มหัศจรรย์สารสีแดง... จากสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส

Wonders of red pigment from Haematococcus algae

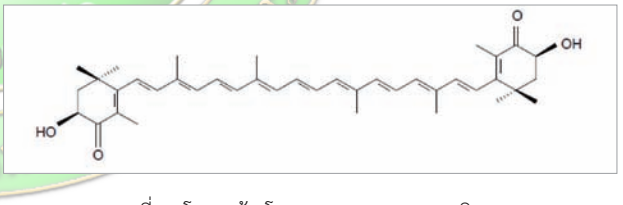
วนิดา ปานอุทัย

ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
ม. เกษตรศาสตร์

แอสตาแซนธิน (astaxanthin) จัดอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์กลุ่มหนึ่งซึ่งมีมูลค่าสูง เป็นสารสีแดงที่มีบทบาทสำคัญทางอุตสาหกรรม ใช้เป็นแหล่งให้สีในอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะสัตว์น้ำที่เป็นอาหารทะเล ได้แก่ แซลมอน ปลาเทราท์ ปลาทะเล และกุ้ง โดยสารแอสตาแซนธินนั้นมีความสำคัญหลายประการ ได้แก่ ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันจำเป็นไม่อิ่มตัว ป้องกันผลกระทบจากรังสียูวี ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การผลิตสารแอสตาแซนธินไม่สามารถผลิตได้จากสัตว์ จึงมีการเพิ่มสารสีแอสตาแซนธินลงในอาหารสัตว์ เช่น ในอาหารสำหรับปลาเทราท์และแซลมอนเพื่อให้เกิดสีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Goa et al., 2012; Guerin et al., 2003; Kang et al., 2005; Orosa et al., 2005) โดยสารแอสตาแซนธินจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสาหร่าย *Haematococcus sp.*

สารแอสตาแซนธิน (Astaxanthin)

แอสตาแซนธินสามารถผลิตได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Haematococcus sp.* โดยแอสตาแซนธิน (3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione) เป็นรงควัตถุสีแดงกลุ่ม ketocarotenoid หรือ secondary carotenoid ชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างพื้นฐานเกิดจากไลโคพีน (lycopene) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มวงแหวนที่ปลายทั้งสองด้านต่อกันด้วยพันธะคู่ หรือ polyene system โมเลกุลแอสตาแซนธินมีตำแหน่งของคาร์บอน 2 ตำแหน่งสมมาตรกัน โดยมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่ง 3, 3' ของวงเบนซีนและหมู่คีโตน (=O) ที่ตำแหน่ง 4, 4' บนปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล แอสตาแซนธินสามารถเกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ คือ แบบ enantiomers (3S, 3'S และ 3R, 3'R) และแบบ meso (3R, 3'S) (Lemoine และ Schoefs, 2010; Visser et al., 2003) โดยโครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนธินจาก *Haematococcus sp.* แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนธินจาก *Haematococcus sp.*ที่มา : Lemoine et al. (2010)

สาหร่าย *Haematococcus sp.*

Haematococcus sp. เป็นสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว จัดอยู่ใน Division Chlorophyta, Class Chlorophyceae, Order Volvocales, Suborder Volvocineae, Family Chlamydo- monadaceae และ Genus Haematococcus สาหร่ายชนิดนี้ในสภาวะปกติเซลล์มีรูปร่างกลมรี เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา 2 เส้น มีโปรโตพลาสต์อยู่กลางเซลล์ ซึ่งจะแยกกับผนังเซลล์ด้วยบริเวณที่เป็นวุ้น (watery jelly) แต่จะมีเส้นบางๆ ของไซโตพลาสซึมจำนวนมากเชื่อมโยงกับผนังเซลล์ไว้ ในระยะนี้จะพบไพรีนอยด์ (pyrenoid) อายสปอร์ต (eye spot) และแวคิวโอ (vacuoles) อยู่บนคลอโรพลาสต์ แต่

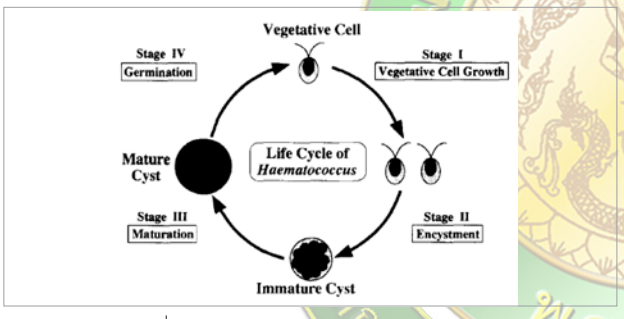
เมื่อเซลล์ตกอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะเปลี่ยนเป็น aplanospore ที่มีรูปร่างกลมและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เท่าของเซลล์ปกติ นอกจากนี้โปรโตพลาสต์ของ aplanospore จะถูกบดบังด้วยรงควัตถุสีแดงที่เรียกว่า Haematochrome หรือ Astaxanthin สาหร่ายสกุลนี้สามารถพบได้บนก้อนหิน บ่อ หนอง สระน้ำต่างๆ โดยทั่วไปองค์ประกอบของสาหร่าย *Haematococcus sp.* ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย แคโรทีนอยด์ กรดไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมี แร่ธาตุ และกรดไขมันของสาหร่าย *Haematococcus*

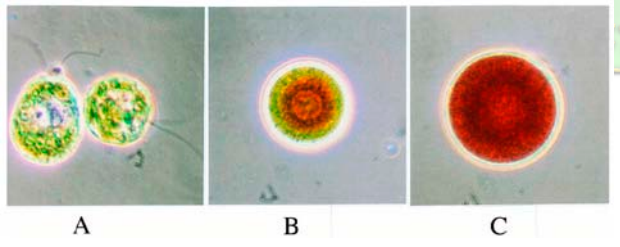
Composition	% (Dry Matter)
Biochemical composition	
Dry matter	95.8 ± 0.4
Total ash	8.9 ± 0.2
Crude protein	10.2 ± 0.2
Crude fat	40.7 ± 1.2
Mineral composition	
N (%)	1.64
P (%)	1.31
K (%)	0.97
Ca (%)	0.25
Mg (%)	0.22
Na (%)	5.87
Cu (mg/kg)	344.0
Mn (mg/kg)	111.9
Zn (mg/kg)	232.2
Fe (mg/kg)	822.7
Main Fatty acids (mg/100g)	
14:0	154 ± 1
16:0	5977 ± 12
18:0	603 ± 10
16:1	102 ± 2
18:1	11125 ± 51
16:4 ω3	1160 ± 6
18:3 ω3 (ALA)	3981 ± 2
20:5 ω3 (EPA)	579 ± 6
18:2 ω6	7844 ± 20
18:3 ω6 (GLA)	472 ± 8

ที่มา: Batista et al. (2013)

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus sp.* ที่มีสภาวะแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญเติบโตจน กระทั่งเกิดการสะสมของสารแอสตาแซนธินมากขึ้น และเซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยในช่วงเริ่มต้นเซลล์จะมีสีเขียว (vegetative cell) สามารถเคลื่อนที่ได้ สารแคโรทีนอยด์ที่พบประกอบด้วย ลูทีน (lutein) มากถึง 75-80% และบีต้า-แคโรทีน 10-12% ขณะที่เริ่มมีการสะสมสารแคโรทีนอยด์มากขึ้นจนถึงระยะสุดท้ายเซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีแดง และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จะพบสารแอสตาแซนธิน (astaxanthin) มากที่สุดประมาณ 80% ขององค์ประกอบแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Kobayashi et al.,1997; Lorenz และ Cysewski, 2000) ซึ่งมีวงจรชีวิตและลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาดังภาพที่ 2 และ 3 การสะสมสารแอสตาแซนธินเกิดจากการกระตุ้นโดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สภาวะที่มีไนโตรเจนและสารอาหารจำกัด ความเข้มแสงและอุณหภูมิสูง ค่าความเป็นกรดด่างและความเค็มไม่เหมาะสม เป็นต้น (Kang et al., 2005)



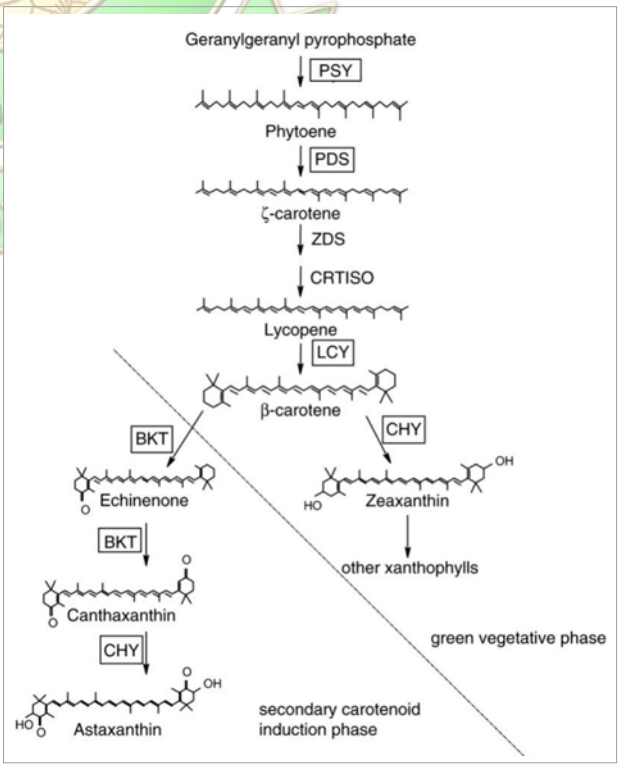
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของ *Haematococcus sp.*
ที่มา : Kobayashi et al. (1997)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ *Haematococcus sp.* เมื่อเกิดการสะสมแอสตาแซนธิน โดยที่ (A) เซลล์ *Haematococcus sp.* ในสภาวะการเจริญเติบโตปกติ (vegetative cell) (B) เซลล์ *Haematococcus sp.* เริ่มมีการสะสมสารแอสตาแซนธิน และ (C) เซลล์ *Haematococcus sp.* ที่มีการสะสมของสารแอสตาแซนธิน (cyst cell)
ที่มา : Sun et al. (1998)

การผลิตแอสตาแซนธินจากสาหร่าย Haematococcus

สาหร่ายน้ำจืดสีเขียว *Haematococcus sp.* สามารถผลิตแอสตาแซนธินซึ่งเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoid) จากธรรมชาติที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยสามารถผลิตแอสตาแซนธินจากสาหร่าย *Haematococcus sp.* ได้สูงถึง 4% (Olaizola et al., 2002; Ranjbaret al., 2008; Vidhyavathi et al., 2008) การผลิตแอสตาแซนธินจากสาหร่าย *Haematococcus sp.* นั้นเกิดจาก 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (Green stage) เซลล์จะมีสีเขียวหลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่การสร้างแอสตาแซนธิน (Red stage) เซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นโดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย (Kang et al., 2005) การผลิตสารแอสตาแซนธินในสาหร่าย *Haematococcus sp.* เกิดขึ้นโดยผ่านวิถีการสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ มีเอนไซม์ β-carotene ketolase (BKT) และ β-carotenehydroxylase (CRTR-B) ที่เกี่ยวข้องในการสร้างแอสตาแซนธินจากบีต้า-แคโรทีน โดยเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ เอนไซม์ β-carotene ketolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนบีต้า-แคโรทีนเป็นแคนตาแซนธิน (canthaxanthin) ผ่านสารเอ็คไคนโนน (echinenone) เป็นตัวกลาง โดยสารแอสตาแซนธินในสาหร่าย *Haematococcus sp.* เกิดขึ้นผ่านวิถีแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoid) ดังภาพที่ 4 (Grünewald et al., 2001; Huang et al., 2006; Vidhyavathi et al., 2008)



ภาพที่ 4 Secondary carotenoid pathway เพื่อการผลิตแอสตาแซนธินจากสาหร่าย *Haematococcus*
ที่มา : Vidhyavathi et al. (2008)

ระบบในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Haematococcus

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus sp.* เพื่อผลิตแอสตาแซนธินนั้นสามารถทำได้ทั้งในระบบปิด และระบบเปิดซึ่งมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 ในปัจจุบันนิยมใช้ระบบปิดเนื่องจากสามารถควบคุมและจัดการได้ง่าย แต่ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ระบบเปิด

ตารางที่ 2 ข้อดีและข้อเสียในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบระบบเปิด และระบบปิด

Parameter	Open system (raceway ponds)	Closed system (Photobioreactor)
Contamination risk	Extremely high	Low
Space required	High	Low
Water losses	Extremely High	Almost none
CO_2 – losses	High	Almost none
Biomass quality	Satisfactory	High
Variability as to cultivation species	Cultivation possibilities are restricted to a few algal varieties	High, nearly all microalgal varieties may be cultivated
Flexibility of production	Change of production between the possible varieties nearly impossible	Change of production without any problem
Reproducibility of production parameter	Dependent on exterior condition	Possible within certain tolerances
Standardization	Limited scope	Possible
Weather dependence	Difficult control during rain	Insignificant, because closed configurations allow production also during bad weather
Period until net production is reached after start or interruptions	Long	Short
Biomass production	Low	High
Efficiency of treatment process	Low	High

ที่มา: Pulz (2001)

สารแอสตาซาธินที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Haematococcus sp.* สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย ได้แก่ ใช้ในอาหารที่มีฤทธิ์ทางยา ยารักษาโรค อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมอาหาร รวมทั้งอาหารสัตว์ เป็นต้น (Guerin et al., 2003) และในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายในเชิงการค้าทั่วโลกดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลิตภัณฑ์แอสตาแซนธินจาก *Haematococcus sp.* ที่มีจำหน่าย

Product	Company	Particulars	Website
AstaFactor®	Mera Pharmaceuticals Inc., USA	Astaxanthin packaged as soft gel; dietary supplement derived from *Haematococcus*	www.astafactor.com
AstaPureTM	Algatechnologies Ltd., Iarael	Dry algal biomass, astaxanthin beadlets and oleoresin	www.algatech.com

Product	Company	Particulars	Website
AstaXin® AstaCarox®	BioReal, Sweden	Dietary supplement containing *Haematococcus*- crushed and dried algae meal	www.bioreal.se
AstaEquus®	BioReal, Sweden	Feed supplement for horses	www.bioreal.se
AstaREAL®	BioReal, Sweden	Super critical fluid-oil extract derived from crushed algae	www.bioreal.se
BioAstin®	Cyanotech Corporation, USA	*Haematococcus* extract – packaged in soft gel, beadlest; dietary supplement	www.cyanotech.com
Britaxan®	Britannia Health Products Ltd., UK	Astaxanthin complex with other carotenoids packaged as capsule – dietary supplement	www.britannia-health.co.uk
NaturAsta®	Jingzhou Natural Astaxanthin Inc., China	Dry algal biomass and astaxanthin soft gel	www.asta.cn
Naturose®	Cyanotech Corporation, USA	*Haematococcus* algal meal; pigmentation source for ornamental fish and animals	www.cyanotech.com
Navaasta®	BioReal, Sweden	Feed supplement or animals	www.bioreal.se
Stazen®	Stazen Inc., USA	Dietary supplement containing *Haematococcus* – crushed and dried algae meal	www.stazen.com
Zanthin®	Valensa International, USA	*Haematococcus* extract, soft gel, beadlets	www.usnutra.com

เอกสารอ้างอิง

Bastista, A. P., L. Gouveia, N. M. Bandarra, J. M. Franco and A. Raymundo. 2013. Comparison of microalgalbiomass profiles as novel functional ingredient for food products. Algal. 2(2): 164-173.

Goa, Z., C. Meng, X. Zhang, D. Xu, Y. Zhao, Y. Wang, H. Lv, L. Yang, L. Chen and N. Ye. 2012. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in H. pluvalis. PLoS One. 7(8): e422243.

Grünewald, K., J. Hirschberg and C. Hagen. 2001. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus* pluvialis. J Biol Chem. 276(8): 6023-9.

Guerin, M., M. E. Huntley and M. Olaizola. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition. Trends Biotechnol. 21(5): 210-216.

Huang, JC., F. Chen and G. Sandmann. 2006. Stress-related differential expression of multiple ß-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus* pluvialis. J Biotech. 122: 176–185.

Kang, C. D., J. S. Lee, T. H. Park and S. J. Sim. 2005. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus* pluvalis. Appl Microbiol Biotechnol. 68: 237-241.

Kobayashi, M., Y. Kurimura, T. Kakizono, N. Nishio and Y. Tsuji. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus* pluvialis. J Ferment Bioengineer. 84(1): 94-97.

Lemoine, Y. and B. Schoefs. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. Photosynth Res. 106(1-2):155-77.

Lorenz, R. T. and G. R. Cysewski. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends Biotechnol. 18(4): 160-167.

Olaizola, M. and M. E. Huntley. 2002. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae, Recent Advances in Marine Biotechnology. 9: 143-164.

Orosa, M., D. Franqueira, A. Cid and J. Abalde. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus* pluvialis. Biores Technol. 96: 373-378.

Pulz, O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 57: 287-293.

Ranjbar, R., R. Inoue, H. Shiraishi, T. Katsuda and S. Katoh. 2008. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus* pluvalis in a bubble column photobioreactor. Biochem Eng J. 39: 575-580.

Sun, Z., FX. Jr. Cunningham and E. Gantt. 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. Proc Natl Acad Sci. 95(19): 11482-8.

Vidhyavathi, R., L. Venkatachalam, R. Sarada and GA. Ravishankar. 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus* pluvialis under nutrient stress conditions. J Exp Bot. 59(6):1409-18.

Visser, H., A. J. J. Ooyen and J. C. Verdoes. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthesis pathway of Xanthophyllomyces dendrorhous. FEMS Yeast Res. 1590: 1-11.