

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-065

微生物发酵法合成虾青素的研究进展

周强¹, 周大伟¹, 孙敬翔¹, 王靖楠¹, 姜万奎¹, 章文明^{1,2}, 蒋羽佳^{1,2}, 信丰学^{1,2}, 姜岷^{1,2}

(¹ 南京工业大学生物与制药工程学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816; ² 南京工业大学, 江苏先进生物与化学制造协同创新中心 (SICAM), 江苏 南京 210009)

摘要: 虾青素是一种高附加值的抗氧化萜类物质, 具有很强的抗氧化活性, 同时还具有抗癌、预防炎症、护眼等诸多功效。随着合成生物学技术的不断发展, 利用微生物发酵法合成虾青素是实现虾青素工业化生产最有效的途径之一, 也更能满足消费者对天然化合物的需求。目前, 生产虾青素的微生物包括细菌、真菌、藻类等。本文系统介绍了虾青素的结构性质和生产方法, 重点讲述了虾青素天然合成以及外源构建的合成路径, 总结了不同微生物如雨生红球藻、酵母和大肠杆菌生产虾青素的最新进展, 分析了利用基因工程和发酵过程调控手段提高虾青素产量的方法。未来, 通过代谢工程等手段 (如虾青素合成基因过表达、使用高强度启动子、代谢途径优化等) 可提高虾青素产量, 以进一步增加虾青素在食品、医疗、化妆品和饲料等产业的应用。

关键词: 微生物; 虾青素; 萜类物质; 生物合成

中图分类号: TQ929 **文献标志码:** A

Research progress in synthesis of astaxanthin by microbial fermentation

ZHOU Qiang¹, ZHOU Dawei¹, SUN Jingxiang¹, WANG Jingnan¹, JIANG Wankui¹, ZHANG Wenming^{1,2},
JIANG Yujia^{1,2}, XIN Fengxue^{1,2}, JIANG Min^{1,2}

(¹ State key Laboratory of Materials Chemical Engineering, College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; ² Jiangsu Advanced Biological and Chemical Manufacturing Collaborative Innovation Center (SICAM), Nanjing Tech University, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

Abstract: Astaxanthin is a value-added terpene with strong antioxidant activity as well as other physiological functions, such as anti-cancer, enhancing immunity, eye protection, and cardio-cerebrovascular protection. Natural astaxanthin mainly comes from algae and aquatic crustaceans such as lobster shell. Astaxanthin presents with stereoisomerism and geometric isomerism, which have different biological activities and applications. Currently, astaxanthin in the market is obtained primarily through natural extraction from *Haematococcus pluvialis* or *Xanthophyllomyces dendrorhous* and chemical synthesis as well. While *H. pluvialis* has a long growth cycle and high light demand, leading to low biomass productivity and extraction rate for high production cost of astaxanthin, *X.*

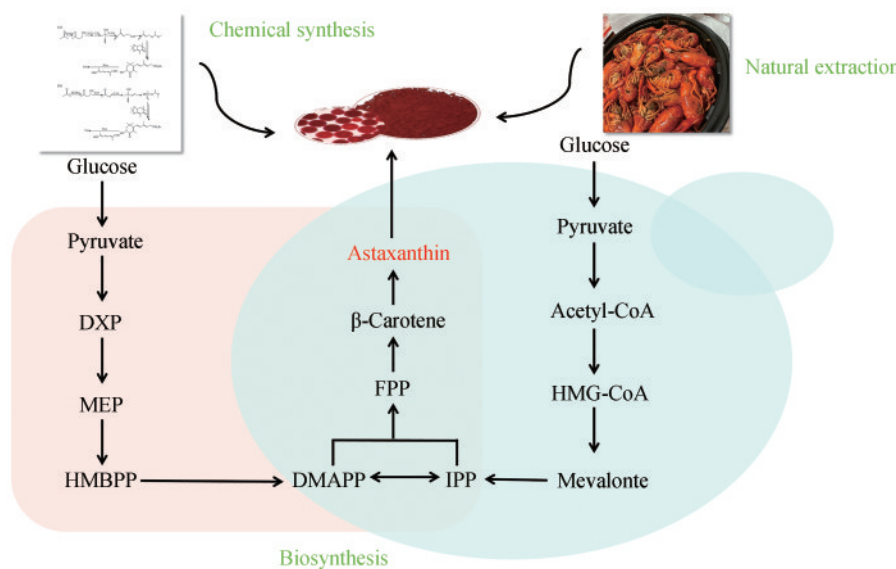
收稿日期: 2023-09-14 修回日期: 2023-11-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22178169); 江苏省杰出青年基金 (BK20220052); 山东省泰山产业领军人才工程 (202306155)

引用本文: 周强, 周大伟, 孙敬翔, 王靖楠, 姜万奎, 章文明, 蒋羽佳, 信丰学, 姜岷. 微生物发酵法合成虾青素的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(1): 126-143

Citation: ZHOU Qiang, ZHOU Dawei, SUN Jingxiang, WANG Jingnan, JIANG Wankui, ZHANG Wenming, JIANG Yujia, XIN Fengxue, JIANG Min. Research progress in synthesis of astaxanthin by microbial fermentation[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(1): 126-143

dendrorhous has a low astaxanthin yield and is easy to degenerate, making them challenging for the large-scale commercial production. The chemical synthesis of astaxanthin involves multiple reactions with complicated processes, producing mixed isomers and various byproducts, which consequently compromises its antioxidant capacity. Moreover, the assimilation and utilization of chemically synthesized astaxanthin *in vivo* is poor compared to its natural product, making it not suitable for being used by human being. With the continuous development of synthetic biology, microbial fermentation has been developed as an effective way for the commercial production of astaxanthin to better meet consumer demand. At present, astaxanthin-producing microorganisms include bacteria, fungi, and algae. This review introduces astaxanthin's structure, properties, production methods, and processes for its extraction and purification, with an emphasis on natural and engineered biosynthetic pathways. The latest progress in the production of astaxanthin by different microorganisms such as *H. pluvialis*, *Yarrowia lipolytica* and *Escherichia coli* is summarized, along with strategies for increasing astaxanthin production through genetic engineering and fermentation process optimization. Future metabolic engineering strategies are proposed, such as over-expression of astaxanthin synthesis genes, promoters with higher substitution intensity, subcellular localization, metabolic pathway optimization, etc, to increase astaxanthin yield for wide usage in food, medical, cosmetic and feed industries.



Keywords: microorganisms; astaxanthin; terpenoids; biosynthesis

虾青素 (astaxanthin) 是一种橙红色的酮式类胡萝卜素, 分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$, 化学名为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -胡萝卜素^[1-2]。虾青素不溶于水, 具脂溶性, 易溶于苯、氯仿、丙酮和二硫化碳等有机溶剂, 微溶于甲醇、乙醇等极性较大的有机溶剂^[3]。虾青素是由 8 个异戊二烯单位组成的四萜烯类, 以共轭双键连接, 在共轭双键的末端存在不饱和的羟基和酮基^[4]。因此, 虾青素存在着不同的构型 (图 1), 包括: 左旋 (3*S*,3'*S*), 右

旋 (3*R*,3'*R*) 和内消旋 (3*S*,3'*R*)^[5]。其中 (3*S*,3'*S*) 异构体是自然界中最常见的虾青素构型, 也是抗氧化活性最高的构型, 其次是 (3*R*,3'*R*) 和 (3*S*,3'*R*) 构型^[6]。

虾青素应用价值非常高, 其长共轭多烯烃链能够猝灭单线态氧, 清除自由基, 提高细胞的活性, 对人体的脂质体起到保护作用, 因此在一定程度上起到提高免疫力、抗衰老等效果。有研究显示, 虾青素的抗氧化能力是维生素 C 的 6000 倍,

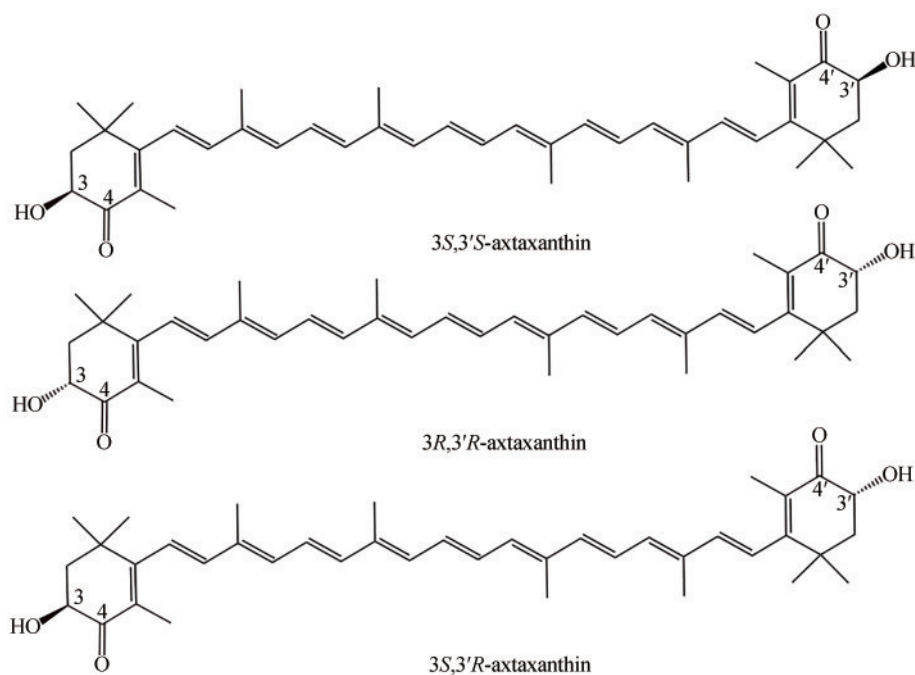


图1 虾青素的三种构型

Fig. 1 Configurations of astaxanthin

是自然界报道中最强的抗氧化剂^[7-9]。同时它可以预防大部分的氧化应激和相关的炎症，包括高血压、癌症、肥胖、心血管疾病、炎症性疾病、骨骼病、皮肤病等，因此可作为多靶点药物制剂^[10]。例如，Lignell等^[11]研究表明口服含虾青素的药物能够明显提升人体的肌肉力量以及运动耐力。虾青素还是天然的着色剂，以不同的构型存在于不同的物种中，赋予机体独特的颜色。鲑鱼肉质所呈现出的红色往往就给人一种视觉上的享受，使人轻易判断出食物的新鲜度以及风味。此外，虾青素还可以用于家禽饲料的添加，有研究指出在饲料中添加 10 mg/kg 的天然虾青素可以有效在肉鸭体内沉积，使活鸭的喙、掌呈现出健康的金黄色，同时也可提高肌肉脂质的氧化稳定性，使其营养价值更高^[12]。虾青素还对环境植物起着保护作用，如虾青素喷雾剂可以增加葡萄叶的光合作用，提高葡萄叶的抗逆性，改变葡萄叶的色泽。因此，目前虾青素在医疗、化妆品、食品、饲料添加剂、保健品、农业等领域的应用与日俱增（图2）^[13-14]。2017年全球类胡萝卜素市场估值为15亿美元，2022年已达到20亿美元^[15]。而作为第二大类胡萝卜素的虾青素，它的全球市场价值预计到2027年将增长到近34亿美元^[16]。

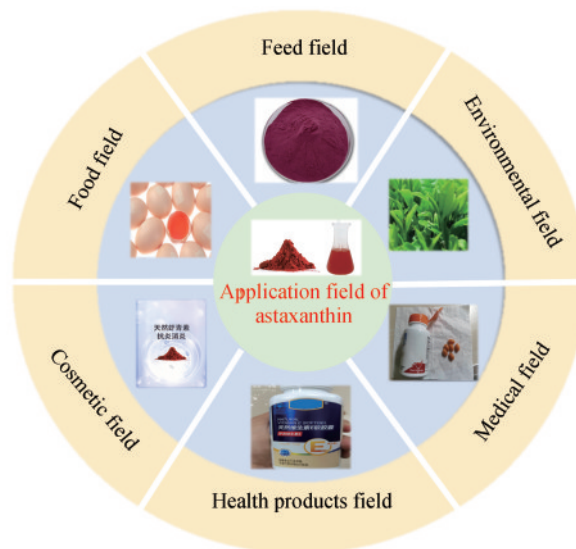


图2 虾青素的应用领域

Fig. 2 Applications of astaxanthin

目前，生产虾青素的方法主要包括天然提取法、化学合成法以及微生物发酵法。天然提取法是从龙虾、螃蟹等甲壳类废弃物中提取虾青素，但产量极低、过程复杂、成本高昂，且提取过程易受污染，在经济上不可行^[17-18]。化学合成法生产周期较长且过程复杂^[19]，合成的产物是多种构型混合的虾青素并且还积累多种副产物^[20]，在生物

体内吸收利用率低于天然提取的虾青素，因此不被批准用于人类使用^[19]。

随着合成生物学技术的不断发展，使用微生物发酵生产天然产物展现出巨大潜力^[21-23]。利用微生物生产的虾青素具有构型明确、环境友好、副产物少等优点^[16]，因此，这是一种极具前景的虾青素生产方法^[18, 24]。目前用于发酵合成虾青素的微生物包括藻类、细菌、酵母等^[25]。本文通过论述雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、红法夫酵母 (*Xanthophyllomyces dendrorhous*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 等微生物生产虾青素的最新进展，总结了用以提高虾青素产量、降低成本的虾青素高产菌株的筛选与代谢工程改造策略。

1 虾青素的生物合成路径

虾青素的生物合成一般可分为3个阶段^[10]：

第一阶段为中心碳代谢，生物体利用葡萄糖等碳源经糖酵解途径 (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) 生成丙酮酸 (pyruvate)、乙酰辅酶A (acyl-CoA) 等，它们作为萜类物质合成的前体物流向甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 和甲基赤四醇 4-磷酸途径 (methylerythritol phosphate, MEP) 途径。

MVA 和 MEP 是虾青素合成途径中的第二阶段 (图3)。MVA 途径不仅可以提供萜类合成所需要的前体物，而且还可以提供细胞生长必需物质的前体物。其从乙酰辅酶A出发，经6步酶促反应生成异戊烯基焦磷酸酯 (isopentenylpyrophosphate, IPP)，再通过异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, IDI) 将 IPP 异构化成二甲基烯丙基焦磷酸酯 (dimethylallylpyrophosphate, DMAPP)，最后以 IPP 和 DMAPP 为前体合成萜类物质的前体物。而 MEP 途径是另一条合成天然萜类物质的前体供应途径，广泛存在于细菌、真菌、植物和藻类中。该途径从丙酮酸出发，经7步酶促反应生成 DMAPP，然后通过 IDI 将 DMAPP 异构化成 IPP，最后以 IPP 和 DMAPP 为前体合成萜类物质的前体物。

第三阶段为虾青素合成阶段，IPP 和 DMAPP

在法尼基二磷酸合酶 (farnic diphosphate synthase) ispA 的作用下生成香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GPP)。GPP 继续在 ispA 的作用下生成法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP)，FPP 在香叶基香叶基二磷酸合酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase) CrtE 的作用下生成香叶基二磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP)，GGPP 在八氢番茄红素合酶/环化酶 (phytoene synthase, lycopene cyclase) CrtYB 和八氢番茄红素去饱和酶 (phytoene desaturase) CrtI 的作用下生成番茄红素，番茄红素在 CrtYB 的作用下生成 β -胡萝卜素。 β -胡萝卜素与虾青素的结构差异在于碳链两端环上的羟基与羰基的不同。因此，将 β -胡萝卜素转化为虾青素的过程就是在 β -胡萝卜素分子环上的两端补充羟基与羰基的过程。但在不同生物体内的合成路径会有所差异，例如在泛菌中，主要通过 β -胡萝卜素酮醇酶 (β -carotenoid ketolase) CrtW 和 β -胡萝卜素羟化酶 (β -carotene hydroxylase) CrtZ 来合成虾青素；在雨生红球藻中，主要通过 β -胡萝卜素酮醇酶 (β -carotenoid ketolase, BKT) 和 β -胡萝卜素羟化酶 (β -carotene hydroxylase) CrtR 来合成虾青素；在红法夫酵母中，主要通过 CrtR 和 CrtS 来合成虾青素；在其他一些工程酵母中，一般也都是通过表达 β -胡萝卜素酮醇酶和 β -胡萝卜素羟化酶来合成虾青素；夏侧金盏花是目前唯一可以生产虾青素的植物，它通过表达类胡萝卜素 4-羟基- β -环-4-脱氢酶 (carotenoids 4-hydroxy- β -cyclo-4-dehydrogenase, HBFD) 和类胡萝卜素- β -环-4-脱氢酶 (carotenoids- β -cyclo-4-dehydrogenase, CBFD) 来合成虾青素。

2 虾青素合成底盘细胞

目前，通过发酵过程调控和代谢工程改造菌株仍是常用的提高微生物合成虾青素的策略。如：
①通过发酵条件的优化提高微生物虾青素产量；
②通过强化代谢路径中的 MVA 和 MEP 来提高前体物质的供应量；
③筛选表达不同来源的关键基因；
④模块化工程连接表达基因，增加其拷贝数；
⑤定位不同亚细胞器等。

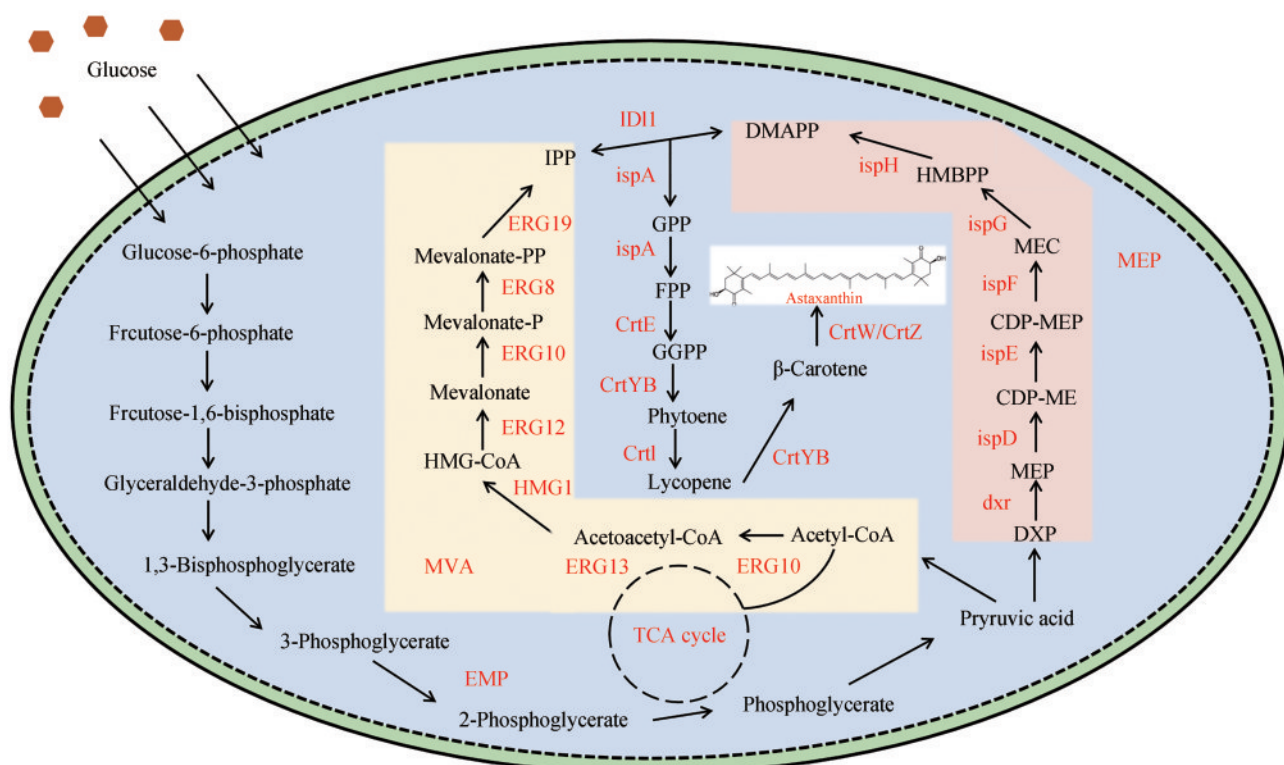


图3 微生物合成虾青素的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways for astaxanthin synthesis by microorganisms

Glucose-6-phosphate—葡萄糖-6-磷酸; Fructose-6-phosphate—果糖-6-磷酸; Fructose-1,6-bisphosphate—1,6-二磷酸果糖; Glyceraldehyde-3-phosphate—三磷酸甘油醛; 1,3-Bisphosphoglycerate—1,3-二磷酸甘油酸; 3-Phosphoglycerate—三磷酸甘油酸; 2-Phosphoglycerate—二磷酸甘油酸; Phosphoglycerate—磷酸甘油酸; Pyruvic acid—丙酮酸; Acetyl-CoA—乙酰辅酶A; Acetoacetyl-CoA—乙酰乙酰辅酶A; Mevalonate—甲羟戊酸; HMG-CoA—3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A; IPP—异戊烯基焦磷酸; DMAPP—二甲基烯基焦磷酸; GPP—香叶基焦磷酸; FPP—法尼基焦磷酸; GGPP—香叶基二磷酸; Phytoene—八氢番茄红素; Lycopene—番茄红素; β-Carotene—β-胡萝卜素; Astaxanthin—虾青素; HMBPP—4-羟基-3-甲基-2-乙基-2-丁烯基-4-磷酸; DXP—1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸; ERG13—3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA 合酶; HMG1—3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A 还原酶; ERG12—甲羟戊酸激酶; ERG8—磷酸甲羟戊酸激酶; ERG19—甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶; IDI1—异戊烯基焦磷酸异构酶; ispA—法尼基二磷酸合酶; CrtE—香叶基香叶基二磷酸合酶; CrtYB—八氢番茄红素合酶/环化酶; CrtI—八氢番茄红素去饱和酶; CrtW—β-胡萝卜素酮醇酶; CrtZ—β-胡萝卜素羟化酶; ispH—4-羟基-3-甲基-2-乙基-2-丁烯基-2-磷酸还原酶; ispG—4-羟基-3-甲基-2-乙基-2-丁烯基-2-磷酸合酶; ispF—2-C-甲基-D-赤藓醇激酶; ispE—4-胞嘧啶-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶; ispD—2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶; dxr—1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶

2.1 藻类

自然界中许多藻类都可以生产虾青素,如雨生红球藻、衣藻 (*Chlamydomonas*)、伞藻 (*Acetabularia*)、裸藻 (*Euglena*) 等^[26]。雨生红球藻是一种淡水单细胞绿藻,其虾青素含量可达到细胞干重的5%,是虾青素生产的主要藻类,同时通过雨生红球藻生产的虾青素是抗氧化能力最强的左旋 (3*S*,3'*S*) 构型^[27]。但是,雨生红球藻的生长周期长、培养条件要求高、需要光照,且虾青素存在于厚壁孢子中,提取率低、成本高、连续性差^[19, 28]。

雨生红球藻生产虾青素的高昂成本限制了其大规模应用,因此,迫切需要开发新的工艺,以实现通过降低生产成本和增加雨生红球藻中虾青素的含量来满足商业化应用的目的。雨生红球藻的生长需要光,但由于光生物反应器内部的光强分布和混合不均,藻类会受到光暗周期的影响,从而影响到生物量以及次级代谢物的产生。Ranjbar等^[29]设计出气升式光生物反应器,相较于传统生物反应器,其液体循环呈现出更规则的流型,从而使反应器中光暗循环周期更稳定、液体混合更均匀,增加次级代谢物的产生,明显提升了雨生红球藻中虾青素的产量。

除上述策略以外，通过添加一些外源物质也是提升虾青素产量的可行方案。王想等^[30]发现添加 *rac*-GR24（一种合成的植物激素类似物）可有效增加雨生红球藻产生的生物量以及虾青素的积累量。*rac*-GR24能够提高植物的光合作用和增加碳水化合物合成中CO₂的利用率，从而增加生物量的积累。同时它还促进NADPH和过氧化酶的过量生产，从而减轻活性氧造成的损害。此外，*rac*-GR24处理雨生红球藻还改变了脂肪酸生物合成以及虾青素酯化途径的活性，从而使虾青素的积累量增加。

由于藻类坚硬厚实的细胞壁增加了细胞的机械抗性和化学抗性，提取虾青素是藻类生产虾青素的重大挑战。传统的提取方法并不适用藻类虾青素的提取，因此黄文灿等^[31]提出了一种利用可切换亲水性溶剂从雨生红球藻中提取虾青素的新方法。二甲氨基环己烷（DMCHA）作为一种可切换亲水性溶剂，具有低挥发性和低溶解性。利用它，无需蒸馏，只需同时加入水和CO₂，就可使雨生红球藻中虾青素的萃取率达87.2%。

雨生红球藻富含天然虾青素、不饱和脂肪酸等，具有很高的研究利用价值^[32]。同时国内外市场对天然虾青素的需求量日益上涨，其开发潜力巨大。但仍存在几个问题需探索解决：①雨生红球藻合成虾青素的中间代谢物转化、关键酶的表达调控需要进一步深入探索；②雨生红球藻由于细胞壁结构复杂，导致提取收率低，未来仍需开发新的提取工艺以降低生产成本。

2.2 酵母

自然界中天然生产虾青素的酵母主要有红法夫酵母、黏红酵母（*Rhodotorula rubra*）、海洋红酵母（*R. benthica*）以及深红酵母（*R. glutinis*）等。随着合成生物学的发展，基于基因工程构建的工程酵母也可以生产虾青素，如解脂耶氏酵母、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）。相对于藻类等微生物而言，酵母生产虾青素的底物来源广泛、生长速度快、发酵周期短以及具有相对成熟

的基因修饰工具。因此，酵母是目前虾青素工业化生产的最有潜力的底盘细胞之一。

2.2.1 红法夫酵母

红法夫酵母被认为是除雨生红球藻外，自然界中最适合生产虾青素的微生物^[33-34]。其可利用多种糖作为碳源发酵合成虾青素^[35]，且细胞生长速度快，生长周期短，能够实现高密度培养，可显著降低生产成本^[34, 36]。同时生产的虾青素为右旋（3*R*,3'*R*）构型，易被人体吸收。因此，红法夫酵母成为合成虾青素理想的底盘细胞之一。表1为红法夫酵母产虾青素的最新进展。

表1 红法夫酵母产虾青素进展
Table 1 Progress in astaxanthin production by *X. dendrorhous*

菌株	碳源	菌株类型	浓度/产量	发酵模式	参考文献
<i>X. dendrorhous</i>	葡萄糖	野生菌	27.05 mg/L	30L发酵罐	[37]
<i>X. dendrorhous</i>	葡萄糖	诱变菌	85.02 mg/L	5L发酵罐	[38]
<i>X. dendrorhous</i>	甜高粱蔗渣	野生菌	48.9 mg/L	分批补料发酵	[39]
<i>X. dendrorhous</i>	葡萄糖	诱变菌	9.7 mg/g	1.3L发酵罐	[40]
<i>X. dendrorhous</i>	葡萄糖	野生菌	67.9 mg/L	分批补料发酵	[41]

发酵条件的优化是最容易、最直接的提高虾青素产量的方式。其中pH对红法夫酵母的细胞生长和虾青素积累均有影响。有研究表明，红法夫酵母细胞生长的最适初始pH为6.0，虾青素形成的最适pH为4.0，虾青素积累的最适pH为5.0^[37]。因此，通过利用变pH的调控策略，红法夫酵母的虾青素产量比恒定pH发酵提高了24.1%。虾青素合成路径复杂，需要多种不同的底物和前体物参与，所以发酵过程中某些物质的添加也会促进虾青素的生物合成。例如，杨浩易等^[42]以红法夫酵母为底盘细胞，发现嘌呤、嘧啶、氨基酸合成和糖酵解途径的下调均有助于虾青素的生物合成，脂质代谢途径的上调有助于虾青素的积累。原钒酸钠的加入可抑制氨基酸代谢途径，使虾青素产量增加19.2%；褪黑素的加入可促进脂质代谢，使虾青素产量增加30.3%。通过代谢通量分析，茹毅等^[41]发现乙醇可以提高红法夫酵母细胞代谢中丙酮酸、乙酰辅酶A的含量，使流向虾青素合成途径的通量提高2.3倍，进而促进虾青素的合成。同时，对虾青素合成途径中α-酮戊二酸和5-磷酸核酮糖代谢节点进行调控，发现在培养基中加入0.5 g/L

的 α -酮戊二酸,可使红法夫酵母细胞生长量提高0.4 g/L。在培养基中加入3 g/L谷氨酸,虾青素的产量提高到67.9 mg/L,是对照组通量的1.7倍。

众所周知,酵母具有很强的代谢能力,不仅可以利用单糖、二糖、多糖、有机酸等小分子物质,还可以利用简单的氮源以及复杂的有机混合物。使用工业废料中的廉价底物可以有效降低虾青素生产的成本,如甘蔗渣、甜高粱蔗渣(sweet sorghumbagasse, SSB)等。庄媛等^[38]对红法夫酵母菌株进行了常温及紫外线诱变研究,选育得到的突变株经在22 °C和220 r/min下发酵甘蔗渣水解液96 h后,类胡萝卜素浓度达到88.57 mg/L;进一步采用超声波和纤维素酶破碎细胞壁后,虾青素得率达96.01%。Stoklosa等^[39]以甜高粱蔗渣为碳源培养红法夫酵母生产虾青素,但由于SSB中的酚类化合物对红法夫酵母会产生抑制作用,于是通过活性炭和漆酶处理SSB来缓解其对红法夫酵母的抑制作用,最终使菌体的细胞干重从15.6 g/L提高到23.6 g/L,虾青素产量从9.55 mg/L提高到48.9 mg/L。

在合成生物学中,最常见的手段还是通过诱变以及代谢工程改造来提升目标产物的含量。Gassel等^[40]通过随机诱变得得到一株虾青素含量高的红法夫酵母,在其基础上,通过表达番茄红素环化酶基因*crtYB*以及虾青素合成基因*ASY*,进一步提高虾青素合成的通量,最后通过发酵罐放大实验,虾青素最大含量达到9.7 mg/g DCW。另外一项研究中指出,麦角甾醇的合成途径会反馈抑制MVA途径。因此,通过删除参与麦角甾醇合成的基因来改善萜类物质生产是一个有效的策略。Yomamoto等^[43]依次删除编码与麦角甾醇生物合成相关的C-22甾醇去饱和酶的双*CYP61*基因后,通过发酵验证,重组红法夫酵母的虾青素产量提高了1.4倍。

虽然红法夫酵母是天然生产虾青素的底盘细胞之一,但野生型红法夫酵母产量低,且容易退化,实现大规模工业化生产仍存在一定的挑战。因此选育虾青素高产菌株就成了目前研究的首要目标。未来,通过诱变选育高产菌株、代谢工程改造,并结合培养基配方优化、发酵条件优化可进一步提高虾青素产量。

2.2.2 酿酒酵母

酿酒酵母是第一个进行全基因组测序的真核微生物,其遗传操作简便、基因表达调控机理清楚且高密度发酵技术成熟,特别是近年来一系列适用于酿酒酵母途径组装工具的开发,使得酿酒酵母成为合成生物学研究的理想底盘细胞^[44]。但是和许多工程酵母一样,野生型酿酒酵母不能合成虾青素,需要通过基因工程改造,引入虾青素合成的关键基因,才能实现虾青素的合成,且合成的虾青素多为左旋(3S,3'S)构型。表2为酿酒酵母产虾青素的最新进展。

不同物种的*crtZ*和*crtW*对酿酒酵母合成虾青素有显著的影响,因此外源合成虾青素基因和底盘细胞的匹配性尤为重要。王瑞兆等^[45]对不同物种的*crtZ*和*crtW*在酿酒酵母进行组合表达,从30个组合中选择了来自泡囊短波单胞菌(*Brevundimonas vesicularis*)的*crtW*和来自产碱杆菌(*Alcaligenes*)的*crtZ*,得到的工程菌株SyBE-Sc118076中虾青素产量高达81.0 mg/L。筛选关键基因的突变体也是提高虾青素产量的有效方法。例如,融合酶的构建可有效降低中间代谢物积累,在利用linker将*crtW*和*crtZ*融合的基础上,通过定向进化获得9个虾青素产量提高的融合突变体。组合这些显性突变体得到了高产虾青素的酿酒酵母菌株L95S+1206L,其虾青素含量是对照菌株的3.8倍^[49-50]。为提高 β -胡萝卜素向虾青素转化的效率,周萍萍等^[46]通过定向协同进化获得*crtZ*和*crtW*的酿酒酵

表2 酿酒酵母产虾青素进展

Table 2 Progress in astaxanthin production by *S. cerevisiae*

菌株	碳源	菌株类型	浓度/产量	发酵模式	参考文献
<i>S. cerevisiae</i>	葡萄糖	表达不同来源的 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i> ,替换不同强度的启动子	81 mg/L	5L发酵罐	[45]
<i>S. cerevisiae</i>	葡萄糖	定向协同进化获得关键基因的突变体,借助温度调节响应系统	235 mg/L	5L发酵罐	[46]
<i>S. cerevisiae</i>	葡萄糖	适度调节脂质代谢的相关基因,平衡 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i> 的表达	446.4 mg/L	5L发酵罐	[47]
<i>S. cerevisiae</i>	葡萄糖	组成型启动子表达 <i>crtW</i> ,诱导型启动子表达 <i>crtZ</i>	464.09 mg/L		[48]

母优越突变体，同时引入基于Gal4M9的温度响应调节系统^[51]，将虾青素的合成与细胞生长进行解耦，即：第一阶段的温度保持在30℃，使细胞快速生长；当细胞生长进入对数中期，将培养温度改变为24℃，促进虾青素的合成；最后，通过两阶段高密度发酵合成了235 mg/L的虾青素。

由于虾青素是脂溶性的，这恰恰与酿酒酵母等模式微生物对脂类的有限储存能力相冲突^[52]，因此可以通过促进脂质合成来扩大脂滴，为虾青素的合成提供更多的储存空间，以提高虾青素的含量。于是李明等利用三功能CRISPR系统筛选了与脂质代谢相关的基因文库^[47, 53]，通过适度上调*opi3*和*hrd1*的表达水平来促进脂质的合成，在平衡*crtZ*和*crtW*的表达后，使虾青素含量提高到10.21 mg/g DCW。最后，通过脂质合成的空间调控和温度响应的的时间调控相结合，在补料分批发酵中合成了446.4 mg/L 虾青素。

2.2.3 解脂耶氏酵母

解脂耶氏酵母是目前研究最多、应用最广泛的非常规酵母之一，通过解脂耶氏酵母生产的虾青素多为左旋(3*S*,3'*S*)构型。与常规酵母酿酒酵母相比，解脂耶氏酵母具有多种独特的生化和代谢特征。它是典型的二型性酵母，其作为一种好氧菌，基本不产生对细胞有毒害作用的乙醇^[54]；且胞内具有高效的乙酰辅酶A代谢通路和较高的三羧酸循环通量，脂质的积累量可达77%，这使其成为有机酸、脂质及其衍生物工业生产的理想选择^[55-57]。此外，解脂耶氏酵母可以在较低pH值和较高的渗透压条件下生长，并且可以利用多种碳源、蛋白质和疏水性底物，如糖类、烃类、醇类、脂类等，因此其对生长环境要求不严格，可在各种环境条件下生长，具有良好的工业应用前

景^[58]。表3为解脂耶氏酵母产虾青素的最新进展。

不同来源的虾青素合成基因依然是影响解脂耶氏酵母中虾青素产量的关键因素。Kildegaard等^[59]在一株高产β-胡萝卜素的解脂耶氏酵母菌株基础上，表达来自副球菌(*Paracoccus* sp. N81106)的*crtW*和来自泛菌(*P. ananatis*)的*crtZ*，同时对相关基因的拷贝数进行优化，得到了3.5 mg/g DCW (54.6 mg/L)的虾青素；另一项研究表达3对不同来源的*crtW*和*crtZ*，指出来自雨生红球藻的*HpCrtW*和*HpCrtZ*转化β-胡萝卜素为虾青素的活性最强^[65]。通过对RIAD-RIDD短肽对相关基因进行模块化组装^[62]，同时增加拷贝数到20后，在补料分批培养条件下，重组解脂耶氏酵母的虾青素产量达3.3 g/L，是迄今为止在微生物底盘中合成虾青素的最高水平。

在微生物中生产高附加值化学品的代谢调控手段大多是使用细胞质作为反应容器^[66]，然而，酶和底物的隔离以及代谢串扰经常阻碍细胞质中目标化合物的有效合成。真核细胞中细胞器的区域化为打破这一瓶颈提供了解决思路。例如，马勇烁等^[60]通过将虾青素合成途径定位于内质网与过氧化物酶体，不仅加速了β-胡萝卜素向虾青素的转化，同时显著减少了类胡萝卜素中间体的积累，使虾青素产量提高141倍，在补料分批发酵中可合成858 mg/L的虾青素。

虾青素是一种脂溶性的萜类化合物，其强疏水性导致生物利用度较低。通过加入外源油相可以促进虾青素的溶解并防止晶体的形成，以此来增加虾青素的产量。Yuzbasheva等^[61]通过模块化工程途径和两种关键酶的融合技术，构建了一株虾青素产量为587.3 mg/L的重组解脂耶氏酵母菌株，在添加油覆盖层的情况下，虾青素产量可提

表3 解脂耶氏酵母产虾青素进展
Table 3 Progress in astaxanthin production by *Y. lipolytica*

菌株	碳源	改造策略	浓度/产量	发酵模式	参考文献
<i>Y. lipolytica</i>	葡萄糖	表达不同来源的 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i> ,增加关键基因拷贝数	54.6 mg/L	96深孔板培养	[59]
<i>Y. lipolytica</i>	葡萄糖	定位于不同的亚细胞器	858 mg/L	3L发酵罐	[60]
<i>Y. lipolytica</i>	蔗糖	加入外源油相,模块化工程途径融合关键基因	973.4 mg/L	3L发酵罐	[61]
<i>Y. lipolytica</i>	葡萄糖	表达来自雨生红球藻的关键基因,通过短肽连接,增加融合酶的拷贝数	3.3 g/L	分批补料发酵	[62]
<i>Y. lipolytica</i>	葡萄糖	表达来自夏侧金盏花的关键基因,引入 <i>crtX</i> 基因	3.46 mg/L	摇瓶发酵	[63]
<i>Y. lipolytica</i>		组合表达不同来源的 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i>	99 mg/L	摇瓶发酵	[64]

高到 973.4 mg/L。糖基化也可以显著增加虾青素的水溶性,从而提高其生物利用度、光稳定性和生物活性^[67-68]。陈靖等^[63]通过在解脂耶氏酵母中表达来自夏侧金盏花的类胡萝卜素 4-羟基- β -环-4-脱氢酶(HBFD)和类胡萝卜素- β -环-4-脱氢酶(CBFD)基因,构建了一株植物来源的虾青素合成菌株,虾青素产量达到 3.46 mg/L。在此基础上,通过表达来自菠萝泛菌(*P. ananatis* ATCC 19321)的玉米黄素糖基化酶(CrtX)基因,成功构建了糖基化虾青素合成途径,其产量达到 1.47 mg/L,是迄今为止报道的微生物生产糖基化虾青素的最高产量。

2.2.4 马克斯克鲁维酵母

近年来,马克斯克鲁维酵母广泛用于天然产物的合成。相比于其他传统酵母,其拥有以下几个优势:马克斯克鲁维酵母可以通过提供过量碳源提高菌体产量^[69];一些马克斯克鲁维酵母耐高温,能在 25~52 °C 的温度下发酵^[70];具有适当的糖基化和较强的信号肽,与酿酒酵母相比具有较高的分泌能力^[71]。

目前,基于代谢工程手段,马克斯克鲁维酵母已被用作底盘细胞合成虾青素,且合成的虾青素多为左旋(3*S*,3'*S*)构型。例如,林语聚等^[72]通过在马克斯克鲁维酵母中构建虾青素异源合成路径,实现了利用葡萄糖合成虾青素。他们将来自雨生红球藻的*Hpchyb*和*bkt*基因整合到马克斯克鲁维酵母的基因组上,并增加其拷贝数,获得 4 株改造菌。为了进一步提高产量,对*Hpchyb*基因进行了定点突变,以提高酶效率和防止泛素化引起的异源蛋白降解,最终实现了在 5 L 发酵罐中合成 9972 $\mu\text{g/g}$ DCW 虾青素。另外一项研究中,通过使用木糖诱导型启动子和温度调控系统,可实现将细胞生长与产物合成解耦;进一步通过对代谢路径以及发酵条件进行优化,虾青素产量达到 56.8 mg/L^[73]。虽然有关马克斯克鲁维酵母用作底盘细胞生产虾青素的报道较少,但其拥有的独特优势,为微生物发酵合成虾青素提供了新的技术选择。

2.2.5 其他酵母

除上述典型的工程酵母外,还有一些报道相对较少的生产虾青素的酵母,如黏红酵母、海洋红酵母等。黏红酵母作为一种含油脂的红酵母,

主要用于生产 β -胡萝卜素。有团队通过诱变筛选获得一株产虾青素的黏红酵母 RG-31,最后通过优化发酵条件,虾青素含量达到 7.41 $\mu\text{g/mL}$ 。海洋红酵母是海洋中自然存在的一种单细胞酵母,有较好的耐盐性,生产以虾青素为主的类胡萝卜素。一株高产类胡萝卜素的海洋深红酵母菌株 S8,通过紫外诱变获得菌株 ST5,并通过发酵条件优化,虾青素含量可达 520 $\mu\text{g/g}$ 。

2.3 细菌

由于细菌合成虾青素的产量较低,因此国内外研究虾青素主要集中在藻类和真菌,对细菌合成虾青素的研究相对较少。尽管大多数细菌的虾青素含量远低于一些藻类及真菌,但通过在细菌中引入合成虾青素的相关基因^[20],可以极大地提升虾青素的产量。同时相比于真菌和藻类,利用细菌发酵更容易提取虾青素,可大大简化后续的提取工艺。尤其是革兰氏阴性细菌,细胞壁薄易破碎,方便提取胞内的虾青素。因此,通过细菌发酵生产虾青素,可以大幅度降低虾青素的生产成本,对未来的工业化生产有重要意义。

2.3.1 大肠杆菌

大肠杆菌是一种革兰氏阴性、兼性厌氧细菌,培养方便、操作简单、成本低廉,且分子遗传改造工具成熟,已成为代谢工程和合成生物学的最佳宿主之一。它作为一种非类胡萝卜素产生菌株,能够通过 MEP 途径合成萜类化合物的前体 IPP 和 DMAPP。在野生型的大肠杆菌中,其体内能够生成 FPP 合成酶,这种酶可以将 IPP 和 DMAPP 进行缩合反应,生成 GPP 和 FPP,但缺乏将 FPP 转化为最终虾青素的酶类。因此通过向大肠杆菌引入外源的虾青素合成模块,就能较容易实现大肠杆菌合成虾青素,且合成的虾青素多为左旋(3*S*,3'*S*)构型。表 4 为大肠杆菌产虾青素的最新进展。

虾青素代谢合成途径中关键基因的确定,为构建虾青素高产工程菌提供了可能。Jeong 等^[75]利用来自库克菌(*Kocuria gwangallensis*) MEP 途径的*dxs*、*ispC*、*ispD*、*ispE*、*ispF*、*ispG*、*ispH*和*idi*和转化虾青素合成的相关基因(*crtI*、*crtE*、*crtYB*、*crtW*、*crtZ*)在大肠杆菌中进行共表达以增加虾青

表4 大肠杆菌产虾青素进展

Table 4 Progress in astaxanthin production by *E. coli*

菌株	碳源	改造策略	浓度/产量	发酵模式	参考文献
<i>E. coli</i>	酵母粉	表达伴侣基因 <i>Apcpna</i> 和 <i>ApcpnB</i>	890 $\mu\text{g/g}$	摇瓶发酵	[74]
<i>E. coli</i>	酵母粉	表达 MEP 途径关键基因与 MVA 途径共表达	1100 $\mu\text{g/g}$	摇瓶发酵	[75]
<i>E. coli</i>	酵母粉	表达类异戊二烯途径关键基因与 MVA 途径共表达	1200 $\mu\text{g/g}$	摇瓶发酵	[76]
<i>E. coli</i>	葡萄糖	通过 γ -Red 重组技术将虾青素合成途径的基因整合到大肠杆菌染色体中	1.4 mg/g	摇瓶发酵	[77]
<i>E. coli</i>	蔗糖	表达不同来源的 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i> , 平衡相关基因的活性	7.4 mg/g	摇瓶发酵	[78]
<i>E. coli</i>	葡萄糖	表达不同来源的 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i> , 通过短肽连接关键基因	5.18 mg/g	摇瓶发酵	[79]
<i>E. coli</i>	葡萄糖	表达不同来源的 <i>crtW</i> 和 <i>crtZ</i> , 表达不同强度的启动子	4.3 mg/g	摇瓶发酵	[80]
<i>E. coli</i>	酵母粉	删除形态、膜、氧化应激相关基因, 建立温度敏感质粒互补表达系统	11.92 mg/g	摇瓶发酵	[81]
<i>E. coli</i>	甘油	对 <i>crtW</i> 进行随机突变, 通过 Cre-loxP 平衡增加基因拷贝数	5.88 mg/g	7L 发酵罐	[82]
<i>E. coli</i>	甘油	增加 <i>crtYB</i> 的拷贝数, 调节操纵子的表达水平	6.17 mg/g	5L 发酵罐	[20]
<i>E. coli</i>	甘油	筛选不同来源的 <i>crtZ</i> 并对这些不同底物偏好的酶进行联合利用	11.5 mg/g	5L 发酵罐	[83]

素的产量。这种含有非甲羟戊酸途径基因的工程大肠杆菌能够合成 1100 $\mu\text{g/g}$ DCW 的虾青素。类异戊二烯途径中 *lytB*、*ispA* 和 *idi* 基因对 IPP、DMAPP、FPP 的合成必不可少, 但由于大肠杆菌本身合成的这些前体物仅能满足自身生长, 无法流向虾青素合成路径, 所以造成虾青素产量过低。因此 Lee 等^[76] 在携带虾青素合成基因 (*crtI*、*crtE*、*crtYB*、*crtW*、*crtZ*) 的大肠杆菌中过表达 *lytB*、*ispA* 和 *idi*, 最终工程大肠杆菌合成 1200 $\mu\text{g/g}$ DCW 的虾青素。筛选不同来源的 *crtW* 和 *crtZ* 依然是提升虾青素产量的常规方案之一。例如, 鲁赛等^[78] 通过比较不同来源 *crtW* 和 *crtZ*, 认为来自短波单胞菌 (*Brevundimonas* sp. SD212) 的 *crtW* 和来自泛菌的 *crtZ* 是生产虾青素的最佳组合。通过平衡 *crtW* 和 *crtZ* 的表达活性后, 构建了一株既不携带质粒也不携带抗生素标记的大肠杆菌 ASTA-1, 在不添加诱导剂的情况下, 重组菌株合成的虾青素占类胡萝卜素含量的 96.6%, 其含量达 7.4 mg/g DCW。而吴元庆等^[79] 筛选 9 个不同来源的 *crtZ* 和 *crtW*, 并分别将其导入到高产 β -胡萝卜素的工程大肠杆菌中, 其虾青素含量达 0.49~8.07 mg/L 。随后, 利用优化的肽连接物将 *crtZ* 与 *crtW* 进行融合, 进一步增加了虾青素的产量, 使虾青素产量增加了 127.6%。李顺等^[80] 通过选用 *GadE* 启动子在大肠杆菌表达来自雨生红球藻的 *HpCHY* 基因和来自莱茵衣藻 (*Chlamydomonas*) 的 *CrBKT* 基因, 最终工程菌株能够合成 24.16 mg/L 虾青素, 比原始菌株增加了 40 倍。由此可见, 选取合适的虾青素合成基

因元件, 会显著影响虾青素的表达含量。

增加关键基因的拷贝数是一种提升虾青素产量的简单、直接和有效的方式。例如, 在大肠杆菌中, 通过增加 *crtYB* 的拷贝数消除虾青素积累不足的瓶颈, 同时通过调节操纵子的表达, 最终在补料分批发酵条件下, 虾青素的产量达到 1.18 g/L ^[20]。李迪等^[82] 首先对 *crtW* 进行随机突变以提高其从 β -胡萝卜素转化为虾青素的活性, 再通过 Cre-loxP 的方法增加 *crtW* 和 *crtZ* 的拷贝数, 构建出一株高产虾青素的大肠杆菌, 最后通过补料分批发酵, 虾青素产量达到 0.88 g/L ^[84]。张梦等^[83] 发现来自马氏副球菌 (*Paracoccus* sp. PC1) 的 *crtZ* 和来自泛菌的 *crtZ* 共表达可以提高虾青素以及中间体的积累量, 最终构建具有两个拷贝数的 PAcrtZ 和一个拷贝数的 PCcrtZ 工程大肠杆菌菌株, 经过 70 h 的补料分批发酵, 虾青素产量达到 1.82 g/L 。

此外, 也可通过非常规技术手段来提升虾青素代谢通路的策略, 从而达到提高虾青素产量的目标。例如, 通过在表达虾青素合成基因 (*crtI*、*crtE*、*crtYB*、*crtW*、*crtZ*) 的大肠杆菌中共表达伴侣基因 *Apcpna* 和 *ApcpnB*, 最终工程菌能够生产 890 $\mu\text{g/g}$ DCW 的虾青素^[74]。Lemuth 等^[77] 构建了第一个无质粒的大肠杆菌, 通过 γ -Red 重组技术将虾青素生物合成途径的基因稳定整合到大肠杆菌染色体中, 使该通路只指向虾青素合成。最终虾青素的含量达 1.4 mg/g DCW^[85]。基于形态学和氧化应激工程也是提高大肠杆菌虾青素合成的有效策略。如删除与形态、膜相关的基因, 可以获得

更大、更长的细胞,从而增加虾青素的积累。氧化应激是指细胞内活性氧产生与抗氧化之间存在不平衡,从而导致细胞损伤。因此删除氧化应激相关基因能够增加细胞内活性氧水平,达到保护细胞的目的^[81]。同时温度升高后,细胞形态依然会发生变化,活性氧水平也将更高,所以通过建立温度敏感质粒的互补表达系统,最终能使这株大肠杆菌的虾青素含量提高至 11.92 mg/g DCW。此外,酶定位策略也可以用来提升工程大肠杆菌中虾青素的产量。例如,叶丽君等^[86-88]利用大肠杆菌定位标签将 β -胡萝卜素裂解双加氧酶PhCCD1定位到不同的细胞室,发现其催化效率的最佳位置是在膜上,最终将CrtW和CrtZ通过GlpF蛋白融合定位到大肠杆菌细胞膜上后,虾青素产量增加了215.4%。

2.3.2 副球菌

副球菌(*Paracoccus* sp.)是一种好氧、革兰氏阴性菌,其胞内含有虾青素以及其他稀有的类胡萝卜素,然而关于副球菌合成虾青素的研究论文还很少^[89-90]。天然类胡萝卜素通常以E构型存在,人和动物对其利用率较低,而“Z-异构化”是提高其生物利用率的有效手段^[91-93]。例如,Honda等^[94]以副球菌为底盘细胞,在亚临界水条件下(将水加热至沸点以上,临界点以下,并控制系统压力使水保持为液态)异构化虾青素等类胡萝卜素,发现在加温加压条件下添加乙醇,“Z-异构化”的效率明显提升,最后,通过30 min的亚临界水处理,在抑制胡萝卜素降解的同时,获得了“Z-异构化”比例50%以上的虾青素。

适当调控培养基的组分以及发酵过程中的参数是提高虾青素产量的有效策略。在培养基中添加三羧酸中间体可增强前体供应量;还可通过添加虾青素合成关键酶的辅因子(硫酸亚铁、抗坏血酸、NADPH、ATP和2-氧戊二酸)以提升关键酶的活性,从而提高虾青素的积累。如在以副球菌为底盘细胞生产虾青素时,通过添加5 mmol/L的苹果酸盐和1 mmol/L的硫酸亚铁,可以提高Crt酶的活性,使虾青素的产量从177 μ g/L增加到3750 μ g/L^[95]。虽然细菌自身合成虾青素与藻类和酵母相比产量较低,但这为后续的工程菌株的构建、改造提供了可供选择的基因元件。

2.3.3 其他细菌

能够生产虾青素的细菌相对较少,且产量相对较低,研究最多的就是大肠杆菌作为底盘细胞。除此以外,如乳酸分枝杆菌(*Mycobacterium lacticola*)和短杆菌(*Bevibacterium*)也都可以生产虾青素。但乳酸分枝杆菌只在烃类培养基上生产虾青素,在营养培养基上并不生产虾青素。而短杆菌在石油里生长,发酵结束,菌体生物量仅有3 g/L,虾青素含量则更低。

综上所述,大肠杆菌是目前细菌中生产虾青素的理想底盘细胞。

3 虾青素的提取工艺

虾青素是胞内产物,因此从微生物中提取虾青素分为两个步骤:细胞的破坏和虾青素的收集。相较于细菌,藻类和酵母的细胞壁坚韧且厚实,不易破碎,给产物的提取带来了很大的困难。因此虾青素的提取重点在于细胞的破壁处理^[96]。

传统的破壁处理方法主要有物理法、化学法、酶法等^[97]。物理处理方法有机械破碎、超声波破碎和超临界流体萃取等。机械破碎操作简单,通过机械搅拌将细胞壁撕裂,从而释放细胞内的虾青素。但是机械破碎可能会引起部分位置温度过高,从而对虾青素造成一定的破坏;超声波破碎虽可以有效破除溶质中的细胞壁,但随着超声波作用强度以及作用时间的增加,产生的强氧化性自由基增多,从而导致虾青素的提取率下降,并且其还会产生一定的噪声污染^[98]。超临界流体萃取是近年来各类藻产品提取中最有效的萃取方法,与传统液体溶剂相比,其具有一些专有的物理化学特性,如高扩散率、高压缩性、低表面张力、低黏度,易穿透细胞壁,提高产品提取效率。

化学法主要包括有机溶剂萃取法、酸碱处理法、二甲基亚砜法等。虾青素为脂溶性天然产物,因此有机溶剂的选择要考虑到虾青素是否可溶以及溶剂的极性。例如,邢涛等^[99]以乙酸乙酯作为有机溶剂,从雨生红球藻中提取虾青素,最终其得率为98.51%。虽然利用有机溶剂提取虾青素得率较高,但不足之处是许多溶剂具有毒性,可能对虾青素产生破坏作用。酸碱处理法破壁会用到

大量的酸碱试剂,不仅可能会造成对虾青素的破坏,还会对环境造成相应的污染。二甲基亚砷作为一种既溶于水又溶于有机溶剂的极性溶剂,成为实验室常用的破壁溶剂,能够快速高效地破碎菌体的细胞壁,并且不会对虾青素造成太大的影响^[100],同时与丙酮以合适的比例混合,能够较为完全地提取虾青素^[101]。

酶法提取虾青素具有条件温和、能耗小、耗时短等优点,它不仅可以快速高效地破除细胞壁,将胞内虾青素释放出来,而且可以抑制细胞的活性,从而防止胞内物质发生变性^[102]。因此酶法提取的虾青素相比于其他方法获得的虾青素更加稳定。例如, β -葡聚糖酶能够水解细胞壁中的 β -葡聚糖,可以避免虾青素溢出菌体减少损失^[100]。但酶法需要大量的酶,这无疑增加了生产成本,同时由于酶的本质是蛋白质,易发生变性,因此并不适用于大规模虾青素提取处理。

由于虾青素是一种强抗氧化剂,如果长期暴露在空中,空气中的氧气会与虾青素发生氧化反应,使其失去抗氧化能力。因此无氧(充氮)提取工艺也是目前工业生产上不可获取的步骤之一。该方法就是通过采用惰性气体或氮气填充,为有机溶剂萃取提供一个无氧环境,用以保护其活性,使虾青素的抗氧化活性显著提高。

4 总结与展望

由于虾青素在食品、医药和化妆品等领域的广泛应用,市场对虾青素的需求将可预见地增加。目前,化学合成法仍是虾青素生产的主要途径,但由于化学合成虾青素的局限性,世界各国对化学法合成虾青素的管理越来越严格。然而直接从自然资源中提取的虾青素远远不能满足消费者的需求。因此,通过微生物发酵生产虾青素为虾青素的工业化生产提供了有前景的选择。酵母由于底物谱宽、易于生长培养、发酵周期短以及具有相对成熟的基因修饰工具等优点,是最具发展潜力的底盘细胞。其中,红法夫酵母能够天然生产虾青素,生长速度快,可以利用多种碳源;解脂耶氏酵母具有较高的乙酰辅酶A通量以及三羧酸循环代谢通路,能够在较低pH和较高的渗透压下

生长;酿酒酵母遗传操作简便、基因表达调控机理清楚且高密度发酵技术成熟;马克斯克鲁维酵母能够耐高温,具有适当的糖基化和较强的信号肽。

随着合成生物学、蛋白质工程、代谢工程和发酵工程的快速发展,许多微生物已被用作底盘细胞来生产虾青素。但尽管虾青素的生物合成已经取得了重大突破,却仍存在挑战:

第一,能够天然生产虾青素的微生物,如红法夫酵母、雨生红球藻依然存在产量低、培养条件严格、成本高等问题。为了解决这个问题,今后的研究方向应集中在高产菌株的培育和筛选、培养条件的优化上,以提高产量、降低成本。

第二,由于虾青素合成代谢通路复杂,因此通过代谢工程改造模式生物如大肠杆菌、解脂耶氏酵母、酿酒酵母等依然存在产量低等问题。对此,可通过如下策略提高底盘细胞合成虾青素的效率(图4):①对MVA代谢途径进行优化改造,如截短的*tHMG*(在N端截短500个氨基酸)被证明是MVA途径的关键基因,它可以有效地防止自身被降解,从而增加类胡萝卜素的产量;②更换不同强度的启动子,提高代谢路径中的催化匹配性,如在 β -胡萝卜素生物合成的基因中,强启动子 P_{TEF} 取代其他弱启动子显著提高了解脂耶氏酵母中 β -胡萝卜素的产量^[103];③增加关键基因的拷贝数,提高限速步骤的代谢通量,如当*crtYB*的拷贝数从1增加到4的时候, β -胡萝卜素产量增加了76%^[104];④使用不同的连接子或者短肽,对关键基因进行模块化组装,提高碳代谢通量,以此来提高虾青素的效价;⑤定位于不同的亚细胞器中,提高虾青素的储存空间,类胡萝卜素一般储存在细胞膜中,会降低细胞膜的流动性,造成细胞的死亡,将类胡萝卜素的代谢路径定位于亚细胞器中,可以减少代谢紊乱,同时也可以扩大类胡萝卜素在细胞内的储存空间,减少其对细胞的毒性,如真核细胞中高尔基体、线粒体、过氧化物酶体具有独特的物理环境,可为类胡萝卜素的合成提供有利的条件;⑥发酵条件优化是最常规也是最有效提升虾青素产量的方式,例如,培养基中不同的碳源氮源、不同的碳氮比、pH值的优化、温度的调控等。

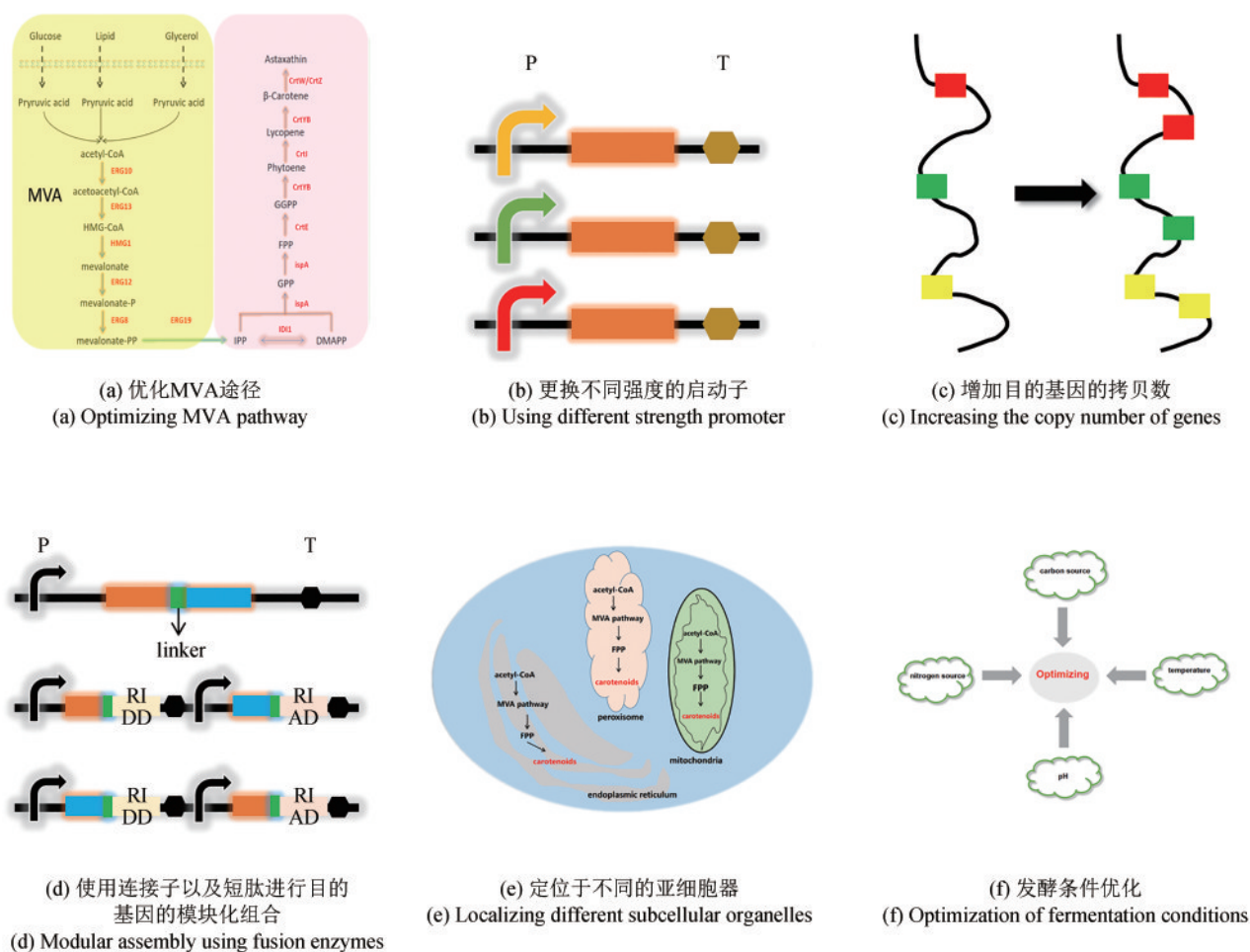


图4 虾青素产量提高策略

Fig. 4 Strategies for increasing astaxanthin production

同时值得我们关注的是,即使通过生物合成的虾青素应用价值远超过化学法合成的,但其应用还是受到许多国家的法律法规所限制。如虾青素长时间加热会产生致癌物质,美国FDA禁止虾青素用作食品添加剂;法国明确规定虾青素只能用于特定的保健品和化妆品中。因此,通过微生物发酵生产虾青素还有很长一段路要走。

参考文献

- [1] RIZZARDI N, PEZZOLESI L, SAMORÌ C, et al. Natural astaxanthin is a green antioxidant able to counteract lipid peroxidation and ferroptotic cell death[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15137.
- [2] TURUJMAN S A, WAMER W G, WEI R R, et al. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin[J]. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 1997, 80(3): 622-632.
- [3] 蔡俊, 游智能. 发酵法生产虾青素的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 358-366.
- CAI J, YOU Z N. Current status of fermentative production of astaxanthin[J]. Food Science, 2015, 36(23): 358-366.
- [4] 姜思, 佟少明. 雨生红球藻虾青素合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(6): 988-997.
- JIANG S, TONG S M. Advances in astaxanthin biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(6): 988-997.
- [5] YUAN J P, CHEN F. Chromatographic separation and purification of *trans*-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(8): 3371-3375.
- [6] 王军, 张晴龙, 李曦月, 等. 高产虾青素红法夫酵母的代谢工程育种研究进展[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(10): 1-5.
- WANG J, ZHANG Q L, LI X Y, et al. Research progress in metabolic engineering breeding of high-yield astaxanthin-

- producing *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Chemistry & Bioengineering, 2022, 39(10): 1-5.
- [7] KOHANDEL Z, FARKHONDEH T, ASCHNER M, et al. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 145: 112179.
- [8] JING Y W, WANG Y X, ZHOU D W, et al. Advances in the synthesis of three typical tetraterpenoids including β -carotene, lycopene and astaxanthin[J]. Biotechnology Advances, 2022, 61: 108033.
- [9] SCHMIDT I, SCHEWE H, GASSEL S, et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3): 555-571.
- [10] 苗丽青, 马旭辉, 李素贞, 等. 虾青素的生物合成与产业化应用[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(3): 21-29.
- MIAO L Q, MA X H, LI S Z, et al. Biosynthesis and industrial application of astaxanthin[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(3): 21-29.
- [11] LIGNELL A. Medicament for improvement of duration of muscle function or treatment of muscle disorders or diseases: US6245818[P].2001-06-12.
- [12] 李新杰, 朱伟, 姜威, 等. 天然虾青素对鸭肉品质和脂质氧化稳定性的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2012(6): 43-45.
- LI X J, ZHU W, JIANG W, et al. Effects of natural astaxanthin on duck meat quality and lipid oxidative stability[J]. Cereal & Feed Industry, 2012(6): 43-45.
- [13] MUSSAGY C U, PEREIRA J F B, DUFOSSÉ L, et al. Advances and trends in biotechnological production of natural astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* yeast[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(13): 1862-1876.
- [14] HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(3): 443-449.
- [15] CICHONSKI J, CHRZANOWSKI G. Microalgae as a source of valuable phenolic compounds and carotenoids[J]. Molecules, 2022, 27(24): 8852.
- [16] PARK S Y, BINKLEY R M, KIM W J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 105-115.
- [17] KITAHARA T. Carotenoids in the Pacific salmon during the marine period[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1984, 78(4): 859-862.
- [18] ZHANG C Q, CHEN X X, TOO H P. Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(13): 5725-5737.
- [19] LI J, ZHU D L, NIU J F, et al. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 568-574.
- [20] GONG Z K, WANG H L, TANG J L, et al. Coordinated expression of astaxanthin biosynthesis genes for improved astaxanthin production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(50): 14917-14927.
- [21] RANI A, SAINI K, BAST F, et al. Microorganisms: a potential source of bioactive molecules for antioxidant applications[J]. Molecules, 2021, 26(4): 1142.
- [22] SAINI R K, KEUM Y S. Progress in microbial carotenoids production[J]. Indian Journal of Microbiology, 2017, 57(1): 129-130.
- [23] 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.
- [24] ZHU X Y, MENG C X, SUN F J, et al. Sustainable production of astaxanthin in microorganisms: the past, present, and future [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022: 1-17.
- [25] ZHOU D W, YANG X Y, WANG H X, et al. Biosynthesis of astaxanthin by using industrial yeast[J]. Biofuels, Bioproducts & Biorefining, 2023, 17(3): 602-615.
- [26] 张辰, 徐慧, 朱坤福, 等. 微生物法生产虾青素的研究进展 [J]. 中国酿造, 2021, 40(10): 29-35.
- ZHANG C, XU H, ZHU K F, et al. Research progress in the production of astaxanthin by microbial method[J]. China Brewing, 2021, 40(10): 29-35.
- [27] GUERIN M, HUNTLEY M E, OLAIZOLA M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(5): 210-216.
- [28] CHENG X, RIORDON J, NGUYEN B, et al. Hydrothermal disruption of algae cells for astaxanthin extraction[J]. Green Chemistry, 2017, 19(1): 106-111.
- [29] RANJBAR R, INOUE R, KATSUDA T, et al. High efficiency production of astaxanthin in an airlift photobioreactor[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(2): 204-207.
- [30] WANG X, MOU J H, QIN Z H, et al. Supplementation with *rac*-GR24 facilitates the accumulation of biomass and astaxanthin in two successive stages of *Haematococcus pluvialis* cultivation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(15): 4677-4689.
- [31] HUANG W C, LIU H, SUN W W, et al. Effective astaxanthin extraction from wet *Haematococcus pluvialis* using switchable

- hydrophilicity solvents[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(2): 1560-1563.
- [32] REN Y Y, DENG J Q, HUANG J C, et al. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: advances and outlook[J]. Bioresource Technology, 2021, 340: 125736.
- [33] GASSEL S, BREITENBACH J, SANDMANN G. Genetic engineering of the complete carotenoid pathway towards enhanced astaxanthin formation in *Xanthophyllomyces dendrorhous* starting from a high-yield mutant[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 345-350.
- [34] CHI S, HE Y F, REN J, et al. Overexpression of a bifunctional enzyme, CrtS, enhances astaxanthin synthesis through two pathways in *Phaffia rhodozyma*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 90.
- [35] GERVASI T, SANTINI A, DALIU P, et al. Astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on a low cost substrate[J]. Agroforestry Systems, 2020, 94(4): 1229-1234.
- [36] STOKLOSA R J, JOHNSTON D B, NGHIEM N P. Utilization of sweet sorghum juice for the production of astaxanthin as a biorefinery co-product by *Phaffia rhodozyma*[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(3): 3124-3134.
- [37] HU Z C, ZHENG Y G, WANG Z, et al. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4): 586-590.
- [38] ZHUANG Y, JIANG G L, ZHU M J. Atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and astaxanthin production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Phaffia rhodozyma* mutant Y1[J]. Process Biochemistry, 2020, 91: 330-338.
- [39] STOKLOSA R J, JOHNSTON D B, NGHIEM N P. *Phaffia rhodozyma* cultivation on structural and non-structural sugars from sweet sorghum for astaxanthin generation[J]. Process Biochemistry, 2019, 83: 9-17.
- [40] GASSEL S, SCHEWE H, SCHMIDT I, et al. Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(4): 565-569.
- [41] 茹毅, 沈宁燕, 倪辉, 等. 乙醇促进法产酵母虾青素合成的机理及其代谢调控[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8): 41-48.
- RU Y, SHEN N Y, NI H, et al. Mechanism of ethanol promoting the synthesis of astaxanthin and its metabolic regulation by *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(8): 41-48.
- [42] YANG H Y, YANG L, DU X P, et al. Metabolomics of astaxanthin biosynthesis and corresponding regulation strategies in *Phaffia rhodozyma*[J]. Yeast, 2023, 40(7): 254-264.
- [43] YAMAMOTO K, HARA K Y, MORITA T, et al. Enhancement of astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by efficient method for the complete deletion of genes[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 155.
- [44] HONG K K, NIELSEN J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(16): 2671-2690.
- [45] WANG R Z, GU X L, YAO M D, et al. Engineering of β -carotene hydroxylase and ketolase for astaxanthin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers of Chemical Science and Engineering, 2017, 11(1): 89-99.
- [46] ZHOU P P, LI M, SHEN B, et al. Directed coevolution of β -carotene ketolase and hydroxylase and its application in temperature-regulated biosynthesis of astaxanthin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(4): 1072-1080.
- [47] LI M, ZHOU P P, CHEN M K, et al. Spatiotemporal regulation of astaxanthin synthesis in *S. cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(8): 2636-2649.
- [48] 杨祖明, 王竞辉, 张雅萍, 等. 一株生产虾青素的重组酿酒酵母及其应用: CN113699052B[P]. 2023-08-11.
- YANG Z M, WANG J H, ZHANG Y P, et al. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for producing astaxanthin and its application: CN113699052B[P]. 2023-08-11.
- [49] DING Y W, LU C Z, ZHENG Y, et al. Directed evolution of the fusion enzyme for improving astaxanthin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(1): 46-53.
- [50] CHEN X Y, ZARO J L, SHEN W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, 65(10): 1357-1369.
- [51] ZHOU P P, XIE W P, YAO Z, et al. Development of a temperature-responsive yeast cell factory using engineered Gal4 as a protein switch[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(5): 1321-1330.
- [52] CHEN G Q, WANG B B, HAN D X, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2015, 81(1): 95-107.
- [53] LIAN J Z, HAMEDIRAD M, HU S M, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. Nature Communications, 2017, 8: 1688.
- [54] RODRIGUEZ-OCASIO E, KHALID A, TRUKA C J, et al.

- Survey of nonconventional yeasts for lipid and hydrocarbon biotechnology[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(4): kuac010.
- [55] FRIEDLANDER J, TSAKRAKLIDES V, KAMINENI A, et al. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 77.
- [56] PARK Y K, DULERMO T, LEDESMA-AMARO R, et al. Optimization of odd chain fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 158.
- [57] WANG J P, LEDESMA-AMARO R, WEI Y J, et al. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*-a review[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123707.
- [58] 赵禹, 刘士琦, 李建, 等. 解脂耶氏酵母作为微生物细胞工厂的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 388-400.
- ZHAO Y, LIU S Q, LI J, et al. Advances in the application of *Yarrowia lipolytica* as a microbial cell factory[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 388-400.
- [59] KILDEGAARD K R, ADIEGO-PÉREZ B, DOMÉNECH BELDA D, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(4): 287-294.
- [60] MA Y S, LI J B, HUANG S W, et al. Targeting pathway expression to subcellular organelles improves astaxanthin synthesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 152-161.
- [61] YUZBASHEVA E Y, TARATYNOVA M O, FEDYAEVA I M, et al. Large-scale bioproduction of natural astaxanthin in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2023, 21: 101289.
- [62] KANG W, MA T, LIU M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4248.
- [63] CHEN J, ZHANG R L, ZHANG G L, et al. Heterologous expression of the plant-derived astaxanthin biosynthesis pathway in *Yarrowia lipolytica* for glycosylated astaxanthin production[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(6): 2943-2951.
- [64] 花强, 汪丹妮, 韦柳静, 等. 一种生产虾青素的解脂耶氏酵母基因工程菌的构建方法: CN116497052A[P]. 2023-07-28.
- HUA Q, WANG D N, WEI L J, et al. A method for construction of genetic engineering strain of *Yersinia lipolis* for astaxanthin production: CN116497052A[P]. 2023-07-28.
- [65] ZHU H Z, JIANG S, WU J J, et al. Production of high levels of 3S,3'S-astaxanthin in *Yarrowia lipolytica* via iterative metabolic engineering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(8): 2673-2683.
- [66] HAMMER S K, AVALOS J L. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(8): 823-832.
- [67] YOKOYAMA A, ADACHI K, SHIZURI Y. New carotenoid glucosides, astaxanthin glucoside and adonixanthin glucoside, isolated from the astaxanthin-producing marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*[J]. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(12): 1929-1933.
- [68] KIM J H, KIM S H, KIM K H, et al. *Sphingomonas lacus* sp. nov., an astaxanthin-dideoxyglycoside-producing species isolated from soil near a pond[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt_9): 2824-2830.
- [69] CHANG J J, HO C Y, MAO C T, et al. A thermo- and toxin-tolerant kefir yeast for biorefinery and biofuel production[J]. *Applied Energy*, 2014, 132: 465-474.
- [70] BANAT I M, NIGAM P, MARCHANT R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1992, 8(3): 259-263.
- [71] RAIMONDI S, ZANNI E, AMARETTI A, et al. Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 34.
- [72] LIN Y J, CHANG J J, LIN H Y, et al. Metabolic engineering a yeast to produce astaxanthin[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 899-905.
- [73] YANG X X, WANG D M, HONG J. Carotenoid production from nondetoxified xylose mother liquid or corn cob hydrolysate with engineered *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128080.
- [74] 서용배, 이종규, 정태혁, 등. 대장균에서 고세균 샤페론을 이용한 아스타잔틴 생산능 향상을 위한 연구[J/OL]. *생명과학회지*, 2015, 25(12): 1339-1346[2023-09-01]. <http://koreascience.or.kr/article/JAKO201509651118178.page>.
- SEO Y B, LEE J K, JEONG T H, et al. Enhanced production of astaxanthin by Archaea chaperonin in *Escherichia coli*[J/OL]. *Journal of Life Science*, 2015, 25(12): 1339-1346[2023-09-01]. <http://koreascience.or.kr/article/JAKO201509651118178.page>.
- [75] JEONG T H, CHO Y S, CHOI S S, et al. Enhanced production of astaxanthin by metabolically engineered non-mevalonate pathway in *Escherichia coli*[J/OL]. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 2018, 46(2): 114-119[2023-09-01]. <https://www.mbl.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/mbl.1801.01007>.
- [76] 이재형, 서용배, 김영태. 대장균에서 이소프레노이드 생합성 경로의 대사공학적 개량에 의한 아스타잔틴의 생산성 향상[J/OL]. *생명과학회지*, 2008, 18(12): 1764-1770[2023-09-01]. <http://koreascience.or.kr/article/JAKO200805441024822.page>.

- LEE J H, SEO Y B, KIM Y T. Enhanced production of astaxanthin by metabolic engineered isoprenoid pathway in *Escherichia coli*[J]. Journal of Life Science, 2008, 18(12): 1764-1770[2023-09-01]. <http://koreascience.or.kr/article/JAKO200805441024822.page>.
- [77] LEMUTH K, STEUER K, ALBERMANN C. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 29.
- [78] LU Q, BU Y F, LIU J Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing astaxanthin as the predominant carotenoid [J]. Marine Drugs, 2017, 15(10): 296.
- [79] WU Y Q, YAN P P, LIU X W, et al. Combinatorial expression of different β -carotene hydroxylases and ketolases in *Escherichia coli* for increased astaxanthin production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46 (11): 1505-1516.
- [80] LI S, HUANG J C. Assessment of expression cassettes and culture media for different *Escherichia coli* strains to produce astaxanthin[J]. Natural Products and Bioprospecting, 2018, 8 (5): 397-403.
- [81] LU Q, LIU J Z. Enhanced astaxanthin production in *Escherichia coli* via morphology and oxidative stress engineering[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(42): 11703-11709.
- [82] LI D, LI Y, XU J Y, et al. Engineering CrtW and CrtZ for improving biosynthesis of astaxanthin in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(9): 666-676.
- [83] ZHANG M, GONG Z K, TANG J L, et al. Improving astaxanthin production in *Escherichia coli* by co-utilizing CrtZ enzymes with different substrate preference[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 71.
- [84] LV Y K, EDWARDS H, ZHOU J W, et al. Combining 26S rDNA and the cre-loxP system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(3): 568-576.
- [85] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [86] YE L J, ZHU X N, WU T, et al. Optimizing the localization of astaxanthin enzymes for improved productivity[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 278.
- [87] FU D X, LIBSON A, MIERCKE L J W, et al. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity[J]. Science, 2000, 290(5491): 481-486.
- [88] NEOPHYTOU I, HARVEY R, LAWRENCE J, et al. Eukaryotic integral membrane protein expression utilizing the *Escherichia coli* glycerol-conducting channel protein (GlpF) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 375-381.
- [89] KATSUMATA T, ISHIBASHI T, KYLE D. A sub-chronic toxicity evaluation of a natural astaxanthin-rich carotenoid extract of *Paracoccus carotinifaciens* in rats[J]. Toxicology Reports, 2014, 1: 582-588.
- [90] HONDA M, KAGEYAMA H, HIBINO T, et al. Efficient and environmentally friendly method for carotenoid extraction from *Paracoccus carotinifaciens* utilizing naturally occurring Z-isomerization-accelerating catalysts[J]. Process Biochemistry, 2020, 89: 146-154.
- [91] HONDA M, KAGEYAMA H, HIBINO T, et al. Improved carotenoid processing with sustainable solvents utilizing Z-isomerization-induced alteration in physicochemical properties: a review and future directions[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2149.
- [92] YANG S, ZHOU Q X, YANG L, et al. Effect of thermal processing on astaxanthin and astaxanthin esters in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Oleo Science, 2015, 64(3): 243-253.
- [93] YUAN J P, CHEN F. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-isomers in organic solvents[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(9): 3656-3660.
- [94] HONDA M, KAGEYAMA H, MURAKAMI K, et al. Isomerization of *Paracoccus carotinifaciens*-derived carotenoids (astaxanthin, adonirubin, and adonixanthin) under subcritical water conditions[J]. ACS Food Science & Technology, 2021, 1 (10): 1861-1868.
- [95] CHOUGLE J A, SINGHAL R S. Metabolic precursors and cofactors stimulate astaxanthin production in *Paracoccus* MBIC 01143[J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21 (6): 1695-1700.
- [96] 蹇华丽, 朱明军, 吴振强, 等. 环状芽孢杆菌胞壁溶解酶用于红发夫酵母虾青素提取的研究[J]. 高校化学工程学报, 2006, 20(1): 147-151.
- JIAN H L, ZHU M J, WU Z Q, et al. Extracting astaxanthin of *Phaffia rhodozyma* with lytic enzyme produced by *Bacillus circulans* A 1.383[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2006, 20(1): 147-151.
- [97] NI H, CHEN Q H, HE G Q, et al. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of Zhejiang University Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2008, 9(1): 51-59.
- [98] 欧阳琴, 陈兴才, 黄亚治. 雨生红球藻提取虾青素不同机械破壁方法的研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2005, 33 (1): 111-115.

- OUYANG Q, CHEN X C, HUANG Y Z. Study on extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by various mechanical methods[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Sciences Edition), 2005, 33(1): 111-115.
- [99] 邢涛, 张慧, 祁琳琳, 等. 从雨生球藻中提取虾青素的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2018(11): 169-174.
- XING T, ZHANG H, QI L L, et al. Study on the extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. China Food Additives, 2018(11): 169-174.
- [100] 高岩, 邢丽红, 孙伟红, 等. 不同来源虾青素提取、纯化及定量检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1414-1423.
- GAO Y, XING L H, SUN W H, et al. Research progress on extraction, purification and quantitative detection methods of astaxanthin from different sources[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(5): 1414-1423.
- [101] ANG F S, KHAW S Y, FEW L L, et al. Isolation of a stable astaxanthin-hyperproducing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through random mutagenesis[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2019, 55(3): 255-263.
- [102] 周锦珂, 李金华, 葛发欢, 等. 酶法提取雨生红球藻中虾青素的新工艺研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1423-1425.
- ZHOU J K, LI J H, GE F H, et al. Study on the new technology of enzymatic extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(9): 1423-1425.
- [103] LARROUDE M, CELINSKA E, BACK A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(2): 464-472.
- [104] GAO S L, TONG Y Y, ZHU L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 192-201.



通讯作者: 信丰学(1982—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为:①木质纤维素、厨余垃圾等废弃碳资源的生物降解与大宗化学品、生物燃料的合成;②CBP和精细化学品合成人工混菌体系的设计、构建与功能调控;③GRAS级安全酵母的开发和细胞工厂构建,尤其针对功能脂肪酸、胡萝卜素、虾青素等医药营养品。
E-mail: xinfengxue@njtech.edu.cn



通讯作者: 蒋羽佳(1991—),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向为可再生生物能源底盘细胞的开发与利用,低劣生物质高值化利用的人工多细胞体系构建及菌株间互作机制解析。
E-mail: jiangyujia@njtech.edu.cn



第一作者: 周强(2000—),男,硕士。研究方向为代谢工程及合成生物学。
E-mail: 2278766279@qq.com