

bkt 基因和 *crtR-B* 基因在集胞藻 PCC 6803 中的重组表达及功能分析

刘亚铭^{1,2}, 王康^{1,2}, 崔玉琳^{1,3}, 陈高^{4,5}, 秦松^{1,3*}

¹ (中国科学院 烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 烟台 264003)

² (中国科学院大学, 北京 101418)

³ (中国科学院海洋大科学研究中心, 青岛 266071)

⁴ (山东省农业科学院生物技术研究中心, 济南 250100)

⁵ (山东省作物遗传改良与生态生理重点实验室, 济南 250100)

摘要: 将来自雨生红球藻 β -胡萝卜素酮化酶基因(*bkt*)和 β -胡萝卜素羟化酶基因(*crtR-B*)经密码子优化后,通过自然转化法分别转入集胞藻 PCC 6803 基因组中, HPLC 分析表明转入 *bkt* 基因的细胞产生角黄质,同时海胆酮减少,表明是外源的 β -胡萝卜素酮化酶基因将海胆酮转化为角黄质;转入 *crtR-B* 基因的细胞产生金盏花黄质,同时玉米黄素减少,表明是外源的 β -胡萝卜素羟化酶将玉米黄素转化为金盏花黄质。本文开展了集胞藻 PCC 6803 类胡萝卜素代谢工程研究,实现了对集胞藻 PCC 6803 类胡萝卜素代谢途径的修饰,为通过基因工程手段在集胞藻 PCC 6803 细胞内积累虾青素奠定了基础。

关键词: 集胞藻 PCC 6803; β -胡萝卜素酮酶基因 (*bkt*); β -胡萝卜素羟化酶基因 (*crtR-B*); 代谢过程

中图分类号: Q7 **文献标志码:** A **doi:** 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427015

Recombinant Expression and Functional Analysis of *bkt* Gene and *crtR-B* Gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803

LIU Yaming^{1,2}, WANG Kang^{1,2}, CUI Yulin^{1,3}, CHEN Gao^{4,5}, QIN Song^{1,3*}

¹ (Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

² (University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101418, China)

³ (Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

⁴ (Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

⁵ (Shandong Provincial Key Laboratory of Academy Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology,

来稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-19

基金项目: 国家自然科学基金 (41876188), 山东省自然科学基金 (ZR2018ZB0210)

作者简介: 刘亚铭, 硕士生, 主要从事微藻合成生物学研究, E-mail: liuyaming234@163.com; 王康, 硕士生, 主要从事分子生物学和代谢工程研究, E-mail: wangkangsdut@126.com; 崔玉琳, 副研究员, 主要从事分子藻类学和微藻代谢工程研究, E-mail: yulincui@yic.ac.cn; 陈高, 副研究员, 主要从事微生物资源开发与农业应用研究, E-mail: chengao001@aliyun.com; 秦松, 研究员, 主要从事海洋藻类学和海岸带生物工程研究, E-mail: sqin@yic.ac.cn.

Jinan 250100, China)

Corresponding Author: Qin Song. Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, 264003, Shandong, China. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071, Shandong, China.
Email: sqin@yic.ac.cn.

Abstract: The β -carotene ketolase gene (*bkt*) and β -carotene hydroxylase gene (*crtR-B*) from *Haematococcus pluvialis* were codon-optimized and transferred to *Synechocystis* sp. PCC6803 genome by natural transformation method. HPLC analysis showed that cells transfected with *bkt* gene produced canthaxanthin, while echinone decreased, indicating that the exogenous β -carotene ketolase gene converted echinone to canthaxanthin; the cells with *crtR-B* gene produced adonixanthin, while zeaxanthin was reduced, indicating that the exogenous β -carotene hydroxylase converted zeaxanthin into adonixanthin. In this study, we utilized metabolic engineering strategy to extend the carotenoid biosynthesis pathway in *Synechocystis* sp. PCC6803, which laid a foundation for astaxanthin production in *Synechocystis* sp. PCC6803 with metabolic engineering.

Key words: *Synechocystis* sp. PCC6803; β -carotene ketolase gene (*bkt*); β -carotene hydroxylase gene (*crtR-B*); metabolic engineering

Funding: This project is supported by the National Natural Science Foundation of China (41876188), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018ZB0210).

1 引 言

类胡萝卜素(carotenoids)是一类广泛存在于高等植物、真核微藻和蓝藻光合膜的烯萜类化合物^[1],通常是由8个类异戊二烯单位组成的碳氢化合物及其氧化衍生物^[2,3]。在光合生物中,它作为捕光色素成分参与光合作用,通过清除自由基参与抗氧化的保护作用^[4,5]。研究表明,类胡萝卜素在人体健康方面也发挥着重要作用。一些类胡萝卜素可作为人体内维生素A的重要来源,大部分的类胡萝卜素具有很强的抗氧化活性^[6],能够增强人和动物的免疫力^[2,7,8],具有多种重要的保健功能和较大的医用价值。如角黄质具有抗氧化,抗癌,提高免疫力,保护皮肤和骨骼健康等作用^[4],金盏花黄质是产生虾青素的中间产物,可以通过激活抗氧化防御对出血性脑损伤发挥保护作用,并且具有防止脑内出血的保护潜力^[9]。

蓝藻,又称蓝细菌,是一类能够进行光合作用的原核生物^[10]。集胞藻 PCC6803 是研究代谢调控的模式蓝藻,也是利用合成生物学手段构建细胞工厂的优良底盘^[11,12]。它既能自养,又能异养,并且遗传背景清晰,是最早完成全基因组测序的藻类,具有天然的遗传转化系统^[13]。集胞藻 PCC6803 中含有的 β -胡萝卜素酮醇酶(CRTO)能催化 β -胡萝卜素转化为海胆酮(图1),但不能将海胆酮进一步转化;而 β -胡萝卜素羟化酶(CRTR)也只能催化 β -胡萝卜素转化为玉米黄素(图1)。然而,在雨生红球藻中, β -胡萝卜素酮化酶(BKT)^[14]不仅可以催化 β -胡萝卜素转化为海胆酮转化为角黄质,还可以催化金盏花黄质转化为虾青素; β -胡萝卜素羟化酶(CRTR-B)^[14,15]则可以催化 β -胡萝卜素转化为玉米黄素,以及催化角黄质转化为虾青素。

因此,为进一步阐明 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因的功能及其作用机制,在本研究中,我们克

降了来自雨生红球藻的 β -胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*) 和 β -胡萝卜素羟化酶基因 (*crtR-B*) 并在集胞藻 PCC6803 中表达, 实现了对集胞藻中类胡萝卜素代谢途径的修饰。这些研究结果为进一步阐明 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因的功能及其作用机制奠定了分子基础。为通过合成生物学手段构建优良藻株奠定基础, 也将为研究其他微型藻类类胡萝卜素代谢途径提供参考。

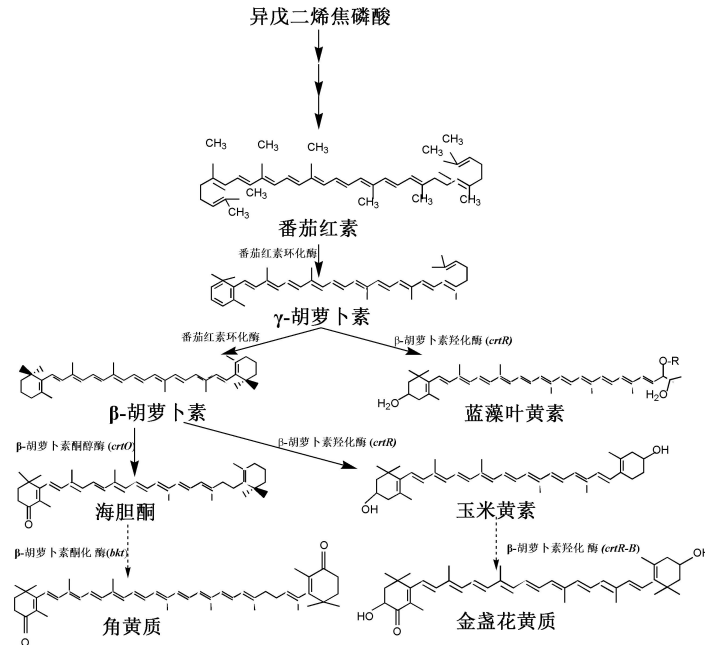


图 1 集胞藻 PCC6803 中类胡萝卜素的合成途径
实心箭头代表集胞藻 PCC6803 中实际发生的类胡萝卜素生物代谢途径。虚线箭头表示在转入 *bkt* 和 *crtR-B* 基因后假定发生的类胡萝卜素生物合成途径。

Fig.1 Synthetic pathway of astaxanthin in *Synechocystis* sp. PCC6803

The solid arrow refers to the carotenoid biosynthesis pathway that actually occurs in *Synechocystis* sp. PCC6803, and the dotted arrow represents the putative carotenoid biosynthesis pathway after integrating of the *bkt* and *crtR-B*.

2 材料与方法

2.1 集胞藻 PCC 6803 的培养

集胞藻 PCC6803 购自中国科学院淡水藻种库, 编号 FACHB-898。使用 BG11 培养基培养集胞藻 PCC6803, 培养温度为 $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $50\ \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, 光/暗周期为 12h/12h。

2.2 同源重组载体的构建

使用 Plant DNA Isolation Reagent (Takara, China) 试剂盒提取集胞藻 PCC6803 的基因组 DNA。使用大肠杆菌 DH-5 α (Invitrogen, China) 进行 DNA 克隆和质粒构建, 并在 37°C , 160rpm 摇床中培养。使用 Rapid Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Sangon, China) 提取大肠杆菌的基因组 DNA。

根据集胞藻 PCC6803 密码子偏好性优化了来自雨生红球藻的 *bkt* 基因 (GenBank: AY603347.1) 和 *crtR-B* 基因 (GenBank: AF162276.1) 的开放阅读框, 由 GenScript 公司合成。p5S1285UD-*bkt* 质粒和 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒构建方法参考附件。根据 NCBI 中基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物, 表 1 为本研究中所用引物, 所用引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

2.3 集胞藻 PCC6803 的转化和突变株的选择

离心收集处于对数期的集胞藻 PCC6803 藻株 ($OD_{730} > 0.6$), 将上述得到的质粒通过自然转化法^[16]转化。转化后的集胞藻 PCC6803 在含有 $5\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素和 $25\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 BG11 固体培养基上进行筛选。将转化初始质粒 p5S1285UD^[17]和 pSKT1T2^[16]的突变株设为对照组。

2.4 突变株的验证

DNA 水平验证, 提取集胞藻 PCC6803 野生型和突变株基因组 DNA, 通过 PCR 验证目的基因的转入情况, 引物见表 1。

使用 Plant RNA Kit (Omega, China) 提取集胞藻 PCC6803 野生型和突变株基因组总 RNA, 并用 Takara PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, China) 反转录为 cDNA, 以 cDNA 作为模板, 用引物 *bkt*-RT-F/*bkt*-RT-R 和 *crtR-B*-RT-F/*crtR-B*-RT-R 检验 *bkt* 和 *crtR-B* 基因 RNA 水平的表达, 同时, 将总 RNA 作为阴性对照的模板进行 PCR 检测。

2.5 生长曲线的测定

取处于对数生长期的集胞藻, 调节初始接种浓度 OD_{730} 值为 0.5, 每 24 h 取样 1 次, 用普析 Tu-1810 紫外分光光度计测定 OD_{730} 值, 绘制生长曲线。实验组和对照组各设置 3 个平行。

2.6 色素分析

参照 Baroli^[18]的方法, 用丙酮提取色素。使用的类胡萝卜素标准品购自 Sigma (中国)。分析仪器采用 Thermo Fisher UltiMate-3000 液相色谱仪 (配置 UV-可见检测器) 对色素进行分离和鉴定。色谱柱使用 C18 反相柱, Acclaim 120A ($5\mu\text{m} \times 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$)。流动相比比例参数、梯度洗脱时间和流动相流速均参照文献^[18]的方法设定。

2.7 统计分析

所有实验重复三次, 数据表示为三个实验的平均值加上标准偏差。使用 SPSS 进行 Tukey 检测。当 $p < 0.05$ 时, 被认为是统计学上差异显著。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	用途
<i>psbA2</i> -F	CTTCATATGCCGCGGATGACAACGACTCTCCAAC	扩增 <i>psbA2</i> 下游同源臂
<i>psbA2</i> -R	AGTGAGCTCTTAACCGTTGACAGCAGG	
P _{<i>psbA2</i>} -F	GATGTCGACGCTTTAGCGTTCCAGTG	扩增 <i>psbA2</i> 启动子
P _{<i>psbA2</i>} -R	CATTTGGTTATAAT TCCTTATGTAT	
P _{<i>cpc560</i>} -F	GATGTCGACGCTTTAGCGTTCCAGTG	扩增 <i>cpc560</i> 启动子
P _{<i>cpc560</i>} -R	CATTTGGTTATAATTCCTTATGTAT	
<i>crtR-B</i> -F	ACACCTCGCACTGGACCCT	扩增 <i>crtR-B</i> 基因
<i>crtR-B</i> -R	GTATAGCGTGATGCCAGCC	
<i>bkt</i> -F	CAATCTTGTCAGCATTCGCG	扩增 <i>bkt</i> 基因
<i>bkt</i> -R	CAGGAAGCTCATCACATCAGAT	
1285U-F	ATAGAGCTCTTTAGTGAAAAAFAATTGAC	1285 上/下游同源臂检测
1285D-R	ATAGAGCTCGTCATCAGCCAGCAAAATTGC	
<i>Bkt</i> /RT-F	GGAAGCAGCAGCCTATTACA	检测 <i>bkt</i> 的转录
<i>Bkt</i> /RT-R	ACTCGTCTTTGCCCTGAACC	
<i>crtR-B2</i> -F	TCGGACCTCCTCCTCACCTACA	检测 <i>crtR-B</i> 的转录
<i>crtR-B2</i> -R	GACTCGTGCCAGATTGCCTTGT	
T1T2-F	TCAGGTACCTTCGATCGTTAGCGCCAA	检测 T1T2 终止子
T1T2-R	TCAGTCGACATGGGGATCAGCGCTAAAT	

3 结果与分析

3.1 突变株的构建和鉴定

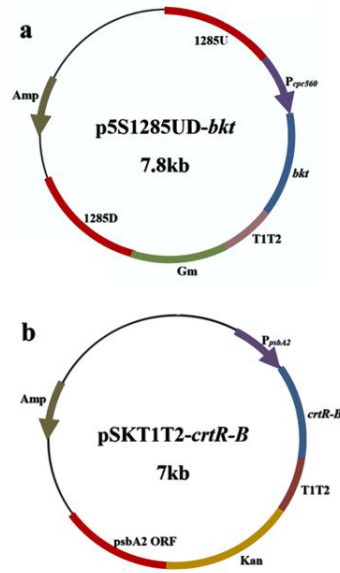


图 2 p5S1285UD-*bkt* 和 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒图谱

Fig.2 Plasmid maps of p5S1285UD-*bkt* and pSKT1T2-*crtR-B*

构建表达载体 p5S1285UD-*bkt* 和 pSKT1T2-*crtR-B* 如图 2 所示，p5S1285UD-*bkt* 含有 1000bp 上游同源臂（1285U，*slr1285* 基因（组氨酸激酶 Hik34）（GenBank: NC_017277.1））和 1000bp 下游同源臂（1285D），从 pFastBacI 质粒(Invitrogen)克隆庆大霉素抗性基因。在 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒中，P_{psbA2} 启动子和由引物 P_{psbA2}-F / P_{psbA2}-R 扩增的 psbA2 ORF 作为上下游同源臂。另外，在 pSKT1T2-*crtR-B* 中以卡那霉素抗性基因作为选择标记基因。经过转化和抗生素筛选后，通过 PCR 验证目的基因的转入情况，分别检测野生株和突变株基因组 DNA 外源序列是否进行同源重组。使用引物 1285U-F/1285D-R 对整个同源交换片段进行检验，在 *bkt*-Gm 突变株中扩增出了预期的 4.9kb 条带，而在对照组中仅扩增出 2.0kb 条带（图 3a），表明 *bkt*-Gm 突变株中包含 *Gm* 和 *bkt* 基因的外源基因表达盒已经整合到基因组 DNA 中。同样，如图 3b，用引物 P_{psbA2}-F/P_{psbA2}-R 对整个同源交换片段进行检验，在 *crtR-B*-Kan 突变株中扩增预期的 4.1kb 条带，而在对照组中仅扩增出 1.5 kb 条带，这表明 *crtR-B*-Kan 突变株中的基因组 DNA 中已经整合了包含 *crtR-B* 和 *Kan* 基因的外源基因表达盒。同时，测序结果也表明了 *crtR-B* 和 *bkt* 基因已经整合到集胞藻 PCC6803 基因组中。

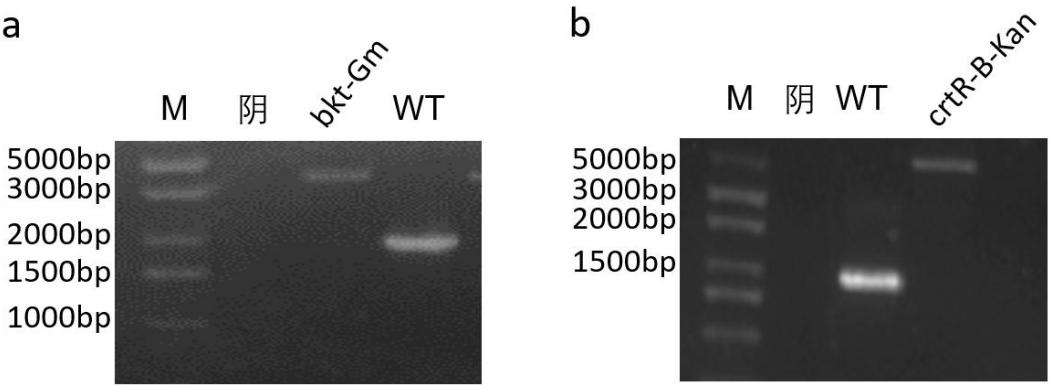


图 3 DNA 水平鉴定

a: *bkt*-Gm 突变株的 PCR 鉴定; b: *crtR-B-Kan* 突变株的 PCR 鉴定。阴: 不加任何模板的空白对照; WT: 以野生型集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳。

Fig.3 The identification of mutants by PCR amplification

a: PCR identification of *bkt*-Gm mutant; b: PCR identification of *crtR-B-Kan* mutant. Negative: blank control without adding any templates; WT: Electrophoresis of PCR products using genomic DNA of wild-type *Synechocystis* sp. PCC 6803 as template.

为了进一步验证 *bkt* 和 *crtR-B* 基因的转录水平的表达,从野生型和突变株中提取总 RNA。如图 4 所示,在 *bkt*-Gm 和 *crtR-B-Kan* 中分别扩增出了代表 *bkt* 和 *crtR-B* 基因的大约 410bp 和 258bp 的条带,而在对照组中没有观察到条带。这些结果表明,整合到基因组中的 *bkt* 和 *crtR-B* 基因被转录。以上结果表明 *bkt* 和 *crtR-B* 基因完全转入集胞藻 PCC6803,且具有表达活性,突变株 *bkt*-Gm 和 *crtR-B-Kan* 已构建成功。

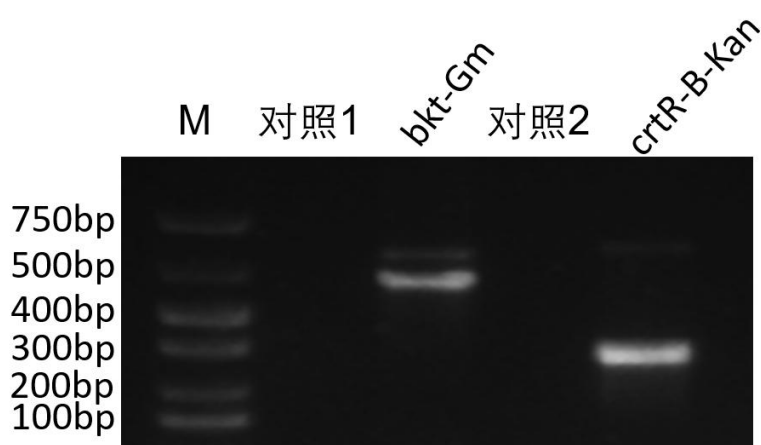


图 4 RNA 水平鉴定

对照 1:转入初始质粒 pS1285UD 的突变株; 对照 2:转入初始质粒 pSKT1T2 的突变株

Fig. 4 The identification of mutant in RNA level

Control 1: mutant transferred with the original plasmid pS1285UD; Control 2: mutant transferred with the original plasmid pSKT1T2.

3.2 正常培养条件下藻株的生长情况

为了检测转入 *bkt* 和 *crtR-B* 基因是否对藻株的生长产生影响,本实验检测了突变株与野生株在正常培养条件下的生长情况,结果显示,野生株和突变株的生长速率相似(图 5),说明转入 *bkt* 和 *crtR-B* 基因对集胞藻的生长基本没有影响。

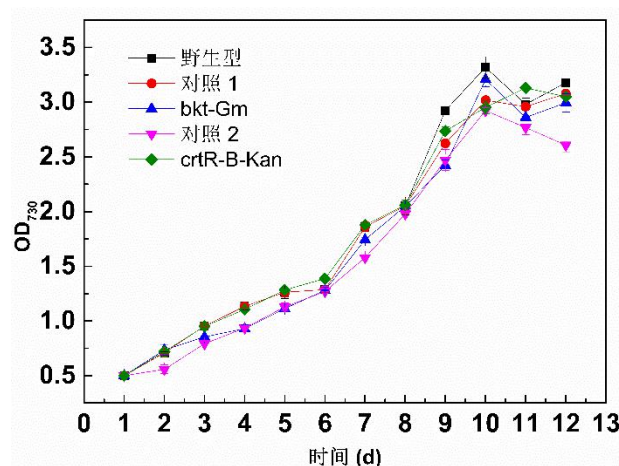


图 5 正常培养条件下野生型, bkt-Gm 和 crtR-B-Kan 突变株的生长曲线
Fig. 5 The growth curve of wild strain, bkt-Gm and crtR-B-Kan mutants under normal condition. Error bars indicate standard error of triplicate

3.3 野生株和突变株的色素差异

如图 6 所示, 根据 HPLC 检测 bkt-Gm 产生了角黄质, 为 1.38 ± 0.07 mg/g, 且海胆酮含量下降为 7.72 ± 0.29 mg/g, β -胡萝卜素含量下降为 13.12 ± 0.49 mg/g (表 2), crtR-B-Kan 中检测出了金盏花黄质, 含量为 0.98 ± 0.04 mg/g, 且玉米黄素下降为 4.18 ± 0.09 mg/g, β 胡萝卜素含量下降 12.80 ± 0.14 mg/g (表 2)。

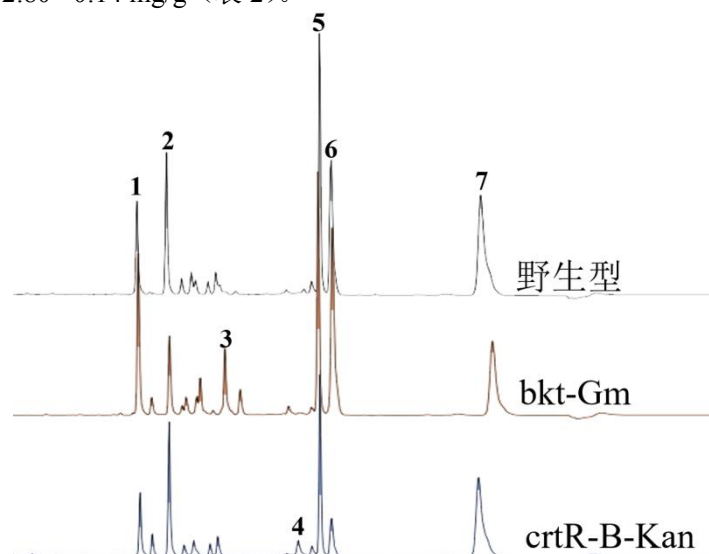


图 6 HPLC 检测来自集胞藻 PCC6803 野生型, bkt-Gm 和 crtR-B-Kan 突变株的类胡萝卜素
1, 蓝藻叶黄素; 2, 玉米黄素; 3, 角黄质; 4, 金盏花黄质; 5, 叶绿素 a ; 6, 海胆酮; 7, β -胡萝卜素
Fig.6 HPLC analysis of pigment production from the *Synechocystis* sp. PCC6803 wild type, bkt-Gm and crtR-B-Kan.

1, Myxoxanthophyll; 2, Zeaxanthin; 3, Canthaxanthin; 4 Adonixanthin; 5, Chlorophyll a ; 6, Echinone; 7, β -carotene.

表 2 色素含量
Table 2 The content of pigment

藻株	β -胡萝卜素 (mg/g, DW)	玉米黄素 (mg/g, DW)	海胆酮 (mg/g, DW)
野生型	14.80 $\pm$ 0.24*	5.39 $\pm$ 0.07*	9.53 $\pm$ 0.38*
bkt-Gm	13.12 $\pm$ 0.49*	5.12 $\pm$ 0.03*	7.72 $\pm$ 0.29*
crtR-B-Kan	12.80 $\pm$ 0.14*	4.18 $\pm$ 0.09*	9.35 $\pm$ 0.34*

DW: dry wight, 干重。*表示 $p<0.05$, **表示 $p<0.01$ 。

4 讨论

集胞藻 PCC6803 中含有 *crtO* (GenBank No.: NC_000911), 是一种 β -胡萝卜素单酮醇酶基因, CRTO 的功能是从氧气 (O_2) 中转移氧原子来氧化 C_4 位的 β -胡萝卜素^[19], CRTO 通常将 β -胡萝卜素合成海胆酮^[20]。BKT 被认为具有与 CRTO 相同的功能, 是一种从 β -胡萝卜素合成虾青素关键酶。虽然 BKT 和 CRTO 都是 β -胡萝卜素酮酶, 但在进化上 BKT 被认为与 CRTO 不同^[21]。其中 BKT 是在 β -胡萝卜素的两个 β -紫罗兰酮环中插入两个酮基^[22], 而 CRTO 是在 β -胡萝卜素的两个 β -紫罗兰酮环之一插入一个酮基以合成海胆酮^[21, 23], 本文研究结果验证来自雨生红球藻的 BKT 可以在集胞藻中利用海胆酮进一步合成角黄质。

集胞藻 PCC6803 中含有 β -胡萝卜素羟化酶基因 *crtR* (GenBank, NP_440788.1), 负责将一个羟基引入 β -胡萝卜素的 β -紫罗兰酮环^[24]。CRTR 能够催化 β -胡萝卜素形成玉米黄质, 并在集胞藻 PCC6803 中合成蓝藻叶黄素。CRTR-B (β -胡萝卜素羟化酶) 是一种来自雨生红球藻的虾青素合成途径中重要的酶, 可将两个羟基引入 β -胡萝卜素中^[14]。在虾青素合成途径中, *crtR-B* 负责将 β -胡萝卜素转化为 β -隐黄质, 进一步转化为玉米黄质, 然后将角黄素转化为虾青素。尽管 CRTR-B 和 CRTR 都被称为 β -胡萝卜素羟化酶, 来自陆生植物和绿藻的 β -胡萝卜素羟化酶由 *crtR-B* 基因编码^[25, 26], 而蓝藻 β -胡萝卜素羟化酶由 *crtR* 基因编码, 且系统发育上与 *crtR-B* 无关^[27]。本文研究结果显示来自雨生红球藻的 CRTR-B 可以在集胞藻中利用玉米黄素进一步合成金盏花黄质。

本实验证明了不同的微藻产生不同结构的类胡萝卜素由具有特定催化功能的类胡萝卜素合成酶决定。要想充分利用微藻衍生的类胡萝卜素, 深入了解它们的生物合成是必需的。本实验将有助于我们更好的理解类胡萝卜素的生物合成机制。此外, 类胡萝卜素已被广泛认为是安全的天然抗氧化剂和抗癌剂, 对微藻中类胡萝卜素的生物合成机制有更深入的了解将促进它们在食品和制药行业的生产和应用。同时也为下一步在集胞藻中合成虾青素, 构建性能优良的藻株奠定基础, 这也是日后工作将继续深入的重点。

5 结论

本实验研究在集胞藻 PCC 6803 中分别转入雨生红球藻来源的 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因, 通过 HPLC 检测色素组成, 发现外源基因对集胞藻 PCC 6803 类胡萝卜素的合成产生了影响。转入 *bkt* 基因的细胞产生角黄质, 同时海胆酮含量下降, 表明是外源的 β -胡萝卜素酮化酶基因将海胆酮转化为角黄质; 转入 *crtR-B* 基因的细胞产生金盏花黄质, 同时玉米黄素含量下降, 表明是外源的 β -胡萝卜素羟化酶将玉米黄素转化为金盏花黄质。本实验证明了来自雨生红球藻和来自集胞藻 PCC 6803 的 β -胡萝卜素酮化酶和 β -胡萝卜素羟化酶具有不同的功能, 证明了仅依靠来源集胞藻 PCC 6803 的 β -胡萝卜素酮化酶和 β -胡萝卜素羟化酶无法合成虾青素。本实验有助于研究集胞藻 PCC 6803 类胡萝卜素代谢机制, 为揭示 β -胡萝卜素如何转化为下游产物提供基础。同时, 也为在其他微藻中转入 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因, 探讨微藻类胡萝卜素代谢途径等提供参考。

参考文献

- [1] 刘龙军, 魏东, 梁晓芸, 等. 利用微藻生产特种天然类胡萝卜素的研究进展[J]. 海洋科学, 2006, (09): 63-68.
- Liu Longjun, Wei Dong, Liang Xiaoyun, et al. Advances on the production of special natural carotenoids by microalgae[J]. Marine Sciences, 2006, (09): 63-68.
- [2] Gong M, Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(8): 1396-1412.
- [3] D'alessandro E B, Antoniosi Filho N R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 58: 832-841.
- [4] Huang J J, Lin S, Xu W, et al. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(5): 597-618.
- [5] 杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 等. 温度和光径对微绿球藻生长及营养成分含量的影响[J]. 海洋科学, 2014, 38(04): 50-54.
- Du Xiaofeng, Zou Ning, Sun Donghong, et al. Effect of temperature and optical path on growth rate and accumulation of nutrients of *Nannochloropsis* sp. [J]. Marine Sciences, 2014, 38(04): 50-54.
- [6] 李庆昌, 邓素贞, 刘贤德, 等. 雌雄波纹巴非蛤不同组织中总类胡萝卜素含量比较分析[J]. 海洋科学, 2017, 41(11): 102-106.
- Li Qingchang, Deng Suzhen, Liu Xiande, et al. Analysis of total carotenoid content in different tissues of male and female *Paphia undulate*[J]. Marine Sciences, 2017, 41(11): 102-106.
- [7] Eggersdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 652: 18-26.
- [8] 李庆昌, 刘坦, 陈小明, 等. 织锦巴非蛤斧足颜色与总类胡萝卜素含量相关分析[J]. 海洋科学, 2016, 40(10): 120-125.
- Li Qingchang, Liu Tan, Chen Xiaoming, et al. Correlation analysis of the color and total carotenoid content in *Paphia textile* foot tissue[J]. Marine Sciences, 2016, 40(10): 120-125.
- [9] Iwata S, Imai T, Shimazawa M, et al. Protective effects of the astaxanthin derivative, adonixanthin, on brain hemorrhagic injury[J]. Brain Research, 2018, 1698: 130-138.
- [10] 王秀秀, 章军. 基于 LC-MS/MS 技术对蓝藻 *Gloeobacter violaceus* PCC7421 细胞膜的蛋白质组学研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(09): 39-44.
- Wang Xiuxiu, Zhang Jun. LC-MS/MS analysis of plasmic membrane proteins in *Gloeobacter violaceus* PCC 7421[J]. Marine Sciences, 2012, 36(09): 39-44.
- [11] Angermayr S A, Gorchs Rovira A, Hellingwerf K J. Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(6): 352-361.
- [12] Hagemann M, Hess W R. Systems and synthetic biology for the biotechnological application of cyanobacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 94-99.
- [13] Carroll A L, Case A E, Zhang A, et al. Metabolic engineering tools in model cyanobacteria[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 47-56.
- [14] Jia D, Fan L, Shen J, et al. Genetic transformation of the astaxanthin biosynthetic genes *bkt* and *crtR-B* into apple tree to increase photooxidation resistance[J]. Scientia Horticulturae,

-
- 2019, 243: 428-433.
- [15] Tan C P, Zhao F, Su Z L, et al. Expression of β -carotene hydroxylase gene (crtR-B) from the green alga *Haematococcus pluvialis* in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2007,19(4):347–355
- [16] Chen G, Chen J, He Q, et al. Functional Expression of the *Arachis hypogaea* L. Acyl-ACP Thioesterases AhFatA and AhFatB Enhances Fatty Acid Production in *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Energies*, 2017, 10(12)
- [17] Ranade S, Zhang Y, Kaplan M. Metabolic engineering and comparative performance studies of *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains for effective utilization of xylose[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1484.
- [18] Baroli I, Do D A, Yamane T, et al. Zeaxanthin Accumulation in the Absence of a Functional Xanthophyll Cycle Protects *Chlamydomonas reinhardtii* from Photooxidative Stress[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(4):992-1008.
- [19] Harker M, Hirschberg J. Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for β -C-4-oxygenase, crtO[J]. *FEBS Letters*, 1997, 404(2): 129-134.
- [20] Mochimaru M, Masukawa H, Takaichi S. The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has two distinct β -carotene ketolases: CrtO for echinenone and CrtW for ketomyxol synthesis[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(27):6111-4.
- [21] Choi S K, Nishida Y, Matsuda S, et al. Characterization of β -Carotene Ketolases, CrtW, from Marine Bacteria by Complementation Analysis in *Escherichia coli*[J].*Marine Biotechnology*, 2005, 7(5): 515-522
- [22] Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar G A, et al. Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of β -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 196-197: 33-41.
- [23] Breitenbach J, Gerjets T, Sandmann G. Catalytic properties and reaction mechanism of the CrtO carotenoid ketolase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803[J]. *Arch Biochem Biophys*. 2013, 529(2):86-91.
- [24] Lagarde D, Vermaas W. The zeaxanthin biosynthesis enzyme β -carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *FEBS Letters*, 1999, 454(3): 247-251.
- [25] Chang J J, Thia C, Lin H Y, et al. Integrating an algal β -carotene hydroxylase gene into a designed carotenoid-biosynthesis pathway increases carotenoid production in yeast[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 2-8.
- [26] Nogueira M, Enfissi E M A, Welsch R, et al. Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: A new tool for engineering ketocarotenoids[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 243-252.
- [27] 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.