

综 述

## 红球藻研究进展

邱保胜 刘其芳

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### THE MICROALGAE, *HAEMATOCOCCUS*: A REVIEW

QIU Bao-sheng and LIU Qi-fang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**关键词:** 红球藻; 雨生红球藻; 湖泊红球藻; 虾青素; 环境因子

**Key words:** *Haematococcus*; *Haematococcus pluvialis*, *Haematococcus lacustris*; Astaxanthin; Environmental factor

中图分类号: Q949.212 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2000)05-0546-09

红球藻是一种生活于间歇性水体的淡水绿藻,能大量积累类胡萝卜素(可占干重的2%—5%),其中80%以上为虾青素(Astaxanthin)及其酯类<sup>[1-3]</sup>。近年来,虾青素在水产养殖中(如虹鳟、鲑等的人工养殖)较广泛地用作饲料添加剂,取得了满意的着色效果<sup>[4-6]</sup>。另一方面,虾青素的抗氧化能力强于 $\beta$ -胡萝卜素<sup>[7]</sup>和维生素E<sup>[8]</sup>,具有潜在的医用价值。同时,红球藻还是研究次生类胡萝卜素(Secondary carotenoids)的生物合成与基因表达<sup>[9,10]</sup>以及细胞的感光与运动<sup>[11]</sup>的良好材料。因此红球藻日益受到研究者重视,成为国际上藻类学研究的热点之一。在我国红球藻研究尚处于起步阶段,仅有少量工作见诸报道<sup>[12,13]</sup>。为此,作者较详尽地介绍了红球藻的一般特征、生长条件、虾青素的积累、虾青素的生物学功能及红球藻生产应用中尚待解决的问题,以期对我国的红球藻研究有所裨益。

## 1 红球藻的一般特征

### 1.1 形态结构

目前,有关红球藻的研究主要集中于雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* Flotow)和湖泊红球藻[*Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski](也有人认为它与雨生红球藻同种异名<sup>[14]</sup>)。

收稿日期:1999-02-26;修订日期:2000-01-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570086)

作者简介:邱保胜(1972—),男,湖北省武汉市人,博士研究生

红球藻运动细胞呈椭圆形或卵形,具两条等长鞭毛。细胞壁和原生质体间具空隙,其间充满胶样物质,细胞壁和原生质体间有细胞质连丝相连<sup>[15-18]</sup>。细胞的原生质体前端具乳头状突起,伸缩泡数个至数十个,不规则地分散于原生质体中。载色体杯状,蛋白核 1 个、2 个或多个,具 1 个眼点,位于细胞近中部的一侧。细胞核位于细胞中央。环境条件不利时,红球藻运动细胞失去鞭毛,进而形成胶群体或厚壁孢子<sup>[18]</sup>。

## 1.2 繁殖

一般认为,红球藻的繁殖方式有营养繁殖和无性繁殖,至于有性繁殖存在与否及其类型曾有异议。通常,红球藻运动细胞以细胞分裂增殖。当环境条件不利时,运动细胞及胶群体转变为厚壁孢子<sup>[15]</sup>,以渡过不良环境。关于红球藻的有性繁殖,一方面,Elliott 和 Shi Tan 等认为尚无确凿证据表明其存在<sup>[15,19]</sup>;而另一方面,Hartmann, Droop, Tjahjono 及 Lee 和 Ding 通过显微观察和细胞 DNA 含量测定等手段研究表明,红球藻具有性繁殖<sup>[16,20,21]</sup>。至于有性繁殖类型,Hartmann 认为红球藻的有性繁殖为同配<sup>[16]</sup>,而 Droop 和 Tjahjono 等工作表明雨生红球藻的有性繁殖为异配<sup>[16,20]</sup>。

## 1.3 分布

红球藻的分布常局限于小面积间歇性水体(如:Rocky depression, Concrete basin, Birdbath 和 Ornamental cemetery urn),这在一定程度上是由于这些生境中通常缺乏竞争性藻类<sup>[22]</sup>。另一方面,红球藻较大多数其它藻类更适合于这种生境。其一,红球藻的厚壁孢子具有极强的耐受力,环境条件不利时运动细胞能迅速转变为厚壁孢子;其二,红球藻能大量积累虾青素,这对于其适应该种生境,免受强光漂白等起到了至关重要的作用<sup>[23]</sup>;其三,红球藻细胞壁与原生质体间的空隙充满胶样物质,它可在厚壁孢子形成之前对所遇逆境起到一定缓冲作用<sup>[17]</sup>。

## 1.4 描述红球藻形态的术语

在众多文献中,描述红球藻形态的术语颇为混乱,如:Elliott 将红球藻划分为 Macrozooid、Microzooid、Palmella 和 Haematocyst 四种形态<sup>[15]</sup>,而 Borowitzka 等则将其划分为 Macrozooid、Palmella 和 Aplanospore 三种形态<sup>[24]</sup>,这可能是由于 Elliott 及其以前的一些研究人员所认为的 Microzooid 实际上为配子。此外,Santos 和 Mesquita 在文章中使用 Motile cell (Zoospore)和 Non-motile cell (Akinete, Cyst)<sup>[25]</sup>;Lee 和 Ding 的文章中同时出现了 Zoospore、Palmella、Aplanospore 和 Akinete<sup>[21]</sup>;Hagen 等的文章中仅出现了 Flagellated cell 和 Aplanospore<sup>[26]</sup>;Boussiba 和 Vonshak 在其文章中所使用的是 Vegetative cell 和 Resting cell<sup>[27]</sup>;Kobayashi 等使用的是 Vegetative cell 和 Cyst<sup>[28]</sup>,等等。Lee 和 Ding 指出,用来描述红球藻运动细胞的术语“Vegetative cell”使用不当,因为在恒化培养中不动的红色细胞也能进行无性繁殖,也应是营养细胞<sup>[21]</sup>。事实上,Akinete、Aplanospore、Cyst、Haematocyst 和 Resting cell 可以统一起来,而 Flagellated cell、Macrozooid、Vegetative cell 和 Zoospore 均指红球藻的运动细胞。因此,红球藻可分为运动细胞(Motile cell)、胶群体(Palmella)和厚壁孢子(Akinete)三种形态。

# 2 红球藻的生长条件

## 2.1 光照

红球藻的生长并不一定需要在光照条件下进行,它能以醋酸盐为碳源行异养生

长<sup>[29]</sup>。一般认为,红球藻的生物量增长过程中适宜光照条件为  $50\text{--}90\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ <sup>[30,31]</sup>。

## 2.2 温度

红球藻适宜于较低温度条件下生长,一般为  $20^{\circ}\text{C}$  左右<sup>[30]</sup>。当环境温度高于  $28^{\circ}\text{C}$  时,其生长受到抑制<sup>[24]</sup>。

## 2.3 搅拌

通常认为红球藻在连续搅拌条件下生长不利<sup>[19]</sup>,但有研究表明,在一定条件下充气能改善环境的酸碱度<sup>[3,27]</sup>,并向培养液中不断补充无机碳,从而显著促进红球藻生长。

## 2.4 氮营养

硝酸盐和尿素较铵盐更适合于红球藻生长,但尿素对类胡萝卜素合成有一定抑制作用<sup>[31]</sup>。一般认为,红球藻生长环境中的  $\text{KNO}_3$  浓度在  $0.5\text{--}1.0\text{g L}^{-1}$  为宜。

## 2.5 磷营养

中等浓度的磷( $0.1\text{g L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4$ )即可满足红球藻生长的需要<sup>[24]</sup>。

## 2.6 羧酸盐

红球藻能利用醋酸盐在暗处行异养生长<sup>[29]</sup>,也能在光下行兼养生长<sup>[32]</sup>。红球藻不同于其它大多数微藻,它的光合作用和醋酸盐的氧化代谢在有醋酸盐存在的兼养条件下能相伴发生。在光下红球藻生长时醋酸盐的合适浓度为  $15\text{--}30\text{mmol L}^{-1}$ ,而在暗处适宜浓度为  $22.5\text{--}30\text{mmol L}^{-1}$ ;当环境中醋酸盐浓度大于  $30\text{mmol L}^{-1}$  时,红球藻生长受抑制<sup>[28,32]</sup>。相比之下,丙酮酸盐优于醋酸盐,它在高浓度时对红球藻的抑制作用较醋酸盐小,且更利于红球藻生长和类胡萝卜素积累;当二者同时使用时(丙酮酸盐  $20\text{mmol L}^{-1}$ 。醋酸盐  $15\text{mmol L}^{-1}$ ),对细胞生长和类胡萝卜素积累均起促进作用<sup>[28]</sup>。另外,在酸性条件下(如:  $\text{pH}$  小于 5.0),醋酸盐对红球藻产生一定的毒害作用<sup>[33]</sup>。

## 2.7 维生素

红球藻无维生素需求,但适量的维生素( $\text{B}_1 1\sim 2\times 10^{-5}\%$ ,  $\text{B}_{12} 4\times 10^{-7}\%$ )能改善其生长,且  $\text{B}_1$  的促进效果更显著<sup>[12,33,34]</sup>。

## 2.8 溶氧

Lee 和 Ding 的研究表明:在氮限制的连续恒化培养中,溶氧分压的升高使红球藻不动细胞数目增加<sup>[35]</sup>。

## 2.9 酸碱度

红球藻适宜于中性或稍碱性条件下生长<sup>[13,15]</sup>。目前较多被采用的 MCM、BBM 及 BG<sub>11</sub> 等培养基,都或多或少存在缓冲能力弱的缺陷,以致于静止培养几天后培养液的  $\text{pH}$  值就上升到非生理活性范围,极大地限制了红球藻生物量的进一步增加<sup>[13]</sup>。

# 3 红球藻中虾青素的累积

## 3.1 积累部位

红球藻中虾青素的积累发生在细胞核周围的细胞质基质中<sup>[25]</sup>。这些脂溶性色素小颗粒出现在内质网潴泡外,与内质网关系密切;随着颗粒数目增多,它们彼此融合,形成更大的内含物颗粒,进而掩盖了叶绿素使细胞呈现出明亮的红色。

### 3.2 红球藻中类胡萝卜素的组成

Renström 等测得雨生红球藻胶群体细胞中类胡萝卜素各组分所占比例分别为: 虾青素 1%, 虾青素单酯 76%, 虾青素双酯 7%,  $\beta$ -胡萝卜素 1%, 金盏花红素酯 3%, 黄体素 7%, 紫黄质 2%, 新黄质 1%<sup>[2]</sup>; 而 Grung 等测得雨生红球藻厚壁孢子中类胡萝卜素的组成情况为: 虾青素 1%, 虾青素单酯 46%, 虾青素双酯 34%,  $\beta$ -胡萝卜素 5%, 黄体素 6%, 海胆酮 4%, 角黄质 4%<sup>[1]</sup>。从以上数据来看, 与光合活性相联系的环氧类胡萝卜素(紫黄质和新黄质), 在厚壁孢子中不存在, 否则二者的类胡萝卜素组成相当一致。至于海胆酮和角黄质, Spray 和 Czygan 已报道了它们的存在<sup>[1]</sup>。另外, 在胶群体细胞中虾青素单酯占主导, 而在厚壁孢子中虾青素双酯所占比率有很大上升, 这表明红球藻细胞由胶群体向厚壁孢子转变过程中虾青素单酯的进一步酯化。在虾青素单酯或双酯中, 脂肪酸主要为  $C_{18:1}$ <sup>[2]</sup>。

### 3.3 虾青素积累的调控

**3.3.1 光照** 红球藻中虾青素的合成并不一定需光, 在异养条件下它能以较慢的速度合成虾青素<sup>[29]</sup>, 但光照是诱导虾青素大量积累的最重要的因子<sup>[27,31,36]</sup>, 红球藻中虾青素的合成在高光密度下得到促进。处于生长期的培养物中虾青素的积累速率是对光照密度(而非吸收光能)的应答<sup>[3]</sup>; 虾青素的合成量与光的剂量(光照密度 $\times$ 光照时间)呈比例关系<sup>[37]</sup>; 另一方面, 蓝光较红光更有利于虾青素的合成<sup>[37]</sup>。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<sup>[35,38,39]</sup>。一般认为, 红球藻中虾青素合成所需合适光照密度为  $140\text{--}280\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ <sup>[27,37]</sup>。

**3.3.2 温度** 提高培养温度有利于红球藻中虾青素的积累<sup>[24]</sup>, 而这种促进作用与藻细胞中内源性产生的活性氧有关<sup>[39]</sup>。据推测, 提高培养温度对虾青素的合成起到双重作用: 1. 正常的生长受到干扰; 2. 高温将促进内源性活性氧的产生, 而活性氧最终有助于虾青素的高积累<sup>[39]</sup>。

**3.3.3 活性氧与二价铁离子** 培养基中自由基的产生者和活性氧促进红球藻中虾青素的合成, 而氧基团清除剂的加入将抑制虾青素的合成<sup>[38,39]</sup>。在氮限制的连续恒化培养中, 虾青素含量与培养液中溶氧分压( $0\text{--}50\%\text{O}_2$ )呈比例, 高溶氧分压提供了一条提高虾青素生产率的有效途径<sup>[35]</sup>。

二价铁离子促进虾青素的合成(可能是由于  $\text{Fe}^{2+}$  的加入引起虾青素的合成酶系活化), 但这种促进作用受到 KI 抑制, 从而暗示着  $\text{Fe}^{2+}$  对虾青素合成的促进作用可能需要通过铁催化的 Fenton 反应产生的羟基来实现。四种活性氧(Singlet oxygen、Superoxide anion radical、Hydrogen peroxide 和 Peroxy radical)能替代  $\text{Fe}^{2+}$ , 在醋酸盐诱导形成的厚壁孢子中促进虾青素的合成<sup>[38]</sup>。因此, Kobayashi 等认为氧胁迫影响虾青素合成的后翻译活性<sup>[38]</sup>。

**3.3.4 碳与氮** 类胡萝卜素的前体(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醋酸盐时, 会很快诱导运动细胞向厚壁孢子转变; 当  $\text{Fe}^{2+}$  与醋酸盐一同加入时, 将更有利于虾青素合成; 而醋酸盐的浓度对虾青素的合成量影响不大<sup>[28,32,38]</sup>。一般, 氮缺乏引起红球藻中虾青素的大量积累<sup>[2,3,24,40,41]</sup>, 但 Boussiba 等认为虾青素的合成需要氮, 这很可能是反映在为支持虾青素的大量积累而需要连续合成蛋白

质上<sup>[27]</sup>。培养基中的碳氮平衡决定虾青素合成的程度,有实验表明:在向红球藻生长相中添加醋酸盐时,红球藻被诱导形成厚壁孢子,这一过程紧紧伴随着 DNA 含量的上升和蛋白质含量的下降。当醋酸盐与高浓度的硝酸盐一同加入时,红球藻细胞内的这些变化剧烈地受到抑制,从而表明厚壁孢子形成由一个高碳氮比触发,伴随厚壁孢子的形成虾青素的合成在一个高碳氮比率下诱发<sup>[42]</sup>。

**3.3.5 磷** 高磷水平诱导红色的胶群体细胞和厚壁孢子的形成,从而有利于虾青素的积累<sup>[24]</sup>;而 Boussiba 等认为磷饥饿有利于虾青素的积累<sup>[27]</sup>。

**3.3.6 盐度** 低浓度的 NaCl 有利于虾青素的合成<sup>[24,27,31]</sup>。

**3.3.7 其它因素** 除以上各影响因素外,干燥<sup>[43]</sup>、机械胁迫<sup>[44]</sup>以及细胞分裂抑制剂<sup>[27]</sup>也促进虾青素的积累。

### 3.4 虾青素的积累机制

次生类胡萝卜素(Secondary Carotenoids)是指在胁迫条件下大量合成的位于载染色体以外的类胡萝卜素,区别于那些结合在载染色体光合作用片层上的原生类胡萝卜素(Primary carotenoids)。次生类胡萝卜素主要包括几种氧化型的 $\beta$ -胡萝卜素衍生物,如:虾青素(Astaxanthin)、海胆酮(Echinenone)、角黄质(Canthaxanthin)等。

**3.4.1 虾青素合成与叶绿素** 红球藻中虾青素的合成并不以叶绿素的分解为代价<sup>[40,45]</sup>,而是利用细胞中已存在的无色前体或光合固定的碳合成而来,以碳水化合物从头合成是红球藻中次生类胡萝卜素合成的根本途径。通常情况下,次生类胡萝卜素合成过程中叶绿素的量几乎无变化<sup>[46]</sup>或略有增加<sup>[26]</sup>。在实际工作中,常以干重作为色素含量的参照,而干重在次生类胡萝卜素积累和厚壁孢子形成过程中由于细胞壁的加厚剧烈增加。这样就很难判断伴随次生类胡萝卜素的合成是否有叶绿素的降解,以致得出一些相矛盾的结果<sup>[41]</sup>。

**3.4.2 虾青素合成与细胞分裂和细胞形态** 有研究认为,红球藻中虾青素的合成受到那些干扰细胞分裂,而不影响其同化碳能力的因素促进<sup>[43]</sup>。当红球藻细胞分裂速率降低至低于虾青素积累速率时,必将导致细胞中虾青素的净积累<sup>[21]</sup>。至于红球藻中虾青素的积累是否以细胞分裂速率的降低为前提,曾有争议<sup>[27,35]</sup>。

虾青素的积累曾被认为与厚壁孢子的形成相关<sup>[24,27,28]</sup>,但红球藻细胞中虾青素的积累可以发生在活跃生长期<sup>[21,47]</sup>,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<sup>[21]</sup>。这种现象在低光照密度下通常被观察到,并被当作红球藻运动细胞不合成虾青素的证据。

因此,可以说红球藻中虾青素的积累并不依赖于细胞分裂的停止、厚壁孢子的形成以及细胞运动能力的丧失。

### 3.5 细胞大量积累虾青素后的生理改变

体内积累有大量虾青素的厚壁孢子与绿色运动细胞除在形态上不同外,生理机能方面亦存在很大差异<sup>[26]</sup>。厚壁孢子的形成以最大光合速率的逐渐降低及光合放氧中光合量子需量和反应中心最小周转时间的上升为特征<sup>[46]</sup>。在厚壁孢子的形成过程中细胞的呼吸速率上升,分泌速率下降。

尽管红球藻厚壁孢子在生长和运动停止后形态和色素组成发生了变化,但它仍能象光合作用活跃的綠色运动细胞一样行使其功能,光合作用复合体保持相对稳定。Shi Tan 等运用免疫探针方法,以叶绿素为标准测定了两种类型培养物中(红色培养物,主要为厚壁孢子;绿色培养物,主要为运动细胞)细胞的类囊体多肽和酶的相对含量,结果表明:在红色培养物中,细胞色素 *f* 的水平大大降低(不到绿色细胞的 1%)<sup>[19]</sup>,这暗示着从 PS II 向 PS I 的线性电子传递的降低。同时,他们还发现红色细胞中 CPI、D2、CP47、LHCI 和 Rubisco 的水平分别只有绿色细胞的 15%、18%、29%、48% 和 80%,而两种类型培养物中 ATP 合成酶没有明显变化。红色培养物的暗呼吸速率、最大净光合速率,PSII 及 PSI 的活性分别为  $100\mu\text{mol O}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $-40\mu\text{mol O}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $15\mu\text{mol DCPIP mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $64\mu\text{mol O}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,而在绿色细胞中分别为  $16\mu\text{mol O}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $80\mu\text{mol O}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $40\mu\text{mol DCPIP mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $46\mu\text{mol O}_2 \text{ mgchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 。这些结果表明:尽管红色细胞的光合放氧降低,但光系统仍具有功能;红色细胞中光合放氧的下降主要是由于呼吸速率的上升和线性电子流的损伤,在一定程度上也归因于光系统某些组分的降低。红色细胞中一些重要的光合蛋白的下降和丢失可能是由于胁迫条件下新的合成和修复降低。红球藻中虾青素的积累与光合作用从一个偏向于还原型类型(线性电子传递、大量同化力的产生)向一个更加有利于产生 ATP 的类型(光合磷酸化活性的增强、储存产物的合成与积累)的转变有关,这是光合结构对于虾青素生物合成能量需求的积极反应<sup>[26]</sup>。

### 3.6 虾青素的合成途径

Harker 和 Young 利用一系列抑制剂研究了虾青素的合成途径,实验结果表明:Di-flufenican 和 Norflurazon 几乎引起次生类胡萝卜素合成的全面抑制,同时伴随八氢蕃茄红素的积累:CPTA 阻止蕃茄红素的环化;二苯胺和 1-氨基苯并噻唑通过阻碍氧的介入进而阻止虾青素与其它次生类胡萝卜素的合成,引起  $\beta$ -胡萝卜素的大量积累。由此推断,蕃茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素能作为虾青素合成的前体<sup>[48]</sup>。

红球藻中  $\beta$ -胡萝卜素合成以后,接下来的虾青素合成具有两条可能途径。其中一条最早由 Cooper 等提出,首先在  $\beta$ -胡萝卜素  $\beta$  环的  $C_3$  上导入一个羟基,形成  $\beta$ -隐黄质,进而经由玉米黄质,金盏花黄质,最后得到虾青素;第二条途径由 Donkin 和 Grung 等根据红球藻厚壁孢子中测得的类胡萝卜素的结构和构型基础上提出,它与前一途径的区别仅在于先在  $\beta$ -胡萝卜素的  $\beta$  环  $C_4$  上导入酮基,形成海胆酮,进而形成角黄质,金盏花红素,最后得到虾青素<sup>[1,45,48]</sup>。

## 4 虾青素等次生类胡萝卜素的生物学功能

红球藻中次生类胡萝卜素在载色体外大量积累是对强烈曝晒生境的一种适应<sup>[49]</sup>,在这种缺乏遮蔽的生境中形成厚壁孢子,从而免受强光的漂白作用显得非常重要<sup>[23]</sup>。在强光照射下,次生类胡萝卜素的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照能力<sup>[36,49]</sup>。有研究表明,红球藻运动细胞和厚壁孢子中次生类胡萝卜素含量与它们耐受高光照能力间存在相关性,绿色厚壁孢子较红色厚壁孢子对光抑制具有更高的敏感性<sup>[49]</sup>。

另外,次生类胡萝卜素的积累引起红球藻运动细胞趋光反应的改变。积累有次生类胡萝卜素的红色运动细胞正向趋光性的精确度下降,而避光反应加强,这可能是由于次生类胡萝卜素引起的对蓝光敏感的光感受器的遮蔽。

## 5 前景与展望

在研究、开发和利用红球藻资源的过程中,人们面临着一些具体困难,主要包括:其一,红球藻生长较慢,生长温度较低,通过传统的光合自养培养体系在单位时间内难以获取高生物量;其二,开放式培养过程中红球藻易被单细胞绿藻和蓝藻等污染,而原生动物捕食者们也会给红球藻生产带来一定危害;其三,虹鳟等水产养殖种类对虾青素酯的利用效率较虾青素低,虾青素酯的着色效果略逊于虾青素<sup>[4]</sup>;其四,红球藻的厚壁孢子具坚韧的细胞壁,直接利用它作为饲料添加剂将导致其生物有效利用率的降低<sup>[4]</sup>,而进行色素提取须采用酶处理,这将使得提取工艺复杂化<sup>[1]</sup>。以上这些给工艺设计和生产带来了较大困难,极大地阻碍了利用红球藻生产虾青素的进程。至目前为止,仅有少数企业(如 Microbio Resources, Inc. 和 Algatec, Inc.)曾利用红球藻生产虾青素<sup>[5]</sup>。

目前人们较多采用两步法诱导红球藻细胞积累虾青素,即:首先在最适生长条件下培养红球藻的运动细胞,最大限度地获取生物量;接下来,通过改变培养条件诱导虾青素的大量积累,同时伴随厚壁孢子的形成<sup>[28]</sup>。红球藻中虾青素的合成并不仅仅局限于厚壁孢子时期,其运动细胞和胶群体细胞中也有虾青素的积累。因此,直接利用红球藻的运动细胞累积虾青素,变两步法为一步法具有较大优越性和可行性。这样,不仅所得虾青素的酯化程度较两步法低,可更有效地被用作着色剂,而且由于运动细胞壁较薄,必将大大简化虾青素的提取工艺,但还有大量工作有待深入探讨。

采用基因工程手段,克隆红球藻中的虾青素合成酶基因,将其导入易于培养或生产上已实现大规模培养的藻株(如:盐藻、螺旋藻等)或者是某些其它微生物,通过调控这些基因的表达,利用这些工程藻株或菌株生产虾青素,这无疑将有助于克服红球藻生产上所面临的众多困难。目前,这方面的研究工作有所进展。Harker 和 Hirschberg 已成功地将雨生红球藻的 crtO 基因(编码  $\beta$ -C<sub>4</sub> 加氧酶)转入聚球藻 PCC7942 中,利用其合成虾青素<sup>[10]</sup>。Breitenbach 等也将雨生红球藻的 bkt 基因(与 crtO 实为同一基因,其编码产物均将酮基导入  $\beta$  环 C<sub>4</sub> 位置)转入大肠杆菌,使其获得大量表达<sup>[9]</sup>。

此外,培养方式的变革(从光合自养到异养或兼养)<sup>[32]</sup>以及高虾青素合成突变株的筛选<sup>[20]</sup>也有望在一定程度上解决红球藻生产与运用中所面临的困难。

## 参考文献:

- [1] Grung M, D'Souza F M L, Borowitzka M, *et al.* Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. Haematococcus pluvialis aplanospores as a source of (3S, 3'S) - astaxanthin esters [J]. J Appl Phycol, 1992, 4:165—171
- [2] Renström B, Borch G, Skulberg O M, *et al.* Optical purity of (3S, 3'S) - astaxanthin from Haematococcus pluvialis [J]. Phytochem, 1981, 20:2561—2564
- [3] Lee Y K, Soh C W. Accumulation of astaxanthin in Haematococcus lacustris (Chlorophyta)[J]. J Phycol, 1991, 27: 575—577
- [4] Sommer T R, Potts W T, Morrissy N M. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (Oncorhynchus

- mykiss) [J]. *Aquaculture*, 1991, **94**:79—88
- [5] Kranzfelder J A. Carotenoids from microalgae [J]. *J Phycol*, 1992, **28**(suppl.):11
- [6] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素—研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997
- [7] Terao J. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution [J]. *Lipids*, 1989, **24**:659—661
- [8] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids [J]. *Pure Appl Chem*, 1991, **63**:141—146
- [9] Breitenbach J, Misawa N, Kajiwara S, *et al.* Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Fems Microbiol Lett*, 1996, **140**:241—246
- [10] Harker M, Hirschberg J. Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for  $\beta$ -C<sub>4</sub>-oxygenase, crtO [J]. *Febs Lett*, 1997, **404**:129—134
- [11] Cecconi C, Ascoli C, Petracchi D. Step-up photophobic responses of the unicellular alga *Haematococcus pluvialis* and their interpretation in terms of photoreceptive apparatus characteristics [J]. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1996, **33**:201—209
- [12] 金传荫, 宋立荣, 刘永定, 等. 红球藻水生 748 株营养需求的研究[J]. 水生生物学报, 1996, **20**:293—296
- [13] 邱保胜, 刘其芳. 雨生红球藻培养基的改良[J]. 水生生物学报, 1999, **23**:391—394
- [14] Grünwald K, Hagen C, Braune W. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris* [J]. *Eur J Phycol*, 1997, **32**:387—392
- [15] Elliott A M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Arch Protistenk*, 1934, **82**:250—272
- [16] Droop M R. *Haematococcus pluvialis* and its allies; I: The Sphaerellaceae [J]. *Rev Alg N S*, 1956, **2**:53—71
- [17] Bowen W R. Ultrastructural aspects of the cell boundary of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Trans Amer Microsc Soc*, 1967, **86**:36—43
- [18] 胡鸿钧, 李尧英, 魏印心, 等. 中国淡水藻类[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980
- [19] Shi T, Francis X, Cunningham Jr, *et al.* Cytochrome *f* loss in astaxanthin-accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes, and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells [J]. *J Phycol*, 1995, **31**:897—905
- [20] Tjahjono A E, Kakizono T, Hayama Y, *et al.* Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers [J]. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77**:352—357
- [21] Lee Y K, Ding S Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)[J]. *J Phycol*, 1994, **30**:445—449
- [22] Proctor, V W. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Ecology*, 1957, **38**:457—462
- [23] Fryxell G. *Survival strategies of the algae* [M]. Cambridge University Press, London, 1983, p256
- [24] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. I Effects of nutrients on growth and cell type [J]. *J Appl Phycol*, 1991, **3**:295—304
- [25] Santos M F, Mesquita J F. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* [Girod]. Rostafinski (Volvocales). I. Some aspects of carotenogenesis [J]. *Cytologia*, 1984, **49**:215—228
- [26] Hagen C, Braune W, Birckner E, *et al.* Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). I. The accumulation period as an active metabolic process [J]. *New Phytol*, 1993, **125**:625—633
- [27] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant cell physiology*, 1991, **32**:1077—1082
- [28] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis*, accompanied with morphological changes in acetate media [J]. *J Ferment Bioeng*, 1991, **71**:335—339
- [29] Droop M R. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Nature*, 1955, **175**:42
- [30] Lu F, Vonshak A, Boussiba S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chloro-



- phyceae) [J]. *J Phycol*, 1994, **30**:829—833
- [31] Harker M, Tsavalos A J, Young A J. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Appl Phycol*, 1995, **7**:399—406
- [32] Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, *et al.* Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions [J]. *J Ferment Bioeng*, 1992, **74**:17—20
- [33] McLachlan J, Craigie J S. Effects of carboxylic acids on growth and photosynthesis of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Can J Bot*, 1965, **43**:1449—1456
- [34] Pringsheim E G. Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and related species [J]. *J Phycol*, 1966, **2**:1—7
- [35] 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
- [36] Yong Y Y R, Lee Y K. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) [J]. *Phycologia*, 1991, **30**:257—261
- [37] Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, *et al.* Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Ferment Bioeng*, 1992, **74**:61—63
- [38] 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
- [39] Tjahjono A E, Hayama Y, Kakizono T, *et al.* Hyper - accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures [J]. *Biotechnol Lett*, 1994, **16**:133—138
- [40] Goodwin T W, Jamikom M. Studies in carotenogenesis. II. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biochem J*, 1954, **57**:376—381
- [41] Czygan F C. Blood - rain and blood - snow: nitrogen - deficient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis* [J]. *Arch Mikrobiol*, 1970, **74**:69—76
- [42] Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* [J]. *J ferment Bioeng*, 1992, **74**:403—405
- [43] Droop M R. Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow [J]. *Arch Mikrobiol*, 1954, **20**:391—397
- [44] Guদিন C, Chaumont D. Cell fragility - The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors [J]. *Bioresource Technology*, 1991, **38**:145—151
- [45] Donkin P. Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus lacustris* [J]. *Phytochem*, 1976, **15**:711—715
- [46] Zlotnik I, Sukenik A, Dubinsky Z. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Phycol*, 1993, **29**:463—469
- [47] Chaumont D, Thépenier C. Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle [J]. *J Appl Phycol*, 1995, **7**:529—537
- [48] Harker M, Young A J. Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus pluvialis* [J]. *Eur J Phycol*, 1995, **30**:179—187
- [49] Hagen C, Braune W, Bjorn L O. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a "sunshade" [J]. *J Phycol*, 1994, **30**:241—248