

Overproduction of Lycopene by Metabolic Engineering *Escherichia coli*

Zhiming Weng, Yue Wang, Jianzhong Liu*

Biotechnology Research Center, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou
Email: *lssljz@mail.sysu.edu.cn

Received: May 4th, 2012; revised: May 21st, 2012; accepted: May 29th, 2012

Abstract: Lycopene is an effective antioxidant and a potential pharmaceutical drug with anticancer. The knockout of *gdhA*, *aceE* or *fdhF* was beneficial to lycopene production in engineered *E. coli*. The double (*gdhA* and *aceE*) gene knockouts showed a similar effect to the triple (*gdhA*, *aceE* and *fdhF*) on lycopene production. Replacement of native promoter of *dxs* gene in the double gene knockout strain resulted in 103% increase in lycopene content. In order to avoid application of expensive inducer, we also constructed some constitutive plasmids containing heterologous carotenoid genes. The final engineered *E. coli* BW25113 (Δ *gdhA* Δ *aceE*, P_{T5-*dxs*}, pAC316-WZM4R) produced lycopene of 15.6 mg/g DCW without inducer in a batch shake flask.

Keywords: Lycopene; *Escherichia coli*; Metabolic Engineering; Promoter Replacement; Constitutive Plasmid

代谢工程大肠杆菌过量生产番茄红素

翁志明, 王 玥, 刘建忠*

中山大学生命科学学院生物工程研究中心, 广州
Email: *lssljz@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2012年5月4日; 修回日期: 2012年5月21日; 录用日期: 2012年5月29日

摘 要: 番茄红素是一种高效抗氧化剂和潜在抗癌药物。*gdhA*、*aceE* 和 *fdhF* 基因敲除促进了重组大肠杆菌番茄红素的合成, 其中 *gdhA* 和 *aceE* 双基因敲除和 *gdhA*、*aceE* 和 *fdhF* 三基因敲除具有相似的作用。在 *gdhA* 和 *aceE* 双基因敲除的基础上, *dxs* 基因天然启动子被 T5 启动子置换后, 重组大肠杆菌番茄红素的产量提高了 103%。为了避免采用诱导剂进行基因表达, 构建了一系列组成型质粒, 最终构建的代谢工程大肠杆菌 BW25113(Δ *gdhA* Δ *aceE*、P_{T5-*dxs*}、pAC316-WZM4R)在不需诱导条件下摇床发酵可产番茄红素 15.6 mg/g DCW。

关键词: 番茄红素; 大肠杆菌; 代谢工程; 启动子置换; 组成型质粒

1. 引言

番茄红素(Lycopene)是类胡萝卜素的一种, 是一种很强的抗氧化剂, 具有极强的清除自由基的能力, 是淬灭单线态氧和清除过氧化氢等自由基能力最强的类胡萝卜素, 其淬灭活性是 β -胡萝卜素的 2 倍、维生素 E 的 100 倍。对防治前列腺癌、肺癌、乳腺癌、

子宫癌等有显著效果, 还有预防心脑血管疾病、提高免疫力、延缓衰老等功效, 有植物黄金之称, 被誉为“21 世纪保健品的宠”。为此, 番茄红素的生产引起了各国学者注意。国内研究主要集中在利用三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)发酵生产番茄红素。但因三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)发酵是一个嗜氧高黏的发酵, 生产成本低, 而难以与番茄提取法竞争。

近年来, 随着代谢工程技术的发展, 国际上许多

*通讯作者。

学者通过代谢工程技术将外源番茄红素合成基因簇导入大肠杆菌实现了大肠杆菌生产番茄红素, 并取得了可喜的进展^[1-11]。这样便可利用大肠杆菌高密度发酵技术高效生产番茄红素, 而且因大肠杆菌本身并不能合成番茄红素, 当外源番茄红素合成基因簇转入大肠杆菌后, 并不会合成其它类胡萝卜素, 从而简化了下游提取步骤。但是国际上大都采用诱导性表达载体来表达番茄红素合成基因^[1-9], 发酵过程需要添加诱导剂, 从而会增加生产成本。国内学者在这方面的研究与先进国家的差距, 我们在国际学者的研究基础上, 采用基因敲除、启动子置换和组成型表达载体的构建等策略, 构建了一株不需诱导的代谢工程大肠杆菌以生产番茄红素, 其番茄红素的发酵水平达到了国际先进水平。

2. 材料和方法

2.1. 菌株和质粒

表 1 是本研究所使用的菌株和质粒。大肠杆菌 DH5 α 用于质粒构建, 大肠杆菌 BW25113 为宿主菌。

pAC-LYC04 和 pAC-LYC 由马里兰大学的 Cunningham 教授惠赠^[12]。 λ -Red 重组质粒 pKD46、pKD3、pKD4 和 pCP20 用于基因敲除和启动子置换, 由普渡大学 Wanner 教授惠赠^[13]。pBAD24 由哈佛医学院 Beckwith 教授惠赠^[14]。

2.2. 基因敲除和质粒构建

基因敲除和 *dxs* 基因的天然启动子置换采用 pKD46 表达的 λ -Red 重组系统^[13]。本研究所用引物见表 2。

利用相应引物从 pAC-LYC04 中, 分别 PCR 扩增得到 *crtE*、*crtI*、*crtB* 和 *ipi* 基因片段, 连接到质粒 pBAD24 中, 分别得到质粒 pBAD-*crtE*、pBAD-*crtI*、pBAD-*crtB* 和 pBAD-*ipi*。*KpnI* 和 *XbaI* 酶切 pBAD-*crtI*、*XbaI* 和 *SalI* 酶切 pBAD-*crtB* 基因片段连接到 *KpnI* 和 *SalI* 酶切 pBAD-*crtE* 载体片段中, 获得质粒 pBAD-*crtEIB*。*SalI* 和 *HindIII* 酶切 pBAD-*ipi* 基因片段, 连接到相同内切酶处理后的 pBAD-*crtEIB*, 获得 pBAD-*crtEIBipi*, 简称 pB-WZM1。*EcoRI* 切 pB-WZM1 质粒后得到的载体片段(8821 bp), 进行 CIAP 去磷酸化处理后分别同 *EcoRI* 酶切 pB-*rpoS* 质粒后的 *rpoS* 片段、*EcoRI* 酶切 pB-DR 后的 *dxs-rpoS* 片段和 *EcoRI* 酶切 pB-*dxs* 后的 *dxs* 片段连接, 得到的质粒经 PCR 和酶切验证插入方向正确的, 分别命名为 pBAD-*rpoS-crtEIBipi*(简称 pB-WZM2)、pBAD-*dxs-rpoS-crtEIBipi*(简称 pB-WZM3)和 pBAD-*dxs-crtEIBipi*(简称 pB-WZM4)。

BamHI 切 pAC-LYC 后得到载体片段(4893 bp), 用 *Pfu* DNA 聚合酶进行补平反应后直接连接, 得到 pACYC315。*BamHI-SalI* 切 pAC-LYC 后得到载体

Table 1. Strains and plasmids used in the study
表 1. 菌株和质粒

Strain and plasmid	Description	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Laboratory store
<i>E. coli</i> BW25113	<i>lacF</i> <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	Laboratory store
Plasmid		
pAC-LYC04	pACYC184 with <i>Erwinia herbicola crtE</i> 、 <i>crtI</i> and <i>crtB</i> genes, and <i>Haematococcus pluvialis ipi</i> gene	12
pAC-LYC	pACYC184 with <i>Erwinia herbicola crtE</i> 、 <i>crtI</i> and <i>crtB</i> genes	12
pKD3	<i>oriR6K</i> , <i>FRT::cat::FRT</i> template plasmid Cm ^r , Amp ^r	13
pKD46	<i>oriR101 repA101</i> ^{ts} <i>P-araB-gam-bet-exo</i> Amp ^r	13
pCP20	pSC101 replicon ^{ts} Flp(λ Rp) <i>cI857</i> Cm ^r , Amp ^r	13
pBAD24	ColE1 ori, P _{BAD} L-arabinose inducible Amp ^r	14
pQE30	ColE1 ori, P _{T5} IPTG inducible Amp ^r	Laboratory store
pB- <i>rpoS</i>	pBAD24 with <i>E. coli rpo</i> gene flanked by two <i>EcoRI</i> sites	Laboratory store
pB- <i>dxs</i>	pBAD24 with <i>E. coli dxs</i> gene flanked by two <i>EcoRI</i> sites	Laboratory store
pB-DR	pBAD24 with <i>E. coli dxs</i> and <i>rpoS</i> genes flanked by two <i>EcoRI</i> sites	Laboratory store

Table 2. Primers^a
表 2. 引物^a

Name	Purpose	5'→3'sequence	Restriction enzyme
<i>gdhA1</i>	<i>gdhA</i> knockout	AACCATGTCCAAAAGCGCGACCCGAATCAAACCGAGTTCGTGAG-CGATTGTGTAGGCTGGAG	
<i>gdhA2</i>		TCACACCCTGCGCCAGCATCGCATCGGCAACCTTCACAAACT-TAACGGCTGACATGGGAATTAG	
<i>fdhF1</i>	<i>fdhF</i> knockout	GAAAAAAGTCGTCACGGTTTGCCCTATTGCGCAT-CAGGTTGCAAAATCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
<i>fdhF2</i>		TACGCCAGTGCCGCTTCGCGCAGGGCAGTTTTCAACTTGTGTACTCGTCATTCCGGGGATCCGTCGACC	
<i>aceE1</i>	<i>aceE</i> knockout	ATGTCAGAACGTTTCCCAAATGACGTGGATCCGATC-GAAACTCGCGACTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
<i>aceE2</i>		TTACGCCAGACGCGGGTAACTTTATCTGCATC-GATGTTGAATTTGGCGAATTCGGGGATCCGTCGACC	
P1		TAACTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCC	
P2	Replacement of the native promoter of <i>dxs</i> gene by T5 promoter of pQE30	ggagtcgacc agtgcaggg tgggtattt ggcaatca aaacTCATAG TTAATTTCTCCTCTTAAATG	
P3		tg gaagcctag cggactacat catccagcgt aataaataac GTCTTGAGCG ATTGTGTAG	
P4		<u>GGTGGATCCT</u> ATGAATATCC TCCTTAGTTC C	<i>BamH I</i>
P5		<u>CTGAATTC</u> CG TCTTGAGCGA TTGTGTAGGC	<i>EcoR I</i>
<i>crtE-f</i>	PCR for <i>crtE</i>	CCGGAATTC AGGAGGTAATAAATATGGTGAGTGGCAGTAAAGC	<i>EcoR I</i>
<i>crtE-r</i>		GAAGGTACC TATCAGGCGATTTTCATGACC	<i>Kpn I</i>
<i>crtI-f</i>	PCR for <i>crtI</i>	TGTGGTACC AGGAGGTATAAAGGATGAAAAAACCGTTG	<i>Kpn I</i>
<i>crtI-r</i>		GCTTCTAGAT CATCAGGCTGGCGGTGGCTTTC	<i>XbaI</i>
<i>crtB-f</i>	PCR for <i>crtB</i>	CGCGGTACCTCTAG AGGAGGATCTGCAATGAGCCAACC	<i>KpnI, XbaI</i>
<i>crtB-r</i>		TGGTTCGACT TACTAAACGGGACGCTGCCAAAG	<i>SalI</i>
<i>ipi-f</i>	PCR for <i>ipi</i>	GCGTCGACAGG AGGTAATAAATATGCTTCGTTGCTCAG	<i>SalI</i>
<i>ipi-r</i>		GCGAAGCTTAGCTAGCT TATACGCTTCGTTGATGTGAT	<i>HindIII, NheI</i>

^aHomology arms to recombination target genes are in bold; restriction enzyme sites are underlined.

片段(4249 bp), 用 *Pfu* DNA 聚合酶进行补平反应后直接连接, 得到 pACYC316。EcoRV 分别切 pACYC315 和 pACYC316, 得到的 4472 bp 和 3832 bp 载体片段分别进行 CIAP 去磷酸化处理, 胶回收产物分别与补平后的 *NheI* 酶切自 pB-WZM1-4 的 4 种目的片段 WZM1、WZM2、WZM3 和 WZM4 进行连接, 理论上可以得到正反连接的 8 种 pAC315 系列质粒和 8 种 pAC316 系列组成型质粒, 分别命名为 pAC315-WZM1-4F/R 和 pAC316-WZM1-4F/R(F 指 WZM1-4 正向连接, R 指 WZM1-4 反向连接)。实际得到了 13 种组成型质粒。

2.3. 培养条件

种子培养基为 2YT-KAc, 发酵培养基为 2YT-KAc 和 2 × M9-glucose。除了 2YT-KAc 含 0.5% KAc 外,

其余的发酵培养基在最后发酵的时候均含 2 mM KAc。培养基中添加相应抗生素。种子液于 37°C, 150 rpm 中摇过夜后, 按 1%接种量接种到 50 mL 发酵培养基中, 发酵培养基于 30°C, 150 rpm 中发酵两天后提取番茄红素并定量。

2.4. 分析

发酵液发酵两天后, 取少量菌液离心收集菌体, 并用蒸馏水洗涤 2~3 次, 沉淀菌体重悬于 1 mL 丙酮中, 抽提液于 55°C 水浴中保温 15 min 后, 于室温下 10,000 rpm 离心 5 min, 取上清液于暗处保存。再用丙酮抽提 2 次, 合并抽提液, 通过测定抽提液在 472 nm 下的吸光度, 来计算番茄红素含量。另外, 取 15 mL 以上的发酵液装于 50 mL 离心管中, 于 8000 rpm 中离心 10 min 后去上清, 沉淀于 105°C 中烘 6 h 以上,

然后称量菌体干重，根据测出的番茄红素的产量就可算出单位干菌重的番茄红素产量。同时测量发酵液的 OD₆₀₀。

3. 结果与讨论

3.1. 基因敲除

根据 Stephanopoulos 研究小组代谢通量平衡分析 (FBA) 显示敲除大肠杆菌的 *fdhF*、*aceE* 和 *gdhA* 基因，将促进大肠杆菌番茄红素的合成^[2]。为此，我们利用 λ -Red 重组技术，敲除了大肠杆菌 BW25113 的 *fdhF*、*aceE* 和 *gdhA* 基因，并将含番茄红素合成基因簇 *crtEIB* 和 *ipi* 的质粒 pAC-LYC04 导入敲除菌中，检测基因敲除对番茄红素合成的影响，结果见图 1(a)。从图 1(a) 可看出，营养丰富的 2YT 培养基比 2M9 培养基更适合于番茄红素的合成。为此，以后实验我们采用 2YT 培养基进行番茄红素的发酵生产。单基因敲除无论在 2M9 还是在 2YT 培养基中，对番茄红素合成稍有促进作用，但是多基因敲除对番茄红素合成有较强的促进作用。在 2M9 培养基中，三基因敲除对番茄红素合成的促进作用最强，这与 Stephanopoulos 研究小组报道结果一致^[2]，但是在 2YT 培养基中，*aceE* 和 *gdhA* 双基因敲除和 *fdhF*、*aceE* 和 *gdhA* 三基因敲除的促进作用差不多。因此，后面研究中我们以 *aceE* 和 *gdhA* 双基因敲除菌作为宿主菌。*gdhA* 编码谷氨酸脱氢酶，催化 α -酮戊二酸和 NADPH 转化成谷氨酸，敲除 *gdhA* 能够增加 NADPH 的供应，而合成 1 mol 番茄红素需

要 16 mol NADPH^[2]。*fdhF* 编码甲醛脱氢酶，催化甲醛转化为 CO₂，敲除 *fdhF* 后可以减少丙酮酸(Pyr)流向甲醛及其副产物，从而提高丙酮酸的供给。*aceE* 编码丙酮酸脱氢复合体的 E1 亚基(丙酮酸脱氢酶组分)，敲除 *aceE* 阻止了丙酮酸向乙酰辅酶 A 的转化，同样可以增加丙酮酸的供给。从图 1(b) 可看出，基因敲除将抑制菌体的生长，尤其 *aceE* 基因的敲除将严重抑制菌体的生长，但当添加 KAc 后又将削弱因 *aceE* 敲除而引起的生长抑制。这主要是由于 *aceE* 基因的敲除造成了乙酰辅酶 A 供给的不足，从而抑制了柠檬酸循环，导致一些氨基酸和 ATP 的合成受到抑制，因此严重影响了菌体的生长。KAc 通过 *acs* 编码的乙酰辅酶 A 合成酶催化生成乙酰辅酶 A，添加 KAc 可弥补因 *aceE* 被敲除而导致的乙酰辅酶 A 供应的不足^[15]。实验还发现，添加 2 mM KAc 能够部分消除敲除 *aceE* 对菌体生长造成的影响，而添加 0.5% KAc 则基本能够完全消除敲除 *aceE* 对菌体生长造成的影响(结果未呈现)。

3.2. *dxs* 基因启动子置换

dxs 基因编码 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DXP)合成酶，催化甘油醛-3-磷酸(G3P)和丙酮酸(Pyr)合成 DXP，它是大肠杆菌通过 MEP 途径合成 IPP(合成番茄红素重要前体)的第一个步骤。许多研究发现 *dxs* 基因是番茄红素合成的关键基因，*dxs* 基因的过量表达将促进番茄红素的合成^[3-6]。可是基于质粒的基因过量表达，虽然能提高基因的表达水平，但同时又将增加代谢

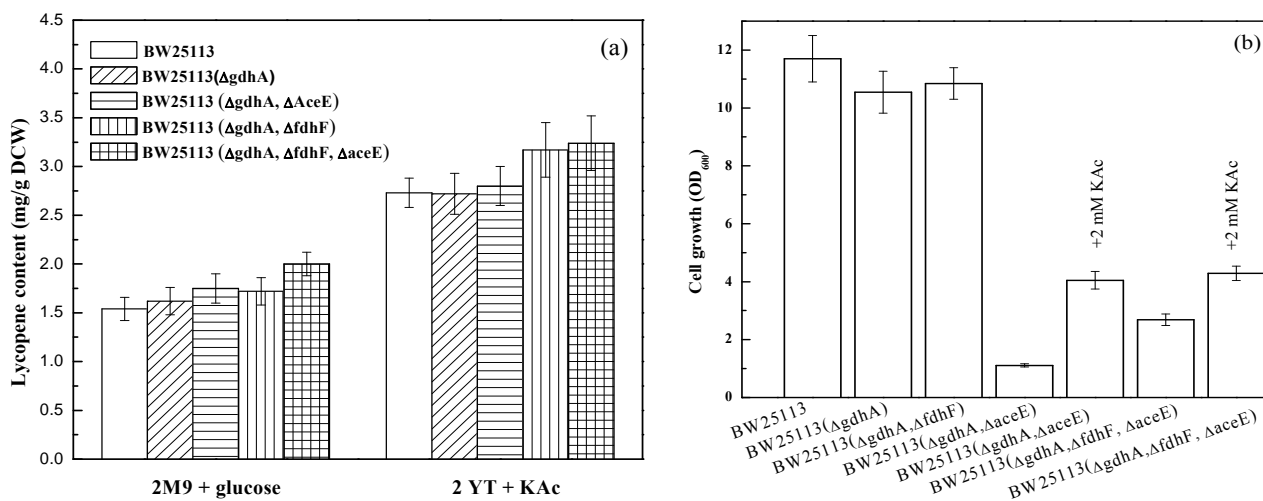


Figure 1. Effects of gene knockout on lycopene production (a) and cell growth (b) in *E. coli* BW25113 harboring pAC-LYC04

图 1. 基因敲除对番茄红素合成(a)及重组大肠杆菌生长(b)的影响

负担、消耗代谢中间产物，而且存在质粒不稳定性(包括结构不稳定性和分离不稳定性)的缺陷^[16,17]。增大启动子强度同样是提高基因表达水平的一种方法。近年来，启动子工程已成功应用于代谢工程领域，以调节基因的表达从而提高产物的合成产率^[8,9]。为此，我们利用 λ -Red 重组技术，将大肠杆菌 BW25113(Δ *gdhA* Δ *aceE*)的 *dxs* 基因的天然启动子置换成 pQE30 的 T5 启动子。结果表明，T5 置换导致重组大肠杆菌番茄红素产量提高了 103%(表 3)。Yuan 等在研究 β -胡萝卜素时获得了相似的结果，他们研究发现 *dxs* 基因的天然启动子置换成 T5 启动子导致重组大肠杆菌 β -胡萝卜素产量提高了 1 倍^[8]。Alper 等利用易错 PCR 技术将 P_{LtetO-1} 启动子进行随机突变，构建了一个具有不同强度的启动子文库，并将获得的强启动子置换大肠杆菌 *dxs* 基因的天然启动子，发现增大启动子强度将有利于重组大肠杆菌番茄红素的合成^[9]。

3.3. 组成型质粒的构建

组成型质粒因不需要添加诱导剂，这有利于工业化生产。pAC-LYC04 也是一个组成型质粒，它含有草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*) *crtEIB* 和雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) *ipi* 基因，但在 *crtE* 和 *crtI* 中间存在一段未知基因。Kang 等研究发现去除这段未知基因将导致大肠杆菌番茄红素产量提高了 3 倍^[5]。为此，我们从 pAC-LYC04 中扩增 *crtE*、*crtI*、*crtB* 和 *ipi* 基因，并将其串联在一起，同时与其它关键基因相连接，成功构建获得了 13 种 pAC315(4893 bp)和 pAC316(4253 bp)系列的组成型表达载体。图 2 为代表性的含不同组成型质粒大肠杆菌 BW25113 产番茄红素的情况。从图 2 可看出，无论是含 pAC315 还是含 pAC316 质粒的重组大肠杆菌合成番茄红素的水平都比对照菌(含 pAC-LYC04)高；而且在反向连接表达相同基因时(如 WZM1R、WZM3R 或 WZM4R)，采用 pAC316 系列质粒的番茄红素产量远远高于采用 pAC315 系列质粒的产量。这主要是由于目的基因距离启动子越远，转录水平相应下降，从而导致代谢终产物产量下降^[18]。在正向连接时，基因表达是利用载体的四环素抗性基因的启动子，而反向链接时则利用载体的氯霉素抗性基因启动子。在反向链接时，采用 pAC315 系列质粒中氯霉素抗性基因启动子与目的基

Table 3. Effect of the replacement of native promoter of *dxs* gene by the promoter of T5 on lycopene production
表 3. *dxs* 基因启动子置换的影响

Strain	Lycopene content (mg/g DCW)
BW25113 (Δ <i>gdhA</i> Δ <i>aceE</i> , pAC-LYC04)	3.15 \pm 0.19
BW25113 (Δ <i>gdhA</i> Δ <i>aceE</i> , pAC-LYC04, P _{T5-<i>dxs</i>})	6.40 \pm 1.58

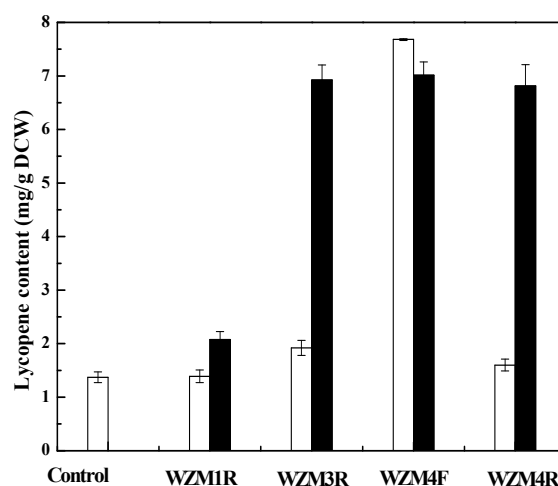


Figure 2. Effects of constitutive plasmids on lycopene production by *E. coli* BW25113. pAC315(open bars); pAC316(solid bars). R represents reverse ligation; F represents forward ligation. *E. coli* BW25113 (pAC-LYC04) was controlled strain
图 2. 组成型质粒对野生型大肠杆菌合成番茄红素的影响。pAC315(空白柱); pAC316(黑体柱)。R 指反相连接; F 指反相连接。大肠杆菌 BW25113 (pAC-LYC04)为对照菌

因间距离比 pAC316 系列质粒的长约 640 bp。

将上述筛选得到的番茄红素产量较高的 3 个质粒 pAC315-WZM4F、pAC316-WZM3R 和 pAC316-WZM4R 分别转化到上面的基因敲除菌 BW25113 (Δ *gdhA* Δ *aceE*), 考察其番茄红素的合成。结果见图 3。结果表明含组成型质粒 pAC315-WZM4F、pAC316-WZM3R 和 pAC316-WZM4R 的菌株番茄红素产量都远远高于含 pAC-LYC04 对照菌，其中含 pAC316-WZM3R 和 pAC316-WZM4R 菌产量最高。接着，将它们转化到双基因敲除的 *dxs* 启动子 T5 置换菌 BW25113 (Δ *gdhA* Δ *aceE*, P_{T5-*dxs*})中，考察其番茄红素的合成。结果见图 3。结果表明，含 pAC316-WZM3R 和 pAC316-WZM4R 的 *dxs* 启动子 T5 置换的双基因敲除菌，番茄红素产量得到了进一步提高，其中大肠杆菌 BW25113 (Δ *gdhA* Δ *aceE*, P_{T5-*dxs*}, pAC316-WZM4R) 可产 15.47 mg/g DCW)。从图 3 同样可看出，各种质粒对细胞生长影响不大。

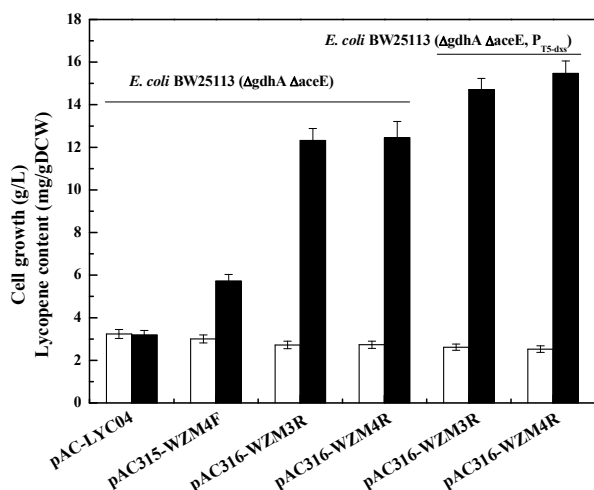


Figure 3. Effects of constitutive plasmids on cell growth (open bars) and lycopene production (solid bars) by engineered *E. coli*
图 3. 组成型质粒对工程大肠杆菌生长(空白柱)和合成番茄红素(黑体柱)的影响

3.4. 发酵过程的表征

为了了解最后构建的工程菌培养过程特性，我们测定了大肠杆菌 BW25113 ($\Delta gdhA \Delta aceE$, P_{T5-dxs} , pAC316-WZM4R)不同发酵时间的菌体生长和番茄红素合成，如图 4。由图可知，重组大肠杆菌经过短暂的适应期后，很快进入对数生长期，大约 26 h 细胞生长达到最大值，其后由于营养成分的不足，细胞进入衰老期，细胞浓度开始下降。番茄红素同样在对数生

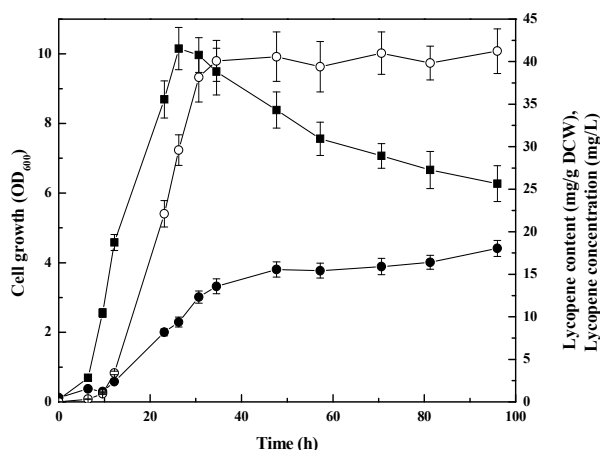


Figure 4. Time course of recombinant *E. coli* BW25113 ($\Delta gdhA \Delta aceE$, P_{T5-dxs} , pAC316-WZM4R) growth and lycopene production. Cell growth (■), lycopene content (●) and lycopene concentration (○). Data represent the mean of the triplicate cultures \pm standard deviation

图 4. 重组大肠杆菌 BW25113 ($\Delta gdhA \Delta aceE$, P_{T5-dxs} , pAC316-WZM4R)发酵过程时间曲线。生长(■)，番茄红素含量(●)和番茄红素浓度(○)，数据为三批发酵的平均值 \pm SD

长期开始大量合成，34 h 左右番茄红素产量达到最大值(40.1 mg/L)，其后番茄红素产量几乎不变，但菌体中番茄红素含量却仍慢速地增加，到 48 h 菌体中番茄红素含量达到最大值 15.6 mg/g DCW，该值接近目前研究重组大肠杆菌产番茄红素最系统的美国麻省理工大学 Stephanopoulos 教授课题组的先进水平^[1-3]。由此可说明，重组大肠杆菌番茄红素的合成是生长耦联的，在发酵后期若能进行营养物质的补充(如采用后期流加补料工艺)，番茄红素产量可望进一步提高。

4. 结论

aceE 和 *gdhA* 基因敲除，同时关键基因 *dxs* 天然启动子被强启动子 T5 置换，大大提高了大肠杆菌合成番茄红素的能力。所构建的大肠杆菌 BW25113 ($\Delta gdhA \Delta aceE$, P_{T5-dxs})在引入异源胡萝卜素基因后，同样可作为合成其它类胡萝卜素(如 β -胡萝卜素、玉米黄素、角黄素、虾青素、海胆酮等)的出发菌株。我们构建的代谢工程大肠杆菌 W25113 ($\Delta gdhA \Delta aceE$, P_{T5-dxs} , pAC316-WZM4R)在发酵培养 48 h 时，可产番茄红素 15.6 mg/g DCW，而且我们构建的工程菌由于采用组成型质粒，不需要诱导剂，从控制生产成本的角度来看，这对放大培养是有利的。为了进一步提高番茄红素的产率，今后的工作一方面可考虑将关键基因整合到染色体上，同时结合其它关键基因启动子的置换，以减轻高拷贝质粒引起的代谢负担，增加工程菌的遗传稳定性；另一方面可尝试对已构建的工程菌 W25113 ($\Delta gdhA \Delta aceE$, P_{T5-dxs} , pAC316-WZM4R)进行发酵培养条件的优化及高密度发酵，以提高番茄红素的产量，为工业化生产奠定基础。

5. 致谢

本项目得到了国际自然科学基金项目(No. 3097 0089)和广东省自然科学基金项目(No. 9351027501 000003, S2011010001396)的资助，在此表示感谢！

参考文献 (References)

- [1] H. Alper, G. Stephanopoulos. Uncovering the gene knockout landscape for improved lycopene production in *E. coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(5): 801-810.
- [2] H. Alper, Y. S. Jin, J. F. Moxley, et al. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2005, 7(3): 155-164.

- [3] Y. S. Jin, G. Stephanopoulos. Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(4): 337-347.
- [4] W. R. Farmer, J. C. Liao. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 2001, 17(1): 57-61.
- [5] M. J. Kang, S. H. Yoon, Y. M. Lee, S. H. Lee, J. E. Kim, K. H. Jung, Y. C. Shin and S. W. Kim. Enhancement of lycopene production *Escherichia coli* by optimization of the lycopene synthetic pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 15(4): 880-886.
- [6] S. H. Yoon, Y. M. Lee, J. E. Kim, S. H. Lee, J. H. Lee, J. Y. Kim, K. H. Jung, Y. C. Shin, J. D. Keasling and S. W. Kim. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(6): 1025-1032.
- [7] L. Z. Yuan, P. E. Rouvière, R. A. LaRossa and W. Suh. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(1): 79-90.
- [8] H. Alper, C. Fischer, E. Nevoigt and G. Stephanopoulos. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102(36): 12678-12683.
- [9] H. Alper, G. Stephanopoulos. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(3): 258-267.
- [10] C. J. Chiang, P. T. Chen and Y. P. Chao. Replicon-free and markerless methods for genomic insertion of DNAs in phage attachment sites and controlled expression of chromosomal genes in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(5): 985-995.
- [11] K. E. J. Tyo, P. K. Ajikumar and G. Stephanopoulos. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nature Biotechnology*, 2009, 27: 760-765.
- [12] F. X. Cunningham, Z. Sun, D. Chamovitz, J. Hirschberg and E. Gantt. Molecular structure and enzyme function of lycopene cyclase from the Cyanobacterium *Synechococcus sp.* Strain PCC7942. *The Plant Cell*, 1994, 6(8): 1107-1121.
- [13] K. A. Datsenko, B. L. Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [14] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14): 4121-4130.
- [15] D. Langley, J. R. Guest. Biochemical genetics of the alpha-keto acid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli* K12: Genetic characterization and regulatory properties of deletion mutants. *Journal of General Microbiology*, 1978, 106(1): 103-117.
- [16] M. O'Connor, M. Peifer and W. Bender. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*, 1989, 244(4910): 1307-1312.
- [17] D. Noack, M. Roth, R. Geuther, G. Müller, K. Undisz, C. Hoffmeier and S. Gáspár. Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in *Escherichia coli* K12 strains grown in a chemostat. *Molecular and General Genetics*, 1981, 184(1): 121-124.
- [18] T. Nishizaki, K. Tsuge, M. Itaya, N. Doi and H. Yanagawa. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1355-1361.