

法夫酵母虾青素合成途径相关基因的研究进展

李天丽¹ 蔡慧农^{1,2,3} 李利君^{1*} 倪辉^{1,2,3} 苏文金^{1,2,3}

(1. 集美大学 生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 福建省高校食品微生物与酶工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

(3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

摘要: 法夫酵母能合成一种具有很高商业价值的类胡萝卜素——虾青素。它广泛应用于饲料、保健品、医药、化妆品等行业。探索法夫酵母中虾青素合成途径及其调控机理对天然虾青素资源的开发具有重要的意义。虽然许多学者通过各种方法对该途径进行了一系列的研究,但其机理目前尚未完全阐明。本文综述了法夫酵母虾青素合成途径以及合成途径中相关基因的研究进展,并对基于基因调控的产量提高策略进行了讨论,为利用基因工程技术进行定向育种提供了思路。

关键词: 法夫酵母, 虾青素, 合成途径相关基因

Research progress for biosynthetic pathway related genes of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*

LI Tian-Li¹ CAI Hui-Nong^{1,2,3} LI Li-Jun^{1*} NI Hui^{1,2,3} SU Wen-Jin^{1,2,3}

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Research Center of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology (Jimei University), Fujian Province, Xiamen, Fujian 361021, China)

(3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: The *Phaffia rhodozyma* has found commercial application as natural source of

基金项目: 省产学研重大专项项目(No. 2010N5009); 福建省自然科学基金项目(No. 2012J01137); 福建省教育厅科研基金项目(No. JA11152)

*通讯作者: Tel: 86-592-6181487; ✉: ljli@jmu.edu.cn

收稿日期: 2012-11-22; 接受日期: 2013-02-06

astaxanthin, a known antioxidant with large importance in the aquaculture, pharmaceutical, and food industries. To satisfy the growing demand for astaxanthin, there are strong efforts to develop economically viable bioprocesses alternative to the current chemical synthesis. However, up to now, natural astaxanthin from *P. rhodozyma* has not been cost competitive with chemically synthesized astaxanthin, and the knowledge about the carotenogenesis regulation is still limited in comparison to other carotenogenic fungi. The aim of this short review is to examine the published studies concerning the biosynthetic pathway of astaxanthin and the related genes in *P. rhodozyma*, and describe their applications to improve the bioprocess of astaxanthin production. It also mentions some gaps and opportunities in this field that should be addressed or exploited in the near future.

Keywords: *Phaffia rhodozyma*, Astaxanthin, Biosynthetic pathway related genes

虾青素(Astaxanthin)是类胡萝卜素的一种,其独特的共轭双烯以及不饱和羰基的分子特征赋予了它超强的抗氧化性,其淬灭活性氧的能力是其它类胡萝卜素的10倍甚至更高,是维生素E的80–550倍^[1]。目前虾青素主要作为一种功能性色素广泛应用于饲料、食品、化妆品等行业中。近年来,虾青素因其在心血管疾病、癌症、慢性炎症、代谢综合征、糖尿病、神经退行性疾病、眼科疾病、皮肤病等多种疾病的预防和治疗中具有突出的效果而受到了极大关注,这预示着虾青素在医药、营养保健品和化妆品等行业中的潜在应用价值和广阔前景^[2–3]。

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*)属于真菌界、真菌门、半知菌亚门、担子菌纲、隐球酵母科、法夫酵母属^[3–4],其代谢产物中含有虾青素。与目前常用的虾青素生产菌雨生红球藻相比,法夫酵母发酵生产天然虾青素具有发酵条件容易满足、发酵培养基简单、不受气候条件影响、易实现工厂化生产等优点。但野生型法夫酵母的虾青素细胞产率较低,往往无法满足产业化需求。很多研究者通过诱变育种、杂交育种以及改进发酵条件等手段使虾青素的产量有了显著提高,但对于虾青素生物合成途

径相关的调控机理目前仍知之甚少^[5]。

有关虾青素等类胡萝卜素合成途径中相关基因的研究,早期以植物、藻类以及细菌居多。国内外学者从雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、小球藻(*Chlorella zofingiensis*)、欧文氏菌(*Erwinia uredovora*)等生物体中克隆出了异戊烯焦磷酸异构酶基因、二甲基丙烯基焦磷酸合成酶基因、八氢番茄红素合成酶基因等一系列的类胡萝卜素合成相关基因^[6],并对它们的调控机理进行了深入而全面的研究。这些研究为法夫酵母虾青素合成途径中各个基因的调控提供了理论基础和依据。本文综述了法夫酵母虾青素合成途径以及合成途径中相关基因的研究进展,并对如何利用基因调控的方法提高虾青素产量进行了讨论,为利用基因工程技术构建高产菌株,进行菌种选育和生产工艺优化提供了思路和依据。

1 法夫酵母合成虾青素的途径

作为一种次生类胡萝卜素,虾青素在细胞内的合成步骤多且复杂。

在法夫酵母中,糖酵解途径产生的丙酮酸作

为前体物质进入甲羟戊酸(MVA)途径生成乙酰 CoA; 2 个乙酰 CoA 缩合成乙酰乙酰 CoA 后, 在 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶(HMG-CoA 合成酶)的催化下与第 3 个乙酰 CoA 结合生成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA(HMG-CoA); 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMG-CoA 还原酶)催化 HMG-CoA 生成 MVA, 最终生成萜类物质的前体物——异戊烯焦磷酸(IPP), 开始虾青素的合成途径(图 1)。

虾青素的合成首先是 IPP 通过 IPP 异构酶异构化为二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP); 在牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGPP 合成酶)的作用

下, 三分子的 IPP 依次添加到一个 DMAPP 中, 形成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)。随后, 两个 GGPP 缩合形成虾青素合成途径中第一个类胡萝卜素——八氢番茄红素(Phytoene), 催化这一过程的是八氢番茄红素合成酶, 它同时还具有番茄红素环化酶的活性。接着, 在八氢番茄红素脱氢酶的作用下, 八氢番茄红素连续四次脱氢, 依次形成六氢番茄红素(Phytofluene)、 ζ -胡萝卜素(ζ -Carotene), 链孢红素(Neurosporene)和番茄红素(Lycopene), 然后番茄红素的两端通过番茄红素环化酶环化生成 β -胡萝卜素。 β -胡萝卜素再经三步氧化反应最终合成虾青素, 中间依次形成海

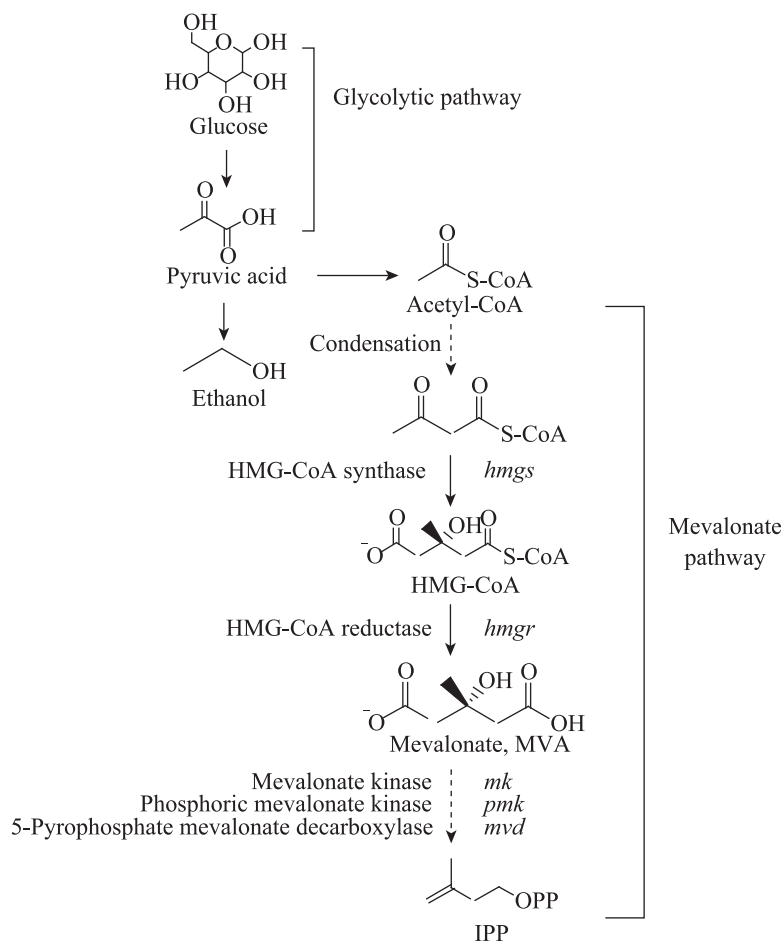


图 1 法夫酵母中异戊二烯焦磷酸的合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of isoprene pyrophosphate in *Phaffia rhodozyma*

胆酮(Echinone), 3-羟基海胆酮, 绯红黄素(Phoenicoxanthin)等。其它可能的存在中间体还包括隐黄质(Cryptoxanthin)、玉米黄质(Zeaxanthin)和 β -胡萝卜素-4-酮等。在这个过程中产生的类胡萝卜素都以双环的形式存在, 所以此途径又称为双环途径^[2,7](图2)。

除双环途径外, 一些学者根据细胞内类胡萝卜素成分组成, 类胡萝卜素合成抑制剂的使用, 以及突变株中类胡萝卜素成分的分析等, 提出法夫酵母中还存在着由链孢红素经 γ -胡萝卜素, 酵母素(Saccharomycetin), 3-羟基-3',4'-二脱氢- β , ψ -胡萝卜素-4-酮(HDCO), 3,3'-二脱氢- β , ψ -胡萝卜

素-4,4'-二酮(DCD)等, 最后生成虾青素的单环旁路途径。同时研究者认为当底物 pH 较低时, 代谢流倾向通过单环途径合成虾青素^[2-3,8]。

2 法夫酵母虾青素合成途径中的相关酶及其编码基因的调控

由于早期类胡萝卜素合成途径中相关基因的研究主要围绕植物、藻类以及细菌展开, 因此法夫酵母中类胡萝卜素合成途径的基因多在这些研究的基础上, 通过异源互补等技术分离得到。从异戊烯焦磷酸(IPP)开始, 研究者陆续克隆出了法夫酵母的异戊烯焦磷酸异构酶基因(*idi*)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因(*crtE*)、番茄红素环化酶基因(*crtYB*)、八氢番茄红素脱氢酶基因(*crtI*)、 β -胡萝卜素转化酶基因(*crtS*)以及细胞色素P450还原酶基因(*crtR*)等一系列相关基因。这些基因有的能够通过可变剪接产生不同的剪接产物, 有的基因能编码在不同合成步骤中发挥作用的双功能酶, 有的基因编码的酶需要辅酶才能催化合成相应的产物。除此之外, 在IPP上游途径中, 还涉及到 *hmgS*、*hmgR* 以及甲羟戊酸途径中的各个基因, 它们对类胡萝卜素的合成也有一定的调控作用。正因为如此, 研究各个反应步骤中相应酶和产物关系, 以及编码这些酶的基因相互间存在的影响和制约作用, 有着极其重要意义。表1总结了目前研究得到的法夫酵母的虾青素合成途径部分相关酶及其基因。

2.1 IPP 异构酶和基因(*idi*)

idi 基因编码法夫酵母异戊烯焦磷酸异构酶(IPP异构酶), 其DNA全长10 957个碱基, 含有4个外显子(GenBank: DQ235686.1)。IPP异构酶能催化位于甲羟戊酸途径末端异戊烯焦磷酸(IPP)转化为二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP), 进而激活五碳化合物链的延伸反应, 并通过调节IPP和DMAPP的比例来调节相关代谢终产物的

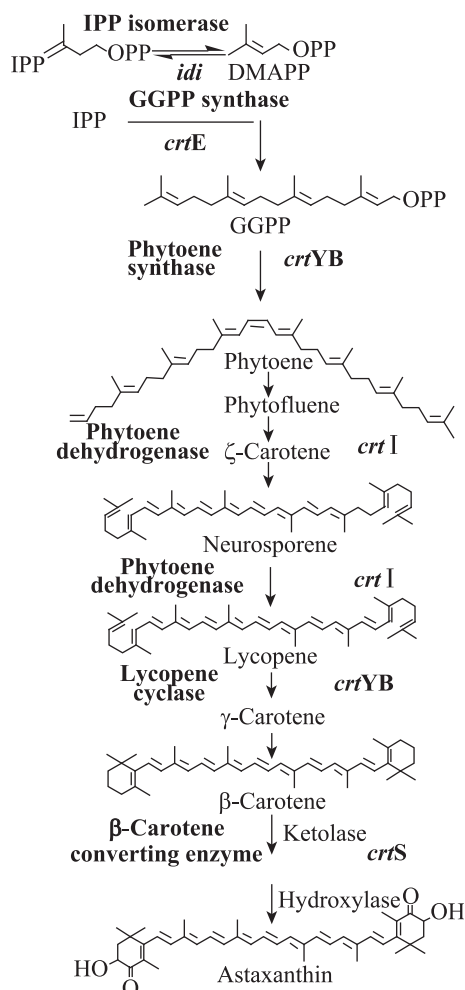


图2 法夫酵母中虾青素合成的双环途径

Fig. 2 The biosynthetic pathway of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*

表 1 法夫酵母虾青素生物合成途径中部分相关酶及其基因

Table 1 The related enzymes and their genes of the astaxanthin biosynthetic pathway in *Phaffia rhodozyma*

酶名称 The name of the enzymes	合成途径中的作用 The function of related enzymes in biosynthetic pathway	编码基因 The coding genes	登录号 Accession number
3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶 3-Hydroxy-3-methylglutaryl- CoA synthase	催化乙酰乙酰 CoA 合成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA	<i>hmgs</i>	E50999
3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 3-Hydroxy-3-methylglutaryl- CoA reductase	催化 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原形成甲羟戊酸	<i>hmgr</i>	E50998
甲羟戊酸激酶 Mevalonate kinase	催化甲羟戊酸合成 5-甲羟戊酸磷酸	<i>mk</i>	E51000
磷酸甲羟戊酸激酶 Phosphoric mevalonate kinase	催化 5-甲羟戊酸磷酸合成 5-甲羟戊酸焦磷酸	<i>pmk</i>	未检索到
5-焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶 5-Pyrophosphate mevalonate decarboxylase	催化 5-甲羟戊酸焦磷酸脱羧形成异戊烯焦磷酸(IPP)	<i>mvd</i>	未检索到
异戊烯焦磷酸异构酶 Isopentenyl pyrophosphate isomerase	催化异戊烯焦磷酸异构化形成二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)	<i>idi</i>	AB019035.1 DQ235686.1
牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	催化异戊烯焦磷酸缩合形成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)	<i>crtE</i>	DQ012943 DQ016502.1 DQ012943.1
八氢番茄红素合成酶 Phytoene synthase	催化 GGPP 缩合形成八氢番茄红素	<i>crtYB</i>	AY177204.1 AJ133646
番茄红素环化酶 Lycopene cyclase	催化番茄红素环化形成 β -胡萝卜素	<i>crtYB</i>	AY177204.1 AJ133646
八氢番茄红素脱氢酶 Phytoene dehydrogenase	催化八氢番茄红素的脱氢形成番茄红素	<i>crtI</i>	AY177424.1 Y15007 DQ028748.1 DQ002007.1
β -胡萝卜素转化酶 β -Carotene converting enzyme	羟化和酮化 β -胡萝卜素, 最终生成虾青素(尚不明确)	<i>crtS (asy)</i>	HM204708.1 AY946023.1 DQ202402.1
细胞色素 P450 还原酶 Cytochrome P450 reductase	辅助 β -胡萝卜素转化酶氧化 β -胡萝卜素	<i>crtR</i>	EU884134.1 EU884133.1

流向。法夫酵母中的类胡萝卜素均由异戊烯化合物合成, 因此, IPP 异构酶的表达水平会直接影响类胡萝卜素前体库的代谢流, 是下游代谢途径的总开关^[9-10]。

Verdoes 等^[9]最早从法夫酵母中克隆出了编码 IPP 异构酶的 *idi* 基因, 并在不产类胡萝卜素的粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中异源表达。理论上说, 如果能提高 IPP 的产量及 IPP 到 GGPP 的转化效率, 使合成类胡萝卜素的前体物质增加, 就可进一步提高类胡萝卜素产量。Visser 等^[11]构建了利用三磷酸甘油醛(gpd)强启动

子调节 *idi* 基因的转化株, 发现重组菌株的类胡萝卜素含量与对照的野生株相比反而降低; 而细菌系统中 *idi* 基因的过量表达可以使类胡萝卜素含量增加 1.3—3 倍。Wang 等^[12]以大肠杆菌为受体, 转入海洋细菌 *Agrobacterium aurantiacum crt* 基因簇生产虾青素, 并过量表达 *idi* 和 *crtE* 基因后, 转化株的虾青素细胞产率高达 1.25 mg/g。Lodato 等^[13]的研究结果显示, 法夫酵母菌株中 *idi* 基因的 mRNA 表达量在类胡萝卜素合成开始时下降, 并且他认为 *idi* 基因表达量的增加与类胡萝卜素产量的增加无必然的联系。以上研究结果说明,

idi 基因的表达水平确实会对下游途径产生影响,但在细菌和真菌中,可能存在着不同的调控方式。

2.2 GGPP 合成酶和基因(*crtE*)

crtE 基因编码牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶,包含 11 429 个碱基,8 个外显子(GenBank: DQ012943.1)。GGPP 合成酶催化三分子的 IPP 依次添加到一个 DMAPP 中,形成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)。与 IPP 一样,GGPP 也是许多二萜、类胡萝卜素、叶绿素、醌的前体,所以 GGPP 合成酶也能够起到调节碳流的作用。

研究者将携带欧文氏菌类胡萝卜素合成基因簇的质粒转化到大肠杆菌中,检测到番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄质;若将该转化质粒中的 GGPP 合成酶基因敲除,则类胡萝卜素产量降为原来的 2%–4%^[14]。由此推测在大肠杆菌中,除 GGPP 外,还存在其它前体物质,比如由法尼基焦磷酸(FPP)合成酶催化得到的 FPP 和 IPP。

国内外学者就法夫酵母中 *crtE* 基因对类胡萝卜素产量的影响进行了研究:宋熙^[15]研究了法夫酵母中 *crtE* 基因的过表达情况,发现自带启动子和带有 *gpd* 强启动子的重组菌株的虾青素产量均得到提升。Breitenbach 等^[16]在法夫酵母中过量表达 *crtE* 基因,其 β -胡萝卜素的产量增加了接近 2 倍,但虾青素的含量却没有相应的提高。Miao 等^[17]发现在不同的生长时期,法夫酵母高产菌株的 *crtE* 基因的表达水平高于野生型菌株 2–8 倍。Lodato 等^[18]的研究结果表明,与营养丰富的天然培养基(YM 培养基)相比,在基本培养基(MM 培养基)中培养的法夫酵母中的 *crtE* 表达水平更高,且能积累更多的类胡萝卜素。

综上所述,与细菌不同,在法夫酵母中类胡萝卜素很可能只存在 GGPP 一种前体,*crtE* 基因表达水平与 GGPP 及下游产物的产量呈现出一定的相关性,因此通过调控 *crtE* 基因来调节 GGPP 的合成,可以达到在一定范围内提高类胡萝卜素的

产量的作用,但要达到提高虾青素产量的目的,可能还需要对 *crtE* 下游的途径进行调控。

2.3 八氢番茄红素合成酶/番茄红素环化酶和基因(*crtYB*)

crtYB 编码一个双功能的酶蛋白,包含 5 917 个碱基,5 个外显子(GenBank 登录号 DQ016503.1)。此酶既具有八氢番茄红素合成酶活性,催化 GGPP 合成八氢番茄红素;也有番茄红素环化酶的活性,催化番茄红素合成 β -胡萝卜素。*crtYB* 转录后可产生两种产物——成熟 mRNA (Mature mRNA, mmRNA) 和可变拼接 mRNA (Alternatively spliced mRNA, amRNA)。这两种产物中,只有 mmRNA 能翻译成双功能蛋白,而 amRNA 由于其序列有很多终止密码子,较难被完整翻译出来,剪接后得到 amRNA 保留了第一个内含子的 55 bp 片段,而第二个外显子缺少了 111 bp^[19]。

Lodato 等^[13]研究发现,在野生菌株及高产菌株中,两种剪接产物的表达量均在类胡萝卜素合成开始前达到最大,而在稳定期迅速衰减;在对数生长中期,高产菌株的 *crtYB* 的 mmRNA 表达量及 amRNA 表达量均高于野生菌株,而在稳定生长期,两个菌的两种剪接产物的表达则都处于很低的水平。Wozniak 等^[20]用不同碳源培养法夫酵母,发现不同于葡萄糖为碳源的培养基,在以琥珀酸为碳源的培养条件下,amRNA 的表达趋势比 mmRNA 滞后,mmRNA 和 amRNA 的表达量在指数期达到峰值,随后便逐渐降低,而类胡萝卜素在稳定期末期开始大量积累。在 Marcolleta 等^[21]的研究中发现乙醇的添加使 *crtYB* 的 mmRNA 水平增加了 4.5 倍,但是 amRNA 的表达水平没有明显变化,同时虾青素的含量与未添加乙醇时相比也略有上升。

Visser 等^[11]将法夫酵母中的 *crtYB* 基因敲除后,得到了一株不产类胡萝卜素的白色菌株。

Verdose 等^[22]将 *crtYB* 基因连接到一个同源的 *gpd* 启动子上进行 *crtYB* 基因的过量表达, 检测到 β -胡萝卜素和海胆酮等产物的大量积累; 也有研究表明当番茄红素环化酶活力增强时, 酵母素和 HDCO 的生成量减少^[23]。由此推测可能是由于番茄红素环化酶的活性提高促进了双环类胡萝卜素的生产, 但进一步研究发现这些产物的积累并没有带来虾青素产量的相应提高。这说明在 *crtYB* 基因过量表达的情况下, 从 β -胡萝卜素到虾青素的转化过程还受到严格的调控, β -胡萝卜素和海胆酮接下去的氧化反应可能是产虾青素的一个重要限速步骤。

这些实验结果说明, 在法夫酵母中, *crtYB* 基因的表达水平虽然能起到调节相应类胡萝卜素的产量, 但对下游虾青素的产量影响不大, 而且在不同的培养基中, 还存在着其他的调控形式(如酶活性的调节)影响类胡萝卜素的合成。因此, 在虾青素合成途径, 该酶活性的精确调控极其重要。

2.4 八氢番茄红素脱氢酶和基因(*crtI*)

crtI 基因编码八氢番茄红素脱氢酶, 包含 15 778 个碱基, 12 个外显子(GenBank 登录号: DQ028748.1), 是法夫酵母中分离得到的第一个类胡萝卜素合成基因, 负责催化八氢番茄红素脱氢生成番茄红素。同 *crtYB* 一样, 基因 *crtI* 也能产生 mmRNA 和 amRNA 两种剪接产物。mmRNA 能翻译得到八氢番茄红素脱氢酶蛋白, 其编码区含有 11 个内含子; amRNA 保留了第一个内含子 80 bp 的序列, 它的翻译过程中会遇到多个终止密码子, 因此推测该产物如能翻译也只能得到一个 N 端缺少 81 个氨基酸的无活性的多肽^[19]。Lodato 等^[13]研究了法夫酵母野生菌株和虾青素高产菌株中 *crtI* 的表达情况, 发现 *crtI* 的 mmRNA 和 amRNA 的表达趋势基本一致, 在对数生长初期均呈现较大值, 后呈现递减趋势。由此可以推断, 与稳定期相比, 对数生长初期菌体中可能存

在较多的 *crtI* mmRNA 来合成八氢番茄红素脱氢酶。

Visser 等^[11]发现, 法夫酵母八氢番茄红素脱氢酶和番茄红素环化酶之间的竞争结果决定了番茄红素的代谢流是朝着 β -胡萝卜素转化成虾青素的方向, 还是通过 3,4-二氢番茄红素(3,4-Didehydrolycopen)生成 HDCO。Verdoes 等^[22]的研究表明当 *crtI* 基因过度表达时, 单环类胡萝卜素(例如酵母素和 HDCO)产量有所增加, 而双环类胡萝卜素(如海胆酮、 β -胡萝卜素和虾青素)则会减少。还有学者发现野生型法夫酵母过表达 *crtI* 基因时, 类胡萝卜素的产量得到了提高, 而在只积累 β -胡萝卜素不产虾青素的法夫酵母突变株中同样过表达 *crtI* 基因, 却出现了类胡萝卜素的含量减少, 菌株颜色变浅的现象^[11]。这进一步说明过高的 *crtI* 表达量反而不利于双环番茄红素的大量积累。由此推测八氢番茄红素脱氢酶和番茄红素环化酶可能对途径代谢方向具有联合调控作用。

2.5 β -胡萝卜素转化酶和基因(*crtS*)

crtS 基因编码 β -胡萝卜素转化酶, 包含 5 920 个碱基, 17 个外显子(GenBank 登录号 DQ201828.1)。关于 *crtS* 基因的功能问题, 至今仍然存在着争议。从 β -胡萝卜素形成虾青素的过程中, 需要酮化酶在 β -胡萝卜素 4 和 4'的位置各引入一个酮基, 羟化酶在 β -胡萝卜素 3 和 3'的位置上各引入一个羟基。在大部分的生物中, 这个步骤中涉及的两个酶是由两个独立的基因编码合成的, 但目前研究人员在法夫酵母中仅分离出了 *crtS* 基因。Ojima 等^[24]根据添加细胞色素 P450 氧化酶抑制剂对法夫酵母类胡萝卜素种类及累积量的影响, 以及将 *crtS* 导入可产 β -胡萝卜素的大肠杆菌时检测到海胆酮的实验结果, 提出该酶有羟化和酮化两种功能的假说。然而 Alvarez 等^[25]有不同的看法, 他们将法夫酵母的 *crtS* 基因导入

能产 β -胡萝卜素的毛霉工程菌时只检测到 β -胡萝卜素的羟化产物 β -隐黄质和玉米黄质,因此认为 β -胡萝卜素转化酶只有羟化的功能。就目前的研究结果来看, β -胡萝卜素转化酶的作用机理及酶学性质等还有待进一步深入的研究。

正是因为如此,关于该基因的命名,也存在多种说法。由于该基因是目前法夫酵母中从 β -胡萝卜素到虾青素转化过程中克隆得到的唯一基因,国外有些学者将其命名为虾青素合成酶基因(Astaxanthin synthase gene)^[24]。但鉴于该基因的功能尚存在争议,它所编码的酶是否能催化 β -胡萝卜素到虾青素的完整过程还没有定论,所以笔者认为,将其命名为 β -胡萝卜素转化酶基因(β -Carotene converting enzyme gene)更为合适。在本文中,为了与其它基因命名统一,仍然使用*crtS*作为该基因的简称。

Ojima等^[24]对 β -胡萝卜素转化酶的氨基酸序列进行生物信息学分析,发现该酶的N端存在一段高度疏水区域,为膜锚定信号,推测 β -胡萝卜素转化酶是以膜蛋白的形式存在于法夫酵母中。Niklitschek等^[26]将法夫酵母中的*crtS*基因敲除,得到了一株产类胡萝卜素不产虾青素的黄色菌株。Lodato等^[13]用半定量的方法检测*crtS*基因的表达与虾青素的关系,发现在高产突变菌株中,*crtS*基因的表达与代谢产物中虾青素含量的增加正相关。Miao等^[17]的实验结果表明高产菌株中*crtS*基因的表达量是野生型菌株的6-20倍。笔者通过实时定量的方法比较了3株不同性状法夫酵母菌株中*crtS*基因的表达情况,发现在整个生长时期高产菌株中*crtS*基因的表达量均高于低产菌株的2-10倍,在不产虾青素的突变株中,*crtS*也有少量表达,表达量仅为高产菌的5%左右。上述研究都是在以葡萄糖等发酵碳源对法夫酵母培养得到的结果,而分析利用非发酵碳源琥珀酸培养的法夫酵母发现,在*crtS*基因表达量上升前

虾青素浓度就已经增加,且*crtS*基因的表达量与虾青素的合成之间也没有体现出直接关系^[20];同时也有研究发现在培养基中添加乙醇会引起法夫酵母中*crtS*的表达量和虾青素含量的增加^[21],这些结果说明,*crtS*的表达水平在一定程度上会影响虾青素的合成,但是为什么一些非发酵碳源的使用(如琥珀酸、乙醇、甘油等)可以促进虾青素的积累还需要更加深入的研究。

2.6 细胞色素 P450 还原酶和基因(*crtR*)

*crtR*基因编码细胞色素 P450 还原酶, DNA 总长 15 477 bp, 仅含有 3 个外显子(GenBank 登录号: EU884133.1)。由于 β -胡萝卜素转化酶属于细胞色素 P450 单加氧酶 3A 亚家族蛋白,而细胞色素 P450 酶需要一个含氧的官能团作为底物的电子供体,所以研究认为*crtS*需要细胞色素 P450 还原酶(CPR)作为辅酶来完成从 β -类胡萝卜素到虾青素的途径^[27]。

Ojima等^[24]在转化了具有合成 β -胡萝卜素功能的基因簇、法夫酵母的*crtS*基因以及酿酒酵母 CPR 基因的大肠杆菌中,只检测到了一些被氧化的 β -类胡萝卜素的衍生物,并没有检测到虾青素。Ukibe等^[28]在能生产 β -胡萝卜素的酿酒酵母菌株里共表达法夫酵母的*crtS*和*crtR*基因,得到少量的虾青素。分析原因可能是异源的细胞色素 P450 还原酶不能辅助法夫酵母的*crtS*合成虾青素。Alvarez等^[25]从法夫酵母中克隆出编码细胞色素 P450 羟化酶的基因,转化到虾青素合成能力受阻的法夫酵母菌株后,使其恢复了合成能力,就进一步说明*crtR*基因对于 β -胡萝卜素虾青素的合成来说是必不可少的。

由于*crtS*和*crtR*是相辅相成的,Alcaíno等^[29]研究了*crtS*和*crtR*的 mRNA 表达水平和法夫酵母生长的关系,发现*crtS*和*crtR*在生长的不同阶段中 mRNA 水平的变化趋势并不相同。*crtR*在整个生长过程中的表达量几乎保持不变,而*crtS*在

66 h 左右达到最大后逐渐降低。由于 *crtR* 所编码的细胞色素 P450 还原酶可能还参与到了法夫酵母中其他细胞色素 P450 的合成中, 所以这两个基因的调节可能是在不同的转录水平上进行的。但 *crtR* 基因的表达水平是否会对虾青素的合成产生影响, 目前还缺乏相关的研究。

2.7 其它相关基因的研究

法夫酵母类胡萝卜素的生物合成是一个复杂的过程, 目前很多相关的调控机制仍是未知的。除了以上提到的几个基因外, 上游途径 *mk*、*pmk*、*mvd*、*hmgr*、*hmgs* 等基因的表达情况对类胡萝卜素的产量也会产生影响。

mk、*pmk*、*mvd* 分别编码甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶, 5-焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶, 这几个酶依次催化从甲羟戊酸到 IPP 的过程。有关 *mk* 基因功能的研究在植物、动物中报道较多, 微生物中较少。Bai 等^[30]研究了甲羟戊酸激酶的反馈抑制作用, 认为在包括酿酒酵母、法夫酵母等的微生物中, 甲羟戊酸激酶的活性能够起到调控下游异戊烯类化合物合成的作用。Martinez 等^[31]从蛋白组学的角度研究了法夫酵母的甲羟戊酸途径中包括甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶, 5-焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶等一系列酶关系, 研究表明, 这些酶的相互作用会直接影响类胡萝卜素的合成。

hmgs 和 *hmgr* 基因是上游途径中研究较多的两个基因, 它们分别编码 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶(HMG-CoA 合成酶)和 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMG-CoA 还原酶)。Johnson 等^[32]早在 1977 年的研究就发现, 抗 HMG-CoA 还原酶抑制剂的法夫酵母菌株为类胡萝卜素高产菌。Wang 等^[33]通过提高粗糙脉孢霉胞内 HMG-CoA 还原酶基因的 mRNA 水平, 使其胞内的类胡萝卜素的含量也有所提高。Guo 等^[34]研究发现, 在酿酒酵母中过量表达 *hmgr* 基因可以提

高类胡萝卜素的产量。Gu 等^[35]研究发现乙醇的添加能够提高法夫酵母细胞中 HMG-CoA 还原酶活性, 并可促进胞内虾青素的合成。这些研究有助于解释上文中非发酵碳源增加对类胡萝卜素合成的影响, 同时也可表明 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 形成甲羟戊酸的过程是类异戊二烯生物合成中一个重要步骤, 可能直接影响下游途径中类胡萝卜素的合成代谢。

3 基于基因调控的产量提高策略

虽然经过国内外专家学者的不断研究, 已逐个克隆出法夫酵母中虾青素合成的相关基因, 但对于虾青素的合成途径和代谢调节机理, 以及这些基因在途径中的相互关系研究还不够深入。目前主要通过异源表达进行功能互补研究, 个别基因通过敲除和过量表达来研究其对代谢产物的影响。如何能根据现有的研究情况, 较系统、深入地了解法夫酵母虾青素合成代谢调控机理与相关酶的调控形式, 指导定向育种, 是提高育种效率的关键问题。

3.1 选择合适的宿主构建工程菌

利用法夫酵母虾青素合成相关基因, 选择合适的宿主构建工程菌来提高虾青素的产量, 可以有以下两种思路: (1) 用能快速增殖、遗传背景清楚、基因操作方便的微生物为宿主, 导入法夫酵母的虾青素合成相关基因簇来生产虾青素; (2) 以法夫酵母本身为代谢工程的受体, 通过改变相关酶的数量、活力以及调控机制, 实现虾青素合成正相关酶的高效表达。

大肠杆菌不能合成类胡萝卜素, 但它含有的成分如多萜醇、苯醌和甲基萜醌等与类胡萝卜素一样, 都是由共同前体 FPP 转化而来。有学者在大肠杆菌中导入异源的类胡萝卜素合成基因产类胡萝卜素获得了成功。从理论上讲, 在大肠杆菌中导入法夫酵母的虾青素合成相关基因簇也

可使大肠杆菌积累虾青素。Alcaino 等^[29]将携带了法夫酵母 *crtR* 和 *crtS* 基因 cDNA 共转化到可产 β -胡萝卜素的大肠杆菌中,并且用反相高效液相色谱法分析了类胡萝卜素的产量,发现没有产生任何 β -胡萝卜素的含氧衍生物。他们认为,一方面可能是由于大肠杆菌中不能表达 β -胡萝卜素转化酶,或者是 β -胡萝卜素转化酶的活性非常的低;另一方面,细胞色素 P450 系统与细胞膜相关,大肠杆菌没法提供其适应的环境。除此之外,如果大量增加 IPP 等前体的合成可能导致大肠杆菌中用于贮存类胡萝卜素的膜负荷超载,使大肠杆菌菌株产生毒害甚至致死^[18]。因此,对于法夫酵母中的类胡萝卜素形成基因来说,真核生物表达系统可能更为合适。

真核生物中的酿酒酵母是常用的宿主菌,被称为真核生物中的“大肠杆菌”。酿酒酵母不能合成类胡萝卜素,但体内积累的麦角固醇也是类异戊二烯化合物,可作为类胡萝卜素的前体物质。Ausich 等^[36]的一项专利通过将欧文氏菌的类胡萝卜素合成基因转化到酿酒酵母中,成功在酿酒酵母转化体上获得了番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄质。Verwaal 等^[37]在可产番茄红素的酿酒酵母中过量表达法夫酵母的 GGPP 合成酶,并引入 *tHMG1* 基因,使番茄红素的产量增加 2.1–3.0 倍。但是, Ojima 等^[24]研究发现酿酒酵母的 CPR (细胞色素 P450 还原酶)基因无法辅助 β -胡萝卜素转化酶合成虾青素。就目前的研究结果来看,利用酿酒酵母作为受体菌表达虾青素合成相关基因还需要进一步的研究。

除此之外,也有学者利用其他生物体来表达虾青素合成相关基因,各种基因工程手段的运用确实提高了虾青素及类胡萝卜素的产量。但由于这些受体自身的限制,如有的生物本身的细胞结构不适合积累大量虾青素,有的外源的基因对宿主本身正常基因的影响不可预知,有的细胞胞内前

体物质较少等,构建的工程菌往往不能达到产业化要求。所以目前通过异源表达还不能达到高产虾青素的目的。因此,利用性状良好的法夫酵母菌株,并对其基因进行操控,定向改造其虾青素合成途径可能具有更好的前景。

3.2 代谢途径多基因协同调控

许多生物中,如已报道的雨生红球藻和粗糙脉孢菌中的类胡萝卜素产量与其对应的基因表达水平有直接联系。但 Wozniak 等^[20]研究了法夫酵母的 *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS* 在指数期和稳定期 mRNA 水平的表达差异,认为 mRNA 的表达和酶活性并没有直接关系,他提出,法夫酵母是一个特殊的有机体,其类胡萝卜素基因的转录调控作用不处于调控的第一线。但是从目前的研究结果来看,由于法夫酵母合成虾青素的代谢网络十分复杂,代谢流可能受到多个基因的联合控制,且有些基因还同时参与到不同的合成步骤中,因此各个基因及其酶之间的关系,以及它们是否存在协同作用还有待进一步研究。

从整体水平上对类胡萝卜素合成相关基因的研究已经展开, Wang 等^[38]以番茄红素生物合成途径的 20 个相关基因,建立了一种能对大量基因的转录水平进行同时调控的方法(MAGE),实现了对全部基因转录水平的整体调控,该实验在 3 d 之内就筛选到了一株番茄红素产量提升 5 倍以上的大肠杆菌突变株。这为法夫酵母中虾青素合成相关基因的整体调控提供了参考,如果能对法夫酵母整个类胡萝卜素代谢网络的基因进行分析及操作,将有望达到全面发掘与提升产物合成能力的目标。

4 现状与展望

近年来,虾青素以其卓越的抗氧化能力及优良的生物学功能受到国内外饲料、保健品、医药、化妆品等行业的广泛关注。法夫酵母作为唯一能

够利用多种廉价碳源生物合成虾青素的酵母, 其潜在产业价值和商业前景日益凸显。本实验室通过菌种选育、发酵条件优化和控制等获得了较高的虾青素产量, 其中高产菌株 JMU-MVP14 的虾青素细胞产率可达 4.94 mg/g^[39]。

尽管国内外已经开展了一系列从法夫酵母中获得虾青素的相关研究, 但利用基因工程及代谢工程手段调控虾青素合成的相关研究还不够深入, 主要存在以下几个方面的问题: (1) 由于虾青素是次级代谢产物, 在生物细胞内的合成步骤多而复杂, 直接导致虾青素高产菌株筛选模型研究的滞后及高产菌株筛选效率低; (2) 虾青素的合成受多个基因联合控制, 单个基因位点的突变或简单的分子操作很难使产量大幅度提高; (3) 虾青素合成途径中存在多功能酶现象, 并且同时参与主流代谢途径和旁路代谢途径, 增强了调控的难度; (4) 法夫酵母中初生代谢途径与次生代谢途径相互关系的研究较少, 虾青素本身合成途径中仍有很多不明确的地方, 这些都亟待进一步的研究。

综上所述, 今后不论是对法夫酵母虾青素发酵菌种的合成途径进行遗传改良, 还是利用其它微生物重建虾青素生物合成途径, 都必须全面深入了解法夫酵母虾青素合成的代谢调控机理, 真正实现对其代谢流的理性改造。相信随着法夫酵母基因克隆、转化方法的不断发展, 虾青素合成途径的调控机制的逐渐阐明, 利用基因工程和代谢调控的手段指导法夫酵母的定向育种将具有越来越广阔的前景, 也必将成为今后研究的重要发展趋势。

参 考 文 献

- [1] Maoka T, Etoh T, Osawa A, et al. Characterization and singlet oxygen quenching activity of (3R)-3-hydroxy-4-ketotetrolene and (3R)-3-hydroxy-4-keto- γ -carotene from the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Journal of Oleo Science, 2012, 61(7): 401-406.
- [2] Rodríguez-Sáiz M, Juan LF, José LB. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(3): 645-658.
- [3] Martín JF, Gudiña E, Barredo JL. Conversion of beta-carotene into astaxanthin: two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein?[J]. Microbial Cell Factories, 2008, 7(1), doi:10.1186/1475-2859-7-3.
- [4] Mcd P. Biogeography of *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a yeast with biotechnological potential: population mapping and host associations[D]. Portugal: Universidade de Lisboa, 2011: 1-35.
- [5] de la Fuente JL, Rodríguez-Sáiz M, Schleissner C, et al. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 148(2/3): 144-146.
- [6] Yuan JP, Peng J, Yin K, et al. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 150-165.
- [7] Verdoes JC, Sandmann G, Visser H, et al. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3728-3738.
- [8] Schmidt I, Schewe H, Gassel S, et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3): 555-571.
- [9] Verdoes JC, Van Ooyen AJJ. Isolation of the isopentenyl diphosphate isomerase encoding gene of *Phaffia rhodozyma*; improved carotenoid production in *Escherichia coli*[J]. Acta Botanica Gallica, 1999, 146(1): 43-53.
- [10] 刘巖, 李娅, 李连强, 等. 异戊烯基焦磷酸(IPP)

- 异构酶的生物信息学分析[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6018–6019, 6023.
- [11] Visser H, van Ooyen AJ, Verdoes JC. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4(3): 221–231.
- [12] Wang CW, Oh MK, Liao JC. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62(2): 235–241.
- [13] Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, et al. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Biological Research, 2007, 40(1): 73–84.
- [14] 陶俊, 张上隆, 徐昌杰, 等. 类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程[J]. 生物工程学报, 2002, 18(3): 276–281.
- [15] 宋熙. 红发夫酵母 GGPP 合成酶过量表达对虾青素产量的影响[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2010: 1–60.
- [16] Breitenbach J, Visser H, Verdoes JC, et al. Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(4): 755–761.
- [17] Miao L, Chi S, Tang Y, et al. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(2): 192–201.
- [18] Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, et al. Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*)[J]. Biological Research, 2004, 37(1): 83–93.
- [19] Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, et al. Alternative splicing of transcripts from crtI and crtYB genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4676–4682.
- [20] Wozniak A, Lozano C, Barahona S, et al. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(3): 252–262.
- [21] Marcoleta A, Niklitschek M, Wozniak A, et al. “Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*”[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 190. doi:10.1186/1471-2180-11-190.
- [22] Verdoes JC, Krubasik KP, Sandmann G, et al. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1999, 262(3): 453–461.
- [23] 贾立壮, 王远山, 郑裕国. 红发夫酵母积累虾青素的代谢调控机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 103–106.
- [24] Ojima K, Breitenbach J, Visser H, et al. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 275(2): 148–158.
- [25] Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, et al. The crtS gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β -carotene into astaxanthin and other xanthophylls[J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43(4): 261–272.
- [26] Niklitschek M, Alcaíno J, Barahona S, et al. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Biological Research, 2008, 41(1): 93–108.
- [27] Tao L, Wilczek J, Odom JM, et al. Engineering a β -carotene ketolase for astaxanthin production[J]. Metabolic Engineering, 2006, 8(6): 523–531.
- [28] Ukibe K, Hashida K, Yoshida N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(22): 7205–7211.
- [29] Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, et al. Cloning

- of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. BMC Microbiology, 2008, 8(1), doi:10.1186/1471-2180-8-169.
- [30] Bai R, Wyss M. IMPROVED MEVALONATE KINASE. WO2006063752: United States, EP2005013282 [P]. 2005,12.
- [31] Martinez-Moya P, Watt SA, Niehaus K, et al. Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 131. doi:10.1186/1471-2180-11-131.
- [32] Johnson EA, Conklin DE, Lewis MJ. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1977, 34(12): 2417-2421.
- [33] Wang GY, Keasling JD. Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*[J]. Metabolic Engineering, 2002, 4(3): 193-201.
- [34] 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*[J]. Current Microbiology, 2012, 64(2): 159-163.
- [35] Gu WL, An GH, Johnson EA. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1997, 19(2): 114-117.
- [36] Ausich RL, Brinkhaus FL, Mukharji I, et al. Biosynthesis of carotenoids in genetically engineered hosts, WO1991013078: United States, US1991001458[P]. 1991, 4.
- [37] 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*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(13): 4342-4350.
- [38] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-898.
- [39] 倪辉, 洪清林, 肖安风, 等. 一株法夫酵母虾青素高产菌株的生产性能[J]. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1065-1075.

科技信息摘录

广东省生态环境与土壤研究所发现胞外呼吸菌新种

广东省生态环境与土壤研究所研究员周顺桂领衔的环境微生物工程团队, 在胞外呼吸菌的筛选和研究方面取得一系列重要进展, 为研究胞外呼吸菌的功能基因组、电子转移机制、代谢网络及生物信息学提供了宝贵资源, 并拓宽了人类对微生物呼吸多样性的认识。

据介绍, 胞外呼吸是近年来新发现的微生物能量代谢方式, 主要包括铁呼吸、腐殖质呼吸与产电呼吸三种形式。胞外呼吸菌的筛选鉴定, 是胞外呼吸研究的关键和基础。周顺桂团队发现了一株铁还原菌 SgZ-3T, 并将其认定为分类学上的新属, 命名为中国红球菌属的 *S. ferrireducens* 新种。SgZ-3T 菌株在系统发育分析上与光合细菌 *Rhodobacter* 属十分相近, 但不含细菌光合色素及内膜囊泡, 以铁呼吸的功能替代了光合作用。这一重要特性使其独立于 *Rhodobacter* 而成为单独的属。

——摘自《科学网》2013/8/27

<http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2013/8/281680.shtml>

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>