

## 고광도와 질소 결핍이 *Haematococcus pluvialis*의 색소 생합성에 미치는 영향

윤지현 · 곽인규 · 진언선\*  
한양대학교 생명과학과

**Influence of High Light and Nitrate Deprivation on the Carotenoid Biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*.** Yun, Ji-hyun, In-kyu Kwak, and EonSeon Jin\*. Department of Life Science, Hanyang University of Korea – The unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis* used as a biological production system for astaxanthin. It accumulates large amounts of the red ketocarotenoid astaxanthin when exposed to various environmental stress such as active oxygen species and high light intensities. To induce astaxanthin biosynthesis of *H. pluvialis*, cells were incubated in either nitrate free at 25°C under continuous high light intensity (1,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) for 2 days or high light stress only. Expressions of astaxanthin biosynthetic genes such as carotenoid hydroxylase, IPP isomerase and  $\beta$ -carotene ketolase were monitored under different culture conditions by using real time RT-PCR. All the subjected genes increased their expression under highlight and N-deprivation condition where a large amount of astaxanthin was accumulated.

**Key words:** *Haematococcus pluvialis*, carotenoids, astaxanthin

### 서 론

단세포 녹조류인, *Haematococcus pluvialis*는 활성산소에 의한 산화적 스트레스, 고광도 고염도, 고온 등의 배양 조건에서 ketocarotenoid astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4,4'-dione)을 다량으로 축적한다[9]. 일반적으로 carotenoid는 광수확 색소로서 중요한 역할을 하며, 과도한 빛에 의한 광합성 기관의 광산화적 손상에 대한 보호에도 중요한 역할을 한다[2]. 일반적으로 astaxanthin이 축적되는 것은 이 생물체와 이와 연관된 다른 생물체들이 환경적 스트레스에 대응하는 생존 전략 기작 이라고 생각되고 있다[3]. 현재 *H. pluvialis* 내의 다수의 carotenoid 생합성 유전자들이 분리되었고, 일부 유전자들의 특성이 밝혀졌다[4, 10, 11, 16, 17]. 하지만, 스트레스에 대응하는 *H. pluvialis*의 분자적인 방어 기작은 아직 완전히 보고되지 않았다.

Astaxanthin은 red-orange 색소로 자연계의 여러 생물체 내에서 강력한 생물학적 항산화제 역할을 한다. Astaxanthin은 인간의 건강과 영양에 대해 다양한 잠재력과 실용성을 지니고 있다. 이 색소는 항산화 능력으로 인해 점점 상업적 관심이 증가하고 있으며, 이는 제약과 화장품 산업에 중요한 요인으로 작용한다[9, 14]. 최근 연구에서 astaxanthin의 항산화 능력, 항염증성 기능, 암과 당뇨병에 관한 영향, 면역계와 눈의 건강 등 다른 측면에서 매우 중요한 활성을 나타낸다고 보고되고 있다[5, 9, 16]. 그리고 미세 녹조류인 *H.*

*pluvialis*는 자연계에 풍부하게 존재하며, 항고혈압성 능력과 신경보호에 대한 잠재력 등을 포함하는 인간 건강 증진에 이용할 수 있다. Astaxanthin은 free astaxanthin, astaxanthin monoester, astaxanthin diester 세 가지의 형태로 존재한다고 알려져 있는데 astaxanthin의 구조가 Fig. 1에 나타나 있으며, astaxanthin monoester는 3번 탄소에 지방산이 결합되어 있는 형태이고 diester는 각각 고리구조의 3번 탄소에 지방산이 결합되어 있는 형태이다.

Fig. 2에서는 astaxanthin 생합성 경로와 관련효소들을 보여주고 있다. 이들 생합성 효소중에 특히  $\beta$ -carotene ketolase (BKT), isopentenyl pyrophosphate isomerase(IPP isomerase), carotenoid hydroxylase 유전자들에 대한 발현양상을 본 연구에서 집중적 살펴보게 되었다. BKT는  $\beta$ -carotene을 canthaxanthin으로 전환시키며, zeaxanthin을 astaxanthin으로 전환시키는 역할을 한다. 그러므로 이 효소는 *H. pluvialis*의 astaxanthin 생합성에 중요한 역할을 한다. IPP isomerase는 isoprenoid 전구체의 생합성과 관련 있으며 고광도의 빛에 의해 발현량이 증가한다[17]. IPP isomerase는 IPP는 가역적인 이성질체의 합성을 촉매하여 dimethylallyl pyrophosphate를 생산하며, dimethylallyl pyrophosphate은 carotenoid의 생합성과 다른 많은 long-chain isoprenoids가 반응을 시작할

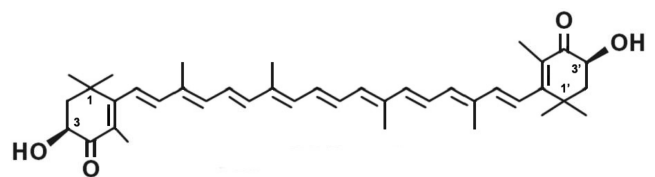


Fig. 1. Astaxanthin structure.

\*Corresponding author

Tel: 82-2-2220-2561, Fax: 82-2-2299-2561

E-mail: esjin@hanyang.ac.kr

재료 및 방법

Cell의 배양액조성과 carotenoid 생합성 유도

본 연구에 사용된 *Haematococcus pluvialis*는 Texas 대학의 Culture Collection (UTEX)에서 구입되어 배양된 것으로 인하대 해양생물공학 실험실로부터 분양 받았으며, MV(Mes-Volvox)medium에서 배양되었다. MV medium에서 배양되는 영양생장단계의 세포(green cell)의 배양조건은 pH 6.7의 배지에, 25°C의 온도와 15 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>의 지속적인 광도로 120 rpm에서 진탕 배양하였다. MV medium의 조성은 다음과 같다. Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 11.8 mg/L; Na<sub>2</sub>glycerophosphate·5H<sub>2</sub>O, 6 mg/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4 mg/L; KCl, 5 mg/L; NH<sub>4</sub>Cl, 2.67 mg/L; biotin, 25 μg/L; vitamin B<sub>12</sub>, 15 μg/L; PIV total solution(Na<sub>2</sub> EDTA, 0.0045 mg/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.582 mg/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.246 mg/L; ZnCl<sub>2</sub>, 0.03 mg/L; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.012 mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.024 mg/L; MES 1.95 g/L. Astaxanthin 생합성이 유도된 세포(red cell) 배양하기 위하여 지수성장기에 있는(2.6×10<sup>5</sup> cell ml<sup>-1</sup>) cell을 N free media인 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O와 NH<sub>4</sub>Cl 대신 CaCl<sub>2</sub> 20 mg/L을 첨가한 MV에 접종하고 25°C의 온도 조건과 1,000 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>의 광도를 주어 이틀 동안 배양하였다. 세포의 수는 hemocytometer로 측정하였다.

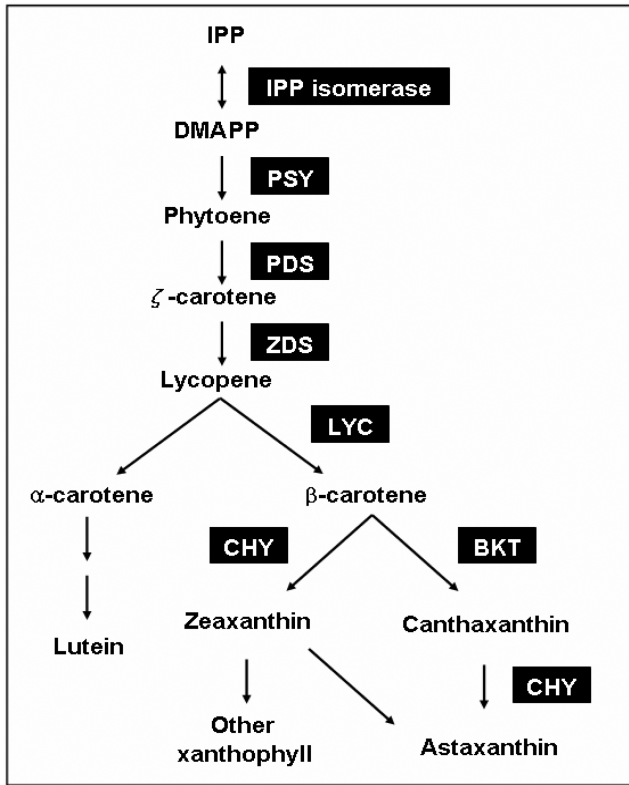


Fig. 2. Biosynthetic pathway of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. Isopentenyl pyrophosphate; IPP, Dimethylallyl pyrophosphate; DMAPP, Phytoene synthetase; PSY, Phytoene desaturase; PDS, ζ-carotene desaturase; ZDS, Lycopene β cyclase; LYC, β-carotene ketolase; BKT, Carotenoid hydroxylase; CHY.

수 있도록 유도한다. Phytoene desaturase(PDS)와 ζ-carotene desaturase(ZDS)는 구조적으로나 기능적으로 비슷한 효소이다. 이 효소들은 phytoene 을 ζ-carotene을 거쳐 lycopene으로 전환시키는 역할을 한다. 광합성 기관의 carotenoid와 secondary carotenoid는 2환식 화합물이다. Lycopene에서 α-carotene과 β-carotene으로 생합성 경로가 나누어질때 carotenoid 생합성에 있어서 중요한 경로가 되고, lycopene에서 β-carotene로의 경로는 lycopene β-cyclases (LYC)가 촉매한다[8]. Carotenoid hydroxylase는 canthaxanthin의 초기 형성을 촉매하고, 그 후 canthaxanthin 초기 형성은 astaxanthin으로 전환된다(Fig. 2). 그 동안 astaxanthin 합성 유전자들의 단편적이고 개별적인 연구들이 보고되었으나[6, 11, 17] 본 연구에서는 고 광도 스트레스와 더불어 질소결핍 스트레스에 노출된 *H. pluvialis*의 생합성관련 유전자 변화를 총체적으로 살펴 보기 위해 Northern 및 Real-time PCR을 수행하여 이들의 발현양상을 살펴보았다. 또한 배양 조건의 차이로 인한 색소의 변화를 알아보기 위해 HPLC 분석도 수행하였다.

색소분석

Astaxanthin의 색소분석은 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하였다. 샘플을 90% acetone으로 3분간 homogenizer를 이용하여 색소를 추출하고 원심분리를 13,000 rpm로 2분간 하여, 상층액만 주사기 필터 (0.2 μm nylon filter)를 이용해 여과하였다. HPLC 분석을 하기 위해 20 μL의 샘플을 주입하였고 분리시간은 25분 동안 진행되었다. HPLC는 Shimadzu 사의 LC-20A Prominence를 이용하였다. Column은 Waters Spherisorb® S5 ODS1 4.6 × 250 mm, 5 μm Cartridge Column(Maple St. Milford, Massachusetts, USA)을 사용하였고 column 온도는 40°C로 하였다. 색소를 분리하는 용매로 0.1M Tris-HCl pH 8.0, acetonitrile, methanol, ethyl acetate가 이용되었다. 기기가 작동하는 동안 용매의 농도는 다음과 같다: 14% 0.1M Tris-HCl(pH 8.0), 84% acetonitrile, 2% methanol(0분~15분), 68% methanol and 32% ethyl acetate(15분~19분). 그 후 6분의 post-run 동안은 처음 시작할 때의 용매 농도와 같다. Column 내의 유속은 분당 1.2 ml로 지속되었다[7]. 분리된 carotenoid와 astaxanthin ester form은 photodiode array detector( SPD-M20A, Shimadzu)를 통해 분석하였고 인증된 standard로 비교하였다. 피크를 정량하기 위해 ketocarotenoid는 476 nm에서 다른 carotenoid는 445 nm에서 확인하였다. Astaxanthin standard는 Sigma-Aldrich에서 구입하였고 그밖에 다른 standard는 DHI(Agerm Allé, HØrsholm,

**Table 1. Gene specific primers sets and PCR product characteristics.**

Primer	Primer sequence (5'-3')	Gene bank ID
Actin forward	GTGGACACCTCAGCGTTTAGC	DV203941
Actin reverse	ACCATCAACAAGTGCACATT	
Carotenoid hydroxylase forward	GCGCGGGCGATGAGCACAG	AY187011
Carotenoid hydroxylase reverse	GAGCATGGCGGGCAGTCCTTTGAT	
Phytoene desaturase forward	GGACGGCGCCCCACCTGAG	AY768691
Phytoene desaturase reverse	GGCCGGCGCAAACACCA	
IPP isomerase forward	CGGGCAGTCGCAGGATGAGC	AY786411
IPP isomerase reverse	ACGTTGGCCCGGATGAATAAGATG	
$\beta$ -carotene ketolase forward	CCAAATCAGGCTACCGACATCCAT	D45881
$\beta$ -carotene ketolase reverse	GCCCCAGCATTTGCATCACCCT	
Chlorophyll a,b binding protein forward	TGAAGGACATGAAGACGAAAGAGC	AY786531
Chlorophyll a,b binding protein reverse	GCGCAGCACAGGGATGG	

Denmark)에서 구입하였다.

#### RNA 추출과 Real-time PCR

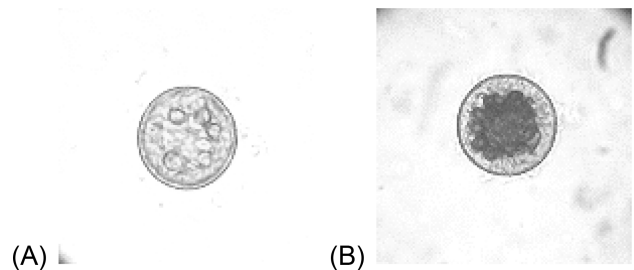
두 가지 조건의 세포(green과 red cell)에서 total RNA를 추출하기 위해 TRIzol reagent(Invitrogen, California, USA)를 이용하였다.

Reverse transcription으로부터 first strand의 cDNA를 얻기 위해 Invitrogen의 superscript III Reverse Transcriptase kit(California, USA)를 제조사의 설명서에 따라 사용하였다. 각 조건에서 추출한 6  $\mu$ g의 total RNA를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 이렇게 얻어진 cDNA로 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR은 Thermal Cycler Dice™ Real Time System TP 800(Takara, Naginatahokocho, Koyto, Japan)로 수행하였으며, 증폭을 확인하기 위해 SYBR® Premix Ex Taq™ ((Takara, Naginatahokocho, Koyto, Japan)을 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 10초 동안 (pre-denaturation) 1cycle, 95°C에서 5초(denaturation), 56°C에서 45초 동안 (annealing) 40 cycle로 실행하였다. Primer 정보는 Table 1에 정리하였고 대조구로 actin 유전자를 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Astaxanthin 생합성이 유도된 *H. pluvialis* 배양조건

영양생장중의 세포인 green cell은 pH 6.7인 MES-Volvox 배지에서 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 15  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 꾸준한 광도로 growth chamber에서 배양하였다. Green cell에서 red cell로 되기 위해 질소가 결핍된 배지에서 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 꾸준한 광도로 48시간 동안 스트레스를 주어 배양하였다. Fig. 3a에서 녹색이었던 세포가 질소 결핍 배지에서 높은 광도를 주어 배양하였더니 Fig. 3b와 같이 astaxanthin을 합성한 상태인 red cell로 바뀌었다. 세포질에서 astaxanthin이 생합성 되어 묻쳐있는 것을 볼 수 있다.

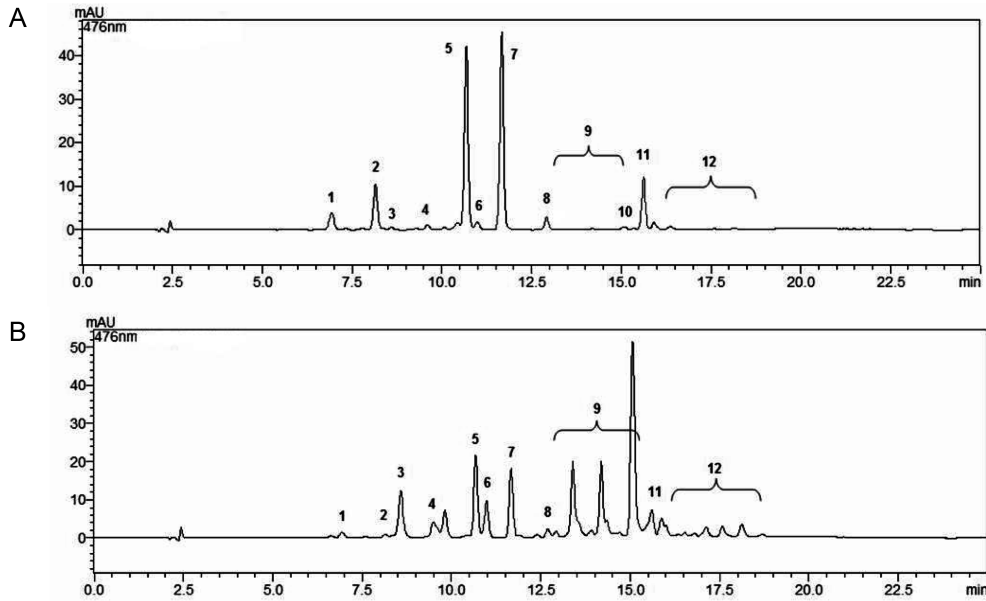


**Fig. 3. Light micrographs of *H. pluvialis* at different culture condition.** (A) Green cells were in MES-volvox growth medium at 25 under a continuous light intensity of 15  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (B) Red cells were incubated under light intensity 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , nitrate free medium for 48 h.

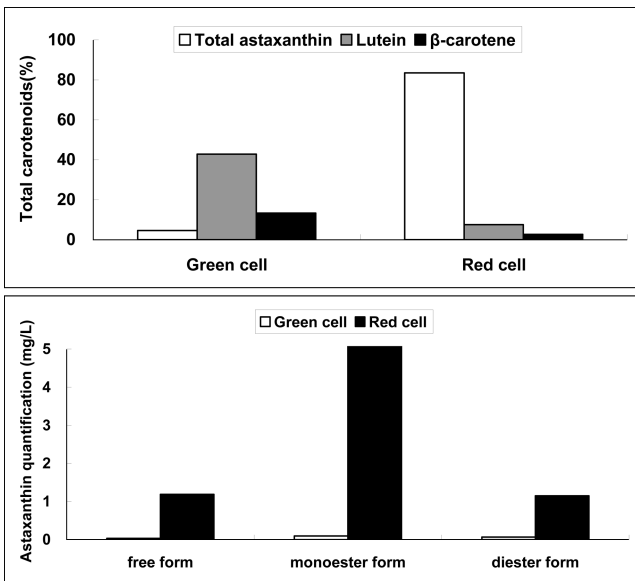
##### 각 조건에 따른 *H. pluvialis*의 광합성 색소 변화

각 배양조건에 따른 광합성 색소의 변화를 보기 위해 HPLC를 이용하여 색소 분석을 하였다. Green cell에 거의 없던 peak들(2, 9, 12)이 red cell에서 보여지고 있다(Fig. 4). 이들은 green cell에서 stress를 받아 유도된 astaxanthin으로 각각 astaxanthin, astaxanthin monoester, astaxanthin diester로 확인되었다. HPLC 결과로 얻은 각 carotenoid의 정량을 통해 total carotenoid에서 total astaxanthin과 lutein 그리고  $\beta$ -carotene의 비율을 보았다. Total carotenoid를 100%로 기준 하였을 때, green cell에서 4.62%이었던 total astaxanthin이 red cell에서 83.43%로 늘어난 것을 볼 수 있다. 반면, lutein은 42.83%에서 7.53%로,  $\beta$ -carotene은 13.32에서 2.64%로 green cell 보다 red cell에서 감소한 것을 볼 수 있다. 즉, total astaxanthin의 비율이 늘어난 반면 lutein과  $\beta$ -carotene의 비율이 줄어든 것을 볼 수 있다(Fig. 5a).

Total astaxanthin은 free astaxanthin, astaxanthin monoester, astaxanthin diester의 3가지 그룹으로 나뉜다[15]. Total astaxanthin을 100%로 기준 하였을 때 monoester는 48.76%에서 76.65%로 증가하였으며, free astaxanthin은



**Fig. 4. HPLC profiles of pigments in *H. pluvialis*.** (A) Pigment profile of *H. pluvialis* before stress, (B) cells exposed to nitrogen deficiency and high light for 48 hrs. 1: neoxanthin 2: violaxanthin 3: astaxanthin free form 4: antheraxanthin 5: lutein 6: zeaxanthin 7: chlorophyll a 8: chlorophyll b 9: astaxanthin monoester 10:  $\alpha$ -carotene 11:  $\beta$ -carotene 12: astaxanthin diester



**Fig. 5. Changes in carotenoid composition in green and red cell.** Peak identification as given in Fig. 4. Changes in concentration of total astaxanthin, lutein,  $\beta$ -carotene (a) and astaxanthin (b).

17.9%에서 11.9%로, diester 그룹은 33%에서 11.5%로 감소하는 변화를 보였다. Fig. 5b는 세가지 astaxanthin 형태의 절대량을 나타내고 있다. Green cell에서 free form은 0.033 mg/L, astaxanthin monoester 에서는 0.099 mg/L, astaxanthin diester에서 0.065 mg/L의 함량을 보이고 있으나, red cell에서는 각각 1.19 mg/L, 7.7 mg/L, 1.15 mg/L로 각각의 농도가 증가하였다. 완전하게 red cell로 전환되었을 경우에

세그룹의 비율이 각각 약 5%, 70%, 25% 정도로 존재하는 것으로 보고되고 있으나[12], 본 실험에서는 Fig. 3b처럼 astaxanthin이 축적중인 red cell의 경우 각각의 astaxanthin ester타입의 조성이 다르게 나타나고 있음을 알 수 있다. 여러 형태의 astaxanthin의 조성비는, 각 cell을 키우는 배지의 종류마다 혹은 환경조건에 따라 차이가 나타나는 것을 알 수 있다. 고광도와 질소 결핍 스트레스를 받게 되면 lycopene에서  $\alpha$ -carotene의 경로가 저해되어 lutein 합성이 줄어들고  $\beta$ -carotene은 하위 경로인 astaxanthin합성경로는 가속화되어  $\beta$ -carotene의 농도가 줄어드는 대신 astaxanthin의 합성이 증가되고 있다고 유추할 수 있다.

**고광도와 질소결핍 스트레스에 따른 astaxanthin 생합성 관련 유전자의 발현**

Real-time RT-PCR을 통해 green cell와 red cell에서의 astaxanthin 생합성 관련 유전자의 발현 차이 여부를 보았다 (Fig. 7). Astaxanthin 생합성 관련 gene인 isopentenyl pyrophosphate isomerase,  $\beta$ -carotene ketolase, carotenoid hydroxylase 유전자들의 발현 정도를 정확하게 정량하기 위해 real-time RT-PCR을 수행하였는데 먼저 각 조건의 cell에서 추출한 total RNA를 cDNA로 역전사하였다. 각 유전자에 대한 고유의 primer를 설정하여 사용하였고 melting curve를 분석하여 단일밴드가 나오는지 확인하였다. Fig. 8의 Real-time PCR 결과는 housekeeping gene인 actin과 대조군인 green cell을 기준으로 하였을 때의 상대적 정량을 나타낸다. 기준점 “1” 보다 클 때는 발현양의 증가를, 낮을 때는 발현양의 감소를 의미한다. Carotenoid hydroxylase의 경

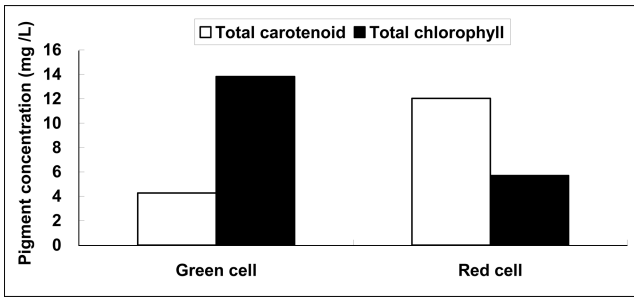


Fig. 6. HPLC chromatogram of pigments of *H. pluvialis*. Peak identification as given in Fig. 4.

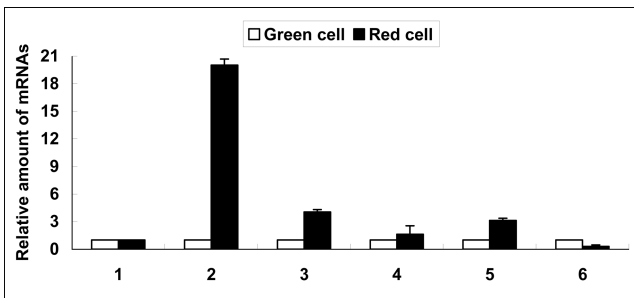


Fig. 7. Expression of astaxanthin biosynthesis genes calculated by quantitative Real-Time PCR. Each bar shows the relative expression using actin as the endogenous control. 1: actin 2: carotenoid hydroxylase 3: phytoene desaturase 4: isopentenyl pyrophosphate isomerase 5: β-carotene ketolase 6: chlorophyll a-b binding protein.

우 red cell에서 green cell 보다 약 20배의 높은 발현율을 보였고 phytoene desaturase의 경우는 약 4배, isopentenyl pyrophosphate isomerase는 1.61배, β-carotene ketolase는 3.13배의 발현량의 증가를 보인 반면, chlorophyll a-b binding protein(Cab)는 0.3배로 red cell보다 green cell에서 더 높게 발현되는 양상을 보였다. HPLC를 이용한 색소분석에서 광 및 질소결핍 스트레스 조건에서 total carotenoid 비율은 green cell에서 red cell이 되면서 증가하고, 반대로 total chlorophyll은 감소하는 현상을 보인다(Fig. 6). 광 스트레스에서는 일반적으로 엽록소의 합성이 감소되고 더불어 Cab 유전자들의 발현이 줄어들기 때문에 [7] 엽록소의 농도가 줄고 더불어 Cab 유전자의 발현이 감소하고 있다는 것은 세포가 광 스트레스를 받고 있다는 강력한 증거를 제공한다. 이와 같은 조건에서 astaxanthin 합성 경로에 있는 유전자들은 성장하기 좋은 조건에서 자란 green cell일 때보다 고광도 스트레스와 질소 결핍 배지에서 배양한 red cell일 때 더 높은 발현을 보이고 있는 것을 확인함으로써 astaxanthin 생합성에 관련한 효소들의 유전자가 전사단계부터 활성화 되어 astaxanthin 생합성이 촉진된다고 사료되었다.

요 약

*H. pluvialis*는 고광도와 질소 결핍 배지 조건에서 ketocarotenoid의 일종인 astaxanthin을 다량 축적하는 녹조류이다. 스트레스가 없는 조건에서 키운 green cell과 astaxanthin이 합성된 red cell을 HPLC를 통해 비교해 본 결과 각 색소의 양이 변화하는 것을 볼 수 있었다. 여러 ester 형태의 astaxanthin이 생합성 되고, zeaxanthin이 늘어난 반면, lutein과 β-carotene은 감소하였다. 또한 total chlorophyll의 양이 줄어드는 대신 total carotenoid의 양이 늘어남을 보였다. *H. pluvialis*에서 찾아낸 astaxanthin 생합성 경로에 있는 carotenoid hydroxylase, phytoene desaturase, isopentenyl pyrophosphate isomerase, β-carotene ketolase 유전자는 음성대조군인 chloroplast chlorophyll a-b binding protein와는 달리 cell이 성장하기 좋은 조건의 상태보다 astaxanthin을 생합성하기 위해 고광도의 스트레스를 받았을 때 더 높은 발현양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 한국 학술진흥재단의 2005년도 협동연구지원(과제번호: C0014)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**:1-15.
2. Bartley, G. E. and P. A. Scolink. 1995. Pigment for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell.* **7**: 1027-1038.
3. Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Plant Physiol.* **108**: 111-117.
4. Grünewald, K., M. Eckert, J. Hirschberg. and C. Hagen. 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and upregulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, chlorophyceae). *Plant Physiol.* **122**: 1261-1268.
5. Guerin, M., M. E. Huntley., and M. Olaizola. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* **21**:210-216.
6. Huang, J. C., F. Chen. and G. Sandmann. 2006. Stress-related differential expression of multiple β-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnol.* **122**: 176-185
7. Jin, E. S., B. Feth. and A. Melis. 2003. A Mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biothechnol. Bioeng.*

- 81**: 115-124.
8. Jin, E. S., C. G. Lee, and J. E. W. Polle. 2006. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (chlorophyceae) biosynthesis, regulation and biotechnology. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 821-831
  9. Kobayashi, M., Y. Kurimura., T. Kakizono., N. Nishio. and Y. Tsuji. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 94-97.
  10. Kobayashi, M. 2003. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotech. Biopro. Eng.* **8**: 322-330.
  11. Linden, H. 1999. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1446**: 203-212.
  12. Lorenz, R. T. and G. R. Cysewski. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* **18**: 160-167
  13. Lotan, T. and J. Hirschberg. 1995. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding  $\beta$ -4-C-oxygenase, that converts  $\beta$ -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS. Lett.* **364**: 125-128.
  14. Melis, A., M. Spangfort. and B. Andersson. 1987. Light-absorption and electrontransport balance between PSII and PSI in spinach chloroplasts. *Photochem Photobiol.* **45**: 129-136.
  15. Miao, F., D. Lu, M. Zeng, and Y. Li. 2006. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **352**:176-181
  16. Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* **20**: 459-466.
  17. Steinbrenner, J. and H. Linden. 2002. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol. Bio.* **52**: 343-356.
  18. Sun, Z., F. X. Cunningham. and E. Gantt. 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11482-11488.

(Received Oct. 4, 2007/Accepted Nov. 20, 2007)