

法夫酵母 β -胡萝卜素转化酶(Asy)基因的克隆及可溶性表达研究

曹樱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: 【目的】从高产虾青素的法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) 7B12 菌株中克隆 β -胡萝卜素转化酶基因(β -Carotene converting enzyme gene, *asy*), 并将该基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行可溶性表达, 为深入研究该酶的性质及应用提供基础。【方法】采用 cDNA 末端快速扩增技术, 克隆得到 *asy* 基因全长 cDNA 序列, 将其克隆到表达载体 pET32a 中, 通过优化温度和 IPTG 浓度提高其可溶表达量; 进一步在 *E. coli* BL21(DE3)中共表达携带 *asy* 基因的重组质粒和 pACCAR16 Δ crtx 质粒(携带由乙酰辅酶 A 合成 β -胡萝卜素的基因链), 用液相色谱分析共转化菌株中类胡萝卜素种类的变化, 鉴定可溶性表达的 Asy 酶活性。【结果】法夫酵母 7B12 菌株 *asy* 基因的 cDNA 序列与 GenBank 能检索到的唯一一条 *asy* 基因 mRNA 序列(Accession No. DQ002007.1)一致性达到 97%, 该序列总长 1 971 bp, 最大开放阅读框为 1 614 bp, 编码 538 个氨基酸, 在 *E. coli* BL21(DE3)中表达的 Asy 融合蛋白分子量约为 70 kD; 条件优化后转化 *asy* 基因的重组菌在 26 °C、0.5 mmol/L IPTG 的条件下诱导时, 可溶性融合蛋白比例达 85%。与 pACCAR16 Δ crtx 单质粒转化相比, 共转化 pACCAR16 Δ crtx 及 *asy* 基因的菌株类胡萝卜素产物的成分发生了明显的变化, 其中 α -胡萝卜素的含量明显减少, 伴随出现了 3 种新的色素, 根据出峰时间判断其中一种为 β -胡萝卜素和虾青素的中间产物—— β -隐黄质。【结论】从法夫酵母中克隆得到 *asy* 基因, 通过优化诱导温度及 IPTG 浓度等条件提高了该基因在 *E. coli* BL21(DE3)中的可溶性表达量, 经鉴定可溶性的 Asy 融合蛋白具有转化 β -胡萝卜素的活性。

关键词: 法夫酵母, β -胡萝卜素转化酶, 克隆, 可溶性表达, 活性分析

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; E-mail: ljli@jmu.edu.cn

收稿日期: 2012-05-16; 接受日期: 2012-10-17

Cloning and soluble expression of β -carotene converting enzyme (Asy) gene from *Phaffia rhodozyma*

CAO Ying¹ 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), Xiamen, Fujian 361021, China)

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

Abstract: [Objective] We cloned the cDNA of β -carotene converting enzyme gene (*asy*) from *Phaffia rhodozyma* 7B12, a high astaxanthin-producing strain, and expressed the recombinant pET32-*asy* in *E. coli* BL21(DE3). Our work could lead to an important use for the study of Asy properties and further applications *in vitro*. **[Methods]** Using RACE method, we cloned the *asy* cDNA from *Phaffia rhodozyma* 7B12, and constructed recombinant plasmid pET32-*asy*. After optimizing the temperature and IPTG concentration, the soluble expression of Asy was achieved in *E. coli* BL21(DE3). pET32-*asy* and pACCAR16 Δ crtx which carried the genes chain on the synthesis of beta-carotene by acetyl CoA were co-transformed into *E. coli* BL21(DE3), and the changes of carotenoid species were analyzed by HPLC to detect the activity of Asy. **[Results]** The homology between new cloned cDNA sequence of *asy* gene (accession No. HM204708.1) and the only reported *asy* mRNA sequence (accession No. DQ002007.1) was 97%. The obtained cDNA was 1 971 bp in length, the longest open reading frame was 1 614 bp encoding 538 amino acids, and therefore the fusion protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) was about 70 kD. At the optimizing condition (induced by 0.5 mmol/L IPTG, at 26 °C, 5 h), 85% fusion protein expressed by recombinant pET32-*asy* was soluble. Compared the components of pigment in the *E. coli* strain only transformed with pACCAR16 Δ crtx with the strain co-transformed with pACCAR16 Δ crtx and pET32-*asy*, we found some changes of carotenoid components. The peak presented α -carotene was disappeared and three new peaks were shown, suggested that β -cryptoxanthin which is one of themetabolic intermediates between β -carotene and astaxanthin were produced because of Asy expression. **[Conclusion]** Astaxanthin synthase cDNA was cloned from *Phaffia rhodozyma* 7B12 and the soluble expression of astaxanthin synthase in *E. coli* BL21(DE3) was obtained. The fusion protein had a certain activity to transform β -carotene.

Keywords: *Phaffia rhodozyma*, β -Carotene converting enzyme, Clone, Soluble expression, Activity analysis

虾青素(Astaxanthin), 又名 3,3'-二羟基- β , β '-胡萝卜素-4,4'-二酮, 呈红色, 是一种萜类色素,

自然界中虾青素主要由浮游生物合成, 部分海洋无脊椎动物、鱼类及鸟类由于摄食含有虾青素的

生物而呈红色^[1]。20 世纪 80 年代化学合成虾青素获美国 FDA (美国食品药品监督管理局) 批准用于饲料添加剂^[2]。后来研究表明虾青素具有极强的抗氧化、淬灭自由基的能力, 并能通过促进抗体生成来增强机体免疫能力^[3], 鉴于这些功能, 虾青素在食品添加、化妆品及医药等领域也具有广泛的应用前景。

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)是目前研究最多的产虾青素酵母^[4], 其生产的天然虾青素于 2000 年经 FDA 批准, 可用作食品添加剂^[5]。在法夫酵母中, 乙酰辅酶 A 首先经过甲羟戊酸途径转变为异戊烯焦磷酸(Isopentenyl pyrophosphate, IPP), 然后 IPP 通过异构、缩合、脱氢、环化等步骤合成 β -胡萝卜素(β -Carotene), 最后 β -胡萝卜素两端环上的 C-3、C-4 经羟化和酮化作用后即为虾青素(图 1)。

目前, 法夫酵母 β -胡萝卜素到虾青素转化过

程中只克隆得到一个基因, 即编码 β -胡萝卜素转化酶的基因(β -Carotene converting enzyme gene, *asy*), 关于该酶的功能至今仍然存在着争议。2006 年, Alvarez 等将法夫酵母的 *asy* 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, 因此推测 *Asy* 酶至少具有羟化的功能^[7]。同年, Ojima 等检测了添加 *Asy* 酶抑制剂时, 法夫酵母类胡萝卜素产物的种类及积累量的变化, 并根据结果提出 *Asy* 酶同时具备羟化和酮化的功能^[8]。Ukibe 等通过法夫酵母 *asy* 和 *asr* 基因(细胞色素 P450 还原酶基因)的异源表达成功地在酿酒酵母中合成了虾青素, 由此判断 *asy* 酶具备羟化和酮化两种功能^[9]。

此外, 研究还表明 *Asy* 酶是以膜蛋白的形式少量存在于法夫酵母中^[8], 因为从法夫酵母中提取膜蛋白, 再从膜蛋白中分离出 *Asy* 酶, 技术上存在着一定的困难, 这也是目前为止法夫酵母

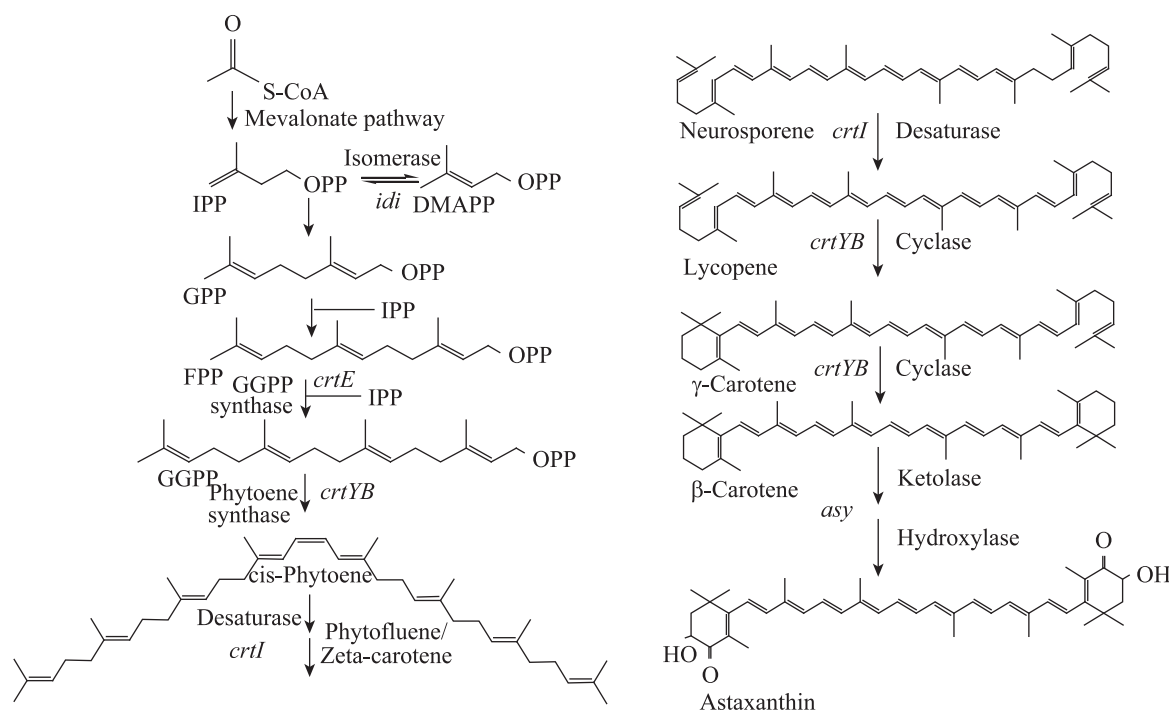


图 1 法夫酵母类胡萝卜素合成的途径^[6]

Fig. 1 Carotenoid-biosynthetic pathways in *Phaffia rhodozyma*^[6]

Asy 酶的研究仍停留在基因水平的主要原因之一。本研究通过 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术, 从实验室前期诱变获得的虾青素高产菌株法夫酵母 7B12 中克隆得到 *asy* 基因, 并采用原核表达技术在 *E. coli* BL21(DE3)中大量表达 Asy 酶, 为研究该酶的酶学性质提供材料, 同时为探索在体外以低成本的 β -胡萝卜素(\$ 600/kg)为底物, 酶法合成反式虾青素(\$ 7 000/kg)^[10]的途径提供了可能。由于真核生物和原核生物在蛋白表达以及修饰上存在着差异, 而原核表达的 Asy 酶是否存在活性是后期研究的关键, 因此, 本研究还对原核表达的 Asy 酶进行了可溶性优化, 并将该基因与 pACCAR16 Δ crtx 质粒(携带有噬夏孢欧文氏菌中将乙酰辅酶 A 合成 β -胡萝卜素的基因链, 可使 *E. coli* BL21(DE3)合成 Asy 酶的底物 β -胡萝卜素^[11])进行共转化, 通过检测在优化条件下培养的共转化菌株中类胡萝卜素的变化来鉴定原核表达的 Asy 酶是否存在活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 法夫酵母 7B12、*E. coli* DH5 α 和 BL21(DE3)由集美大学生物工程学院发酵研究室保藏; pACCAR16 Δ crtx 质粒由德国 Linden 教授馈赠^[11]; pET32a 质粒购自 Novagen 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: TRI REAGENT 总 RNA 抽提试剂盒购自 MRC 公司(美国); 5'-Full RACE Kit 购于宝生物公司(大连); 质粒提取试剂盒、DNA marker DSTM 5000 购于东盛生物科技有限公司(广州); 工具酶均购自 Fermentas 公司(加拿大); 氨苄青霉素、氯霉素、虾青素标准品、 β -胡萝卜素标准品购于 Sigma 公司(美国); IPTG 购自 Biosharp 公司(美国); 色谱纯乙腈、甲醇、四氢呋

喃购自 TEDIA 公司(美国); 其它生化试剂为国产分析纯试剂。Eppendorf (德国) 5331 PCR 仪; Waters (美国) 1525 高效液相色谱仪; BIO-RAD (美国) PowerpacTM basic 蛋白电泳仪; 上海培清 JS-680C 全自动凝胶成像分析仪; 宁波新艺 JY92-IIN 超声波细胞粉碎机。

1.1.3 培养基和培养条件: Luria-Bertani (LB)培养基用于 *E. coli* 的培养, 培养温度为 37 °C; 麦汁培养基用于法夫酵母的生长, 培养温度为 22 °C。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母浸膏 5, NaCl 10, pH 7.0; 麦汁培养基(g/L): 麦汁原液稀释至糖度为 4° Brix, pH 6.0, 固体培养基加琼脂粉 20。按照 *E. coli* 的培养需要, 抗生素用量分别为: 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 50 mg/L, 氯霉素 (Chloramphenicol, Cam) 34 mg/L。

1.1.4 引物: 根据已报道的法夫酵母 *asy* 基因 (Accession No. DQ002007.1), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1), 其中 3' RACE R1 为逆转录引物, 3' RACE R2、3' RACE F1、3' RACE F2 和 5' RACE R1、5' RACE F1、5' RACE R2、5' RACE F2 分别为扩增 *asy* 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列的引物, 3' RACE R2、5' RACE F2 扩增 *asy* 基因全长 cDNA, Full R、Full F 用于扩增 *asy* 基因的开放阅读框, 下划线部分为酶切位点。

1.2 法夫酵母 *asy* 基因的克隆

1.2.1 法夫酵母总 RNA 的提取: 根据 TRI REAGENT 总 RNA 提取试剂盒使用说明提取法夫酵母总 RNA, 再将总 RNA 反转录合成第一条 cDNA 链。

1.2.2 *asy* 基因全长 cDNA 序列的克隆: 以 1.2.1 得到的 cDNA 链为模板, 扩增 *asy* 基因 cDNA 的 3'端, 方法参照文献[12]。根据 5'-Full RACE Kit 使用说明, 获得 *asy* 基因 cDNA 的 5'端。接着以 *asy* 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列为模板, 3' RACE R2、5' RACE F2 为引物进行重叠 PCR, 获得 *asy*

表 1 引物序列
Table 1 List of primers

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'→3')	长度 Size (bp)	限制性内切酶位点 Restriction site
3' RACE R1	CAGCTGTAGCTATGCGCACCAGTTTTTTTTTTTTTT	37	—
3' RACE R2	CAGCTGTAGCTATGCGCACCAG	22	—
3' RACE F1	GATCGCTGGAGACCCGTCT	20	—
3' RACE F2	ATGCTAACCGTGAATGCT	22	—
5' RACE R1	CGACCCAATCCTTTACATC	18	—
5' RACE R2	AGGCTCGGCAAGTGGGAT	18	—
5' RACE F1	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	23	—
5' RACE F2	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	34	—
Full R	CCCAAGCTTCAGCTGTAGCTATGCG	25	<i>Hind</i> III
Full F	CGCGGATCCATGTTCATCTTGGT	23	<i>Bam</i> HI

基因全长 cDNA。重叠 PCR 反应条件: 96 °C 6 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 10 min; 一个循环后加入引物 3' RACE R2 和 5' RACE F2, 96 °C 6 min; 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将 *asy* 基因全长 cDNA 与 T 载体 pMD18-T 相连, 得到 pMD18T-*asy* 质粒。

1.3 表达载体 pET32-*asy* 的构建

以质粒 pMD18T-*asy* 为模板, Full R、Full F 为引物, 扩增 *asy* 完整开放阅读框序列。将扩增产物用 *Bam*HI 和 *Hind* III 酶切, 然后与经同样限制性内切酶作用的载体 pET32a 进行连接、转化, 获得重组质粒即 pET32-*asy*。将 pET32a、pET32-*asy* 分别导入 *E. coli* BL21(DE3)菌株中, 利用 Amp^r 的抗性平板筛选, 得到 BL21-pET32、BL21-*asy* 菌株。

1.4 重组蛋白的表达和可溶性检测

培养 BL21-*asy* 菌株, 当 OD₆₀₀ 值达到 0.5 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 30 °C 诱导 5 h, 以 BL21(DE3)菌株, BL21-pET32 菌株诱导的菌体, BL21-*asy* 未诱导的菌体作为对照。取全菌进行 SDS-PAGE, 检测融合蛋白的表达。

收集 BL21-*asy* 菌株诱导和未诱导的菌体, 采用超声波法破碎细胞, 破碎条件: 功率 200 W、超声 3 s, 间隔 5 s, 冰浴超声 10 min。离心提取上清, 沉淀用 8 mol/L 的尿素溶解, 离心再次取上清及沉淀, 将这些产物进行 SDS-PAGE。

1.5 诱导条件的优化

对 BL21-*asy* 菌株进行诱导温度(16 °C–40 °C)及 IPTG 浓度(0.1–1.1 mmol/L)的优化, 取未诱导的菌体做对照, 检测可溶性融合蛋白表达情况的方法参见 1.4。

1.6 pET32-*asy* 与 pACCAR16Δcrtx 的共转化

将 pACCAR16Δcrtx 质粒导入 *E. coli* BL21(DE3)菌株中, 得到菌株 BL21-Δ16, 再采取 CaCl₂ 法将得到的菌株制成感受态细胞, 最后将 pET32-*asy* 质粒转化到该感受态细胞中, 采用 Amp^r 和 Chl^r 的双抗性平板筛选, 得到共转化菌株 BL21-Δ16_{asy}。

1.7 类胡萝卜素产物的分析

培养 BL21-Δ16_{asy} 菌株, 收集菌体(以 BL21-Δ16 的菌体为对照) 0.1 g, 加入 1 mL 无水乙醇萃取, 离心, 取上清, 采用高效液相色谱法(HPLC)分析类胡萝卜素产物的种类, 方法参照

文献[2]。

1.8 参数的计算

根据 SensiAnsys 凝胶图像分析软件扫描电泳图得到 Asy 融合蛋白的灰度和菌体总蛋白的灰度, 以此计算 Asy 融合蛋白的可溶性比例:

Asy 融合蛋白的可溶性比例 = $100\% \times \frac{\text{上清中 Asy 融合蛋白的灰度}}{\text{上清中 Asy 融合蛋白的灰度} + \text{沉淀中 Asy 融合蛋白的灰度}}$ 。

2 结果与分析

2.1 法夫酵母 *asy* 基因 cDNA 全长序列的克隆

经 3' RACE 法和 5' RACE 法分别扩增得到 1.7 kb 和 0.6 kb 的两个片段, 采用重叠 PCR 连接这两个片段, 得到全长 1 971 bp 的 *asy* 基因的 cDNA 序列(Accession No. HM204708.1)。该序列与目前报道的唯一一条法夫酵母的 *asy* 基因 mRNA 序列(Accession No. DQ002007.1)一致性达到 97%。应用 NCBI 的 ORF finder 软件对该序列的开放阅读框进行分析, 发现该基因的开放阅读框长 1 614 bp, 编码 538 个氨基酸, 其中 5'非翻译区(5'-UTR)长 17 bp, 3'非翻译区(3'-UTR)长 340 bp, Asy 酶的分子量约为 59 kD。

2.2 *asy* 基因的表达和可溶性分析

在 30 °C、IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 的条件下诱导, 收集菌体进行电泳分析。结果表明, 与其它菌株相比, 含空载体的菌株 BL21-pET32 经诱导后在 20 kD 处多出一条明显的蛋白条带(图 2, 泳道 2), 分子量大小与 pET32a 载体上携带标签蛋白一致。转化菌株 BL21-*asy* 在约 70 kD 处有明显的表达条带(图 2, 泳道 4), 条带大小与 *asy* 基因及 pET32a 载体起始密码子和多克隆位点间序列的融合蛋白相一致, 而其它 3 种对照菌在对应位置均无此条带, 证明 Asy 融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中得到表达。

在原核表达过程中, 当诱导条件不适合时, 融合蛋白容易形成包涵体, 而包涵体不具有生物活性。对上述条件下表达的 Asy 融合蛋白的可溶性进行分析, 发现菌体超声破碎离心后的上清中只有少量的目的蛋白(图 3, 泳道 2), 沉淀物用尿素溶解后, 有大量的目的蛋白溶解出来(图 3, 泳道 4), 同时经尿素溶解后剩下的沉淀中还含有少量的目的蛋白(图 3, 泳道 6), 由此可见 Asy 融合蛋白在上述诱导条件下主要以包涵体的形式存在, 需要对诱导条件进一步优化, 提高 Asy 融合蛋白的可溶性。

2.3 诱导条件的优化

诱导温度范围选择的预实验结果显示, Asy 融合蛋白的可溶性比例在 22 °C–28 °C 温度范围内相对较高。因此, 选择在 22 °C、24 °C、26 °C 和 28 °C, IPTG 诱导浓度 0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.1 mmol/L 诱导菌体, 菌体超声波破碎后, 进行电泳分析。电泳结果采用 SensiAnsys 凝胶图像分析软件进行分析。

从表 2 和图 4 的结果可以看出, 在 IPTG 浓度相同时, 26 °C 的 Asy 融合蛋白可溶性比例均大于

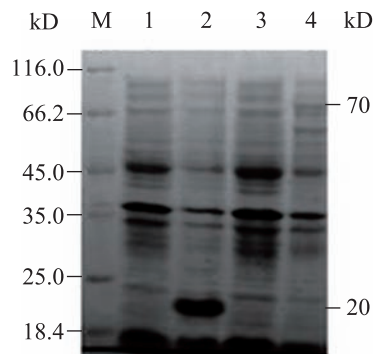


图 2 Asy 融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达
Fig. 2 Expression of Asy fusion proteins in *E. coli* BL21(DE3)

注: M: 蛋白 Marker; 1: BL21(DE3); 2: 经诱导的 BL21-pET32 菌株; 3: 未诱导的 BL21-*asy* 菌株; 4: 经诱导的 BL21-*asy* 菌株。

Note: M: Protein marker; 1: BL21(DE3); 2: Induced BL21-pET32; 3: Non-induced BL21-*asy*; 4: Induced BL21-*asy*.

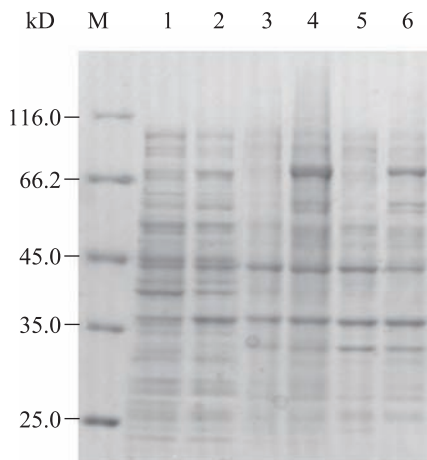


图3 Asy融合蛋白在*E. coli* BL21(DE3)中的可溶性检测

Fig. 3 The soluble detection of Asy fusion protein in *E. coli* BL21(DE3)

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导的 BL21-asy 菌株超声波破碎后的上清; 2: 诱导的 BL21-asy 菌株超声波破碎后的上清; 3: 未诱导的 BL21-asy 菌株超声波破碎后沉淀的 8 mol/L 尿素溶解液; 4: 经诱导的 BL21-asy 菌株超声波破碎后沉淀的 8 mol/L 尿素溶解液; 5: 未诱导的 BL21-asy 菌株最后的沉淀; 6: 诱导的 BL21-asy 菌株最后的沉淀。

Note: M: Protein marker; 1: Supernatant of non-induced BL21-asy; 2: Supernatant of induced BL21-asy; 3: Supernatant of non-induced BL21-asy pellet in 8 mol/L urea; 4: Supernatant of induced BL21-asy pellet in 8 mol/L urea; 5: Sedimentation of non-induced BL21-asy pellet in 8 mol/L urea; 6: Sedimentation of induced BL21-asy pellet in 8 mol/L urea.

其它温度下的比例。26℃时,随着IPTG浓度的增加Asy融合蛋白的可溶性比例呈上升的趋势,当IPTG浓度为1.1mmol/L时达最高,约为99.80%,但此时的菌体浓度仅为对照(26℃下,

未经诱导的BL21-asy菌体浓度)的5.0%。考虑到菌体浓度及可溶性融合蛋白的比例对后期检测共转化菌株类胡萝卜素产物的影响,最终选择的诱导条件是:26℃,0.5mmol/LIPTG(可溶性融合蛋白比例达83.7%,菌体浓度为对照的46.0%),培养5h。

2.4 共转化菌株产类胡萝卜素的分析

利用HPLC法检测BL21-Δ16菌株的类胡萝卜素产物,结果显示,在保留时间为35.68min时出现一个峰(图5D,峰1),该峰与β-胡萝卜素标准品出峰的时间(图5A)一致,由此可见pACCAR16Δcrtx质粒的表达,能使*E. coli* BL21(DE3)合成β-胡萝卜素。此外,在图5D中,峰1'与峰1紧紧相连,对应的是β-胡萝卜素转化的同分异构体α-胡萝卜素(C₁₈反相高效液相柱的主要缺点是不能将异构体充分分开^[13])。采用HPLC法进行检测共转化菌株BL21-Δ16asy的色素产物,结果发现,经诱导后共转化菌株的类胡萝卜素种类发生了变化。首先,与单质粒转化菌株色谱分析结果相比,共转化菌株的色谱图在保留时间为27.00、29.20、33.37min时多出3个峰(图5E,峰5、4、3),说明共转化菌株产生了新的类胡萝卜素物质,其中峰3的出峰时间与β-隐黄质标准品(图5C)的出峰时间一致,而β-隐黄质又是β-胡萝卜素转化为虾青素过程中的羟化产物,可见该融合蛋白具有羟化β-胡萝卜素的活性;其次,

表2 不同温度和IPTG浓度对Asy融合蛋白可溶性比例的影响				
Table 2 Effects of different temperature on the dissolubility of Asy fusion protein at different concentration of IPTG				
IPTG 浓度 Concentration of IPTG (mmol/L)	可溶性融合蛋白的比例 The percentage of soluble Asy fusion protein (%)			
	22℃	24℃	26℃	28℃
0.1	23.17	66.35	70.35	39.65
0.3	27.58	78.24	75.44	12.32
0.5	34.91	69.73	83.73	20.52
0.7	24.82	84.01	91.88	86.88
1.1	22.06	91.91	99.80	6.68

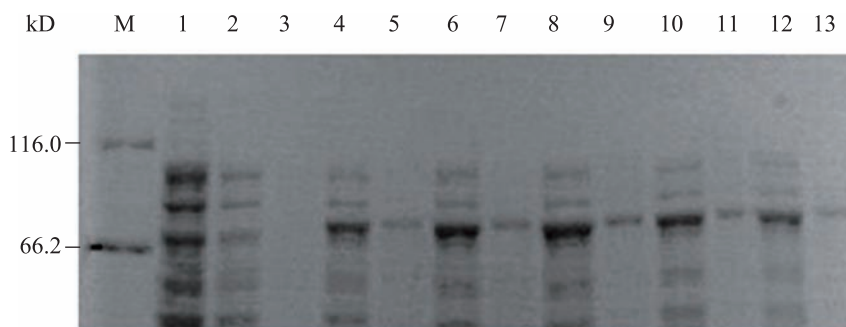


图 4 26 °C 时 IPTG 浓度对 Asy 融合蛋白的可溶性比例的影响

Fig. 4 Effects of different concentration of IPTG on the dissolubility of Asy fusion protein when the induced temperature is 26 °C

注: 1: 完整未诱导的 BL21-asy 细胞; 2、4、6、8、10、12: 经 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.1 mmol/L IPTG 诱导的 BL21-asy 细胞超声波破碎后的上清; 3、5、7、9、11、13: 经 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.1 mmol/L IPTG 诱导的 BL21-asy 细胞超声波破碎后的沉淀。

Note: 1: Intact cells of BL21-asy induced with 0 mmol/L IPTG; 2, 4, 6, 8, 10, 12: Supernatants of BL21-asy induced with 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.1 mmol/L IPTG; 3, 5, 7, 9, 11, 13: Sedimentation of BL21-asy induced with 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.1 mmol/L IPTG.

产物中检测不到 α -胡萝卜素和虾青素对应的峰 1' 和峰 2。这两个结果表明 *E. coli* 表达的可溶性 Asy 融合蛋白具有羟化 β -胡萝卜素的能力, 但是从转化成 β -隐黄质的比例来看, 该蛋白的活性较弱。

3 讨论

本文采用 RACE 法从法夫酵母 7B12 菌株中克隆得到 *asy* 基因的 cDNA, 再构建得到重组质粒 pET32-*asy* 并将其转化, 诱导后发现 *asy* 基因在 *E. coli* BL21(DE3)中能大量表达。通过优化 Asy 融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的可溶性表达, 将其可溶性融合蛋白比例提高到 85%, 接着采用 HPLC 法检测转化菌株在优化条件下培养时的类胡萝卜素色素产物, 结果发现在共转化菌株的色谱图(图 5E)中多出了 3 个特征峰, 其中保留时间为 33.37 min 的特征峰对应的物质为 β -隐黄质(β -胡萝卜素到虾青素的中间羟化产物), 说明表达的 Asy 融合蛋白具有羟化 β -胡萝卜素的活性。Ojima 等同样在可产生 β -胡萝卜素的 *E. coli* 中表达了法夫酵母的 Asy 酶, 结果发现转化菌株并未合成虾青素, 只合成了 β -胡萝卜素转化为虾青素过程中的中间产物海胆酮^[8], 这与本研究的

结果相似。此外, 在共转化菌株的类胡萝卜素产物中检测不到 α -胡萝卜素特征峰, 原因可能是 Asy 融合蛋白针对 β -胡萝卜素两端的环进行作用而产生的 β -胡萝卜素和虾青素的中间产物, 而这一反应又导致 β -胡萝卜素含量减少, 进而促使代谢流从 α -胡萝卜素向 β -胡萝卜素的流动, 因此 α -胡萝卜素的特征峰消失了, 这也从侧面反映了 Asy 融合蛋白具有活性。

2006 年, Alvarez 等将法夫酵母 *asy* 基因导入能产 β -胡萝卜素的毛霉工程菌时, 在该菌产物中检测到 β -胡萝卜素的羟化产物 β -隐黄质和玉米黄质, 因此推测 Asy 酶至少具有羟化的功能^[7], 这与本实验得到的结果一致。Martin 等^[14]和 Ojima 等^[8]分析均发现 Asy 酶含有细胞色素 P450 氧化酶的 3 个特征结构, 因此, Martin 等提出 Asy 酶在酶促反应过程中需要细胞色素 P450 还原酶(Asr)辅助的概念, 而 Ojima 等在 *E. coli* 中共同表达了 *asy* 基因和酿酒酵母中编码细胞色素 P450 还原酶的基因, 结果后者在 *E. coli* 共转化菌株中检测到了海胆酮(β -胡萝卜素的酮化产物), 可见在酿酒酵母 P450 还原酶的辅助下, Asy 酶具备酮化 β -胡萝卜素的能力。Alcaino 等从法夫酵母中克隆得到

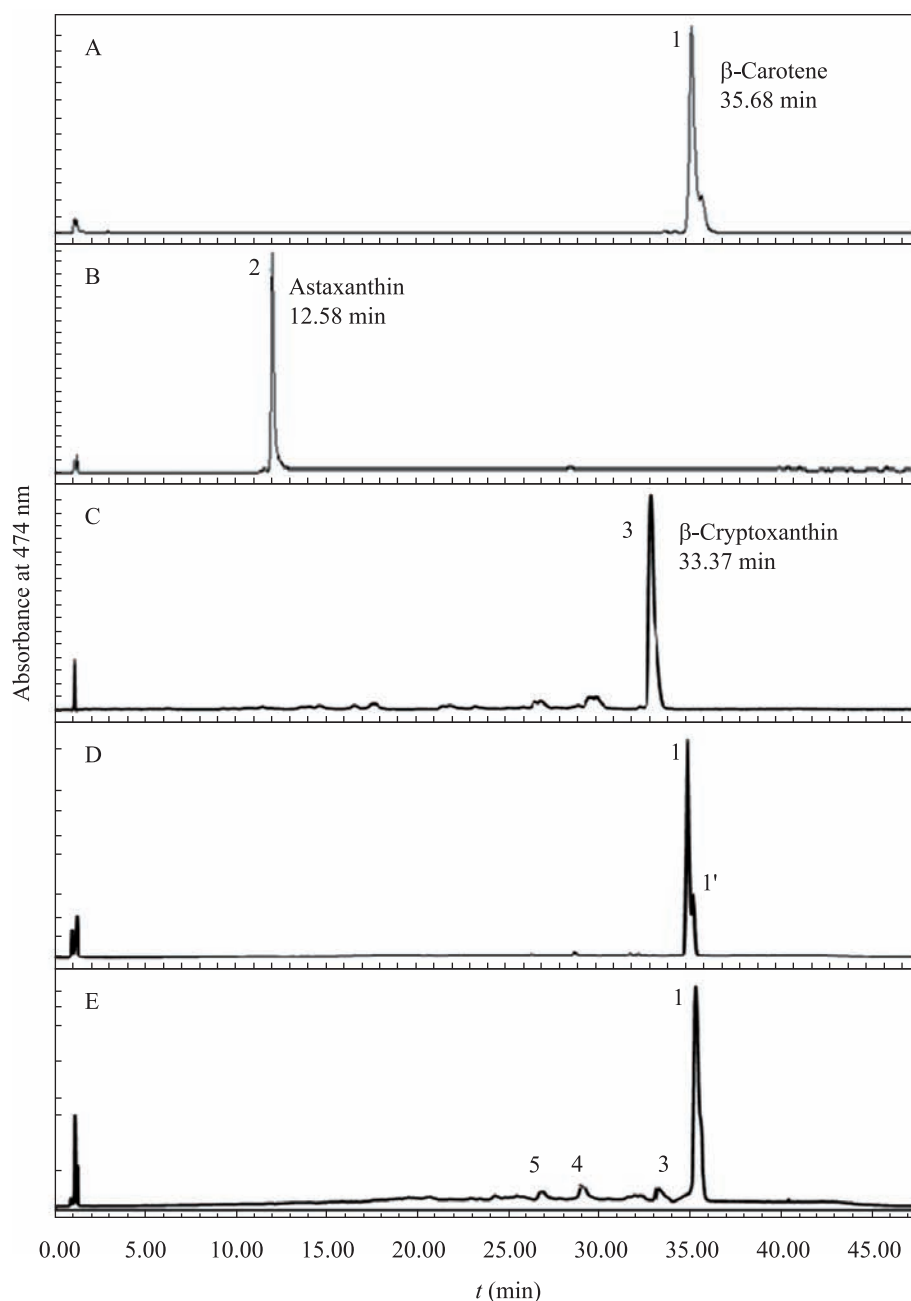


图5 质粒 pET32-asy 和 pACCAR16Δctx 共转化菌株类胡萝卜素种类分析结果
 Fig. 5 Detection of carotenoid species in *E. coli* BL21(DE3) strain co-transformed with pET32-asy and pACCAR16Δctx

注: A: β-胡萝卜素标准品; B: 虾青素标准品; C: β-隐黄质标准品; D: 未诱导的 BL21-Δ16asy; E: 诱导的 BL21-Δ16asy.

Note: A: β-Carotene standard; B: Astaxanthin standard; C: β-Cryptoxanthin standard; D: Non-induced BL21-Δ16asy; E: Induced BL21-Δ16asy.

了编码 Asr 酶的基因, 并通过基因敲除的实验证实了 Asr 酶在 β-胡萝卜素到虾青素转化过程中起着重要的作用^[15]。其后, Ukibe 等^[16]将法夫酵母的

asy 基因和 asr 基因共同转化到可产 β-胡萝卜素的酿酒酵母中, 结果在这株菌中检测到了微量虾青素。从这些学者的研究结果可知, Asy 酶在 β-胡萝

卜素转化为虾青素的过程中, 对酶促反应的环境和辅酶的特异性要求较严格。在异源宿主中, 当 Asy 酶在缺少其相应辅酶 Asr 酶的情况下, 只能单独具备羟化或酮化 β -胡萝卜素的功能, 当相应的辅酶存在时, Asy 酶具备将 β -胡萝卜素转化成虾青素的能力, 但是活性较低。在本研究中, 所使用的宿主为 *E. coli* BL21(DE3), 其胞内环境不能满足 Asy 酶的要求(例如 *E. coli* 和法夫酵母的电子传递方式存在着差异^[17]), 此外, 研究过程中缺少了其相应辅酶(Asr 酶)的辅助。因此, Asy 融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的活性低且不完全。

本研究通过原核表达等技术, 在保证产量的前提下, 实现了 Asy 酶在 *E. coli* BL21(DE3)中的可溶性表达, 并检测出该表达产物具备一定的活性, 这为后期 Asy 酶的分离纯化, 利用质谱、X 射线晶体衍射法或核磁共振等技术测定该酶空间结构, 体外研究该酶的酶学性质以及建立体外酶活测定体系等研究奠定了基础。该酶在原核环境中酶活较低也间接证实了该酶的部分功能需要相关辅酶参与的设想, 为今后进一步研究该酶的特性提供了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Ni H, He GQ, Ruan H, Chen QH, et al. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2005, 6(6): 514–522.
- [2] 卢宝驹, 肖安风, 李利君, 等. 高温湿热酸法破壁提取法夫酵母胞内虾青素[J]. 生物工程学报, 2008, 24(7): 1285–1292.
- [3] 肖素荣, 李京东. 虾青素的特性及应用前景[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(5): 33–35.
- [4] 孙乃霞, 赵学明. 红法夫酵母发酵生产虾青素的研究进展[J]. 化学工业与工程, 2007, 24(4): 339–344.
- [5] 肖素荣, 李京东. 虾青素生产方法研究进展[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(4): 27–29.
- [6] Visser H, van Ooyen AJJ, Verdoes JC, et al. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4(3): 221–231.
- [7] Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JF, 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.
- [8] Ojima K, Breitenbach J, Visser H, et al. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 275(2): 148–58.
- [9] 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.
- [10] 朱明军, 宗敏华, 吴振强, 等. 虾青素研究进展[J]. 食品工业科技, 2000, 21(2): 79–81.
- [11] Linden H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1999, 1446(3): 203–212.
- [12] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王栋梁, 周晓薇, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 651–657.
- [13] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素: 研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科学出版社, 1997: 169–174.
- [14] Martín JF, Gudiña E, Barredo JL. Conversion of β -carotene into astaxanthin: two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein?[J]. Microbial Cell Factories, 2008, 7(3): 1–10.
- [15] 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(169): 1–13.
- [16] 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.
- [17] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 9–28.