

雨生红球藻生产虾青素的研究进展

廖兴辉, 王明兹, 陈必链* (福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心, 福建省现代发酵技术工程研究中心, 生命科学学院, 福州 350108)

摘要 虾青素是一种红色的类胡萝卜素衍生物, 具有广泛的用途。文中综述了近年来增强雨生红球藻中虾青素积累的方法如胁迫培养方法、诱变育种方法、植物激素协助方法和基因工程方法的进展, 以及一步式和两步式规模化培养雨生红球藻生产虾青素的现状和特点, 为虾青素的进一步开发利用提供依据。

关键词 虾青素; 雨生红球藻; 积累; 规模化培养

中图分类号 S932.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)26-10579-05

Research Advance of Astaxanthin Production from *Haematococcus pluvialis*

LIAO Xin-hui et al (Engineering Research Center of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Fujian Normal University, Center of Fujian Modern Fermentation Technology and Engineering, College of Life Sciences, Fuzhou, Fujian 350108)

Abstract Astaxanthin is a kind of red carotenoids with wide range of use. The advances of methods for strengthening astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* were reviewed, such as stress method, mutation breeding method, plant hormones assist method and gene engineering method, as well as the status and characteristics of one-step and two-step large scale culture of *Haematococcus pluvialis* to produce astaxanthin, which will provide reference for further development and utilization of astaxanthin.

Key words Astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; Accumulation, Large scale culture

虾青素(3,3'-二羟基- β,β' -胡萝卜素-4,4'-二酮)是一种红色的类胡萝卜素衍生物, 分子两端各有一个紫罗酮环, 环上各有一个羟基, 根据羟基与整个分子平面的位置关系虾青素分为4种光学异构体^[1]: 2个羟基位于平面下方构成S构象(3S,3'-S-虾青素); 2个羟基位于平面上方构成R构象(3R,3'-R-虾青素); 1个羟基位于平面上方, 1个位于平面下方的构成S,R构象(3S,3'-R-虾青素和3R,3'-S-虾青素)。研究表明, 虾青素有极强的染色、抗氧化和增强机体免疫的能力, 这些特性使得虾青素在水产养殖业中作为饲料添加剂不仅可以增加水生动物着色还可以增强鱼类卵子的质量^[2-3], 在化妆品中还能够有效地延迟皮肤老化^[4]; 在临床医药上能够有效地促进癌细胞凋亡^[5], 抑制心血管疾病引发的炎症^[6]。如此广泛的用途使得虾青素的需求量越来越大, 2010年全球的水产养殖业的市场需求量就达到了2亿美元^[7]。现阶段虾青素的生产主要有以下3种方法: 化学合成、红发夫酵母发酵和雨生红球藻积累, 其中化学合成的产物是上述4种光学异构体的混合物, 红发夫酵母发酵的产物为98%R构象, 雨生红球藻积累的产物为纯S构象^[8]。出于安全性的考量, 化学合成的虾青素的使用受到越来越严格的限制; 而红发夫酵母发酵的方法由于产物中虾青素含量较低和培养基成本过高等原因受到了极大的限制。

雨生红球藻是一种淡水绿藻, 属于绿藻纲团藻目红球藻科红球藻属。在其生长周期中明显地呈现出2个阶段: 在生长条件适宜的情况下雨生红球藻以绿色带鞭毛的可游动细

胞形态大量繁殖; 在生长环境不利的情况下, 绿色游动细胞逐渐丧失鞭毛、细胞壁加厚、形成红色包囊, 同时细胞质油脂小泡中大量积累虾青素。雨生红球藻在不利条件下积累虾青素的含量可高达干重的6%^[9], 并且自身具有普通微藻所需营养简单的特点, 因此被认为是生产虾青素最好的自然资源。雨生红球藻由于培养周期较长, 易受其他藻类和原生动物物的污染等不利因素的影响, 其大规模的培养一直是虾青素生产的壁垒。目前全球有能力商业化养殖雨生红球藻的企业只有8家, 其中中国有2家: 云南爱尔发天然虾青素生物技术有限公司和湖北荆州市天然虾青素有限公司。笔者对近年来增强雨生红球藻中虾青素积累的方法进行了综述, 现报道如下。

1 雨生红球藻积累虾青素的生理机制

前期研究表明, 虾青素在雨生红球藻细胞内是一个物理屏障。在光照强度超过细胞光合作用所需时, 藻体会在叶绿体附近积累虾青素并堆积成油脂小泡, 挡住部分光照, 避免了强光对叶绿体的伤害^[10]。但是这种观点的说服力不强, 因为其没有将虾青素积累时藻体的细胞壁加厚、形态改变等因素考虑在内, 同时虾青素的积累并不只表现在高光强的条件下, 在高盐度、营养缺乏等不利条件下也会大量积累虾青素。随后人们发现上述不利环境下, 雨生红球藻细胞内会产生大量的 H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 等活性氧因子, 而虾青素在积累过程中伴随着这些活性氧因子水平的下降。随着对虾青素合成途径的认识加深和上述现象相结合形成了现在主流的虾青素作用机理假说: 在虾青素的合成过程中产生的电子被八氢番茄红素脱饱和酶(PDS)和 ζ -胡萝卜素脱饱和酶转移到光合作用电子传递链中的质体醌池中, 而后通过质粒终端氧化酶的作用将电子传给分子氧合成水, 从而避免了过多活性氧因子的产生^[11]。但这种假说仍然是不完善的, 因为活性氧因子产生于叶绿体中而虾青素积累在细胞质中, 两个过程存在空间隔离。

基金项目 福建省发展与改革委员会(闽发改高技[2011]1598)资助课题; 科技部农业科技成果转化资金项目(2013GB2C400228); 厦门南方海洋研究中心项目。

作者简介 廖兴辉(1987-), 男, 福建龙岩人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学, E-mail: liao_xinghui@163.com。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事微藻生物技术和微生物酶学研究。

收稿日期 2013-07-11

2 增强虾青素在雨生红球藻中积累的方法

2.1 胁迫诱导方法 用于胁迫培养雨生红球藻的方法主要有:高光强照射、高盐度处理、磷饥饿处理、氮饥饿处理和硫饥饿处理等。其中,最常用的是高光强照射。为了在雨生红球藻内大量积累虾青素,一般将高光强照射和其他方法相结合。如 He 等用 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 的光强照射结合硫饥饿培养雨生红球藻,使其虾青素的含量达到 $25 \text{ pg}/\text{个}$,比未经处理的对照组提高了 8 倍^[12]。Kang 等采用分批培养流加氮、磷营养,通入含 5% CO_2 的空气并逐步提高光强的方法培养雨生红球藻,在 $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 的光照条件下,虾青素的产量为 $190 \text{ mg}/\text{L}$ ^[13]。Kang 和 Lee 等在 $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 光照条件下使用完全缺氮的培养基培养雨生红球藻,每克干藻粉中虾青素的含量超过 70 mg ^[14]。

由于雨生红球藻具有可吸收有机碳源来满足自身生长繁殖需要的能力,在提供有机碳源的培养条件下配合上述的胁迫处理方法可以在较短的时间内积累大量的虾青素。例如张睿钦等利用乙酸钠作为碳源,在 $7\ 000 \sim 7\ 500 \text{ lux}$ 光照条件下胁迫培养雨生红球藻 5 d,虾青素含量达到了 $12.37 \text{ mg}/\text{L}$,是自养条件下的 16 倍多^[15]。Vidhyavath 等人同样利用乙酸钠作为碳源,同时利用氮缺乏、 $17.1 \text{ mmol}/\text{L}$ 的 NaCl 和 $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 的光照作为胁迫条件培养雨生红球藻,9 d 后每克干藻粉的虾青素含量达到 24.5 mg ^[16]。

在上述处理条件下,伴随虾青素的积累,雨生红球藻的分裂生殖的速度下降或停止,同时使用细胞分裂抑制剂(长春花碱)处理培养液也可以观察到虾青素的积累,这说明虾青素的积累和细胞的分裂生殖有关^[17]。

2.2 诱变育种方法 为了进一步提高雨生红球藻中虾青素的含量,传统工业微生物中诱变育种的方法也被应用于虾青素的生产中。Wu 等用传统紫外诱变方法得到了虾青素含量比出发藻株高 120% 的藻株^[18]。Kamath 等用化学诱变剂 NTG 将一株雨生红球藻中虾青素的含量从 2.8% 提高到了 3.2% (虾青素重量与藻体干重比)^[19]。Hu 等利用 MNNG 作为化学诱变剂处理雨生红球藻,得到一株稳定高产的藻株 MT2877,其虾青素的含量比出发藻株高 100%^[20]。Chen 等使用紫外线和化学诱变剂 EMS 复合处理得到一株虾青素含量比出发藻株高 110% 的藻株^[21]。

2.3 植物激素处理 在高等植物中,茉莉酸、水杨酸等植物激素在植物处于不利生长环境时可以作为信号分子调节抗逆防御体系^[22]。由于微藻和植物的高度同源性,且虾青素也是在雨生红球藻处于不利环境下积累的,因此不少研究者对这些植物激素能否诱导雨生红球藻中虾青素的合成进行了研究。王丽丽等用浓度为 $312.5 \text{ mg}/\text{L}$ 的花生四烯酸处理雨生红球藻,发现积累的虾青素含量达到了 $3.67 \text{ mg}/\text{L}$,比对照组提高了 48%^[23]。Lu 等用 $20 \text{ mg}/\text{L}$ 的甲基茉莉酸和赤霉素 A_3 处理雨生红球藻后,虾青素的含量分别提高到干重的 5% 和 7%^[22]。Raman 等验证了在高盐度的情况下水杨酸可以大幅度地提高虾青素含量^[24]。由于植物激素本身价格的缘故,植物激素处理的方式还未能用于大规模培养雨生红球

藻以生产虾青素。

2.4 基因工程方法

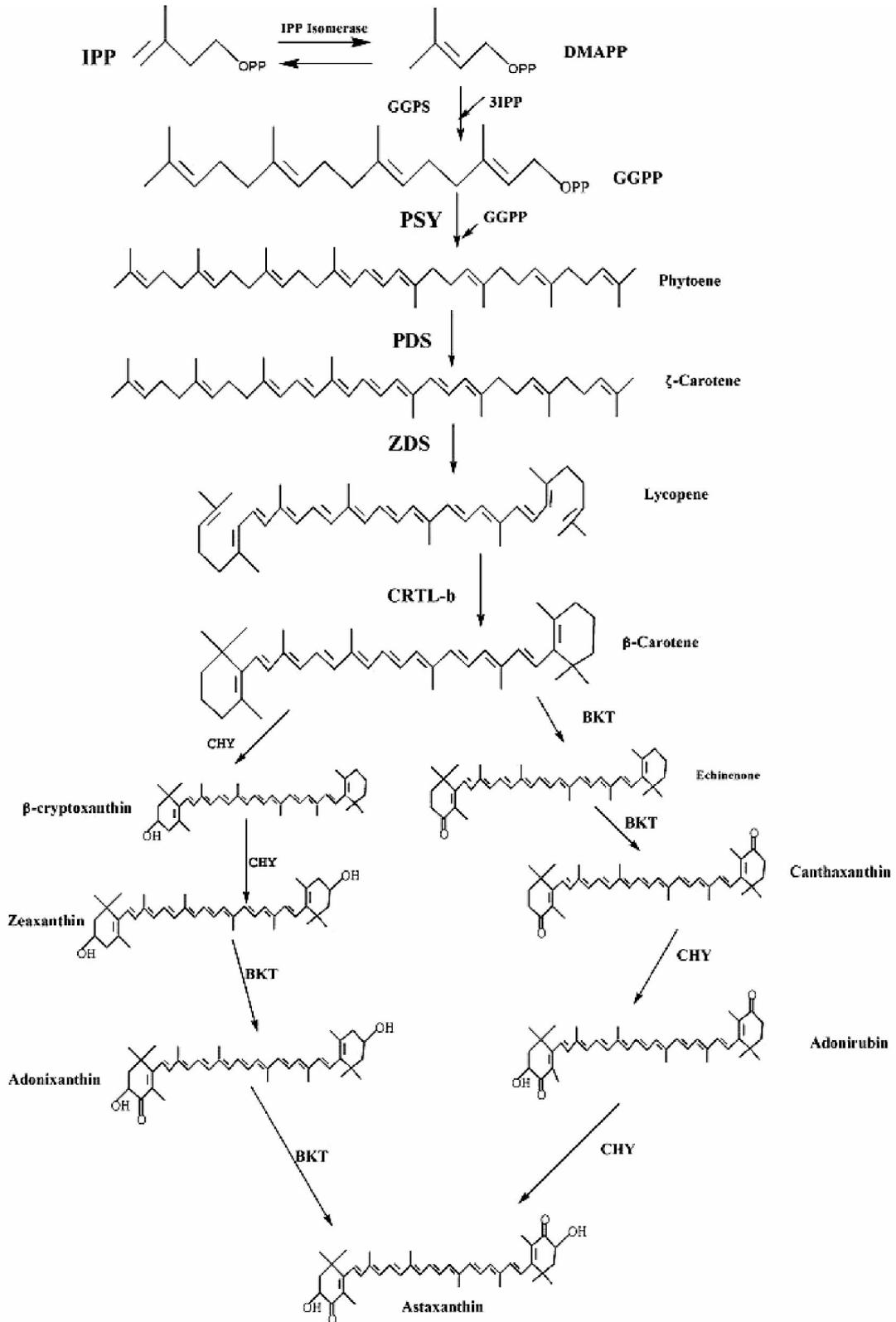
2.4.1 同源表达的方法。由于以真核单细胞绿藻为受体的转基因表达手段不成熟,即没有有效的基因转入方法、高效的高产藻株筛选手段、导入基因在细胞内沉默等原因,使得转基因表达仅限在衣藻和小球藻中使用。在雨生红球藻中使用基因工程的方法以提高虾青素含量的研究进展比较缓慢,大多还停留在使用基因枪这种低效率的转入方法上。Steinbrenner 等使用基因枪的方法将定点诱变后的八氢番茄红素脱饱和酶基因打入雨生红球藻细胞内进行同源表达,得到稳定的转化子,其中有转化子表现出虾青素高含量性^[25]。虽然 Kathiresan 等利用含穿梭载体 pCAMBIA1301 的农杆菌侵染雨生红球藻,成功地构建了转基因表达所需的抗性标记,但并未实现相关基因的同源表达^[26]。

2.4.2 异源表达的方法。在异源表达体系中,受体的选择是极为重要的一个环节,在虾青素合成相关基因的异源表达中受体的选择主要考虑以下因素:前体物质的供应、合成途径的完整程度、基因转入方式以及虾青素合成后的存贮方式。综合上述因素考虑,一些不产虾青素的高等植物如胡萝卜、西红柿、马铃薯^[27]和烟草^[28]等比不产虾青素的微生物更具优越性。因为这些植物不仅含有丰富的 β -胡萝卜素、番茄红素等虾青素合成所需的前体物质,本身具有除 β -胡萝卜素酮醇酶之外的虾青素生物合成所需要的所有酶(虾青素合成途径见图 1),具有成熟的土壤农杆菌侵染这一有效的基因转入方式,而且合成虾青素后可以酯化的形式储存在有色体中从而避免了对合成途径的反馈抑制,提高产量。如 Ahn 等利用土壤农杆菌侵染的方法将雨生红球藻中的 β -胡萝卜素酮醇酶基因 (*bkt*) 导入胡萝卜中并成功表达,获得的转化植株的主根中虾青素的含量达到 $17.2 \mu\text{g}/\text{g}$ (干重)^[29]。Jayaraj 等同样选择胡萝卜作为受体,利用同样的方法导入来自雨生红球藻中的 *bkt* 和来自拟南芥菜的 β -胡萝卜素羟化酶基因 (*chy*),转化植株的叶子和根部合成的虾青素含量分别达到 34.7 和 $91.6 \mu\text{g}/\text{g}$ (湿重)^[30]。Huang 等选择一株可积累大量 β -胡萝卜素的变异西红柿植株作为受体。其中,来自衣藻的 β -胡萝卜素酮醇酶基因和来自雨生红球藻的 β -胡萝卜素羟化酶基因得到表达,转化植株的叶子和果实中虾青素含量分别为 3.12 和 $1.61 \text{ mg}/\text{g}$ (干重)^[31]。

3 雨生红球藻的规模化培养

3.1 两步式两阶段法 所谓两步式两阶段法就是根据雨生红球藻生长周期的特性将虾青素的生产分为 2 个步骤,每个步骤在不同的生物反应器中进行。第 1 个阶段:在设计好的生物反应器中提供适合的条件,让分裂快速的绿色游动型细胞在短时间内大量繁殖,达到较高的生物量。第 2 阶段:将达到一定浓度的绿色游动细胞培养液转移到新的生物反应器,进行胁迫培养(高光、高盐度、氮缺乏和磷缺乏等),让藻细胞包裹化,同时大量积累虾青素。在第 1 个阶段中,由于细胞的抗逆性比较弱,易受其他藻类和原生动物的污染,一般需要使用封闭式的生物反应器或在室内进行。而在第 2

阶段中,由于藻体浓度较大,且红色包裹细胞本身具有一定的抗逆能力,可以在开放式的生物反应器中进行,但培养的时间不宜过长。这是目前最常用和成熟的方法。



注:IPP(Isopentenylpyrophosphate)为异戊烯焦磷酸;DMAPP(Dimethylallyl pyrophosphate)为二甲基烯丙基焦磷酸酯;PSY(Phytoene synthase)为八氢番茄红素合成酶;ZDS(ζ -Carotene desaturase)为 ζ -胡萝卜素去饱和酶;CRTL-b(Lycopene β -cyclase)为番茄红素- β -环化酶;BKT(β -carotene ketolase)为 β -胡萝卜素酮醇酶;CHY(β -carotene hydroxylase)为 β -胡萝卜素羟化酶。

图1 雨生红球藻中虾青素的生物合成途径

位于美国夏威夷的 Aquasearch 公司的 Miguel Olaizola 等 使用 3 个由电脑控制的、容积为 25 000 L 名为 AGM 的平行

塑料管道生物反应器和跑道池进行红球藻室外大规模培养的研究。该培养系统使用3 000和9 000 L的室内管道式生物反应器作为种子培养器,在管道培养时使用电脑系统检测培养液的各个参数:温度、营养物浓度和pH等。室外诱导虾青素培养时准备了6个养殖池,1次诱导周期为5 d,保证每天养殖池都在循环使用中。在9个月的试验中,虾青素的含量可达到藻体干重的2.5%^[32]。Gómez等也用了相类似的方法,不过在生物反应器上,Gómez等在室内使用了3级种子培养器:容积为20 L的三角瓶、1 100 L塑胶袋和2 500 L的跑道池,而在室外使用了容积达125 000 L的跑道池来诱导红球藻中虾青素的积累,最终获得的虾青素产量为9.77 g/m³^[33]。Aflalo等使用容量为500 L的平板式光生物反应器来培养绿色游动细胞,2 000 L的管道式生物反应器来进行诱导红色包囊细胞的形成和虾青素的积累,整个过程在室外进行,绿色阶段耗时4 d,诱导阶段耗时6 d;绿色游动细胞阶段增值能力可以达到0.55 g/L·d,最终虾青素含量可达到干重的3.8%^[34]。

3.2 一步式两阶段法 所谓一步式两阶段法就是将雨生红球藻绿色游动细胞的快速生长阶段和包囊形成并积累虾青素的阶段放在同一个生物反应器中连续进行。这2个阶段所需要的条件不一样:绿色游动细胞阶段所需的条件温和(低光、营养充足),诱导阶段需要不利的生长条件(高光强、高盐度、氮缺乏、磷缺乏等),而营养缺乏处理在连续培养时较难实现,因此在诱导阶段一般采用高光和高盐度处理。这也意味着在一步式两阶段培养方法中光强是可控制变化的。

Zhang等在室内通过自己设计的光生物反应器进行了试验^[35]。该反应器包括:光源(光强的变化通过调节荧光灯的数目和荧光灯跟培养液之间的距离来实现)、CO₂源(维持培养液pH和满足微藻光合作用所需)、温度控制系统、双层环形槽和搅拌系统。试验过程中,随着培养液中细胞浓度的提高,逐步提高光强,经过12 d的培养,试验的几株藻中生物量最高的可达1.83 g/L,虾青素含量达到藻体干重的2.79%。随后选取合适的藻株在面积为100 m²室外跑道池中进行规模化培养,起始时用遮阳布遮住跑道池获得低光强,使游动细胞快速生长繁殖,随着细胞浓度的增加,慢慢掀开遮阳布增大光强。在4个月的时间中进行了6批培养,每批所耗时间在11~18 d,平均15 d,虾青素最高含量可以达到藻体干重的2.48%。

两阶段法培养雨生红球藻以生产虾青素中的第2阶段一般放在室外进行,因为使用太阳光来诱导虾青素的积累可以大量减少生产成本,但这也意味着培养的光照和温度较难控。在温度控制方面,在室外培养中一般不控制低温,但经常使用在反应器表面洒水的方式来防止培养液的温度过高;在光照方面,根据生产地的日照情况来调节接种密度^[36]、生物反应器规格^[37]、培养基营养和通气速率^[38]等避免光抑制或光不足。

3.3 一步式一阶段法 Brinda等发现,在缺氮、磷、低光强的情况下,雨生红球藻会在绿色游动阶段就开始积累虾青

素,即虾青素的积累而未伴随细胞包囊化^[39]。这意味着虾青素的积累可以不用以牺牲细胞繁殖为代价,在此基础上利用雨生红球藻的连续培养成为生产虾青素的一种新的方法。所谓的一步式一阶段法就是利用营养缺乏处理使雨生红球藻在绿色游动阶段不影响细胞生殖的情况下(或细胞生殖速度下降不多的情况下)大量积累虾青素,这样就可以借助传统微生物连续发酵的方法一边补充新鲜培养基一边流出培养液来提取虾青素,实现虾青素的连续生产。整个过程中只使用一个生物反应器,藻细胞只停留在绿色游动细胞阶段。

Garcia-Malea等利用带夹套的鼓泡塔光生物反应器(容量1.8 L)在室内培养绿色游动细胞,在5 d的稳定期中每天可得到0.7 L的培养液,虾青素含量可达到藻干重的0.6%,之后利用容量为50 L的管状光生物反应器进行1年的室外中等规模化培养:培养液使用0.6 mmol/L低浓度的硝酸盐来诱导虾青素的合成,新鲜培养基补充速度为0.6 L/d(白天补充,夜晚停止),1年中在5月、7月、10月达到了稳定期。在生物量方面,该试验得到了0.6~0.7 g/L的生产能力,其中虾青素含量可达到藻体干重的1.34%^[40]。

在一步式一阶段培养法中,影响产量的因素主要是光强、氮浓度和补充液流速^[41]。其中,氮浓度是影响藻体中虾青素含量最重要的因素,在氮浓度高于阈值2.7 mmol/L时,虾青素的含量维持在一个较低的水平,并且不受光强的影响;同时,氮含量也影响了生物量的增长,在氮浓度高于2.0 mmol/L时,生物量不再随氮浓度的增加而增加且不受光强的影响。补充液流速对产量的一部分影响也是通过改变氮浓度来实现的。

4 讨论

试验从成本、生产效率、虾青素纯度和虾青素提取难度等4个方面对3种规模培养方法进行比较。结果表明,这3种方法在规模化培养雨生红球藻以生产虾青素上各有优缺点,从成本方面考虑,一步式2种方法的成本优势来自于在整个生产过程中只需用到一种生物反应器;而两步式两阶段法用到的2个反应器造价较高,在整个生产成本中占有较高的比重。就生产效率而言,一步式一阶段法生产效率较低的原因在于生长稳定期维持的时间在整个生产周期中的比例不大,而且虾青素含量较低。从虾青素纯度来说,两阶段的2种方法培养的藻细胞诱导充分,藻体内的虾青素占总类胡萝卜素的比重极高(可到90%以上),而一步式一阶段法培养的藻细胞处在绿色游动阶段,虾青素占总类胡萝卜素的比重极低。就虾青素提取难度而言,在两阶段的2种培养方法中,藻细胞经过充分诱导形成的包囊体带有厚厚的细胞壁,这层细胞壁极为坚固,给下游提取带来了较大困难。而一阶段培养的细胞由于仍处于绿色游动,细胞壁极为脆弱,下游破壁程序较易实现。从目前国内外的现状上看,两步式两阶段法仍是主要的生产方法,但另外2种方法仍处在发展阶段,有着极大的提升前景。

参考文献

[1] LEMOINE Y, SCHOEFS B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosyn-

- thesis in algae: a multifunctional response to stress [J]. *Photosynth Res*, 2010, 106(1/2): 155–177.
- [2] HIGUERA-ClAPARA I, FELIX-VALENZUELA L, GOYCOOLEA F M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2006, 46(2): 185–196.
 - [3] SHEIKHZADEH N, PANCHAH I K, ASADPOUR R, et al. Effects of *Haematococcus pluvialis* in maternal diet on reproductive performance and egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Animal Reproduction Science*, 2012, 130(1/2): 119–123.
 - [4] TOMINAGA K, HONGO N, KARATO M, et al. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, 59(1): 43–47.
 - [5] PALOZZA P, TORELLI C, BONINSEGNA A, et al. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2009, 283(1): 108–117.
 - [6] FASSETT R G, COOMBES J S. Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease [J]. *Future Cardiol*, 2009, 5(4): 333–342.
 - [7] IMAMOGLU E, DALAY M C, SUKAN F V. Semi-continuous cultivation of *Haematococcus pluvialis* for commercial production [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(3): 764–772.
 - [8] SCHMIDT I, SCHEWE H, GASSEL S, et al. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(3): 555–571.
 - [9] RAPOSO M F, MORAIS A M, MORAIS R M. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(3): 1253–1257.
 - [10] WANG B, ZARKA A, TREBST A, et al. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance [J]. *J Phycol*, 2003, 39: 1116–1124.
 - [11] LI Y, SOMMERFELD M, CHEN F, et al. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *J Appl Phycol*, 2010, 22(3): 253–263.
 - [12] HE P, DUNCAN J, BARBER J. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(4): 447–451.
 - [13] KANG C D, HAN S J, CHOI S P, et al. Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33(1): 133–139.
 - [14] KANG C D, LEE J S, PARK T H, et al. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(5): 987–994.
 - [15] 张睿钦, 斌管, 青孔, 等. 雨生红球藻异养转化产虾青素的条件研究 [J]. *浙江大学学报*, 2011, 37(6): 624–630.
 - [16] VIDHYAVATHI R, VENKATACHALAM L, SARADA R, et al. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(6): 1409–1418.
 - [17] BOUSSIBA S, VONSHAK A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32(7): 1077–1082.
 - [18] WU Z, CHEN G, CHONG S, et al. Ultraviolet-B radiation improves astaxanthin accumulation in green microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(12): 1911–1914.
 - [19] SANDESH KAMATH B, VIDHYAVATHI R, SARADA R, et al. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(18): 8667–8673.
 - [20] HU Z, LI Y, SOMMERFELD M, et al. Enhanced protection against oxidative stress in an astaxanthin-overproduction *Haematococcus* mutant (Chlorophyceae) [J]. *European Journal of Phycology*, 2008, 43(4): 365–376.
 - [21] CHEN Y, LI D, LU W, et al. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnol* Letters, 2003, 2003(25): 527–529.
 - [22] LU Y, JIANG P, LIU S, et al. Methyl jasmonate-or gibberellins A3 – induced astaxanthin accumulation is associated with up – regulation of transcription of beta-carotene ketolase genes (bkts) in microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(16): 6468–6474.
 - [23] 王丽丽, 李惠咏, 龚一富. 花生四烯酸对雨生红球藻细胞生长和虾青素含量的影响 [J]. *水产科学*, 2010, 29(3): 142–146.
 - [24] RAMAN V, RAVI S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2010, 33(3): 1043–1049.
 - [25] STEINBRENNER J, SANDMANN G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(12): 7477–7484.
 - [26] KATHIRESAN S, SARADA R. Towards genetic improvement of commercially important microalga *Haematococcus pluvialis* for biotech applications [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(5): 553–558.
 - [27] GERJETS T, SANDMANN G. Ketocarotenoid formation in transgenic potato [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(14): 3639–3645.
 - [28] HUANG J, ZHONG Y, SANDMANN G, et al. Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants [J]. *Planta*, 2012, 236(2): 691–699.
 - [29] AHN M J, NOH S A, HA S H, et al. Production of ketocarotenoids in transgenic carrot plants with an enhanced level of β -carotene [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2011, 6(2): 133–140.
 - [30] JAYARAJ J, DEVLIN R, PUNJA Z. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants [J]. *Transgenic Res*, 2008, 17(4): 489–501.
 - [31] HUANG J C, ZHONG Y J, LIU J, et al. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin [J]. *Metab Eng*, 2013, 17: 59–67.
 - [32] OLAIZOLA M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12: 499–506.
 - [33] GÓMEZ P I, INOSTROZA I, PIZARRO M, et al. From genetic improvement to commercial-scale mass culture of a Chilean strain of the green microalga *Haematococcus pluvialis* with enhanced productivity of the red ketocarotenoid astaxanthin [J]. *AoB Plants*, 2013, 26: 1–26.
 - [34] AFLALO C, MESHULAM Y, ZARKA A, et al. On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 98(1): 300–305.
 - [35] ZHANG B Y, GENG Y H, LI Z K, et al. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process [J]. *Aquaculture*, 2009, 295(3/4): 275–281.
 - [36] WANG J, HAN D, SOMMERFELD M R, et al. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 25(1): 253–260.
 - [37] YOO J J, CHOI S P, KIM B W, et al. Optimal design of scalable photobioreactor for phototrophic culturing of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(1/2): 309–315.
 - [38] KAEPINTONG K, SHOTIPRUK A, POWTONGSOOK S, et al. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2): 288–295.
 - [39] BRINDA B R, SARADA R, KAMATH B S, et al. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects [J]. *Current Science*, 2004, 87(9): 1290–1295.
 - [40] GARCIA-MALEA M C, ACIEN F G, DEL RIO E, et al. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(2): 651–657.
 - [41] DEL RIO E, ACIEN F G, GARCIA-MALEA M C, et al. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(2): 397–402.