotene fermentation of CP12.

始发酵后控制菌体生长至 10 h 时, 加入 20 mL 20% 的阿拉伯糖诱导物。15 h 时开始检测 β -胡萝卜素产物积累。结果发现发酵 30 h 后菌体浓度可达 150 OD/L , 同时 β -胡萝卜素产物积累明显上升。至发酵 50 h 后, 菌体浓度可达 200 OD/L 。

β -胡萝卜素产量约为 1.9 g/L。

3 讨论

利用代谢工程手段在微生物中改造目标产物的合成途径, 通常需要解决多种异源蛋白的同时表达问题, 从而解除途径中多个关键性限制瓶颈, 提高目标产物合成水平。之前的研究表明利用 OLMA 方法对番茄红素合成模块中的 *crtE*、*crtB*、*crtI* 协同表达进行优化能够显著提高番茄红素的合成水平, 证明蛋白表达的精细控制对类胡萝卜素合成基因簇具有重要作用^[18]。在 β -胡萝卜素合成模块中, 番茄红素环化酶是一种需要结合 FAD 作为配体的环化酶^[22], 具有典型的跨膜结构域^[23]。这一类蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达往往具有很大的挑战性, 之前的报道也证实番茄红素环化酶容易在大肠杆菌中形成不溶性包涵体^[22]。本研究尝试以 OLMA

方法为基础对番茄红素环化酶的活性进行高效率的优化。结果表明优化后的菌株 CP09-CP13 的 β -胡萝卜素产量均能提高 60% 以上。通过对高产菌株中 RBS 强度分析, 5 株高产菌株中有 4 株采用了低强度的 RBS (预测强度为 1147–3088), 这一结果表明降低表达强度有利于番茄红素环化酶的活性。由于 *crtY* 及 β -胡萝卜素合成模块其他基因的表达产物在 CP07-CP13 的菌株中表达量少, 很难用 SDS-PAGE 分析 (结果未列出), 因此进一步用代谢中间体的积累分析相关途径和模块的功能。相关结果证实在降低番茄红素环化酶表达强度的工程菌株中, 能够明显减少 IPP/DMAPP 的中间体积聚, 说明 β -胡萝卜素合成模块的活性得到了提高。菌株 CP07 和 CP12 中色素产物均仅以 β -胡萝卜素的形式存在, 表明 *crtY* 在两个菌株中的表达量均足够将番茄红素转化为 β -胡萝卜素。因此可以推测在菌株 CP12 中 *crtY* 优化对 β -胡萝卜素产量的提高可能是由于平衡了 *crtY* 与 *crtE* 之间的表达, 并促进了 *crtE* 的功能。值得注意的是, 菌株 CP09-CP13 不仅 β -胡萝卜素产量明显提高, 在合成途径诱导之后菌体生长也比 CP07 和 CP08 明显提高, 生长提高的原因尚不清楚。文献报道证实^[11-12,24], MVA 途径的代谢中间体包括 HMG-CoA、甲羟戊酸、IPP/DMAPP 等均对细胞的生长具有毒性。在本研究中, 菌株 CP12 中的 IPP/DMAPP 水平比未经优化的对照菌株 CP07 减少了 4 倍, 暗示高产菌株生长的提高可能是由于代谢途径畅通后, 解除了 IPP/DMAPP 的生长抑制引起的。

在微生物代谢工程改造中, 只有异源途径、模块中不同异源蛋白的表达处于相对平衡的状态时, 才能使模块的功能以及模块间的“适配性”、模块与宿主细胞间的“适配性”达到最优状

态。本研究以 β -胡萝卜素模块为研究对象, 通过对模块中关键性的番茄红素环化酶的优化实现了异源蛋白表达的平衡, 为高产 β -胡萝卜素菌株的进一步优化及工业化应用打下基础。

REFERENCES

- [1] Chew BP. Vitamin A and β -carotene on host defense. *J Dairy Sci*, 1987, 70(12): 2732–2743.
- [2] Olson JA. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *J Nutr*, 1989, 119(1): 105–108.
- [3] Hughes DA, Finglas PM, Wright AJA, et al. Dietary beta-carotene supplementation modulates the production of tumour necrosis factor- α by human monocytes. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24(3): 387S.
- [4] Cui BK, Liu S, Wang QB, et al. Effect of β -carotene on immunity function and tumour growth in hepatocellular carcinoma rats. *Molecules*, 2012, 17(7): 8595–8603.
- [5] Yamano S, Ishii T, Nakagawa M, et al. Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(6): 1112–1114.
- [6] Sandmann G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 385(1): 4–12.
- [7] Yoon SH, Park HM, Kim JE, et al. Increased β -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnol Progr*, 2007, 23(3): 599–605.
- [8] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3/4): 218–226.
- [9] Yan GL, Wen KR, Duan CQ. Enhancement of β -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant

- Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol*, 2012, 64(2): 159–163.
- [10] Ye LJ, Zhang CZ, Bi CH, et al. Combinatory optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for β -carotene production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 202.
- [11] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796–802.
- [12] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 193–207.
- [13] Ma SM, Garcia DE, Redding-Johanson AM, et al. Optimization of a heterologous mevalonate pathway through the use of variant HMG-CoA reductases. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 588–597.
- [14] Alper H, Jin YS, Moxley JF, et al. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 155–164.
- [15] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678–12683.
- [16] Li C, Ying LQ, Zhang SS, et al. Modification of targets related to the Entner-Doudoroff/pentose phosphate pathway route for methyl-D-erythritol 4-phosphate-dependent carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1): 117.
- [17] Zhao J, Li QY, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50.
- [18] Zhang SS, Zhao XL, Tao Y, et al. A novel approach for metabolic pathway optimization: oligo-linker mediated assembly (OLMA) method. *J Biol Eng*, 2015, 9(1): 23.
- [19] Feng F, Xu Y, Tao Y, et al. Improving isoprene production by engineered heterologous mevalonate pathway in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2015, 31(7): 1073–1081 (in Chinese).
冯凡, 许杨, 陶勇, 等. 提高大肠杆菌通过 MVA 途径合成异戊二烯. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1073–1081.
- [20] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Express Purif*, 2005, 41(1): 207–234.
- [21] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 343–345.
- [22] Yu QJ, Schaub P, Ghisla S, et al. The lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (formerly *Erwinia uredovora*) catalyzes an FAD_{red}-dependent non-redox reaction. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12109–12120.
- [23] Peck RF, Johnson EA, Krebs MP. Identification of a lycopene β -cyclase required for bacteriorhodopsin biogenesis in the Archaeon *Halobacterium salinarum*. *J Bacteriol*, 2002, 184(11): 2889–2897.
- [24] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027–1032.

(本文责编 陈宏宇)