



اثر حذف تدریجی نیتروژن بر رشد، ترکیبات بیوشیمیایی و پروفایل اسید چرب ریزجلبک *Haematococcus pluvialis*

زهرا زارعی^۱، هاجر زمانی^{۲*}

DOI: 10.22124/japb.2022.22780.1476

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

عوامل فیزیوشیمیایی مختلف بر رشد *Haematococcus pluvialis* تاثیر می‌گذارد و به منظور تولید مقدار بهینه زیست‌توده و ترکیبات بیوشیمیایی، این عوامل باید بررسی شوند. اطلاعات محدودی در زمینه اثرات حذف تدریجی نیتروژن بر ریزجلبک‌ها وجود دارد. بنابراین، در مطالعه حاضر اثرات حذف تدریجی نیتروژن از محیط کشت در دو مرحله بر میزان رشد، کلروفیل، آستاگزانتین، ترکیبات بیوشیمیایی و پروفایل اسیدهای چرب مورد ارزیابی قرار گرفت. در طول دوره کشت ۵۵ روزه میزان زیست‌توده و کلروفیل تولید شده در گروه تیمار (شامل حذف تدریجی نیتروژن از محیط کشت) کاهش معنادار ($P < 0.05$) نسبت به گروه شاهد نشان داد، در حالی که میزان آستاگزانتین تغییر نکرد. بیشترین میزان آستاگزانتین قبل از تعویض محیط کشت در هر دو گروه آزمایش مشاهده شد. در پایان دوره آزمایش، ترکیبات لیپید، پروتئین و کربوهیدرات در کشت فاقد نیتروژن، نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. پروفایل اسیدهای چرب نشان داد که با حذف نیتروژن، میزان اسیدهای چرب غیراشباع کاهش یافت. در کل، نتایج این پژوهش نشان داد که حذف تدریجی نیتروژن از محیط کشت سبب تغییر در میزان زیست‌توده و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک شد. در همین شرایط چون سلول‌های ریزجلبک بتدریج تحت تنش شدید قرار گرفتند، در نتیجه تولید آستاگزانتین تحت تاثیر قرار نگرفت.

واژگان کلیدی: تنش نیتروژن، ریزجلبک، آستاگزانتین، رنگدانه، متابولیت.

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول: hzamani@shirazu.ac.ir

مقدمه

رئزجلبک‌های سبز شامل بیش از ۷۰۰۰ گونه هستند که در زیستگاه‌های مختلف رشد می‌کنند (Shah et al., 2016). زیست‌توده رئزجلبک به عنوان ماده اولیه برای تولید انرژی، جایگزین مناسبی برای انرژی زیستی حاصل از گیاهان است. با این وجود، احتمالاً کشت رئزجلبک‌ها تنها برای اهداف تولید انرژی زیستی از نظر اقتصادی به صرفه نیست. بنابراین کاربردهای دیگر رئزجلبک‌ها نیز همواره مورد بررسی قرار گرفته است (Panis and Carreon, 2016).

رئزجلبک‌هایی که تحت شرایط تنش خاص کشت می‌شوند، می‌توانند به همراه لیپیدها و کربوهیدرات‌ها، مقدار قابل توجهی از متابولیت‌های ثانویه را ذخیره کنند که بهره‌برداری صنعتی آنها اقتصادی و سودآور است. در بین این متابولیت‌ها رنگدانه کاروتنوئید آستاگزانتین یکی از ارزش‌ترین ترکیبات جلبک‌ها با طیف گسترده‌ای از کاربردها در مواد غذایی، مکمل‌های بهداشتی، افزودنی‌ها و رنگ‌های خوراکی است (Panis and Carreon, 2016).

رئزجلبک‌های سبز شامل بیش از ۷۰۰۰ گونه هستند که در زیستگاه‌های مختلف رشد می‌کنند (Shah et al., 2016). زیست‌توده رئزجلبک به عنوان ماده اولیه برای تولید انرژی، جایگزین مناسبی برای انرژی زیستی حاصل از گیاهان است. با این وجود، احتمالاً کشت رئزجلبک‌ها تنها برای اهداف تولید انرژی زیستی از نظر اقتصادی به صرفه نیست. بنابراین کاربردهای دیگر رئزجلبک‌ها نیز همواره مورد بررسی قرار گرفته است (Panis and Carreon, 2016).

رئزجلبک‌هایی که تحت شرایط تنش خاص کشت می‌شوند، می‌توانند به همراه لیپیدها و کربوهیدرات‌ها، مقدار قابل توجهی از متابولیت‌های ثانویه را ذخیره کنند که بهره‌برداری صنعتی آنها اقتصادی و سودآور است. در بین این متابولیت‌ها رنگدانه کاروتنوئید آستاگزانتین یکی از ارزش‌ترین ترکیبات جلبک‌ها با طیف گسترده‌ای از کاربردها در مواد غذایی، مکمل‌های بهداشتی، افزودنی‌ها و رنگ‌های خوراکی است (Panis and Carreon, 2016).

گونه *Haematococcus pluvialis* یک رئزجلبک تک سلولی آب شیرین متعلق به رده

جلبک‌های سبز (*Chlorophyceae*) و خانواده *Haematococcaceae* است که در بسیاری از زیستگاه‌های جهان یافت می‌شود (Jannel et al., 2020). این رئزجلبک به عنوان غنی‌ترین منبع آستاگزانتین طبیعی و موجود زنده اصلی تولید کننده این محصول تجاری در نظر گرفته می‌شود و در حال حاضر در مقیاس صنعتی برای تولید این کاروتنوئید برای کاربردهای انسانی کشت می‌شود. با این حال، آستاگزانتین استخراج شده از *H. pluvialis* کمتر از یک درصد از کل تولید جهان را به خود اختصاص می‌دهد (Zhao et al., 2019).

ترکیبات بیوشیمیایی *H. pluvialis* بسیار متغیر است و بستگی زیادی به منشا سویه، مرحله چرخه حیات آن و شرایط محیطی یا کشت دارد. بیوسنتز و تجمع آستاگزانتین با تغییر در مسیرهای متابولیسم اولیه همراه است که به طور کلی با افزایش سطح کربوهیدرات‌ها و اسیدهای چرب و کاهش نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه (به استثنای گلوتامیک اسید و گلوکاتینون) همراه می‌شود. به دلیل چرخه زندگی منحصر به فرد *H. pluvialis* ترکیب سلولی این رئزجلبک در حدها بین مراحل

ترکیبی از تنش‌ها اتفاق بیفتد. در بعضی موارد اگر سلول‌ها در معرض تنش شدید باشند، رشد سلول‌ها کاملاً متوقف می‌شود و سلول‌ها در مدت زمان نسبتاً کوتاهی شروع به از بین رفتن می‌کنند (Shah et al., 2016).

تجمع بیش از حد کاروتنوئید یا آستاگزانتین درون سلولی را می‌توان با قرار دادن کشت در معرض کمبود مواد غذایی از طریق تنش نیتروژن بهبود بخشید. با این حال اگر نیتروژن کم یا اصلاً تامین نشود، آسیب سلولی نیز می‌تواند به علت تخریب قابل توجه کلروفیل اتفاق بیفتد (Oslan et al., 2021).

کمبود مواد غذایی در محیط، منجر به تجمع آستاگزانتین در داخل سلول‌ها می‌شود. کمبود نیتروژن یکی از راهکارهای موثر در افزایش تولید آستاگزانتین است. محدودیت نیتروژن باعث دو برابر شدن تولید آستاگزانتین نسبت به شرایط کمبود فسفر می‌شود که می‌تواند به دلیل آسیب سلولی ناشی از کمبود نیتروژن باشد. این مورد، کاهش قابل توجه کلروفیل را در کمبود نیتروژن در مقایسه با شرایط کمبود فسفر نشان می‌دهد (Saha et al., 2013). با این وجود، پاسخ‌های مختلفی به محدودیت نیتروژن در ریزجلبک *H. pluvialis* گزارش شده است.

که به رنگ سبز و قرمز است، بسیار متفاوت است (Shah et al., 2016).

انواع مختلفی از محیط رشد برای کشت *H. pluvialis* استفاده می‌شود که متداول‌ترین آن‌ها عبارت هستند از BG-11، BBM و OHM. یک ترکیب بهینه محیط کشت برای دستیابی به سرعت بالای رشد و تجمع زیست‌توده از ترکیب ایده‌آل برای تجمع بالای آستاگزانتین متفاوت است (Shah et al., 2016). بهینه‌سازی شاخص‌های مختلف کشت مانند ترکیب محیط کشت، نور، pH و دما برای دستیابی به زیست‌توده زیاد و تولید آستاگزانتین از *H. pluvialis* ضروری است. بیشتر این شاخص‌ها دارای حالت بهینه مختلف برای تجمع زیست‌توده و یا تولید آستاگزانتین هستند. علاوه بر این مشخص شده است که تغییر در ترکیبات محیط کشت، سبب تغییرات ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها از جمله رنگیزه‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات می‌شود (Jannel et al., 2020).

قرار گرفتن تحت تنش شدید باعث افزایش تجمع آستاگزانتین می‌شود. این تنش‌ها می‌توانند متنوع باشند و تجمع موفقیت‌آمیز آستاگزانتین می‌تواند توسط یک تنش شدید یا

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت BG-11

غلظت (گرم در ۲۰۰ میلی‌لیتر)	ترکیبات
۱۸	NaNO ₃
۰/۸	K ₂ HPO ₄
۱/۵	MgSO ₄ .7H ₂ O
۰/۷۲	CaCl ₂ .2H ₂ O
۰/۱۲	Citric Acid.H ₂ O
۰/۱۲	(NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]
۰/۰۲	Na ₂ EDTA.2H ₂ O
۱ میلی‌لیتر	BG-11 Trace Metals Solution
ریمغذی‌ها	گرم در لیتر
H ₃ BO ₃	۱/۴
MnCl ₂	۰/۹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	۰/۲۲
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	۰/۳۹
CuSO ₄ .5H ₂ O	۰/۰۷۹
Co(NO ₃).6H ₂ O	۰/۰۴۹

طراحی آزمون و شرایط تیمار

در این آزمایش در طول دوره کشت دو بار محیط کشت در هر دو گروه شاهد و تیمار (حذف تدریجی نیتروژن) تعویض شدند. به این ترتیب که در شروع آزمایش میزان نیتروژن هر دو گروه مشابه بودند. پس از گذشت ۱۵ روز از شروع آزمایش محیط کشت هر دو گروه تعویض

تاکون گزارش‌های متعددی از اثرات محدودیت نیتروژن بر رشد و میزان تولید آستاگزانتین *H. pluvialis* منتشر شده است (Ordog et al., 2012; Zhang et al., 2019; Li et al., 2022). با این وجود، اطلاعات محدودی در زمینه اثرات حذف تدریجی نیتروژن بر رشد و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک *H. pluvialis* وجود دارد. از این رو در این پژوهش، تنش محدودیت نیتروژن به صورت تدریجی بر ریزجلبک *H. pluvialis* اعمال شد و اثرات آن بر رشد و میزان ترکیبات بیوشیمیایی از جمله لیپید، پروتئین، کربوهیدرات و آستاگزانتین و همچنین پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505 مورد استفاده در این پژوهش از شرکت آرین گستر خریداری شد. سلول‌های ریزجلبک در محیط کشت مایع اصلاح شده BG-11 مطابق جدول ۱ کشت داده شد (Hermansyah et al., 2018).

اندازه‌گیری میزان کلروفیل

از هر ارلن سوسپانسیون جلبکی برداشت و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به رسوب به دست آمده، متانول اضافه شد. مخلوط به دست آمده پس از همزدن توسط ورتکس سانتریفیوژ شده و جذب محلول رویی در طول موج‌های ۶۵۲ و ۶۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV-160A, ژاپن) خوانده شد. سپس با استفاده از معادلات مربوطه میزان کلروفیل محاسبه شد (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

اندازه‌گیری محتوای آستاگزانتین

به رسوب به دست آمده از سانتریفیوژ سوسپانسیون جلبک DMSO اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار گرفت. در ادامه، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند (۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) و جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و محاسبات بر اساس روش Liyanaarachchi و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد.

شدند. با این تفاوت که در گروه تیمار غلظت نیتروژن به نصف غلظت اولیه کاهش یافت، در حالی که در گروه شاهد تغییری در غلظت نیتروژن ایجاد نشد. در ادامه آزمایش پس از گذشت ۱۵ روز از تعویض اول محیط کشت، مجدد محیط کشت هر دو گروه تعویض شد و این بار در گروه تیمار، نیتروژن به طور کامل از محیط کشت حذف شد، اما محیط کشت گروه شاهد همچنان بدون تغییر، تعویض شد. این مطالعه در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع انجام شد. ارلن‌ها تحت روشنایی مداوم با شدت نوری ۳۳۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه و دمای متوسط 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رشد ریزجلبک

ابتدا سوسپانسیون ریزجلبک به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettich, Universal 32, آلمان) شد. سپس محلول رویی به آرامی جدا شده، در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شود. سپس وزن خشک زیست توده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات کل

به ۱۰ میلی‌گرم زیست‌توده خشک جلبک ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت (Hielscher, UP100H, آلمان) شد. مخلوط به دست آمده به مدت یک ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی به آرامی جدا شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک و ۱۲۰ میکرولیتر فنل ۵ درصد به ۱۸۰ میکرولیتر عصاره جلبک اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در یخچال و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در پایان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت کربوهیدرات نمونه مجهول به دست آمد (DuBois et al., 1956).

حمام آب گرم قرار گرفت. پس از خنک شدن در دمای محیط، به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (Kobayashi et al., 2013). به ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی، یک میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه و جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. از آلبومین سرم گاوی به عنوان محلول استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان لیپید کل

۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک به ۱۰ میلی‌گرم زیست‌توده خشک جلبک اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن در دمای محیط معرف فسفووانیلین اضافه شد. جذب محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد (Chai et al., 2018). همچنین از کلسترول به عنوان استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول

به ۱۰ میلی‌گرم زیست‌توده خشک جلبک ۳ میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم ۰/۵ نرمال اضافه و به مدت ۵ دقیقه سونیکیت شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد در

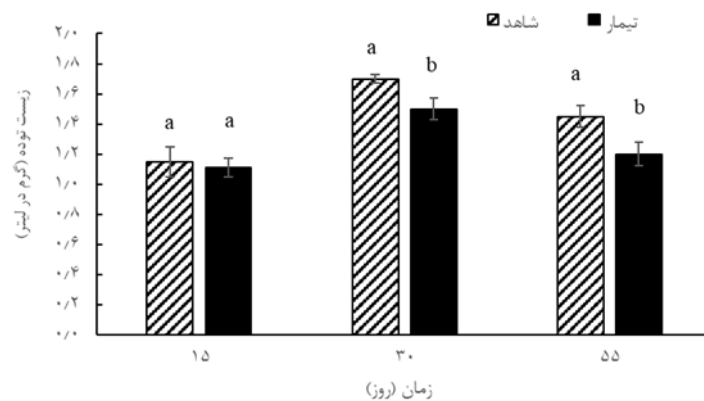
آنالیز اسید چرب

به منظور بررسی پروفایل اسید چرب ریزجلبک از روش Breuer و همکاران (۲۰۱۳) همراه با تغییراتی استفاده شد. به ۳۰ میلی‌گرم زیست‌توده خشک جلبک ۲ میلی‌لیتر متانول

حاوی ۵ درصد اسید سولفوریک اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۳ ساعت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از خنک شدن در دمای محیط، ۲ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی جدا شد. پس از اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و سانتریفیوژ مجدد دو فاز مشاهده شد. در پایان، فاز آلی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی (Agilent Technologies GC/MSD، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری
 آزمایش با سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS Statistics 26.0 و با استفاده از آزمون T-test در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شدند.

نتایج
ارزیابی رشد ریزجلبک
 میزان زیست‌توده تولید شده توسط ریزجلبک *H. pluvialis* در شرایط شاهد و حذف تدریجی نیتروژن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: میزان زیست‌توده تولید شده توسط ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* در شرایط شاهد و حذف تدریجی نیتروژن (میانگین \pm انحراف معیار؛ $n=3$). اختلاف معنادار بین گروه‌ها در زمان‌های مشخص با حروف مختلف نشان داده شده است ($P < 0.05$).

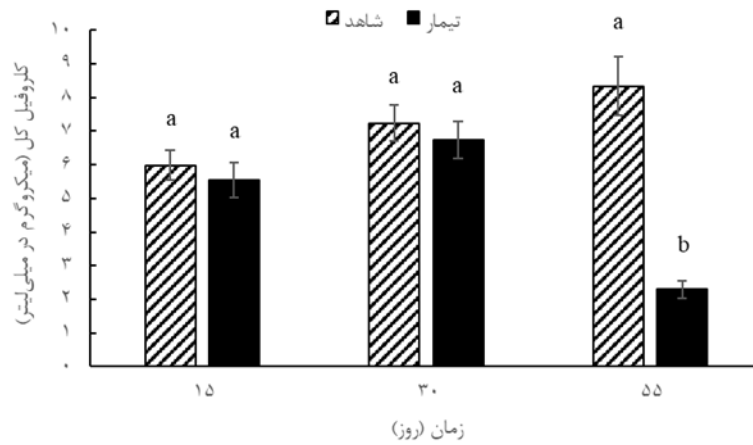
میزان زیست‌توده تولید شده توسط ریزجلبک *H. pluvialis* در شرایط شاهد و تیمار (شامل حذف تدریجی نیتروژن) تا قبل از تعویض کردن محیط کشت (روز پانزدهم) اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در روز ۳۰ آزمایش (قبل از مرحله دوم تعویض محیط کشت) کاهش معنی‌دار در میزان زیست‌توده تولید شده در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). در روز پایانی دوره کشت میزان زیست‌توده تولید شده در گروه تیمار ۱۷/۲۴ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافت.

محتوای آستاگزانتین

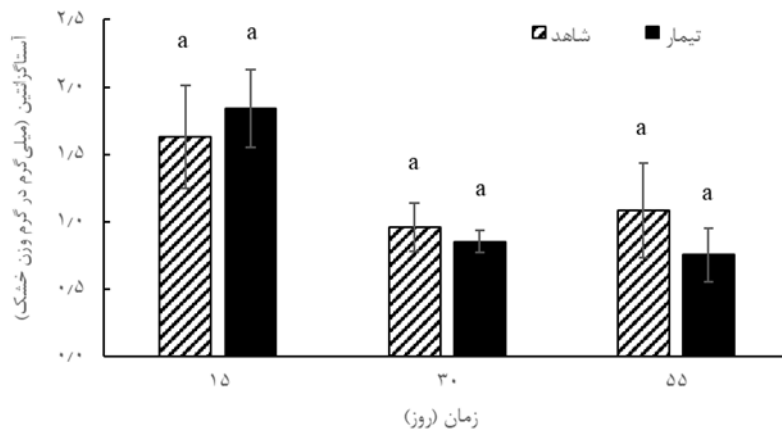
میزان زیست‌توده تولید شده توسط ریزجلبک *H. pluvialis* در شرایط شاهد و تیمار (شامل حذف تدریجی نیتروژن) تا قبل از تعویض کردن محیط کشت (روز پانزدهم) اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در روز ۳۰ آزمایش (قبل از مرحله دوم تعویض محیط کشت) کاهش معنی‌دار در میزان زیست‌توده تولید شده در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). در روز پایانی دوره کشت میزان زیست‌توده تولید شده در گروه تیمار ۱۷/۲۴ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافت.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

مقدار کلروفیل کل ریزجلبک *H. pluvialis* در دو گروه شاهد و تیمار در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان کلروفیل در روز پانزدهم کشت (قبل از تعویض کردن محیط کشت) در گروه شاهد و تیمار به ترتیب 5.98 ± 0.44 و 5.54 ± 0.53 میکروگرم در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌دار در میزان کلروفیل دو گروه مشاهده نشد.

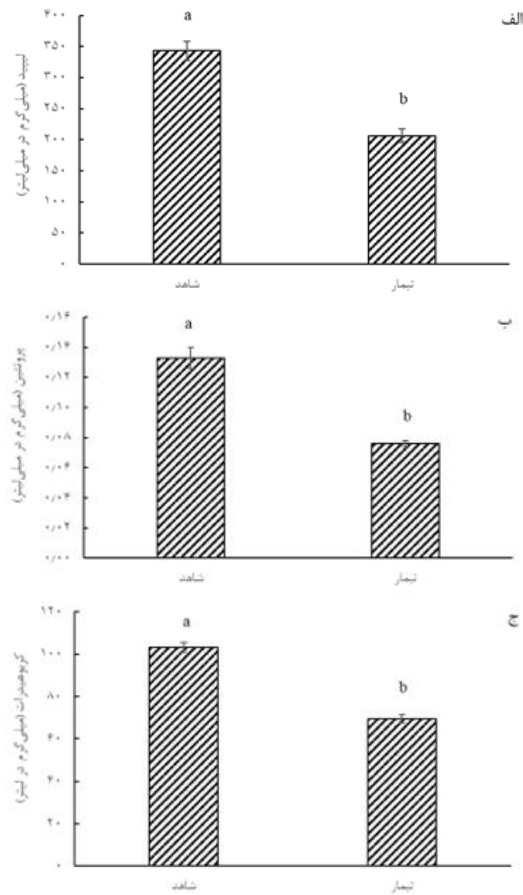


شکل ۲: میزان کلروفیل (a+b) ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* در شرایط شاهد و حذف تدریجی نیتروژن (میانگین \pm انحراف معیار؛ $n=3$). اختلاف معنادار بین گروه‌ها در زمان‌های مشخص با حروف مختلف نشان داده شده است ($P < 0.05$).



شکل ۳: میزان آستاگزانتین ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* در شرایط شاهد و حذف تدریجی نیتروژن (میانگین \pm انحراف معیار؛ $n=3$). اختلاف معنادار بین گروه‌ها در زمان‌های مشخص با حروف مختلف نشان داده شده است ($P < 0.05$).

ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک (شکل ۴-ب) و کربوهیدرات (شکل ۴-ج) را در شکل ۴ میزان ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک شامل لیپید (شکل ۴-الف)، پروتئین



شکل ۴: ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک *Haematococcus pluvialis* در شرایط شاهد و حذف تدریجی نیتروژن (میانگین \pm انحراف معیار؛ $n=3$). الف) لیپید. ب) پروتئین. ج) کربوهیدرات. اختلاف معنادار بین گروه‌ها در زمان‌های مشخص با حروف مختلف نشان داده شده است ($P < 0.05$).

نتایج نشان می‌دهد که در پایان دوره کشت مقادیر لیپید، پروتئین و کربوهیدرات در گروه تیمار به ترتیب ۳۹/۸۰، ۳۹/۸۵ و ۳۲/۶۰ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش داشت. بنابراین، در این پژوهش با حذف کامل نیتروژن از محیط کشت میزان ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک کاهش معنی‌دار یافت ($P < 0.05$).

بررسی اسیدهای چرب

پروفایل اسیدچرب ریزجلبک *H. pluvialis* در دو گروه شاهد و تیمار در جدول ۲ نشان داده

جدول ۲: پروفایل اسیدهای چرب *Haematococcus pluvialis* در گروه شاهد و تیمار در پایان دوره رشد (میانگین \pm انحراف معیار؛ $n=3$)

نوع اسید چرب	طول زنجیره اسید چرب	گروه شاهد (درصد)	گروه تیمار (درصد)
Palmitic Acid	C16:0	۲۷/۸۹ \pm ۲/۶۰ ^a	۲۶/۶۷ \pm ۶/۰۷ ^a
Palmitoleic Acid	C16:1	۱/۲۸ \pm ۰/۰۰ ^a	۱/۶۸ \pm ۰/۳۳ ^a
Stearic Acid	C18:0	۶/۳۰ \pm ۱/۱۴ ^a	۶/۲۱ \pm ۰/۵۴ ^a
Oleic Acid	C18:1	۳/۲۳ \pm ۰/۲۸ ^a	۴/۵۳ \pm ۰/۵۹ ^b
Linoleic Acid	C18:2	۱۷/۰۰ \pm ۰/۵۳ ^a	۱۰/۷۶ \pm ۲/۵۰ ^b
Linolenic Acid	C18:3	۲۰/۷۱ \pm ۰/۰۸ ^a	۱۵/۷۵ \pm ۳/۹۷ ^a
SFAs	-	۳۳/۷۹ \pm ۱/۷۱ ^a	۳۲/۸۸ \pm ۶/۳۱ ^a
USFAs	-	۴۱/۵۸ \pm ۰/۳۱ ^a	۳۲/۷۴ \pm ۵/۵۴ ^b

SFAs: اسیدهای چرب اشباع؛ USFAs: اسیدهای چرب غیراشباع. در هر ردیف اختلاف معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است ($P < 0.05$).

بیشترین میزان اسید چرب غیراشباع مربوط به اسید لینولنیک (C18:3) بود که تحت تنش نیتروژن در گروه تیمار کاهش معنی‌دار یافت ($P < 0/05$). بعد از آن اسید چرب اسید لینولئیک (C18:2) بیشترین میزان را در اسیده‌های چرب غیراشباع داشت. هر چند میزان این اسید چرب تحت تنش نیتروژن کاهش یافت. در کل، درصد اسیده‌های چرب اشباع در گروه شاهد و تیمار اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0/05$), در حالی که درصد اسیده‌های چرب غیراشباع با حذف نیتروژن از محیط کشت کاهش معنی‌دار یافت ($P < 0/05$).

بحث

در دسترس بودن مواد غذایی به طور عمده نیتروژن و فسفر برای رشد ریزجلبک‌ها ضروری است. نیتروژن یکی از اجزای اصلی در بسیاری از مولکول‌های درشت زیستی مانند کلروفیل‌ها، پروتئین‌ها و DNA است. در نتیجه، تنش نیتروژن اثرات منفی بر فیزیولوژی سلول از جمله رشد سلول دارد (Ordog et al., 2012). گزارش‌هایی وجود دارد که نشان دهنده ارتباط مستقیم رشد ریزجلبک با غلظت نیتروژن در محیط کشت است (Zhu et al., 2014). Tarazona-Delgado و همکاران (۲۰۲۱) با

مطالعه اثر تنش نیتروژن بر *Picocystis salinarum* نشان دادند که در گروه شاهد بالاترین میزان زیست‌توده در پایان دوره کشت (روز ۲۰ آزمایش) تولید شد، در حالی که با افزایش محدودیت نیتروژن زیست‌توده تولید شده توسط این ریزجلبک در روز ۲۰ آزمایش کاهش یافت. همچنین بر اساس نتایج Zhu و همکاران (۲۰۱۵) در میزان زیست‌توده تولید شده توسط ریزجلبک *Chlorella zofingiensis* تحت تنش محدودیت نیتروژن کاهش ۷۲ درصدی نسبت به گروه شاهد در پایان دوره کشت (۶ روز) مشاهده شد. در این پژوهش پس از حذف تدریجی نیتروژن که طی دو مرحله این کار صورت پذیرفت (در مرحله اول کاهش نیتروژن به نصف و در مرحله دوم حذف کامل نیتروژن) میزان زیست‌توده تولید شده نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. با مقایسه با گزارش‌های موجود در حذف کامل نیتروژن، حذف مرحله به مرحله نیتروژن کاهش شدیدی در میزان زیست‌توده ریزجلبک‌ها ایجاد نکرد. کلروفیل از اجزای ضروری در فرایند فتوسنتز و یک شاخص غیرمستقیم در سلامت گیاهان و ریزجلبک‌ها است. همچنین محتوای کلروفیل بر میزان فتوسنتز در ریزجلبک‌ها مستقیماً تأثیر می‌گذارد. تنش نیتروژن مانع

است (Shah et al., 2016). نیتروژن یکی از مواد غذایی ضروری است که رشد سلول و فعالیت آنزیمی *H. pluvialis* را بویژه برای تولید آستاگزانتین تحت تاثیر قرار می‌دهد (Oslan et al., 2021). در این پژوهش دو دلیل برای کاهش میزان آستاگزانتین تحت شرایط حذف کامل نیتروژن وجود دارد. یک دلیل این است که تحت شرایط تنش نیتروژن سلول‌های جلبک، انرژی خود را برای حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی اساسی پس از حذف نیتروژن حفظ کنند و در نتیجه این انرژی و اسکلت کربنی برای تولید آستاگزانتین استفاده نشد که نتیجه آن کاهش میزان آستاگزانتین بود (Zhang et al., 2019). دلیل دیگر آن است که با حذف تدریجی نیتروژن، سلول‌های ریزجلبک به یک‌باره تحت تنش شدید قرار نگرفتند و در نتیجه تولید آستاگزانتین برای مقابله با تنش تحت تاثیر قرار نگرفت. بنابراین با اعمال محدودیت تدریجی نیتروژن، سلول‌ها تحریک به تولید آستاگزانتین نشدند. در گروه شاهد نیز با هر بار تعویض محیط کشت، سلول‌های ریزجلبک در محیط کشت تازه و غنی از مواد غذایی رشد کرد و در نتیجه در شرایط رشد مطلوب، افزایش تولید آستاگزانتین رخ نداد.

از بیوسنتز کلروفیل و همچنین تخریب کلروفیل می‌شود (Jannel et al., 2020). یکی از پاسخ‌های عمده به تنش نیتروژن در *H. pluvialis* و *Dunaliella salina* کاهش *Chlamydomonas reinhardtii* شدید میزان کلروفیل بوده است (Cakmak et al., 2012; Recht et al., 2012; Sathasivam et al., 2018). در این پژوهش در گروه تیمار محدودیت نیتروژن با نصف غلظت نیتروژن در گروه شاهد، تغییری در میزان کلروفیل ایجاد نکرده بود. در عین حال حذف کامل نیتروژن از محیط کشت سبب کاهش میزان کلروفیل در پایان دوره کشت شد. در شرایط نامساعد محیطی یا کشت مانند شوری بالا، نور زیاد و کمبود مواد غذایی تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن برهم می‌خورد و در نهایت منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. پاسخ اولیه به تنش اکسیداتیو در *H. pluvialis* شامل تنظیم سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی است. هنگامی که شرایط تنش‌زا ادامه یافت این واکنش با بیوسنتز و تجمع آستاگزانتین جایگزین شد که می‌توان آن را به عنوان یک مکانیسم دفاعی بلند مدت در نظر گرفت. بنابراین تجمع آستاگزانتین در *H. pluvialis* یک پاسخ سلولی به شرایط تنش

نیترژن یک عنصر ضروری برای تولید اسیدهای آمینه است، به طوری که کمبود آن به طور چشمگیری بیوسنتز پروتئین‌ها را کاهش می‌دهد و باعث مهار چرخه اسید سیتریک می‌شود. نتیجه آن کاهش تقسیم سلولی و به دنبال آن کاهش پروتئین در مراکز واکنشی فتوسیستم و زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی است (Msanne et al., 2012). Cobos و همکاران (۲۰۱۷) کاهش در میزان پروتئین در شرایط کمبود نیترژن را گزارش کردند، به طوری که این میزان در *Acutodesmus obliquus* از ۱۲/۸ به ۹/۷ درصد، در *Ankistrodesmus sp.* از ۱۴/۵ به ۱۰/۵ درصد و در *Chlorella lewinii* از ۳۱/۲ به ۱۴/۲ درصد کاهش یافت. به طور مشابه در پژوهش حاضر نیز با حذف کامل نیترژن از محیط کشت، میزان پروتئین کاهش یافت. تولید کربوهیدرات به ذخایر تغذیه‌ای ریزجلبک وابسته است. نیترژن عنصر ضروری در متابولیسم کربن است. سلول‌های جلبک با تنظیم و کنترل فتوسنتز به غلظت‌های مختلف نیترژن پاسخ می‌دهند (Zhang et al., 2019). Tarazona-Delgado و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که در شرایط تنش نیترژن، محتوای کربوهیدرات در ریزجلبک

P. salinarum کاهش یافت. کمبود نیترژن از طریق کاهش میزان کلروفیل، میزان فتوسنتز را محدود می‌کند که نتیجه آن، کاهش در تولید کربوهیدرات است (Geider et al., 1993; Da Silva et al., 2009). به دلیل کمبود نیترژن، بازده فتوشیمیایی فتوسیستم II و فعالیت مرکز واکنش فتوسیستم II کاهش می‌یابد (Zhao et al., 2017). علاوه بر این، کاهش در میزان پروتئین‌های سلول در نتیجه کاهش نیترژن، باعث مهار تولید پروتئین‌های کلروپلاست می‌شود و بنابراین فتوسنتز را نیز مختل می‌کند (Young and Beardall, 2003). به طور مشابه در این پژوهش نیز تحت شرایط حذف کامل نیترژن همراه با کاهش در میزان کلروفیل و پروتئین، میزان کربوهیدرات نیز کاهش یافت. لیپیدها می‌توانند تحت شرایط نامطلوب برای بقا و تکثیر سلولی متابولیزه شوند (Courchesne et al., 2009). همچنین لیپیدها و کربوهیدرات‌های ذخیره شده می‌توانند در شرایط تنش به تولید و تجمع آستاگزانتین کمک کنند (Li et al., 2020). با این وجود گزارش‌هایی از افزایش میزان لیپیدها تحت شرایط تنش شدید نیترژن نیز وجود دارد (Tarazona-Delgado et al., 2021). در پژوهش حاضر کاهش میزان لیپید تحت تنش

نیترژن یک عنصر ضروری برای تولید اسیدهای آمینه است، به طوری که کمبود آن به طور چشمگیری بیوسنتز پروتئین‌ها را کاهش می‌دهد و باعث مهار چرخه اسید سیتریک می‌شود. نتیجه آن کاهش تقسیم سلولی و به دنبال آن کاهش پروتئین در مراکز واکنشی فتوسیستم و زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی است (Msanne et al., 2012). Cobos و همکاران (۲۰۱۷) کاهش در میزان پروتئین در شرایط کمبود نیترژن را گزارش کردند، به طوری که این میزان در *Acutodesmus obliquus* از ۱۲/۸ به ۹/۷ درصد، در *Ankistrodesmus sp.* از ۱۴/۵ به ۱۰/۵ درصد و در *Chlorella lewinii* از ۳۱/۲ به ۱۴/۲ درصد کاهش یافت. به طور مشابه در پژوهش حاضر نیز با حذف کامل نیترژن از محیط کشت، میزان پروتئین کاهش یافت. تولید کربوهیدرات به ذخایر تغذیه‌ای ریزجلبک وابسته است. نیترژن عنصر ضروری در متابولیسم کربن است. سلول‌های جلبک با تنظیم و کنترل فتوسنتز به غلظت‌های مختلف نیترژن پاسخ می‌دهند (Zhang et al., 2019). Tarazona-Delgado و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که در شرایط تنش نیترژن، محتوای کربوهیدرات در ریزجلبک

(۲۰۲۲) نشان دادند که میزان اسیدهای چرب غیراشباع ریزجلبک *Chlorella vulgaris* تحت تنش نیتروژن به مدت ۹ روز، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد یافت. به طور مشابه، در این پژوهش نیز در پاسخ به حذف کامل نیتروژن، میزان اسیدهای چرب غیراشباع کاهش یافت. اسیدهای چرب غیراشباع ترکیب اساسی در ساختار غشای کلروپلاست هستند و نقش آنها در یکپارچگی ساختار غشا در جلبک‌های سبز بسیار مهم است. بنابراین کاهش در میزان اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند با اثر محدودیت نیتروژن بر سیستم فتوسنتزی جلبک نیز مرتبط باشد (Chia et al., 2013). این پژوهش بینشی از نقش نیتروژن، در شرایط حذف تدریجی آن در تولید زیست‌توده و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک *H. pluvialis* و همچنین پروفایل اسید چرب ریزجلبک ارائه داد. همچنین پیشنهاد می‌شود به منظور درک بهتر تغییرات بیوشیمیایی ریزجلبک تحت شرایط حذف تدریجی نیتروژن، مطالعه متابولومیکس صورت پذیرد.

نیتروژن می‌تواند به این علت باشد که با کاهش میزان کربوهیدرات، اسکلت کربنی لازم برای تولید لیپیدها به میزان کافی در دسترس نبوده است. همچنین تحت تنش نیتروژن، تجزیه لیپیدها برای حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی ضروری برای بقای سلولی نیز رخ داده است.

نیتروژن نقش مهمی در پروفایل اسید چرب و روند تولید اسیدهای چرب در ریزجلبک‌ها دارد (Yaakob et al., 2021). مشابه با نتیجه پژوهش حاضر، کمترین میزان اسید چرب C18:2 و C18:3 به دلیل محدودیت نیتروژن در *Picocystis* و *Coccomyxa* sp. گزارش شده است (Msanne et al., 2012; Tarazona-Delgado et al., 2021). Zhu و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند که تحت شرایط تنش نیتروژن، در میزان اسیدهای چرب اشباع ریزجلبک‌های *C. zofingiensis* نسبت به گروه شاهد تغییری مشاهده نشد، در حالی که کاهش معنادار در میزان اسیدهای چرب غیراشباع نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. همچنین Liu و همکاران

منابع

- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248–254.
- Breuer G., Evers W.A., De Vree J.H., Kleinegris D.M., Martens D.E., Wijffels R.H. and Lamers P.P. 2013.** Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. *Journal of Visualized Experiments*, 80: 1–9 (e50628).
- Cakmak T., Angun P., Demiray Y.E., Ozkan A.D., Elibol Z. and Tekinay T. 2012.** Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109: 1947–1957.
- Chai S., Shi J., Huang T., Guo Y., Wei J., Guo M., Li L., Dou S., Liu L. and Liu G. 2018.** Characterization of *Chlorella sorokiniana* growth properties in monosaccharide-supplemented batch culture. *PLoS One*, 13: 1–19 (e0199873).
- Chia M.A., Lombardi A.T., Melao M.D.G. and Parrish C.C. 2013.** Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 48(1): 1–11.
- Cobos M., Paredes J.D., Maddox J.D., Vargas-Arana G., Flores L., Aguilar C.P., Marapara J.L. and Castro J.C. 2017.** Isolation and characterization of native microalgae from the Peruvian Amazon with potential for biodiesel production. *Energies*, 10: 1–16.
- Courchesne N.M.D., Parisien A., Wang B. and Lan C.Q. 2009.** Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141: 31–41.
- Da Silva A.F., Lourenco S.O. and Chaloub R. 2009.** Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalgae *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Aquatic Botany*, 91(4): 291–297.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. and Smith F. 1956.** Phenol sulphuric acid method for total carbohydrate. *Analytical Chemistry*, 26: 350–356.
- Geider R.J., Roch J.L., Green R.M. and Olaizola M. 1993.** Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron saturation.

- Journal of Phycology, 29: 755–766.
- Hermansyah H., Sakinah R.A., Julinar J., Hanafiah Z. and Zulkifli H. 2018.** Bioethanol production from microalgae *Oscillatoria* sp. cultured in blue green 11 and bold basal media. E3S Web of Conferences, 68: 1–8 (03018).
- Jannel S., Caro Y., Bermudes M. and Petit T. 2020.** Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin: Advances and key challenges to allow its industrial use as novel food ingredient. Journal of Marine Science and Engineering, 8(10): 1–48 (789).
- Kobayashi N., Noel E.A., Barnes A., Watson A., Rosenberg J.N., Erickson G. and Oyler G.A. 2013.** Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. Bioresour Technology, 150: 377–386.
- Li F., Cai M., Lin M., Huang X., Wang J., Ke H. and Yang S. 2020.** Enhanced biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* by a cell transformation strategy with optimized initial biomass density. Marine Drugs, 18(7): 1–18 (341).
- Li F., Cai M., Wu Y., Lian Q., Qian Z., Luo J., Zhang Y., Zhang N., Li C. and Huang X. 2022.** Effects of nitrogen and light intensity on the astaxanthin accumulation in motile cells of *Haematococcus pluvialis*. Frontiers in Marine Science. 9: 1–7 (909237).
- Lichtenthaler H.K. and Buschmann C. 2001.** Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 1(1): 1–8 (F4.3).
- Liu T., Chen Z., Xiao Y., Yuan M., Zhou C., Liu G., Fang J. and Yang B. 2022.** Biochemical and morphological changes triggered by nitrogen stress in the oleaginous microalga *Chlorella vulgaris*. Microorganisms, 10(3): 1–16 (566).
- Liyanaarachchi V.C., Nishshanka G.K.S.H., Premaratne R.G.M. M., Ariyadasa T.U., Nimarshana P.H.V. and Malik A. 2020.** Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. Biotechnology Reports, 28: 1–11 (e00538).
- Msanne J., Xu D., Konda A.R., Casas-Mollano J.A., Awada T., Cahoon E.B. and Cerutti H. 2012.** Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown

- microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*, 75: 50–59.
- Ordog V., Stirk W.A., Balint P., Van Staden J. and Lovasz C. 2012.** Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24: 907–914.
- Oslan S.N. H., Shoparwe N.F., Yusoff A.H., Rahim A.A., Chang C.S., Tan J.S. and Sulaiman A.Z. 2021.** A Review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2): 1–15 (256).
- Panis G. and Carreon J.R. 2016.** Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18: 175–190.
- Recht L., Zarka A. and Boussiba S. 2012.** Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6): 1495–1503.
- Saha S.K., McHugh E., Hayes J., Moane S., Walsh D. and Murray P. 2013.** Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 128: 118–124.
- Sathasivam R., Pongpadung P., Praiboon J., Chirapart A., Trakulnaleamsai S., Roytrakul S. and Juntawong N. 2018.** Optimizing NaCl and KNO₃ concentrations for high β -carotene production in photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 isolated from saline soil sample. *Chiang Mai Journal of Science*, 45: 106–115.
- Shah M., Mahfuzur R., Liang Y., Cheng J.J. and Daroch M. 2016.** Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1–28 (531).
- Tarazona-Delgado R., Guarieiro M.D., Antunes P.W., Cassini S.T., Terreros H.M. and Fernandes V.O. 2021.** Effect of nitrogen limitation on growth, biochemical composition, and cell ultrastructure of the microalga *Picocystis salinarum*. *Journal of Applied Phycology*, 33: 2083–2092.
- Yaakob M.A., Mohamed R.M.S.R., Al-Gheethi A., Aswathnarayana Gokare R. and Ambati R.R. 2021.** Influence of nitrogen and

phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells*, 10: 393–412.

Young E.B. and Beardall J. 2003. Rapid ammonium- and nitrate-induced perturbations to Chl a fluorescence in nitrogen-stressed *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 39: 332–342.

Zhang Y., Wu H., Yuan C., Li C.T. and Li A. 2019. Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogen starvation and resupply. *Journal of Applied Phycology*, 31: 2797–2809.

Zhao L.S., Li K., Wang Q.M., Song X.Y., Su H.N., Xie B.B., Zhang X.Y., Huang F., Chen X.L., Zhou B.C. and Zhang Y.Z. 2017. Nitrogen starvation impacts the photosynthetic performance of *Porphyridium cruentum* as revealed by chlorophyll a

fluorescence. *Scientific Reports*, 7(1): 8542–8553.

Zhao Y., Yue C., Geng S., Ning D., Ma T. and Yu X. 2019. Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42: 593–602.

Zhu S., Huang W., Xu J., Wang Z., Xu J. and Yuan Z. 2014. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152: 292–298.

Zhu S., Wang Y., Shang C., Wang Z., Xu J. and Yuan Z. 2015. Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(2): 205–209.



Research Paper

Effect of gradual nitrogen removal on growth, biochemical composition and fatty acid profile of microalga *Haematococcus pluvialis*

Zahra Zarei¹, Hajar Zamani^{2*}

DOI: 10.22124/japb.2022.22780.1476

Received: August 2022

Accepted: October 2022

Abstract

Different physicochemical factors influence the growth of *Haematococcus pluvialis* and should be assessed in order to optimal production of biomass and its chemical composition. There is few information on the effect of gradual nitrogen limitation on the microalgae. Hence, in the present study the effects of gradual nitrogen removal from culture medium, in two stages, on growth, chlorophyll and astaxanthin content, biochemical compounds and fatty acid profile in *H. pluvialis* was evaluated. During 55 days culture, biomass production and chlorophyll content in the treatment group showed a significant decrease ($P < 0.05$) compared to the control, whilst no significant change was observed in the astaxanthin content. The highest content of astaxanthin was observed before the replacement of culture medium in both experimental groups. At the end of the experiment, the content of lipid, protein, and carbohydrate in the nitrogen-free culture showed a significant decrease. Fatty acid profile showed a reduction in unsaturated fatty acid with nitrogen limitation. Overall, the results showed that the stepwise nitrogen depletion caused a change in biochemical composition of microalgae. In the same condition, as the algal cells were gradually subjected to severe stress, consequently, the production of astaxanthin was not affected.

Key words: *Nitrogen Stress, Microalga, Astaxanthin, Pigment, Metabolite.*

1- M.Sc. in Plant Physiology, Department of Biology, College of Science, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Biology, College of Science, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*Corresponding Author: hzamani@shirazu.ac.ir