تأثیر شوری، ائوزین و کمبود فسفات بر میزان رشد و تولید آستاگزانتین در جلبک سبز تک‌سلولی هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*)

صادق فرهی آشتیانی[۱]، مجید مهدیه[۱] و ایرج نحوی[۲]

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی چگونگی افزایش تولید کتوکاروتنویید آستاگزانتین در جلبک سبز هماتوکوکوس پلوویالیس، تأثیر شوری، ائوزین و کمبود فسفات بر میزان رشد و تولید آستاگزانتین انجام شده است. آزمایش‌های لازم، تحت شرایط سترون در اطاقک رشد با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته است.

نتایج نشان می‌دهد که شوری، کمبود فسفات و مصرف ائوزین کیست‌زایی را تحریک می‌کند، و هم‌زمان تشکیل آستاگزانتین و میزان وزن خشک جلبک افزایش می‌یابد. با افزودن هیستیدین به محیط کشت، به عنوان یک خاموش کننده اکسیژن یکتایی، تشکیل آستاگزانتین نیز تحت شرایط کمبود فسفات کاهش می‌یابد. از این رو، می‌توان گفت شاید انباشته شدن آستاگزانتین در جلبک به پاسخ‌های آنتی اکسیداتیو آن مربوط باشد، که زنده‌مانی سلول‌های جلبک را تحت شرایط دشوار محیطی افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ***شوری، کمبود فسفات، ائوزین، آستاگزانتین، هماتوکوکوس پلوویالیس***

مقدمه

آستاگزانتین (۳و ′۳-دی هیدروکسی-β، β-کاروتن-٤، ′٤-دی‌اون)، کتوکاروتنویید قرمز رنگی است که در گیاهان، جانوران، باکتری‌ها و قارچ‌ها شناسایی شده است (۱۷). این ماده در جانوران دریایی به طور گسترده پراکنده شده، و رنگ قرمز تا صورتی ماهی آزاد، قزل‌آلا، و سخت‌پوستان به این کاروتنویید نسبت داده شده است (۲۷). به علاوه، این کاروتنویید در ترکیب با پروتئین‌ها و لیپیدها، انواع رنگ‌های آبی، سبز، بنفش و ... را در موجودات دریازی ایجاد می‌کند. به همین دلیل امروزه از آن به طور وسیع در صنایع شیلات برای رنگ کردن گوشت

۱. به ترتیب استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

۲. استادیار زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

ماهی‌های پرورشی استفاده می‌شود (۲۷ و ۲۸). آستاگزانتین به دلیل داشتن خاصیت آنتی اکسیداتیو (۲۵)، افزایش پاسخ ایمنی بدن (۱۸ و ۱۹) و خاصیت ضد سرطانی (۱۲)، در صنایع دارویی به کار می‌رود.

منابع طبیعی آستاگزانتین بسیار است، ولی تا امروز عظیم‌ترین منبع طبیعی آن در جهان جلبک سبز تک‌سلولی هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) گزارش شده است (۱۷). جلبک هماتوکوکوس یک جلبک سبز تک‌سلولی دو تاژکی آب شیرین از راسته ولووکال (Volvocales) بوده که تحت شرایط تنش، مقادیر زیادی آستاگزانتین را تولید و در سیتوپلاسم خود انباشته می‌کند (۱۳). تجمع آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس، با تغییر مورفولوژیک سلول‌های سبز تاژک‌دار (سلول‌های رویشی) به اسپورهای غیر متحرک (کیست) قرمز غنی از آستاگزانتین همراه می‌باشد (۲۲).

تجمع آستاگزانتین در این جلبک، تحت شرایط تنش‌های مختلف، مانند کمبود ازت (۸)، کمبود فسفات (۳)، کمبود منیزیم (۸)، شدت نور زیاد (۱۰ و ۱٤)، دمای زیاد (۹ و ۳۰)، شوری (۲٤) و تنش اکسیداتیو (۱۰ و ۲۳) بررسی شده است. احتمال می‌رود اکسیژن یکتایی، مؤثرترین نوع اکسیژن فعال برای تشدید بیوسنتز آستاگزانتین در کیست‌های جلبک هماتوکوکوس باشد (۲۳). در ضمن، مشخص شده است که ائوزین به عنوان یک تولید کننده اکسیژن یکتایی عمل می‌کند (۲۰)، زیرا اکسیژن یکتایی، در تحریک بیوسنتز آستاگزانتین در این جلبک نقش دارد (۲۳). فان و همکاران (۱۰)، احتمال می‌دهند که در این جلبک تحت شرایط کمبود فسفات، اکسیژن یکتایی تولید می‌شود، و به نظر می‌رسد، این جلبک تحت چنین شرایطی از تنش اکسیداتیو رنج می‌برد. زیرا مادهٔ DABCO که یک خاموش کنندهٔ اختصاصی اکسیژن یکتایی است، قادر است در غلظت ۰/۰۱ مولار، به طور کامل از کاروتن‌زایی تحریک شده توسط انواع اکسیژن فعال، جلوگیری کند (۲۳).

از آن جا که سرعت رشد این جلبک در مقایسه با دیگر جلبک‌ها پایین بوده (۱۵)، و تاکنون پژوهش‌های کمی در زمینه بهینه‌سازی شرایط رشد این جلبک صورت گرفته است (۱۱)، و با در نظر گرفتن این که شرایط بهینه برای رشد و تولید آستاگزانتین در این جلبک متفاوت است، عموماً کشت این جلبک در دو فاز مختلف پیشنهاد می‌شود؛ یعنی ابتدا باید شرایطی که رشد را تقویت و تحریک می‌کند فراهم گردد، و هنگامی که زیتودهٔ کافی حاصل شد، شرایط برای تولید آستاگزانتین تغییر داده شود (۵). از این رو، برای تولید انبوه آستاگزانتین می‌بایست بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آستاگزانتین به طور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد (۱٤).

با توجه به این که تاکنون پژوهش‌های چندانی در زمینهٔ جداسازی و کشت جلبک هماتوکوکوس در ایران صورت نگرفته، هدف از این پژوهش، علاوه بر جداسازی و کشت این جلبک در ایران، بررسی بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آستاگزانتین در آن نیز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت جلبک

برای کشت جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، از محیط کشت بولد (۱۵)، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و اطاقک کشت استفاده شد. سویهٔ جلبک مورد بررسی، قبلاً از آب یک استخر سیمانی، در محوطه دانشگاه اصفهان شناسایی و خالص‌سازی شده بود (۱). به این ترتیب که نخست جلبک توسط کلید شناسایی که به وسیله فریچ (Fritsch) مورد استفاده قرار گرفته است، شناسایی شده، سپس با استفاده از یک میکروپیپت شیشه‌ای که انتهای آن توسط یک لولهٔ پلاستیکی به سر نخ متصل می‌شد، کیست‌های در حال جوانه‌زنی این جلبک از جلبک‌های دیگر و میکروارگانیسم‌های همراه آن جدا گردید. عمل جداسازی، ضمن بازکشت جلبک‌های جدا شده، چند مرتبه تکرار گردیدتا جلبک خالص هماتوکوکوس به دست آمد. سرانجام اسپورهای جلبک خالص شده برای تکثیر به محیط کشت استریل بولد منتقل شده و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۵۰۰

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

لوکس و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

پس از جوانه‌زنی کامل کیست‌های قرمز رنگ، عمل خالص‌سازی سلول‌های متحرک رویشی تاژک‌دار این جلبک (نگاره ۱) به روش پلتینگ (Plating)، از طریق افشاندن آنها روی محیط کشت جامد در داخل پتری‌دیشی که حاوی ۲۵ $\mu g.ml^{-1}$ استرپتومایسین بود (برای جلوگیری از رشد جلبک‌های سیانوفیسه و باکتری‌ها)، انجام گردید (۵).

در کلیهٔ آزمایش‌های این پژوهش از کیست‌های قرمز رنگ استفاده شده است. برای جوانه‌زنی کیست‌های قرمز رنگ و تکثیر سلول‌های رویشی این جلبک، از شدت نور ۵۰۰ لوکس، دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی استفاده گردید. البته پس از تلقیح کشت و آغاز اعمال تیمارها، شرایط نور تغییر داده شد و از شدت نور ٤٥٠٠ لوکس و نور دایم استفاده گردید.

در آزمایش‌های مربوط به کاهش غلظت فسفات، نخست سلول‌های هماتوکوکوس پلوویالیس در فاز رشد رویشی با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه برداشت شدند و به محیط کشت بدون فسفات منتقل گردیده و تکثیر شدند، سپس میزان فسفر مربوط به هر تیمار به محیط کشت اضافه شد. یادآوری می‌شود که در کلیهٔ آزمایش‌ها، در آغاز اعمال تیمار، تمام سلول‌ها در فاز رویشی و سبز بودند. تیمارهای هر آزمایش به شرح جدول ۱ بوده و همگی در سه تکرار انجام گردیدند. در آزمایش با غلظت‌های مختلف فسفات، املاح فسفاته محیط کشت بولد، با غلظت‌های ذکر شده در جدول مصرف شدند. هم‌چنین، در این بررسی آزمایش‌ها تحت شرایط سترون صورت گرفت، و برای سترون نمودن موادی که در اتوکلاو از بین می‌روند، نظیر ائوزین، از فیلترهای میلی‌پور سترون (۰/٤٥ میکرون) استفاده شد.

آنالیزها

مراحل این آزمایش بدین صورت انجام گرفت که ابتدا در هر نمونه تعداد سلول‌های جلبک با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش شد. سپس برابر روش کوبایاشی و همکاران (۲۲)، حجم معینی از سوسپانسیون جلبک سانتریفیوژ و رسوب به وجود آمده، پس از خشک کردن در دمای اتاق، با ذرات کوچک شیشه در استن ۹۰٪ سرد (روی یخ) و حدود ٤ درجه سانتی‌گراد و نور ضعیف، در داخل هاون ساییده و کاروتنویید آنها استخراج گردید. عمل استخراج چندین مرتبه ادامه یافت تا کیست‌ها به طور کامل سفید رنگ شدند. پس از سانتریفیوژ کردن عصاره، میزان آستاگزانتین محتوی آن در طول موج ٤٨٠ نانومتر با استفاده از ضریب جذب ۲۵۰۰= $A^{1cm}_{\%1}$ تعیین گردید (۲۳). کلروفیل محتوی نمونه‌ها نیز مطابق روش فان و همکاران (۹)، و با استفاده از دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد استخراج شد. پس از سانتریفیوژ کردن عصاره کلروفیلی، میزان کلروفیل کل در طول موج ٦٧٣ نانومتر، با استفاده از ضریب جذب ۸۷۰= $A^{1cm}_{\%1}$ اندازه‌گیری شد (۹). هم‌چنین، پس از فیلتر کردن ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی جلبک، توسط فیلترهای میلی‌پور (۰/٤٥ میکرون) و خشک کردن آن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت، وزن خشک جلبک برحسب گرم در لیتر تعیین گردید (۹).

سرعت رشد نسبی جلبک با استفاده از معادله $\mu = (LnX_2 - LnX_1)/dt$ محاسبه گردید (۹). در این معادله X بیوماس (وزن خشک یا تعداد سلول در میلی‌لیتر)، و dt زمان مورد نیاز برای افزایش در بیوماس از X_1 به X_2 می‌باشد. هم‌چنین، مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ با کمک نرم‌افزار آماری SPSS صورت گرفته است.

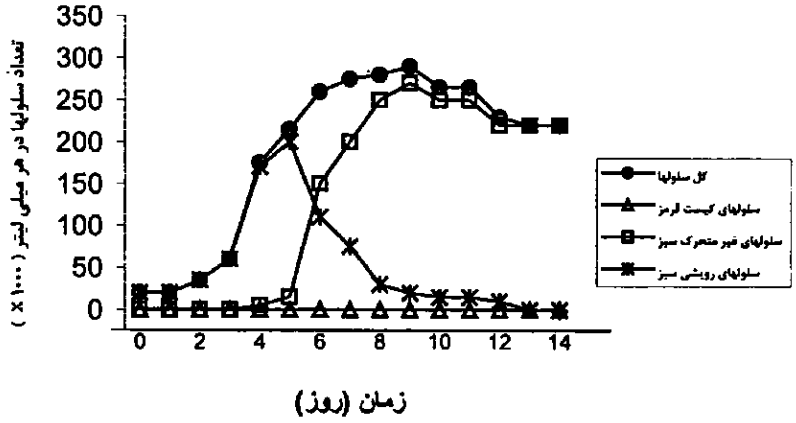
نتایج

جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس کشت شده در محیط کشت بولد، در دو هفته اول به رنگ سبز و در دوران کیست‌زایی به رنگ قرمز ظاهر می‌شد (نگاره ۲).

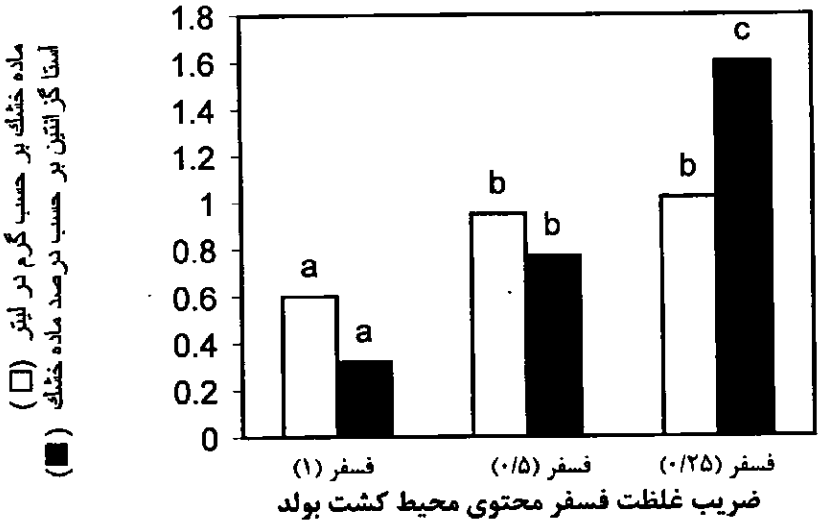
بررسی رشد این جلبک در مدت دو هفته، نشان می‌دهد که فراوانی سلول‌های متحرک رویشی تا روز پنجم از زمان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]



نمودار ۱. تغییرات تعداد سلول‌های رویشی سبز، سلول‌های غیر متحرک سبز و سلول‌های کیست قرمز جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در محیط کشت بولد در دو هفته



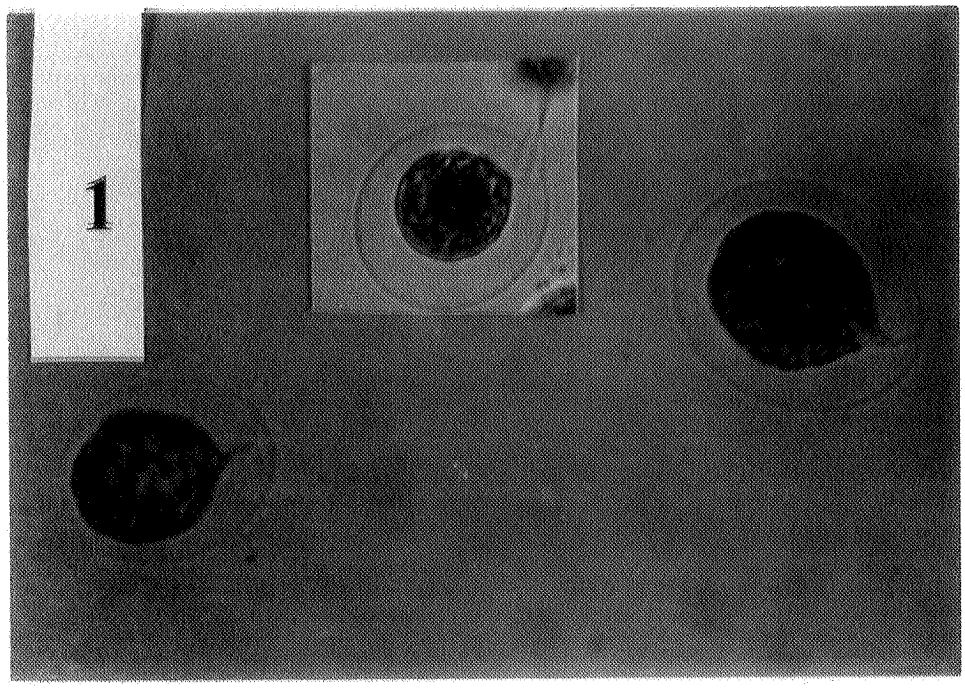
نمودار ۲. تأثیر غلظت فسفر محیط کشت بولد بر میزان وزن ماده خشک و آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس. اعداد در پرانتز از چپ به راست، به ترتیب ضریب غلظت فسفر در محیط کشت بولد می‌باشد.

انکوباسیون افزایش یافته است (نمودار ۱). در روز پنجم تعداد سلول‌های متحرک رویشی به حداکثر خود رسید. پس از پنج روز تعداد سلول‌های متحرک رویشی شروع به کاهش نموده، در عوض تعداد سلول‌های سبز به فرم کلنی (فرم پالملوییید (Palmeloid)) شروع به افزایش کرد. در روز نهم تعداد سلول‌های سبز به بیشینهٔ $۲/۷\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر رسید، و به دنبال آن، در روز دوازدهم به تعداد $۲/۵\times۱۰^{۵}$، و سرانجام به $۲/۲\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد، و تا روز چهاردهم به همین صورت بدون تغییر باقی ماند (نمودار ۱). در طول مدت ۱٤ روز کشت، هیچ سلول کیست قرمز رنگی در محیط کشت مشاهده نگردید. در ضمن، تعداد کل سلول‌ها از روز دهم شروع به کاهش نمود.

نتیجهٔ تأثیر کاهش غلظت فسفات محلول غذایی بولد بر میزان رشد و تولید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در نمودار ۲ آورده شده است. وزن خشک جلبک هماتوکوکوس در محیط کشت بولد با فسفات کامل [فسفر (۱)] پس از یک ماه کشت، به طور چشم‌گیری کمتر از تیمارهای

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]



نگاره ۱. سلول‌های سبز رویشی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس (۴۰۰×)

نگاره ۲. جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس کشت شده در محیط کشت بولد. ارلن شماره ۱ مربوط به دوران رشد رویشی (به رنگ سبز)، و ارلن شماره ۲ مربوط به دوران کیست‌زایی (به رنگ قرمز) دیده می‌شود.

حاوی $\frac{1}{2}$ فسفات و $\frac{1}{4}$ فسفات کامل بوده است، به طوری که جلبک‌های تیمار $\frac{1}{2}$ فسفات و $\frac{1}{4}$ فسفات با یکدیگر اختلاف تفاوت معنی‌داری با آنها نشان می‌دهد، ولی وزن ماده خشک معنی‌داری نداشتند. هم‌چنین، معلوم گردید که میزان آستاگزانتین

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

جدول ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر میزان وزن ماده خشک و تولید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در شرایط محیط کشت بولد حاوی فسفات کامل در مدت یک ماه (میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار)[۱]

تیمار	وزن خشک[۲] (گرم در لیتر)	میزان آستاگزانتین در جلبک[۳]		
		میلی‌گرم در لیتر	میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک	درصد وزن خشک
بدون نمک (شاهد)	۰/۸۵±۰/۰۶ b	۳/٤۰±۰/٤۷ a	٤/۰۰±۰/۳۲ a	٪۰/٤ a
۸ میلی‌مولار نمک	۱/۰٤±۰/۰٤ c	۵/۵۰±۰/۵۵ b	۵/۲۸±۰/۳۵ b	٪۰/۵۳ b
۲۰ میلی‌مولار نمک	۱/۰۲±۰/۰۳ c	۱۷/۸٦±۰/۵٤ d	۱۷/٦±۰/۳ d	٪۱/۷٦ d
۵۰ میلی‌مولار نمک	۰/۷۵±۰/۰۵ a	۸/۷۸±۰/٤۵ c	۱۱/۷۱±۰/۱۹ c	٪۱/۱۷ c

۱. مقایسهٔ میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند، از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند (آزمون دانکن).
۲. وزن خشک جلبک در آغاز آزمایش مساوی ۰/۱۲ گرم در لیتر، برابر ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر بوده است.
۳. جلبک‌ها در آغاز آزمایش در فاز رویشی بودند (جلبک‌ها در فاز رویشی فاقد آستاگزانتین هستند).

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر میزان وزن ماده خشک و تولید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در شرایط محیط کشت بولد بدون مصرف فسفات در مدت ده روز (میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار[۱])

تیمار	وزن خشک[۲] (گرم در لیتر)	میزان کلروفیل در جلبک[۳]		میزان آستاگزانتین در جلبک[٤]		
		میلی‌گرم در لیتر	میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک	میلی‌گرم در لیتر	میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک	درصد وزن خشک
بدون نمک (شاهد)	۰/۸٤±۰/۰۳ a	۰/۵۰±۰/۰٦ c	۰/۵۹±۰/۰٦ c	۱۱/۹۸±۰/۲۹ ab	۱٤/۲٦±۰/٦۷ ab	٪۱/٤ ab
۲۰ میلی‌مولار نمک	۰/۸۳±۰/۰٤ a	۰/٤۹±۰/۰۳ c	۰/٦±۰/۰۵ c	۱۳/۹۵±۲/۰۷ b	۱٦/۷۷±۱/۹٦ b	٪۱/۷ b
۳۰ میلی‌مولار نمک	۰/۸٦±۰/۰۱ a	۰/۳۳±۰/۰٤ b	۰/۳۸±۰/۰٦ b	۲۲/٦٦±۲/۰۵ d	۲٦/٤۷±۲/۱۲ d	٪۲/٦ d
٤۰ میلی‌مولار نمک	۰/۸٤±۰/۰۳ a	۰/۲۸±۰/۰۳ ab	۰/۳۳±۰/۰۳ ab	۱۸/۸±۱/۱۲ c	۲۲/٤٦±۲/۱۳ c	٪۲/۲ c
۵۰ میلی‌مولار نمک	۰/۷۳±۰/۰۳ b	۰/۲۲±۰/۰۲ a	۰/۳۰±۰/۰۲ a	۹/۸۹±۰/۵۸ a	۱۳/۲۳±۰/۸۵ a	٪۱/۳ a

۱. مقایسهٔ میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند، از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند (آزمون دانکن).
۲. وزن خشک جلبک در آغاز آزمایش مساوی ۰/۱۸ گرم در لیتر، برابر $۲/۲۵\times۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر بوده است.
۳. میزان کلروفیل جلبک در آغاز آزمایش برابر ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت بوده است.
٤. جلبک‌ها در آغاز آزمایش در فاز رویشی بودند (جلبک‌ها در فاز رویشی فاقد آستاگزانتین هستند).

جلبک در محیط کشت بولد با فسفات کامل، به طور معنی‌داری پایین‌تر از تیمارهای $\frac{۱}{۲}$ فسفات و $\frac{۱}{۴}$ فسفات می‌باشد، و میزان آستاگزانتین جلبک در تیمارهای $\frac{۱}{۲}$ فسفات و $\frac{۱}{۴}$ فسفات نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند.

شوری نیز عامل مؤثری برای تحریک تولید کیست و تجمع آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس است. از ارقام جدول ۱ چنین استنباط می‌شود که در تیمار ۵۰ میلی‌مولار نمک، وزن ماده خشک جلبک به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر و شاهد کاهش می‌یابد. در ضمن، بیشترین وزن ماده خشک در تیمارهای ۸ میلی‌مولار و ۲۰ میلی‌مولار نمک حاصل گردید، که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند، ولی با تیمار ۵۰ میلی مولار نمک و شاهد دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (جدول ۱).

تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر انباشتگی آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس نیز بررسی شد. مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که کلیهٔ غلظت‌های نمک بر میزان آستاگزانتین جلبک اثر

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

معنی‌دار دارند (جدول ۱). بیشترین غلظت آستاگزانتین (۱/۷٦ درصد مادهٔ خشک) مربوط به تیمار ۲۰ میلی‌مولار نمک، و کمترین غلظت آن (۰/٤ درصد مادهٔ خشک) مربوط به تیمار بدون نمک (شاهد) می‌باشد.

تأثیر غلظت‌های مختلف نمک در شرایط مصرف نکردن فسفر بر میزان آستاگزانتین جلبک نیز قابل ملاحظه بود. همان گونه که در جدول ۲ دیده می‌شود، در شرایط نبود فسفات، وزن خشک جلبک در تیمارهای ۲۰، ۳۰ و ٤۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد (بدون نمک) اختلاف معنی‌داری نداشته، ولی در تیمار ۵۰ میلی‌مولار، وزن خشک جلبک به طور چشم‌گیری کمتر از دیگر تیمارها و شاهد بوده است.

هم‌چنین، در این آزمایش میزان آستاگزانتین جلبک در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شده است. با مقایسهٔ میانگین‌ها در جدول ۲، مشاهده می‌شود که از لحاظ میزان آستاگزانتین، اختلاف تیمار ۲۰ میلی‌مولار با تیمار بدون نمک معنی‌دار نمی‌باشد. بالاترین میزان آستاگزانتین جلبک، به ترتیب مربوط به تیمارهای ۳۰ و ٤۰ میلی‌مولار نمک است، که نسبت به بقیه تیمارها به طور معنی‌داری بالاتر است.

با توجه به نمودار ۳ ملاحظه می‌شود که پس از دو هفته کشت، کمترین وزن خشک جلبک در تیمار شاهد و بیشترین وزن خشک در تیمار مصرف نمک بوده است. در ضمن، معلوم گردید که مصرف ائوزین نیز همانند شوری، باعث افزایش وزن خشک جلبک در مقایسه با شاهد می‌شود. هم‌چنین، وزن مادهٔ خشک جلبک در تیمار ائوزین به تنهایی، و تیمار توأم ائوزین و شوری، در سطح ۵٪ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

افزودن توأم نمک و ائوزین به محیط کشت جلبک، موجب تشدید بیوسنتز آستاگزانتین شده و اثر افزودن توأم این دو ماده بر انباشتگی آستاگزانتین، بیشتر از افزودن هر یک از آنها به تنهایی می‌باشد، به طوری که آستاگزانتین در این تیمار به طور معنی‌دار افزایش یافته است (نمودار ۳).

از نمودار ۳ می‌توان دریافت که در کلیه تیمارهای مربوط به مصرف شوری و ائوزین، میزان تشکیل آستاگزانتین نسبت به شاهد به طور چشم‌گیری زیادتر گردیده است. در ضمن، افزودن نمک به محیط کشت، موجب افزایش معنی‌دار آستاگزانتین جلبک نسبت به افزودن ائوزین نیز می‌گردد.

در آزمایش دیگری، با افزودن هیستیدین به محیط کشت، به عنوان یک خاموش کنندهٔ اکسیژن یکتایی، معلوم شد که هیستیدین هیچ تأثیری بر تعداد سلول، وزن خشک جلبک و نیز انباشتگی آستاگزانتین ندارد، و روند رشد جلبک در این تیمار همانند شاهد می‌باشد. ولی هنگامی که فسفات از محیط کشت جلبک حذف می‌شود، کیست‌زایی به سرعت تحریک شده و تشکیل آستاگزانتین نیز تشدید می‌گردد و منفی شدن سرعت رشد (از لحاظ تعداد سلول) تحت این شرایط، که ناشی از چسبیدن سلول‌های رویشی (دو به دو) برای تشکیل کیست است، ملاحظه می‌شود (جدول ۳ و ٤). با ملاحظه جدول ٤، نتیجه می‌شود که بالاترین میزان آستاگزانتین در تیمار بدون فسفات به دست می‌آید، که آن نیز با افزایش زمان انکوباسیون، به طور معنی‌دار افزایش می‌یابد. همان گونه که از جدول ٤ استنباط می‌شود، در شرایط نبود فسفات، افزودن هیستیدین به محیط کشت جلبک، باعث کاهش معنی‌دار تشکیل آستاگزانتین در طی هفته‌های اول و دوم، نسبت به محیط کشت بدون هیستیدین می‌گردد.

بحث

با کشت جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در محیط کشت بولد، معلوم گردید که تقسیم سلول‌های رویشی متحرک پس از پنج روز باز می‌ایستد (نمودار ۱). پس از توقف عمل تقسیم سلولی در سلول‌های تخم مرغی شکل متحرک، سلول‌های موجود دو به دو به یکدیگر چسبیده و به سلول‌های کروی غیر متحرک سبز رنگ تغییر شکل می‌دهند. این تغییر شکل، اغلب در روزهای چهارم و پنجم صورت می‌گیرد. در ضمن، سلول‌های سبز رنگ غیر متحرک، پس از تشکیل به رشد خود ادامه می‌دهند و تعداد آنها افزایش می‌یابد. کاهش نیافتن تعداد سلول‌های کل را در طی دورهٔ ترکیب شدن سلول‌های رویشی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

جدول ۳. تأثیر هیستیدین بر وزن مادهٔ خشک، تعداد سلول و سرعت رشد نسبی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در شرایط محیط کشت بولد، با و بدون فسفات در ظرف دو هفته (میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار)[1]

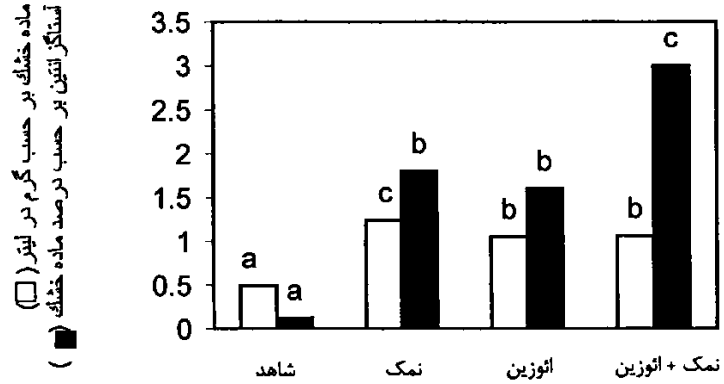
تیمار	وزن خشک[2] (گرم در لیتر)		تعداد سلول (×۱۰^۵ در هر میلی‌لیتر)		سرعت رشد نسبی (در هفته)			
					سرعت افزایش در وزن خشک		سرعت تغییر تعداد سلول	
	هفته اول	هفته دوم	هفته اول	هفته دوم	هفته اول	هفته دوم	هفته اول	هفته دوم
محیط کشت بولد (شاهد)	۱/۱۷±۰/۰ ^{a}	۰/۶۶±۰/۰۶ ^{a}	۳/۰۷±۰/۱۱ ^{c} سلول‌های رویشی	۲/۴±۰/۱۷ ^{b} سلول‌های سبز غیر متحرک	۰/۲۵ ^{a}	۱/۴۷ ^{b}	۰/۲۰ ^{b}	−۰/۲۵ ^{b}
محیط کشت بولد + ۲۵ میلی‌مولار هیستیدین	۱/۱۶±۰/۰ ^{a}	۰/۶۷±۰/۰۸ ^{a}	۲/۹۷±۰/۰۶ ^{c} سلول‌های رویشی	۲/۱۷±۰/۲۹ ^{ab} سلول‌های سبز غیر متحرک	۰/۲۲ ^{a}	۱/۴۱ ^{b}	۰/۱۷ ^{b}	−۰/۳۲ ^{b}
محیط کشت بولد بدون فسفات	۰/۹۹±۰/۰۲ ^{c}	۱/۲۶±۰/۰۵ ^{c}	۱/۹۷±۰/۰۶ ^{a} کیست‌های قرمز	۱/۹۷±۰/۰۶ ^{a} کیست‌های قرمز	۲/۰۴ ^{c}	۰/۲۳ ^{a}	−۰/۲۴ ^{a}	۰/۰ ^{a}
محیط کشت بولد بدون فسفات + ۲۵ میلی‌مولار هیستیدین	۰/۷۶±۰/۰۵ ^{b}	۰/۹۳±۰/۰۲ ^{b}	۲/۲۷±۰/۲۵ ^{b} سلول‌های سبز با مرکز نارنجی	۲/۲۷±۰/۲۵ ^{ab} سلول‌های سبز با مرکز قرمز	۱/۷۷ ^{b}	۰/۲۰ ^{a}	−۰/۱۰ ^{a}	۰/۰ ^{a}

۱. مقایسهٔ میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که داری حروف مشترک نیستند، از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند (آزمون دانکن).
۲. وزن خشک جلبک در آغاز آزمایش مساوی ۰/۱۳ گرم در لیتر، برابر $۲/۵\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر بوده است و تمام سلول‌ها در آغاز آزمایش در فاز رویشی بودند.

جدول ٤. تأثیر هیستیدین بر تولید آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در شرایط محیط کشت بولد، با و بدون فسفات در مدت دو هفته (میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار)[1]

تیمار	میزان آستاگزانتین جلبک[2]			
	میلی‌گرم در لیتر		پیکوگرم در هر سلول	
	هفته اول	هفته دوم	هفته اول	هفته دوم
محیط کشت بولد (شاهد)	۰±۰/۰ ^{a}	۰±۰/۰ ^{a}	۰±۰/۰ ^{a}	۰±۰/۰ ^{a}
محیط کشت بولد + ۲۵ میلی‌مولار هیستیدین	۰±۰/۰ ^{a}	۰±۰/۰ ^{a}	۰±۰/۰ ^{a}	۰±۰/۰ ^{a}
محیط کشت بولد بدون فسفات	۱۶/۴۸±۰/۳ ^{c}	۳۲/۸±۰/۹۹ ^{c}	۸۳/۸۷±۳/۴ ^{c}	۱۶۶/۷۲±۲/۶۱ ^{c}
محیط کشت بولد بدون فسفات + ۲۵ میلی‌مولار هیستیدین	۵/۱۳±۰/۱ ^{b}	۱۰/۳±۱/۰۴ ^{b}	۲۲/۷۷±۲/۱ ^{b}	۴۵/۸۵±۷/۹۷ ^{b}

۱. مقایسهٔ میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که داری حروف مشترک نیستند، از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند (آزمون دانکن).
۲. میزان آستاگزانتین محتوی جلبک در آغاز آزمایش برابر صفر پیکوگرم در هر سلول (صفر میلی‌گرم در لیتر) بود.



نمودار ۳. تأثیر شوری و ائوزین بر میزان ماده خشک و آستاگزانتین جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس. میزان نمک و ائوزین مصرف شده، به ترتیب ۳۰ میلی‌مولار سدیم کلراید، و ۲ میکرومولار ائوزین بوده است.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

متحرک با هم، که در روز پنجم و بعد از آن رخ می‌دهد، می‌توان با تشکیل سلول‌های پالملوییدو تقسیم بعدی آنها، که معمولاً تا روز دهم در محیط کشت مشاهده می‌شوند، مرتبط دانست.

تشکیل نشدن کیست‌های قرمز رنگ در این آزمایش در طول مدت ١٤ روز، ممکن است به خاطر کافی بودن منابع غذایی، به ویژه ازت و فسفر محیط کشت، زیاد نبودن شدت نور و هم‌چنین کم بودن تراکم سلولی در آغاز آزمایش باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده (جدول ١)، پیداست که در شرایط محیط کشت بولد دارای فسفات، افزودن نمک به محیط کشت، موجب افزایش وزن خشک جلبک و بیوسنتز آستاگزانتین در سلول‌ها می‌شود. افزایش وزن خشک جلبک در اثر تیمار شوری، به دلیل تشکیل دیوارهٔ اسکلتی ضخیم در کیست‌ها می‌باشد، که این دیواره از یک بیوپلیمر ناشی از مشتقات کاروتنوییدی به نام اسپوروپولنین (Sporopollenin) ساخته شده است (٤). افزودن نمک تا حدود ٢٠ میلی‌مولار به محیط کشت، موجب افزایش وزن خشک جلبک می‌شود، ولی افزودن ٥٠ میلی‌مولار نمک به محیط کشت، وزن خشک جلبک را به طور معنی‌داری نسبت به سطوح پایین‌تر شوری و شاهد کاهش می‌دهد. البته این امر، شاید به علت مرگ و میر سلولی و جلوگیری از تشکیل کیست در جلبک باشد.

غلظت‌های ٨ و ٢٠ میلی‌مولار نمک بر تولید وزن خشک جلبک یکسان عمل کرده، به طوری که در هر دو مورد موجب افزایش وزن خشک جلبک شده‌اند، ولی غلظت ٢٠ میلی‌مولار برای تولید آستاگزانتین مؤثرتر بوده است، که احتمالاً برای ایجاد تنش شوری در این جلبک ضرورت بیشتری دارد. زیرا غلظت ٨ میلی‌مولار نمک تنش چندان شدیدی در این جلبک ایجاد نمی‌کند. به طور کلی، در زمینه بهترین غلظت نمک، که منجر به کمترین مرگ و میر سلولی و بیشترین غلظت آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس می‌شود، میان پژوهندگان اختلاف نظر وجود دارد (٦ و ١٥). احتمالاً این اختلاف نظر، به دلیل متفاوت بودن شرایط کشت و نیز سویه جلبک مورد استفاده توسط آنها می‌باشد.

با توجه به جداول ١ و ٢، مشخص می‌شود که اثر توأم کمبود فسفات و شوری بر بیوسنتز آستاگزانتین، بیشتر از اثر هر یک از آنها به تنهایی است. با این که وزن خشک جلبک در غلظت ٤٠ میلی‌مولار نمک، تفاوت معنی‌داری با غلظت ٣٠ میلی‌مولار ندارد، ولی غلظت آستاگزانتین در تیمار ٤٠ میلی‌مولار نمک، به طور معنی‌داری نسبت به تیمار ٣٠ میلی‌مولار کاهش می‌یابد. احتمال می‌رود شوری زیاد افزون بر مرگ و میر سلولی، موجب جلوگیری از بیوسنتز آستاگزانتین نیز بشود، که این مطلب با نتایج کوبایاشی و همکاران هم‌خوانی دارد (٢٤).

بازده نهایی تولید آستاگزانتین، هنگامی که تنش نمک با تابش شدید نور همراه باشد، بیشتر است (١٤). از سویی، تنش نمک در جلبک هماتوکوکوس می‌تواند تشکیل کیست و بیوسنتز آستاگزانتین را حتی در تاریکی تحریک کند (٢٤). از این رو، احتمال دارد یک سیستم اختصاصی برای القای کاروتنوییدد در هماتوکوکوس وجود داشته باشد که توسط نمک تحریک می‌شود. مشخص شده که تنش نمک در برخی از جلبک‌ها، از جمله جلبک سبز دونالیلا (*Dunaliella*)، میزان آبسیزیک اسید داخلی و دفع آن را به محیط افزایش می‌دهد (٧). به علاوه، مشخص شده است که آبسیزیک اسید، به عنوان یک هورمون گیاهی در ریخت‌زایی جلبک هماتوکوکوس و تحریک تشکیل کیست و بیوسنتز آستاگزانتین در آن نقش دارد (٢١). از این رو، احتمال دارد که تنش نمک، به واسطهٔ تولید آبسیزیک اسید، در این جلبک نیز تولید کیست و بیوسنتز آستاگزانتین را تحریک نماید، که البته این موضوع نیازمند بررسی بیشتر است. به علاوه، مشخص شده است که ائوزین، به عنوان یک تولید کنندهٔ اکسیژن یکتایی عمل می‌کند (٢٠)، که این مطلب تحریک بیوسنتز آستاگزانتین را در اثر این تیمار به خوبی توجیه می‌کند.

سطح فسفات محیط کشت نیز بر تولید آستاگزانتین تأثیر می‌گذارد، و کمبود فسفات عامل مؤثری در کیست‌زایی و

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

تشدید بیوسنتز آستاگزانتین در جلبک سبز هماتوکوکوس می‌باشد، که این نتیجه مطابق با گزارش پژوهندگان دیگر است (۲ و ۳). هم‌چنین، فان و همکاران (۱۰) احتمال می‌دهند که تحت شرایط کمبود فسفات در این جلبک، اکسیژن یکتایی تولید می‌شود. به علاوه، با توجه به نتایج به دست آمده (جداول ۳ و ٤)، معلوم می‌شود که در شرایط محیط کشت حاوی فسفات، افزودن هیستیدین به محیط کشت، بر میزان رشد و انباشتگی آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس تأثیری ندارد، و احتمال دارد هیستیدین بر آنزیم‌های تولید کننده کاروتنویید در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بی‌تأثیر باشد. هم‌چنین، معلوم می‌شود که مصرف نشدن فسفات، بلافاصله در هفتهٔ اول، موجب تحریک تشکیل کیست و انباشته شدن آستاگزانتین در جلبک می‌گردد، در حالی که افزودن هیستیدین به محیط کشت، تحت این شرایط موجب کاهش بیوسنتز آستاگزانتین می‌شود (جدول ٤).

از آن جا که گزارش شده است، هیستیدین خاموش کنندهٔ اکسیژن یکتایی می‌باشد (۲٦)، و خود اکسیژن یکتایی نیز در تولید آستاگزانتین در این جلبک نقش دارد (۲۳)، و از سویی هیستیدین بر آنزیم‌های مؤثر در تولید کاروتنویید بی‌تأثیر است (۱۰)، احتمال داده می‌شود که در پاسخ به تشکیل اکسیژن یکتایی تحت شرایط کمبود فسفات، سلول‌های هماتوکوکوس پلوویالیس بیوسنتز آستاگزانتین را آغاز کرده باشند، که این خود یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان است. هم‌چنین، احتمال می‌رود که اکسیژن یکتایی به عنوان یک ناقل پرانرژی عمل کرده، و در تقسیم سلولی (جدول ۳) و فتوسنتز اختلال (۱۰) ایجاد کند، به طوری که فرایندهای کاروتن‌زایی را در این جلبک به جریان اندازد.

این که چرا انباشته شدن آستاگزانتین تحت شرایط کمبود فسفات در حضور هیستیدین، به طور کامل جلوگیری نمی‌شود و با زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد (جدول ٤)، شاید به دلیل کافی نبودن غلظت هیستیدین برای خاموش کردن اکسیژن‌های یکتایی حاصل شده تحت شرایط کمبود فسفات، و یا تولید مداوم اکسیژن یکتایی باشد.

برای اثبات تشکیل اکسیژن یکتایی در اثر کمبود فسفات در این جلبک، ضرورت دارد که از تکنیک‌هایی چون گاز کروماتوگرافی اتان و آنالیز شیمیایی مالون دی‌آلدیید، که هر دو از محصولات پرکسیداسیون چربی در اثر واکنش اکسیژن یکتایی با چربی‌ها می‌باشند (۲۹)، بهره مند شد. هم‌چنین از تکنیک‌های پیش‌رفته‌ای چون اسپکتروسکوپی رزنانس اسپین الکترون (ESR)، به منظور ردیابی تشکیل اکسیژن یکتایی، و از خاصیت شمی‌لومینسانس اکسیژن یکتایی استفاده شود. هرچند که کاربرد این تکنیک‌ها در محیط زنده (*In vivo*)، اغلب مشکل می‌باشد.

منابع مورد استفاده

۱. مهدیه، م. ۱۳۷۸. تأثیر شوری و برخی از عوامل تغذیه‌ای بر میزان رشد و تولید کاروتنویید در برخی از جلبک‌های سبز. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

2. Borowitzka, M. A., J. M. Huisman and A. Osborn. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis.* I: Effects of nutrients and cell type. J. Appl. Phycol. 3: 295-304.
3. Boussiba, S. and A. Vonshak. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol. 32: 1077-1082.
4. Burczyk, J. 1987a. Cell wall carotenoids in green algae which form sporopollenins. Phytochem. 26: 121-128.
5. Chaumont, D. and C. Thepenier. 1995. Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. J. Appl. Phycol. 7: 529-537.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

6. Cordero, B., A. Otero, M. Patino, B. O. Arredondo and J. Fabregas. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. Biotechnol. Lett. 18: 213-218.
7. Cowan, A. K. and P. D. Rose. 1991. Abscisic acid metabolism in salt-stressed cells of *Dunaliella salina*: possible interrelationship with β-caroten accumulation. Plant Physiol. 97: 798-803.
8. Fabregas, J., A. Dominguez, D. G. Alvarez, T. Lamela and A. Otero. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvials*. Biotechnol. Lett. 20: 623-636.
9. Fan, L., A. Vonshak and S. Boussiba. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophycaae). J. Phycol. 30: 829-833.
10. Fan, L., A. Vonshak, A. Zarka and S. Boussiba. 1998. Does astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage? Z. Naturforsch. 53c: 93-100.
11. Gong, X. and F. Chen. 1997. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. J. Appl. Phycol. 9: 437-444.
12. Gradelet, S., P. Astorg, A. M. Le Bon, R. Berges and M. Suschetet. 1997. Modulation of aflatoxin B1 carcinogenicity, genoloxicity and metabolism in rat liver by dietary carotenoids: evidence for a protective effect of CYP1A inducens. Cancer Lett. 114: 221-222.
13. Grunewald, K., C. Hagen and W. Braune. 1997. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris.* Eur. J. Phycol. 32: 387-392.
14. Harker, M., A. J. Tsavalos and A. J. Young. 1995. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis.* J. Appl. Phycol. 7: 399-406.
15. Harker, M., A. J. Tsavalos and A. J. Young. 1996. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. J. Ferment. Bioengin. 82: 113-118.
16. Harker, M. and A. J. Young, 1995b. Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus pluvialis*. Eur. J. Phycol. 30: 199-187.
17. Johnson, E. A. and G. H. An. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Crit. Rev. Biotechnol. 11: 297-326.
18. Jyonouchi, H., S. Sun and M. D. Gross. 1995a. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody response in culture including T-helper cell clons and suboptimal doses of antigen. J. Nutr. 125: 2483-2492.
19. Jyonouchi, H., L. Zhang, M. Gross and Y. Tomita. 1994. Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens. Nutr. Cancer 21: 47-58.
20. Knox, J. P. and A. D. Dodge. 1985. The photodynamic action of eosin, a singlet-oxygen generator. The inhibition of photosynthetic electron transport. Planta 164: 30-34.
21. Kobayashi, M., N. Hirai, Y. Kurimura, H. Ohigashi and Y. Tsuji. 1997b. Abscisic acid-dependent algal morphogenesis in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis.* Plant Growth Regul. 22: 79-85.
22. Kobayashi, M., T. Kakizono and S. Nagai. 1991. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. J. Ferment. Bioengin. 71: 335-339.
23. Kobayashi, M., T. Kakizono and S. Nagai. 1993. Enhancement carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis.* Appl. Environ. Microbiol. 59: 867-873.
24. Kobayashi, M., Y. Kurimura and Y. Tsuji. 1997a. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. Biotechnol. Lett. 19: 507-509.
25. Lawlor, S. M. and N. M. O'Brien. 1995. Astaxanthin: antioxidant effects in chiken embryo fibroblasts. Nutr. Res. 15: 1695-1710.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]

26. Mishra, N. P. and D. F. Ghanotakis. 1994. Exposure of photosystem II complex to chemically generated singlet oxygen results in D1 fragments similar to the ones observed during aerobic photoinhibition. Biochem. Biophysic. Acta 1187: 296-300.
27. Mori, T., K. Makabe, K. Yamaguchi, S. Konosu and T. Atai. 1989. Comparison between kill astaxanthin diester and synthesized free astaxanthin suplemented to diets in their absorption and deposition by juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comp. Biochem. Physiol. 938: 255-264.
28. No, H. K. and T. Strorebakken. 1992. Pigmentation of rain-bow trout with astaxanthin and canthaxanthin in freshwater and saltwater. Aquaculture 101: 123-134.
29. Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. PP. 217-243. *In*: W. J. Davies (Ed.), Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation. Lancaster, UK.
30. Tjahjono, A. E., Y. Hayama, T. Kakizono, Y. Terada, N. Nishio and S. Nagai. 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. Biotechnol. Lett. 16: 133-138.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.17.1]