



张艺妍,徐哲,顾向阳. 谷氨酸和脯氨酸促进 *Cereibacter sphaeroides* DT.1 番茄红素积累的作用与机制[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4): 822-832.

Zhang Y Y,Xu Z,Gu X Y. The role of glutamate and proline in enhancing lycopene accumulation in *Cereibacter sphaeroides* DT.1 and its mechanism [J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):822-832.

谷氨酸和脯氨酸促进 *Cereibacter sphaeroides* DT.1 番茄红素积累的作用与机制

张艺妍,徐哲,顾向阳*

(南京农业大学农业农村部农业环境微生物学重点实验室/生命科学学院,江苏 南京 210014)

摘要:[目的]本文旨在分离鉴定具有积累番茄红素能力的紫色非硫细菌,分析番茄红素的合成途径,研究谷氨酸和脯氨酸促进番茄红素积累的机制。[方法]采用双层板法从底泥中富集分离紫色非硫细菌,通过基因组测序和代谢组分析,揭示番茄红素合成的代谢途径;比较分离菌株在不同条件及不同培养基中生长及积累番茄红素的性能,研究不同氨基酸对分离菌株积累番茄红素的影响,通过差异转录组结合差异代谢组学分析谷氨酸或脯氨酸促进番茄红素积累的机制。[结果]分离鉴定到1株具有番茄红素合成能力的紫色非硫细菌,经16S rRNA基因及全基因组比对,将该菌株鉴定并命名为 *Cereibacter sphaeroides* DT.1。基因组测序和代谢组结果表明该菌株通过4-磷酸甲基赤藓糖醇(MEP)途径合成番茄红素,且该途径的八氢番茄红素去饱和酶(CrtI)具有4步脱氢功能,可以催化八氢番茄红素经四步脱氢形成番茄红素。在好氧黑暗条件下,8种氨基酸可以提高番茄红素的产量,其中谷氨酸和脯氨酸促进效果最佳,在酵母粉培养基中添加400 mg·L⁻¹的谷氨酸或脯氨酸,番茄红素积累量分别较对照提高99.4%和101.7%。添加谷氨酸或脯氨酸后非环化类胡萝卜素1,2-水合酶基因 *crtC* 的表达水平显著下降,丙酮酸、乙酰辅酶A等番茄红素合成前体物质的积累明显增加。[结论]在酵母粉培养基中添加谷氨酸或脯氨酸可以显著提高 *C. sphaeroides* DT.1 中番茄红素的产量;谷氨酸或脯氨酸提高番茄红素产量的机制主要为下调非环化类胡萝卜素1,2-水合酶基因的表达,促进番茄红素合成前体物质的积累。

关键词: *Cereibacter sphaeroides*; 番茄红素; 氨基酸; *crtC* 基因

中图分类号:Q939.99

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2026)04-0822-11

The role of glutamate and proline in enhancing lycopene accumulation in *Cereibacter sphaeroides* DT.1 and its mechanism

ZHANG Yiyan,XU Zhe,GU Xiangyang*

(Key Lab of Microbiology for Agricultural Environments,Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
College of Life Sciences,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China)

Abstract:[Objectives]The paper aimed to isolate and identify purple non-sulfur bacteria capable of accumulating lycopene,analyze the biosynthetic pathway of lycopene,and investigate the mechanisms by which glutamate and proline promote the accumulation of lycopene.[Methods]The double-layer plate method was used to enrich and isolate purple non-sulfur bacteria from fish pond sediments. Genome sequencing and metabolomics analysis were used to explore the metabolic pathways of lycopene synthesis. The growth of and lycopene accumulation in the isolated strains were compared under different conditions and in different culture media. The effects of the addition of different amino acids on the lycopene accumulation in the isolated strains were studied. The mechanisms by which glutamate or proline promote lycopene accumulation were analyzed through differential transcriptomics combined with differential metabolomics.[Results]A purple non-sulfur bacterium capable of synthesizing lycopene was isolated and identified. Through comparison of the 16S rRNA gene and whole-genome sequences, the strain was identified and named as *Cereibacter sphaeroides* DT.1. Genome sequencing and metabolomic results indicated that this strain synthesized lycopene via the methylerythritol 4-phosphate(MEP)pathway. Moreover,the phytoene desaturase(CrtI)in this pathway possessed a 4-step desaturation activity. Under aerobic dark conditions,increased lycopene yield was observed due to the addition of eight amino acids,among which glutamic acid and proline showed the most significant promoting effects. Compared to the control,accumulation of lycopene increased by 99.4% and

收稿日期:2025-02-15

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFC1906404);江苏省碳达峰碳中和科技创新专项(BE2022421)

作者简介:张艺妍,硕士研究生。*通信作者:顾向阳,副教授,主要从事环境微生物工程研究,E-mail:gxy@njau.edu.cn。

101.7%, respectively by adding $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of glutamic acid or proline to the yeast extract medium. Addition of glutamic acid or proline led to a significant decrease in the expression level of the acyclic carotenoid 1,2-hydratase gene *crtC*, and a significant increase in the accumulation of lycopene synthesis precursors such as pyruvate and acetyl-CoA. [Conclusions] Lycopene yield of *C. sphaeroides* DT.1 could be significantly enhanced by the addition of either glutamate or proline addition. The mechanisms for enhanced lycopene production by glutamate or proline addition include downregulation of the expression levels of acyclic carotenoid 1,2-hydratase genes and promotion of the accumulation of precursor for lycopene synthesis.

Keywords: *Cereibacter sphaeroides*; lycopene; amino acids; *crtC* gene

番茄红素是一种天然的类胡萝卜素,存在于多种植物中,特别是可食部分呈红色、黄色的植物中,如番茄^[1]、西瓜^[2]、石榴^[3]和木瓜^[4]等。它具有淬灭活性氧、消除自由基的能力,在预防心脏病、减缓动脉粥样硬化、预防多种癌症以及保护心血管等方面发挥着重要作用^[5],其强大的生理活性引起了广泛的关注,导致全球市场需求的不断增长^[6]。番茄红素的合成已成为一个重要的研究热点^[7]。合成番茄红素主要有植物提取、化学合成和微生物生产等方法^[8]。从植物中提取番茄红素,尤其是从番茄中提取是一种传统且普遍采用的方法,通常涉及多种提取技术,如有机溶剂萃取法、超声波辅助提取法和超临界流体萃取法等^[8]。不足之处是,番茄及其他植物中的番茄红素含量相对较低^[9],同时存在资源利用效率不佳等问题^[10];而化学合成番茄红素时化学残留物质对食品安全构成潜在的风险;而微生物生产番茄红素作为一种较为高效与安全的生产方式已被广泛应用^[8]。

光合细菌中的紫色非硫细菌(purple non-sulfur bacteria, PNSB)对环境适应能力强,可在好氧、厌氧条件下分别进行化能异养、光能异养生长,并且具有合成类胡萝卜素的能力,这使得 PNSB 成为番茄红素生物合成的理想菌株^[10]。文献报道产番茄红素的 PNSB 有 *Rhodospirillum rubrum*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Rhodopseudomonas faecalis*、*Rhodobacter sphaeroides* 等^[11-13]。作为类胡萝卜素合成途径的中间产物,番茄红素合成以后可在非环化类胡萝卜素 1,2-水合酶(CrtC)的作用下进一步转化为下游代谢物,导致野生型菌株中不积累番茄红素或积累量很低($0 \sim 3.24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,以细胞干重计,下同),因此敲除 *crtC* 基因通常可以有效提高 PNSB 中番茄红素的产量^[14]。现有研究显示,原核生物主要通过 4-磷酸甲基赤藓糖醇(methylerythritol 4-phosphate, MEP)途径合成番茄红素^[15],而八氢番茄红素去饱和酶(CrtI)是该途径的关键酶,其活性及功能对 PNSB 合成番茄红素的能力有很大影响,在有的菌株中 CrtI 具备 4 步脱氢功能,可以催化八氢番茄红素经 4 步脱氢反应直接形成番茄红素^[16-19],但有的菌株中 CrtI 只有 3 步脱氢功能,需要引入外源 *crtI₄* 才能具备合成番茄红素的能力^[14]。

利用 PNSB 制备番茄红素需要厌氧光照培养条件,由于菌体细胞的遮光效应使得它在规模化发酵上有局限性,而好氧发酵可以有效克服上述缺点,但目前还较少有相关研究的报道^[14]。因此本研究的目的是探索好氧条件下合成番茄红素的可行性,研究氨基酸对细菌合成番茄红素的影响并探究其内在机制,以期对番茄红素的生物合成奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

富集培养基:乙酸钠 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,七水合硫酸镁 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,氯化铵 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,氯化钠 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,无水磷酸氢二钾 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,碳酸氢钠 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,酵母提取物 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,微量元素溶液 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,维生素储备液 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。微量元素溶液:硼酸 $0.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,硫酸锰 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,二水合钼酸钠 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,六水合氯化铁 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,三水合硝酸铜 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。维生素储备液:维生素 B1 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,尼克丁酸 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对氨基苯甲酸 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生物素 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

酵母粉蛋白胨培养基:酵母提取物 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,蛋白胨 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,七水合硫酸镁 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,氯化铵 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,氯化钠 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,无水磷酸氢二钾 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,微量元素溶液 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。根据试验需要去除蛋白胨或酵母粉可分别配制成酵母粉培养基或蛋白胨培养基。

1.2 试验设计

1.2.1 光合细菌的分离与鉴定 试验菌株分离自江苏省东台市某鱼塘底泥。在 120 mL 血清瓶中加入 60 mL 富集培养基,在厌氧光照($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000 \text{ lx}$)条件下进行富集培养,当培养液变为棕红色时采用双层平板法进行分离和纯化。通过透射电子显微镜(日立, H7650)观察分离菌株的形态特征。将菌体接种于装有酵

母粉蛋白胨培养基的摇瓶中培养至对数生长期($D_{660}=1.0$),取 50 mL $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后收集菌体,液氮速冻后加足量干冰寄送武汉华大基因生物技术有限公司,使用 Illumina TruSeq™ Nano DNA 试剂盒进行 DNA 提取与文库构建,随后采用 PacBio 技术进行全基因组测序。从细菌全基因组中获得 16S rRNA 基因全长序列,提交 NCBI (GenBank 登录号:PQ416756),并与相关模式菌株比对,使用邻接法构建系统发育树。全基因组序列上传 JSpeciesWS 网站并与模式菌株 *Cereibacter sphaeroides* ATH 2.4.1 比对计算平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI),将分离菌株鉴定至属种。

1.2.2 光合细菌番茄红素积累能力的测定 在厌氧光照和好氧黑暗 2 种条件下比较分离菌株在酵母粉培养基、蛋白胨培养基、酵母粉蛋白胨等 3 种培养基中生长和合成番茄红素的能力。厌氧光照培养在装有 60 mL 培养基的 120 mL 血清瓶中进行,培养条件为光照度 $3\,000\text{ lx}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;好氧黑暗培养在装有 100 mL 培养基的 250 mL 摇瓶中进行,培养条件为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。培养 24 或 48 h 取样测定 D_{660} 和番茄红素的产量。

在摇瓶条件下研究不同氨基酸对分离菌株生长和细胞内番茄红素积累的影响^[20-21],在酵母粉培养基中分别添加 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 19 种氨基酸,以未添加氨基酸的培养基作为对照,所有处理均进行 3 次重复。 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h 后取 50 mL 细菌培养液 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,将所得细胞沉淀在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下真空冷冻干燥(Thermo, Power dry LL3000)后提取番茄红素并测定其产量。根据上述结果确定对番茄红素积累促进作用最显著的氨基酸,进一步测定这些氨基酸在不同浓度条件下对分离菌株生长和番茄红素积累的促进作用。

1.2.3 转录组和代谢组分析 将菌株 DT.1 接种于含 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的谷氨酸或脯氨酸的培养基中,在好氧黑暗条件下($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)培养 24 h。取 50 mL 菌液,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 1 min。弃去上清液,用预冷 PBS 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下洗涤菌体沉淀 2 次,然后将菌体沉淀在液氮中速冻,并使用足量干冰寄送至广州基迪奥生物技术有限公司进行转录组和代谢组分析,每个处理准备 3 个独立样本。对不同样品每个基因的表达比较采用负二项分布统计模型进行检验,得到基因比较的 P 值,然后使用 Benjamini-Hochberg(BH)法修正 P 值得到基因之间显著差异的 FDR(false discovery rate)。按照 $|\log FC| \geq 1$ 和 $FDR \leq 0.05$ 标准确定差异表达显著的基因,然后根据 GO 和 KEGG 数据库注释结果,对差异基因进行相关分类和分析。差异代谢物则以 $P < 0.05$ 和 VIP(variable importance in projection) > 1 为阈值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 采用 RNA-easy Isolation Reagent(Vazyme)总 RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA,使用 Thermo Scientific NanoDrop One 分光光度计检测其纯度和浓度。以 16S rRNA 作为内参基因,根据 Caetano-Lopes 等^[22]的方法进行 RNA 反转录和实时定量 PCR。用于 RT-qPCR 分析的引物见表 1。

表 1 RT-qPCR 所使用的引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR in this work

基因 Gene	正向引物 Forward primer(5'→3')	反向引物 Reverse primer(5'→3')
<i>crtC</i>	TGACGCTCAAGGACGATGGC	CCAGGTCCAGAAACGGAAGTCG
<i>crtD</i>	AATCGAGGGCGGGATGCA	TCGCCGTGAAGACGATGTGA
<i>crtF</i>	GTCCGGGCTTCGTCCATT	GGCTCGGTCTCGCCTTTCA
<i>crtA</i>	ACCAAGATGGCCGACGAGA	AGAAGGTAACCTGCTGGACGAA
<i>fabF</i>	TGGATGGAGCCCAAGGACAG	GGATGAAGAAGGCGGAGACG
<i>glbB</i>	GGCTCTACCTGCTCGCTGTC	GCGGATCTCGTGGCTCTTCA

注:*crtC*:羟基链孢红素合酶基因 Hydroxyneurosporene synthase gene;*crtD*:羟基链孢红素去饱和酶基因 Hydroxyneurosporene desaturase gene;*crtF*:羟基链孢红素-O-甲基转移酶基因 Hydroxyneurosporene-O-methyltransferase gene;*crtA*:球形烯单加氧酶基因 Spheroidene monogenase gene;*fabF*:3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]合酶 II 基因 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II gene;*glbB*:谷氨酰胺合酶大亚单位基因 Glutamate synthase subunit alpha gene.

1.2.5 番茄红素的提取及色素吸收光谱测定 取 20 mL 培养液离心收集菌体($12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min),使用预冷的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS(pH7.5)洗涤 2 次,真空冷冻干燥后^[23-25]向离心管中加入 5 mL 预冷的丙酮-甲醇(体积比 1:1)溶液,并用锡箔纸包裹避光,在黑暗中涡旋振荡 10 min,直到菌体沉淀变为无色^[18]。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min,取上清液过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜得到提取液,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的棕色色谱瓶中,2 d 内上样分析。使用酶标仪(美谷,MD iD5-1)对色素提取液在 $320\sim 1\,000\text{ nm}$ 处扫描测定其吸收光谱。

1.2.6 番茄红素的定量分析 采用高效液相色谱仪(CTO-20A,日本岛津)测定番茄红素的含量,色谱柱为 C_{18} 反相色谱柱(ZorbaxSB-Aq, $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),紫外检测波长为 450 nm 。流动相由乙腈、异丙醇和甲醇(体积比 5:2:3)组成,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$,运行时间 8 min。将番茄

红素标准样品溶解于丙酮-甲醇(体积比 1:1)溶液中制成系列浓度,制备标准曲线,以计算色素提取液中番茄红素含量。

1.3 数据统计与分析

使用 Microsoft Excel 2016 软件进行统计分析,使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图,以比较不同处理之间在 0.05 水平上的显著差异。

2 结果与分析

2.1 光合细菌 DT.1 的分离与鉴定

从江苏省东台市某淡水养殖基地的鱼塘底泥中分离出 1 株光合细菌 DT.1。菌株在酵母粉蛋白胨琼脂平板上形成深红色、湿润光滑的菌落,直径 2.5~3.8 mm。该细菌为革兰氏阴性卵圆形细胞,在透射电子显微镜下可见囊泡状光合内膜(intracellular membranes, ICM),并有聚羟基烷酸(polyhydroxyalkanoates, PHA)颗粒分布于细胞质基质中(图 1-A)。酶标仪扫描所得吸收光谱图呈现出类胡萝卜素典型的三指峰(图 1-B)。全基因组测序后获得了 1 455 bp 的 16S rRNA 基因全长序列,同 NCBI 数据库中相关模式菌株进行比对并采用邻接法构建系统发育树。结果(图 1-C)显示,菌株 DT.1 的 16S rRNA 基因与 *Cereibacter sphaeroides* ATH2.4.1、*C. johrii* JA192 和 *C. azotoformans* JA916 的相似度分别为 100%、99.79% 和 98.39%,在系统发育树中与模式菌株 *C. sphaeroides* ATH2.4.1 位于同一分支,而 *C. johrii* JA192 和 *C. azotoformans* JA916 分别处于不同分支。

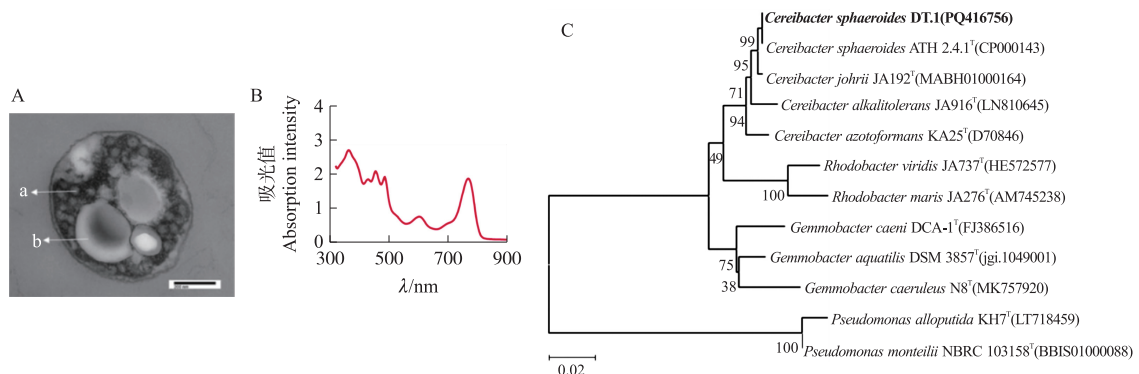


图 1 菌株 DT.1 的细胞形态、光吸收图谱以及系统发育树

Fig. 1 The cell morphology, absorption spectrum and phylogenetic tree of strain DT.1

A. 菌株 DT.1 的细胞形态及光合内膜形态(a. 聚羟基烷酸颗粒;b. 光合内膜);B. 菌株 DT.1 的色素吸收光谱;C. 菌株 DT.1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树。

A. Cellular morphology and photosynthetic membranes of strain DT.1 (a. Polyhydroxyalkanoates particle; b. Intracellular membrane); B. The pigment absorption spectrum of strain DT.1; C. The phylogenetic tree of strain DT.1 constructed based on the 16S rRNA gene sequence.

菌株 DT.1 基因组包含 4 257 个编码基因,总序列长度为 3 866 193 bp,占整个基因组序列的 86.73% (表 2)。将全基因组序列上传至 JSpeciesWS 网站,计算发现其与模式菌株 *C. sphaeroides* ATH 2.4.1 的 ANI 高达 98.14%,高于 Yoon 等^[26]判断细菌种的阈值(95%~96%),因此将分离菌株 DT.1 鉴定为 *C. sphaeroides* 种的 1 个菌株。应当说明的是 *C. sphaeroides* 原学名为 *Rhodobacter sphaeroides*,2020 年该菌连同 *Rhodobacter azotoformans*、*R. johrii* 和 *R. ovatus* 被提议重新分类到 *Cereibacter* 属中^[27],因此本文采用新学名加以命名。

表 2 菌株 DT.1 基因组特性

Table 2 Characteristics of genome of strain DT.1

基因组大小/bp	基因数量	基因总长度/bp	平均长度/bp	染色体大小/bp	质粒 1/bp	质粒 2/bp	质粒 3/bp	GC 含量/%	基因长度/基因组长度(%)
Genome size	Total number	Total length	Average length	Chromosome	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3	GC content	Length/genome length
4 364 336	4 257	3 866 193	908.20	3 154 711	908 038	200 903	100 684	69.35	88.59

获得菌株 DT.1 的全基因组序列后,通过 KEGG 数据库对基因进行注释与分类,发现该菌基因主要分布在代谢、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、细胞过程以及有机系统 6 个方面,其中 56.97% 的基因与代谢相关(图 2)。基因组分析结果(图 3)显示,分离菌株 DT.1 的基因组含有 1 个环状染色体和 3 个质粒,总长度为 4 364 336 bp,GC 含量为 69.35%。

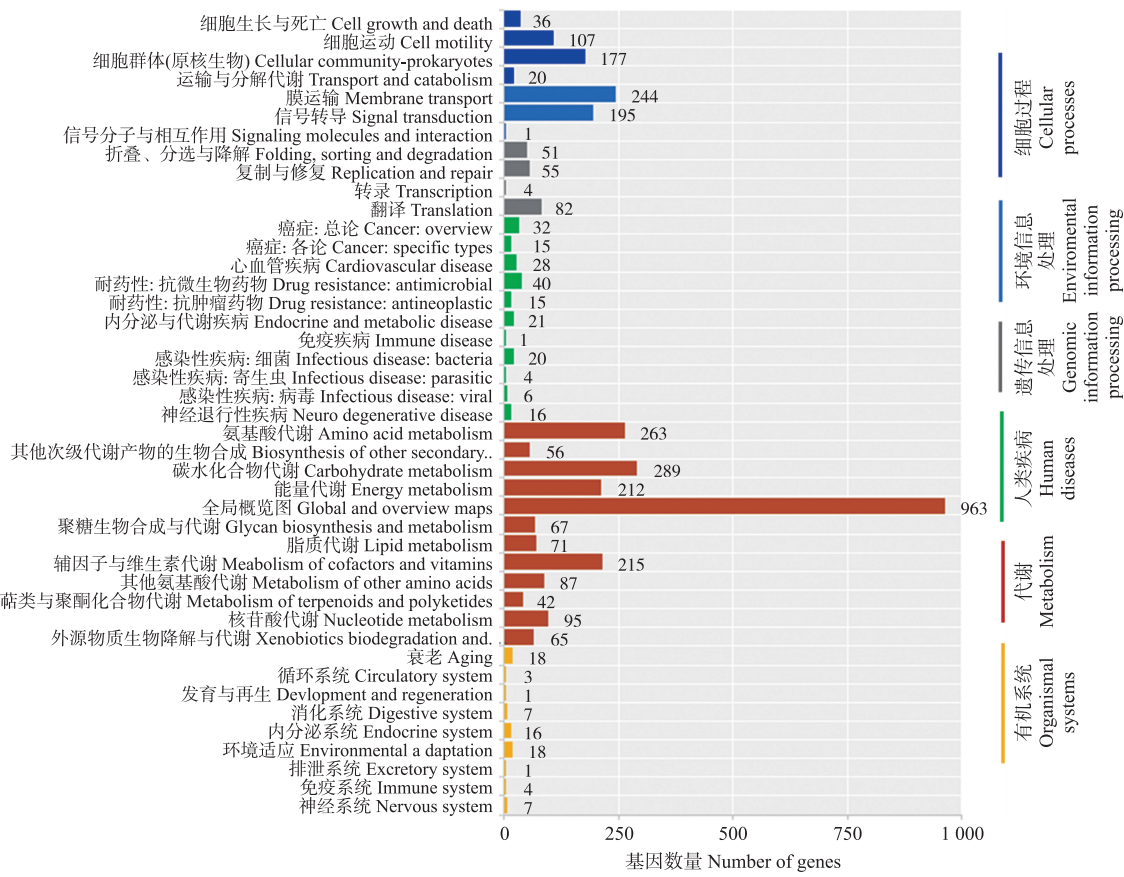


图 2 菌株 DT.1 基因组 KEGG 注释结果

Fig. 2 KEGG annotation results of the genome of strain DT.1

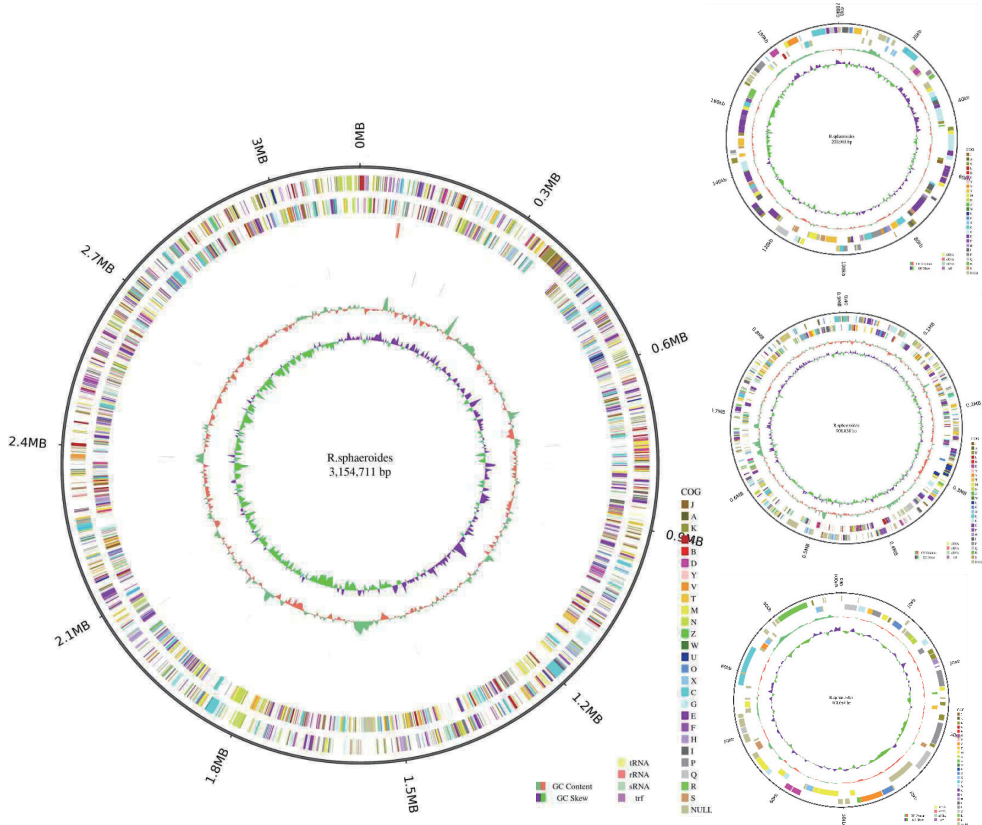


图 3 菌株 DT.1 基因组圈图

Fig. 3 Genome circle map of strain DT.1

2.2 分离菌株番茄红素的合成途径

将菌株 DT.1 的全基因组序列与 KEGG 数据库进行比对,发现菌株 DT.1 含有完整的类胡萝卜素合成通路,其中包括 *dxs*、*ispD*、*crtIDCEF*、*ppsR*、*prpA* 等与番茄红素代谢相关的基因簇。这说明该菌株通过 MEP 途径合成番茄红素,与文献报道的结果^[28]一致。值得一提的是,本研究中不仅通过 HPLC 检测到了番茄红素的积累,还通过代谢物组分析(表 3)检测到了其下游代谢物 β-类胡萝卜素、玉米黄质等,说明在菌株 DT.1 中 *crtI* 基因编码的 CrtI 具有 4 步脱氢功能,可以催化八氢番茄红素经 4 步脱氢直接形成番茄红素,因而是番茄红素合成的理想菌株。综合基因组和代谢组分析结果推断番茄红素合成途径如图 4 所示。

表 3 菌株 DT.1 番茄红素合成相关代谢物
Table 3 Metabolites related to lycopene synthesis in strain DT.1

代谢物编号 Metabolite index	代谢物名称 Metabolites name	保留时间/min Retention time	对照组 CK	Glu 处理组 Glu	Pro 处理组 Pro
M537T173_POS	β-胡萝卜素 β-carotene	2.88	7 781.43	14 439.83	15 336.38
M569T184_POS	玉米黄素 Zeaxanthin	3.07	963 075.70	926 266.30	776 124.00
M569T206_POS	叶黄素 Lutein	3.43	1 160 456.61	919 355.83	653 686.38
M619T231_POS	斑螫黄质 Canthaxanthin	3.02	6 857.63	18 838.77	7 727.39
M619T231_POS	虾青素 Astaxanthin	3.85	2 039.10	2 957.82	2 380.18
M535T173_POS	红酵母烯 Torulene	2.89	11 520.06	40 305.76	23 530.64
M582T33_3_POS	球状菌素 Spheroidenone	0.55	21 182.96	175 102.50	458 504.69
M313T443_NEG	牻牛儿基焦磷酸 Geranyl pyrophosphate (GPP)	7.38	23 260.55	152 115.30*	330 939.50*
M381T318_NEG	法尼基焦磷酸 Farnesyl pyrophosphate (FPP)	5.30	19 575.74	5 487.88	4 712.32

Note: * $P<0.05$, $VIP>1$.

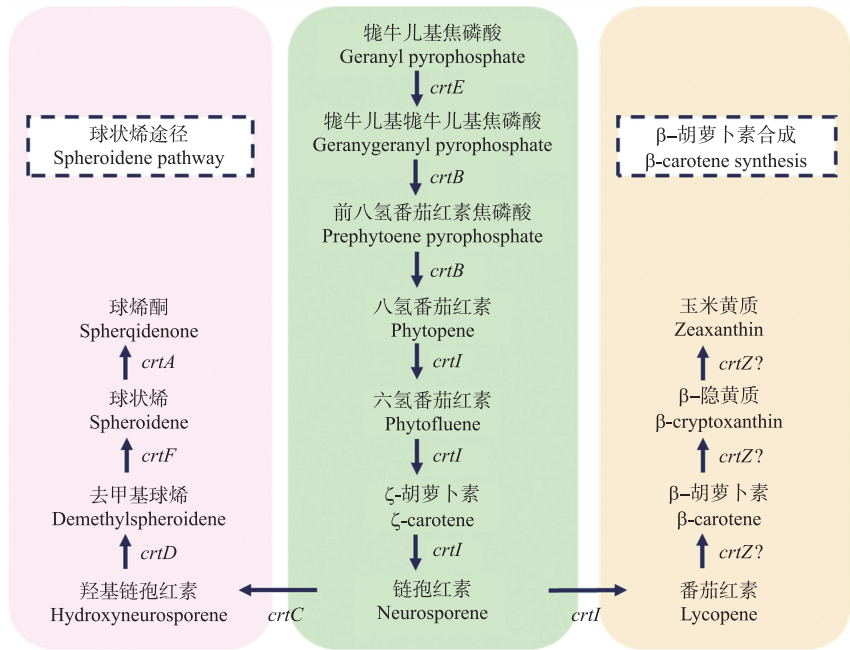


图 4 菌株 DT.1 合成番茄红素代谢通路推断图
Fig. 4 Deduced metabolic pathway for lycopene synthesis in strain DT.1

“?”表示基因组未注释到该基因但检测到了相关转化产物。

“?”indicated that the gene was not annotated in the genome, but the relevant transformation product was detected.

2.3 分离菌株积累番茄红素的条件与产量

菌株 DT.1 在厌氧光照和好氧黑暗 2 种条件下合成积累番茄红素的结果(表 4)显示,该菌株生长与积累番茄红素的条件并不一致,在厌氧光照条件下其生长显著优于好氧黑暗的条件,但是并无番茄红素积累,只有在好氧黑暗的培养条件下才检测到番茄红素的积累,其中当菌株 DT.1 在酵母粉培养基中培养时可以积累 $(0.82\pm0.49)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 番茄红素,当在酵母粉蛋白胨培养基中培养时,细菌生长量和番茄红素产量均显著提高,番茄红素积累量增加至 $(1.55\pm0.27)\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,而在蛋白胨培养基中生长较差,且未检测到番茄红素的积累。

表 4 菌株 DT.1 在不同培养条件下的生长量及番茄红素含量
Table 4 Growth and lycopene content of strain DT.1 under different culture conditions

培养基成分 Medium composition	厌氧处理 Anaerobic treatment		有氧处理 Aerobic treatment	
	D_{660}	番茄红素含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Lycopene content	D_{660}	番茄红素含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Lycopene content
酵母提取物+蛋白胨 Yeast extract+peptone	2.26±0.09 ^a	BDL	1.61±0.04 ^a	1.55±0.27 ^a
酵母提取物 Yeast extract	1.82±0.04 ^c	BDL	0.79±0.04 ^b	0.82±0.49 ^a
蛋白胨 Peptone	1.77±0.02 ^b	BDL	0.34±0.02 ^c	BDL

注:BDL 表示低于检测限。同一列中的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note:BDL stands for below detection limit. The data with different lower-case letters in the same column are statistically different in the content of lycopene ($P<0.05$).

根据上述结果推断蛋白胨中某些氨基酸可能具有促进菌株 DT.1 生长及番茄红素合成的能力。为了验证上述假设,在摇瓶条件下研究 19 种氨基酸对分离菌株 DT.1 生长及番茄红素合成的影响。从图 5-A 可知,8 种氨基酸对分离菌株 DT.1 生长及番茄红素合成具有明显的促进作用,其中:谷氨酸钠和脯氨酸对分离菌株 DT.1 的生长及番茄红素合成的促进作用最强,菌体蛋白较对照分别提高 51.97% 和 52.84%,番茄红素产量较对照分别提高 45.1% 和 63.4%;其次是亮氨酸、丙氨酸等 6 种氨基酸,菌体蛋白较对照提高 18.3%~26.8%,番茄红素产量较对照提高 10.17%~24.79%。

进一步研究发现,谷氨酸和脯氨酸本身并不支持细菌的生长,但其可作为生长因子促进细菌的生长及番茄红素的积累(图 5-B、C)。在 0~400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,谷氨酸和脯氨酸对分离菌株 DT.1 生长及番茄红素合成的促进作用随着氨基酸添加浓度的增加而逐渐增强,当氨基酸浓度增加至 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时促进作用不再继续增强(图 5-D、E)。因此可推断谷氨酸及脯氨酸在 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时促进作用最强,培养至 48 h 时番茄红素合成产量达到最大,为 (2.13±0.12) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,较未补充氨基酸的对照组分别提高 99.4% 和 101.7% (图 5-F、G)。然而,同时补充 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的谷氨酸和脯氨酸并没有获得更好的促进效果。上述结果表明,通过优化培养基中氨基酸的种类及其浓度,可以显著提高菌株 DT.1 番茄红素的合成效率。

2.4 谷氨酸和脯氨酸促进番茄红素合成的机制

谷氨酸和脯氨酸对光合细菌基因表达及代谢物合成的影响结果(图 6-A)显示:与对照相比,在培养基中补充谷氨酸培养的菌体中检测到 1 506 个基因表达上调,473 个基因表达下调;补充脯氨酸培养的菌体中检测到 1 290 个基因表达上调,511 个基因表达下调。差异表达的基因多涉及能量代谢、TCA 循环、氨基酸代谢、脂肪酸代谢和类胡萝卜素的代谢等,其中表达上调的基因与番茄红素合成无明显关系,与番茄红素合成密切相关且差异表达的基因都表现为下调。例如,在类胡萝卜素代谢中参与番茄红素转化的 *crtC*、*crtD*、*crtF* 等基因的表达量均显著低于对照组,而参与番茄红素合成相关的 *crtI*、*crtB*、*crtE* 等基因的表达均无明显变化(图 6-B—D),这说明谷氨酸或脯氨酸促进番茄红素积累的机制之一是减少番茄红素的转化。

参与脂肪酸合成的 *fabB*、*fabF*、*fabG*、*fabI*、*fabZ* 5 个基因表达也显著下调(图 6-E、F,图 7),这些基因所表达的酶负责以乙酰辅酶 A 为底物合成长链脂肪酸,这些基因表达下调意味着细胞内的乙酰辅酶 A 消耗量减少,有助于提高胞内乙酰辅酶 A 的水平;与此同时,TCA 循环中的基因 *glbA*、*acnA* 以及氨基酸代谢中的基因 *glbB* 表达也显著下调,这些基因所表达的酶负责催化乙酰辅酶 A 逐步转化,最终合成谷氨酸,因此这些基因表达的下调同样有助于提高胞内乙酰辅酶 A 的水平^[29-30]。乙酰辅酶 A 的积累可以抑制丙酮酸脱氢酶系的活性,使丙酮酸累积,从而为番茄红素的合成提供更多原料^[24]。

谷氨酸和脯氨酸对菌株 DT.1 代谢组影响的结果(图 6-H)显示:与对照相比,在培养基中补充谷氨酸培养的菌体中负离子模式下检测到 83 个代谢物上调,154 个代谢物下调;补充脯氨酸培养的菌体中负离子模式下检测到 88 个胞内代谢物上调,151 个胞内代谢物下调。在添加谷氨酸或脯氨酸的处理中不仅乙酰辅酶 A 和丙酮酸明显上调,番茄红素合成的前体物质 MEP、GPP 的合成量也明显增加,与前述番茄红素积累量显著提高的分析结果相符,说明谷氨酸或脯氨酸促进番茄红素积累的第 2 种机制是通过下调编码消耗乙酰辅酶 A 的基因表达水平,进而造成胞内乙酰辅酶 A 和丙酮酸含量上升,导致番茄红素合成所需前体物质增加实现的。Li 等^[13]曾报道在培养基中添加甘油具有促进光合细菌 *Rhodospseudomonas palustris* 胞内番茄红素积累的效果,而甘油经糖酵解途径代谢的转化产物丙酮酸正是 MEP 途径的起始前体物质,该研究结果同样支持本文对第 2 种机制的解释。

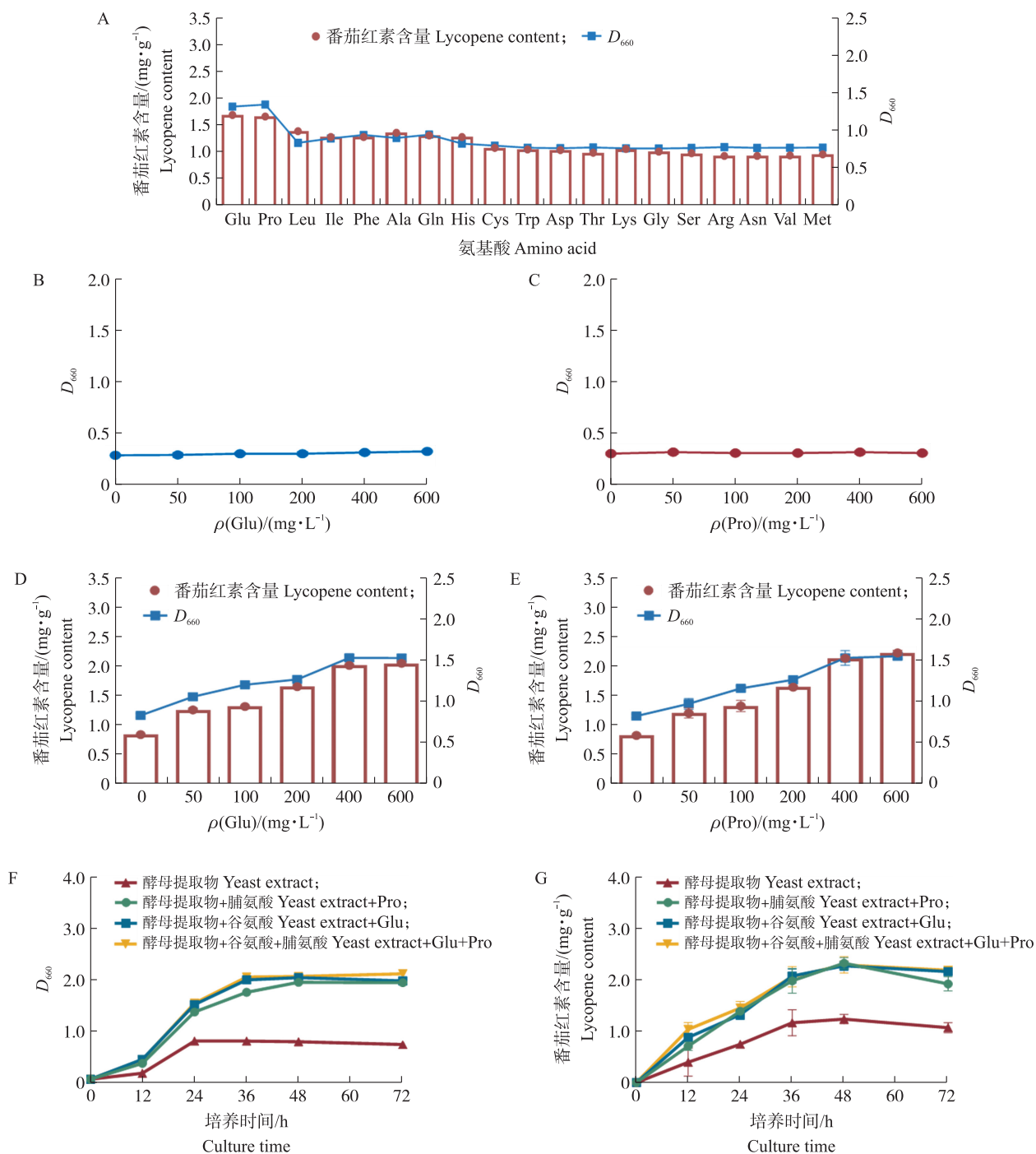


图5 菌株 DT.1 在不同培养基中的生长量及番茄红素含量

Fig. 5 The biomass and lycopene content of strain DT.1 in different culture media

A. 不同氨基酸对菌株 DT.1 的生长和番茄红素含量的影响; B、C. 谷氨酸 (B) 或脯氨酸 (C) 作为唯一碳氮源时菌株 DT.1 的生长量; D、E. 补充不同浓度谷氨酸 (D) 或脯氨酸 (E) 的酵母粉培养基中菌株 DT.1 的生长量及番茄红素含量; F、G. 补充 400 mg·L⁻¹ 谷氨酸或/和脯氨酸的酵母粉培养基中菌株 DT.1 的生长曲线 (F) 及番茄红素含量 (G)。

A. Effects of different amino acids on the growth and lycopene content of strain DT.1; B, C. Growth of strain DT.1 in the media with glutamate (B) or proline (C) as the sole carbon and nitrogen source; D, E. Growth and lycopene content of strain DT.1 in yeast extract media containing different concentrations of glutamic acid (D) or proline (E); F, G. Growth curves (F) and lycopene content (G) of strain DT.1 in yeast extract media containing 400 mg·L⁻¹ glutamic acid or/and proline.

3 讨论与结论

本文报道了1株具有番茄红素合成能力的光合细菌,经鉴定并命名为 *Cereibacter sphaeroides* DT.1。研究表明该菌株通过 MEP 途径合成番茄红素,可以在好氧黑暗条件下生长并积累番茄红素;在酵母粉培养基中添加 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的谷氨酸或脯氨酸,番茄红素积累量分别较对照提高 99.4% 和 101.7%,而其他 6 种类胡萝卜素含量并无显著差异,可见番茄红素积累量的提升主要是提高了番茄红素的比列所致,不是总类胡萝卜素含量提升所致。谷氨酸或脯氨酸促进番茄红素合成的机制相同,都是通过下调番茄红素转化相关基因 *crtC* 的表达、促进番茄红素合成前体物质的积累 2 种机制提高番茄红素的产量,同时补充 2 种氨基酸未取得更好的促进效果。

谷氨酸和脯氨酸具有相似的促进效果,主要原因是二者都利用 α -酮戊二酸作为合成前体物质,并且可以相互转换,如谷氨酸可经谷氨酰转氨酶(γ -glutamyl transferase, γ -GK)和吡咯啉-5-羧酸还原酶(pyrroline-5-carboxylate reductase, P5CR)的催化作用还原为脯氨酸,而脯氨酸可经脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase, PRODH)和吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, P5CDH)的催化作用氧化为谷氨酸^[31]。本研究在菌株 DT.1 的基因组中注释到了同时编码 PRODH 和 P5CDH 的基因 *putA*,转录组结果也检测到了该基因的表达,这说明 PRODH 和 P5CDH 生成 1 条肽链,形成 1 个双功能酶^[32],因而谷氨酸和脯氨酸均可促进番茄红素的积累。

采用传统的厌氧光照发酵工艺生产番茄红素具有发酵周期长、菌体生长易受光照强度的限制等缺点,而本文报道的 *C. sphaeroides* DT.1 可以在好氧黑暗条件下积累番茄红素,具有发酵周期短、无需光照等优点,有利于降低成本,提高生产效率,因此具有更大的应用潜力。作为类胡萝卜素合成的中间产物,野生型菌株中番茄红素的积累量通常很低,一般需要通过代谢工程改造才能获得较高产量。例如 Li 等^[13]通过敲除 *crtC* 基因,使厌氧光照条件培养的 *Rhodospseudomonas palustris* 胞内番茄红素产量由 $3.24\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高至 $32.06\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; Qu 等^[14]在 *R. sphaeroides* 中引入了 *Rhodospirillum rubrum* 的 *crtI₄*,并敲除 *crtC*、*ppsR* 基因和 *pprA* 基因过表达等改造手段,在好氧条件下使番茄红素产量提高至 $21.45\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。菌株 DT.1 胞内积累的番茄红素产量与 Li 等^[13]报道的野生型 *Rhodospseudomonas palustris* 及 Wang 等^[11]报道的野生型 *Rhodospirillum rubrum* 相当,但与经过代谢工程改造过的工程菌株相比还有一定差距,因此未来将通过代谢工程切断下游转化途径、优化发酵条件等手段,实现番茄红素的高效积累。

参考文献 References:

- [1] Zhu J F, Hu Q, Shen S. Enhanced antitumor efficacy and attenuated cardiotoxicity of doxorubicin in combination with lycopene liposomes[J]. Journal of Liposome Research, 2020, 30(1): 37-44.
- [2] Zhang J, Sun H H, Guo S G, et al. Decreased protein abundance of lycopene β -cyclase contributes to red flesh in domesticated watermelon[J]. Plant Physiology, 2020, 183(3): 1171-1183.
- [3] Pasupuleti V, Kulkarni S G. Lycopene fortification on the quality characteristics of beverage formulations developed from pink flesh guava (*Psidium guajava* L.)[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(12): 4126-4131.
- [4] Khan U M, Sevindik M, Zarrabi A, et al. Lycopene: food sources, biological activities, and human health benefits[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021(1): 2713511.
- [5] Chernyshova M P, Pristenskiy D V, Lozbiakova M V, et al. Systemic and skin-targeting beneficial effects of lycopene-enriched ice cream: a pilot study[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(1): 14-25.
- [6] Wang Y H, Zhang R R, Yin Y, et al. Advances in engineering the production of the natural red pigment lycopene: a systematic review from a biotechnology perspective[J]. Journal of Advanced Research, 2023, 46: 31-47.
- [7] Liu X J, Liu R S, Li H M, et al. Lycopene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and 2896 (-) in a stirred-tank fermenter[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, 35(5): 739-749.
- [8] Wang Q, Chen Y L, Yang Q X, et al. SR5AL serves as a key regulatory gene in lycopene biosynthesis by *Blakeslea trispora*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 126.
- [9] Xu J L, Xu X, Xu Q, et al. Efficient production of lycopene by engineered *E. coli* strains harboring different types of plasmids[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(4): 489-499.
- [10] Su A P, Chi S, Li Y, et al. Metabolic redesign of *Rhodobacter sphaeroides* for lycopene production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(23): 5879-5885.
- [11] Wang G S, Grammel H, Abou-Aisha K, et al. High-level production of the industrial product lycopene by the photosynthetic bacterium

- Rhodospirillum rubrum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(20): 7205–7215.
- [12] Tuly J A, Zayed H M, Nizami A S, et al. Bioconversion of agro-food industrial wastes into value-added peptides by a *Bacillus* sp. mutant through solid-state fermentation[J]. Bioresource Technology, 2022, 346: 126513.
- [13] Li M J, Xia Q Q, Lv S Z, et al. Enhanced CO₂ capture for photosynthetic lycopene production in engineered *Rhodospseudomonas palustris*, a purple nonsulfur bacterium[J]. Green Chemistry, 2022, 24(19): 7500–7518.
- [14] Qu Y L, Su A P, Li Y, et al. Manipulation of the regulatory genes *ppsR* and *prrA* in *Rhodobacter sphaeroides* enhances lycopene production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(14): 4134–4143.
- [15] Harada J, Nagashima K V P, Takaichi S, et al. Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene[J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(10): 1112–1118.
- [16] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular *Alga*, *Haematococcus pluvialis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 867–873.
- [17] Ye V M, Bhatia S K. Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(8): 1405–1414.
- [18] Naylor G W, Adlasee H A, Gibson L C D, et al. The photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Photosynthesis Research, 1999, 62(2): 121–139.
- [19] Shimizu T, Teramoto H, Inui M. Introduction of glyoxylate bypass increases hydrogen gas yield from acetate and l-glutamate in *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(2): e01873–18.
- [20] Xiao D F, Zeng L M, Yao K, et al. The glutamine- α -ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications[J]. Amino Acids, 2016, 48(9): 2067–2080.
- [21] Lukey M J, Wilson K F, Cerione R A. Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism[J]. Future Medicinal Chemistry, 2013, 5(14): 1685–1700.
- [22] Caetano-Lopes J, Rodrigues A, Lopes A, et al. Rheumatoid arthritis bone fragility is associated with upregulation of *IL17* and *DKK1* gene expression[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2014, 47(1): 38–45.
- [23] Zuurro A. Enhanced lycopene extraction from tomato peels by optimized mixed-polarity solvent mixtures[J]. Molecules, 2020, 25(9): 2038.
- [24] Sun L, Wang J H, Jiang W, et al. Construction of a highly efficient synthetic lycopene engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(7): 1334–1345.
- [25] Shi B, Ma T, Ye Z L, et al. Systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene overproduction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 11148–11157.
- [26] Yoon S H, Ha S M, Lim J, et al. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. Antonie van Leeuwenhoek: Journal of Microbiology, 2017, 110(10): 1281–1286.
- [27] Oren A, Garrity G M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 1–5.
- [28] Hunter C N, Hundle B S, Hearst J E, et al. Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(12): 3692–3697.
- [29] Martínez-Reyes I, Chandel N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease[J]. Nature Communications, 2020, 11: 102.
- [30] Mullen A R, Wheaton W W, Jin E S, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria[J]. Nature, 2011, 481(7381): 385–388.
- [31] Zhu J J, Schwörer S, Berisa M, et al. Mitochondrial NADP(H) generation is essential for proline biosynthesis[J]. Science, 2021, 372(6545): 968–972.
- [32] Ye P Y, Li X, Cui B B, et al. Proline utilization A controls bacterial pathogenicity by sensing its substrate and cofactors[J]. Communications Biology, 2022, 5: 496.

责任编辑: 刘怡辰