

## بررسی اثر ممانعت مسیر موالونات/استات (MVA) در تولید لیپید در جلبک‌های سبز *Dunaliella bardawil* و *Dunaliella salina* با استفاده از ماده لواستاتین

زهرا زارع چاوشی و منصور شریعتی\*

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۳/۲۲)

### چکیده

بسیاری از ریز جلبک‌ها غنی از چربی می‌باشند و اخیراً به علت کمی نیاز به مواد غذایی و رشد سریع بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از آنجا که ماده لواستاتین بازدارنده مسیر موالونات (مسیر بیوسنتز بتاکاروتن) می‌باشد و بتاکاروتن‌ها ترکیبات تریپنی و از دسته لیپیدهای ساده می‌باشند، در این مطالعه اثر بازدارنده لواستاتین روی ریز جلبک‌های *Dunaliella salina* و *Dunaliella bardawil* در تولید لیپید مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های جلبکی در شرایط اتوتروف تحت تاثیر غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار ماده لواستاتین به مدت دو هفته کشت داده شدند، نتایج نشان داد که ممانعت مسیر موالونات منجر به کاهش رشد سلولی، غلظت کلروفیل و بتاکاروتن و نیز افزایش در تولید لیپید در *D. salina* می‌گردد. در صورتی که در *D. bardawil* افزایش در تولید لیپید با کاهش در غلظت کلروفیل و بتاکاروتن سلولی بدون تحت تاثیر قراردادن رشد سلولی بدست آمد. همچنین نتایج حاکی از تولید دو برابری محتوی سلولی کلروفیل و بتاکاروتن در *D. bardawil* نسبت به *D. salina* بود. در حالیکه *D. salina* رشد دو برابری نسبت به *D. bardawil* نشان داد ولی افزایش ۱/۵ برابری در تولید لیپید در کوتاهترین زمان (یک هفته) توسط *D. bardawil* نسبت به *D. salina* حاکی از آنست که جلبک *D. bardawil* گونه مناسب در جهت تولید لیپید از طریق ممانعت‌کننده مسیر موالونات می‌باشد. نتایج پیشنهاد می‌کند که مسیر موالونات، احتمالاً مسیر مورد استفاده برای جلبک‌های *D. salina* و *D. bardawil* می‌باشد و به نظر می‌رسد ممانعت از آن احتمالاً منجر به تغییر مسیر استیل کوآنزیم A از سنتز بتاکاروتن به سمت افزایش تولید لیپید در سلول می‌شود.

کلمه‌های کلیدی: *D. salina*، *D. bardawil*، لواستاتین، لیپید، موالونات

### مقدمه

نظر اقتصادی در مکمل‌های غذایی، دارویی، و در تولید سوخت زیستی به کار می‌روند (Behrens and Kyle, 1996; Perez-Garcia et al., 2011; Wen and Chen, 2003). *Dunaliella* جلبک سبز تک سلولی (اتوتروف)، هالوفیل یا شور پسند، فاقد دیواره اسکلتی و متعلق به خانواده Chlorophyceae می‌باشند (Capa-Roles et al., 2009; Fried

لیپیدها از ترکیبات آلی در سلول‌ها می‌باشند (Gurr and Harwood, 1991) که با ایفای نقش ساختاری، ذخیره‌ای و تولید انرژی (De Swaaf, 2003) به دو گروه لیپیدهای ساختاری و لیپیدهای ذخیره‌ای رده‌بندی می‌شوند (Sharma et al., 2012). لیپیدها منبع غنی از اسیدهای چرب می‌باشند و از

از سنتز بتاکاروتن در دو جلبک *Dunaliella salina* با توانایی متوسط تولید بتا کاروتن و جلبک *Dunaliella bardawill* با توانایی بالای تولید بتاکاروتن از طریق ممانعت مسیر موالونات/استات با استفاده از ماده لواستاتین به منظور هدایت بیشتر پیش ماده استیل کوآنزیم A به سمت سنتز لیپید، انجام گرفت.

#### مواد و روش‌ها

جلبک *D. salina* سویه UTEX 200 و *D. bardawil* سویه UTEX 2538 از کلکسیون دانشگاه تگزاس آمریکا تهیه شد. محیط رشد جلبک محلول جانسون (Johnson et al., 1968) تغییر یافته (Shariati and Lilley, 1994) شامل: ۵ میلی مولار نترات پتاسیم، ۵ میلی مولار سولفات منیزیم، ۰/۲ میلی مولار فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۰/۲ میکرومولار کلرید مس، ۰/۲ میکرومولار کلرید روی، ۷ میکرومولار کلرید منگنز، ۴ میکرومولار کلرید آهن، ۱۰ میکرومولار  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ، ۱ میکرومولار مولیدات آمونیوم، ۱ میکرومولار کلرید کبالت و ۱/۵ مولار کلرید سدیم بود. pH محیط در محدوده ۷/۵ - ۷ تنظیم شد. محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد توسط دستگاه اتوکلاو، استریل شد. سلول‌ها در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری کشت داده شدند و با ۱۰٪ از سلول‌های جلبکی در شرایط اتوتروف انکوبه شدند. کشت‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد، دوره نوری (تاریکی / روشنایی، ۱۶/۸) بطور پیوسته با سرعت ۱۱۰ دور بر دقیقه (BOTININGEN, U.K INFOR AG CH - 4103) تحت شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه (SQPR Hansatech.UK) قرار داده شدند.

ماده لواستاتین پس از حل در حلال کلروفرم توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استریل شد و به مقداری لواستاتین به محیط اضافه گردید تا غلظت نهایی آن در محیط کشت به غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار رسید.

برای تخمین رشد سلولی، اندازه‌گیری غلظت کلروفیل کل و بتاکاروتن سلول‌های جلبکی، تیمارها در روزهای ۰، ۴، ۷،

(et al., 1982). گونه‌های این جلبک در دامنه وسیعی از شوری از ۰/۱ مولار تا بیشتر از ۴ مولار زندگی می‌کنند (Ben-Amotz, 2004). تحت شرایط نامساعد از قبیل نور زیاد، شوری بالا و کمبود مواد غذایی، برخی گونه‌های *Dunaliella* قادر به تولید مقادیر زیاد بتاکاروتن می‌باشند (Ben-Amotz, 1982; Hosseini Tafreshi and Shariati, 2006). همچنین همه گونه‌های *Dunaliella* از طریق کاتابولیسم نشاسته و فتوسنتز قادر به تولید بالای گلیسرول برای حفظ پتانسیل اسمزی در مقابل شوری بالا در محیط می‌باشند (Ben-Amotz et al., 1982). گلیسرول در مسیر بیوسنتز تری‌گلیسریدها (از لیپیدهای ذخیره ای ریزجلبک‌ها) مصرف می‌شود (Sharma et al., 2012). در اتوتروف‌های تک‌سلولی، استیل کوآنزیم A به عنوان پیش ماده در مسیر بیوسنتز لیپید به کار می‌رود که تبدیل به مالونیل کوآنزیم A شده و وارد چرخه سنتز اسیدهای چرب و در نهایت سنتز لیپید می‌شود. همچنین استیل کوآنزیم A پیش ماده آغازگر مسیر موالونات/استات در بیوسنتز کاروتنوئیدها در سیتوزول (Sasso et al., 2012) در موجودات زنده (Lichtenhaler, 1999; Rohmer et al., 1993) و همچنین جلبک *Dunaliella* (Ben-Amotz and Shaish, 1992) می‌باشد. ماده لواستاتین ( $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_5$ ) بازدارنده مسیر موالونات/استات از طریق ممانعت آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوئاریل کوآنزیم A ردوکتاز می‌باشد (Sasso et al., 2012). با توجه به اینکه ماده لوستاتین برای درمان بیماری کلسترول بالای خون مورد استفاده قرار می‌گیرد لذا اطلاعات زیادی درخصوص اثر آن بر متابولیسم گیاهان و جلبک‌ها وجود ندارد. کاهش در رشد سلولی بواسطه تیمار لواستاتین بر دو دیپاتومه *setigera* (Masse et al., 2004) و *Rhizosolenia* گزارش شده است. با توجه به وجود مقادیر بالای گلیسرول در جلبک *Dunaliella* به عنوان یکی از پیش ماده‌های سنتز لیپید و همچنین از آنجائیکه پیش ماده استیل کوآنزیم A هم در مسیر سنتز بتاکاروتن که از مشخصه‌های مهم جلبک *Dunaliella* می‌باشد و هم در مسیر سنتز لیپید است، لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی سنتز بیشتر لیپید با جلوگیری

های جلبکی در فریزر قرار داده شدند. محتوی لیپید کل از سلول‌های تازه مطابق روش Bligh و Dyer (۱۹۵۹) با مخلوط کلروفورم/متانول/ NaCl ۱٪ با نسبت (۲:۱:۲ v/v) استخراج شدند. در ابتدا رسوب‌های فریز شده جهت شکست غشا سلول‌ها با ماکروویو گرما داده شدند. سپس متانول به رسوب اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس شدند. در ادامه کلروفورم و سپس NaCl ۱٪ اضافه و در نهایت مخلوط به مدت ۵ دقیقه ورتکس و در ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی توسط وکیوم حذف شد و محلول زیری که شامل کلروفورم و لیپید بود، خشک و سپس وزن و محتوای لیپید کل به صورت وزن لیپید بر وزن تر محاسبه گردید.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از روش آماری One-way ANOVA و برای بررسی روند رشد سلول‌ها، کلروفیل و بتاکاروتن از روش آماری Repeated measure و با استفاده از نرم افزار SPSS (version 23 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح ۵٪ استفاده گردید.

### نتایج

در این مطالعه اثرات لواستاتین (بازدارنده مسیر مولونات) روی میزان رشد سلولی، غلظت کلروفیل کل، غلظت بتاکاروتن و تولید لیپید در جلبک *D. salina* و *D. bardawil* در شرایط اتوتروف بررسی شد. شکل ۱ اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار لواستاتین بروی میزان رشد سلولی در قیاس با شاهد در دو گونه مورد مطالعه را نشان می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد در گونه *D. salina* (شکل ۱A) با افزایش غلظت لواستاتین در محیط کشت تا روز ۴ هیچ گونه تغییری مشاهده نشد. از روز ۷ کاهش بسیار کمی در میزان رشد مشاهده شد که این کاهش از روز ۱۰ به بعد در غلظت ۴۰۰ میکرومولار در قیاس با شاهد معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). با توجه به شکل ۱B، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف لواستاتین بر روند رشد جلبک *D. bardawil* در قیاس با شاهد

۱۰ و ۱۴ روز نمونه‌گیری شدند. همچنین محتوی لیپید کل در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ روز اندازه‌گیری گردید.

برای اندازه‌گیری تعداد سلول، ۱۰ میکرولیتر از محلول فرمالدئید برای تثبیت سلول‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جلبکی رقیق شده با محیط کشت، اضافه و رشد سلولی توسط شمارش سلول‌ها با لام هموسایتومتر با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS OPTICAL CO, LTD, MODEL CH3ORF200) انجام شد. نتیجه نهایی با استفاده از فرمول زیر برحسب تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر محاسبه گردید (Schoen, 1988).

تعداد سلول‌های جلبکی در میلی‌لیتر =  $10^4 \times \text{ضریب رقت} \times \text{میانگین تعداد سلول‌ها در } 10 \text{ مربع}$   
 برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل کل و بتا کاروتن، ۱ میلی‌لیتر از کشت جلبکی در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Eppendorf AG 22331 Hamburg). محلول رویی به دقت حذف و ۱ میلی‌لیتر از استون ۸۰ درصد به رسوب اضافه و به خوبی ورتکس گردید. محلول حاصله در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰ و ۴۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160A) قرائت و سپس غلظت کلروفیل کل و بتاکاروتن با معادله‌های زیر برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تخمین زده شدند (Eijkelhoff and Dekker, 1997).

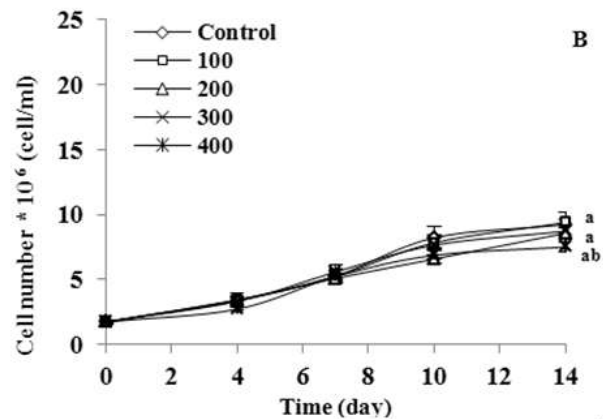
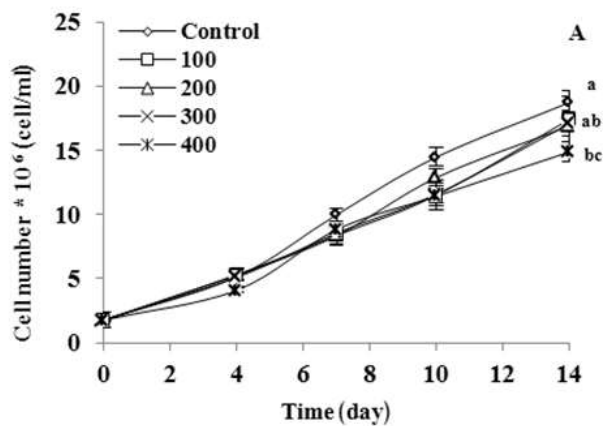
$$a = -1.709A_{412} + 11.970A_{431} - 2.998A_{460} - 5.708A_{480}$$

$$b = -0.171A_{412} - 0.230A_{431} + 11.871A_{460} - 13.248A_{480}$$

کلروفیل کل = کلروفیل *a* + کلروفیل *b*

$$= -0.430A_{412} + 0.251A_{431} - 4.376A_{460} + 13.216A_{480}$$

برای استخراج لیپید کل، به اندازه ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی از هر تیمار نمونه‌گیری شدند. سپس سلول‌های جلبکی در ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ (IEC HN-S centrifuge) شدند. محلول رویی حذف و رسوب به صورت وزن تر، توزین شد. سپس رسوب



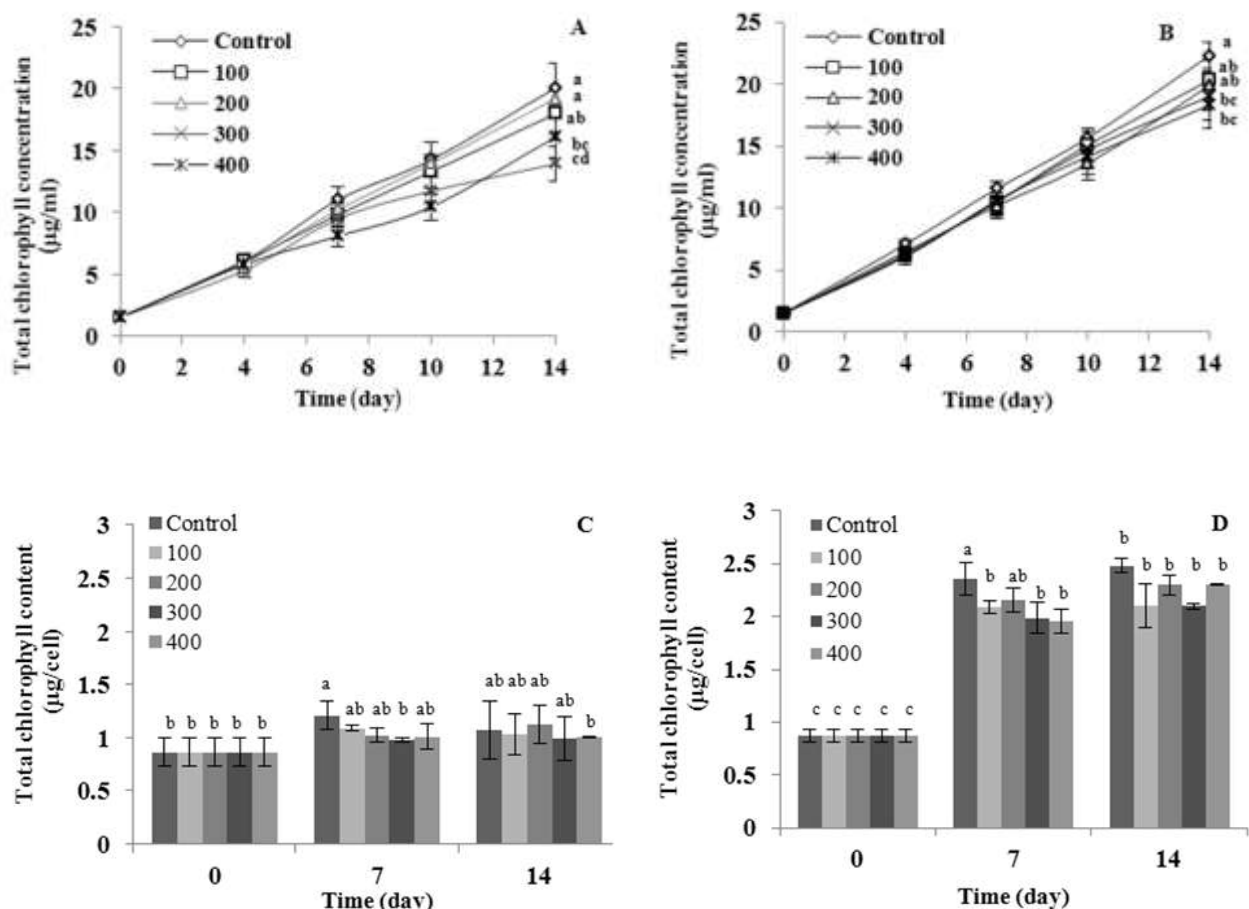
شکل ۱. اثر غلظت های مختلف لواستاتین (بر حسب میکرومولار) در شرایط اتوتروف بر میزان رشد سلولی جلبک های *D. salina* (A) و *D. bardawil* (B). مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای استاندارد می باشد. عدم حروف مشترک بین غلظت های مختلف لواستاتین نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بر اساس تست توکی ( $P \leq 0.05$ ) می باشد.

آزمایش به میزان دو برابر افزایش و میزان محتوای سلولی کلروفیل کل در همه غلظت های لواستاتین نسبت به شاهد کاهش اندک ولی معنی داری را نشان می دهد ( $P \leq 0.05$ ).

در شکل ۳، غلظت بتاکاروتن در دو جلبک *D. salina* و *D. bardawil* تحت تاثیر غلظت های مختلف لواستاتین نشان داده شده است. در جلبک *D. salina* (شکل ۳A)، تغییر محسوسی در غلظت بتاکاروتن در واحد حجم تا روز ۴ مشاهده نشد اما از روز هفت، کاهش در غلظت بتاکاروتن در واحد حجم در تمام غلظت های لواستاتین مشاهده شد که این کاهش در غلظت های ۳۰۰ در قیاس با شاهد و ۴۰۰ در قیاس با شاهد و غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار معنی دار بود ( $P \leq 0.05$ ). غلظت بتاکاروتن در واحد حجم در گونه *D. bardawil* (شکل ۳B)، بین غلظت های تیمار شده تفاوت معنی داری وجود ندارد ولی با شاهد کاهش معنی داری نشان می دهند. شکل ۳C میزان محتوای سلولی بتاکاروتن در گونه *D. salina* را نشان می دهد. به طوری که در روز ۷ تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود ولی در روز ۱۴ در غلظت ۴۰۰ میکرومولار لواستاتین در قیاس با شاهد کاهش معنی داری ( $P \leq 0.05$ ) مشاهده می گردد. میزان ممانعت لواستاتین بر سنتز محتوای سلولی بتاکاروتن در گونه *D. bardawil* (شکل ۳D) کاهش معنی داری ( $P \leq 0.05$ ) در محتوای سلولی بتاکاروتن در

مشاهده نشد. نتایج مقایسه دو گونه جلبک از نظر میزان رشد سلولی نشان دهنده آن است که میزان رشد سلولی در *D. salina* تقریباً دو برابر *D. bardawil* می باشد.

شکل ۲ اثر غلظت های مختلف لواستاتین بر روی میزان غلظت کلروفیل کل در واحد حجم و محتوای سلول بر روی دو گونه جلبک *D. salina* و *D. bardawil* را نشان می دهد. نتایج حاکی از تاثیرات کم لواستاتین بود بطوریکه در جلبک *D. salina* (شکل ۲A)، هفت روز پس از شروع تیمار فقط در غلظت های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار لواستاتین کاهش معنی داری ( $P \leq 0.05$ ) در مقایسه با شاهد و سایر غلظت های لواستاتین مشاهده می شود. در گونه *D. bardawil* (شکل ۲B)، تغییرات زیادی در غلظت کلروفیل کل در واحد حجم در پاسخ به لواستاتین در بین غلظت های اعمال شده مشاهده نمی گردد و اندکی کاهش در غلظت های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار با شاهد دیده می شود. شکل ۲C، غلظت کلروفیل کل در سلول در نمونه شاهد و سلول های گونه *D. salina* تیمار شده با لواستاتین را نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود، تا روز ۱۴ غلظت کلروفیل کل در شاهد و کلیه تیمارها تغییر معنی داری نکرده است. در گونه *D. bardawil* (شکل ۲D)، میزان محتوای سلولی کلروفیل در شاهد و سایر غلظت های لواستاتین در روزهای ۷ و ۱۴ نسبت به شروع

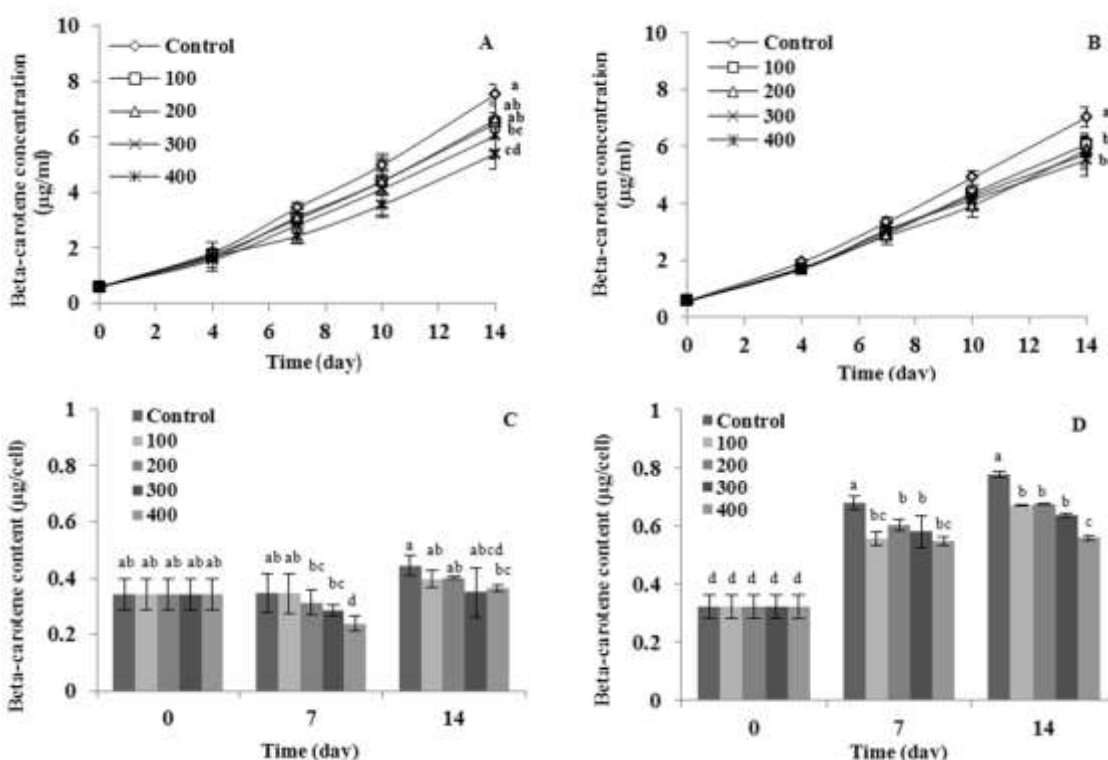


شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف لواستاتین (بر حسب میکرومولار) در شرایط اتوتروف بر میزان غلظت کلروفیل کل در میلی‌لیتر در جلبک‌های *D. salina* (A و B) و *D. bardawil* (C و D) در سلول در جلبک‌های *D. salina* (C) و *D. bardawil* (D). مقادیر میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. عدم حروف مشترک بین غلظت‌های مختلف لواستاتین نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بر اساس تست توکی ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

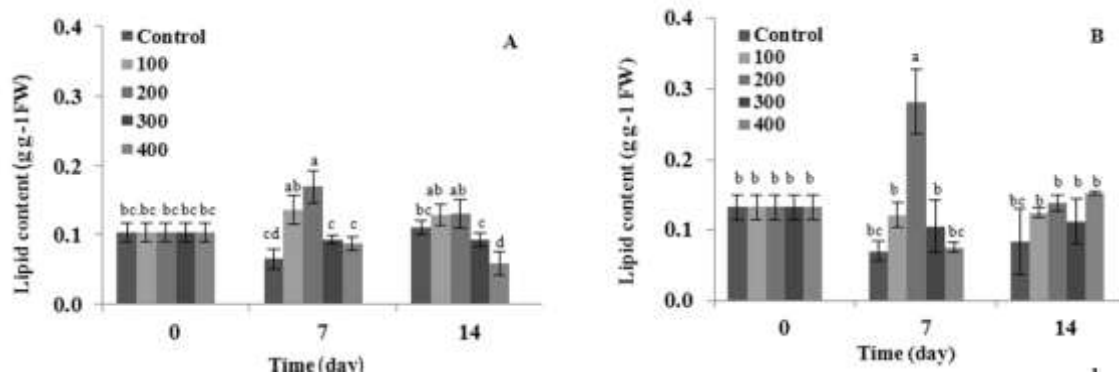
مشاهده شد که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار لواستاتین، این افزایش نسبت به شروع آزمایش نیز معنی‌دار بود در حالی که این مقادیر در دو هفته پس از شروع آزمایش اندکی کاهش یافت. در جلبک *D. bardawil* (شکل B ۴) بیشترین میزان افزایش مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومولار لواستاتین یک هفته پس از شروع تیمار می‌باشد که حاکی از افزایش معنی‌دار ۴ برابری ( $P \leq 0.05$ ) نسبت به شاهد روز هفت و حدود ۲/۵ برابری ( $P \leq 0.05$ ) نسبت به روز صفر می‌باشد. با افزایش غلظت لواستاتین میزان تولید لیپید کاهش نشان می‌دهد. در روز ۱۴ اندکی افزایش نسبت به شاهد مشاهده ولی نسبت به روز صفر تفاوت زیادی ملاحظه نمی‌گردد.

زمان‌های ۷ و ۱۴ روز پس از شروع تیمار در تمام غلظت‌های لواستاتین مشاهده می‌گردد که بیشترین میزان کاهش مربوط به غلظت ۴۰۰ میکرومولار در روز ۱۴ می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ). مقایسه میان دو جلبک نشان داد (شکل ۳D و ۳C) که میزان محتوای سلولی بتاکاروتن در *D. bardawil* حدود دو برابر *D. salina* می‌باشد.

اثر غلظت‌های مختلف لواستاتین بر روی میزان تولید لیپید در دو گونه *D. salina* و *D. bardawil* در شکل ۴ مشاهده می‌شود. در گونه *D. salina* (شکل A ۴) بعد از گذشت یک هفته، افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در تولید لیپید در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار لواستاتین در قیاس با شاهد



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف لوآستاتین (بر حسب میکرومولار) بر غلظت بتاکاروتن در میلی لیتر در شرایط اتوتروف در جلبک‌های (A) *D. salina* (B و *D. bardawil*) و بر غلظت بتاکاروتن در سلول در جلبک‌های (C) *D. salina* و (D) *D. bardawil* مقادیر میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. عدم حروف مشترک بین غلظت‌های مختلف لوآستاتین نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بر اساس تست توکی ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف لوآستاتین (بر حسب میکرومولار) بر میزان تولید لیپید کل در جلبک‌های (A) *D. salina* و (B) *D. bardawil* در شرایط اتوتروف. مقادیر میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. عدم حروف مشترک بین غلظت‌های مختلف لوآستاتین نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بر اساس تست توکی ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

#### بحث

بزرگی از وزن خشک‌شان را در لیپید ذخیره می‌کنند (Chisti, 2008). با این حال، برای استفاده از آنها جهت کاربردهای صنعتی و غذایی نیاز به بهینه شدن دارند. از این رو اثرات لوآستاتین به عنوان بازدارنده مسیر مولونات/استات برای

با توجه به افزایش تقاضای انرژی در جهان، استفاده از اشکال مختلف انرژی تجدیدپذیر مورد توجه قرار گرفته است. برخی از ریزجلبک‌ها منابع با ارزش و غنی از لیپید می‌باشند و قسمت

Lichtenthaler, 1999; Schwender *et al.*, 2001) در گیاهان و جلبک‌ها به کار می‌رود (Rohmer, 1999). در این مطالعه، مسدود نمودن مسیر موالونات بواسطه لواستاتین منجر به کاهش در میزان بتاکاروتن در واحد حجم و همچنین محتوای سلولی بتاکاروتن در هر دو گونه گردید که حاکی از نیازمند بودن هر دو گونه به مسیر موالونات در تولید بتاکاروتن می‌باشد. این کاهش به میزان کم در *D. salina* و فقط در غلظت بالای لواستاتین و به میزان بیشتر در *D. bardawil* در تمامی غلظت‌های لواستاتین مشاهده گردید. غلظت بالای بتاکاروتن در *D. bardawil* نسبت به *D. salina*، میزان بیشتر واکنش به لواستاتین در *D. bardawil* و همچنین وابستگی بیشتر این گونه به مسیر موالونات برای سنتز بتاکاروتن را توجیه می‌نماید. با کاربرد لواستاتین یک هفته پس از شروع تیمار، افزایش در تولید لیپید در غلظت ۲۰۰ میکرومولار لواستاتین در هر دو گونه مشاهده شد که *D. bardawil* در قیاس با *D. salina* افزایش بیشتری را نشان داد. در مسیر موالونات در سیتوزول، استیل کوآنزیم A به عنوان پیش‌ساز برای سنتز IPP در جهت تولید کاروتنوئیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بازدارندگی مسیر موالونات توسط لواستاتین (Sasso *et al.*, 2012) منجر به بازدارندگی سنتز IPP و متعاقباً افزایش استیل کوآنزیم A در سیتوزول می‌شود و از طرفی، استیل کوآنزیم A یک متابولیت محوری در فرایند توزیع کربن داخل سلولی درون بسیاری از مسیرهای متابولیکی مهم نظیر سنتز لیپید (Kim, 1983) و پیش‌ساز برای بیوسنتز لیپیدها می‌باشد (Ren *et al.*, 2009). بنابراین مشترک بودن پیش ماده استیل کوآنزیم A در هر دو مسیر سنتز بتاکاروتن و مسیر سنتز لیپید احتمالاً می‌تواند توجیه کننده کاهش سنتز بتاکاروتن بواسطه بازدارندگی مسیر موالونات توسط لواستاتین و احتمالاً هدایت پیش ماده استیل کوآنزیم A به سمت افزایش تولید لیپید باشد. از طرفی دو برابر بودن غلظت بتاکاروتن در *D. bardawil* نسبت به *D. salina*، افزایش ۱/۵ برابری تولید لیپید در *D. bardawil* نسبت به *D. salina* در پاسخ به لواستاتین را تایید می‌کند. نهایتاً می‌توان نتیجه‌گیری نمود که می‌توان از مسیر سنتز بتاکاروتن میزان

ارزیابی محتوی تولید لیپید در دو جلبک سبز *D. salina* و *D. bardawil* مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی‌های انجام شده در مطالعه اخیر بر روی رشد سلولی در جلبک *D. salina* کاهش و بازدارندگی در رشد سلولی در غلظت بالای لواستاتین مشاهده شد در صورتی که در جلبک *D. bardawil* تاثیر معنی‌داری بر روی روند رشد سلولی نداشت. بر این اساس می‌توان استدلال کرد که کاهش رشد سلولی در *D. salina* می‌تواند به علت سمی بودن غلظت بالای لواستاتین برای سلول و وابسته بودن جلبک *D. salina* به مسیر متابولیسمی موالونات و عدم نیاز بالا به این مسیر در جلبک *D. bardawil* باشد (Capa-Robles *et al.*, 2009). در دو دیاتومه *setigera* و *Rhizosolenia* و *Haslea ostrearia* کاهش در رشد سلولی در غلظت‌های بالای لواستاتین گزارش شده است (Masse *et al.*, 2004). در بررسی میزان غلظت کلروفیل کل، کاهش بسیار اندکی در غلظت کلروفیل کل در واحد حجم و همچنین میزان محتوای کلروفیل سلولی در دو گونه *D. salina* و *D. bardawil* در غلظت‌های بالای لواستاتین مشاهده شد. همچنین محتوای کلروفیل سلولی *D. salina* با افزایش اندک در حالیکه در *D. bardawil* افزایش دوبرابری در پاسخ به غلظت‌های مختلف لواستاتین مشاهده گردید. فیتول جزیی از ساختار کلروفیل می‌باشد و علی‌رغم اینکه گزارش شده است یکی از مسیرها در سنتز فیتول مسیر موالونات (Lichtenthaler, 1999) می‌باشد ولی به نظر می‌رسد این مسیر سهم زیادی را در سنتز کلروفیل در این دو جلبک بر عهده ندارد. مسیر موالونات از مسیرهای مرتبط با سنتز بتاکاروتن‌ها می‌باشد. لواستاتین بازدارنده آنزیم HMG-COA ردوکتاز (۳- هیدروکسی ۳- متیل گلووتاریل کوآنزیم A-ردوکتاز)، آنزیم بسیار مهم در بیوسنتز ایزوپرنوئید در مسیر موالونات (Bach and Lichtenthaler, 1983) می‌باشد. در اولین مرحله از بیوسنتز ایزوپرنوئید، IPP (ایزوپنتنیل دی فسفات) و ایزومرش دی متیل آلایل پیروفسفات (DMAPP) تشکیل می‌شود (Bouvier *et al.*, 2005). IPP به عنوان پیش ماده منحصر به فرد ۵ کربنه در بیوسنتز همه کاروتنوئیدها و بتاکاروتن (Lange *et al.*, 2000)

### سیاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان به خاطر فراهم نمودن تسهیلات این پژوهش و حمایت مالی و اجرایی این تحقیق نهایت تشکر و قدردانی را می‌نمائیم.

تولید لیپید در این جلبک را افزایش داد و گونه *D. bardawil* بواسطه دارا بودن بیشتر بتاکاروتن ارجحیت بیشتری دارد. همچنین بررسی سایر ممانعت کننده‌های مسیرهای متابولیسمی در ریزجلبک‌ها در جهت تولید لیپید می‌تواند راهی در جهت کمک به صنایع وابسته به لیپید ریزجلبکی باشد.

### منابع

- Bach, T. J. and Lichtenthaler, H. K. (1983) Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. *Physiologia Plantarum* 59: 50–60.
- Behrens, P. W. and Kyle, D. J. (1996) Microalgae as a source of fatty acids. *Journal of Food Lipids* 3: 259-272.
- Ben-Amotz, A. (2004) Industrial production of microalgal cell-mass secondary products—Major industrial species: *Dunaliella*. In: *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology* Pp. 273–280. Blackwell Press, Iowa.
- Ben-Amotz, A. and Shaish, A. (1992)  $\beta$ -carotene biosynthesis. In: *Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology* Pp. 205–216. CRC Press, Florida.
- Ben-Amotz, A. Sussman, I. and Avron, M. (1982) Glycerol production by *Dunaliella*. *Experientia* 38: 49-52.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Bouvier, F. Rahier, A. and Camara, B. (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44: 357–429.
- Capa-Robles, W. Paniagua-Michel, J. and Soto, J. O. (2009) The biosynthesis and accumulation of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella salina* proceed via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. *Natural Product Research* 23: 1021-1028.
- Chisti, Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* 26:126–131.
- DE Swaaf, M. E. (2003) Docosahexaenoic acid production by the marine alga *Cryptocodinium cohnii*. Delft University Press, Amsterdam.
- Eijkelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophyll *a*, pheophytin *a* and  $\beta$ -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis Research* 52: 69–73.
- Fried, A. Tietz, A. Ben-Amotz, A. and Eichenberger, W. (1982) Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 713: 419-426.
- Gurr, M. I. and Harwood, J. L. (1991) *Lipid biochemistry* 4<sup>th</sup> ed. Chapman and Hall, London.
- Hosseini Tafreshi, A. Shariati, M. (2006) Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for *b*-carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1003-1006.
- Johnson, M. K. Johnson, E. J. Mc Elroy, R. D. Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effect of salt on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology* 95: 1461-1468.
- Kim, K. H. (1983) Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Current Topics in Cellular Regulation* 22: 143–176.
- Lange, B. M. Rujan, T. Martin, W. and Croteau, R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13172–13177.
- Lichtenthaler, H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47–65.
- Masse, G. Belt, S. T. Rowland, S. J. and Rohmer, M. (2004) Isoprenoid biosynthesis in the diatoms *Rhizosolenia setigera* (Brightwell) and *Haslea ostrearia* (Simonsen). *PNAS* 101: 4413-4418.
- Perez-Garcia, O. Escalante, F. M. E. de-Bashan, L. E. and Bashan, Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45: 11-36.
- Ren, L. J. Huang, H. Xiao, A. H. Lian, M. Jin, L. J. and Ji, X. J. (2009) Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 837–843.
- Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* 16: 565-574.
- Rohmer, M. Knani, M. Simonin, P. Sutter, B. and Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 295: 517–524.
- Sasso, S. Pohnert, G. Lohr, M. Mittag, M. and Hertweck, C. (2012) Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 761–785.



- Schoen, S. (1988) Cell counting. In: Experimental Phycology (eds. Lobban, C. S., Chapmans, D. J. Kremer, B. P.) Pp. 16-22. A Laboratory Manual, Cambridge University Press, Cambridge.
- Schwender, J. Gemunden, C. and Lichtenthaler, H. (2001) Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* 212: 416-423.
- Shariati, M. Lilley, R. McC. (1944) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant Cell and Environment* 17: 1295-1304.
- Sharma, K. K. Schuhmann, H. and Schenk, P. M. (2012) High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* 5: 1532-1553.
- Wen, Z-Y. and Chen, F. (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances* 21: 273-294.