

植物乳植杆菌类胡萝卜素生物合成 关键基因*LpispA*的功能鉴定

李舒丽¹, 谢卓婷¹, 沈润泽¹, 郭丽琼^{1,2}, 林俊芳^{1,2}, 陈谋通³, 叶志伟^{1,2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642)
(3. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室,
农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)

摘要: 类胡萝卜素具有抗氧化和抗肿瘤等多种重要生理活性。与化学合成法和植物提取法相比较, 利用微生物法合成新型的、高价值的类胡萝卜素, 具有食用安全和经济可行等优势。植物乳植杆菌作为天然 C₃₀ 类胡萝卜素来源的几种细菌之一, 其类胡萝卜素生物合成途径却尚未被阐明清楚。该论文基于转录组数据对一株海洋源植物乳植杆菌中的 *LpispA* 基因进行克隆、绘制系统进化树, 并构建了类胡萝卜素合成功能互补的大肠杆菌表达系统 pAC-BETAΔE-ispA, 再采用紫外可见光谱法和反相高效液相色谱法验证产物成分。结果表明, 植物乳植杆菌 *LpispA* 与桃色欧文氏菌的亲缘关系最近; 构建的大肠杆菌工程菌株 pAC-BETAΔE-ispA 的 β-胡萝卜素 (C₄₀) 产量为 0.05 mg/g DCW。因此, *LpispA* 在大肠杆菌功能互补表达系统中成功表达了 Geranylgeranyl Pyrophosphate (GGPP) 合成酶的活性, 也即说明 *LpispA* 在细菌类胡萝卜素合成途径中可作为类胡萝卜素合成多功能酶, 共同参与 C₃₀ 和 C₄₀ 类胡萝卜素的合成。该研究为植物乳植杆菌类胡萝卜素生物合成机制研究和利用植物乳植杆菌作为类胡萝卜素补充剂的应用奠定了实验基础。

关键词: 类胡萝卜素; 植物乳植杆菌; *LpispA* 基因; 互补表达

文章编号: 1673-9078(2024)02-131-138

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0215

Functional Characterization of *LpispA*, a Key Gene Involved in Carotenoid Biosynthesis in *Lactiplantibacillus plantarum*

LI Shuli¹, XIE Zhuoting¹, SHEN Runze¹, GUO Liqiong^{1,2}, LIN Junfang^{1,2}, CHEN Moutong³, YE Zhiwei^{1,2*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Research Center for Micro-ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)
(3. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Key Laboratory of Agricultural Microbiome and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, China)

引文格式:

李舒丽, 谢卓婷, 沈润泽, 等. 植物乳植杆菌类胡萝卜素生物合成关键基因 *LpispA* 的功能鉴定[J]. 现代食品科技, 2024, 40(2):131-138.

LI Shuli, XIE Zhuoting, SHEN Runze, et al. Functional characterization of *LpispA*, a key gene involved in carotenoid biosynthesis in *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 131-138.

收稿日期: 2023-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32272298; 31801918); 广东省自然科学基金项目 (2022A1515010057; 2015A030310225); 广东省重点领域研发计划重点项目 (2022B0202050002); 广东省农业科研项目和农业技术推广项目 (2022KJ103; 2023KJ103)

作者简介: 李舒丽 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 1156960143@qq.com

通讯作者: 叶志伟 (1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物与微生物工程, E-mail: zhwy@scau.edu.cn

Abstract: Carotenoids exhibit various important physiological activities, including anti-oxidation and anti-tumor properties. Compared with plant extracts and chemically synthesized compounds, carotenoids are considered safe for human consumption. Moreover, microbial biosynthesis offers an economically viable approach to the synthesis of carotenoids. As a novel source of the carotenoid C₃₀, the carotenoid biosynthetic pathway in *Lactiplantibacillus plantarum* has not been fully elucidated. Based on transcriptome analyses performed previously, in this study, the *LpispA* gene was cloned from a marine *L. plantarum* strain, and phylogenetic analysis was performed. Subsequently, the cloned open reading frame sequence was expressed in the reconstructed plasmid pAC-BETAΔE-ispA within a functional complementation system using *Escherichia coli* for carotenoid biosynthesis. In addition, ultraviolet-visible light spectroscopy and reversed-phase high-performance liquid chromatography were employed for component detection of the pigment productions. The results indicated that the *L. plantarum LpispA* gene exhibited the closest genetic relationship with the corresponding gene from *Erwinia persicina*. A β-carotene (C₄₀) yield of 0.05 mg/g (dry cell weight) was achieved in the engineered *E. coli* strain with pAC-BETAΔE-ispA. In conclusion, the bioactivity of geranylgeranyl pyrophosphate synthase expressed by *LpispA* in the functional complementation *E. coli* system resulted in the biosynthesis of β-carotene. In other words, *LpispA*, isolated from *L. plantarum*, is a multifunctional enzyme in carotenoid biosynthesis, contributing to the biosynthesis of both C₃₀ and C₄₀ carotenoids in bacteria. These results may establish an experimental foundation for investigating carotenoid biosynthesis in *L. plantarum* and pave the way for potential applications of *L. plantarum* in the production of carotenoid supplements.

Key words: carotenoids; *Lactiplantibacillus plantarum*; *LpispA* gene; complementary expression

类胡萝卜素 (Carotenoids) 是由高等植物、微生物和藻类等合成的一大类类异戊二烯代谢物^[1-3]。迄今为止,已在自然资源中发现了 1 200 多种类胡萝卜素,包括烃类的胡萝卜素和含氧的叶黄素^[4,5]。类胡萝卜素具有抗衰老和抗肿瘤等多种活性功能,适量摄入该化合物可以有效防止机体细胞和组织受到氧化损伤,提高机体免疫系统能力^[6-8]。目前,类胡萝卜素已被广泛应用于医药保健、食品着色、饲料营养补充和化妆品生产等多个领域^[9]。据美国商务通讯公司 (Business Communications Company, BCC) 的市场调研报告称,商业应用类胡萝卜素的全球市场价值预计到 2027 年将突破 27 亿美元关口,2022 年至 2027 年的复合年增长率为 5.7%^[10]。

随着生物功能技术的发展和人们食品安全意识的提高,相对于植物提取法和化学合成法,人们更青睐于通过合成生物学等手段构建微生物细胞工厂生产的新型和高安全性类胡萝卜素。研究显示,具有“公认安全”(Generally Regard As Safe, GRAS) 地位的植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 在其代谢过程中能产生 C₃₀ 类胡萝卜素、细菌素、胞外多糖和叶酸等多种有益物质^[11-13]。各种类胡萝卜素的生物合成途径是了解生物的次生代谢演变的一个典型系统^[14]。尽管目前已鉴定出各种 C₃₀ 类胡萝卜素,但由于缺乏组学数据和胡萝卜素基因的功能鉴定从而限制了对植物乳植杆菌甚至乳

酸菌的类胡萝卜素合成途径的研究。法尼基焦磷酸 (Farnesyl Pyrophosphate, FPP) 和牻牛儿基牻牛儿焦磷酸 (Geranylgeranyl Pyrophosphate, GGPP) 分别是 C₃₀ 和 C₄₀ 类胡萝卜素的直接前体, Matthews 等^[15] 和 Lois 等^[16] 研究发现,前体物质的合成是类胡萝卜素合成代谢途径中的限速步骤甚至是“瓶颈”。FPP 是由 FPP 合成酶 (FPP Synthase, ispA) 催化异戊烯基焦磷酸 (Isopentenyl Pyrophosphate, IPP) 和二甲丙烯基焦磷酸 (Dimethylallyl Pyrophosphate, DMAPP) 缩合而成的,再经 GGPP 合成酶 (GGPP Synthase, crtE) 进一步催化形成 GGPP。因此,前体物质合成酶性质的研究对深入解析类胡萝卜素合成的分子机理和调控机制都至关重要。

项目组 Ye 等^[17] 的前期转录组分析表明,海洋源植物乳植杆菌菌株 Lp10 含有类胡萝卜素生物合成的基因簇。本研究对植物乳植杆菌 FPP 合酶基因 *LpispA* 进行了克隆、绘制系统进化树和构建类胡萝卜素合成颜色功能互补的大肠杆菌表达系统 pAC-BETA Δ E-ispA, 利用紫外可见光谱 (Ultraviolet-Visible Spectroscopy, UV-Vis) 和反相高效液相色谱 (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) 检测产物成分来验证基因的功能,为探究植物乳植杆菌类胡萝卜素生物合成机制及为高效合成新的类胡萝卜素奠定理论基础,有望进一步推进应用植物乳植杆菌作为类胡萝卜素补充剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

植物乳植杆菌 Lp10 菌株由所在研究组实验室从海带中分离纯化并保存；质粒 pAC-BETA 由所在研究组保藏；大肠杆菌 DH5 α 购买于大连 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要的试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购买于 TIANGEN 公司；ClonExpress II 一步克隆试剂盒和 Phanta Max 超保真 DNA 聚合酶购买于 Vazyme 公司；限制性内切酶 *Spe* I、*Nde* I 购买于大连 Takara 公司。

高效液相色谱仪 LC-2030（日本，株式会社岛津制作所）；紫外可见分光光度计 UV-2802PC（上海，尤尼科）；高速冷冻离心机 5804R（德国，Eppendorf）；MJ Mini PCR 仪（美国，BIO-RAD）；GelDoCTMXR + 凝胶快速成像系统（美国，BIO-RAD）。

1.1.3 引物

本文所用引物如表 1 所示。

表 1 基因扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences for gene amplification

| 引物名称 | 引物序列 (5'-3') |
|----------|--|
| ispA-F | <u>AATTCAGCGGGTAACCTTGACATATGATG</u> |
| | AATAAGCAATTATTAAGTGAATTTGAATCCAAGTGG |
| ispA-R | <u>CTTGAACCCAAAAGGGCGGTAAGTAGTTTAA</u> |
| | TCTGTAATAACGTTAGAAAAGCTG |
| pAC-BY-F | TACCGCCCTTTTGGGTTCAAG |
| pAC-BY-R | TGCAAGGTTACCCGCTGAATTG |
| check-F | CGTTGATGCAATTTCTATGCGC |
| check-R | TGGTTTCCAGCGTGATGTCG |

注：限制性酶切位点以粗体字母，同源臂以下划线显示。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因扩增

以试剂盒提取的植物乳植杆菌 Lp10 菌株的基因组 DNA 为模板，设计引物 ispA-F&R（表 1），扩增 *LpispA* 基因的开放阅读框（Open Reading Frame, ORF）序列。反应体系（50 μ L）：模板 200 ng，上下游引物各 2 μ L（0.4 μ mol/L），Phanta Max 1 μ L，dNTPs 1 μ L，2 \times PCR buffer 25 μ L，加超纯水至 50 μ L。

扩增条件：95 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 15 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，30 个循环；4 $^{\circ}$ C 保存。以质粒 pAC-BETA 为模板，设计引物 pAC-IBY-F&R，反向扩增线性化片段 pAC-IBY，反应体系与上述 *LpispA* 基因扩增相同；扩增条件：95 $^{\circ}$ C 30 s；95 $^{\circ}$ C 15 s，59 $^{\circ}$ C 15 s，72 $^{\circ}$ C 5 min，30 个循环；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1%（*m/V*）琼脂糖凝胶电泳检测，切下目的条带并使用琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒（MAGEN）回收目的片段并进行测序比对。

1.2.2 *ispA* 系统进化树的构建

用 MEGA 软件（7.0）对本研究中获得的植物乳植杆菌 *LpispA* 基因推断的氨基酸序列以及从 GenBank 检索的相关物种（包括植物、藻类、细菌和蓝细菌）的氨基酸序列进行比对，采取邻接法（Neighbor-Joining, NJ）构建系统进化树。

1.2.3 *LpispA* 基因功能互补表达载体的构建

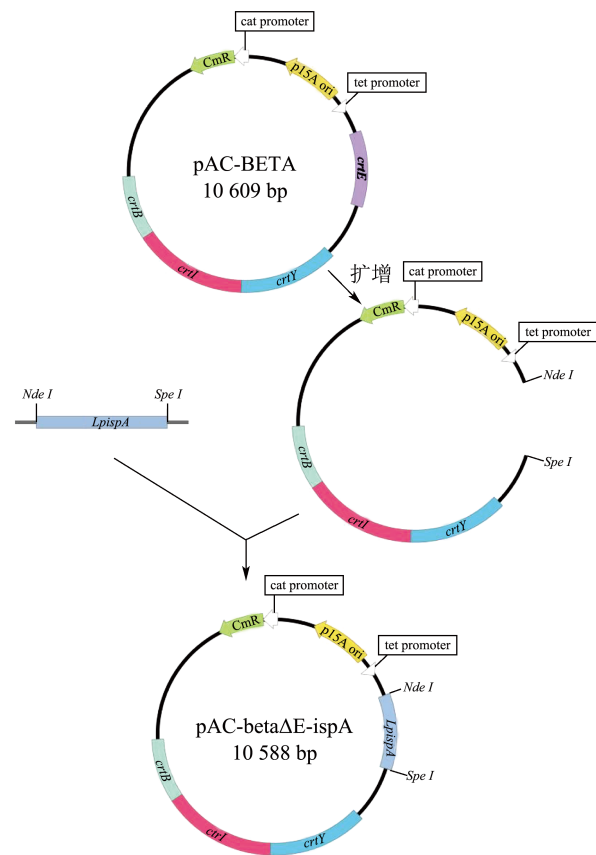


图 1 重组载体 pAC-BETA Δ E-ispA 的构建路线

Fig.1 Structure route of recombinant vector pAC-BETA Δ E-ispA

植物乳植杆菌 *LpispA* 基因的功能互补表达质粒 pAC-BETA Δ E-ispA 的构建路线如图 1 所示。用 ClonExpress II 一步克隆试剂盒将目的片段 *LpispA* 和 pAC-IBY 连接，然后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受

态细胞中,于含氯霉素(30 μg/mL)的LB(10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g 氯化钠,1 L 超纯水,pH 值 7.0)平板中 37 °C 培养过夜,用引物 check-F&R 进行 PCR 验证。挑选拟转化子并于含 30 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 下扩大培养,提取质粒进行双酶切(*Spe* I 和 *Nde* I) 检验,并送至公司测序分析。将正确的重组质粒命名为 pAC-BETAΔE-ispA。

1.2.4 转化子色素的提取

参照叶志伟^[18]的方法,将含有质粒 pAC-BETA、pAC-BETA Δ E-ispA 和空载体的大肠杆菌工程菌株分别接种于 LB 液体培养基,37 °C、200 r/min 黑暗培养 36 h。每个样品取两份培养物各 50 mL,一份用于转化子色素的提取,具体操作如下:a) 将 50 mL 发酵液于 4 °C,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;b) 用超纯水重新悬浮沉淀的大肠杆菌细胞,短暂离心弃上清液;c) 加入 2 mL 丙酮,涡旋振荡分散沉淀物;d) 在 55 °C 水浴中处理 15 min,每隔 5 min 振荡一次;e) 4 °C,10 000 r/min 离心 20 min 后,收集含有色素的上清液;f) 离心所得的细胞沉淀物再按步骤 c~e 处理一次;g) 收集所有上清液并用丙酮定容至 5 mL,-80 °C 保存(类胡萝卜素易光解,色素提取过程中应避免光处理)。另一份用于测定细胞干重,具体操作如下:①重复以上步骤 a~b;②将细胞在 65 °C 下避光干燥处理至恒重(约 24 h),称重。

1.2.5 色素提取物的UV-Vis和RP-HPLC分析

使用 UV-Vis 波长扫描提取液以获得 350~800 nm 光谱范围内的光吸收情况。确定最大吸收波长后,参照 Inbaraj 等^[19]的方法,通过 RP-HPLC 对各色素溶液进行定性和定量。色谱条件为:色谱柱,J&K Scientific C₁₈ 反相柱(250 mm×4.6 mm,5.0 μm);流动相,甲醇:乙腈:CH₂Cl₂=85:12:3(V/V/V)(含 0.4 g/L 抗坏血酸);流速,1 mL/min;柱温,30 °C;进样量,20 μL。分析过程中使用标准加入法,即在各样品中加入一定量的 β-胡萝卜素标准品(Solarbio)对提取液进行目的物质 β-胡萝卜素的定性,利用 β-胡萝卜素标准品试验绘制的校准曲线进行定量分析。

1.2.6 数据分析

根据样品中类胡萝卜素的质量浓度和细胞干重,计算每克细胞干重的 β-胡萝卜素含量(mg/g DCW)。每个样品设置 3 个平行,实验数据采用平

均数 ± 标准差表示。使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件构建图形,当 $P < 0.05$ 时为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 *LpispA* 基因和 pAC-IBY 片段克隆及纯化

对植物乳植杆菌 Lp10 的 *LpispA* 基因和质粒 pAC-BETA 中的 pAC-IBY 片段进行克隆及纯化,琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示,可发现前者在 800~1 200 bp 处有显著的单一一条带,与 *LpispA* 基因 ORF 序列 891 bp 预期大小一致(图 2a),后者在 10 000 bp 左右处有明显的单一一条带,与 pAC-IBY 片段 9 685 bp 预期大小一致(图 2b)。扩增产物的测序结果表明,*LpispA* 基因 ORF 序列和 pAC-IBY 片段均已被成功克隆。

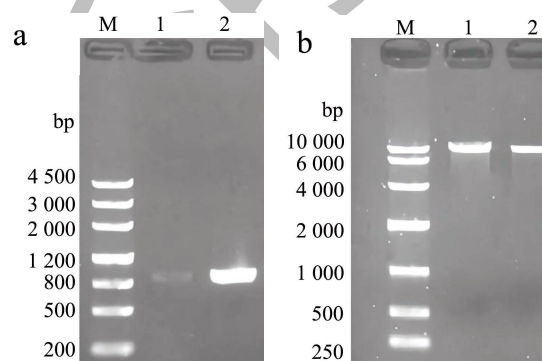


图 2 *LpispA* 和 pAC-IBY 的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification for *LpispA* and pAC-IBY

注:(a) 目的基因 *LpispA* 的 PCR 扩增(M: DNA marker; 1 和 2: 目的基因 *LpispA* 的开放阅读框);(b) pAC-IBY 片段的 PCR 扩增(M: DNA marker; 1 和 2: 目的片段 pAC-IBY 的 PCR 扩增)。

2.2 *LpispA* 的系统发育分析

利用植物、藻类、细菌和蓝细菌等 4 个类群的氨基酸序列构建 *LpispA* 系统进化树(图 3)。系统进化树中,红色三角形标记显示了植物乳植杆菌 *LpispA* 在系统树上的位置,其它物种氨基酸序列的 GenBank 登陆号显示在相应每个物种名称后面。系统进化树表明植物乳植杆菌与桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina*) 遗传距离最近,经过逐层汇聚,相对与藻类和植物等遗传距离较远。表明在所选的物种中,植物乳植杆菌与细菌分类中的桃色欧文氏菌亲缘关系最近,与蓝细菌次之,与藻类和植物的亲缘关系最远。

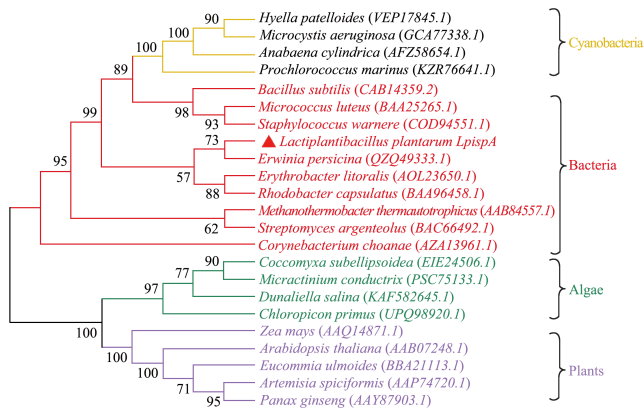


图3 基于 FPP 合成酶 (ispA) 氨基酸序列 NJ 法构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of farnesyl pyrophosphate synthase (ispA) based on the amino acid sequences by the neighbor-joining method

注: 系统进化树分为植物 (紫色)、藻类 (绿色)、细菌 (红色) 和蓝细菌 (黄色) 4 个类群。红色的三角形显示了植物乳植杆菌 LpispA 在系统进化树上的位置。参考氨基酸序列的 GenBank 登录号显示在相应物种名称的后面。

2.3 pAC-BETAΔE-ispA 重组载体的构建

对构建的重组载体 pAC-BETAΔE-ispA 进行双酶切鉴定, 结果如图 4 所示, 酶切出两条条带, 亮度清晰, 大小分别与线性化载体 pAC-IBY 和目的基因 LpispA 一致。对重组质粒进行测序分析鉴定, 结果显示重组载体 pAC-BETAΔE-ispA 被成功构建。

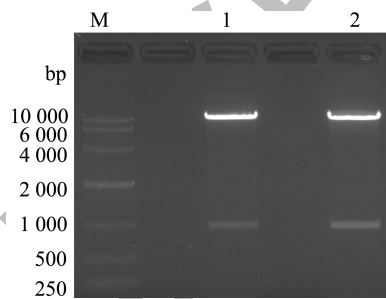


图4 pAC-BETAΔE-ispA 重组载体双酶切验证

Fig.4 Identification of recombinant vector pAC-BETAΔE-ispA by double enzyme digestion

注: M: DNA marker; 1 和 2: pAC-BETAΔE-ispA 质粒双酶切电泳结果。

2.4 转化子类胡萝卜素含量的测定

低温离心收集含质粒 pAC-BETA (阳性对照)、pAC-BETAΔE-ispA 和空载体 (阴性对照) 构建的大肠杆菌工程菌株的细胞 (图 5a), 再用丙酮提取

菌体中的色素 (图 5b)。其中, 阳性对照含有源自细菌的 β -胡萝卜素生物合成基因簇的质粒, 菌体 β -胡萝卜素沉着, 细胞呈现橙黄色。结果显示, 构建的 LpispA 基因功能互补表达工程菌株及其提取的色素颜色皆显浅橙黄色, 对比阳性对照颜色稍浅, 但深于阴性对照 (图 5)。对提取到的色素进行 UV-Vis 波长扫描测量, 转化子与 β -胡萝卜素标准品的色素样品皆呈现类胡萝卜素紫外可见光吸收图谱的典型三指吸收峰结构, 其最大吸光度在 450 nm (图 6a)。利用 RP-HPLC 进行定性定量分析, 结果显示, pAC-BETAΔE-ispA 组、 β -胡萝卜素标准品组以及 pAC-BETAΔE-ispA+ 组 (添加了 β -胡萝卜素标准品) 均在保留时间 43.90 min 下有相似的色谱峰出现, 说明 pAC-BETAΔE-ispA 组细胞合成了 β -胡萝卜素 (图 6b)。由 β -胡萝卜素标准品制备的校准曲线进行定量, 结果显示转化子 pAC-BETA, pAC-BETAΔE-ispA 的 β -胡萝卜素含量分别为 0.80 mg/g DCW 和 0.05 mg/g DCW, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 7)。实验组的 β -胡萝卜素含量较对照组低, 推测可能的原因是对照组 pAC-BETA 质粒的类胡萝卜素功能酶基因来源于单一物种, 而实验组 pAC-BETAΔE-ispA 为重组质粒, 其中来源于不同物种的类胡萝卜素功能基因组合在异源表达代谢通路中, 容易出现基因表达和酶活性失衡^[20], 不平衡的碳通量易导致中间产物的积累, 从而降低系统合成效率^[21], 而且可能产生对宿主生长不利的中间产物^[22]。

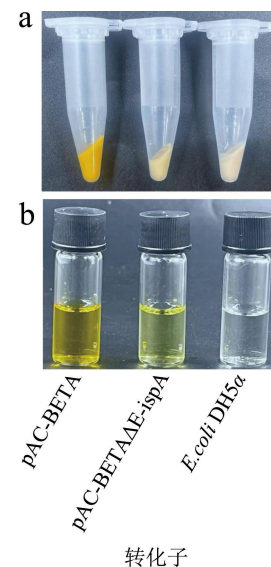


图5 转化子和提取色素的颜色分析

Fig.5 Colors analysis of transformants and extracted pigments

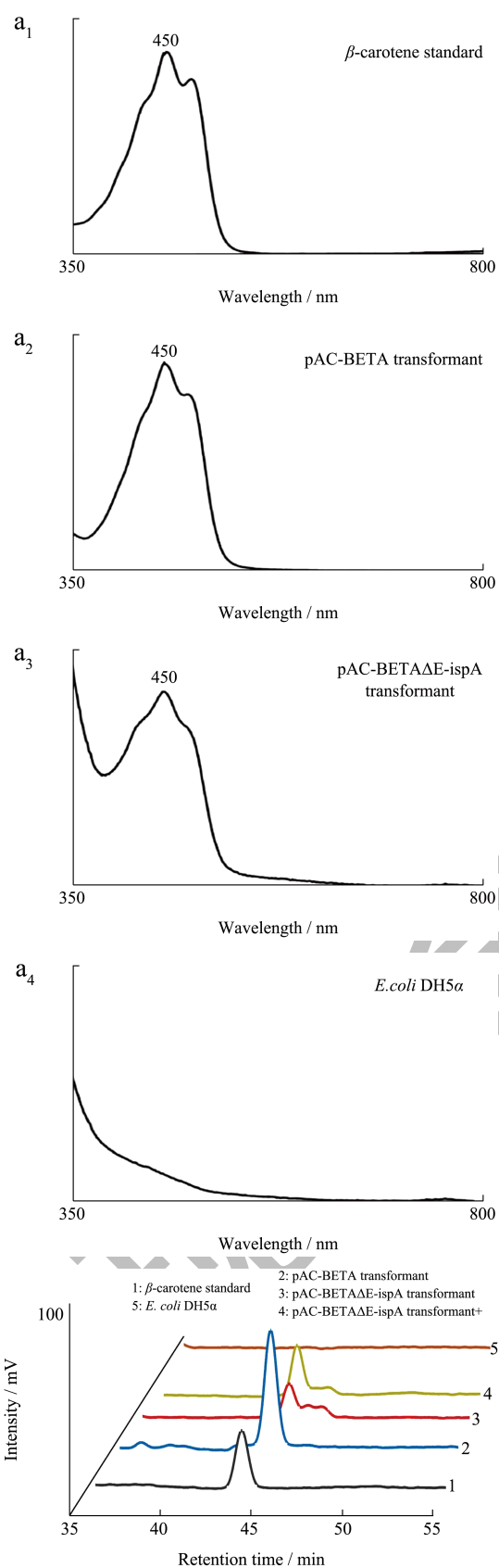


图6 色素提取物的UV-Vis和RP-HPLC分析图谱

Fig.6 Chromatogram of pigment extracts by UV-Vis and RP-HPLC

注: (a) 色素的UV-Vis吸收光谱图; (b) 色素的RP-HPLC图, 最高峰为β-胡萝卜素的色谱峰。

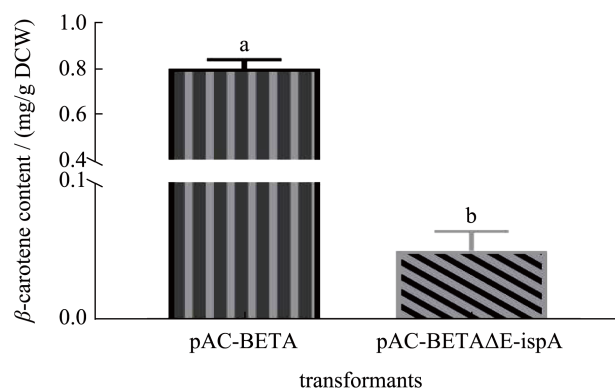


图7 转化子的β-胡萝卜素含量

Fig.7 β-carotene content of transformants

注: 不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 细菌类胡萝卜素的潜在生物合成途径

质粒 pAC-BETA 含有来自草生欧文氏杆菌的β-胡萝卜素生物合成基因簇, 包括 GGPP 合成酶基因 *crtE*、番茄红素环化酶基因 *crtY*、八氢番茄红素脱氢酶基因 *crtI* 和八氢番茄红素合成酶基因 *crtB*。含有该质粒的大肠杆菌培养物可通过β-胡萝卜素的积累而显现黄色表型^[23]。依据以上实验结果, 植物乳植杆菌 FPP 合成酶基因 *LpispA* 在构建的大肠杆菌功能互补表达系统中成功表达并使宿主细胞产生β-胡萝卜素, 实现了对草生欧文氏杆菌 GGPP 合成酶基因 *crtE* 的功能替换, 为类胡萝卜素合成多功能酶, 实现在 C₄₀ 类胡萝卜素合成路径中替换 *crtE* 的缺失。Armstrong 等^[24]研究发现, *ispA* 与 *crtE* 的氨基酸序列在系统发育分析上具有较高的同源性。Miguel 等^[25]研究表明, 玉米胚乳中的 FPP 合成酶具有 GGPP 合成酶的功能活性, 既影响 FPP 的产量, 也对 GGPP 形成产生作用。通过定位突变等处理改变微生物中酶的链长决定区域 (CLDR) 或其它区域的氨基酸序列, 可实现 FPP 合成酶与 GGPP 合成酶的功能互相转化。Ohnuma 等^[26]利用化学诱变法将热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的 FPP 合成酶成功转化为 GGPP 合成酶。Ohnuma 等^[27]通过定点突变的方式在古细菌中将 GGPP 合成酶基因转变为了能表达 FPP 合成酶的基因。Kawasaki 等^[28]的研究表明灰孢链霉菌 (*Streptomyces griseolosporeus*) 中突变的 GGPP 合成酶和 FPP 合成酶可分别产生 FPP 和 GGPP。细菌类胡萝卜素的合成一般是经由甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径^[29], 结合本实验结果推测出细菌类胡萝卜素的潜在生物合成途径如图 8 所示。

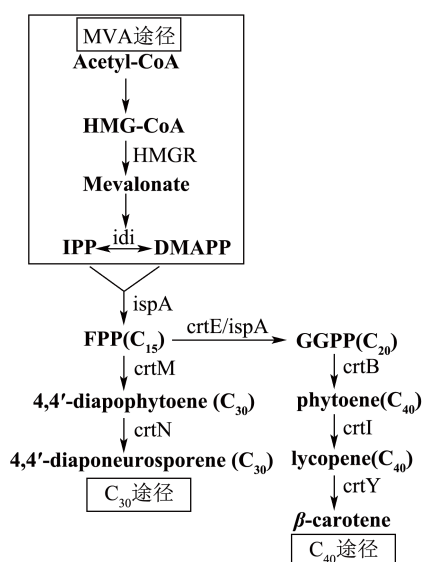


图 8 细菌类胡萝卜素的潜在生物合成途径

Fig.8 The potential biosynthetic pathway for carotenoids in bacteria

注：代谢物用粗体字显示，转化酶用未加粗字体显示。虚线箭头表示在相关酶的催化可生成一个或多个中间产物。

在 MVA 途径中，2 分子乙酰辅酶 A (Acetyl-Coenzyme A, Acetyl-CoA) 经缩合形成 3 羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A, HMG-CoA)，接着在 HMG-CoA 还原酶 (HMG Reductase, HMGR) 的作用下生成甲羟戊酸。甲羟戊酸再经多个相关酶的催化下合成前体物质 IPP (C_5)，及在 IPP 异构酶 idi (IPP Isomerase) 的作用下生成其同分异构体 DMAPP。在 C_{30} 类胡萝卜素合成途径中，反应起始于 IPP 与 DMAPP 在 ispA 作用下的缩合生成前体物质 FPP (C_{15})；2 分子的 FPP 在脱氢角鲨烯合成酶 crtM 的作用下生成 C_{30} 类胡萝卜素 diapophytoene，再经脱氢酶 crtN 催化生成 diaponeurosporene (C_{30})。在 C_{40} 类胡萝卜素合成途径中，FPP 经 crtE/ispA 催化合成前体物质 GGPP (C_{20})；2 分子的 GGPP 在八氢番茄红素合成酶 crtB 的作用下生成无色的八氢番茄红素 phytoene (C_{40})，再由八氢番茄红素脱氢酶 crtI 和番茄红素环化酶 crtY 催化去饱和和环化反应最终生成 β -胡萝卜素。

3 结论

本论文利用植物乳植杆菌 *LpispA* 基因功能替换质粒 pAC-BETA 的 crtE 基因，构建了基于植物乳植杆菌 *LpispA* 基因的大肠杆菌功能互补表达系统 pAC-BETA Δ E-ispA，通过 UV-Vis 和 RP-HPLC 法测定含重组质粒 pAC-BETA Δ E-ispA 大肠杆菌工程菌株

的类胡萝卜素生物合成，验证了 *LpispA* 的功能。结果表明，构建的大肠杆菌工程菌株 pAC-BETA Δ E-ispA 具有 β -胡萝卜素合成功能，推测 *LpispA* 功能性替代了 crtE 的作用而合成 C_{40} β -胡萝卜素的前体物质 GGPP，*LpispA* 为首次在植物乳植杆菌合成的类胡萝卜素途径中发现底物特异性变宽的酶，为类胡萝卜素合成多功能酶。本研究构建的 *LpispA* 基因功能互补的大肠杆菌表达系统，为植物乳植杆菌类胡萝卜素的生物合成机制研究提供了实验基础，有利于推动植物乳植杆菌作为类胡萝卜素补充剂的应用，扩充了利用异源系统工程菌株生产更多新型的高价值的化合物所需的基因库。

参考文献

- [1] MANUEL R C, JAVIER A, M L B, et al. A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health [J]. Progress in Lipid Research, 2018, 70: 62-93.
- [2] ZHAO Y, LI S L, CHEN H Y, et al. Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom *Cordyceps militaris* by abiotic stresses [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109808.
- [3] MUSSAGY C U, WINTERBURN J, SANTOS-EBINUMA V C, et al. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(3): 1095-1114.
- [4] YABUZAKI J. Carotenoids database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms [J]. Database-the Journal of Biological Databases and Curation, 2017, 2017(1): 1-11.
- [5] STEVEN R, HUMAIRA Z, NATANAEL Y, et al. Marine microbial-derived resource exploration: uncovering the hidden potential of marine carotenoids [J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 352.
- [6] BHATT T, PATEL K. Carotenoids: potent to prevent diseases review [J]. Natural Products and Bioprospecting, 2020, 10(3): 109-117.
- [7] CHEN J, WEI D, LIM P. Enhanced coproduction of astaxanthin and lipids by the green microalga *Chromochloris zofingiensis*: Selected phytohormones as positive stimulators [J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122242
- [8] GOU Z, SONG X, WANG G, et al. Heterologous expression of C_{30} carotenoid biosynthetic gene crtNM from *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 103(2): 506-513.
- [9] CHOI O, KANG B, LEE Y, et al. *Pantoea ananatis* carotenoid production confers toxoflavin tolerance and is regulated by Hfq-controlled quorum sensing [J]. Microbiologyopen, 2023, 12(1): 1-11.

- 2021, 10(1): e1143.
- [10] JALILI H. The global market for carotenoids [R]. North Carolina (America), BCC Research, 2022.
- [11] TAMENE A, BAYE K, KARILUOTO S, et al. *Lactobacillus plantarum* P2R3FA isolated from traditional cereal-based fermented food increase folate status in deficient Rats [J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2819.
- [12] AARTI C, KHUSRO A. Functional and technological properties of exopolysaccharide producing autochthonous *Lactobacillus plantarum* strain AAS3 from dry fish based fermented food [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 114: 108387.
- [13] JUAN G F, ANTONIO M B, BELÉN C G, et al. Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 140(1): 34-39.
- [14] KLASSEN J L, FRANCISCO R V. Phylogenetic and evolutionary patterns in microbial carotenoid biosynthesis are revealed by comparative genomics [J]. *Plos One*, 2010, 5(6): e11257.
- [15] MATTHEWS P D, WURTZEL E T. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(4): 396-400.
- [16] LOIS L M, MANUEL R C, FRANCESCA G, et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase [J]. *Plant Journal*, 2000, 22(6): 503-513.
- [17] YE Z W, GUO, T F, TANG C, et al. Transcriptional analysis for cholesterol-lowering effects of marine *Lactobacillus plantarum* Lp10 isolated from kelp [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 139: 110563.
- [18] 叶志伟. 杜氏藻类胡萝卜素合成关键酶基因的分子克隆及外源表达系统的构建[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [19] INBARAJ B S, LU H, HUNG C F, et al. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47(4-5): 812-818.
- [20] MATTHEW S, CARL W G, EDUARD M M, et al. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences [J]. *Science*, 2010, 330(6007): 1099-1102.
- [21] DOUGLAS J P, CHRIS J P, JACK D N, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(2): 193-207.
- [22] ZHU M M, LAWMAN P D, CAMERON D C. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *E. coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate [J]. *Biotechnology Progress*, 2002, 18: 694-699.
- [23] POLIAKOV E, SOUCY J, GENTLEMAN S, et al. Phylogenetic analysis of the metazoan carotenoid oxygenase superfamily: a new ancestral gene assemblage of BCO-like (BCOL) proteins [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13192.
- [24] ARMSTRONG G A, SCHMIDT A, SANDMANN G, et al. Genetic and biochemical characterization of carotenoid biosynthesis mutants of *Rhodobacter capsulatus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(14): 8329-8338.
- [25] MIGUEL C C, CYNTHIA E. G, ZHU C F, et al. Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141: 220-231.
- [26] OHNUMA S I, NAKAZAWA T, HEMMI H, et al. Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl diphosphate synthase by random chemical mutagenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 10087-10095.
- [27] OHNUMA S I, HIROOKA K, OHTO C, et al. Conversion from archaeal geranylgeranyl diphosphate synthase to farnesyl diphosphate synthase: two amino acids before the first aspartate-rich motif solely determine eukaryotic farnesyl diphosphate synthase activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(8): 5192-5198.
- [28] KAWASAKI T, HAMANO Y, KUZUYAMA T, et al. Interconversion of the product specificity of type I eubacterial farnesyl diphosphate synthase and geranylgeranyl diphosphate synthase through one amino acid substitution [J]. *Journal of Biochemistry*, 2003, 133: 83-91.
- [29] YANG J M, GUO L Z. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 160.