تقدير نسبة الأستازنتين والفعالية المضادة للتأكسد في الكتلة الحيوية لطحلب الهيماتوكوكس *Haematococcus pluvialis*

عبير ديوب (1)* و عدنان نظام (1)

(1). قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

(*للمراسلة: الباحثة عبير ديوب، البريد الإلكتروني: abeer84.dayoub@damascusuniversity.edu.sy، هاتف: 0941141154)

تاريخ الاستلام: 2023/08/24 تاريخ القبول: 2023/10/9

الملخص

تمثل الطحالب الدقيقة مصدراً كبيراً وغير مستغل لمركبات جديدة نشطة حيوياً (مُسْتقْلَبات ثانوية التي تنتجها بعض الطحالب الدقيقة عندما تخضع في بيئاتها لشروط قاسية (إجهاد stress) مثل: تغيرات الملوحة ودرجة الحرارة والمغذيات والضوء والأشعة فوق البنفسجية؛ لذلك يجب أن تتكيف بسرعة مع الظروف البيئية الجديدة للبقاء على قيد الحياة، وهذه المُسْتقْلَبات الثانوية لا يمكن العثور عليها في الأحياء الأخرى، ومن هذه المُسْتقْلَبات الأستازنتين (مضاد تأكسد نشط) الذي ينتجه طحلب *Haematococcus pluvialis*، وقد بلغت نسبته في عينات الدراسة 7.86% من الوزن الجاف للخلايا الحمراء، ومع ذلك كان النشاط المضاد للتأكسد الأعلى في الخلايا الخضراء المستخلصة بالإتانول مقارنة بالخلايا الحمراء التي يكون فيها الأستازنتين على هيئة إستر حموض دسمة.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الدقيقة، الأستازنتين، الهيماتوكوكس النوع البلوفيالي، إجهاد، إستر حموض دسمة.

المقدمــة:

تتعرض الطحالب الدقيقة في بيئاتها لإجهادات بيئية مختلفة، فترتفع معدلات التأكسد وتتحرر الجذور الكيميائية الحرة المخربة للمادة العضوية، وبما أن معظم تفاعلات أكسدة المواد العضوية ضارة بالخلية الحية، فهي تؤدي إلى تخريب الفيتامينات والأصبغة والليبيدات وتخريب بنية الخلية وفقدان القيمة الغذائية والنكهات (Halliwell and Gutteridge, 2007)، وتؤدي إلى تلف البروتين وتلف الحمض النووي أو حدوث طفرة؛ الأمر الذي فرض على هذه الأحياء ضرورة تطوير نظم حماية طبيعية من خلال إنتاج المزيد من الأصبغة الكاروتينويدية التي تتصف بدور مهم في التحكم في عمليات التأكسد، إذ إنها قادرة على امتصاص طاقة الإثارة لجذور الأكسجين الحرة في سلسلتها الحلقية المعقدة، وتعزيز تبديد الطاقة، مع حماية النسج من التلف الكيميائي، وتنقل الفوائد الصحية للمستهلك عند أكله هذه الطحالب أو تستعمل كمكملات غذائية، وإن استعمال مضادات التأكسد لإطالة العمر الافتراضي للمواد الغذائية موجود في كل مكان، ومعظم مضادات التأكسد المستعملة في الوقت الحاضر هي مركبات اصطناعية ويشتبه بأنها مواد مسرطنة (López-Pedrouso *et al.*, 2022). أُجريت أبحاث عديدة خلال العقدين الماضيين لاستبدال مضادات التأكسد الاصطناعية بمضادات تأكسد طبيعية، وإن معظم مضادات التأكسد الطبيعية المتوافرة تجارياً مشتقة من النباتات الأرضية مثل إكليل الجبل والشاي وبذور العنب ولحاء الصنوبر والكاكاو، وازداد استعمالها كمكون غذائي أو كمكملات غذائية،

ويعتقد أن الطحالب الدقيقة وحيدة الخلية هي مصدر بديل واعد لمضادات التأكسد (Li *et al.*, 2007)، ومن مضادات التأكسد المعروفة من الطحالب الدقيقة الكاروتينويدات، التي لها دور مهم في جعل أنواع الأكسجين التفاعلية خامدة لاسيما ذرات الأكسجين النشطة (O^-) الناتجة عن عملية التركيب الضوئي، وصباغ β الكاروتين الذي ينتجه طحلب *Dunaliella*، وصباغ الأستازنتين (كاروتينويد ثانوي) الذي ينتجه طحلب الهيماتوكوكس البلوفيالي *Haematococcus pluvialis*، إذ تستعمل هذه الأصبغة في الأغذية والأعلاف، ومستحضرات التجميل والمكملات الغذائية (Spolaore *et al.*, 2006; Bhalamurugan *et al.*, 2018).

طحلب الهيماتوكوكس النوع البلوفيالي هو أحد أنواع الطحالب الدقيقة الخضراء الذي يعيش في المياه العذبة، ويعد أغنى مصدر طبيعي لكاروتين الأستازنتين Astaxanthin الذي يمكن أن تصل كميته إلى 4% من الوزن الجاف للخلية (Han *et al.*, 2013; Wayama *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2018). تتضمن دورة حياة هذا الطحلب مرحلتين: المرحلة الخضراء عندما تكون الشروط مناسبة للنمو، وتكون الخلايا متحركة بسوطين، وتتكوّن خلالها الكتلة الحيوية الأساسية للطحلب، والمرحلة الحمراء عندما يتعرّض الطحلب لظروف إجهاد مختلفة، مثل نقص المغذيات وارتفاع الملوحة والشدة الضوئية القوية، وتكون فيها الخلايا غير متحركة، محاطة بغمد مخاطي سميك، وتكدّس كميات كبيرة من صباغ الأستازنتين (Butler *et al.*, 2018). تبيّن أن خلايا الهيماتوكوكس الخضراء تمتلك نظاماً إنزيمياً دفاعياً ضد الجذور الحرة (الكاتالاز، البيروكسيداز)؛ عندما يكون فيها الأستازنتين منخفضاً جداً أو معدوماً، أما خلاياه الحمراء فتمتلك الأستازنتين الذي يعد أكثر كفاءة ويتفاعل بسرعة مع الجذور الحرة ويمتلك مقدرة مضادة للتأكسد أقوى من الإنزيمات المضادة للتأكسد (Liu *et al.*, 2010). فعند تطبيق إجهادات عديدة على الطحلب تنشط آليات الدفاع العديدة المضادة للإجهاد وتعمل على نحو متناسق، ويساهم كل منها جزئياً في الحماية الشاملة للخلايا، ونظراً إلى أن أنظمة الدفاع الإنزيمية تعمل أساساً كآليات دفاع خلوي قصيرة الأمد فإن استمرار الإجهاد فرض على هذه الخلايا تكوين الكاروتينويدات الثانوية كآلية دفاع طويلة الأمد من أجل البقاء والاستمرار في الحياة، أي أن الأنظمة الدفاعية الإنزيمية هي آلية استجابة مبكرة للإجهاد التأكسدي، ومع استمرار الإجهاد، تنتج الخلايا الأستازنتين وتكدسه كآلية دفاع طويلة الأمد؛ لذلك هدف البحث إلى تقدير نسبة الأستازنتين في الخلايا الحمراء لهذا الطحلب، وتقدير الفعالية المضادة للتأكسد لعينتي طحلب الهيماتوكوكس الخضراء والحمراء باستعمال ثلاثة محلّات مختلفة (إتانول، هكسان، ماء ساخن 80 مْ).

مواد البحث وطرائقه

حُضن طحلب الهيماتوكوكس البلوفيالي *Haematococcus pluvialis* المعزول من مياه راكدة من نهر بردى في منطقة الربوة في محافظة دمشق في المختبر لتنميته باستعمال المفاعل الحيوي الذي يتحكم ويضبط جميع شروط النمو بطريقة الدفعات Batch، باستعمال السائل المغذي Bold's Basal Medium BBM (Bischoff and Bold, 1963)، مع تعديل الوسط بإضافة محلول التربة الخصبة إليه (1 مل/ل). وإجراء التجارب تحت شروط ثابتة من حيث الإضاءة المستمرة 10 آلاف لوكس، درجة الحرارة 25 مْ، سرعة الدوران 200 دورة /د، تدفق الغازات 2 ل/د)، بمدة زمنية 18 يوماً للدفعة الواحدة، جُفّدت الكتلة الحيوية للطحلب الأخضر الناتجة وقد أُجري التجفيد باستعمال مجفدة ماركة Christ الألمانية طراز Alpha 1-2 LD، واستمرت عملية التجفيد حتى الوصول إلى نسبة رطوبة لا تتجاوز 7%، وللحصول على خلايا حمراء أُجريت تنمية النوع الطحلبي للهيماتوكوكس خارج المفاعل الحيوي في حوجلات سعة 1 لتر في شروط مثالية للنمو لزيادة إنتاج الكتلة الحيوية الخضراء (مرحلة نمو خضري)، ومن ثم تُركت العينة الخضراء بدون تهوية وفي درجة حرارة الغرفة (30 – 35 مْ) قرب النافذة ومعرضة لضوء الشمس القوي،

فتحوّلت خلايا الطحلب الخضراء المتحركة إلى خلايا حمراء غير متحركة تحتوي صبغة الأستازنتين Astaxanthin الحمراء التي تميز هذا النوع، ثم جفّدت الكتلة الحيوية للطحلب الأحمر وحفظت في المجمدة في عبوات بلاستيكية.

تقدير تركيز الأستازنتين:

أُضيف إلى 20 ملغ من الكتلة الحيوية للطحلب الأحمر المجفد 5 مل مذيب dimethylsulfoxide (DMSO) لاستخلاص الأستازنتين من داخل الخلايا، ثم سُخنت العينة في حمام جاف بدرجة حرارة 70 مْ مدة 10 دقائق، ثقلت العينة مدة 5 دقائق بسرعة 4000 دورة في الدقيقة، جُمع الطافي وكررت عملية الاستخلاص مرتين، أُكمل الحجم إلى 25 مل بمذيب DMSO، ثم خففت العينة بمقدار (1: 10) وقيست الامتصاصية باستعمال جهاز المطيافية الضوئية spectrophotometer UV–VIS طراز U-290 HITACHI عند طول الموجة 530 نانومتراً، لتجنب تداخل اليخضور مع الكاروتينويدات الأخرى وحسب تركيز الأستازنتين وفق المعادلة الآتية:

$$Astaxanthin(mg/L) = 4.5\times OD530\times A\times V_a/V_b$$

حيث A هو معامل الامتصاص ويساوي 1.556

V_a: حجم العينة، V_b : حجم المذيب

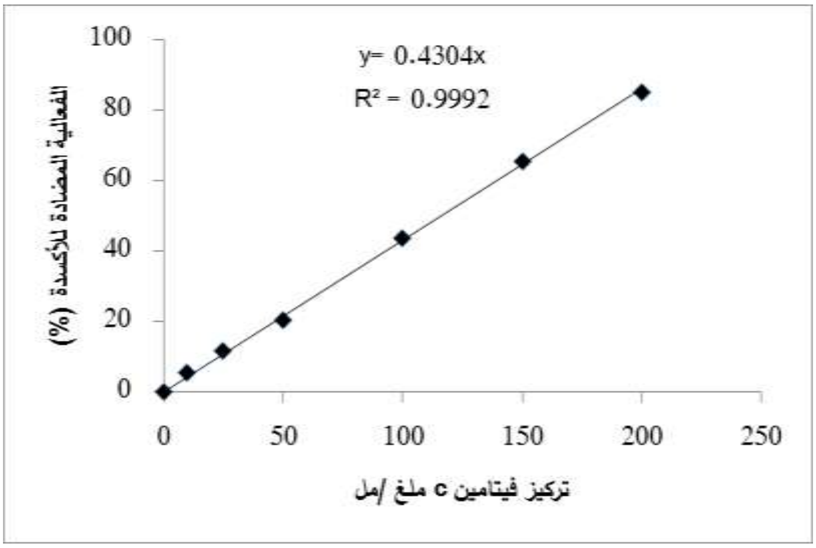
تقدير مضادات التأكسد:

حُضر المستخلص الطحلبي باستعمال 3 محاليل استخلاص مختلفة (إتانول، هكسان، ماء 80 مْ) وفقاً لطريقة لي وآخرين (Li *et al.*, 2007) أُضيف إلى 0.05 غ كتلة طحلبية جافة خضراء وحمراء محطمة باستعمال Tissue Lyser (QIAGEN company- Germany)، 10 مل إتانول، مزجت جيداً ثم حُضنت في حمام للأمواج فوق الصوتية درجة حرارته 40 مْ مدة ساعة، ثقلت بمثقلة 10000 g مدة 10 دقائق، أخذ الطافي وحُفظ في درجة حرارة – 20 مْ لحين القياس، كررت العملية مع الهكسان والماء 80 مْ.

أُخذ 250 ميكرولتراً من السائل الطافي وأُضيف إليه 1 مل كاشف DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) في الإتانول (4.5 ملغ/ل) حُضنت العينات في الظلام مدة 30 دقيقة، ثم قيست الامتصاصية الضوئية بجهاز المطيافية الضوئية spectrophotometer عند طول الموجة 515 نانومتراً. حضّر المنحنى المعياري من فيتامين C (الشكل 1) بتركيز 200 ملغ/مل، كمركب مرجعي لاختبار كنس الجذور الحرة بسبب قدرته الإرجاعية الكبيرة، لحساب قدرة الخلاصة على تثبيط الجذور الحرة استُعملت المعادلة (Sarikurkcu *et al.*, 2009):

$$DPPH\% = [(Ab-Aa)/Ab] \quad 100$$

حيث: Aa امتصاصية العينة، Ab امتصاصية الكاشف.



الشكل(1): السلسلة العيارية للفيتامين C

حيث IC_{50} التركيز المثبط النصفي للجذور الحرة من فيتامين C µ (IC_{50} = 116.171 ملغ/مل).

التحليل الإحصائي

أُجريت جميع التجارب باستعمال مكررين لكل تركيز، واستعمل البرنامج Minitap 14 لتحليل النتائج إحصائياً، وكانت جميع التجارب الإحصائية عند مستوى ثقة 95%.

النتائج والمناقشة:

نتائج تقدير الأستازنتين

تحولت الخلايا الخضراء لطحلب الهيماتوكوكس البلوفيالي *H. pluvialis* إلى خلايا حمراء خلال مدة 20- 25 يوماً، وأُجري تحطيم جدر الخلايا الحمراء التي كانت في مرحلة التحوصل وتكوين الأبواغ الساكنة aplanospore، بالطرائق الميكانيكية المناسبة (التعريض للاهتزاز بسرعات عالية بوجود كرات معدنية) لتسهيل استخلاص الأصبغة منها لاسيما الأستازنتين الذواب في الدسم.

بلغ تركيز الأستازنتين في الكتلة الحيوية للخلايا 0.731 ملغ/ل، بنسبة 7.86% من الوزن الجاف. تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه هاركر وآخرون (Harker *et al.* 1996)، الذي أكد أن نسبة الأستازنتين يمكن أن تصل إلى 8% من الوزن الجاف للخلايا، وكانت نتيجة هذه الدراسة أعلى من نتائج بعض الدراسات الأخرى على النوع نفسه، إذ بلغت نسبة الأستازنتين 3.6% (Torzillo *et al.*, 2003)، و3.8% (Aflalo *et al.*, 2007)، في شروط نقص النتروجين الذي يحفز إنتاج الأستازنتين، كما انخفضت نسبة الأستازنتين إلى 2.7% (Wang *et al.*, 2012) في وسط غني بالنتروجين، وبيّن تشوي (Choi, 2002) في دراسة على هذا النوع أن الإشعاع الضوئي العالي هو أهم عامل لتشكيل الأستازنتين إضافة إلى نقص النتروجين الذي يؤدي إلى تغيير شكل الخلايا وتحوصلها، وفي دراسة أخرى أكد شاه وآخرون (Shah *et al.*, 2016) أن تأثير نقص النتروجين في إنتاج الأستازنتين أكبر من تأثير شدة الضوء، وقد بيّن ساها وآخرون (Saha *et al.*, 2013) وإماماُوغلو وآخرون (Imamoglu *et al.*, 2009) أن تناقص النتروجين مع ارتفاع درجة الحرارة في وسط استزراع طحالب الهيماتوكوكس يؤدي إلى تراكم الأستازنتين في الخلايا، ويؤدي إلى زيادة معدل تركيب الأستازنتين بمقدار أكثر بمرتين تقريباً من تناقص عنصر الفُسفور في الوسط، إذ إن النقص في النتروجين يؤدي إلى النقص في بناء البروتينات (البنائية والإنزيمية) ضمن الخلايا والصانعات الخضراء، والذي يتجلى في شحوب الخلايا وتحلل اليخضور مقارنة بالتجويع الفسفوري (Boussiba *et al.*, 1999). واستجابة للتكيف مع هذه الظروف البيئية الجديدة

وللبقاء على قيد الحياة، ومن أجل التقليل من جذور الأكسجين الحرة التي تهاجم الخلايا وتسبب ضرر للحمض النووي والبروتين وغشاء الخلية، ينتج الطحلب هذا المُستَقْلَب الثانوي (الأستازنتين) ذا القيمة التجارية العالية (Zhu *et al*., 2020).

نتائج الفعالية المضادة للتأكسد:

تشير النتائج الواردة في الجدول 1 إلى أن النشاط المضاد للتأكسد كان الأعلى في خلاصة الإتانول للعينة الخضراء إذ بلغت 30.71%، وبمقارنة نشاطها المضاد للتأكسد بنشاط الفيتامين C تبين أنها تفوق فعاليته بمقدار 14 مرة، وكان النشاط الأقل في خلاصة الهكسان للعينة الحمراء التي بلغت 16.25%.

الجدول(1): النشاط المضاد للتأكسد لعينتي طحلب *H. pluvialis* الخضراء والحمراء.

محلول الاستخلاص	فعالية العينة الطحلبية المضادة للتأكسد (%)		مقارنة فعالية العينة الطحلبية المضادة للتأكسد بالفيتامين C	
	الخضراء	الحمراء	الخضراء	الحمراء
الإتانول	30.71 ± 0.45^{a}	21.61 ± 0.66^{b}	14.27	10.04
الماء الساخن 80 م	24.94 ± 0.51^{a}	24.05 ± 0.32^{b}	11.59	11.17
الهكسان	20.07 ± 0.15^{a}	16.25 ± 0.22^{b}	9.32	7.55

* تدل الأحرف المتشابهة في الصف الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

تخالف هذه النتيجة ما هو متوقع نظرياً، إذ إن النشاط المضاد للتأكسد يكون الأعلى في الخلايا الحمراء بسبب احتوائها على الأستازنتين الذي يعد من أقوى الكاروتينويدات المضادة للتأكسد، وهذا يمكن تفسيره بأن كاروتينويدات الخلايا الحمراء لطحلب الهيماتوكوكس البلوفيالي في مرحلة النمو هذه تتكون أساساً من الأستازنتين (يكون على هيئة إستر) الذي يبدو أنه يستخرج بصعوبة مع محاليل الاستخلاص المستعملة في هذه التجربة. وهذا يتفق مع دراسة غويريس وآخرين (Goiris *et al*., 2012). إذ كان النشاط المضاد للتأكسد في دراسته على عدة أنواع من الطحالب الدقيقة من ضمنها طحلب *H. pluvialis* التي استعمل فيها محاليل استخلاص مختلفة (إتانول 50%، هكسان، خلات الإتيل، ماء ساخن 80 م) الأعلى في مستخلص الخلايا الخضراء بالماء الساخن 80 م، بالرغم من أن محتوى الكاروتينويدات في هذه الخلايا كان منخفضاً جداً، وهذا يدل على أن النشاط المضاد للتأكسد في المستخلص المائي يعود إلى المركبات الفينولية عموماً بسبب الطبيعة القطبية للمركبات الفينولية. وإن الكاروتينويدات ليست المحددات الوحيدة المسؤولة عن النشاط المضاد للتأكسد في الطحالب الدقيقة، بل المركبات الفينولية أيضاً، ويمكن تحسين محتوى الكتلة الحيوية الطحلبية من هذه المركبات باختيار شروط الاستزراع المناسبة كتوفر المغذيات أو نقصها وشدة الضوء (Spolaore *et al*. 2006)، وهذا ما أكده Lorenz (2017) في دراسته على هذا النوع، إذ إنّ نوع الكاروتينويدات المتشكلة عند تعرض الطحلب للإجهاد هي 70% أستازنتين أحادي إستر و10% أستازنتين ثنائي إستر و5% أستازانتين حر و15% مزيج من بيتا كاروتين وكانتازانتين ولوتئين وكاروتينويدات أخرى. أي جزيء معلق في الدسم موجود في سيتوبلاسما خلايا سميكة الجدر مما يعوق استخراجه.

أما في الخلايا الخضراء فكان استخلاص الكاروتينويدات (مضادات التأكسد) أسهل، وكان الإتانول أفضل محلول استخلاص، يليه الماء الساخن 80 م، ثم الهكسان.

أكد Cerón وآخرون (2007) أن الخلايا الحمراء الغنية بكل من الأستازانتين وحمض الأولييك تمتلك نشاطاً مضاداً للتأكسد عالياً، وإن جودة الكتلة الحيوية لطحلب *H. pluvialis* لا تقاس بمحتواه من الأستازنتين فقط، بل بمحتواه من الحموض الدهنية أيضاً، إذ تكون هذه الخلايا أكثر ملاءمة للاستهلاك البشري سواء في المغذيات أو الأدوية.

وبالتالي فإن اختلاف النشاط المضاد للتأكسد من نوع طحلبي لآخر، يعود لاختلاف أنواع الطحالب ولاختلاف محاليل الاستخلاص المستعملة في كل تجربة.

الاستنتاجات :

- حساسية طحلب الهيماتوكوكس البلوفيالي *Haematococcus pluvialis* للتغير في الشروط البيئية أو الغذائية، وإن التغير الأكثر وضوحاً هو تراكم الأستازنتين في الخلايا الحمراء غير المتحركة.
- بلغت نسبة الأستازنتين في خلايا الطحلب الحمراء 7.86% من الوزن الجاف، في ظل شروط مجهدة (الشدة الضوئية العالية ودرجة الحرارة المرتفعة ونقص المغذيات).
- كان النشاط المضاد للتأكسد الأعلى في الخلايا الخضراء المستخلصة بالإتانول، وكان النشاط المضاد للتأكسد الأقل في الخلايا الحمراء المستخلصة بالهكسان.

المراجع:

Aflalo, C.; Y. Meshulam; A. Zarka; and S. Boussiba (2007). On the relative efficiency of two vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga Haematococcus pluvialis. Biotechnol Bioeng 98: 300 – 305.

Bhalamurugan, G. L.; O. Valerie; and L. Mark (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. Environmental Engineering Research, 23(3), 229–241.

Bischoff, H. W; and H. C. Bold (1963). Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publications, Vol. 6318, 1- 95.

Boussiba, S.; W. Bing; J. P. Yuan; A. Zarka; and F. Chen (1999). Changes in pigments profie in the green alga Haeamtococcus pluvialis exposed to environmental stresses. Biotechnol. Lett. 21, 601– 604.

Butler, T. O.; G. J. McDougall; R. Campbell; M. S. Stanley; and J. G. Day (2018). Media screening for obtaining *Haematococcus pluvialis* red motile macrozooids rich in astaxanthin and fatty acids. *Biology*.

Cerón, M. C.; M. D. C. García-Malea; J. Rivas; F. G. Acien; J. M. Fernández; E. Del Río; ... & E. Molina (2007). Antioxidant activity of Haematococcus pluvialis cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. Applied microbiology and biotechnology, 74, 1112-1119.

Choi, Y. E.; Y.S. Yun; and J.M. Park (2002). Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular green alga, Haematococcus pluvialis, with fractional factorial design, Biotechnol. Prog. 18 (6) 1170 –1175.

Goiris, K., K. Muylaert; I. Fraeye; I. Foubert; J. De Brabanter; & L. De Cooman (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. Journal of applied phycology, 24, 1477-1486.

Halliwell, B.; and JMC. Gutteridge (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press; New York, NY, USA: pp. 79–350.

Han, D.; Y. Li; and Q. Hu (2013). Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications Algae, 28, 131–147.

Harker, M.; AJ. Tsavalos; and AJ. Young (1996). Autotrophic growth and carotenoid production of Haematococcus pluvialis in a 30liter air-lift photobioreactor. J Ferment Bioeng 82: 113 – 118.

Imamoglu, E.; MC. Dalay; and FV. Sukan (2009). Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga Haematococcus pluvialis. New Biotechnol. 26: 199 – 204.

Li, H.; K. Cheng; C. Wong; K. Fan; F. Chen; and Y. Jiang (2007). Evaluation of astaxanthin in Haematococcus pluvialis cells by first-order derivative ultravioletvisible spectrophotometry. J Biosci Bioeng 101: 104-110.

Liu, J.; X. Zhang; Y. Sun; and W. Lin (2010). Antioxidative capacity and enzyme activity in Haematococcus pluvialis cells exposed to superoxide free radicals. Chin. J. Oceanol. Limnol., 28, 1–9.

López-Pedrouso, M.; J. M. Lorenzo; & D. Franco (2022). Advances in natural antioxidants for food improvement. Antioxidants, 11(9), 1825.

Lorenz, T. (2017). A Technical Review of Haematococcus Algae, Cyanotech Corporation. Availableonline**:** http://www.cyanotech.com/pdfs/bioastin/axbul60. pdf

Ma, R.; S.R. Thomas-Hall; E.T. Chua; F. Alsenani; E. Eltanahy; M.E. Netzel; G. Netzel; Y. Lu; and P.M. Schenk (2018). Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in Haematococcus pluvialis in response to different LED lighting conditions, Bioresource Technology, 250, 591- 602.

Saha, SK.; E. McHugh; J. Hayes; S. Moane; D. Walsh, et al (2013). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga Haematococcus pluvialis**.** Bioresour Technol 128: 118-124.

Sarikurkcu, C.; K. Arisoy; B. Tepe; A. Cakir; G. Abali; & E. Mete (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey. Food and Chemical Toxicology, 47(10), 2479 -2483.

Shah, M.M.R.; Y. Liang; J.J. Cheng; and M. Daroch (2016). Astaxanthin-producing green microalga Haematococcus pluvialis: From single cell to high value commercial products. Front. Plant Sci, 7, 531.

Spolaore, P.; C. Joannis-Cassan; E. Duran; and A. Isambert (2006). Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng 101: 87 – 96.

Torzillo, G.; T. Goksan; C. Faraloni; J. Kopecky; and J. Masojídek (2003). Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of Haematococcus pluvialis during the shift from the green to red stage. J Appl Phycol 15: 127–136.

Wang, L.; B. Yang; B. Yan; and X. Yao (2012). Supercritical fluid extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis and its antioxidant potential in sunflower oil. Innov Food Sci Emerg Technol 13: 120 - 127.

Wayama, M.; S. Ota; H. Matsuura; N. Nango; A. Hirata; and S. Kawano (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga Haematococcus pluvialis. PLoS ONE 8: e 53618.

Zhu, Y.; Z. Zhang; X. Xu; J. Cheng; S. Chen; J. Tian; W. Yang; and M. Crocker (2020). Simultaneous promotion of photosynthesis and astaxanthin accumulation during two stages of Haematococcus pluvialis with ammonium ferric citrate. Sci. Total Environ. 750, 141689.

Estimation of Astaxanthin Content and Antioxidant Activity in Biomass of *Haematococcus pluvialis* Alga

Abeer Dayoub *(1) **Adnan Nizam**(1)
(1). Department of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University, Syria.
(*Corresponding author: Abeer Dayoub, E.mail: abeer84.dayoub@damascusuniversity.edu.sy, Phone No: +963 941141154)

Received: 24/08/2023 Accepted: 9/10/2023

Abstract

Microalgae represent a large, untapped source of new bioactive compounds (secondary metabolites) produced by some microalgae when they are subjected to harsh conditions (stress) in their environments such as: changes in salinity, temperature, nutrients, light, and ultraviolet radiation. Therefore, they must quickly adapt to new environmental conditions to survive. These secondary metabolites cannot be found in other organisms. Among these metabolites is astaxanthin (an active antioxidant) produced by the alga *Haematococcus pluvialis*, and its percentage in the samples study reached 7.86% of the dry weight of red cells. However, the antioxidant activity was higher in green cells extracted with ethanol compared to red cells, in which astaxanthin is in the form of esters of fatty acids.

Keywords: microalgae, astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, stress, fatty acids ester.