

雨生红球藻虾青素积累机制的研究进展

Review of astaxanthin accumulating mechanism in *Haematococcus pluvialis*

滕长英¹, 张立¹, 缪静¹, 秦松²

(1. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 中国科学院 海洋研究所 开放实验室, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q77

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)12-0077-05

虾青素(astaxanthin)是一种具有极强抗氧化活性的类胡萝卜素,超强的抗氧化活性赋予了虾青素突出的生理功能,如提高动物免疫力、抑制肿瘤、清除自由基和活性氧等。虾青素具有广泛的应用价值,不仅可以用作水产养殖的饵料添加剂、人的食品添加剂,在药品、化妆品和高级营养保健品等领域也有非常大的应用潜力。

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种单细胞淡水绿藻,在分类学上属于绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、团藻目(Volvocales)、红球藻科(Haematococcaceae)、红球藻属(*Haematococcus*)。雨生红球藻在多种不适宜生长的外界环境条件下都会在细胞核周围的细胞质基质中加速积累次生类胡萝卜素^[1],其中80%以上为虾青素及其酯类^[2]。雨生红球藻中虾青素的积累量可高达细胞干质量的4%,是其他生物虾青素合成积累量的一到几个数量级,是目前首选的天然虾青素合成生物。但虾青素的大量积累总是发生在不适于生物量积累的环境胁迫条件下,虾青素积累与生物量积累之间的矛盾是限制利用红球藻高效生产虾青素的根本问题。

近年来,国内外从与虾青素合成有关的诱导条件、红球藻细胞的光合变化、细胞形态变化、显微结构变化、生化指标以及合成酶表达的分子调控等方面进行了分析研究,目前已经有大量相关的实验报道。下面分别从几个方面对目前所取得的进展做一综述。

1 雨生红球藻积累虾青素的条件

1.1 光照

光照是红球藻诱导虾青素大量积累最重要的因子,高强度光照下虾青素的合成会得到促进。Boussiba和Vonshak在实验中观察到,在高光照强度(8 500 lx)下,虾青素的积累量可达65 pg/个细胞,而在较低的光照强度下(4 000 lx),每个细胞中平均仅有8 pg的虾青素积累^[3]。他们同时也观察到,虾青

素的加速合成总是伴随着细胞分裂速度的下降,虾青素开始积累的时间也正是细胞分裂开始减速的时间。因此他们认为,强光照条件下虾青素的积累可能与不适宜的光照引起的细胞分裂减少有关。

许多研究者认为,红球藻中虾青素大量合成的诱发因子可能是光合反应引起的氧胁迫,而不是光本身^[4,5]。一般认为,红球藻中虾青素合成所需的适宜光照强度为7 000~14 000 lx^[3],而红球藻细胞在自营生长时其生物量增长适宜的光照强度为2 500~4 500 lx^[6]。

尽管高光照强度是虾青素合成的重要因子,但光照并不是虾青素合成的必要条件,在异养条件下没有光照条件它也能以较慢的速度合成虾青素^[7]。

1.2 温度

红球藻适宜的生长温度为20℃左右,提高温度有利于红球藻中虾青素的积累^[6]。Borowitzka等^[8]观察到红球藻在15℃时基本上全部表现为绿色的游动细胞;培养温度升高到25℃时,有部分细胞转化成积累大量虾青素的红色厚壁孢子;而在28℃培养20 d,细胞即全部转化成了厚壁孢子。Tjahjono等^[9]认为高温促进了活性氧的产生,而活性氧最终有利于虾青素的高积累。另外也可能是较高的培养温度抑制了红球藻细胞的正常分裂生长,从而使虾青素的相对含量提高。

1.3 营养盐

在雨生红球藻的培养中,氮的缺乏会引起红球藻

收稿日期:2006-04-30;修回日期:2006-09-10

基金项目:中国科学院知识创新方向性项目(KZCX-SW-215)

作者简介:滕长英(1975-),女,博士,讲师,研究方向:藻类分子生物学与基因工程,电话:13220936532, E-mail: lzhangt@sina.com

中虾青素的大量积累。如 Borowitzka 等^[8]在实验中观察到,红球藻的绿色游动细胞在含 0.01 g/L 的 KNO_3 培养基中培养 10 d 即全部转变成红色细胞;而在 0.1 g/L 的 KNO_3 浓度下,38 d 时才有部分红色细胞形成。虾青素的合成量与氮的含量密切相关,如在 Orosa 等^[11]的实验中,在 0、0.15、0.25、0.5 g/L 等不同 NaNO_3 浓度下每个细胞中的虾青素合成量分别为 24.5、5.5、0.6 和 0 μg 。但 Boussiba 等^[3]认为虾青素合成不能没有氮,这很可能是反应在红球藻细胞为支持虾青素的大量积累而连续合成蛋白质对氮的需要上。

合成类胡萝卜素的前体化合物(如甲羟戊酸盐、丙酮酸盐)对虾青素的合成起促进作用。当向红球藻生长相中加入或多或少的醋酸盐时,会很快诱导运动细胞向厚壁孢子转变并加速积累虾青素,但醋酸盐的浓度对虾青素的合成量影响不大^[6,8]。醋酸盐对虾青素积累的促进作用分别受到 DNA 转录和蛋白翻译抑制剂放线菌素 D 和放线菌酮的阻抑,说明醋酸盐的这种调控作用发生在虾青素合成酶的基因转录水平上^[5]。仅在红球藻的生长相添加醋酸盐会诱导细胞形成富含虾青素的厚壁孢子;当醋酸盐与高浓度的硝酸盐一同加入时,红球藻内虾青素的合成受到剧烈抑制,这表明虾青素的合成可能受到碳氮比的影响^[7]。

二价铁离子能够加强醋酸盐对虾青素合成的促进作用,这种促进作用不要求蛋白质的从头合成,推测其机理可能是由于 Fe^{2+} 的加入引起虾青素合成酶系活化,但这种促进作用受到自由基 $\text{HO}\cdot$ 的猝灭剂 KI 的抑制,从而暗示着 Fe^{2+} 对虾青素合成的促进作用可能需要通过铁催化的 Fenton 反应产生的羟基自由基来实现^[5]。

Borowitzka 等^[8]的实验证明,高磷促进虾青素的合成。在该实验的 5 个不同磷浓度处理组中,最低磷浓度处理组在培养 45 d 中始终没有红色细胞产生,其余组磷浓度越高其虾青素合成越早且红色细胞比例越大,其中在 0.2 g/L 的磷浓度下处理 10 d 红球藻即已全部转化成红色细胞。在所有 5 组处理中,细胞的分裂速度和最终细胞的产量是没有区别的,因此,高磷对虾青素积累的促进作用与细胞分裂速度无关。但是 Boussiba 等^[3]的实验结果却表明:磷缺乏时会引起虾青素的积累,尽管在此胁迫条件下细胞分裂停止,但这种积累可以一直持续到细胞停止分裂后 21 d,说明在此条件下虾青素的积累可能不仅与细胞的停止分裂有关。对这两种相互矛盾的实验结果目前还没有可信的解释。

一定浓度(0.8%~1%)的 NaCl 有利于虾青素的合成^[3,8]。但在虾青素的合成同时,伴随着细胞分裂的停止,因而,NaCl 可能是通过阻止细胞的分裂来

间接影响虾青素的含量的。

1.4 活性氧

很多实验表明红球藻中虾青素的合成与体内的活性氧基团有关。在 Kobayashi 等^[5]的实验中 4 种活性氧的产生试剂皆能替代 Fe^{2+} 增强醋酸盐对虾青素合成的促进作用,活性氧清除剂的加入能够抑制这种促进作用,该实验直接证明了活性氧能促进红球藻中虾青素的合成,但这一促进作用是直接导致虾青素的积累还是一种间接效果,该实验没有给出证据。也有大量的实验可以作为活性氧与虾青素合成有关的间接证据,即诱导虾青素积累的多种环境胁迫可以同时诱导产生活性氧,如高光强^[3],干燥^[10],高盐^[12],高温^[9]等。众多研究者认为虾青素的合成是红球藻细胞对逆境产生的氧胁迫的适应反应。Kobayashi 等^[5]的实验中富含虾青素的厚壁细胞比虾青素含量较低的游动细胞更能忍耐过量的活性氧,这从另一方面提示了虾青素可能是应氧胁迫而产生的。

1.5 细胞分裂抑制剂

Boussiba 和 Vonshak^[3]为了分析红球藻的细胞分裂与虾青素积累之间的关系,研究了细胞分裂抑制剂长春碱对虾青素积累的影响。结果表明,在 2 mg/L 和 5 mg/L 的浓度处理下细胞分裂完全被抑制,随后 1~2 d 单个细胞中虾青素的含量也随即开始上升。

1.6 其它因素

除以上各影响因素外,干燥^[10]、机械胁迫^[13]等也会促进虾青素的积累。

2 虾青素积累的生理机制

2.1 虾青素积累与光合保护

雨生红球藻虾青素积累机制的理论假设中,影响最大的是光保护学说^[14,15]。这一学说认为虾青素的产生是雨生红球藻这一生物体对自身进行光保护的防御反应。

Kobayashi 等的研究小组支持这一学说,他们的证据主要来自于下面的实验结果:虾青素能够清除光合过程中产生的大量活性氧,从而保护光合器官和光合色素免受氧自由基的破坏。红球藻中虾青素的主要存在形式——虾青素酯无论是在疏水还是亲水环境下皆具有很强的抗氧化活性^[14]。他们又比较了含大量虾青素的红色厚壁孢子与含少量虾青素的绿色细胞对 UV-B 的忍耐力,结果表明:前者抵制 UV-B 的能力比后者强 6 倍;被虾青素合成抑制剂 Norflurazon 降低虾青素含量的厚壁孢子对 UV-B 的抵制能力下降了 30%~50%;并且在 UV-B 辐照过程中虾青素的含量下降。因而,他们认为虾青素在红球藻中通过消除光辐射产生的活性氧对光合器官起保护作用

用^[15]。在其他生物体中类胡萝卜素能够通过猝灭光合过程中产生的氧自由基而起到光保护作用,但这种作用要求猝灭剂与光敏色素之间的近距离接触,也就是类胡萝卜素必须是存在于光合色素膜上。但雨生红球藻中虾青素是直接分布在细胞质中的脂质体中而非叶绿体膜上,是否是光合器官中产生的高浓度的活性氧分子能够跨过生物膜释放到细胞质中,在细胞质中再由虾青素完成活性氧的熄灭,目前还没有直接的实验证明。

此外,还存在另一光保护理论。在红球藻细胞中随着虾青素的积累,其聚集而成的色素颗粒逐渐增多,并相互融合而增大体积,色素沉积的部位也由最初的核周围向四周扩展直至占据细胞的大部分区域^[31]。虾青素的这种扩散作用导致其对杯状载色体的遮光增强,从而防止光抑制发生,使红球藻细胞具有更强的耐高光强能力。

2.2 虾青素合成与细胞分裂和细胞形态

Boussiba 和 Vonshak^[3]在实验中发现抑制细胞分裂的环境因素和细胞分裂抑制剂对单个细胞中虾青素的积累量皆有明显的影响,因而他们认为虾青素积累的诱导总是发生在细胞分裂受到干扰时,细胞分裂速度的降低是红球藻中虾青素合成的必要前提。但 Lee 和 Ding^[16]认为,红球藻中虾青素的积累只是其细胞分裂速率低于虾青素累积速率而导致的单个细胞中虾青素绝对量增加的结果。

虾青素的积累曾被认为与厚壁孢子的形成密切相关^[3,8],但大量实验证明红球藻细胞中虾青素的合成也可以发生在细胞的活跃生长期,且其运动细胞能以与不动细胞同样快的速度合成虾青素。由于运动细胞积累虾青素的速率较细胞分裂慢,因而在培养过程中这些细胞内的虾青素含量逐步降低。这种现象通常被错认为成红球藻运动细胞不合成虾青素的证据。在显微镜下所看到的运动细胞中所具有的色素颗粒^[31]也是一个很好的证据。

因此可以说,红球藻中虾青素的合成并不依赖于细胞分裂的停滞、厚壁孢子的形成以及细胞运动能力的丧失,只是在大多数情况下,在没有运动能力,且分裂速度极低的细胞中,尤其是当这种细胞发展到后期即厚壁孢子期,由于虾青素在单个细胞内的长期积累导致了肉眼可见的明显的特征。

3 虾青素在雨生红球藻中的生物合成途径

近年来,通过使用特异性抑制剂^[17],已经阐明了红球藻中虾青素的生物合成途径,并克隆了途径中的关键酶基因^[18~20,25]。该合成途径一般由丙酮酸盐和 3-磷酸甘油醛从头合成,先形成五碳的异戊烯焦磷酸(IPP),再转化成同分异构体的二甲基丙烯焦磷酸(DMAPP)。由三分子的 DMAPP 和一分子的 IPP

经三步缩合反应形成廿碳的 GGPP。在八氢番茄红素合成酶(PSY)的作用下,2 分子的 GGPP 缩合形成四十碳的八氢番茄红素。八氢番茄红素在八氢番茄红素去饱和酶(PDS)和 ζ -胡萝卜素去饱和酶(ZDS)的催化下,经 4 步脱氢去饱和反应形成番茄红素。番茄红素在番茄红素 β 环化酶的作用下,进一步环化后形成 β -胡萝卜素。 β -胡萝卜素 C3, C3' 和 C4, C4' 分别经过羟基化和酮基化最终形成虾青素。 β -胡萝卜素可以先在 C-3, 3' 位羟基化形成中间产物 β -隐黄质和玉米黄素,再在 C-4 位氧化形成中间产物 3-二羟基-2-酮- β -胡萝卜素,进一步氧化最后形成虾青素。 β -胡萝卜素也可以先在 C-4, 4' 氧化形成中间产物海胆酮和角黄质,再在 C-3 位羟基化形成中间产物 4-二酮-3-羟基- β -胡萝卜素,进一步将在 C-3 位羟基化形成虾青素。

IPP 异构酶 (IPI) 催化 IPP 向其同分异构体 DMAPP 的转化,在高等植物中该过程是类胡萝卜素合成的一个限速步骤^[21]。Sun 等^[22]在红球藻中分离到了该酶的两个序列不完全相同的 cDNA 克隆,它们分别编码大小为 34 ku 和 32.5 ku 的多肽,其中只有 32.5 ku 多肽的表达量能够被强光诱导,且在厚壁孢子中可见,而较大的多肽既不能被强光诱导,也不存在于厚壁孢子中,因而推测是前者参与了细胞质脂质中虾青素的合成。类胡萝卜素生物合成途径中的第一个特征反应是由八氢番茄红素合成酶(PSY)完成的,已从红球藻中克隆到了该酶的具有完整编码框的 cDNA 序列 (GenBank 序列号: AF305430)^[23]。它的氨基酸序列和蓝藻、高等植物中具有同样功能的 CrtB 很类似,都有两个相同的保守序列。与细菌 CrtB 氨基酸序列相比较,发现红球藻 PSY 具有一个延长的 N 末端,这很可能是叶绿体定位功能序列。Grunewald 等^[24]最早克隆了八氢番茄红素去饱和酶(PDS)的部分 cDNA 序列 (GenBank 序列号: X86783) 并对该酶进行了定位,发现它只存在于红球藻的叶绿体中,其催化产物必须被运输到细胞质脂质球中进行氧化和积累。番茄红素 β 环化酶(LCYB)催化番茄红素环化形成 β -胡萝卜素,其相对分子量约为 50 ku, Steinbrenner 和 Linden^[28]已从雨生红球藻中克隆获得了该基因的 cDNA 序列。 β -胡萝卜素羟化酶是双功能酶,能分别以 β -胡萝卜素和角黄质为底物,现已从红球藻中克隆了 CrtZ 的 cDNA 序列 (GenBank 序列号: AF162276),其推导的氨基酸序列含有 4 个极保守的组氨酸组,目前还没有在红球藻中对该酶进行细胞定位^[20]。能在类胡萝卜素的 C4 和 C4' 为上引入酮基的酶,称为 β -胡萝卜素酮化酶(BKT)或氧化酶(CrtO)。已从红球藻中分别克隆了 *bkt*, *crtO* 和 *bkt3* 三个基因的 cDNA 全序列 (GenBank 序列号分别为: D45881, AR079860),该酶也是双功能酶,能分

别以 β -胡萝卜素和玉米黄素为底物^[18,25,27]。 β -胡萝卜素羟基化酶和 β -胡萝卜素酮化酶与脂肪酸去饱和酶相似,都是含有两个铁离子和组氨酸残基的膜蛋白,催化时都需要分子氧和铁的刺激^[19]。采用膜系统的免疫标记和 Western 杂交分析,发现在诱导条件下该两酶都可同时存在于叶绿体和细胞质脂质球中,但 β -胡萝卜素酮化酶的活性只表现在细胞质脂质球中^[26]。

4 虾青素积累的分子机制研究进展

目前已有人从虾青素合成酶系基因的表达水平上分析影响虾青素合成的调控机制^[22~28]。Steinbrenner 和 Linden^[23]用 Northern 杂交的方法研究了虾青素合成酶基因 *psy* 和从 *crtZ* 在不同环境胁迫下的表达情况。在最有效的虾青素诱导条件——同时施加醋酸钠、硫酸亚铁和强光照射时,48 h 内 *psy* 和从 *crtZ* 的 mRNA 水平都有一个稳定的大幅度上升,而虾青素在诱导 72 h 后达到最高水平(13.5 mg/g)。这说明环境胁迫下虾青素的合成调控至少是部分发生在合成酶基因的转录水平上。只加强光照射或只添加醋酸钠时,该两酶的 mRNA 水平也都有一定程度的上升,但转录量低且转录较晚,虾青素的最终积累量也较低,说明高强度光照有利于虾青素的积累但不是诱导虾青素积累的唯一和必要条件。在同样的诱导条件下,光合电子传递链抑制剂的加入抑制了该两酶基因的转录,说明虾青素的合成还是需要一定的光合量支持。二价铁离子的添加与否,不影响这两个酶的 mRNA 水平,但虾青素的积累量却有很大差别,说明 Fe^{2+} 对虾青素合成的影响不发生在转录水平上,这印证了 Kobayashi 等^[5]的研究结果。

同样,在 Grunewald 等^[24]的实验中观察到,在胁迫条件下虾青素合成酶基因 *pds* 和 *crtO* 的基因转录水平均上调。在施加强光和氮缺失的诱导条件后 1.5 d, *crtO* mRNA 的含量在单个细胞中持续上升,4 d 后达到最高水平;与此同时,细胞内类胡萝卜素的含量也在同步上升。在诱导条件下, *pds* 的 mRNA 转录量也呈线性上升,4 d 后达到最大值,随后缓慢下降。在此期间,作者也检测到细胞内该两酶酶量的增加。这说明,胁迫条件下,虾青素的合成也是受 PDS 和 CrtO 酶基因的转录调控的。Huang 等^[27]也通过实验证实了在光照或醋酸盐胁迫下,雨生红球藻中虾青素的快速积累伴随着三个 β -胡萝卜素酮化酶基因表达量的急剧增加。Sun 等^[22]的实验中发现,在强光诱导下,IPP 异构酶的 mRNA 和 32.5 ku 蛋白的水平都有一个明显的提高。

由此可见,红球藻中虾青素的积累与合成酶基因 mRNA 转录水平上的调控有关。但高强度光照、醋酸盐等诱导条件是如何刺激次生类胡萝卜素合成

酶基因的转录?刘建国等^[32]发现在细胞培养液中会积累一种脂溶性的信号物质,诱导了富含虾青素的不运动细胞的生成。Steinbrenner 和 Linden^[28]通过不同的电子传递链抑制剂的作用发现番茄红素 β 环化酶基因 *lcyb* 以及 *psy*、*pds* 和 *crtZ* 在环境胁迫下的上调表达受细胞光合氧化还原状态控制,信号物质为电子传递链中的质体醌。

5 展望

目前虾青素作为天然色素和生物活性物质受到了极大的重视,具有广阔的应用前景和巨大的市场潜力。随着人们对雨生红球藻虾青素积累条件、生理生化过程、酶学基础以及基因表达水平等认识的逐步清晰以及基因工程手段的逐步成熟,对虾青素在雨生红球藻中积累的分子机制研究如虾青素合成酶基因应答环境胁迫的表达调控机制将会是新一轮研究的热点,也将是根本性地改变雨生红球藻虾青素生产限制问题的唯一途径。作者所在的实验室已经围绕这个主题开展了部分工作^[29~30]。

参考文献:

- [1] Santos M F, Mesquita J F. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Grod), Rostafinski (Volvocales). Some aspects of carotenogenesis [J]. *Cytologia*, 1984, 49: 215-228.
- [2] Lee Y K, Soh C W. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) [J]. *J Phycol*, 1991, 27: 575-577.
- [3] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32: 1 077-1 082.
- [4] Lee Y K, Ding S Y. Effect of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) [J]. *J Phycol*, 1995, 31: 922-924.
- [5] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 867-873.
- [6] Lu F, Vonshak A, Boussiba S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) [J]. *J Phycol*, 1994, 30: 829-833.
- [7] Kobayashi M, Kakizono T. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions [J]. *J Ferment Bioeng*, 1992, 74: 17-20.
- [8] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Appl Phycol*, 1991, 3: 295-304.

- [9] Tjahjono A E, Hayama Y. Hyper-accumulation of astaxanthin in green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures[J]. **Biotechnol Lett**, 1994, 16: 133-138.
- [10] Kobayashi M, Hirai N. Absciscic acid-dependent algal morphogenesis in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Plant Growth Regul**, 1997, 22: 79-85.
- [11] Orosa M, Franqueira D, Cid A, *et al.* Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. **Bioresour Technol**, 2005, 96 (3): 373-378.
- [12] Kobayashi M, Kurimura Y. Light-independent astaxanthin production by the green microalgae *Haematococcus pluvialis* under salt stress[J]. **Biotechnol Lett**, 1997, 19: 507-509.
- [13] Gudin C, Chaumont D. Cell fragility- The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors[J]. **Bioresour Technol**, 1991, 38: 145-151.
- [14] Kobayashi M, Okada T. Protective role of astaxanthin against UV-B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Biotechnol Lett**, 2000, 22: 177-181.
- [15] Kobayashi M, Sakamoto Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Biotechnol Lett**, 1999, 21: 265-269.
- [16] Lee Y K, Ding S Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) [J]. **J Phycol**, 1994, 77: 352-357.
- [17] Harker M, Young A J. Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus pluvialis* [J]. **Eur J Phycol**, 1995, 30: 179-187.
- [18] Kajiwarra S, Kakizono T, Saito T, *et al.* Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli* [J]. **Plant Mol Biol**, 1995, 29: 343-352.
- [19] Cunningham F X, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants [J]. **Plant Mol Biol**, 1998, 49: 557-583.
- [20] Linden H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1999, 1446: 203-212.
- [21] Albrecht M, Sandmann G. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase [J]. **Plant Physiol**, 1994, 105: 529-534.
- [22] Sun Z, Cunningham F X, Gantt E. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte[J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1998, 95: 11 482-11 488.
- [23] Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Plant Physiol**, 2001, 125: 810-817.
- [24] Grunewald K, Eckert M, Hirschberg J, *et al.* Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae) [J]. **Plant Physiol**, 2000, 122: 1 261-1 268.
- [25] Lotan T, Hirschberg J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis* [J]. **FEBS Lett**, 1995, 364: 125-128.
- [26] Grunewald K, Hirschberg J, Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276(8): 6 023-6 029.
- [27] Huang J C, Cheng F, Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Journal of Biotechnology**, 2006, 122: 176-185.
- [28] Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control [J]. **Plant Mol Biol**, 2003, 52(2): 343-356.
- [29] Teng C Y, Qin S, Liu J G, *et al.* Transient expression of *lacZ* in bombarded unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **J Applied Phycol**, 2002, 14: 497-500.
- [30] Meng C X, Teng C Y, Jiang P, *et al.* Cloning and characterization of beta-carotene ketolase gene promoter in *Haematococcus pluvialis* [J]. **Acta Biochim Biophys Sin**, 2005, 37(4): 270-275.
- [31] 庄惠如, 卢海声, 陈文列, 等. 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow) 在胁迫条件下积累虾青素过程的超微结构研究 [J]. **电子显微学报**, 2000, 19 (2): 137-142.
- [32] 刘建国, 孙艳妮, 殷明焱, 等. 无机碳与雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 细胞调节物质 [J]. **海洋与湖沼**, 2004, 5: 459-466.

(本文编辑:张培新)