

## تولید آستاگزانتین و بیان ژنهای مسیر متابولیسمی آن، تحت تاثیر اسید لینولئیک و نانوذرات در ریز جلبک هماتوکوکوس لاکوستریس *Haematococcus lacustris*

حمید گرشاسبی<sup>۱\*</sup>، براتعلی فاخری<sup>۱</sup>، حسن جلیلی<sup>۲</sup>، مهدی رهایی جهرمی<sup>۲</sup>، نفیسه مهدی نژاد<sup>۱</sup>

۱- گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه زابل، ایران

۲- گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران

### چکیده

آستاگزانتین ماده ای بسیار ارزشمند و دارای فواید بسیاری برای انسان است، این ماده از بعضی موجودات مانند ریز جلبک *Haematococcus lacustris* استخراج می شود. محققان سعی در تولید حداکثری این ماده دارند. در این تحقیق اثر غلظت های مختلف اسید لینولئیک (LA) و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (CRTO) و دی اکسید سیلیکون بر تولید آستاگزانتین و بیان ژن  $\beta$  کاروتن کتولاز و بتا کاروتن هیدروکسیلاز (CRTR) سنجیده شد. ریز جلبک مورد نظر در محیط کشت BBM (Bold Basal Medium) بمدت ۱۹ روز بصورت اتوتروف کشت داده شد. در روز سوم تیمارها به کشت ها اضافه شدند و در سه روز مختلف در مراحل رشد لگاریتمی و ثابت آستاگزانتین اندازه گیری شد، همچنین در روز یازدهم استخراج RNA و Real-time PCR صورت گرفت و بیان ژن مشخص گردید. تیمارهای ۳۰ میلی مولار اسید لینولئیک و نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ۴۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب با ۳/۴ و ۱/۵ برابر نسبت به کنترل بیشترین تولید آستاگزانتین و همچنین ژنهای بتا کاروتن کتولاز و بتا کاروتن هیدروکسیلاز به ترتیب تحت تاثیر تیمارهای ۳۰ میلی مولار اسید لینولئیک و سیلیکون دی اکسید ۴۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین بیان ژنی را نشان دادند. برای اولین بار نشان داده شد که غلظت های خاصی از لینولئیک اسید و نانوذرات تیتانیوم دی اکسید به عنوان القاگر برای تولید آستاگزانتین در این ریز جلبک می توانند استفاده شوند، همچنین لینولئیک اسید با تولید آستاگزانتین و بیان ژن بتا کاروتن کتولاز رابطه مستقیم دارد.

**کلید واژه ها:** تیتانیوم دی اکساید، سیلیکون دی اکساید، القاگر، اسپکتروفتومتری

### نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۶

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۹۹/۶/۲۸

\*نویسنده مسؤل:

Garshasbi@uoz.ac.ir

### مقدمه

از دوران باستان بشر از میکرو جلبکها در غذای دام و حاصلخیزی خاک استفاده می نمود، به مرور خواص تازه ای از آنها را مانند دارویی، آرایشی، تغذیه طيور و ماهی یافت و مواد با ارزشی از آنها استخراج نمود از جمله بتا کاروتن، آستاگزانتین، کانتاگزانتین و غیره [۱] آستاگزانتین با نام علمی دی هیدروکسی بتا کاروتن دیون (۳،۳'-Dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4,4'-dione) یک کارتنوئید زانتوفیل، دارای یک ساختار قطبی در دو انتهایش است که به او قدرت آنتی اکسیدانی فوق العاده ای می دهد، این ماده با ارزش در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی، دام و طيور و شیلات کاربرد زیادی دارد [۲]. آستاگزانتین از موجوداتی چون گیاهان، قارچها [۱]، برخی سخت پوستان دریایی، ریز جلبک هایی نظیر کلرلا، هماتوکوکوس پلوویالیس، هماتوکوکوس لاکوستریس و باکتری ها و غیره استحصال می شود [۲]، ولی میزان تولید این ماده در هماتوکوکوس پلوویالیس از همه بیشتر تا حدود ۸۰٪ وزن خشک است [۳]. هماتوکوکوس لاکوستریس از طبقه Chlorophyceae، رسته

Chlamydomonadales، خانواده Haematococcaceae، ریز جلبک سبز تک سلولی دو تاژکه، ساکن آب های مناطق معتدل است و بسیار شبیه هماتوکوکوس پلی ویالیس و تولید کننده مهم آستازانتین است [۴]. نتایج نشان دادند برخی تنش های محیطی مانند نور و نمک و برخی القاگرها نظیر لینولئیک اسید [۲]، متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و نانو ذرات به عنوان القاگر تولید آستازانتین را در ریز جلبک ها بالا بردند، به عنوان مثال: نتایج مطالعات مشابهی نشان دادند که افزودن اسید سالیسیلیک یا متیل جاسمونات رشد سلولی و تولید کارتنوئید را کاهش، همچنین سالیسیلیک اسید مقدار آستازانتین را سریع و به مقدار زیاد افزایش داد در حالیکه متیل جاسمونات آن را آهسته و تدریجی افزایش داد [۵]. برخی از نتایج مقالات منتشر شده نشان می دهند که اخیرا نانوذراتی مانند کادمیوم (Cd) تولید آستازانتین را افزایش می دهند در حالیکه رشد سلولی را در هماتوکوکوس پلوویالیس کاهش می دهند، همچنین افزودن نانو ذرات نقره (Ag) و کادمیوم به هماتوکوکوس پلوویالیس باعث افزایش تولید آستازانتین شد [۶]. تحقیق درباره مسیر متابولیکی آستازانتین روش دیگری برای افزایش آستازانتین در ریز جلبک است. یافته های علمی نشان می دهند که در حدود ۸ ژن مسئول تولید آستازانتین از بتا کاروتن در ریز جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس هستند [۷]. فعالیت آنزیمی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پروکسی داز (POD) تحت تاثیر غلظت های مختلف نانوذره تیتانیوم دی اکسید در کشت *Nitzschia closterium* ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت [۸]. اضافه کردن سالیسیلیک اسید بیان سوپر اکسید دیسموتاز و اسکوریات پروکسیداز (APX)، همچنین متیل جاسمونات بیان کاتالاز و بیان پروکسیداز را تحت نور کم و زیاد در هماتوکوکوس پلوویالیس بالا برد [۵]. ژن های بتا کاروتن کتولاز و بتا کاروتن هیدروکسیلاز به ترتیب بتا کاروتن را به کانتازانتین و کانتازانتین را به آستازانتین تبدیل می نمایند و مهمترین ژن های این مسیر هستند [۷]. برای اولین بار خلیلی و همکاران [۲ و ۹] گزارش نمودند که لینولئیک اسید و متیل جاسمونات تولید آستازانتین را در ریز جلبک های سندسموس (*Scenedesmus acutus*) و کلرلا (*Chlorella sorokiniana*) تحت شرایط هتروتروف افزایش دادند، اما اینکه کدام ژن ها در این مسیر فعالند تا بحال مشخص نشده است، که این تحقیق تا حدی به آن جواب داد همچنین اثر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و سیلنیوم دی اکسید در تولید آستازانتین و بیان ژن در این ریز جلبک برای اولین بار سنجیده شد. ضرورت این تحقیق، مطالعه اثر افزایش مقادیر اندک اسید لینولئیک و نانوذرات در افزایش چند برابری تولید ماده بسیار ارزشمند آستازانتین در ریز جلبک هماتوکوکوس لاکوستریس بود. هدف این تحقیق، مطالعه آثار لینولئیک اسید، نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید و سیلیکون دی اکسید به عنوان القاگر بر تولید آستازانتین و بیان ژن در هماتوکوکوس لاکوستریس به صورت اتوتروفیک بود.

## مواد و روش ها

### شرایط کشت ریز جلبک

ریز جلبک تک سلولی آب شیرین هماتوکوکوس لاکوستریس از آزمایشگاه ریز جلبک دانشگاه الزهرا گرفته شد. در ابتدا سلول های ریز جلبک با غلظت  $20 \times 10^4$  سلول در میلی لیتر درارلن مایرهای ۲۵۰ سی سی حاوی ۱۵۰ سی سی محیط کشت BBM در معرض نور فلورسانس با شدت ۱۳۹/۳۵ فوت بر شمع،  $25 \pm 2$  سلسیوس و اسیدیته ۷/۵-۷/۶ (PH) بدون هوادهی در اتاقک رشد بصورت اتوتروف انکوبه شدند [۱۰]. از هفتمین روز آزمایش تا انتهای آزمایش آنها در معرض ۳۲۵/۱۶ فوت بر شمع به منظور استرس نوری و تحریک تولید آستازانتین قرار گرفتند [۱۱]. اسیدیته محیط کشت قبل از اتوکلاو به وسیله هیدروکسید سدیم (NaOH) تنظیم شد [۲].

### مشخصات نانو ذرات

نانوذرات سیلیکون دی اکسید و تیتانیوم دی اکسید به ترتیب پودری شکل با اندازه های ۱۵-۱۰ نانومتر، خلوص ۹۹/۹۹٪، بی شکل از شرکت اسپانیایی تکنان (TECNAN) و ۲۵~ نانومتر، خلوص ۹۹/۹٪، سطح خارجی ۵۵ مترمربع بر گرم، مخلوطی از فرم های آناتاس (۸۹٪) و روتیل از شرکت آلمانی دگوسا (Degussa) خریداری شدند [۱۲].

### افزودن لینولئیک اسید و نانوذرات به کشت های هماتوکوکوس

تیمارهای اسید لینولئیک در سه غلظت ۳۰،۰ و ۶۰ میکرومولار در سه تکرار و نانوذرات تیتانیوم و سیلیکون دی اکساید هر کدام در دو غلظت ۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر در دو تکرار در نظر گرفته شدند. علت انتخاب این غلظت‌ها سنجش اثر غلظت‌های مختلف لینولئیک اسید و نانوذرات بر تولید آستاگزانتین بود و همچنین بر طبق تحقیقات گذشته برخی محققان صورت گرفت [۲۹،۳۰]. سپس تیمارها در دو آزمایش جداگانه به محیط کشت BBM اضافه شدند. لینولئیک اسید با روش توپین ۲۰ (Tween20) و هیدروکسید سدیم به محیط کشت اضافه شد [۱۳]. محلول‌های پایه نانوذرات تیتانیوم و سیلیکون دی اکساید جدید با آب دیونیزه تازه تهیه و اتوکلاو شدند سپس در حمام سونار با شدت ۵۰ هرتز به مدت ۱۵ دقیقه و سپس در دمای ۴ سلسیوس تا استفاده بعدی ذخیره شدند [۱۰،۴]. سه روز بعد از کشت که رشد سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رسیده بود، تمام تیمارها به محیط کشت اضافه شدند [۱۵].

### اندازه‌گیری آستاگزانتین

آستاگزانتین به روش اسپکتروفتومتری (مدل دستگاه: c2000 شرکت ترمو فیشر ساینتیفیک، آمریکا) اندازه‌گیری شد. دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) برای اندازه‌گیری صفر در اسپکتروفتومتر استفاده شد. جذب نوری آستاگزانتین در طول موج ۴۸۰ نانومتر تعیین شد و مقدار آستاگزانتین با استفاده از فرمول  $Y=1608.X+0.110$  محاسبه شد، که X و Y به ترتیب جذب نوری آستاگزانتین در ۴۸۰ نانومتر و غلظت آستاگزانتین میلی گرم بر لیتر را نشان می‌دهند [۱۶]. آستاگزانتین در روزهای ۱۰، ۱۴ و ۱۷ اندازه‌گیری شد زیرا بر طبق تحقیقات گذشته مقدار آستاگزانتین در انتهای مرحله رشد سریع (Logarithmic phase) و کل مرحله ثبات (Stationary phase) در ریزجلبک‌ها افزایش یافت [۱۷].

### استخراج RNA و سنتز DNA مکمل

کل RNA نمونه با استفاده از کیت استخراج آن (دنا زیست، ایران) مطابق دستورالعمل ذکر شده در روز دهم تا دوازدهم استخراج شد. مقدار و شرایط استخراج RNA شده به ترتیب بوسیله روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانو دراپ (نانودراپ ۲۰۰۰ سی، ترموساینتیفیک، آمریکا) و ژل آگارز اندازه‌گیری شد و سپس در دمای ۸۰- سلسیوس تا استفاده بعدی ذخیره شد [۱۸]. دی‌ان‌ای مکمل (cdNA) از RNA استخراج شده با استفاده از کیت سنتز cdNA (شرکت پیشگام، ایران) به مقدار ۲۰ میکرولیتر سنتز شد روش کار بدین صورت است که با استفاده از نوع خاصی از آنزیم دی‌ان‌ای پلی مراز معکوس mRNAهای استخراج شده به دی‌ان‌ای‌های مکمل تبدیل می‌شوند [۱۹].

### طراحی پرایمر

ژن‌های بتا کاروتن کتولاز و بتا کاروتن هیدروکسیلاز از میان ۸ ژن برای این تحقیق انتخاب شدند زیرا آنها ژن‌های مهم و نهایی در مسیر سنتز آستاگزانتین در هماتوکوکوس لاکوستریس هستند. بتا کاروتن کتولاز بتا کاروتن را به کانتازانتین و بتا کاروتن هیدروکسیلاز کانتازانتین را به آستاگزانتین در دو مرحله تبدیل می‌نمایند [۸]. آغازگرهای آنها بوسیله نرم افزار پرایمر ۳ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) برپایه توالی مربوطه در پایگاه داده‌های مرکز بین المللی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) طراحی و ساخته شدند (شرکت متابیون آلمان)، جدول ۱. از ژن HLrRNA به منظور ژن کنترل داخلی استفاده شد. صحت پرایمرهای طراحی شده به روش‌های بلاست کردن در بانک ژن و مشاهده باندهای اختصاصی پس از آزمایش PCR سنجش شد [۲۰]، که تا ۱۰۰٪ انطباق مشاهده گردید.

### آزمون Real-time PCR

بمنظور سنجش بیان ژن‌های بتا کاروتن کتولاز و بتا کاروتن هیدروکسیلاز تحت تاثیر تیمارهای لینولئیک اسید و نانوذرات به عنوان القاگر تولید آستاگزانتین، از روش ریل تایم پی‌سی‌ار کمی (Quantitative Real-time PCR) همزمان استفاده شد. تیوب‌های عاری از آنزیم اران‌ای‌آز (RNAs free) شامل ۱ میکرولیتر DNA مکمل، ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۴ میکرولیتر مستر میکس سایر گرین ۵ برابر غلظت [۲۱] و ۱۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیرتهیه شدند سپس ریل تایم پی‌سی‌ار کمی با استفاده از دستگاه مستر میکس (روتور ژن کیو ساخت آمریکا) انجام شد. سیکل‌های دمایی به ترتیب زیر بودند: یک سیکل ۲۵ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۰ سیکل ۲۵ ثانیه‌ای برای ژن بتا کاروتن کتولاز در دمای ۶۳ درجه سلسیوس، ۴۰ سیکل ۲۵ ثانیه‌ای برای ژن‌های بتا کاروتن هیدروکسیلاز و HLrRNA با دمای ۶۰ درجه

سلسیوس و ۱ چرخه ۲۵ ثانیه ای با دمای ۶۰ درجه سلسیوس. همچنین روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  برای آنالیز داده های ریل تایم پی سی ار کمی استفاده شد [۲۲].

جدول ۱) پرایمرها، دمای اتصال و شماره دسترسی در بانک ژن در Real-time PCR کمی

| کد بانک ژن | دمای اتصال (سلسیوس) | توالی پرایمر (۳'-۵')   | آغازگر   |
|------------|---------------------|------------------------|----------|
| AF۱۶۲۲۷۶   | ۶۰                  | ACTCTCCTCTTGGTGGTTGG   | CRTR-F   |
|            |                     | GAGGTGTGTGATGGCTCTTATG | CRTR-R   |
| X۸۶۸۷۲     | ۶۳                  | AAGCTAGGCTGGACGAGGAC   | CRT0-F   |
|            |                     | ACTGCTCAAACAATCCATAGCC | CRT0-R   |
| NC۰۲۴۵۱۱   | ۶۰                  | TGAGCTCAGGCAAGAACACC   | HLrRNA-F |
|            |                     | AGTTGGGCTATTCCCAGTTCAC | HLrRNA-R |

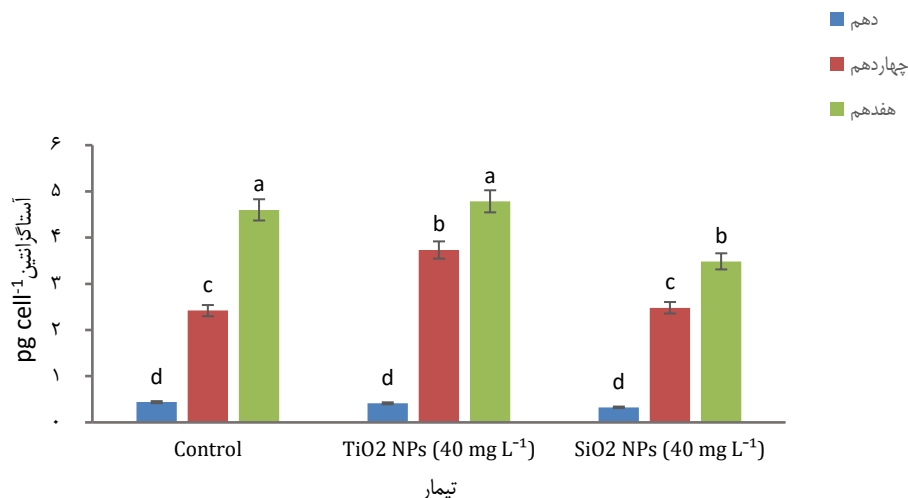
## آنالیز داده ها

تمام داده ها با طرح کامل تصادفی (RCD) در قالب فاکتوریل با میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) با سه و دو تکرار اجرا شدند، همچنین جدول آنوا با استفاده از نرم افزار اسپاس اس (SPSS) نسخه ۱۶ با اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) عدم حضور لینولئیک اسید و نانوذرات) استفاده شد. آزمون چند دامنه ای دانکن برای مقایسه میانگین بین تیمارها و همچنین نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ برای ورود داده ها و رسم نمودارها استفاده شد [۲۳].

## نتایج

### اثرات نانوذرات تیتانیوم و سیلیکون دی اکسید بر بیوسنتز آستاگزانتین

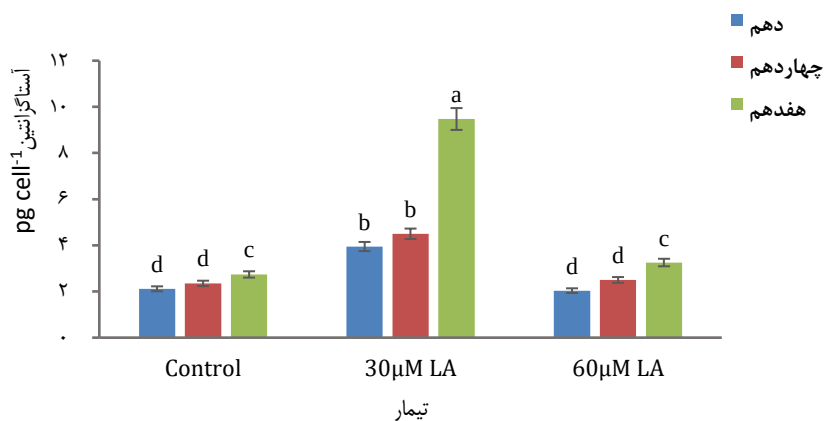
نتایج نشان دادند که اختلاف معنی داری بین کنترل و نانوذرات در روز دهم دیده نشد، در حالیکه در روز چهاردهم، هفدهم و بطور متوسط تیمار نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) بیشترین تولید آستاگزانتین را با ۱/۵، ۱/۰۲ و ۱/۲ مرتبه در مقایسه با کنترل نشان داد. در روز دهم، تیمار سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) کمترین اثر را روی تولید آستاگزانتین نشان داد هرچند در روز چهاردهم تولید آستاگزانتین از کنترل با تولید ۲/۵ ~ (پیکو گرم در سلول) آستاگزانتین فراتر رفت اما در روز هفدهم دوباره کمتر از کنترل شد. متوسط تولید آستاگزانتین تحت تیمار نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) ۰/۸۴ تیمار کنترل بود (شکل ۱). ترتیب تیمارها در تولید آستاگزانتین به ترتیب زیر بود: نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) > کنترل > نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر).



شکل ۱) تولید آستاگزانتین در هماتوکوکوس لاکوستریس تحت تیمارهای مختلف نانوذرات. میله‌های خطا نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) است. حروف مختلف بر دو ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آنهاست. تکرار=۲،  $P < 0.05$

### اثرات اسید لینولئیک بر تجمع آستاگزانتین

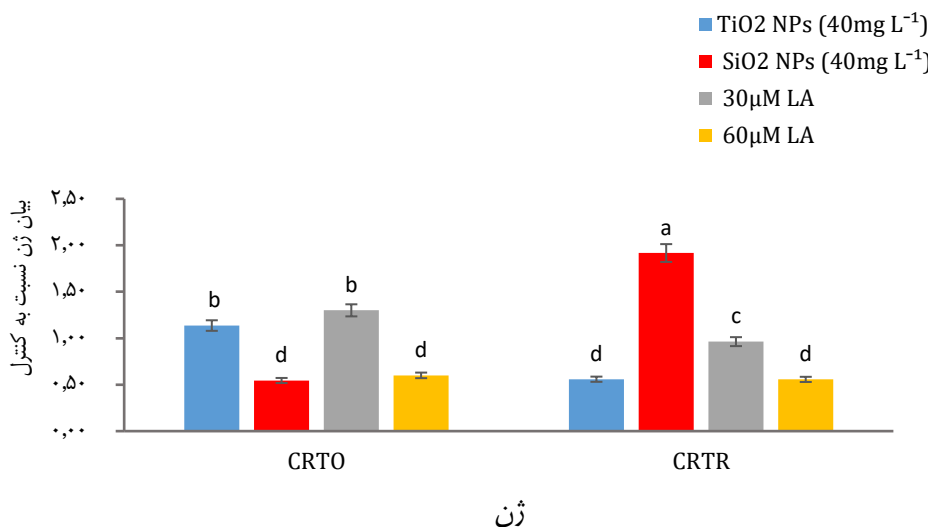
شکل ۲ نشان می‌دهد که تیمار ۳۰ میکرومولار اسید لینولئیک بیشترین تولید آستاگزانتین را بین سایر تیمارها بصورت متوسط و در روز هفدهم به ترتیب با ۲/۵ و ۳/۵ برابر در مقایسه با کنترل داشت. همچنین تولید آستاگزانتین را به‌طور متوسط و روز هفدهم ۲/۳ و ۲/۹ برابر نسبت به ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک افزایش داد. تیمار ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک در دهم و چهاردهم رقابت بسیار شدیدی با کنترل در تولید آستاگزانتین نشان داد. اما در هفدهم از کنترل عبور نمود. تیمار ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک تولید آستاگزانتین را به‌طور متوسط و در روز ۱۷ هم ۱/۱ برابر در مقایسه با کنترل افزایش داد. ترتیب تیمارها در تولید آستاگزانتین به شرح زیر بود: کنترل  $> ۶۰$  میکرومولار اسید لینولئیک  $> ۳۰$  میکرومولار اسید لینولئیک.



شکل ۲) اثر غلظت‌های مختلف اسید لینولئیک در تولید آستاگزانتین در هماتوکوکوس لاکوستریس. میله‌های خطا نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) است. حروف مختلف بر دو ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آنهاست. تکرار=۳،  $P < 0.05$

## بیان ژن مسیر متابولیکی آستازانتین

نتایج این تحقیق نشان داد که ژن های بتا کاروتن هیدروکسیلاز و بتا کاروتن کتولاز به ترتیب تحت تیمارهای نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) و 30 میکرومولار لینولئیک اسید، به ترتیب با ۱/۹ و ۱/۳ مرتبه نسبت به کنترل دارای بیشترین بیان ژن بودند. در حالیکه کمترین بیان ژن برای بتا کاروتن هیدروکسیلاز و بتا کاروتن کتولاز در تیمارهای ۶۰ میکرومولار لینولئیک اسید و نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) با ۰/۵۵ و ۰/۵۴ برابر در مقایسه با کنترل بود. بیان ژن بتا کاروتن هیدروکسیلاز نسبت به بتا کاروتن کتولاز ۱/۱۱ مرتبه بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۳) بیان ژن CRTO و CRTR تحت تیمارهای مختلف. میله های خطا نشان دهنده میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) است. حروف مختلف بر دو ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آنهاست. تکرار= ۳، ۰/۰۵ < P

## بحث

آستازانتین طبیعی یک ماده با ارزش است که به صورت عمده به وسیله ریزجلبک تولید می شود، بسیاری از تحقیقات به منظور افزایش تولید آستازانتین انجام شده است. یک روش، استفاده از مواد ارزان به عنوان القاگر مانند نمک ها، بیو اسیدها، نور، نانو مواد و غیره است. لینولئیک اسید یک مولکول کوچک در مرحله اول مسیرهای متابولیکی اکسی لیپین و آراشیدونیک اسید (ARA, C20:4 Δ5,8,11,14) در گیاهان و ریزجلبکها [۲۴،۲۵] است. دو مسیر متابولیکی اکسی لیپین و آراشیدونیک اسید هر کدام شامل دو مسیر مجزا لیپوکسی ژنز-۱۳ (13-LOX) و لیپوکسی ژنز-۹ (9-LOX) به ترتیب در گیاهان [۲۴] و جلبک های بزرگ [۲۶]، (مسیر اکسی لیپین) همچنین امگا-۶ (W-6) و امگا-۳ (W-3) در ریزجلبکها [۲۵] (مسیر آراشیدونیک اسید) هستند. تولید نهایی مسیرهای لیپوکسی ژنز-۱۳ و امگا-۶ به ترتیب شامل متیل جاسمونیک [۲۴] (MJ) و آراشیدونیک اسید می باشد که مهمترین القاگرهای سلولی در گیاهان و ریزجلبکها هستند [۲۷]. متیل جاسمونیک و آراشیدونیک اسید در مقابل برخی تنش ها مانند نمک، نور، زخم، نانوذرات [۲۸] و غیره تولید می شوند. اسید لینولئیک همچنین پیش ماده هورمون های جاسمونیک اسید (JA) و ترماتیک اسید (TA) [۲۹] است. نانوذرات و دیگر تنش ها با استفاده از گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) مکانسیم دفاعی سلول را در ریزجلبک تحریک می کنند. گونه های اکسیژن واکنشگر باعث آسیب یا مرگ سلولی در ترکیب با اجزاء سلولی مانند DNA، آنزیم و لیپیدها [۳۰] می شوند، لذا سیستم دفاعی سلول برای دفاع در مقابل این حالت فعال می شود. بر این اساس آستازانتین و دیگر متابولیت ها به عنوان ترکیب اصلی یا فرعی مکانسیم دفاع سلولی برای خنثی سازی گونه های اکسیژن واکنشگر در ریزجلبکها، بزرگ جلبکها و گیاهان [۳۱] تولید می شوند. ثانیاً، آستازانتین به عنوان

ذخیره غذایی پس از رفع شرایط تنش استفاده می‌شود<sup>[۳۲]</sup>. مطالعات اسید لینولئیک در ریزجلبک مهم است زیرا نشان می‌دهد ترکیبات آغازی مسیرهای اکسی لیپین و آراشیدونیک می‌تواند تولید آستاگزانتین را تحریک نماید. بعلاوه، مسیر تولید آستاگزانتین ممکن است به مسیر آراشیدونیک در ریزجلبک متصل باشد زیرا تشکیل آستاگزانتین یکی از پاسخ‌های سلولی بر علیه تنش‌ها در ریز جلبک است<sup>[۳۳]</sup>. مطالعات پیشین نشان داد که اسید لینولئیک مانند متیل جاسمونیک تولید آستاگزانتین را در برخی ریزجلبک‌ها افزایش داد، با این تفاوت که اثر متیل جاسمونیک بیش از اسید لینولئیک بود<sup>[۲]</sup>. مشخص شده بود که اثر ۳۰ میکرومولار لینولئیک اسید چندین برابر نانو ذرات بر تولید آستاگزانتین بود<sup>[۳۴]</sup>. بعلاوه نانو ذرات تیتانیوم و سیلیکون دی‌اکسید معمولاً رشد سلولی و فتوسنتز را در گیاهان و ریزجلبک‌ها کاهش می‌دهند، اما فعالیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن‌های مربوطه را افزایش می‌دهند<sup>[۱۴]</sup>، در حالیکه اسید لینولئیک تا یک غلظت مشخص تمام موارد ذکر شده را افزایش و پس از آن کاهش می‌دهد<sup>[۲]</sup>.

### اثر نانوذرات تیتانیوم و سیلیکون دی‌اکسید بر تولید آستاگزانتین

نتایج تحقیق بیان می‌کند که بیشترین غلظت آستاگزانتین بوسیله تیمار نانوذرات تیتانیوم (۴۰ میلی گرم برلیتر) در روز هفدهم تولید شد ( نمودار ۱). در روز دهم، چهاردهم و هفدهم تولید آستاگزانتین به‌وسیله تیمار نانوذرات تیتانیوم به‌ترتیب ۰/۹۵، ۱/۵ و ۱/۰۲ برابر کنترل بود که نشان داد تیمارهای نانو دارای اختلاف معنی‌داری با کنترل در انتهای فاز لگاریتمی (روزدهم) نیستند، اما در مرحله ثبات رشد (چهاردهم) اثر آنها بر تولید آستاگزانتین افزایش یافت و دو باره در روز هفدهم اختلاف تیمار با کنترل کم شد. می‌توان گفت نانوذرات تیتانیوم بعد از روزدهم مسیر متابولیسمی آستاگزانتین را سریعتر از حالت بدون تیمار (کنترل) فعال نمودند و تولید آستاگزانتین تا روز چهاردهم افزایش یافت، اما در فاز مرگ (هفدهم) تیمارکنترل به‌طور عادی مسیر متابولیسمی تولید آستاگزانتین را فعال نمود و سلول‌های کنترل با تمام توان شروع به تولید آستاگزانتین نمودند و تولید آستاگزانتین در تیمار نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و کنترل برابر شد لذا نقش نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در آستاگزانتین شتاب‌دهنده بود نه افزایش‌دهنده.

اثر تیمار نانوذرات تیتانیوم (۴۰ میلی گرم برلیتر) بر تولید آستاگزانتین ۱/۴ بار بیش از تیمار نانوذرات سیلیکون دی‌اکسید (۴۰ میلی گرم برلیتر) به‌صورت کلی (متوسط سه روز) بود، که به علت تجمع و نفوذ سلولی بیشتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید، همچنین تولید بیش‌تر گونه‌های اکسیژن واکنشگر و در نتیجه تولید آستاگزانتین بیشتر بود<sup>[۳۳]</sup>. در یک آزمایش میزان اثر سمی نانو ذرات تیتانیوم دی‌اکسید، سیلیکون دی‌اکسید و اکسید روی (Zno) بر ریزجلبک *Daphnia magna* و باکتری ایشیریشیاکولی (*B. subtilis*, *E. coli*) سنجیده شد که اثر سمی آنها به‌صورت زیر بود نانوذرات سیلیکون دی‌اکسید > تیتانیوم دی‌اکسید > اکسید روی<sup>[۳۴]</sup>. مطالعات نشان دادند که نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و سیلیکون دی‌اکسید به ترتیب در ۱۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار اثر نانو ذرات کادمیوم (Cd NPs) را به ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* کاهش دادند<sup>[۱۱]</sup>. نتایج تحقیقات آشکار نمودند که ۵۰ واحد در میلیون (ppm) تیتانیوم دی‌اکسید یا ۳۲۰۰ واحد در میلیون سیلیکون دی‌اکسید اثر خشکی را در پنبه کاهش دادند<sup>[۳۵]</sup>. مطالعات قبلی نشان دادند که اثر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید از سیلیکون دی‌اکسید بر تولید آستاگزانتین بیشتر است که با نتایج ما منطبق است<sup>[۳۳]</sup>. در این آزمایش اثر عمومی نانو ذره سیلیکون دی‌اکسید بر تولید آستاگزانتین ۰/۸۳ تیمارکنترل و تیتانیوم دی‌اکسید بود زیرا نفوذ آن در دیواره سلولی و آسیب رساندن به محتویات سلول و تولید اکسیژن‌های واکنشگر بسیار ضعیف‌تر از نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید است و فقط می‌تواند تکثیر و رشد سلولی را کمتر از معمول نماید<sup>[۳۵]</sup>. این نتیجه از نظر اینکه تاثیر نانوذرات را بر تولید آستاگزانتین در ریزجلبک همتاکوکوس لاکوستریس سنجید منحصر به فرد بود، همچنین نشان داد که می‌توان از نانو ذرات تیتانیوم دی‌اکسید به عنوان القاگر موثر در تولید آستاگزانتین استفاده نمود.

### اثرات لینولئیک اسید بر تولید آستاگزانتین

نتایج این تحقیق نشان داد که ۳۰ میکرومولار لینولئیک اسید دارای یک اثر حداکثری بر تولید آستاگزانتین تا ۳/۴ و ۲/۵ برابر کنترل در روز هفدهم و کل دوره (متوسط سه روز) بود. که با نظر برخی دانشمندان موافق بود (شکل ۲)<sup>[۲]</sup>. بنظر می‌رسد که ۳۰ میکرومولار اسید لینولئیک در روزهای اولیه آزمایش (از روز سوم تا دهم) تنش‌های مناسبی بر ریزجلبک وارد نمود و بیان ژن آستاگزانتین را افزایش داد لذا این روند تا اکسیداسیون اسید چرب (لینولئیک اسید) در آب در روزهای بعدی (هفدهم) با افزایش تقریباً دو برابری تولید آستاگزانتین در روز هفدهم نسبت به چهاردهم ادامه یافت

که مطابق با نتایج برخی محققان در این زمینه است [۳۶]. اثر تیمار ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک بر تولید آستازانتین در روز هفدهم و به صورت متوسط ۱/۱ برابر نسبت به کنترل بود. همچنین در این غلظت افزایش آستازانتین تا روز هفدهم یا مرحله مرگ سلولی (Dead phase) روند تدریجی داشت، بر این اساس اثر تیمار ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک بر تحریک تولید آستازانتین در ریز جلبک خنثی یا اندکی مثبت بود و ممکن است که ژنوم ریز جلبک و ژن های این مسیر را آسیب رسانده باشد (شکل ۲). لینولئیک اسید در مجاورت محیط کشت آبی تدریجاً هیدرولیز و اکسید شده و غلظتش کمتر می شود، لذا سمیت یا اثر این اسید چرب بر سلول ها کاهش می یابد (زیرا غلظت ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک برای تولید آستازانتین در این ریز جلبک سمی است) و بیان ژن های تولید آستازانتین افزایش یافت، بعلاوه در مرحله مرگ سلولی ریز جلبک با تمام توان آستازانتین تولید نمود. این نتیجه بیان داشت که اسید لینولئیک از نظر غلظت مانند متیل جاسمونیک و سالیسیلیک اسید پس از یک نقطه حداکثر تولید (پیک تولید) دارای یک اثر منفی و سمی [۵] بر تولید آستازانتین بود. اثر اسید لینولئیک شبیه به اسید سالیسیلیک بود زیرا سالیسیلیک اسید تولید آستازانتین را چند برابر نمود در حالیکه متیل جاسمونیک تنها یک اثر حاشیه ای بر آن داشت که با نتایج ما موافق بود [۳۷]. نتایج برخی محققان از آن جهت که برخی مواد تولید آستازانتین را کاهش دادند با نتایج ما موافق نبود [۳۸]. این تحقیق از آن جهت که اولین بار تولید آستازانتین را تحت تاثیر لینولئیک اسید در این ریز جلبک سنجید بسیار مهم و جدید بود، همچنین نشان داد که این ماده یک القاگر موثر در تولید آستازانتین در همتوکوکوس لاکوستریس همانند همتوکوکوس پلوویالیس بود و نیز اثر آن ۲ برابر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید بود.

## بیان ژن

ژن های بتا کاروتن هیدروکسیلاز و بتا کاروتن کتولاز برای این مطالعه انتخاب شدند زیرا آنها ژن های اصلی و انتهایی در مسیر متابولیکی آستازانتین در همتوکوکوس لاکوستریس هستند [۱]. نتایج نشان دادند که بتا کاروتن هیدروکسیلاز و بتا کاروتن کتولاز در تیمارهای نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم بر لیتر) و ۳۰ میکرومولار اسید لینولئیک با ۱/۹ و ۱/۳ برابر کنترل بیشترین بیان ژن را داشتند، در حالیکه کمترین بیان ژن بتا کاروتن کتولاز در تیمار نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم بر لیتر) بود (شکل ۳). نتیجه جالب این بود که ترتیب تولید آستازانتین و بیان ژن بتا کاروتن کتولاز بصورت زیر و یکسان بود: نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم بر لیتر) > ۶۰ میکرومولار اسید لینولئیک > نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (۴۰ میلی گرم بر لیتر) > ۳۰ میکرومولار اسید لینولئیک.

بر این اساس یک ارتباط مستقیم بین بتا کاروتن کتولاز و تولید آستازانتین برقرار است. در تیمار نانوذرات سیلیکون دی اکسید (۴۰ میلی گرم بر لیتر)، ژن بتا کاروتن هیدروکسیلاز بیشترین بیان و یک ارتباط معکوس با تولید آستازانتین را داشت. یک نوع همکاری بین دو ژن در سایر تیمارها دیده شد به این معنی که هر دو باید حضور داشته باشند تا آستازانتین سنتز شود ولی ارتباط مستقیم یا غیر مستقیم بین آنها دیده نشد (شکل ۳). مطالعات گذشته درباره تولید آستازانتین نشان داد که بعضی تنش ها و مواد برخی ژن ها (بتا کاروتن کتولاز و بتا کاروتن هیدروکسیلاز) را بیش از دیگران تحریک نموده [۱۹،۳۹،۴۰] که همسو و مطابق با نتایج ما بود. این تحقیق اولین بار بیان ژن های اصلی مسیر متابولیک آستازانتین را تحت تیمارهای لینولئیک اسید و نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و نانوذرات سیلیکون دی اکسید در همتوکوکوس لاکوستریس بررسی نمود، همچنین با مهندسی ژنتیک ژن بتا کاروتن کتولاز می توان تولید این ماده را افزایش داد که در صنعت مهم است.

## نتیجه گیری

بطور خلاصه اثرات تیمارهای لینولئیک اسید و نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و سیلیکون دی اکسید، بر تولید آستازانتین و بیان دو ژن مسیر بیوسنتز آستازانتین در ریز جلبک همتوکوکوس لاکوستریس به ترتیب در دو طرح جداگانه کامل تصادفی (RCD) در قالب فاکتوریل به ترتیب هر کدام با سه تکرار و غلظت و دو تکرار و غلظت مطالعه شدند. تیمارهای ۳۰ میکرومولار اسید لینولئیک و نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (۴۰ میلی گرم بر لیتر) به ترتیب تولید بیشترین آستازانتین را نشان دادند. همچنین تیمار ۳۰ میکرومولار لینولئیک اسید ارتباط مستقیمی با تولید آستازانتین داشت. در بحث بیان ژن، بتا کاروتن کتولاز در غلظت ۳۰ میکرومولار اسید لینولئیک و بتا کاروتن هیدروکسیلاز در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات



سیلیکون دی اکسید دارای بیشترین بیان ژن بودند. بین بیان ژن بتا کاروتن کتولاز، تولید آستاگزانتین و لینولئیک اسید یک ارتباط مستقیم وجود داشت. با توجه به اهمیت آستاگزانتین طبیعی امیدوارم در آینده تحقیقات بیشتری بر روی اثرات الفاگراها و ژنها در تولید آستاگزانتین صورت گیرد تا آستاگزانتین سریعتر و بیشتر از ریزجلبک‌های مختلف تولید گردد.

## منابع

- 1- Danxiang Han & Yantao Li QH. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. ALGAE. 2013;28(2):131-47.
- 2- Khalili Z, Jalili H, Noroozi M, Amrane A. Effect of linoleic acid and methyl jasmonate on astaxanthin content of *Scenedesmus acutus* and *Chlorella sorokiniana* under heterotrophic cultivation and salt shock conditions. Journal of Applied Phycology. 2019:1-12.
- 3- Domínguez-Bocanegra AR, Guerrero Legarreta I, Martinez Jeronimo F, Tomasini Campocosio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology. 2004; 92(2):209-14.
- 4- Smith DR. *Haematococcus lacustris*: the makings of a giant-sized chloroplast genome. AoB PLANTS. 2018:ply058-ply.
- 5- Raman V, Ravi S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. Acta Physiologiae Plantarum. 2011; 33(3):1043-9.
- 6- Cheng Wh, Wong Ls, Hong Yz, Tan Ym, Ahmad Za. The Effect of Argentum And Cadmium Towards Astaxanthin Content In Green Algae, *Haematococcus Pluvialis*. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences. 2018; 20(1):43-7.
- 7- Schoefs Bt, Rmiki N-E, Rachadi J, Lemoine Y. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. FEBS Letters. 2001; 500(3):125-128.
- 8- Xia B, Chen B, Sun X, Qu K, Ma F, Du M. Interaction of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: Growth inhibition, oxidative stress and internalization. Science of the Total Environment. 2015; 508:525-33.
- 9- Khalili Z, Jalili H, Noroozi M, Amrane A, Ashtiani FR. Linoleic-acid-enhanced astaxanthin content of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) under normal and light shock conditions. Phycologia. 2020; 59(1):54-62.
- 10- Yu Z, Hao R, Zhang L, Zhu Y. Effects of TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Ag and CdTe/CdS quantum dots nanoparticles on toxicity of cadmium towards *Chlamydomonas reinhardtii*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018; 156:75-86.
- 11- Wu F-Y, Tang C-Y, Guo Y-M, Bian Z-W, Fu J-Y, Lu G-H, et al. Transcriptome analysis explores genes related to shikonin biosynthesis in *Lithospermeae* plants and provides insights into *Boraginales*' evolutionary history. Scientific Reports. 2017; 7:4477.
- 12- Karimi J, Mohsenzadeh S. Effects of silicon oxide nanoparticles on growth and physiology of wheat seedlings. Russian journal of plant physiology. 2016; 63(1):119-23.
- 13- Grosch W, Schwarz JM. Linoleic and linolenic acid as precursors of the cucumber flavor. Lipids. 1971;6(5):351-2.
- 14- Liu Y, Wang S, Wang Z, Ye N, Fang H, Wang D. TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub> Nanoparticles Synergistically Provoke Cellular Oxidative Damage in Freshwater Microalgae. Nanomaterials. 2018;8(2):95.

- 15- Gao Z, Meng C, Zhang X, Xu D, Miao X, Wang Y, et al. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial Technology. 2012; 51(4):225-30.
- 16- Yu X, Chen L, Zhang W. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. Frontiers in microbiology. 2015; 6:56.
- 17- Del Campo J, Rodriguez H, Moreno J, Vargas M, Rivas J, Guerrero M. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Applied microbiology and biotechnology. 2004; 64(6):848-54
- 18- Kahila MMH, Najy AM, Rahaie M, Mir-Derikvand M. Effect of nanoparticle treatment on expression of a key gene involved in thymoquinone biosynthetic pathway in *Nigella sativa* L. Natural product research. 2018; 32(15):1858-62.
- 19- Gao Z, Meng C, Gao H, Zhang X, Xu D, Su Y, et al. Analysis of mRNA expression profiles of carotenogenesis and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under exogenous 2, 4-epibrassinolide (EBR). Biological Research. 2013; 46:201-6.
- 20- Khajavi M, Rahaie M, Ebrahimi A. The effect of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles and salinity stress on expression of genes involved in parthenolide biosynthesis in Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). Caryologia International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. 2019; 72(1):3-14.
- 21- Wu F-Y, Tang C-Y, Guo Y-M, Bian Z-W, Fu J-Y, Lu G-H, et al. Transcriptome analysis explores genes related to shikonin biosynthesis in *Lithospermeae* plants and provides insights into *Boraginales*' evolutionary history. Scientific Reports. 2017; 7:4477.
- 22- Lu Y, Jiang P, Liu S, Gan Q, Cui H, Qin S. Methyl jasmonate-or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of  $\beta$ -carotene ketolase genes (bkts) in microalga *Haematococcus pluvialis*. Bioresource technology. 2010; 101(16):6468-74.
- 23- Karimi J, Mohsenzadeh S. Effects of silicon oxide nanoparticles on growth and physiology of wheat seedlings. Russian journal of plant physiology. 2016; 63(1):119-23.
- 24- Jorge León-Morcillo R, Martín J, Martín-Rodríguez, Vierheilig H, Antonio Ocampo J, Garrido J. Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling 2012. 3545-58 p.
- 25- Shanab SMM, Hafez RM, Fouad AS. A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid. Journal of Advanced Research. 2018; 11:3-13.
- 26- Barbosa M, Valentão P, Andrade P. Biologically active oxylipins from enzymatic and nonenzymatic routes in macroalgae. Marine drugs. 2016;14(1):23.
- 27- León-Morcillo RJ, Ángel J, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling. Journal of experimental botany. 2012; 63(10):3545-58.
- 28- Comotto M, Casazza AA, Aliakbarian B, Caratto V, Ferretti M, Perego P. Influence of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Growth and Phenolic Compounds Production in Photosynthetic Microorganisms. The Scientific World Journal. 2014;2014: 961437.
- 29- de los Reyes C, Ávila-Román J, Ortega MJ, de la Jara A, García-Mauriño S, Motilva V, et al. Oxylipins from the microalgae *Chlamydomonas debaryana* and *Nannochloropsis gaditana* and their activity as TNF- $\alpha$  inhibitors. Phytochemistry. 2014; 102:152-61.
- 30- Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. Physiologia Plantarum. 2000; 108(2):111-7.
- 31- Howe GA, Schillmiller AL. Oxylipin metabolism in response to stress. Current Opinion in Plant Biology. 2002; 5(3):230-6.

- 32- Solovchenko A. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. Russian journal of plant physiology. 2013; 60(1):1-13.
- 33- Christian D, Zhang J, Sawdon AJ, Peng C-A. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. Bioresource Technology. 2018; 256. 51-548.
- 34- Gao Z, Meng C, Zhang X, Xu D, Zhao Y, Wang Y, et al. Differential Expression of Carotenogenic Genes, Associated Changes on Astaxanthin Production and Photosynthesis Features Induced by JA in *H. pluvialis*. PLOS ONE. 2012;7(8):e42243.
- 35- Manzo S, Buono S, Rametta G, Miglietta ML, Schiavo S, Di Francia G. The diverse toxic effect of SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* 2015.
- 36- Qian H, Xu J, Lu T, Zhang Q, Qu Q, Yang Z, et al. Responses of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* to allelochemical linoleic acid. Science of the Total Environment. 22-625:1415; 2018.
- 37- Chen T, Wei D, Chen G, Wang Y, Chen F. Employment of organic acids to enhance astaxanthin formation in heterotrophic *Chlorella zofingiensis*. Journal of food processing and preservation. 2009;33(2):271-84.
- 38- Zhekisheva M, Boussiba S, Khozin-Goldberg I, Zarka A, Cohen Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters<sup>1</sup>. Journal of Phycology. 2002;38(2):325-31.
- 39- Li Y, Huang J, Sandmann G, Chen F. Glucose sensing and the mitochondrial alternative pathway are involved in the regulation of astaxanthin biosynthesis in the dark-grown *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). Planta. 2008;228(5):735-43.
- 40- Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. Plant Molecular Biology. 2003;52(2):343-56.

# Astaxanthin Production and Expression of its Metabolic Pathway Genes under the influence of Linoleic Acid and Nanoparticles in Microalga (*Hematococcus Lacustris*)

Garshasbi H<sup>1\*</sup>, Fakheri B<sup>1</sup>, Jalili H<sup>2</sup>, Rahaie Jahromi M<sup>1</sup>, Mahdinezhad N<sup>1</sup>

1- Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural Sciences, University of Zabol, Iran.

2- Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

## ABSTRACT

Astaxanthin is a precious material and has many favorites for human; it is extracted from some creatures such as *Haematococcus lacustris*. Researchers try to maximize the production of this material. In this research effects of linoleic acid (LA), TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> Nanoparticles (NPs) were investigated on astaxanthin production, and expression of two astaxanthin metabolic pathway genes (C<sub>RT0</sub> and C<sub>RT1</sub>). The microalgae was cultured in BBM medium for 19 days autotrophically. In 3rd day, treatments were added to the cultures and astaxanthin measured in 3 days respectively in logarithmic and stationary phases, also RNA was extracted, Real-time PCR applied and Gene expression investigated in 11th. 30  $\mu$ M LA and TiO<sub>2</sub> NPs (40 mg L<sup>-1</sup>) induced 3.4 and 1.5 times astaxanthin production compared to the control, furthermore, C<sub>RT0</sub> and C<sub>RT1</sub> under 30  $\mu$ M LA and SiO<sub>2</sub> NPs (40 mg L<sup>-1</sup>) treatments displayed the highest gene expression. It was demonstrated that special concentration of Linoleic acid and TiO<sub>2</sub> NPs, as inducers, could be used for astaxanthin production; also, Linoleic acid has a direct relationship with astaxanthin production and C<sub>RT0</sub>'s gene expression in the microalgae.

## KEYWORDS

TiO<sub>2</sub>  
SiO<sub>2</sub>  
Inducer  
Spectrophotometry

## ARTICLE TYPE

Original Research

## ARTICLE HISTORY

Received: 8 March 2020

Accepted: 6 August 2020

ePublished: 22 August 2020

\* Corresponding Author:

Email address: Garshasbi@uoz.ac.ir

Tel: +98 9124248861

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513