مقاله پژوهشی

بررسی اثر اتانول آمین بر میزان چربی و رابطه آن با بتاکاروتن در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella*

ریحانه‌السادات شهابی[1] و منصور شریعتی*[1]

[1]گروه زیست‌شناسی گیاهی- جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۷/۱۰)

چکیده

جلبک سبز و تک سلولی *Dunaliella* در مطالعات فیزیولوژی اهمیت بسیار زیادی دارد. از دلایل انتخاب این جلبک در پژوهش‌های زیستی می‌توان به مقاومت آن در برابر تنش‌های شوری و فقدان دیواره سلولی اشاره نمود. بسیاری از ریزجلبک‌ها منبع‌های غنی از چربی هستند که از برخی از اسیدهای‌چرب آن‌ها می‌توان برای تولید بیودیزل که به نسبت آلودگی کمتر از سوخت‌های فسیلی دارند، استفاده می‌شود. در این تحقیق اثر ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۰ میکرومولار اتانول‌آمین بر میزان رشد، کلروفیل، بتاکاروتن، لیپید و همچنین نیمرخ اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع دو جلبک *D. salina* و *D. bardawil* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اتانول آمین در غلظت‌های پایین تأثیری بر روی بر روی رشد و میزان کلروفیل نداشت و در غلظت‌های بالا باعث ممانعت رشد و سنتز کلروفیل شد. به‌طورکلی در هردو جلبک اتانول آمین تأثیری بر میزان لیپید نداشت و فقط غلظت ۵۰ میکرومولار در جلبک *D. bardawil* باعث افزایش میزان لیپید شد. به نظر می‌رسد در غلظت‌های بالای اتانول آمین، احتمالاً مواد اولیه و انرژی بجای مصرف‌شدن در فرایند تقسیم سلولی و سنتز کلروفیل بیشتر به سمت مقابله با غلظت بالای اتانول آمین و در غلظت ۵۰ میکرومولار در جلبک *D. bardawil* به سمت تولید چربی رفته است. همچنین، اتانول آمین در در غلظت‌های بالا در هردو جلبک و باعث کاهش رشد شد. جلبک *D. bardawil* تحت تیمار غلظت‌های پایین اتانول آمین، بتاکاروتن بیشتری سنتز کرد. در دو غلظت مورد استفاده ۲۵ و ۵۰ میکرومولار به همراه شاهد در طول یک هفته دوره آزمایش، میزان لیپید در جلبک *D. salina* حدود *D. bardawil* دو برابر جلبک بود. از طرفی میزان بتاکاوتن در جلبک *D. bardawil* بیشتر از *D. salina* بود. کمتربودن بتاکاروتن و بیشتر بودن لیپید در *D. salina* و بیشتربودن بتاکاروتن و کمتربودن لیپید در *D. bardawil* می‌تواند احتمالاً حاکی از رابطه احتمالی بین تولید لیپید و بتاکاروتن باشد. در تیمار با اتانول آمین، تغییرات زیادی در نیمرخ اسید چرب اشباع و غیراشباع در مشاهده نشد. ولی *D. bardawil* در افزایش اسید چرب اشباع هپتادکانوئیک اسید و اسید چرب غیراشباع اولئیک اسید مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ***دونه لیه لا سالینا، دونه لیه لا باردواویل*، اتانول‌آمین، لیپید**

مقدمه

لیپیدها ترکیبات آلی تشکیل‌شده از اسیدهای چرب و گلیسرول، غیرمحلول در آب هستند که در حلال‌های آلی حل می‌شوند (Gurr *et al*., 2002). تمامی موجودات زنده توانایی تولید لیپید را دارند و از آن به برای تشکیل غشا سولی، ذخیره انرژی و کربن استفاده می‌کنند (Lehninger, 1993). هر گرم

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mansour_Shariati@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

لیپید معادل ۹ کیلوکالری بیش از دو برابر کربوهیدرات و پروتئین انرژی تولید می‌کند (Belitz and Grosch, 2013). همه موجودات برای رشد و زنده‌ماندن به لیپیدها نیاز دارند. در گیاهان لیپیدها در بذر ها برای روند جوانه‌زنی ذخیره می‌شوند. همچنین گیاهان می‌توانند تری‌آسیل گلیسرول را به صورت قطرات روغنی درون‌سلولی ذخیره کنند (Berg *et al*., 2015). ۷۰ درصد از لیپیدهای غشایی در بافت‌های فتوسنتزکننده، توسط غشاءهای کلروپلاستی که عمدتاً از نوع گلیکولیپیدها هستند، تشکیل می‌شوند و سایر غشاءهای سلولی از فسفولیپیدها ساخته شده‌اند (Gurr *et al*., 2002). ساخت اسیدهای چرب در گیاهان در پلاستیدها انجام می‌گیرد. در گیاهان و جلبک‌ها با گرفتن انرژی نورانی خورشید و کربن دی اکسید هوا، توسط چرخه کالوین در کلروپلاست‌ها، گلیسرآلدئید ۳- فسفات (G3P) می‌سازند. G3P ساخته‌شده درون کلروپلاست باقی می‌ماند یا از کلروپلاست خارج شده و وارد سیتوزول می‌شود. در درون کلروپلاست G3P به دی‌هیدروکسی استون فسفات (DHAP) تبدیل شده و سپس به پیروات و استیل کوآنزیم‌آ تبدیل می‌شود. استیل کوآنزیم‌آ توسط آنزیم استیل کربوکسیلاز به مالونیل کوآنزیم‌آ تبدیل شده که اولین قدم در بیوسنتز اسیدچرب محسوب می‌شود (Muhlroth *et al*., 2013). نهایتاً با طویل‌شدن زنجیره اسیدهای چرب، سنتز لیپیدها صورت می‌گیرد. اگر میکروارگانیسمی توانایی ذخیره ۲۰ تا ۲۵ درصد لیپید بر حسب بیوماس خشک را داشته باشد، به عنوان موجودات روغنی شناخته خواهد شد (Ratledge and Evans, 1989). اکثر جلبک‌های پرسلولی مقدار کمی لیپید تولید کرده که بیشتر این مقدار از اجزا غشاء سلولی هستند. برخی از گونه‌های ریزجلبکی قادرند مقدار لیپید بالایی را انباشت کنند که مقدار آن بین یک تا هفتاد درصد وزن تر متغییر خواهد بود (Francisco *et al*., 2010) و برخی از آنها منبع مهمی برای تولید اسیدهای‌چرب و لیپید درصنعت هستند (Laoteng *et al*., 2011). ریزجلبک‌ها به علت دارابودن لیپیدها و اسیدهای چرب جز منابع تولیدی کاروتنوئید، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای چرب امگا۳ و امگا۶ هستند که برای تولید مکمل‌های غذایی، دارویی (Shaish *et al*., 1992) و سوخت‌های زیستی به کار برده می‌شوند (Huntley and Redalje, 2007; Demirbas and Demirbas, 2011). تجمع لیپید در ریزجلبک‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های روغنی به عواملی چون سویه خاص جلبکی، دما، رژیم رشد، pH، سن کشت و برخی استرس‌ها (Ratledge and Wynn, 2002)، عوامل محیطی و تغذیه‌ایی مختلف نظیر دما، نور، دسترسی کافی به منابع معدنی، کربن و نیتروژن می‌توان اشاره کرد (Takagi and Karseno, 2006). شناسایی سویه مناسب جلبکی که بازده بالایی برای تولید لیپید و بهینه‌سازی شرایط رشد برای تولید حداکثر روغن دارد، ضروری است. برخی از محققین نشان دادند که تجمع کل چربی در جلبک‌هایی که به صورت پلانکتونی رشد می‌کنند، تحت شرایط تنش‌زای محیطی مثل استرس‌های اکسیداتیو و همچنین افزایش غلظت کربن دی‌اکسید، افزایش می‌یابد (Wang *et al*., 2004). برخی از ریزجلبک‌ها در شرایط استرس و تنش‌زا مثلاً در اثر کمبود مواد غذایی یا تنش شوری، قادر به انباشت مقدار بالایی لیپید هستند. به همین دلیل یکی از استراتژی‌های افزایش لیپید، تنش و استرس‌های محیطی است و همچنین القاکننده مواد ذخیره‌ایی در ریزجلبک‌ها می‌باشد (Jang *et al*., 2011; Fan *et al*., 2014). مطالعه بر روی دیاتومه *Phaeodactylum tricornutum* نشان داد تنش کمبود ازت می‌تواند باعث افزایش چربی شود (Levitan *et al*., 2015). گزارش شده است که تنش شوری در جلبک *Botryococcus baraunii* (Rao *et al*., 2007)، همچنین برخی گونه‌های جلبک *Dunaliella* باعث افزایش چربی شده است (Rismani and Shariati, 2017). به منظور مقرون به صرفه‌بودن سنتز لیپید در ریزجلبک‌ها، استفاده از محیط‌کشت‌های اتوتروف، هتروتروف و میکسوتروف برای افزایش میزان لیپید مورد بررسی قرار گرفته است (Schenk *et al*., 2009; Zareh and Shariati, 2019a; Zareh and Shariati, 2019b). اکثر میکروارگانیسم‌های روغنی در زمان وجود منبع کربن بیش از حد در محیط، شروع به انباشت لیپید می‌کنند (Ratledge and Evans, 1989). در دسترس بودن مواد غذایی،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

نیتروژن و کربن از عوامل تأثیرگذار بر محتوی لیپید موجود در ریزجلبک‌ها است (Takagi and Karseno, 2006).

اتانول‌آمین‌ها خانواده‌ای از مواد شیمیایی هستند که به عنوان مواد فعال‌کننده و امولسیون‌کننده در محصولات بهداشت شخصی و تمیزکننده‌ها استفاده می‌شود. استفاده از اتانول آمین در گیاهان و جلبک‌ها کمتر مورد توجه قرار گرفته است. ولی با توجه به اینکه گزارش شده است که اتانول آمین به طور غیرمستقیم در سنتز اسیدهای چرب توسط استیل کوآنزیم‌آ نقش دارد (Cui *et al.*, 2018)، اخیراً استفاده از آن در تولید چربی در برخی جلبک‌ها انجام شده است. گزارش شده است که اتانول‌آمین از طرق کاهش سنتز فسفاتیدیل اتانول آمین، سبب سنتز چربی در برخی جلبک‌ها نظیر *Scenedesmus* می‌شود (Cheng *et al.*, 2012). مطالعات نشان می‌دهد که اضافه‌شدن اتانول آمین به محیط‌کشت جلبک *Chlorella sorokiniana* سبب تشکیل اسید اولئیک و در نهایت تغییر در ترکیب اسیدهای چرب در این جلبک شده و منجر به ایجاد اسید چرب با کیفیت بالا به عنوان استفاده برای سوخت زیستی می‌شود (Cheng *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2018).

جلبک *Dunaliella* یک جلبک سبز تک سلولی فاقد دیوار اسکلتی است و دارای دو تاژک می‌باشد (Oren, 2005). گونه‌های جنس *Dunaliella*، توانایی زیستن در محدوده وسیعی از درجه شوری با غلظت نمک حدود ۰/۵ درصد تا حدود ۳۵ درصد را دارند و به عنوان یوکاریوت متحمل به شوری شناخته می‌شود (Shariati and Hadi, 2011). گونه‌های مقاوم به نمک این جلبک در گودال‌های آب شور، باتلاق‌های نمکی، دریاچه‌های نمک دریافت شده‌اند (Oren, 2005). این جلبک در برابر افزایش شوری جهت تنظیم پتانسیل اسمزی درون سلولی با محیط بیرون با سنتز گلیسرول پاسخ می‌دهد (Shariati and Lilley, 1994). برخی از گونه‌های این جلبک نظیر *D. salina* و *D. bardawil* از منابع اصلی و طبیعی تولید بتاکاروتن هستند و آن را به‌صورت قطرات چربی موجود در استرومای کلروپلاست انباشت می‌نماید. علاوه بر بتاکاروتن و گلیسرول، از پروتئین این جلبک که حدود ۴۰ درصد وزن خشک آن را شامل می‌شود، به عنوان منبع غذایی پروتئینی برای آبزیان و پرندگان استفاده می‌شود (Finney *et al.*, 1984). گزارش‌ها حاکی از آن است که برخی گونه‌های این جلبک قادرند مقادیر بیشتری از بتاکاروتن را در شرایط غلظت بالای نمک، فلزات سنگین مثل کادمیوم و مس (Yahyaabadi and Shariati, 2006)، شدت بالای نور، دماهای خیلی بالا یا پایین، کمبود عناصر نیتروژن و فسفر ذخیره کنند (Madadkar Haghjou and Shariati, 2007). ترکیبات استخراج‌شده از جلبک *Dunaliella* به علت دارابودن ترانس و ۹-سیس استرئوایزومرها ارزش اقتصادی نیز دارند (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009).

جلبک *Dunaliella* یک جلبک سبز تک سلولی است و به دلیل بالابودن مقدار بتاکاروتن و گلیسرول (پیش‌ماده سنتز تری‌گلیسریدها) در زمینه‌های بیوتکنولوژی و زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ریزجلبک چون فاقد دیواره سلولی است، هزینه‌های استخراج مواد تولیدی در این جلبک به نسبت گیاهان و سایر جلبک‌هایی که دارای دیواره سلولی هستند، کمتر می‌باشد و از کاربردهای آن می‌توان به تولید اسیدهای چرب امگا ۳، سوخت‌های فسیلی و همچنین به عنوان مواد غذایی برای تغذیه موجودات آبزی و خشکی‌زی اشاره نمود (Perez-Garcia *et al.*, 2011). از آنجایی که برخی مطالعات حاکی از اثر اتانول آمین بر میزان چربی در برخی جلبک‌ها است، لذا در این مطالعه اثرات اتانول آمین بر میزان چربی و نوع اسیدهای چرب در جلبک *Dunaleilla* و همچنین رابطه بین میزان چربی و بتاکاروتن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، جهت انجام آزمایشات، جلبک *D. salina* سویه Utex-200 و *D. bardawil* سویه Utex-2538 تهیه‌شده از کلکسیون دانشگاه تگزاس آمریکا، مورد استفاده قرار گرفت. محیط‌کشت مطابق روش Johanson و همکاران (۱۹۶۸) تغییر یافته توسط Shariati و Lilley (۱۹۹۴) با غلظت‌های زیر برحسب میلی‌مولار (۲۵) $NaHCO_3$، (۵) $MgSO_4$، (۵) KNO_3،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

(۰/۲) KH_2PO_4، (۰/۲) $CaCl_2$، و برحسب میکرومولار (۷) $MnCl_2$، (۱۰+۴) $FeCl_3$+Na_2-EDTA، (۱) $CuCl_2$، (۱) $ZnCl_2$، (۱) $CoCl_2$، (۱) $(NH_6)\ MO_7O_{24}.4H_2O$ به همراه غلظت ۱/۵ مولار نمک NaCl تهیه شد. pH محیط کشت با استفاده از دستگاه pH متر (مدل WTWPH 197i) در محدوده ۷/۵–۷ تنظیم و به‌مدت ۱۵ دقیقه در درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر جهت استریل کردن قرار داده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت با ۱۰ درصد از سلول‌های جلبکی در شرایط اتوتروف تلقیح و در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتر کشت داده شد. در شرایط استریل غلظت‌های مختلف اتانول آمین به نحوی به محیط‌کشت حاوی جلبک اضافه شد تا غلظت‌های نهایی صفر (شاهد)،۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۰ میکرومولار اتانول آمین در محیط‌کشت حاصل شود. سپس کلیه کشت‌های تیمارشده در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه (SQPR Hansatech. UK) بر روی دستگاه شیکر (Botiningen, UK Infor AG CH-4103) با سرعت ۱۱۰ دور بر دقیقه قرار داده شدند.

برای اندازه‌گیری تعداد سلول‌های جلبکی، از هر کدام از سوسپانسیون جلبکی تیمارشده با غلظت‌های مختلف اتانول آمین به میزان ۲۰۰ میکرولیتر طی روزهای صفر، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۴ برداشته شد. جهت ثابت‌کردن سلول‌ها، مقدار کمی بلور ید اضافه شد. سپس با استفاده لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus Optical CO. LTD, CH3ORF200) شمارش سلولی صورت گرفت. تعداد سلول‌های شمارش‌شده با استفاده از فرمول زیر برحسب تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر محاسبه شد (Schoen, 1988).

تعداد سلول‌های جلبکی در میلی‌لیتر = میانگین تعداد سلول‌ها در ۱۰ مربع لام × ضریب رقت × $۱۰^۶$

برای استخراج کلروفیل کل، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی تیمارشده با غلظت‌های مختلف اتانول آمین در روزهای صفر، ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۴ برداشت و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت پنج دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه با دستگاه (Eppendorf AG 22331 Hamburg) سانتریفیوژ شد. محلول رویی به دقت توسط وکیوم خارج و بر روی رسوب جلبکی باقیمانده، یک میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه شد و سپس با استفاده از دستگاه ورتکس (Heidolph Rextor, Germany) رسوب بخوبی حل شده و سپس محلول به‌دست آمده به مدت پنج دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به داخل چاهک‌های پلیت ریخته شد و با دستگاه اسپکتروفتومتر مولتی ریدر (SYNERGY/HTX- Multi-mood Reader)، جذب محلول‌ها در طول‌موج‌های ۴۸۰، ۴۶۰، ۴۵۰، ۴۳۱، ۴۱۲ نانومتر خوانده و غلظت کلروفیل کل و بتاکاروتن با روابط زیر محاسبه شد (Eijckelhoff and Dekker, 1997):

$$Chl_a = -۱/۷۰۹\ (A_{۴۱۲}) + ۱۱/۹۷۰\ (A_{۴۳۱}) - ۲/۹۹۸\ (A_{۴۶۰}) - ۵/۷۰۸\ (A_{۴۸۰})$$

$$Chl_b = -۰/۱۷۱\ (A_{۴۱۲}) - ۰/۲۳(A_{۴۳۱}) + ۱۱/۸۷۱(A_{۴۶۰}) - ۱۲/۲۴۸\ (A_{۴۸۰})$$

$$Total\ Chlorophyll = Chlorophyll_a + Chlorophyll_b$$

$$Beta\text{-}Carotene = -۰/۴۳۰\ (A_{۴۱۲}) + ۰/۲۵۱(A_{۴۳۱}) - ۴/۳۷۶\ (A_{۴۶۰}) + ۱۳/\ ۲۱۶\ (A_{۴۸۰})$$

جهت استخراج لیپید کل از سوسپانسیون جلبکی تیمارشده با غلظت‌های صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر اتانول آمین، ۸۰ میلی‌لیتر در روزهای صفر، ۳ و ۷ برداشت و به فالکون منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (IFC HN-S Centrifuge) با چرخش ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. محلول رویی خارج و رسوب باقیمانده را به صورت وزن تر رسوب جلبکی وزن شد. سپس رسوب‌های جلبکی به مدت ۲۴ ساعت در داخل فریزر جهت شکست غشا سول‌ها در داخل فریزر قرار داده شد. در مرحله بعدی، ۶ میلی‌لیتر حلال متانول به آن اضافه و کاملاً ورتکس شد تا رسوب به طور کامل در داخل متانول حل شود. در مرحله بعدی ۱۲ میلی‌لیتر کلروفرم به محلول اضافه و سپس ورتکس شد. نهایتاً ۱۲ میلی‌لیتر نمک NaCl یک درصد اضافه شد تا لیپید به فاز حلال وارد شود و سپس به مدت پنج دقیقه ورتکس شدند. محلول

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

حاصله در دستگاه سانتریفیوژ با چرخش ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ سه فاز ایجاد شدند. فاز رویی شامل محلول متانول و نمک NaCl و فاز میانی حاوی لاشه سلول‌های چربی گیری‌شده تخلیه و سپس فاز زیرین شامل فاز لیپید-کلروفرم به لوله آزمایش شیشه‌ایی از قبل وزن شده، منتقل گردید و بعد از تبخیر کلروفرم و خشک‌شدن، لوله آزمایش شیشه‌ایی توسط ترازوی (Kern 870 ALS 2204) وزن شد و مقدار لیپید از تفاضل وزن لوله شیشه‌ایی قبل و بعد از لیپید به‌دست آمد و در نهایت محتوای لیپید کل، از نسبت وزن لیپید (میلی‌گرم) بر وزن تر جلبک (گرم) سنجش شد.

جهت جداسازی و اندازه‌گیری اسیدهای چرب از نمونه لیپیدی جلبک، از روش کروماتوگرافی گازی (GC) (Young Lin, Acme6000, South Korea) با ستون موئینه ۵۰ متری CPSIL88 وآشکارساز FID استفاده شد. میزان تزریق ۱ میکرولیتر با ۱۰۰ /۱=Split شرایط ایزوترمال و دمای انژکتور ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آون ۱۷۵ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز۲۶۰ درجه سانتی‌گراد میزان گاز حامل هلیوم، ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. برای تبدیل چربی‌ها به ترکیباتی غیرقطبی با وزن مولکولی پایین برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی، متیلاسیون اسیدهای چرب انجام گرفت (Demirbas, 2008). بدین منظور ۷ میلی‌لیتر حلال هگزان نرمال را به لوله‌های آزمایش درب‌دار حاوی روغن استخراجی از هر یک از نمونه‌ها اضافه نموده و بعد از حل‌شدن کامل روغن،۲ میلی‌لیتر پتاس متانولی اضافه و جهت دو فاز شدن محتویات لوله آزمایش، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط تکان داده شد. فاز هگزان (فاز رویی) تخلیه و فاز زیرین توسط سمپلر خارج و به لوله آزمایش دیگری، جهت تزریق به دستگاه GC انتقال داده شد. ۱ میکرولیتر از نمونه در شرایط ایزوترمال ۱/۱۰۰=Split به دستگاه تزریق و در دمای انژکتور ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آون ۱۷۵ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و میزان گاز حامل هلیوم، ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه اندازه‌گیری نیمرخ اسیدهای چرب اندازه‌گیری شد.

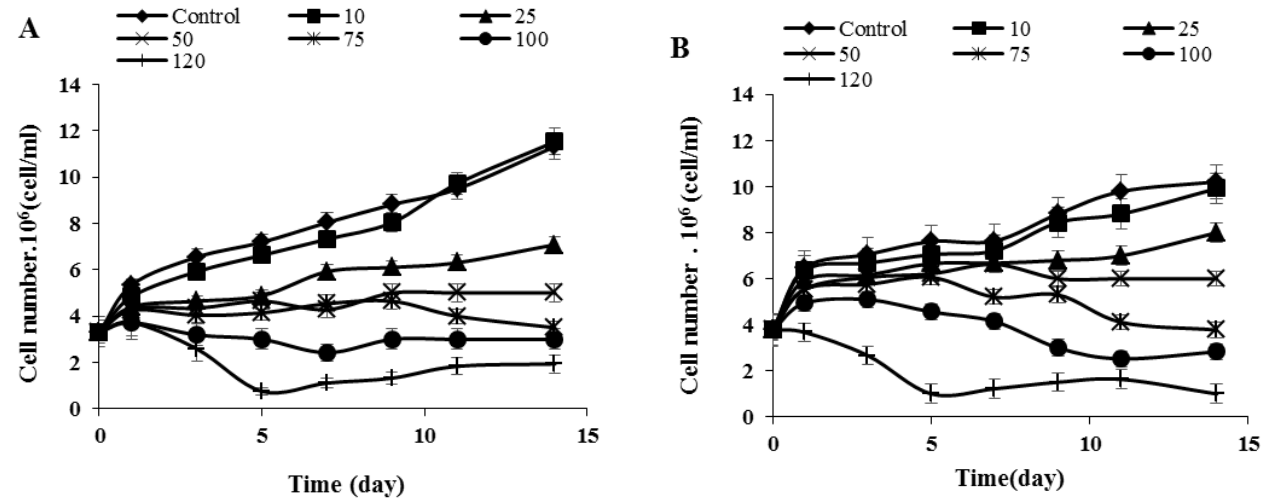
کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار ± انحراف معیار انجام و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. برای مشخص‌شدن تفاوت میانگین‌ها در بین تیمارهای مختلف از روش ANOVA و آزمون Duncan در سطح $P \leq 0.5\%$ استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

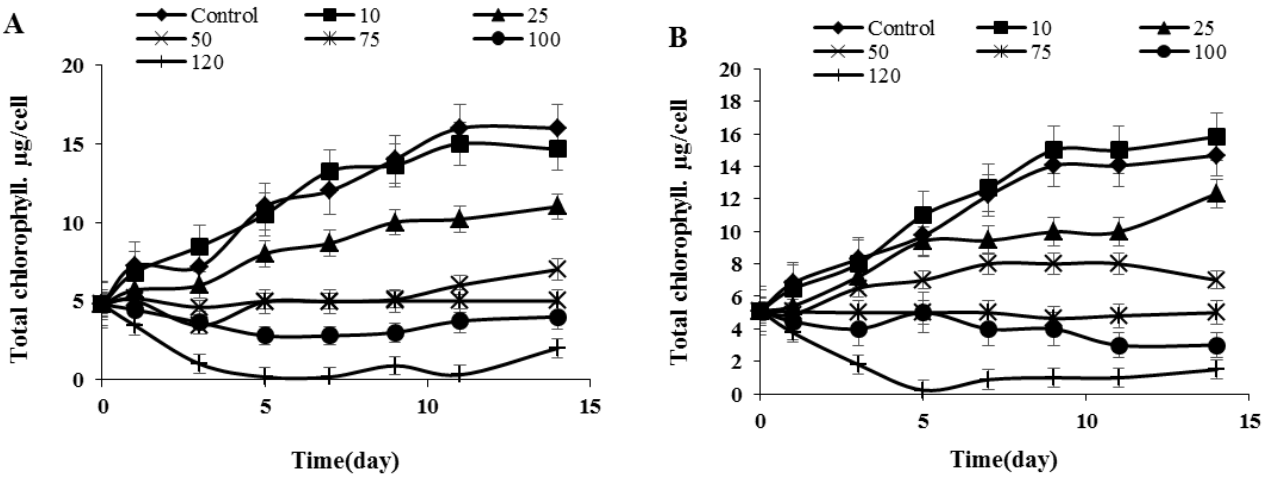
بررسی اتانول آمین بر میزان رشد سلولی: شکل ۱ تیمار غلظت‌های مختلف اتانول آمین بر میزان رشد سلولی سوسپانسیون‌های جلبکی دو گونه *D. salina* و *D. bardawil* در غلظت ۱/۵ مولار نمک را در یک دوره ۱۴ روزه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود (شکل ۱-A) تا روز چهاردهم پس از زمان شروع، سوسپانسیون‌های جلبکی گونه *D. bardawil* در غلظت‌های ۱۰ همراه با نمونه شاهد حالت صعودی افزایش رشد سلولی دارند که این شدت افزایش در غلظت ۲۵ میکرومولار اتانول آمین اندکی کمتر است. اما افزایش رشد سلولی در غلظت ۵۰، ۷۵ میکرومولار اتانول آمین مشاهده نمی‌شود.

بررسی اثر اتانول آمین بر میزان کلروفیل کل و بتاکاروتن: شکل ۲ اثر تیمار غلظت‌های مختلف اتانول آمین بر میزان کلروفیل کل در سوسپانسیون‌های جلبکی دو گونه *D. salina* و *D. bardawil* در غلظت ۱/۵ مولار نمک را در یک دوره چهارده روزه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، اعمال تیمار ۱۰ و ۲۵ میکرومولار اتانول آمین در جلبک *D. bardawil* به همراه شاهد روند افزایشی داشته است (شکل۲-A) که شدت افزایش در ۲۵ میکرومولار کمتر است. بین غلظت ۱۰ و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکرومولار تغییرات زیادی مشاهده نمی‌شود. از طرفی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۰ میکرومولار روند کاهشی میزان کلروفیل و با شدت کاهش بیشتر در غلظت ۱۲۰ میکرومولار دیده می‌شود. در هر دو غظت اندکی بازیابی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]



شکل ۱- بررسی اثر غلظت‌های مختلف اتانول آمین (میکرومولار) بر میزان رشد سلولی جلبک A) *D. bardawil*، B) *D. salina* مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است.



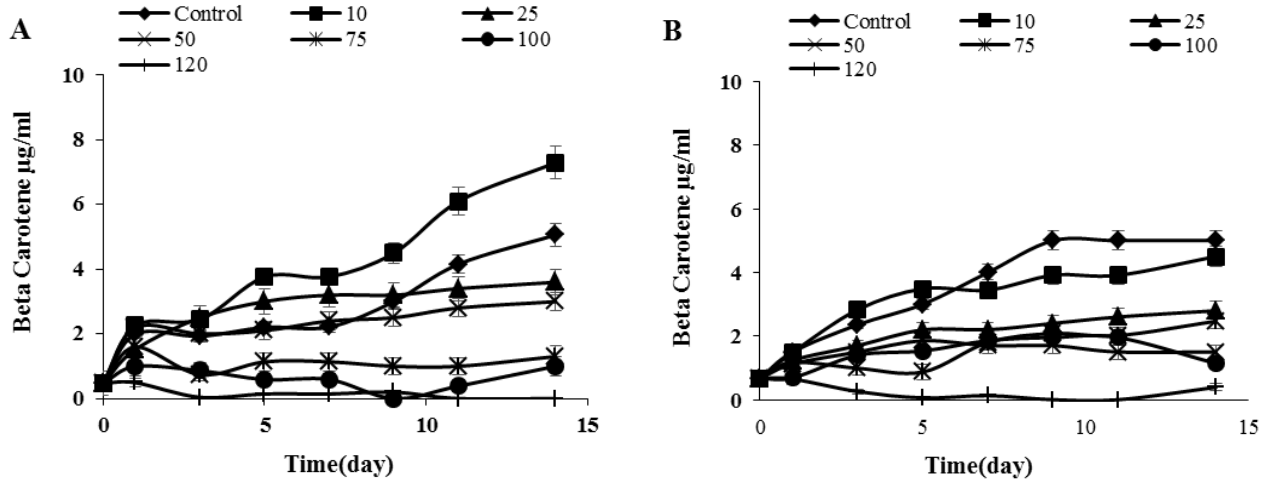
شکل ۲- اثر غلظت‌های متفاوت اتانول آمین (میکرومولار) بر میزان کلروفیل کل در جلبک A) *D. bardawil*، B) *D. salina* مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است.

به مقدار اولیه وجود دارد. همین روند تقریباً در جلبک *D. salina* (شکل۲-B) نیز مشاهده می‌شود.

در مورد اثر اتانول آمین بر بتاکاروتن، در جلبک *D. bardawil* مطابق شکل ۳-A در غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اتانول آمین روند صعودی تا روز هفت بالاتر از نمونه شاهد بوده است که این افزایش در غلظت ۱۰ میکرومولار از بقیه بیشتر بوده و این روند صعودی تا روز چهاردهم ادامه می‌یابد و مقدار آن به بیش از ۷/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسید. ولی غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار حالت نزولی یافته است، در غلظت ۷۵ میکرومولار تا روز سوم یک شیب نزولی داشته و سپس با شیب بسیار کم افزایش یافته است و حالت یکنواخت خود را تا روز چهاردهم ادامه می‌دهد. در مورد غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۰ روند نزولی دارند.

در جلبک *D. salina* مطابق شکل ۳-B در غلظت ۱۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد تا روز پنجم اندکی روند صعودی بالاتری دارد و سپس شیب روند صعودی نسبت به نمونه شاهد کم شده است در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار به صورت یک شیب یکنواخت با حالت افزایشی پیش می‌رود

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]



شکل ۳- اثر غلظت‌های متفاوت اتانول آمین (میکرومولار) بر میزان بتاکاروتن در جلبک A) *D. bardawil*، B) *D. salina*. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است.

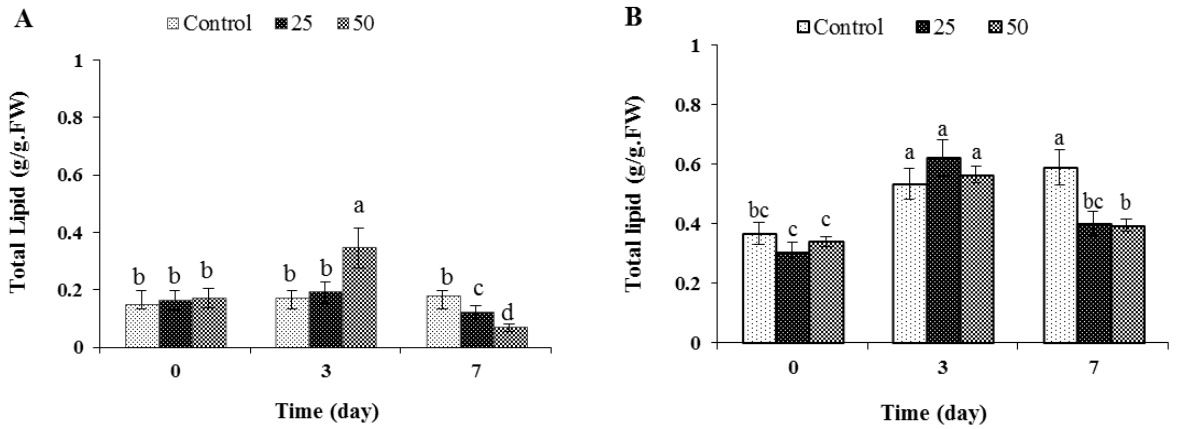
در غلظت ۷۵ میکرومولار بعد از یک شیب نزولی از روز پنجم روند صعودی یافته است و در غلظت ۱۰۰ و ۱۲۰ میکرومولار روند نزولی تا روز پنجم داشته‌اند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار رو به رشد افزایشی می‌رود ولی غلظت ۱۲۰ میکرومولار روند افزایشی خود را از روز یازدهم به‌دست می‌آورد. میزان بتاکارتن در دو هفته پس از تیمار در بهترین غلظت (۱۰ میکرومولار) کمتر از شاهد بوده و میزان آن به کمی بیشتر از ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌رسد.

بررسی اثر اتانول آمین بر محتوی لیپید: با توجه اینکه در اکثر نتایج حاصل از شاخص‌های رشد مانند تقسیم سلولی و میزان کلروفیل، تیمار ۱۰ میکرومولار اتانول آمین تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت، لذا تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اتانول آمین که کاهش کمتری نسبت به سایر غلظت‌های بالاتر بر روی هر دو گونه جلبک *Dunaliella* داشتند برای بررسی اثر اتانول آمین بر میزان و مقدار لیپید در محیط‌کشت انتخاب و در روزهای صفر، ۳ و ۷ مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. اثر این غلظت‌های مختلف اتانول آمین بر تولید لیپید در زیرجلبک‌های *D. bardawil* و *D. salina* که به ترتیب در شکل‌های ۴-A و ۴-B نشان داده شده است.

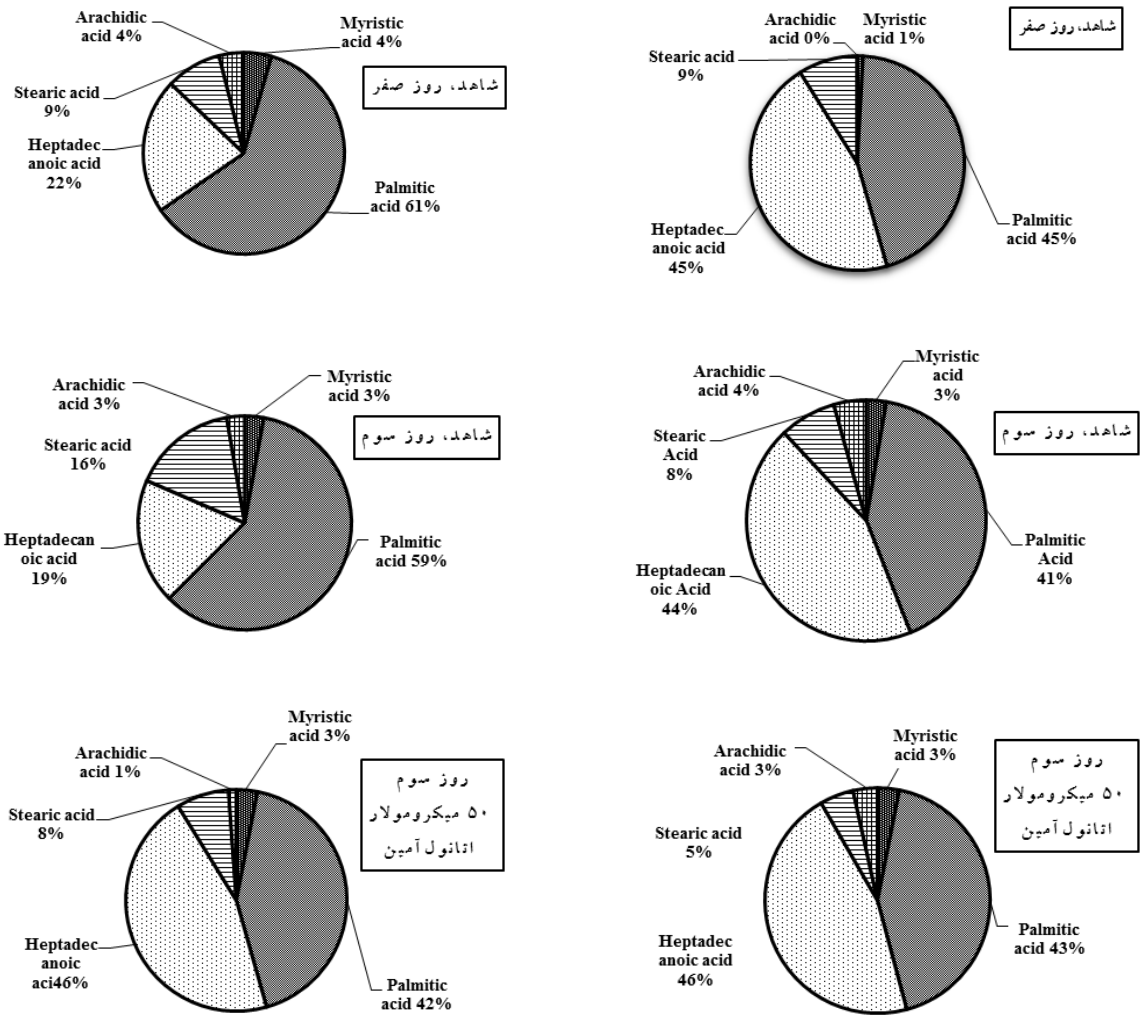
در جلبک *D. bardawil* در تیمار ۵۰ میکرومولار روز سوم میزان لیپید تفاوت معناداری نسبت به نمونه شاهد و تیمار ۲۵ میکرومولار دارد. اما در روز هفتم مقدار لیپید در هر دو تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد کاهش می‌یابد. در جلبک *D. salina* هر سه نمونه شاهد و تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در روز سوم مقدار لیپید رشد افزایشی معناداری نسبت به روز صفر داشته‌اند ولی تفاوت معنی‌داری بین سه تیمار مشاهده نمی‌شود. مقدار لیپید در روز هفتم در تیمار ۲۵ و ۵۰ میکرومولار به یک نسبت کاهش یافته است. مقایسه دو جلبک نشان می‌دهد که میزان لیپید به‌طورکلی در جلبک *D. salina* حدود دو برابر بیشتر از *D. barawil* بوده است.

بررسی اثر اتانول آمین بر غلظت اسیدهای‌چرب موجود در جلبک *Dunaliella*: جهت بررسی اثر اتانول آمین بر غلظت اسیدهای چرب موجود در *D. bardawil* و *D. salina*، با توجه به اینکه در هر دو جلبک، در تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار، افزایش لیپید کل مشاهده شده است. لذا این دو جلبک تحت تیمار ۵۰ میکرومولار اتانول آمین قرار گرفتند و با توجه به اینکه تقریباً در هر دو جلبک بیشترین میزان افزایش در روز سوم بود نمونه‌برداری در روز صفر و روز سوم کشت سوسپانسیون جلبکی انجام و سپس توسط دستگاه GC مورد اندازه‌گیری و آنالیز قرار گرفتند. اسیدهای چرب موجود در جلبک *Dunaliella* را به دو دسته اشباع و غیراشباع تقسیم‌بندی و مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج حاصل از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

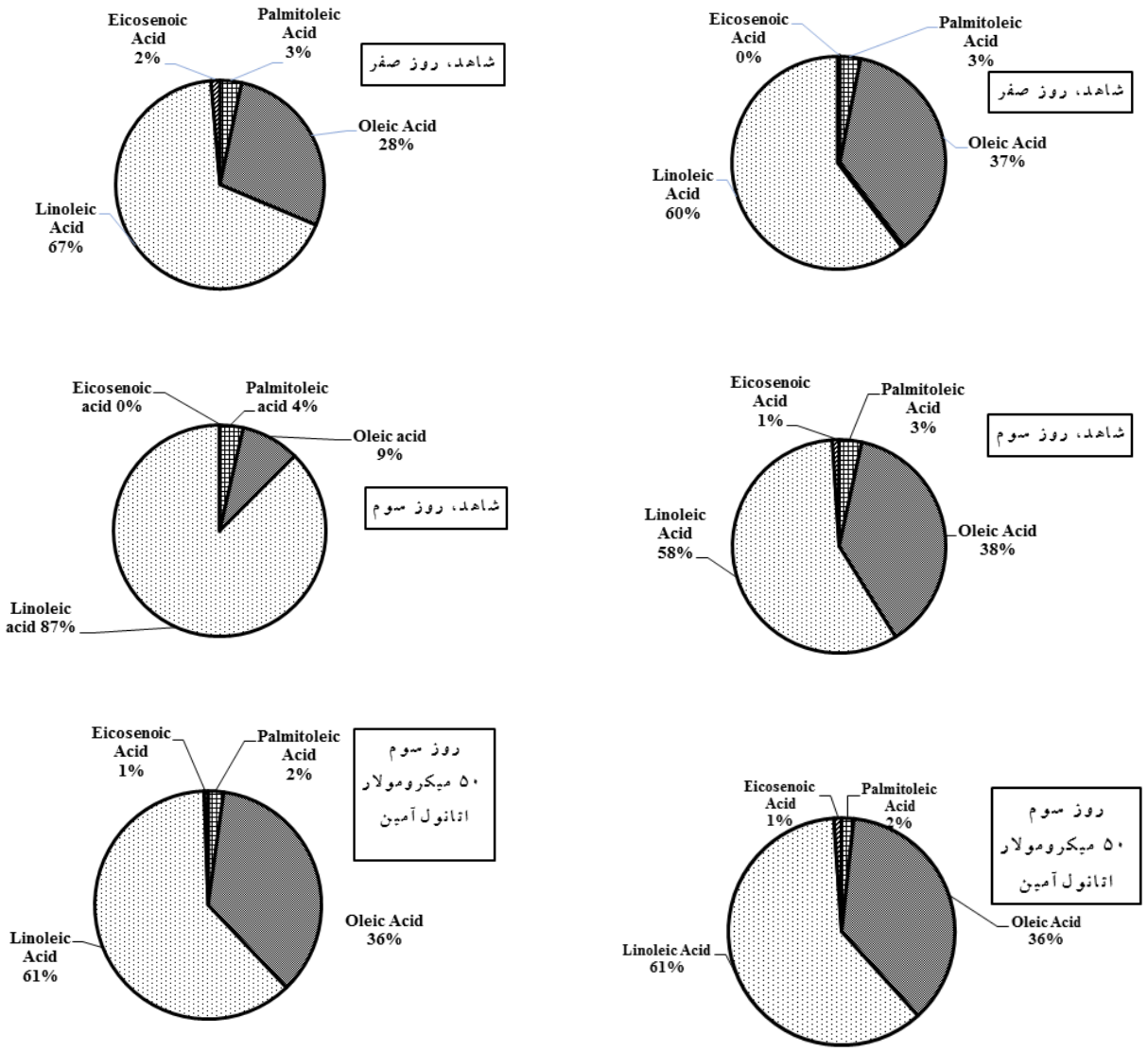


شکل ۴- اثر غلظت‌های متفاوت اتانول آمین (میکرومولار) بر میزان تولید لیپید کل در جلبک A) *D. bardawil*، B) *D. salina*. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.5\%$ با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۵- اثر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اتانول آمین بر میزان اسیدهای چرب اشباع در جلبک در سمت چپ *D. bardawil* و در سمت راست *D. salina* در قیاس با شاهد در روز صفر و روز سوم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]



شکل ۶- اثر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اتانول آمین بر میزان اسیدهای چرب غیراشباع در جلبک در سمت چپ *D. bardawil* و در سمت راست *D. salina* در قیاس با شاهد در روز صفر و روز سوم

دستگاه GC مشاهده می‌شود که در مورد اسیدهای‌چرب اشباع در جلبک *D. bardawil* مطابق شکل ۵ (سمت چپ) در نمونه شاهد در روز سوم نسبت به نمونه شاهد در روز صفر، اسیدهای چرب پالمیتیک اسید و هپتادکانوئیک اسید تغییر چندانی نکرده است و بالعکس استاریک اسید از ۹٪ به ۱۶٪ افزایش نشان می‌دهد. اما در روز پنجم با تیمار ۵۰ میکرومولار اتانول آمین، در قیاس با شاهد روز سوم، میزان اسیدهای چرب پالمیتیک اسید و استاریک اسید کاهش یافته ولی میزان هپتادکانوئیک اسید حدود ۲/۵ برابر بیشتر شده و از ۱۹٪ به ۴۶٪ افزایش یافته است. در اسیدهای چرب آراشیدیک اسید و میریستیک اسید در طول آزمایش تغییرات چندانی مشاهده نمی‌شود. از طرفی در جلبک *D. salina* مطابق شکل ۵ (سمت راست) تغییرات زیادی در میزان اسیدهای چرب مورد بررسی چه در طول پنج روز و چه در اثر تیمار اتانول آمین مشاهده نمی‌شود و فقط کاهش اندکی در میزان استاریک اسید در تیمار ۵۰ میکرومولار با نمونه شاهد در روز سوم مشاهده شد.

در مورد اسیدهای چرب غیراشباع مطابق شکل ۶ (سمت چپ) در جلبک *D. bardawil*، غلظت اسید چرب اولئیک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

اسید با گذشت ۵ روز کاهش یافت. اما تحت تیمار ۵۰ میکرومولار اتانول آمین افزایش چشمگیری داشته است. اسید چرب لینولئیک اسید نمونه شاهد در روز سوم نسبت به نمونه شاهد در روز صفر رشد افزایشی داشته است و اما این اسید چرب در نمونه تحت تیمار ۵۰ میکرومولار اتانول آمین نسبت به نمونه شاهد در روز صفر کاهش یافته است. در مورد اسیدهای چرب غیراشباع پالمیتولئیک اسید و ایکوزنوئیک اسید تغییر چشمگیری مشاهده نشده است. طبق شکل ۶ (سمت راست) در جلبک *D. salina* اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک اسید و لینولئیک اسید تغییر چشمگیری مشاهده نمی‌شود، اما اسید چرب غیراشباع پالمیتولئیک اسید و ایکوزنوئیک اسید تحت تیمار اتانول آمین در روز سوم نسبت به نمونه‌های شاهد در روز صفر و ۵ به ترتیب تغییر نزولی و صعودی داشته است.

بحث

با توجه به اینکه تقاضای انرژی در جهان رو به افزایش است، استفاده از شکل‌های مختلف انرژی تجدیدپذیر مورد توجه خاصی قرار گرفته است. برخی از ریزجلبک‌ها قسمت اعظمی از وزن خشک خود را لیپید ذخیره می‌کنند به همین جهت منابع با ارزشی از لیپید هستند (Chisti, 2008). به منظور استفاده‌های صنعتی و غذایی از این ریزجلبک‌ها، نیاز به بهینه‌سازی آن‌ها در جهت افزایش مقدار اسید چرب در آن‌ها است. گزارش‌ها حاکی از آن است که اضافه نمودن محرک‌های شیمیایی به صورت افزایش در رشد چربی، افزایش در رشد با کاهش چربی، کاهش رشد با افزایش چربی و نهایتاً بدون تأثیر بر رشد و تولید چربی گزارش شده است (Franz *et al.*, 2013). نتایج تحقیق ما حاکی از میزان رشد پایین جلبک‌های *D. bardawil* و *D. salina* در غلظت‌های مختلف اتانول آمین است. علی‌رغم اینکه در خصوص نحوه اثر اتانول آمین بر میزان تقسیم سلولی جلبک‌های تک‌سلولی علت خاصی بیان نشده است، ولی به نظر می‌رسد در مورد جلبک Dunaliella احتمالاً مواد اولیه و انرژی بجای مصرف شدن در فرایند تقسیم سلولی، بیشتر به سمت سایر مراحل متابولیسمی و احتمالاً در برخی از غلظت‌ها به سمت تولید چربی رفته است و در غلظت‌های بالا باعث کاهش رشد شده است. مطالعات انجام‌شده در جلبک *Scenedesmus obliquus* به منظور افزایش محتوی لیپید، نشان داده است که اتانول آمین سبب کاهش زیست‌توده و رشد جلبک می‌شود (Cheng *et al.*, 2012). افزایش غلظت بالای اتانول آمین در این تحقیق باعث تأثیر شدید بر کاهش تقسیم سلولی شده است که احتمالاً حاکی از اثرات سمی اتانول آمین در غلظت‌های بالا است. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان‌دهنده این است که در غلظت‌های پایین میکرومولار اتانول آمین تفاوتی بین میزان کلروفیل با شاهد نداشته است و تفاوتی بین دو جلبک مشاهده نمی‌شود و در غلظت‌های بالا سبب کاهش میزان کلروفیل کل در هر دو جلبک شده است. به نظر می‌رسد تأثیر اتانول آمین بر رشد سلول به همان میزان بر میزان کلروفیل نیز مؤثر بوده است و احتمالاً ناشی از انحراف مواد اولیه و انرژی از رشد و سنتز کلروفیل به سمت سایر مسیرها باشد. نتایج نشان داد که بتاکاروتن نسبت به نمونه شاهد در غلظت پایین در هر دو جلبک تا حدود روز سوم باعث افزایش میزان بتاکاروتن می‌شود که در جلبک *D. bardawil* تا پایان آزمایش ادامه دارد. یکی از مسیرهای سنتز بتاکاروتن مسیر موالونات است (Lichtenthaler, 1999). استیل کوآنزیم‌آ پیش‌ماده سنتز بتاکاروتن در مسیر موالونات در جلبک *Dunaliella* (Ben-Amotz and Shaish, 1992) و سایر موجودات (Lichtenthaler, 1999) است. از طرفی تولید استیل کوآنزیم آ از اتانول آمین در گیاهان گزارش شده است (Cui *et al.*, 2018). لذا به نظر می‌رسد افزودن غلظت‌های کم اتانول آمین در محیط‌کشت در هر دو جلبک *Dunaliella* مورد استفاده در این تحقیق، احتمالاً باعث افزایش تولید استیل کوآنزیم آ شده است که به نوبه خود به سمت تولید موالونات و سمت سنتز بتاکاروتن هدایت شده است (Cui *et al.*, 2018). در این تحقیق تیمار با اتانول آمین باعث سنتز بتاکاروتن در جلبک *D. salina* به میزان اندک و در جلبک *D. bardawil* که توانایی بالای تولید بتاکاروتن را دارد باعث افزایش بیشتر آن شده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

است. از آنجایی که گزارش شده است که بین بتاکاروتن و میزان چربی رابطه وجود دارد (Mendoza *et al.*, 1999)، و نتایج ما حاکی از آن است که محتوای سلولی چربی در جلبک *D. salina* به‌طورکلی بیشتر از *D. bardawil* است، لذا به نظر می‌رسد میزان توانایی بالای *D. bardawil* در تولید بتاکاروتن باعث انتقال کمتر مواد اولیه به سمت تولید چربی و انتقال آن بیشتر به سمت تولید بتاکاروتن باشد و احتمالاً دلیل اصلی میزان تولید چربی کمتر در *D. bardawil* نسبت به *D. salina* باشد. علی‌رغم اینکه بیان شده است در برخی جلبک‌ها اتانول آمین سبب افزایش لیپید شده است (Cui *et al.*, 2018)، ولی در آزمایش‌های ما در هر دو جلبک تقریباً در تمامی غلظت‌های مورد استفاده اتانول آمین در طول آزمایش تأثیری بر میزان چربی ندارد، بجز در روز سوم در غلظت ۵۰ میکرومولار اتانول آمین در جلبک *D. bardawil* میزان چربی به شاهد در همان روز افزایش نشان می‌دهد که نیاز به بررسی‌های بیشتر می باشد. با توجه به اثر کاهشی غلظت‌های بالای اتانول آمین بر میزان چربی تولیدشده به نظر می‌رسد در تیمار با غلظت‌های بالای اتانول آمین، این ماده به عنوان سوبسترا عمل نکرده و بیشتر نقش سمی پیدا می‌کند و افزایش غلظت اتانول آمین همان‌طور که باعث کاهش رشد و سنتز کلروفیل شده است، بر روی جنبه‌های عمومی متابولیسم اثر گذاشته و در غلظت‌های بالا جدای از کاهش شدید تقسیم سلولی و سنتز کلروفیل بر سایر فرآیندها جدای از کاهش شدید تقسیم سلولی و سنتز کلروفیل از جمله سنتز بتاکاروتن را نیز با کاهش روبرو ساخته است که می‌تواند ناشی از اثرات سمی غلظت بالای اتانول آمین باشد.

گزارش شده است که احتمالاً اتانول آمین از طریق تأثیر غیرمستقیم بر روی سنتز استیل کوآنزیم آ و همچنین در جلبک *Crypthecodinium cohni* از طریق کاهش سنتز فسفاتیدیل اتانول آمین بر میزان اسیدهای چرب و لیپید نقش دارد (Cui *et al.*, 2018). در این تحقیق تأثیر اتانول آمین بر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع مورد ارزیابی قرار گرفت. با بررسی نتایج مشخص شد که با تیمار ۵۰ میکرومولار اتانول آمین در جلبک *D. salina*، تغییرات چشمگیری در غلظت اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع آن رخ نداده است و فقط مقدار کمی استئاریک اسید کاهش یافته است. به نظر می‌رسد اتانول آمین در جلبک *D. salina* علی‌رغم داشتن میزان بیشتر لیپید نسبت به *D. bardawil*، احتمالاً اتانول آمین تأثیری بر نیمرخ اسیدهای چرب آن نداشته است. در عوض در جلبک *D. bardawil* غلظت ۵۰ میکرومولار اتانول آمین هم بر روی اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع مؤثر بوده است بطوریکه اسید چرب هپتادکانوئیک اسید افزایش زیادی یافته است. همچنین اسید چرب غیراشباع اولئیک اسید که در روز سوم به شدت کاهش نشان می‌دهد، با استفاده از اتانول آمین مقدار آن افزایش یافته و به مقدار اولیه می‌رسد. در ارتباط با رابطه بین هپتادکانوئیک اسید و اتانول آمین گزارشی وجود ندارد ولی به نظر می‌رسد اسید چرب ذخیره‌ایی اولئیک اسید، به طور عمده با فسفا تیدیل اتانول آمین که حدواسط مهمی در سنتز چربی در جلبک *Dunaliella* به شمار می‌آید، مرتبط باشد. از طرفی همچنین رابطه بین اسید اولئیک و میزان بتاکاروتن گزارش شده است (Mendoza *et al.*, 1999). از نتایج حاصل مشخص شد که با توجه به غلظت بالای بتاکاروتن در جلبک *D. bardawil*، میزان این اسید چرب احتمالاً با بتاکاروتن رابطه دارد که این امر گویای نقش حفاظت نوری بتاکاروتن که تعیین کننده مشخصات اسید چرب می‌باشد، است. نتایج این تحقیق نیز رابطه احتمالی اسید اولئیک و بتاکاروتن در جلبک *D. bardawil* را اندکی نشان می‌دهد. هر چند برای اثبات رابطه بین تجمع بتاکاروتن و غلظت اولئیک اسید که توسط برخی گزارش شده است (Mendoza *et al.*, 1999) تحقیقات بیشتری لازم است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاکی از مطالعه اثر اتانول آمین بر روی جلبک *D. bardawil* و *D. salina* گویای این است که کاهش رشد و میزان کلروفیل در تمامی غلظت‌های اتانول آمین در جلبک *D. salina* و *D. bardawil* احتمالاً به دلیل این است که، مواد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

اولیه و انرژی بجای مصرف شدن در فرایند تقسیم سلولی، بیشتر به سمت سایر مسیرهای متابولیسمی و در برخی موارد احتمالاً به سمت چربی رفته باشد. احتمالاً در غلظت‌های بالا ایجاد اثر سمی و باعث کاهش رشد و سایر رنگیزه‌ها و متابولیسم شده است. به نظر می‌رسد افزودن غلظت‌های کم اتانول آمین در محیط‌کشت جلبک *D. bardawil*، احتمالاً باعث افزایش تولید استیل کوآنزیم آ شده است که به دلیل آن که استیل کوآنزیم آ پیش‌ماده سنتز بتاکاروتن در مسیر موالونات است، احتمالاً به سمت سنتز بتاکاروتن هدایت می‌شود. افزایش غلظت اتانول آمین همان‌طور که باعث کاهش رشد و سنتز کلروفیل شده است، بر روی جنبه‌های عمومی متابولیسم نیز اثرگذار بوده و تمامی فرآیندها از جمله سنتز بتاکاروتن را با کاهش روبرو می‌سازد. افزایش چربی در جلبک *D. bardawil* در غلظت ۵۰ میکرومولار اتانول آمین احتمالاً به واسطه تأثیر غیرمستقیم آن بر روی سنتز استیل کوآنزیم آ و همچنین از طرق کاهش سنتز فسفاتیدیل اتانول آمین است. با تأثیر اتانول آمین بر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع مشخص شد که احتمالاً اتانول آمین در جلبک *D. salina* تأثیری بر اسیدهای چرب غیراشباع نداشت، ولی تغییرات آن در جلبک *D. bardawil*، رابطه احتمالی بین اسید چرب و بتاکاروتن را نه به طور کامل بلکه تا حدودی نشان می‌دهد.

منابع

Belitz, H. D, & Grosch, I. W. (2013). Food Chemistry. Springer Science and Business Media. Berlin.

Ben-Amotz, A, & Shaish, A. (1992). *β*-Carotene biosynthesis. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto Jr., G. L., & Stryer, L. (2015). Biochemistry, 8th Ed. WH Freeman and Company, USA, New York.

Cheng, J. S., Niu, Y. H., Lu, S. H., & Yuan, Y. J. (2012). Metabolome analysis reveals ethanolamine as potential marker for improving lipid accumulation of model photosynthetic organisms. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *87*(10), 1409-1418. https://doi.org/10.1002/jctb.3759

Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnology*. *26*, 126-131. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002

Cui, J., Diao, J., Sun T., Shi, M., Liu, L., Wang, F., Chen, L., & Zhang, W. (2018). C^{13} Metabolic flux analysis of enhanced lipid accumulation modulated by ethanolamine in *Crypthecodinium cohni*. *Journal of Frontiers in Microbiology*, *9*, 956. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00956

Demirbas, A, & Demirbas, M. F. (2011) Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, *52*(1), 163-170. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055

Demirbas, A. (2008) Biodiesel a Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. Springer-Verlag London Limited, London.

Eijckelhoff, C, & Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and B-carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. *Biophysics Photosynthesis/Energy*, *52*, 69-73.

Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W., & Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology Biofuels*, *7*(1), 17. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-17

Finney, K. F., Pomeranz, Y., & Bruinsma, B. L. (1984). Use of algae *Dunaliella* as a protein supplement in bread. *Cereal Chemistry*, *61*(5), 402-406.

Francisco, E. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., & Franco, T. T. (2010). Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *85*(3), 395-403. https://doi.org/10.1002/jctb.2338

Franz, A. K., Danielewicz, M. A., Wong. D. M., Anderson, L. A., & Boothe, J. R. (2013). Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. *Journal of ACS Chemical Biology*, *8*(5), 1053-1062.

Gurr, M. I., Harwood, J. L., & Frayn, K. N. (2002). Lipid Biochemistry. Blackwell Science, Oxford.

Hosseini Tafreshi, A, & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(1), 14-35. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x

Huntley, M. E, & Redalje, D. G. (2007). CO_2 mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *12*, 573-608. http://dx.doi.org/10.1007/s11027-006-7304-1

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

Jang Y. S., Park, J. M., Choi, S., Choi, Y. J., Seung, D. Y., Cho, J. H., & lee, S. Y. (2011) Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. *Biotechnology Advances, 30*(5), 989-100. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.015

Johanson, M. K., Johnson, E. J., McElrory, R. D., Speer, H. L., & Bruff, B. S. (1968). Effects of salt on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology, 95*, 1461-1468.

Laoteng, K., Certik, M., & Cheevadhanark, S. (2011). Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Chemical Papers, 65*(2), 97-103. https://doi.org/10.2478/s11696-010-0097-4.

Lehninger, A. L. (1993). Biochemistry, 2nd Ed. The Molecular Basis of Cell Structure and Function. Worth Publisher, New York.

Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D. S., Guerra, L. T., Kim, M. K., Kim, J., Van Mooy, B. A. S., Bhattacharya, D., & Falkowski, P. G. (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 112*(2), 412-417. https://doi.org/10.1073/pnas.1419818112

Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology, 50*, 47-65. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47

Madadkar Haghjou, M, & Shariati, M. (2007). Photosynthesis and respiration under low temperature stress in tow *Dunaliella* strains. *World Applied Sciences Journal, 2*(4), 276-282.

Mendoza, H., Martel, A., Del Rio, M. J., & Reina, G. G. (1999). Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. In: 6th International Seaweed Symposium. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4449-0_65

Muhlroth, A., Li, K., Rokke, G., Winge, P., Olsen, Y., Holmann-Marriott, M. F., Vadstein, O., & Bones, A. M. (2013). Pathways of lipid metabolism in marine algae, Co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of *Chromista*. *Marine Drugs, 11*(11), 4662-4697. https://doi.org/10.3390/md11114662

Oren, A. (2005). A century year of *Dunaliella* research: 1905-2005, *Saline Systems*, 1-2. https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. F., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research, 45*(1), 11-35. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037

Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology, 98*(1), 560-564. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.007

Ratledge, C, & Evans, C. T. (1989). Lipid and Their Metabolism: The yeasts, Academic press, London.

Ratledge, C, & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology, 51*, 1-50. https://doi.org/10.1016/s0065-2164(02)51000-5

Rismani, S. H. & Shariati, M. (2017). Changes of the total lipid and Omega-3 fatty acid contents in two microalgae *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* under salt stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 60*, 1-11. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160555

Schenk, P., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., & Posten, C. (2009). Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research, 1*, 20-43. https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8

Shaish, A., Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1992). Biosynthesis of β-carotene in *Dunaliella*. *Methods of Enzymology, 213*, 439-444. https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13145-N

Shariati, M, & Hadi, M. R. (2011). Microalgal biotechnology and bioenergy in *Dunaliella*. In: Progress in Molecular and Environmental Bioengineering from Analysis and Modeling to Technology Application. (ed. Carpi, A). Pp. 483-505. Intech, Croatia.

Shariati, M, & Lilley, R. M. (1994). 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.

Schoen, S. (1988). Cell counting. In: Experimental Phycology. (eds. Lobban, C., Chapman, D. and Kremer, B. P). Pp. 16-22. A Laboratory Manual. Cambridge University Press, Cambridge. https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80053-7

Takagi, M, & Karseno, Y. T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 101*(3), 223-226. https://doi.org/10.1263/jbb.101.223

Wang, S. B., Chen, F., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2004). Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green algae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta, 220*, 17-29. https://doi.org/10.1007/s00425-004-1323-5

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

Yahyaabadi, S, & Shariati, M. (2006). Effect of different concentration of cadmium on the growth rate and beta-carotene synthesis in unicellular green algae *Dunaliella salina*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A*, *30*(1), 57-63.

Zareh Chavooshi, Z, & Shariati, M. (2019a). Lipid production in *Dunaliella salina* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Biologia*, *74*, 1579-1590. https://doi.org/10.1590/s1679-87592019024906709

Zareh Chavooshi, Z, & Shariati, M. (2019b). Lipid production in *Dunaliella bardawill* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Brazilian Journal of Oceanography*, *67*, e19249. https://doi.org/10.1590/S1679-87592019024906709

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]

The effect of ethanolamine on lipid production and its relationship with beta-carotene in the unicellular green alga *Dunaliella*

Reihaneh Sadahte Shahabi[1] and Mansour Shariati*[1]

[1] Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received: 2024/08/13, Accepted: 2024/10/01)

Abstract

Unicellular green alga *Dunaliella* is very important in physiological studies due to its resistance to salinity stress and its lack of cell walls. Many microalgae are rich in sources of lipids and fatty acids, which can be used to produce biodiesel, which is less polluting than fossil fuel. The effect of 10, 25, 50, 75, 100, and 120 micromolar ethanolamine concentrations was examined on the growth rate, chlorophyll, and beta-carotene content of two algae *D. salina* and *D. bardawil*, as well as the saturated and unsaturated fatty acids profile. The results showed that low concentrations of ethanolamine did not affect the growth rate and chlorophyll content whereas high concentrations inhibited growth rate and chlorophyll synthesis. In general, both algae were not affected by ethanolamine, only lipid content in *D. bardawil* increased at 50 micromolar ethanolamine. It seems, that in high concentrations of ethanolamine treatment, the suberates, and the energy instead of being used in cell division and chlorophyll synthesis, probably deviated in response to high concentrations of ethanolamine or lipid synthesis. In two applied ethanolamine concentrations (25 and 50 micromolar) and control during one-week experiments, *D. salina* had two times higher lipid content than *D. bardawil*. Moreover, *D. bardawil* showed higher beta-carotene content than *D. salina*. The lower beta-carotene and higher lipid content in *D. salina* and higher beta-carotene and lower lipid content in *D. bardawil* revealed the probable relationship between lipid production and beta-carotene content. Under the treatment of ethanolamine, no big changes in the saturated and unsaturated fatty acid profiles were observed in *D. salina*. An increase in heptadecanoic acid as a saturated fatty acid and oleic acid as unsaturated fatty acid in *D. bardawil* was detected.

Keyword: *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil*, Ethanolamine, Lipid

Corresponding author, Email: mansour_Shariati@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-13]