

集胞藻 6803 中 S2P 同源基因 *sll0528* 在多种胁迫下的表达谱分析

陈谷, 王玉玲

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 为考察集胞藻 6803 中 S2P 同源蛋白 *sll0528* 的功能, 应用实时荧光定量 PCR 技术研究 *sll0528* 基因在各种胁迫条件下不同时间点的表达谱变化。结果表明: *sll0528* 在多种胁迫条件下被显著诱导, 根据表达谱特点不同可分为以下三组 (1) 对高光、双氧水、山梨醇和葡萄糖混养等胁迫的响应属于早期响应, 表达量诱导上调的峰值出现在 0.5 h 内, 前三者在 0.25h 分别上调约 10、80 和 100 倍, 后者在 0.5 h 上调 9 倍左右; (2) 对高温和低温胁迫的响应属于中期响应, 前者在 1 h 上调 30 倍, 后者在 2 h 显著上调 280 倍; (3) 对酸和盐胁迫的响应属于后期响应, 在 6 h 分别上调 90 和 190 倍。由此推断, *sll0528* 可能在响应多种外界环境胁迫中起到重要作用, 在不同的胁迫条件下可能参与了不同的信号转导途径从而诱导表达的峰值出现时间和数量有所不同。本研究结果为进一步探讨 *sll0528* 基因在胁迫条件下的生理功能及其作用的分子机制奠定了基础。

关键词: 集胞藻 6803; S2P 同源蛋白; *sll0528*; 胁迫响应; 实时荧光定量 PCR

文章编号: 1673-9078(2014)9-44-48

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.008

Expression Profile of S2P homolog gene *sll0528* in *Synechocystis* sp. 6803 under Multiple Stress Conditions

CHEN Gu, WANG Yu-ling

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To explore the functions of site-2 protease (S2P) homolog *sll0528* in *Synechocystis* sp. PCC 6803, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to detect the time-course expression profile of *sll0528* under multiple stress conditions. The results showed that *sll0528* was induced significantly under different stress conditions; however, stress induction patterns were different and could be classified into three groups. The first group included early response, i.e., *sll0528* promptly responded to stress conditions such as exposure to high intensity light, hydrogen peroxide, sorbitol, and glucose mixotrophic condition, where maximal induction occurred within 0.5 h. The expression level increased by 10-, 80-, and 100-fold at 0.25 h when induced by high intensity light, hydrogen peroxide, and sorbitol, respectively, whereas glucose mixotrophic condition increased the expression level by approximately 9-fold after 0.5 h of treatment. The second group included mid-stage response, which was induced by low and high temperature. High temperature stress increased the expression level by 30-fold after 1 h of treatment, whereas low temperature stress significantly increased the expression level by 280-fold after 2 h of treatment. The third group included late response induced by acid and salt stress, which increased the expression level by 90- and 190-fold, respectively, after 6 h of treatment. Taken together, it could be inferred that *sll0528* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 might play an important role in multiple stress responses. Under different stress conditions, this gene might participate in different signal transduction pathways and showed an expression peak at different levels and at different time-points. These results provide fundamental knowledge for further research to characterize the function and mechanisms of *sll0528* in stress response.

Key words: *Synechocystis* sp. PCC 6803; *sll0528*; stress condition; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

蓝藻作为地球上最古老的能进行光合自养的原核生物, 其体内含有一系列高价值的生物活性物质, 近

收稿日期: 2014-03-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31270085)

作者简介: 陈谷 (1973-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 分子生物学与微生物生理生化

年来被广泛用于生产保健食品, 药品和生物能源等。然而目前为止, 蓝藻大规模的市场应用受到限制, 主要是因为蓝藻广泛分布于自然环境中, 易于受到各种外界胁迫的影响。因此, 了解蓝藻的胁迫响应机制对于蓝藻的大规模培养和高值化利用具有重要意义。集胞藻 PCC6803 是一种单细胞, 无毒性的淡水蓝藻, 因

其具有基因组和代谢较为简单,生长周期短,易于转化等特点,故常被认为是研究蓝藻胁迫响应的模式生物。过去的研究表明,集胞藻响应变化的环境条件是通过上调或下调一系列功能基因的表达来实现的^[1],但这些功能基因是如何通过信号转导而被调控的至今还有很多谜团。因此研究胁迫响应下的信号转导机制对于阐明胁迫响应机理十分重要。

受控的膜内蛋白水解(Regulated intramembrane proteolysis, RIP)介导胞外功能 σ 因子活化是细菌中一类胁迫响应的保守机制^[2]。当环境压力超过一定的阈值时,生物体会感知环境变化, Anti-sigma 因子首先通过一位蛋白酶(site-1 protease, SIP)初次剪切而暴露出活性位点,紧接着又被膜内的锌金属蛋白酶,即二位蛋白酶(site-2 protease, S2P)剪切而释放胞外功能 σ 因子,最终通过激活一系列响应基因的转录、合成特定蛋白、生成特定代谢物来应对胁迫^[3]。因此, S2P 介导的 RIP 被认为是逆境胁迫响应的重要信号转导途径。目前为止, S2P 家族蛋白酶介导的跨膜信号传导被发现存在于多种生物体中,从细菌到人类都广泛存在,如人的 S2P 和大肠杆菌的 RseP,提示其重要而保守的功能^[3]。

集胞藻 6803 中发现有四个 S2P 同源蛋白 sll0528、slr0643、sll0862 和 slr1821^[4],这些 S2Ps 在跨膜区均含有高度保守的 HExxH 和 NxxPxxxLDGG 基序。我们前期的研究工作发现 slr0643 参与弱酸胁迫响应^[4],而 sll0862 与氧化和热胁迫响应相关^[5]。搜索文献发现多组的芯片分析结果揭示, sll0528 受多种环境胁迫条件诱导表达^[4,6-8],提示 sll0528 在集胞藻对逆境胁迫的应答中可能起重要作用。为了进一步研究该基因在逆境胁迫应答中的表达模式,我们系统地考察葡萄糖混合营养、高光、高盐、高渗、低温、高温、酸、氧化胁迫等条件下, sll0528 在不同时间点表达谱的变化,并分析 sll0528 基因在几种胁迫条件下的表达规律,为进一步研究 sll0528 基因参与胁迫响应的分子调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和培养条件

1.1.1 实验材料

集胞藻 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 购自 ATCC, 生长于 BG11 培养基中(含 20 mM HEPSE, pH7.5), 置 30 °C, 20 μ E/(m²·s)连续光照, 140 r/min 摇瓶培养。初始接种 OD₇₃₀ 值为 0.1 的藻液, 连续生长 5 d 左右至对数生长期, 开始胁迫处理。

胁迫处理方法如下: 高光胁迫是在 200 μ mol photons/(m²·s)光强下培养; 葡萄糖混养胁迫是添加终浓度 2.5 mM 葡萄糖并光照培养; 氧化胁迫是添加 5 M H₂O₂; 渗透胁迫是添加 5 M 山梨醇; 高温胁迫是于 45 °C 水浴加热; 低温胁迫是将正常生长的集胞藻转移至 4 °C 冰箱中, 光照培养; 酸胁迫是添加终浓度 20 mM pH 6.5 HEPES 缓冲液; 盐胁迫是添加终浓度 5% 的 NaCl。八种胁迫均在处理 0、0.25、0.5、1、2、4、6 h 时分别取 30 mL 样品。离心收集样品, 经 TE (pH 8.0) 洗涤后, 立即用液氮速冻置于 -80 °C 保存备用。

1.1.2 试剂与仪器

主要试剂: RNA 试剂盒购自东盛; DNase I 和一步法 RT-PCR 试剂盒均购自大连宝生物; 常规试剂和药品均为分析纯, 购于广州卯林化工有限公司;

主要仪器: 恒温摇床(培英); 4 °C 冰箱(万宝); 水浴锅(海门); 低温超速离心机(Beckman), 超速离心机(Eppendorf), 二级生物安全柜(苏州净化), 凝胶成像系统(Gene), ABI7500 荧光定量 PCR 仪(ABI)。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计和内参基因的选择

在 Cyanobase 数据库中 (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>) 获取 sll0528 基因序列, 用 primer5 设计引物后再导入二级结构网站中查询, 最终选择特异性好、无二级结构的引物, 由上海英骏生物技术广州分公司合成。集胞藻中 mpB 基因编码核糖核酸酶 P 的亚基, 在不同的生长环境下表达量恒定, 因此被选作内参基因。

表1 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers

ORF	引物序列 (5'-3')	扩增子大小
sll0528	5'-GGAAGCCTTTACTGCTGAAGAT-3'	137
	5'-TGTCGGCACCAATAACCAAG-3'	
rnpB	5'-CCACTGAAAAGGGTAAGGG-3'	98
	5'-CTCCGACCTTGCTTCCA-3'	

1.2.2 RNA 提取及纯化

集胞藻总 RNA 提取方法参考东盛细菌/细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书, 同时用 DNase I (RNase free, Takara) 进行基因组 DNA 的去除, 最终 RNA 保存于 -80 °C。取 500 ng 以 1% 的非变性琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 的完整性, 并运用紫外分光光度法检测样品的纯度。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量PCR使用一步法SYBR GreenI试剂盒 (TAKARA)。反应体系为: 10 μ L 2 \times one step SYBR RT-PCR Buffer, 0.8 μ L正向和反向引物 (0.4 μ M), 0.8 μ L Prime Script one-step enzyme mix, 0.4 μ L 50 \times ROX Reference Dye, 4 μ L模板RNA, 最后补足ddH₂O (RNase-free) 至总体积20 μ L。

反应程序: 反转录 (42 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s); 扩增和定量程序重复40个循环 (95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s); 溶解曲线 (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s)。

1.2.4 数据分析

每个样品设3个生物学重复和三次技术重复, 以0h为参考进行相对定量。ABI7500 SDS 4.0版软件采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析, 确定基因的相对表达量。其中 $\Delta\Delta C_t = (\text{待测组目的基因}C_t\text{值} - \text{待测组内参基因}C_t\text{值}) - (\text{对照组目的基因}C_t\text{值} - \text{对照组内参基因}C_t\text{值})$ 。

运用SPSS 9.0软件进行数据统计分析并作图。显著性检测采用LSD法, $p < 0.05$ 为显著差异, $p < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 早期响应胁迫

高光胁迫 (200 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$), *sll0528* 在 15 min 时上调 10 倍左右 (图 1a), 这与 Huang^[6]等芯片实验结果基本一致。前人研究表明, 高光作用会对机体产生光伤害, 蓝藻中由于捕光系统吸收了过多的光能量, 超过细胞进程的能量消耗, 由多余的能量产生活性生物氧 (ROS), 导致细胞成分严重的光损伤。ROS 引起光合系统 PSII 复合体中 D1 蛋白失活后被水解, 使 PSII 缺少 D1 蛋白; 在恢复阶段 D1 蛋白的前体被重新合成, 整合到 PSII 复合体中, 接着被加工产生有活性的 D1 蛋白, 从而产生有活性的 PSII 复合体。光伤害的程度依赖于 PSII 复合体的失活和修复过程的平衡。光合作用机体对高光形成了多种适应机制, 来维持能量供给 (光捕获和电子转移) 和消耗 (细胞代谢) 之间的平衡, 从而保护光合作用元件免受光伤害^[9]。Huang^[6]等芯片实验结果表明, 高光胁迫 (300 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 15 min) 条件下, PSII 反应中心 D1 蛋白 (psbA2、psbA3), NAD(P)H 脱氢酶 (ndhF3、ndhd2、ndhd3、ndhK 等), 热胁迫蛋白 (dnaK、htpG、hsp17、clpB), 脂肪酸去饱和酶 (desA、desB), 活性生物氧清除酶 (sodB, 谷胱甘肽过氧化酶), FtsH, 氯化酶以及其他的一些基因均显著上调, 之后随时间延长而下调, 其变化规律与 *sll0528* 表达谱类似, 因此 *sll0528* 响应高光胁迫早期可能与这些基因的调控有

关。

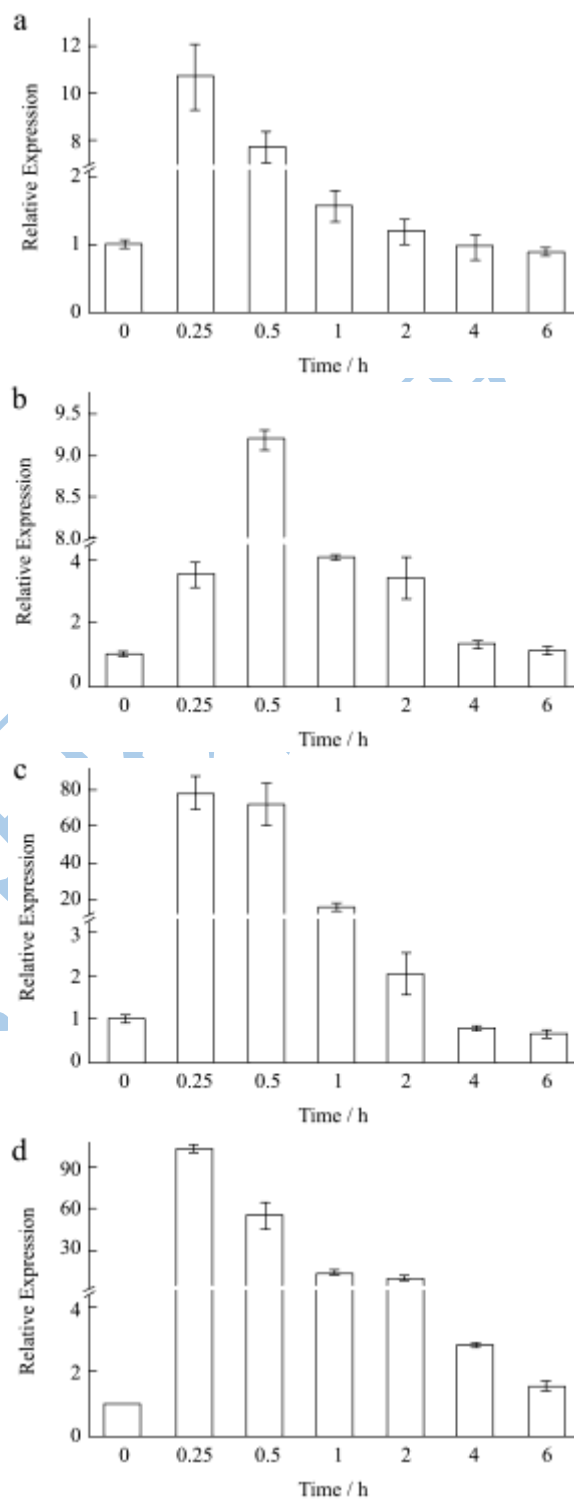


图 1 *sll0528* 早期响应胁迫

Fig.1 Stress conditions that *sll0528* responded at early time points

注: a: 高光; b: 葡萄糖混合营养; c: 氧化胁迫; d: 渗透胁迫。

葡萄糖混合营养胁迫 (2.5mM glucose), 15 min 时 *sll0528* 上调表达, 30 min 时上调到 9 倍左右, 随后逐渐下降, 6 h 时恢复至初始水平 (图 1b)。由光合自

养转至葡萄糖混合营养条件下, OPP 和 TCA 等糖代谢途径增加, 呼吸作用增加, 光合作用(尤其是卡尔文循环)减少。有研究表明: 外源葡萄糖能影响质醌库和PSI反应中心P700的氧化还原状态及细胞的呼吸活性, 从而影响了光合作用的电子传递。因此, *slI0528* 响应葡萄糖可能与光合作用有关。

氧化胁迫(5 mM H₂O₂), *slI0528* 在 15 min 上调 80 倍左右, 30 min 时维持在较高水平, 4 h 后恢复到初始水平(图 1c), 这一结果与 Kanesaki 等^[7]报道的研究结果基本一致。除此之外, 渗透胁迫下 SigH 也上调 3.9 倍左右^[10]。因此, 有可能 *slI0528* 调控 sigH 响应渗透胁迫, 这一可能性有待进一步的研究。

渗透胁迫(5 M 山梨醇), *slI0528* 在 15 min 迅速上调至 100 倍左右, 6 h 后恢复到初始水平(图 1d)。已有研究发现, *slI0528* 响应山梨醇诱导的渗透胁迫是一个快速的过程^[1, 8, 11], 但文献中报道的 *slI0528* 表达量的变化倍数与本研究结果不尽相同, 可能是由于藻株和生长条件不一致造成的。在水通道蛋白基因 *aqpZ* 的缺失突变体中, *slI0528* 的渗透诱导表达显著下降, 提示经由水通道蛋白 *aqpZ* 实现的细胞渗透萎缩, 是 *slI0528* 出现渗透诱导表达的前提, 即 *slI0528* 感知的是细胞萎缩的信号而非胞内外的渗透压差异。

以上这些研究结果表明, 集胞藻中 *slI0528* 基因对高光、葡萄糖混养、氧化和渗透等胁迫的响应较快, 均在短时间内迅速响应, 诱导表达峰值出现在 0.25~0.5 h, 提示 *slI0528* 基因可能在集胞藻抵抗高光、葡萄糖混养、氧化和渗透胁迫的早期起重要调控作用, 很可能是初级做出响应的基因。另外, 对比 *slI0528* 基因诱导表达量, 氧化与渗透胁迫下有百倍的增长而高光和混养条件下仅有近十倍的增长, 提示同样是早期响应, 这两类增长量相差悬殊的胁迫响应中, *slI0528* 有不同的功能和机理。

2.2 中期响应胁迫

集胞藻是一种嗜温性的蓝细菌, 最适生长温度是 32 °C, 在 15 °C 到 45 °C 范围内均可生长, 但低于 25 °C 或高于 43 °C 会感受到胁迫信号。实时荧光定量 PCR 结果表明, 在温度急剧变化的诱导下, *slI0528* 基因持续上调, 峰值出现在 1~4 h 之间。

高温胁迫(45 °C), *slI0528* 在 15 min 开始明显上调, 1 h 达到 30 倍左右, 6 h 后缓慢下降至 20 倍左右(图 2a)。高温胁迫影响 PSII 活性, 在胁迫响应 1 h 内主要诱导普遍的胁迫响应基因, 包括热胁迫蛋白(如 *clpB1*、*cpcC2*、*hspA*、*htpG*、*slr1674* 等)可能影响了初期 PSII 的热稳定性, 而 *cpcC2*、*hik34*、*hspA* 和 *hypA1*

可能影响了 PSII 长期的热胁迫适应^[10]。因此, 有可能 *slI0528* 响应高光胁迫与 PSII 的稳定性调节有关。

低温胁迫(4 °C), *slI0528* 在 15 min 开始上调, 2 h 急剧上调达到峰值约 280 倍左右, 6 h 后逐渐下降到 150 倍左右(图 2b), 这说明极端的冷环境显著诱导 *slI0528* 的表达。有报道 22 °C 下 30 min 与 42 °C 下 10 min 时 *slI0528* 表达上调数倍, 与我们结果一致^[12]。该研究还提示, 在敲除脂肪酸去饱和酶导致膜脂硬化的突变体 *desA::desD* 中, *slI0528* 的冷诱导表达有数倍的增强, 但其热诱导性没有变化^[12]。图中 4 °C *slI0528* 的诱导表达量比 45 °C 时 *slI0528* 的诱导量大许多倍, 提示高温与低温胁迫中 *slI0528* 不同的作用机理。

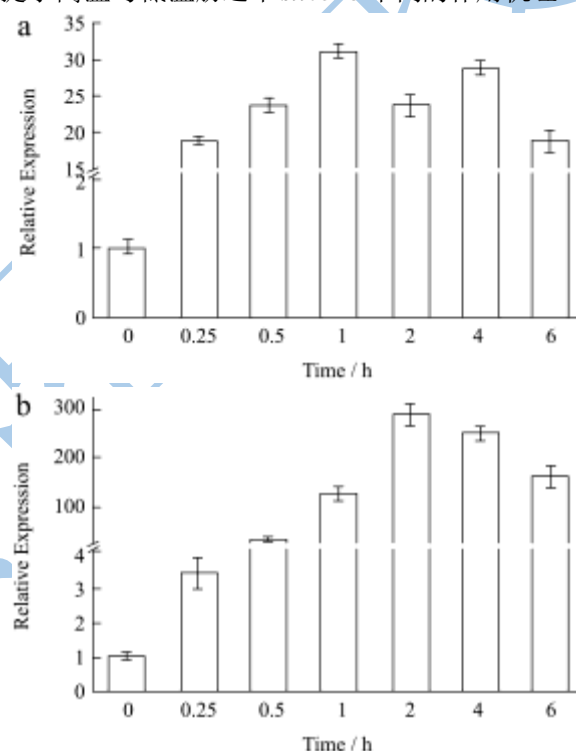


图 2 *slI0528* 中期响应胁迫

Fig.2 Stress conditions that *slI0528* responded at middle time points

注: a: 高温; b: 低温。

2.3 后期响应胁迫

酸胁迫(pH6.5), *slI0528* 的表达量在 30 min 开始上升, 1 h 后表达量显著上升, 6 h 基因表达量达到最高水平, 约为处理前的 90 倍(图 3a)。有研究表明, *slI0528* 在 pH3 30 min 处理时表达上调约 37 倍, 趋势与我们相符, 更大的表达上调可能源于更低的 pH^[13]。有趣的是, 该研究还发现 *slI0528* 的酸诱导性在 SphR 反应调控因子的缺失突变体中完全消失, 暗示 *slI0528* 参与酸胁迫响应时位于双组份系统 SphS-SphR 的下游。

盐胁迫 (5% NaCl), *slI0528* 的表达量在 15 min 开始升高, 4 h 明显上升至约 50 倍, 6 h 达到约 190 倍左右(图 3b)。Marin 等的研究表明 684 mM NaCl 时, *slI0528* 在 6 h 内有数十倍的上调, 与我们结果一致^[14]。但是他们没有观察到 *slI0528* 缺失突变体的耐盐性有下降, 提示 *slI0528* 并非盐胁迫唯一的调控蛋白, 或者它的功能可以为其它的 S2P 蛋白所替代。另一个 S2P 蛋白基因 *slr1821* 的表达在盐胁迫下也有显著的上升 (未发表的数据), 证实存在这种可能性。

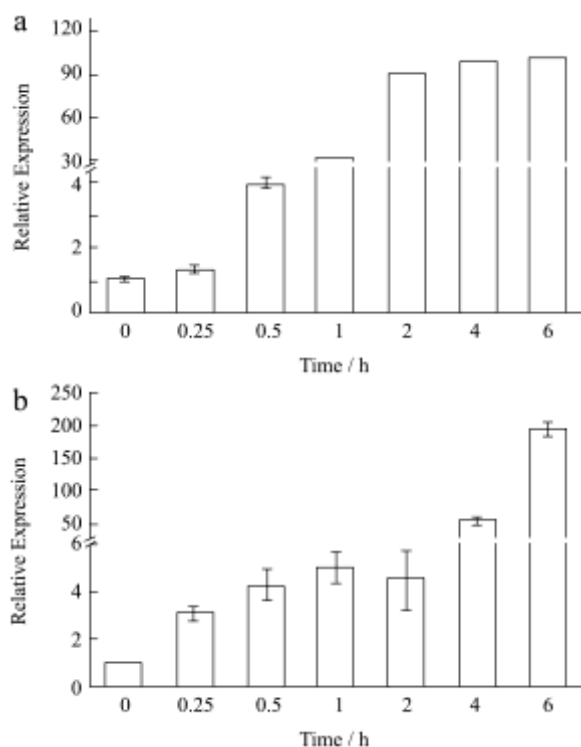


图 3 *slI0528* 后期响应胁迫

Fig.3 Stress conditions that *slI0528* responded at later time points

注: a: 酸胁迫; b: 盐胁迫。

以上结果说明, 不同于前面六种胁迫处理, 弱酸胁迫和盐胁迫条件下 *slI0528* 表现出峰值滞后的诱导表达模式, 即在胁迫初期表达量未有明显变化, 但随着时间的推移表达量持续升高, 到了胁迫处理后期才达到最大值。由此可见, 集胞藻中 *slI0528* 基因可能参与了酸胁迫和盐胁迫后期及长期响应的调控。

3 结论

本研究通过实时荧光定量 PCR 技术对集胞藻 *slI0528* 基因在不同胁迫条件下的表达情况进行了检测, 并探讨了 *slI0528* 基因在几种胁迫条件下的表达规律。研究结果发现, *slI0528* 对葡萄糖混养, 高光, 氧化和渗透胁迫响应较快, 低温和高温胁迫属于中期响应, 而酸和盐胁迫属于后期响应。本文揭示了 *slI0528* 在各种逆境

胁迫下可能具有重要功能, 为最终阐明集胞藻逆境适应机制奠定了良好的基础, 也对开发微藻可再生能源和生物活性物质^[15]具有重要意义。

参考文献

- [1] Shapiguzov A, Lyukevich A A, Allakhverdiev S I, et al. Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmotic stress-inducible gene expression [J]. *Microbiology*, 2005, 151(2): 447-455
- [2] Staron A, Sofia H J, Dietrich S, et al. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family [J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(3): 557-581
- [3] Chen G, Zhang X. New insights into S2P signaling cascades: Regulation, variation, and conservation [J]. *Protein Science*, 2010, 19(11): 2015-2030
- [4] Zhang X, Chen G, Qin C, et al. Slr0643, a S2P homolog, is essential for acid acclimation in *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Microbiology*, 2012
- [5] 曾小琳, 闻盼盼, 陈谷. 集胞藻 PCC6803 中 S2P 同源蛋白基因 *slI0862* 缺失突变株对热胁迫与氧化胁迫的响应 [J]. *微生物学报*, 2012, 52(5): 594-601
ZENG Xiao-lin, WEN Pan-pan, CHEN Gu. Stress response of *Synechocystis slI0862* mutant to heat shock and oxidative stress [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(5): 594-601
- [6] Huang L X, Mccluskey M P, Ni H, et al. Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(24): 6845-6858
- [7] Kanesaki Y, Yamamoto H, Paithoonrangarid K, et al. Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *The Plant Journal*, 2006, 49(2): 313-324
- [8] Kanesaki Y, Suzuki I, Allakhverdiev S I, et al. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(1): 339-348
- [9] Muramatsu M, Hihara Y. Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses [J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(1): 11-39
- [10] Singh A K, Summerfield T C, Li H, et al. The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC

- 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB [J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(4): 273-286
- [11] Paithoonrangsarid K, Shoumskaya M A, Kanesaki Y, et al. Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(51): 53078-53086
- [12] Inaba M, Suzuki I, Szalontai B, et al. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(14): 12191-12198
- [13] Uchiyama J, Asakura R, Kimura M, et al. Slr0967 and Slr0939 induced by the SphR response regulator in *Synechocystis* sp. PCC 6803 are essential for growth under acid stress conditions [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2012, 1817(8): 1270-1276
- [14] Marin K, Kanesaki Y, Los D A, et al. Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 [J]. Plant Physiology, 2004, 136(2): 3290-3300
- [15] 王冬琴,谭瑜,卢虹玉,等.微藻生物活性物质在食品工业中的应用进展[J].现代食品科技,2013,29(5):1185-1191
WANG Dong-qin, TAN Yu, LU Hong-yu, et al. Application of microalgal bioactives in food industry [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1185-1191

现代食品科技