

افزایش تولید آستاگزانتین از میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis*

رشید علیجانی اردشیر*

استادیار گروه زیست فناوری دریا ، دانشکده زیست فناوری ، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل

مرجان شفقتی

دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی ، دانشکده زیست فناوری ، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل

چکیده:

آستاگزانتین^۱ یکی از معروف ترین رنگدانه های طبیعی از دسته ی کاروتنوئیدها میباشد که به دلیل خواص سرشاری که دارد ، در زمینه های مختلفی مانند آبی پروری، پزشکی، تغذیه، آرایشی و بهداشتی و... کاربرد دارد. تولید طبیعی آستاگزانتین توسط ارگانیسم هایی مانند باکتری ها ، مخمر ها و جلبک ها صورت میگیرد. یکی از جلبک هایی که میتوان برای تولید آستاگزانتین از آن بهره برد جلبک تک سلولی آب شیرین *Haematococcus pluvialis* ، میباشد که تولید سطوح بالای آستاگزانتین در پاسخ به شرایط تنش در این ریزجلبک مشاهده میشود. با این حال، هنوز بحث های قابل توجهی در مورد ماهیت و برهمکنش های احتمالی عوامل غیرزیستی وجود دارد که تصور می شود مسئول اصلی تحریک سنتز این کاروتنوئید هستند. در این مطالعه به بررسی پارامترهای تغذیه ای و فیزیکی مختلفی که میتوانند بر افزایش تولید آستاگزانتین توسط جلبک *Haematococcus pluvialis* موثر باشند پرداخته شد.

کلمات کلیدی: آستاگزانتین ، کاروتنوئید ، *Haematococcus pluvialis*

¹ Astaxanthin

۱. مقدمه:

آستازانتین یکی از محصولات ریزجلبکی با ارزش در آینده است که در میان کاروتنوئیدها از قوی ترین آنتی اکسیدان ها میباشد که به طور گسترده در آبرزی پروری استفاده میشود و همچنین به دلیل دارا بودن اثرات قوی ضد پیری، ضد التهابی، ضد آفتاب بر روی ارگانسیم ها، تولید آستازانتین توجه صنایع مختلفی مانند موادغذایی و خوراکی و آرایشی را به خود جلب کرده (Cheng et al., 2016). با این حال، به دلیل وجود برخی خطرات یا عدم انجام تحقیقات کافی از نظر مصرف طولانی مدت، هنوز توسط صنایع غذایی مورد بررسی قرار نگرفته است. اگرچه هزینه آستازانتین مشتق شده طبیعی بالا است، اما تنها یک درصد سهم از کل آستازانتین موجود در بازار جهانی را به خود اختصاص می دهد. بنابراین، دانشمندان به دنبال راه هایی برای کاهش هزینه آستازانتین طبیعی هستند تا در دسترس مصرف کنندگان قرار گیرد (Kumar et al., 2022). جلبک تک سلولی *Haematococcus pluvialis* که حاوی ۱-۵ درصد آستازانتین میباشد به عنوان تنها جلبک تجاری شده برای تولید زیستی آستازانتین میباشد. اگرچه *Haematococcus pluvialis* بهترین منبع طبیعی آستازانتین است که تا به امروز شناخته شده است، اما بهره وری آن هنوز نیاز به بهبود دارد. آستازانتین به صورت تجاری یا از سنتز شیمیایی یا منابع طبیعی مانند ریزجلبک ها، مخمرها و محصولات جانبی سخت پوستان در دسترس است. اما آستازانتین جلبکی سهم کمی از بازار جهانی را تشکیل میدهد زیرا فرآیند تولید جایگزین مصنوعی آن هزینه های کمتری را در بر میگیرد (Niizawa et al., 2018).

۲. تولید آستازانتین در میکرو جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس

چرخه زندگی *Haematococcus pluvialis* شامل سه مرحله و چهار نوع مورفولوژی سلولی قابل تشخیص است: ماکروزوئید^۲، میکروزوئید^۳، پالملا^۴ و همتوسیست^۵؛ در شرایط کشت مطلوب در مراحل اولیه ی رشد رویشی، ماکروزوئیدها غالب هستند که در این حالت به صورت بیضی شکل (به شکل گلابی) هستند که یک ماتریکس خارج سلولی ژلاتینی را ارایه میدهند؛ تحت شرایط نامطلوب، این سلول ها شروع به از دست دادن تاژک های خود کرده و بزرگ تر میشوند و به پالملاهای غیر متحرک تبدیل میشوند؛ سلول هایی که در پالملا خود هستند در شرایط نامطلوب، زمانی که مرحله آلیانوسپور^۶ رخ می دهد، بالاترین سنتز آستازانتین را خواهند داشت (Niizawa et al., 2018). سلول های آلیانوسپور بالغ، رنگ قرمز روشنی دارند زیرا مقدار زیادی کاروتنوئید ثانویه (بیش از ۵ درصد وزن خشک سلول) به ویژه آستازانتین را که در قطرات لیپید در سیتوپلاسم رسوب می کند، در خود انباشته می کنند. هنگامی که شرایط محیطی یا کشت به حالت مطلوب باز می گردد، آلیانوسپور قرمز جوانه می زند و زئوسپورهای تاژک دار را تشکیل می دهد و چرخه رشد رویشی جدیدی را آغاز می کند. با توجه به ویژگی های رشد *Haematococcus pluvialis*، یک فرآیند دو مرحله ای برای کشت آن برای بهبود تولید آستازانتین پیشنهاد میشود. در مرحله اول، شرایط بهینه برای رشد میکرو جلبک برای دستیابی به تکثیر سلولی عظیم فراهم می شود. در مرحله دوم، شرایط رشد برای ایجاد استرس سلولی و تحریک سنتز و تجمع آستازانتین اصلاح می شود. بنابر این شرایط تولید آستازانتین به طور قابل توجهی متفاوت از شرایط رشد

² macrozooids

³ microzooids

⁴ palmella

⁵ haematocysts (aplanospores)

Haematococcus pluvialis است و در صنایع تجاری برای افزایش بهره وری تولید آستاگزانتین توسط *Haematococcus pluvialis* از سیستم کشت دو مرحله ای استفاده میکنند (Choi et al., 2002).

۳. برخی از کاربردهای آستاگزانتین:

- در صنعت آبی پروری: رنگ قرمز متمایل به نارنجی مشخصه این ماهی قزل آلا و سخت پوستان است که از کاروتنوئیدهای به دست آمده از خوراک آنها منشأ می گیرد که در پوست، ماهیچه، اسکلت بیرونی و غدد جنسی آنها به شکل شیمیایی اولیه یا در حالت تغییر یافته (بسته به گونه) رسوب میکند. کاروتنوئید غالب در اکثر سخت پوستان و ماهی قزل آلا آستاگزانتین است و از آنجایی که ماهیان پرورشی و سخت پوستان به منابع طبیعی آستاگزانتین دسترسی ندارند، بنابراین کل مصرف آستاگزانتین باید از خوراک آنها حاصل شود.
- استفاده از آستاگزانتین در صنعت آبی پروری نه تنها از نقطه نظر نگهدانه برای افزایش پذیرش مصرف کننده، بلکه به عنوان یک ماده مغذی ضروری برای رشد و تکثیر کافی گونه های با ارزش تجاری اهمیت دارد (Higuera-Ciapara et al., 2006).
- آستاگزانتین به عنوان یک آنتی اکسیدان و مکمل غذایی برای انسان عمل میکند: در حال حاضر طیف گسترده ای از محصولات آستاگزانتین در فروشگاه های مواد غذایی بهداشتی به صورت مکمل های غذایی به فروش می رسد. اکثر این محصولات از جلبک یا عصاره مخمر تولید می شوند. این مکمل ها به دلیل خواص آنتی اکسیدانی بالایی که دارند دارای خواص بالقوه ای در برابر بسیاری از بیماری ها هستند (Higuera-Ciapara et al., 2006).
- فعالیت ضد سرطانی
- پیشگیری از بیماری های قلبی عروقی
- اثر بر عفونت هلیکوباکتر پیلوری
- تقویت کننده و تعدیل سیستم ایمنی

۴. عوامل موثر در ایجاد شرایط استرس و تولید آستاگزانتین در میکروجلبک *Haematococcus pluvialis*:

نتایج بدست آمده از آزمایشات به وضوح نشان می دهد که بسیاری از پارامترهای تغذیه ای و محیطی، القاء کننده بالقوه تشکیل آستاگزانتین در سلول های *Haematococcus pluvialis* هستند.

۴.۱ کمبود نیتروژن:

در مطالعات اولیه ی *Haematococcus pluvialis*، تحت شرایط کشت کمبود نیتروژن، پس از کشت طولانی مدت بیش از یک ماه، یک تغییر مورفولوژیکی از سلول های رویشی متحرک سبز به اسپورهای غیر متحرک دیواره ضخیم مشاهده شد و تشکیل آستاگزانتین بیشتر تحریک شد (Kobayashi et al., 1992). در غلظت های پایین تر نیترات، رشد جلبک به شدت محدود شده و سطوح بالایی از آستاگزانتین در سلول های زنده مانده انباشته میشود (Harker et al., 1996). وضعیت کمبود نیتروژن قبل از افزایش شدت تابش متوسط در مرحله آخر پالملا باعث افزایش ۲۵ درصدی غلظت آستاگزانتین در مقایسه با افزایش همزمان تشعشع

و کمبود نیتروژن و استفاده از انرژی نور کارآمد برای بیوسنتز رنگدانه در مقایسه با سایر شرایط استرسی گزارش شده شد (Niizawa et al., 2018).

۴.۲ کمبود فسفات:

اثر کلی شرایط محدودکننده فسفات در *Haematococcus pluvialis* شبیه به اثرات مشاهده شده در کشت های با نیتروژن محدود است. یعنی کمبود فسفات در محیط کشت، باعث تحریک سنتز آستاگزانتین در این جلبک خواهد شد. با این حال، توجه به این نکته مهم است که کاهش سطح فسفات به اندازه گرسنگی نیتروژن در این جلبک رشد را مهار نمی کند و سطوح آستاگزانتین تولید شده در واحد حجم کشت ممکن است به طور قابل توجهی بالاتر باشد. نتایج به دست آمده در مطالعات انجام شده بیشتر از این فرضیه حمایت می کند که قرار گرفتن در معرض سطوح فسفات کم و نه بالا است که باعث تشکیل آستاگزانتین در سلول های *Haematococcus pluvialis* می شود (Harker et al., 1996).

۴.۳ آهن:

آهن موجود در محیط کشت تنها در غلظت های نسبتاً بالا بر تجمع آستاگزانتین تأثیر می گذارد. طبق مشاهدات، رشد در حضور سطوح پایین آهن تغییر کمی از نظر رشد سلولی یا تشکیل آستاگزانتین از سطوح کنترل ایجاد خواهد کرد (Harker et al., 1996).

هم چنین کوبایاشی و همکارانش گزارش دادند که افزایش آستاگزانتین ناشی از Fe^{2+} توسط پتاسیم یدید مهار میشود و طی این فرآیند HO از بین میرود، بنابر این میتوان نتیجه گرفت که HO تشکیل شده توسط واکنش فنتون کاتالیز شده با آهن برای افزایش بیوسنتز آستاگزانتین در جلبک *Haematococcus pluvialis* مورد نیاز است. همچنین طبق گزارش این محققان چهار گونه اکسیژن فعال تشکیل آستاگزانتین را در جلبک *Haematococcus pluvialis* تحریک میکنند (O_2 و H_2O_2 و رادیکال پراکسیل و رادیکال آنیون سوپر اکسید) (Kobayashi et al., 1993).

۴.۴ شوری:

مطالعات نشان میدهند که قرار گرفتن در معرض افزایش شوری باعث تشکیل آستاگزانتین در جلبک می شود. در مقابل، KCl اثر مضر بر رشد جلبک و در نتیجه تشکیل آستاگزانتین در واحد حجم محیط کشت در تمام غلظتها داشت (Harker et al., 1996).

۴.۵ تابش زیاد:

طبق مطالعات انجام شده شدت نوری که کشت *Haematococcus pluvialis* در معرض آن قرار گرفته بود، تأثیر قابل توجهی بر سطح آستاگزانتین انباشته شده در سلول ها داشت. شدت نور بالا باعث می شود که مقادیر نسبتاً زیادی آستاگزانتین در سلول های *Haematococcus pluvialis* انباشته شود. حتی اگر قرار گرفتن در معرض شدت نور بالا منجر به میزان بالایی از مرگ و میر سلولی شود، سلول هایی که زنده ماندند حاوی مقادیر زیادی آستاگزانتین بودند. در شدت نور کمتر، میزان آستاگزانتین انباشته شده در مقایسه با آن بسیار کم بود، اما میزان بقای جلبک ها به طور قابل توجهی افزایش یافت (Harker et al., 1996).

هم چنین گزارش شده که روشنایی مداوم به جای چرخه روشنایی نور/تاریکی برای تشکیل آستاگزانتین مطلوب تر است. (Harker et al., 1996).

۴/۶ تأثیر فلزات دیگری مانند Cu^{2+} و Mg^{2+} و Cd^{2+} بر کارتنوئید در جلبک *Haematococcus pluvialis* مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد همه ی این فلزات به جز Cu^{2+} محتوای کاروتنوئید را در جلبک افزایش دادند اما رشد جلبک را به شدت مهار کردند (Harker et al., 1996).

۴.۷ افزودن استات سدیم:

استات سدیم پنج یا ۱۰ میلی مولار محتوای آستاگزانتین را بیش از دو برابر در مقایسه با سلول های بدون استات سدیم پس از ۶ روز انکوباسیون افزایش داد، که نشان می دهد استات سدیم تجمع آستاگزانتین را در مرحله غیر متحرک به طور قابل توجهی تسریع می کند. افزودن استات سدیم پارامترهای فلورسانس کلروفیل و همچنین نرخ فتوسنتز را مهار کرد، که نشان می دهد استات سدیم افزون فعالیت فتوسنتزی را سرکوب می کند. با این حال، استات سدیم اضافی باعث افزایش تعداد تنفس شد. می توان حدس زد که تنفس تقویت شده نقش مهمی در تسریع تجمع آستاکسانتین در حضور استات سدیم ایفا می کند، زیرا استات می تواند توسط چرخه تری کربوکسیلیک اسید تنفسی برای تولید اسکلت های کربن و $NAD(P)H$ برای سنتز آستاگزانتین استفاده شود (Zhang et al., 2019). روی هم، استات سدیم افزون، تجمع آستاگزانتین و ظرفیت محافظت از نور را در *Haematococcus pluvialis* در مرحله غیر متحرک افزایش می دهد.

۴.۸ استفاده از نور مصنوعی جهت افزایش تولید آستاگزانتین در میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis*:

افزایش تولید آستاگزانتین با استفاده از *Haematococcus pluvialis* با استراتژی جدید تغییر طول موج LED:

استفاده از نور خورشید به عنوان یک منبع انرژی دارای چندین اشکال است مانند: تغییرات در شرایط آب و هوایی، چرخه روز / شب، و تغییرات فصلی. با این حال، اگرچه نور مصنوعی نه تنها بهره وری را افزایش می دهد، بلکه هزینه های مربوط به کشت ریز جلبک را نیز افزایش می دهد. بنابراین، انتخاب شدت تابش یک پارامتر مهم برای دستیابی به تعادل انرژی مثبت برای تولید متابولیت با ارزش افزوده بالا با استفاده از PBRs (photo-bioreactors) است (Niizawa et al., 2018).

مشخص شد که نور مهم ترین عامل در القای بیوسنتز آستاگزانتین در *Haematococcus pluvialis* است. علیرغم نقش حیاتی نور در القای بیوسنتز آستاگزانتین، اطلاعات محدودی در مورد توسعه بیشتر سیستم های تولید آستاگزانتین بر اساس روشنایی کارآمد نور در دسترس است. در این راستا، شکی نیست که دیودهای ساطع نور (LED) باید به عنوان منبع نور نسل بعدی در نظر گرفته

شوند و جایگزین منابع نور سنتی برای تولید آستاگزانتین از طریق کشت *Haematococcus pluvialis* شوند (Xi et al., 2016)

داده ها به وضوح نشان می دهد که طول موج آبی می تواند یکی از عوامل القایی مختلف برای بیوسنتز آستاگزانتین باشد. مشاهده زیر میکروسکوپ تشریح به وضوح نشان داد که مورفولوژی سلول، مانند اندازه سلول، با روشنایی طول موج آبی افزایش می یابد. سلول های *Haematococcus pluvialis* کشت شده در زیر LED های آبی بزرگتر از سلول های کشت شده در LED های قرمز بودند. اندازه گیری اندازه سلول نشان داد که سلول هایی که در زیر LED های آبی رشد می کنند، تقریباً ۱۵ تا ۲۰ درصد افزایش قطر را در مقایسه با سلول های زیر LED قرمز نشان می دهند. علاوه بر این، ویژگی های فنوتیپی معمولی عدم وجود تاژک را با رنگ مایل به قرمز نشان دهنده تجمع آستاگزانتین شناسایی شد. همه مشاهدات (به عنوان مثال، فقدان تاژک با رنگ مایل به قرمز و افزایش اندازه سلول) که تحت نور طول موج آبی تشخیص داده شده است، نشان دهنده توسعه مرحله استراحت غیر متحرک به نام کیست^۷ است که با بیوسنتز آستاگزانتین همراه است.

۵. رویکرد نوآورانه برای افزایش بهره وری *Haematococcus pluvialis*:

گزارش شده است که کربن آلی می تواند تولید آستاگزانتین را در *Haematococcus pluvialis* با ترویج جذب کربن افزایش دهد، که به نوبه خود منجر به سلول های القایی با دیواره سلولی ضخیم می شود. بنابراین، امکان افزایش بیشتر در تولید آستاگزانتین از طریق تیمار همزمان کربن های آلی و نور آبی مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین، کاربرد همزمان استات (۲٪) و طول موج آبی در مقایسه با سایر آزمایش ها انجام و ارزیابی شد. استات (۲٪) موثرترین کربن آلی برای القاء است. جالب توجه است که کاربردهای همزمان طول موج آبی و همچنین منبع کربن اضافی می تواند منجر به افزایش بیشتر در تولید آستاگزانتین شود. طبق مشاهدات حدس زده شد که روشنایی طول موج آبی قطعاً باعث استرس سلولی در *Haematococcus pluvialis* می شود و افزودن استات احتمالاً به افزایش اندازه سلول با تشکیل کیست کمک می کند و در نتیجه ظرفیت تجمع آستاگزانتین را بیشتر می کند. از این رو، نشان داده شد که کاربردهای همزمان طول موج آبی و همچنین منبع کربن اضافی مانند استات می تواند یکی از قوی ترین عوامل القایی برای تولید آستاگزانتین در *Haematococcus pluvialis* باشد (Xi et al., 2016).

روی هم رفته، می توان استراتژی زیر را برای تولید آستاگزانتین در *Haematococcus pluvialis* پیشنهاد کرد (Xi et al., 2016).

- ۱- تغییر طول موج مناسب از LED های قرمز (به خوبی با مرحله متحرک سبز مطابقت دارد) به LED های آبی (برای مرحله کیست قرمز) می تواند برای افزایش تولید آستاگزانتین استفاده شود.
- ۲- نور آبی را می توان با استفاده همزمان از منبع کربن، به عنوان مثال، استات، برای افزایش بیشتر بهره وری به کار برد

⁷ cyst



۶. نتیجه گیری:

Haematococcus pluvialis غنی ترین منبع آستاگزانتین طبیعی است، اما تولید آستاگزانتین مشتق از *Haematococcus pluvialis* معمولاً به دلیل تکثیر سلولی آهسته و تجمع آستاگزانتین محدود می شود. تلاش‌ها برای افزایش بهره‌وری زیست توده، تجمع آستاگزانتین و استخراج ادامه دارد. موارد ذکر شده در این مقاله راه هایی هستند که میتوان با بهره گیری از آن ها برای بهبود تولید آستاگزانتین از میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis* و ابداع روش هایی جهت افزایش بهره برداری استفاده نمود. میکرو جلبک *Haematococcus pluvialis* با تحریک مسیرهای متابولیکی خود، که در آن امکان اصلاح بیوشیمیایی وجود دارد، توانایی سازگاری با شرایط مختلف کشت و مواد مغذی موجود در محیط کشت را دارد. (Marinho et al., 2021) بنابر این می توان نتیجه گرفت که هر عاملی که با فرآیندهای سلولی خاصی در جلبک تداخل داشته باشد (و از این رو رشد یا فتوسنتز را محدود می کند) می تواند به عنوان یک محرک برای تشکیل آستاگزانتین عمل کند.



۷. منابع:

- CHENG, J., LI, K., YANG, Z., ZHOU, J. & CEN, K. 2016. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresource Technology*, 204, 49-54
- Y. S. & PARK, J. M. 2002. Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis*, with fractional factorial design. *Biotechnol Prog*, 18, 1170-5
- HARKER, M., TSAVALOS, A. J. & YOUNG, A. J. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 55, 207-214
- HIGUERA-CIAPARA, I., FÉLIX-VALENZUELA, L. & GOYCOOLEA, F. M. 2006. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 185-196
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T. & NAGAI, S. 1993. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 867-873
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NISHIO, N. & NAGAI, S. 1992. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 61-63
- KUMAR, S., KUMAR, R., KUMARI, A. & PANWAR, A. 2022. Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. *J Basic Microbiol*, 62, 1064-1082
- DOS SANTOS, A. P. F., DE MORAES, J. MARINHO, Y. F., MALAFAIA, C. B., DE ARAÚJO, K. S., DA SILVA, T. D L. B. & GÁLVEZ, A. O. 2021. Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*, 29, 757-7
- NIIZAWA, I., ESPINACO, B. Y., LEONARDI, J. R., HEINRICH, J. M. & SIHUFÉ, G. A. 2018. Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under autotrophic growth conditions by a sequential stress strategy. *Prep Biochem Biotechnol*, 48, 5
- XI, T., KIM, D. G., ROH, S. W., CHOI, J. S. & CHOI, Y. E. 2016. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 6231-6238
- ZHANG, C., ZHANG, L. & LIU, J. 2019. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage. *Journal of Applied Phycology*, 31, 1001-1008