

(*Haematococcus pluvialis* F.)

۵ ۵

۵

:

سلولهای جلبک سبز هماتوکوکوس پلوویالیس در مرحله تولید سلولهای رویشی دو تازه و سلولهای غیرمتحرک، سبز رنگ می باشند. این سلولها به محض قرار گرفتن در معرض شدت نوربالا، به کیستهای قرمز رنگ که حاوی مقدار زیادی کتوکاروتنوئید قرمز رنگ، به نام آستاگزانتین است، تبدیل می شوند. به منظور معرفی مناسب ترین شدت نور، برای تولید آستاگزانتین در دو سویه جدا شده در ایران (TMU) و آلمان (SAG)، سلولهای کیست قرمز رنگ دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس که بر روی محیط کشت آگار نگهداری می شدند، در محلول غذایی و شرایط اتاقک کشت کنترل شده، کشت داده شد. نتایج نشان داد که تغییر شکل سه تیپ سلول این جلبک به یکدیگر (ژئوسپورهای تخم مرغی شکل دو تازه، سلولهای سبز غیر متحرک و سلولهای کیست قرمز رنگ) در دو سویه مورد مطالعه متفاوت بوده و تابع زمان انکوباسیون و شدت نور است. در ضمن، افزایش میزان آستاگزانتین تولید شده، در سویه ایرانی در مقایسه با سویه آلمانی حدود ۳-۲/۵ برابر می باشد. که شاید به سازش یافتن سویه ایرانی به محیطهایی با تشعشع زیاد و متناسب با افزایش تعداد سلول مربوطه باشد.

: هماتوکوکوس پلوویالیس، شدت نور، سلولهای رویشی، کیست زائی، آستاگزانتین.

در سلولهای گیاهان سبز، کاروتنوئیدها بعنوان گیرنده نور عمل کرده و موجب استفاده سلول از طول موجهای مختلف آن می شوند [۱]. همچنین کاروتنوئیدها موجب می گردند که رنگیژه کلروفیل محتوی سلول از صدمات اکسیداسیون نوری در برابر تشعشعات بالا حفاظت شوند [۲ و ۳]. سلولهای جلبک هماتوکوکوس در مرحله رشد رویشی سبز رنگ می باشند. به محض اینکه در معرض شدت نور بالا، دمای بالا و فقر عناصر غذایی ازت و فسفر قرار گیرند، سلولهای رویشی آنها به کیستهای قرمز رنگ تبدیل می شوند. در ضمن در کیستهای قرمز رنگ، مقداری کاروتنوئید آستاگزانتین انباشته می گردد [۴، ۵، ۶]. نقش فیزیولوژیکی آستاگزانتین

در سلولهای گیاهان سبز، کاروتنوئیدها بعنوان گیرنده نور عمل کرده و موجب استفاده سلول از طول موجهای مختلف آن می شوند [۱]. همچنین کاروتنوئیدها موجب می گردند که رنگیژه کلروفیل محتوی سلول از صدمات اکسیداسیون نوری در برابر تشعشعات بالا حفاظت شوند [۲ و ۳]. سلولهای جلبک هماتوکوکوس در مرحله رشد رویشی سبز رنگ می باشند. به محض اینکه در معرض شدت نور بالا، دمای بالا و فقر عناصر غذایی ازت و فسفر قرار گیرند، سلولهای رویشی آنها به کیستهای قرمز رنگ تبدیل می شوند. در ضمن در کیستهای قرمز رنگ، مقداری کاروتنوئید آستاگزانتین انباشته می گردد [۴، ۵، ۶]. نقش فیزیولوژیکی آستاگزانتین

به یک اندازه محتوی بیوماس (۱۱ میلی گرم) بود، به ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت تازه بولد، در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس ارلن ها در اتاقک رشد در شدت نورهای متفاوت در ۶-۴ تکرار انکوبه شدند. شدت نور در ۱۲ روز پایان آزمایش ۵۰۰ (۱۶۶۰) لوکس بود.

در دوران انکوباسیون و پس از پایان هر آزمایش، تعداد سلول، وزن خشک هر نمونه و میزان آستاگزانتین محتوی نمونه ها اندازه گیری شده و مقایسه میانگین ها در سطح ۵ درصد به روش آزمون دانکن انجام شد.

در چرخه زندگی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، سلولهای رویشی (سلولهای میکروزوئید و ماکروزوئید تاژکدار)، سلولهای سبز غیر متحرک (کیست نارس) و کیست قرمز (کیست بالغ) بطور وضوح تشخیص داده شدند. در طی چرخه زندگی این جلبک، سلولهای رویشی حاوی مقدار زیادی کلروفیل بود، در حالیکه در مرحله تولید سلولهای سبز غیر متحرک، از میزان کلروفیل آن کاسته شد. در مرحله تولید سلولهای کیست قرمز (مرحله کاروتن زائی)، میزان آستاگزانتین محتوی سلولها سریعاً افزایش یافت. ارقام مندرج در (جدول ۱) نشان می دهد که، شدت نور در میزان رشد دو سویه مختلف جلبک هماتوکوکوس اثر متفاوتی دارد. حداکثر تعداد سلول رویشی در سویه جلبک TUM (ایرانی) در مقایسه با سویه جلبک SAG (آلمانی) همسن آن، قبل از شروع آزمایش، به ترتیب $10^4 \times 3/75$ و $10^4 \times 3/25$ سلول دو تاژکه در هر میلی لیتر محیط کشت بوده است.

همچنین طی آزمایشی که تأثیر شدت نور، در مرحله تولید سلولهای سبز غیر متحرک بر تغییر فرم سلولهای رویشی، میزان بیوماس و تولید آستاگزانتین در دو سویه مختلف جلبک هماتوکوکوس ایرانی و آلمانی مورد بررسی قرار گرفت، مشخص شد که ۷۰ روز پس از شروع آزمایش،

ضمن از آستاگزانتین بعنوان یک ضد اکسید کننده [۱۲] در تغذیه طيور، ماهیان پرورشی و صنایع داروئی استفاده می شود [۱۶]. علیرغم دسترسی به آستاگزانتین مصنوعی، امروزه سعی شده از جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس که می تواند حاوی بیش از ۲٪ آستاگزانتین باشد، برای تولید آن استفاده شود. معهداً تولید این رنگیزه بعلت رشد ضعیف جلبک ذکر شده با مشکلات زیادی مواجه است که احتمالاً بعلت ناکافی بودن اطلاعات از نیاز غذایی و تأثیر عوامل محیطی بر رشد آن می باشد. از آنجا که یکی از راههای افزایش محصول آستاگزانتین افزایش بیوماس جلبکهای هماتوکوکوس از طریق افزایش سرعت رشد سلولهای آن است، لذا در این بررسی تأثیر شدت مختلف نور در مرحله تولید سلولهای سبز غیر متحرک و مرحله کاروتن زائی بر تغییر فرم سلولهای رویشی، رشد سلولهای سبز غیر متحرک، تولید بیوماس و تولید آستاگزانتین در دو سویه مختلف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس مورد بررسی قرار گرفته است.

در این بررسی، ضمن انجام چند آزمایش مجزا، میزان رشد و تولید آستاگزانتین در دو سویه مختلف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس با یکدیگر مقایسه شد. یکی از سویه ها دارای کد TUM بوده و از یک استخر سیمانی شناسائی و جداسازی شده است و دیگری دارای کد SAG است، که به وسیله همکار این طرح، از مرکز مطالعات جلبک شناسی دانشگاه کوتینگن آلمان تهیه شده است. برای انجام هر آزمایش، ابتدا مقداری کیست قرمز هر دو سویه که در محیط کشت آگار نگهداری می شدند، بطور همزمان از محیط آگار به محیط کشت اصلاح شده بولد [۱۷] منتقل شدند و سلولهای رویشی دو تاژکه تحت شرایط یکسان در داخل اتاقک رشد، در شدت نور ۱۲۴۰ لوکس، نور دایم و دمای 20°C تکثیر شدند. حجم معینی از سوسپانسیون سلولی هر یک از دو سویه که

اختلاف تولید بیوماس بین دو سویه ایرانی و آلمانی نیز از نظر آماری معنی دار بود. بیوماس تولید شده توسط سویه ایرانی در مقایسه با سویه آلمانی بیشتر بوده و تابع شدت نور در مرحله تولید سلولهای سبز غیرمتحرک و کیست قرمز می‌باشد. میانگین افزایش بیوماس در جلبکهای ۷۲ و ۸۴ روزه سویه ایرانی و سویه آلمانی در مدت ۱۲ روز حدود ۳۰٪ در شدت نور ۵۰۰ لوکس و ۴۱٪ در شدت نور ۱۶۶۰ لوکس بود (جدول ۳ و ۴).

بعلاوه، شدت نور در مرحله تولید سلول سبز غیر متحرک و هم در مرحله تولید سلولهای کیست قرمز(مرحله کاروتن زائی) بر تولید آستاگزانتین اثر متفاوتی بر جای می‌گذارد. میانگین افزایش تولید آستاگزانتین بوسیله جلبک ایرانی در مقایسه با جلبک آلمانی، در یک فاصله زمانی یکسان بوده و حدود ۲/۵ تا ۳ برابر می‌باشد که تابع افزایش شدت نوردر مرحله تولید سلولهای سبز غیرمتحرک و کاروتن زائی است (جدول ۵ و ۶). ارقام مندرج در (جدول ۵) نشان می‌دهد. که میانگین افزایش تولید آستاگزانتین در مدت ۱۲ روز در جلبک سویه ایرانی ۷۲ و ۸۴ روزه در مقایسه با جلبک سویه آلمانی همسن آن به ترتیب ۶۱٪ و ۶۹٪ بود. علت این افزایش احتمالاً پائین بودن قدرت تکثیر سلول و فتوسنتز در سویه آلمانی نسبت به سویه ایرانی است که شاید به طبیعی بودن سویه ایرانی در محیطهایی با تشعشع بیشتر برای به دام انداختن رادیکالهای آزاد مربوط باشد. از آنجا که تشکیل کاروتنوئید در بسیاری از ارگانسیم ها تابع نور است [۱۹]، لذا به نظر می‌رسد، افزایش تولید آستاگزانتین توسط نور، در جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، این جلبک را بعنوان یک سیستم وابسته به نور برای مطالعه و تنظیم فرایندهای کاروتن زائی در جلبکها معرفی نماید.

سلولهای رویشی سویه ایرانی در شدت نور ۵۰۰ لوکس تا حد صفر کاهش می‌یابد، در حالیکه در سویه آلمانی هنوز تعدادی سلول رویشی مشاهده می‌شود (جدول ۱). ۸۲ روز پس از شروع آزمایش، در سویه آلمانی همچنان سلولهای رویشی در شدت نور ۲۹۰ لوکس مشاهده شد(جدول ۱)، در حالیکه در سویه ایرانی در این مدت، کلیه سلولها به سلول سبز غیر متحرک تبدیل شده بودند.

اختلاف در تولید سلولهای سبز غیر متحرک و کیست قرمز بین دو سویه ایرانی و آلمانی در شدت نورهای ۲۹۰، ۵۰۰ و ۱۶۶۰ لوکس از نظر آماری معنی دار بود.

نتایج نشان می‌دهند که در شدت نور ۵۰۰ و ۱۶۶۰ لوکس تعداد سلولهای سبز غیر متحرک و کیست قرمز ۸۲ روزه نسبت به سلولهای ۷۰ روزه کاهش یافته است (جدول ۱). شاید علت این باشد که در مرحله تولید سلولهای سبز غیر متحرک، سلولهای ماکروزوئید دو تاژکه دو به دو با یکدیگر تلفیق و به یک سلول غیر متحرک سبز رنگ تبدیل می‌شوند که در نتیجه تعداد آنها کاهش می‌یابد.

همچنین، شدت نور بر کیست زائی جلبکهای ۷۰ و ۸۲ روزه دو سویه ایرانی و آلمانی نیز تأثیر متفاوتی دارد. با افزایش شدت نور از ۲۹۰ به ۵۰۰ لوکس در مرحله تولید سلول سبز غیر متحرک، ضریب افزایش تعداد سلولها در سویه ۷۰ و ۸۲ روزه جلبک ایرانی به ترتیب ۳/۳ و ۲/۸ می‌باشد در حالیکه این ضرایب برای سویه جلبک های همسن آلمانی آن به ترتیب ۱/۶ و ۱/۵ می‌باشد (جدول ۱). علت کاهش تعداد سلولهای جلبک ۸۲ روزه نسبت به جلبک ۷۰ روزه، در مدت ۱۲ روز شاید این باشد که گامتهای مشابه و متحرک با یکدیگر ترکیب شده و به سلولهای پالملا تبدیل می‌شوند که متعاقباً با تشکیل هماتوکیست های مقاوم کاروتنوئید آستاگزانتین در آنها تجمع می‌یابد [۱۷]. این کاهش تعداد سلول در سویه ایرانی ۲۳٪ و در سویه آلمانی ۴۶٪ بود. (جدول ۲).

تأثیر شدت نور بر تغییر فرم سلولهای رویشی و تبدیل آنها به سلولهای سبز غیر متحرک و کیست قرمز، در دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلووبالیس. شدت نور در مرحله کاروتن زائی (۱۲) روز پایان آزمایش) ۵۰۰ لوکس بوده است.

** (x)			* (%)							()	
میانگین ضریب افزایش در جلبک ۸۲روزه	میانگین ضریب افزایش در جلبک ۷۰روزه	درصد افزایش (+) و یا کاهش (-) در مدت ۱۲روز	ضریب افزایش	۸۲ روز پس از شروع آزمایش	ضریب افزایش	۷۰روز پس از شروع آزمایش	۸۲روز پس از شروع آزمایش	۷۰روز پس از شروع آزمایش	شروع آزمایش		
۲/۸ (۱۰۰)	۳/۳ (۱۰۰)	+۱۶ -۱۵ -۲۸	۲/۱ ۳/۲ ۳/۱	۷/۳ b ۱۱/۲ a ۱۱ a	۱/۸ ۳/۷ ۴/۳	۶/۲ d ۱۳/۰ b ۱۵/۲ a	۰/۰۰ ۰/۰۰ ۰/۰۰	۵ ۰/۰۰ ۰/۰۰	۱۰۰ ۱۰۰ ۱۰۰	۲۹۰ ۵۰۰ ۱۶۶۰	TMU
۱/۵ (۵۴)	۱/۶ (۵۰)	+۳۸ -۱۶ -۱۶	۱/۱ ۱/۷ ۱/۷	۴/۰ c ۶/۲ bc ۵/۸ bc	۰/۸ ۱/۸ ۲/۳	۲/۸ e ۶/۳ d ۸/۰ d	۳۳ ۰/۰۰ ۰/۰۰	۸۶ ۱۴ ۹	۱۰۰ ۱۰۰ ۱۰۰	۲۹۰ ۵۰۰ ۱۶۶۰	SAG

تأثیر شدت نور بر تغییر فرم سلولهای رویشی و تبدیل آنها به سلولهای سبز غیر متحرک و کیست قرمز، در دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلووبالیس. شدت نور در مرحله کاروتن زائی (۱۲) روز پایان آزمایش) ۱۶۶۰ لوکس بوده است.

** (x)			(x)				()	
درصد افزایش (+) و یا کاهش (-) در مدت ۱۲ روز	۸۲ روز پس از شروع آزمایش	۷۰ روز پس از شروع آزمایش	درصد تبدیل	۸۲ روز پس از شروع آزمایش	درصد تبدیل	۷۰ روز پس از شروع آزمایش		
+۶۳ -۲۳	۹/۴۸ b ۱۳/۱۸ a	۵/۸۳ superscribe ۱۵/۲۰ a	۱۰۰ ۱۰۰	۰/۰۰ ۰/۰۰	۸۱ ۱۰۰	۰/۶۷ ۰/۰۰	۲۹۰ ۵۰۰	TMU
+۱ -۴۶	۲/۳۵ d ۴/۴۴ c	۲/۳۳ d ۸/۰۰ b	۸۲ ۱۰۰	۰/۱۷ ۰/۰۰	۵ ۸۶	۳/۳۳ ۰/۳۳	۲۹۰ ۵۰۰	SAG

* در هنگام شروع آزمایش، میانگین تعداد سلولهای رویشی، در دو سویه جلبک TMU و SAG به ترتیب $۳/۷۵ \times ۱۰^4$ و $۳/۲۵ \times ۱۰^4$ سلول رویشی دو تاژکه در هر میلی لیتر محیط کشت بوده است، که برای هر سویه مساوی $۳/۵ \times ۱۰^4$ سلول رویشی در نظر گرفته شد.
 ** مقایسه میانگینها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظر آماری معنی دار هستند (آزمون دانکن) اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

تأثیر شدت نور بر تولید بیوماس، در دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس. شدت نور در مرحله کاروتن زائی (۱۲ روز پایان آزمایش) ۵۰۰ لوکس بوده است.

*()				()	
میانگین تولید بیوماس	در جلبک ۸۴ روزه	میانگین تولید بیوماس	در جلبک ۷۲ روزه		
۱/۰۵ (۱۰۰)	۰/۶۳c ۱/۱۳b ۱/۳۸a	۰/۷۲ (۱۰۰)	۰/۴۴d ۰/۷۹b ۰/۹۰a	۲۹۰ ۵۰۰ ۱۶۶۰	TMU
۰/۷۱ (۷۰)	۰/۳۷d ۰/۸۳c ۰/۹۳bc	۰/۵۱ (۷۲)	۰/۳۳d ۰/۴۸c ۰/۷۳b	۲۹۰ ۵۰۰ ۱۶۶۰	SAG

* مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظر آماری معنی دار هستند (آزمون دانکن). اعداد داخل پرانتز، اعداد نسبی است.

تأثیر شدت نور بر تولید بیوماس، در دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس. شدت نور در مرحله کاروتن زائی (۱۲ روز پایان آزمایش) ۱۶۶۰ لوکس بوده است.

*()				()	
میانگین تولید بیوماس	در جلبک ۸۴ روزه	میانگین تولید بیوماس	در جلبک ۷۲ روزه		
۱/۲۴ (۱۰۰)	۱/۱۰ab ۱/۳۸a	۰/۷۸ (۱۰۰)	۰/۶۵b ۰/۹۰a	۲۹۰ ۵۰۰	TMU
۰/۷۳ (۵۹)	۰/۵۳c ۰/۹۳b	۰/۵۵ (۷۱)	۰/۳۷c ۰/۷۳ab	۲۹۰ ۵۰۰	SAG

* مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظری آماری معنی دار هستند (آزمون دانکن). اعداد داخل پرانتز، اعداد نسبی است.

تأثیر شدت نور بر تولید آستاگزانتین، در دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس. شدت نور در مرحله کاروتن زائی (۱۲ روز پایان آزمایش) ۵۰۰ لوکس بوده است.

*()				()	
میانگین تولید آستاگزانتین	در جلبک ۸۴ روزه	میانگین تولید آستاگزانتین	در جلبک ۷۲ روزه		
۶/۷۳ (۱۰۰)	۲/۳۲d ۴/۶۸b ۱۳/۱۸a	۳/۰۲ (۱۰۰)	۱/۱۶d ۲/۱۷b ۵/۱۸a	۲۹۰ ۵۰۰ ۱۶۶۰	TMU
۲/۰۹ (۳۱)	۰/۷۵ ۱/۰۷ ۴/۴۴	۱/۱۸ (۳۹)	۰/۶۴d ۰/۷۴d ۲/۱۷c	۲۹۰ ۵۰۰ ۱۶۶۰	SAG

* مقایسه میانگین ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظری آماری معنی دار هستند (آزمون دانکن). اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

تأثیر شدت نور، بر تولید آستاگزانتین، در دو سویه جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس. شدت نور در مرحله کاروتن زائی (۱۲ روز پایان آزمایش) ۱۶۶۰ لوکس بوده است.

*()				()	
میانگین تولید آستاگزانتین	در جلبک ۸۴ روزه	میانگین تولید آستاگزانتین	در جلبک ۷۲ روزه		
۱۱/۳۳ (۱۰۰)	۹/۴۸b ۱۳/۱۸a	۴/۳۴ (۱۰۰)	۳/۴۹b ۵/۱۸a	۲۹۰ ۵۰۰	TMU
۳/۹۰ (۳۴)	۳/۳۵c ۴/۴۴c	۱/۹۱ (۴۴)	۱/۶۵d ۲/۱۷c	۲۹۰ ۵۰۰	SAG

* مقایسه میانگین ها در سطح ۵٪ انجام شده است و در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند از نظری آماری معنی دار هستند (آزمون دانکن). اعداد داخل پرانتز اعداد نسبی است.

- [1] Gogdell, R. J., Gillro, T., Anderson, P. O., Liu, R. S. H. and Asa, A. E., 1994. Carotenoids as accessory light harvesting pigments. *Pure Appl. Chem.* 66. pp. 1041-1046.
- [2] Burnett, J. H., 1976. Function of carotenoids other than in photosynthesis, In T. W., Goodwin (ed). *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Academic Press, London. pp. 655 – 680.
- [3] Goodwin, T. W. and Jamikorn, M., 1954. Studies in carotenogenesis, II. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochem. J.* 57, pp. 376-381.
- [4] Boussiba, S., Fan, L. and Vonshak, A., 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Meth. Enzymol.* 213, pp. 386-391.
- [5] Droop. M.R., 1955. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*. *Nature* 175, p.42.
- [6] Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S., 1991. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioengin.* 71, pp. 335-339.
- [7] Angelini, F., Ascoli, C., Frediani, C. and Petrachi, D., 1986. Transient photoresponses of a phototactic microorganism, *Haematococcus pluvialis*, revealed by light scattering. *Biophys. J.* 50, pp.929-936.
- [8] Fan, L., Vonshak, A., Zarka, and Boussiba, S., 1998. Does Astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage?. *Z. Naturforsch.* 53c, pp. 93-100.
- [9] Litvin, F. F., Sineshchekov, O. A. and Sineshchekov, V. A., 1978. Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*. *Nature* 271, pp.476-478.
- [10] Hagen. C., Braune, W., Birckner. E. and Nuske, J., 1993a. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales) the accumulation period as an active metabolic process. *New. Phytol.* 125, pp. 926-933.
- [11] Yong, Y. Y. R. and Lee, Y. K., 1991. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *Phycologia* 30, pp. 262-264.
- [12] Miki, W., 1991. Biological function and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63, pp. 141-146.
- [13] Krinsky, N. I., Mathews – Roth, M. and Taylor, R. F., 1989. *Carotenoids chemistry and Biology*. Plenum press, New york.
- [14] Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okumura, A. and Mori, H., 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis* 15, pp. 15-19.
- [15] Matsuno, T., 1991. Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure Appl. Chem.* 63, pp. 81-88.
- [16] Johnson, E. A. and An, G. H., 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotech.* 11, pp. 297-326.
- [17] Gong, X. and Chen, F., 1997. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* g, pp. 437-444.
- [18] Fritsch, F. E., 1968. *A treatise on the british freshwater algae*.
- [19] Rau, W., 1985. Mechanism of photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Pure Appl. Chem.* 57, pp. 777-784.