

红发夫酵母积累虾青素的代谢调控机理研究进展

贾立壮 王远山 郑裕国*

(浙江工业大学生物工程研究所 杭州 310014)

摘要: 由红发夫酵母合成的虾青素是一种非常有商业价值的类胡萝卜素。综述了近年来国内外在红发夫酵母中虾青素的生物合成途径、合成代谢调控机理等领域的相关研究进展,并提出了国内应开展的相关创新性研究。

关键词: 红发夫酵母, 虾青素, 生物合成途径, 调控机理

Advances in Regulatory Mechanisms of Astaxanthin Accumulation in *Phaffia rhodozyma*

JIA Li-Zhuang WANG Yuan-Shan ZHENG Yu-Guo*

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract: The astaxanthin synthesized by *Phaffia rhodozyma* is a commercially valuable carotenoid. Related advances in the biosynthetic pathway of astaxanthin and the regulatory mechanisms of biosynthesis in *Phaffia rhodozyma* in recent years were reviewed. The innovating research aspects in related fields in China were also proposed.

Keywords: *Phaffia rhodozyma*, Astaxanthin, Biosynthetic pathway, Regulatory mechanism

虾青素(astaxanthin, 全称为 3,3-二羟基- β -胡萝卜素-4,4-二酮), 属于酮式类胡萝卜素, 其结构式见图 1^[1]。

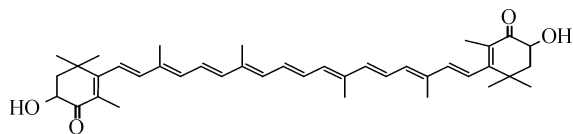


图 1 虾青素的结构式

Fig. 1 The chemical structure of astaxanthin.

虾青素除作为天然色素外, 还具较强的抗氧化能力, 其生物活性高于一类的类胡萝卜素。虾青素能防止癌细胞的产生, 增强机体免疫能力。由红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)合成的虾青素呈游离态,

易于进行结构改造, 具有重要的医用、食用价值。近年来红发夫酵母积累虾青素的生物合成途径、代谢调控机理等已成为研究的热点, 本文拟将这些方面的研究进展作一综述。

1 红发夫酵母中虾青素的生物合成途径

红发夫酵母中虾青素的合成是通过甲羟戊酸途径, 它始于乙酰辅酶 A (acetyl CoA) 合成甲羟戊酸 (mevalonate), 进一步生成异戊烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate)。八分子异戊烯焦磷酸缩合形成八氢番茄红素 (phytoene), 八氢番茄红素经四步脱氢去饱和和反应生成番茄红素 (lycopene), 进一步环化后形成

* 通讯作者: Tel: 0571-88320630; 信箱: zhengyg@zjut.edu.cn

收稿日期: 2007-04-27; 接受日期: 2007-06-04

β -胡萝卜素(β -carotene), 经 C_4 、 C_4 位上的酮基化反应和 C_3 、 C_3 位上的羟基化反应, 最终生成了虾青素。虾青素在红发夫酵母中的合成途径见图 2^[1~3]。

2 红发夫酵母中虾青素合成的调控机制

虾青素作为一种强抗氧化剂, 是细胞在诱导条

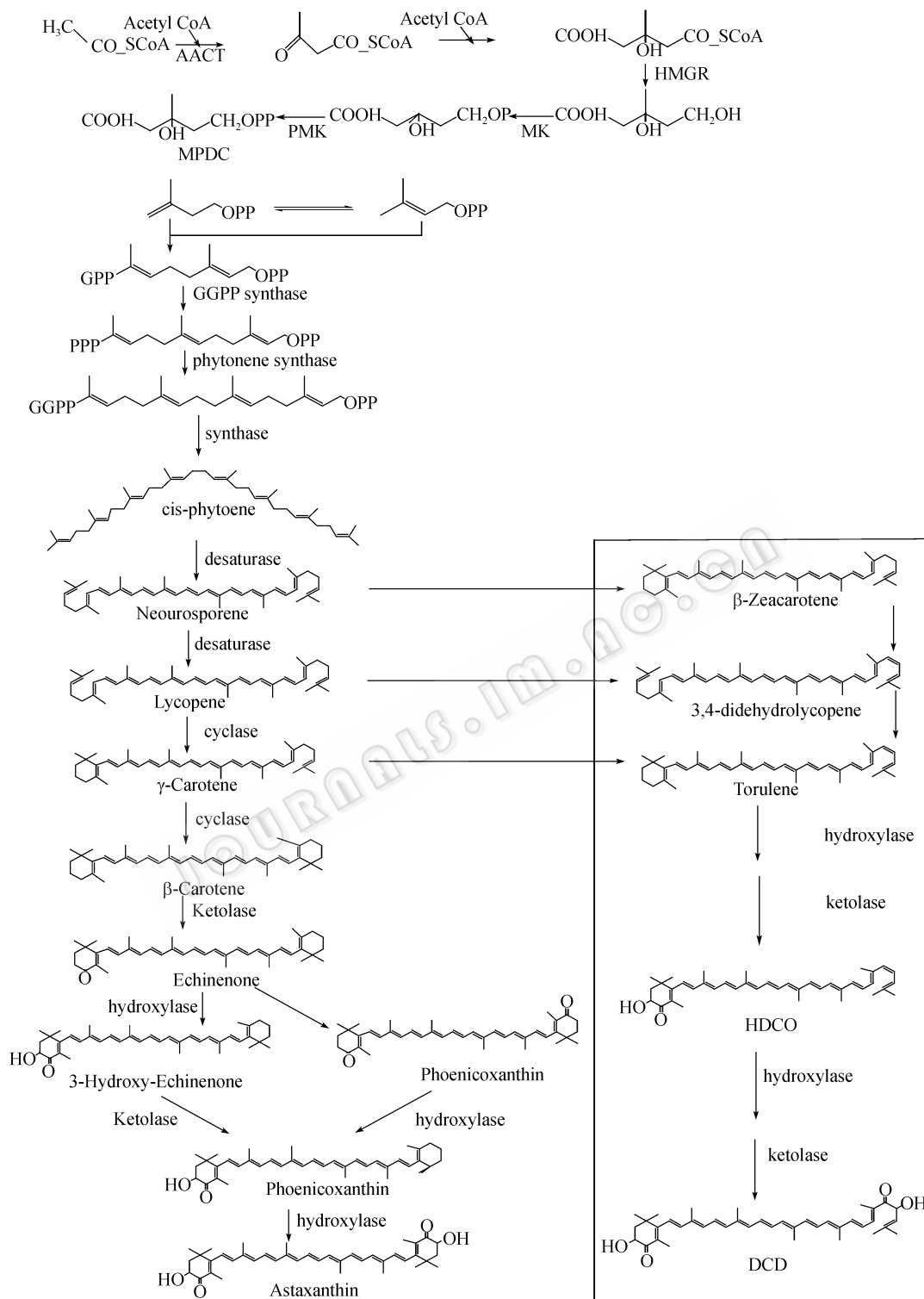


图 2 红发夫酵母中虾青素的生物合成途径

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

件下产生的次生类胡萝卜素。高光照、高氧化压力等环境条件及一些化学物质都能影响红发夫酵母中虾青素的合成。目前已克隆得到了虾青素生物合成途径中几乎所有关键酶的基因, 相关虾青素合成的代谢调控机制也得到了进一步的阐明。

2.1 基于关键酶的虾青素合成调控机理

An 等^[2]提出红发夫酵母中类胡萝卜素合成的单环途径, 此途径催化酵母素(torulene)生成 HDCO, 与催化 β -胡萝卜素生成虾青素系同一组酶完成。八氢番茄红素脱氢酶与番茄红素环化酶对底物番茄红素的竞争决定了代谢是经过 β -胡萝卜素生成虾青素还是通过 3, 4-二氢番茄红素(3, 4-didehydrolycopene)生成 HDCO。

八氢番茄红素脱氢酶催化八氢番茄红素脱氢生成番茄红素, 该酶由 *crtI* 基因编码^[1], 已经证实细菌中编码八氢番茄红素脱氢酶的基因表达受到蓝光的严格调控^[4], 酵母细胞无相关报道。尼古丁、吡嗪酮为该酶的特异性抑制剂^[4]。低浓度的二苯胺可使 β -胡萝卜素的氧化被不可逆抑制, 高浓度的二苯胺则使八氢番茄红素脱氢被可逆抑制, 以上调控也可能涉及到基因水平。八氢番茄红素脱氢酶的量及活力大小决定其引入双键的个数。当编码八氢番茄红素脱氢酶的基因过度表达时, 酵母素和 HDCO 作为终端产物过度积累, 导致虾青素合成量降低^[1]。因此需要选择适当的培养条件或筛选突变株以在虾青素生产中获得较低量的 HDCO 或 DCD 进而提高虾青素的产量。

催化番茄红素生成 γ -胡萝卜素及催化 γ -胡萝卜素生成 β -胡萝卜素的两种环化酶均由酵母的 *crtYB* 基因编码合成, 并且该基因转入大肠杆菌后两种酶的均被合成^[5]。*crtYB* 基因的过度表达可使 β -胡萝卜素和海胆酮(echinone)得到积累。当番茄红素环化酶活力增强时, 酵母素和 HDCO 的生成量减少。

2.2 诱导条件下虾青素合成调控机理

活性氧(reactive oxygen species, ROS)如单线态氧($^1\text{O}_2$), 过氧化氢(H_2O_2), 以及羟基自由基($\cdot\text{OH}$)等可促进酵母胞内虾青素的合成, 但目前还没有实验证明 ROS 调控红发夫酵母中虾青素的合成是在何水平上进行。Ma 和 Chen^[6]推断 ROS 可能促进 β -胡萝卜素羟化酶的活力, 该酶由酵母胞内 *crtZ* 基因表达, 催化红发夫酵母胞内鸡油菌黄质(canthaxanthin)生成虾青素的反应, 该反应是酵母合成虾青素的关键步骤。

Liu 和 Wu^[7]的实验表明, 在细胞培养初期加入合适剂量的过氧化氢可以显著提高酵母胞内虾青素的含量。在虾青素含量提高的同时, 酵母胞内的 β -

类胡萝卜素的含量降低, 过氧化氢使酵母胞内的类胡萝卜素转化生成虾青素。其机理可能是与类胡萝卜素相比, 虾青素是一种更有效的抗氧化剂。Iigusa 等^[8]的实验表明, 过氧化氢能诱使类胡萝卜素合成基因 *al-1* 在粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)中的表达, 但目前无相关实验证明过氧化氢调节红发夫酵母胞内虾青素合成是在基因水平上进行的。

An^[9]的实验表明, 培养基中加入 TCA 循环中间产物及相关氨基酸能调节红发夫酵母胞内类胡萝卜素的合成。谷氨酸、脯氨酸等氨基酸可使细胞生长加速但抑制虾青素的积累。其机理为 TCA 循环及呼吸作用可产生大量的 ROS, 从而促进红发夫酵母中类胡萝卜素的合成, 而加入 TCA 循环中间产物及相关的氨基酸降低了 TCA 循环的活力, 从而减少了 ROS 的形成。实验表明 TCA 循环中间产物的抑制作用低于相关氨基酸, 推断其原因为加入氨基酸后, 由 TCA 循环中间产物向氨基酸代谢的氮转移途径减弱, 使 ROS 的生成量减少, 进而影响虾青素生成。

2.3 基于代谢途径的虾青素合成调控机理

柠檬酸盐、磷酸盐及铵盐均能调控红发夫酵母中虾青素的合成。其机理为减少培养基中铵盐的量后, 其 C/N 发生变化, 蛋白质及核酸的合成速度减慢, 特别是 α -酮戊二酸盐、草酰乙酸盐的合成量减少, 进而碳源的积累增加, 碳源过量有利于红发夫酵母中虾青素的积累。在磷酸盐限量的情况下核酸的合成受到抑制, 从而影响蛋白质的合成, 进一步影响虾青素的积累。虾青素的合成需要大量合成类胡萝卜素的前体物质——乙酰辅酶 A 及合成过程中所需的 ATP, 乙酰辅酶 A 是联结初级代谢和次级代谢的重要中间体, 当红发夫酵母中蛋白质合成受到抑制后, 乙酰辅酶 A 和 ATP 作为重要的影响因素使代谢中的碳由 TCA 循环流向次级的虾青素合成途径。柠檬酸盐可通过 TCA 循环使乙酰辅酶 A 的含量增加, 从而能促进虾青素的合成^[10 11]。Meyer 等^[12]较早也证明, 加入乙酸盐能提高酵母胞内类胡萝卜素的产量, 推测其原因可能为乙酸盐抑制乙二醛支路中酶的活性, 使乙酰辅酶 A 的含量增加, 进而提高虾青素的产量。

Gu 等^[13]的实验表明, 向培养基中加入 0.2% 的乙醇可使酵母胞内 HMG-CoA 还原酶(3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶)的活性提高近 3 倍。HMG-CoA 还原酶是类胡萝卜素合成途径中的一个关键酶, 该酶活性提高后可促进红发夫酵母胞内虾青素的合成。研究表明^[14 15], 提高粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)、布氏须霉(*Phycomyces*)胞内 HMG-CoA 还原酶的信使 RNA

含量可使两种霉菌胞内的类胡萝卜素的含量升高。

Carlos 等^[16]的研究表明,用含有黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)提取物的培养基培养的红发夫酵母,其虾青素产量提高了40%。推测其机理为,作为植物病原体,黑附球菌能合成类异戊二烯等一些能影响类胡萝卜素合成的次级代谢产物,同时也能自身合成类胡萝卜素和类黄酮,这些前体物质能影响酵母胞内虾青素的合成。类似前体物质影响虾青素的合成,Calo等^[17]较早也有实验证明,在培养基中加入0.1%甲羟戊酸盐,胞内虾青素和总色素含量增加了4倍。其原因一般认为是甲羟戊酸盐是虾青素合成的起点物质,加入后可使提虾青素产量提高,但有实验证明啤酒酵母中HMG-CoA还原酶受到甲羟戊酸盐的反馈调节,红发夫酵母中HMG-CoA还原酶是否受到甲羟戊酸盐的反馈调节还未阐明。

3 国内研究现状和建议

目前国内有多家单位对红发夫酵母发酵生产虾青素进行相关研究,我们利用高通量微生物筛选技术^[18],获得了高产虾青素的红发夫酵母菌株,通过菌种选育、发酵工艺优化和控制、产物分离纯化等技术创新,成功开发了红发夫酵母天然虾青素的产业化技术。但国内对虾青素生物合成的调控机理并无深入研究,相关研究还主要集中在菌种的传统方法选育、诱导剂及诱导条件的选择等,以上方法随机性强,方向性差,且对菌体生长有影响。目前国内发酵生产虾青素的水平与国外有一定差距,因此,可通过构建基因工程菌和代谢工程调控等手段进一步提高虾青素的发酵水平,降低生产成本,以上研究将具有重要的理论价值和实际意义。

参 考 文 献

- [1] Verdoes JC, Sandmann G, Visser H, *et al.* Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(7): 3728–3738.
- [2] An GH, Cho MH, Johnson EA. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J Biosci Bioeng*, 1999; **88**(2): 189–193.
- [3] 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. *Mol Genet Genomics*, 2006, **275**(2): 148–158.
- [4] Arias RS, Netherland MD, Scheffler BE, *et al.* Molecular evolution of herbicide resistance to phytoene desaturase

- inhibitors in hydrilla verticillata and its potential use to generate herbicide-resistant crops. *Pest Manag Sci*, 2005, **61**(3): 258–268.
- [5] Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G, *et al.* Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet*, 1999, **262**(3): 453–461.
- [6] Ma R, Chen F. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**(7): 519–523.
- [7] Liu YS, Wu JY. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73**(3): 663–668.
- [8] Iigusa H, Yoshida Y, Hasunuma K. Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett*, 2005, **579**(18): 4012–4016.
- [9] An GH. Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**(12): 1005–1009.
- [10] Flores-Cotera LB, Martín, Sánchez S. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**(3): 341–347.
- [11] Vustin MM, Belykh EN, Kishilova SA. Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Mikrobiologiya*, 2004, **73**(6): 751–757.
- [12] Meyer PS, Du Preez JC. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**(9): 919–924.
- [13] Gu WL, An GH, Johnson EA. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, **19**(2): 114–117.
- [14] Ruiz-Albert J, Cerda-Olmedo E, Corrochano LM. Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Mol Genet Genomics*, 2002, **266**(5): 768–777.
- [15] Wang GY, Keasling JD. Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metab Eng*, 2002, **4**(3): 193–201.
- [16] Carlos E, Johnson EA. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Research*, 2004, **4**(4): 511–519.
- [17] Calo P, De Miguel T, Velázquez JB, *et al.* Mevalonic acid increase trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 1995, **17**(6): 575–578.
- [18] Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, *et al.* pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**(4): 586–590.
- [19] 董庆霖, 赵学明, 马红武, 等. 生物技术生产虾青素研究的最新进展. *生物加工过程*, 2004, **2**(2): 18–24.