

تأثیر اتانل بر تولید پیگمان‌ها در *Chlorella sorociniana* در شرایط اتوتروف

زهرا خلیلی^۱، حسن جلیلی^{۲*}، مصطفی نوروزی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۶

چکیده

کلرلا نوعی جلبک سبز تک سلولی است که بیشترین کلروفیل را در بین موجودات تولید می‌کند. از جمله متابولیت‌های مهم کلرلا می‌توان به کلروفیل *a* و *b* و آستاگزانتین اشاره کرد. تا کنون جهت افزایش تولید متابولیت‌های ریزجلبک‌ها، برخی مواد شیمیایی به عنوان محرک استفاده شده‌اند که یکی از این محرک‌ها اتانل می‌باشد. در این پژوهش برای اولین بار تأثیر اتانل بر تولید آستاگزانتین و کلروفیل *a* و *b* در کلرلا سوروکینینا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری نشان داد که اتانل در غلظت ۱۰ میکرولیتر (در ۱۰۰ سی سی محیط کشت) سبب افزایش تولید آستاگزانتین به مقدار ۱/۴ برابر می‌شود. در حالیکه میزان تولید کلروفیل‌ها، در حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل (در ۱۰۰ سی سی محیط کشت) تنها تغییر اندکی داشته است. با توجه به نقش تنظیمی فیتوهورمون‌ها در ریزجلبک‌ها می‌توان نتیجه گرفت که اتانل نیز مشابه سیگنال عمل کرده و تولید برخی متابولیت‌ها را تنظیم می‌کند.

واژه های کلیدی: آستاگزانتین، اسپکتروفتومتری، اتانل، ریزجلبک، کلروفیل

مقدمه

کلرلا جلبک سبز تک سلولی از شاخه کلروفیتا است که در آب شیرین پرورش داده می‌شود. کلرلا اولین غذای سبز موجود در کره زمین می‌باشد و قدمت آن به ۲/۵ میلیارد سال می‌رسد. واژه کلرلا از دو جزء «chlor» به معنی سبز و «ella» به معنی کوچک گرفته شده است. این جلبک بیشترین کلروفیل را در بین تمام گیاهان روی کره زمین تولید می‌کند و سبزترین گیاه روی کره زمین است (Luangpipat & Chisti, 2016). اندازه هر سلول کلرلا ۸-۲ میکرون است. سرعت تکثیر کلرلا بسیار زیاد است و یک سلول آن در مدت ۱۷ تا ۲۴ ساعت ۴ سلول جدید تولید می‌کند. سرعت بالای تولید مثل کلرلا نشان دهنده پتانسیل حیات بسیار بالای این ارگانیسم است (Rioboo et al., 2009). تحقیقات دانشمندان نشان داده که کلرلا یکی از سالم‌ترین و کامل‌ترین غذاهای روی کره زمین است. کلرلا در دسته ریز جلبک‌های سبز دسته بندی می‌شود.

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

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

* نویسنده مسئول: (hjalili@ut.ac.ir)

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

کلرلا منبع غنی از ترکیبات با ارزشی مثل ویتامین‌ها، مواد معدنی، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها و رنگدانه‌ها است و به عنوان مکمل‌های غذایی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Li *et al.*, 2015). این مسئله با توجه به رشد روز افزون جمعیت جهان و کمبود منابع غذایی بسیار حائز اهمیت است. آستاگزانتین (Astaxanthin) نوعی کاروتنوئید است و جزء رنگدانه‌های طبیعی شناخته شده می‌باشد. آستاگزانتین به رنگ نارنجی پررنگ بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که تاثیر زیادی روی سلامتی انسان دارد. از جمله اثرات آستاگزانتین می‌توان به تقویت سیستم ایمنی بدن، پیشگیری از پیر شدن سلول‌ها، جلوگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و غیره اشاره کرد. در نتیجه آستاگزانتین به صورت گسترده در صنایع غذایی، دارویی و حتی آرایشی-بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آستاگزانتین در بدن انسان تولید نمی‌شود لذا باید با رژیم غذایی و از طریق گیاهان و ریزجلبک‌ها تامین شود. آستاگزانتین را به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌توان به عنوان نگهدارنده و مکمل غذایی استفاده کرد (Chacón-Ordóñez *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017). در تحقیقی دیگر اثر محیط‌های کشت مختلف روی تولید آستاگزانتین توسط جلبک *Haematococcus pluvialis* مورد ارزیابی قرار گرفته (Noroozi *et al.*, 2012).

کلروفیل‌ها رنگیزه‌های سبز و فعال فتوسنتزی موجود در کلروپلاست‌اند که به انواع متنوع *a*, *b*, *c*, *d* و *e* شناخته شده‌اند. تمام گیاهان فتوسنتز کننده، دارای کلروفیل *a* هستند ولی وجود کلروفیل کمکی مثل *b*, *c*, *d* و *e* بستگی به نوع گیاه دارد. در بعضی جلبک‌ها کلروفیل *b* وجود ندارد و به عوض آن کلروفیل *c* یا *d* دیده می‌شود. کلروفیل *a* به رنگ آبی مایل به سبز و محلول خالص کلروفیل *b* به رنگ سبز متمایل به زرد است. طیف جذبی کلروفیل *a* با *b* تفاوت دارد و بر حسب نوع پروتئینی که با آنها ترکیب شده است فرق می‌کند (Garcia-Camacho *et al.*, 2012). نقش کلروفیل‌ها در افزایش سلامت خون، محافظت در برابر بیماری و حذف فلزات سنگین حائز اهمیت است (Ferruzzi *et al.*, 2002; Stahl & Sies, 2005; Takaichi, 2011). با توجه به اهمیت کلروفیل‌ها در سلامت انسان، افزایش تولید این ماده و تخلیص آن به شکل دارو، می‌تواند نقش به‌سزایی در بهبود سلامت انسان و پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها داشته باشد.

از آنجایی که تولید متابولیت‌ها از جمله آستاگزانتین و کلروفیل، توسط کلرلای وحشی مقرون به صرفه نیست و حتی متابولیت‌های سویه‌های تغییر یافته هم آن‌چنان صنعتی نیست، محققان استفاده از محرک‌های شیمیایی و زیستی را در دستور کار قرار داده‌اند. از جمله محرک‌هایی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است می‌توان به بررسی اثر اتانل بر تولید ترکیبات لیپیدی، اثر متیل جاسمونات بر تولید آستاگزانتین، تاثیر پیرووات و سترات بر تولید آستاگزانتین، اثر فلزات بر رشد سلولی و غیره اشاره کرد (Yu *et al.*, 2015). در این پژوهش برای نخستین بار تاثیر اتانل بر تولید آستاگزانتین و کلروفیل توسط ریزجلبک کلرلا سوروکینینا مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* (Shihira & Krauss)، تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیک، استفاده شد. مواد بکار رفته در آزمایش همگی از شرکت مرک (Merck) بوده و آزمایشات در آزمایشگاه دانشکده علوم فنون دانشگاه تهران انجام شد.

کشت ریزجلبک کلرلا

جهت کشت این ریزجلبک از محیط کشت BG11 استفاده شد. جهت تهیه ۱ لیتر از این محیط کشت: ۱/۵ گرم NaNO_3 ، ۰/۰۷۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۲ گرم Na_2CO_3 ، ۰/۰۳۹ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۰۳۵ گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۶ گرم اسید سیتریک، ۰/۰۰۶ گرم فریک آمونیوم سترات، ۰/۰۰۱ گرم $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و ۱ سی سی محلول ریز مغذی‌ها استفاده شد. ۱ لیتر از محلول ریز مغذی‌ها نیز شامل ۶۱ میلی گرم H_3BO_3 ، ۱۶۹ میلی گرم $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۲۸۷ میلی گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۲/۵ میلی گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ و ۱۲۵ میلی گرم $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ بود. pH محیط کشت با استفاده از NaOH به ۸/۴ رسید و سپس اتوکلاو شد. محیط کشت پس از تلقیح، در دمای 25°C ، روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm و در معرض ۶۰ فوتون نور قرار گرفت.

ترسیم منحنی رشد کلرلا

جهت رسم منحنی رشد کلرلا، در زمان‌های مختلف تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از هر محیط کشت یکنواخت شده، به لام نئوبار منتقل شده و میانگین تعداد سلول‌های چهار خانه حاشیه لام و یک خانه مرکزی آن محاسبه شده و سپس در عدد 10^4 ضرب شد.

تیمار محیط کشت با اتانل

در سه ارلن با حجم ۵۰۰ سی سی، هر کدام به اندازه ۱۰۰ سی سی محیط کشت ریخته شد و با ۱۰ سی سی از مایه تلقیح، کشت داده شد. ۴۸ ساعت پس از تلقیح (ابتدای فاز رشد لگاریتمی کلرلا در منحنی رشد)، در یکی از ارلن‌ها به اندازه ۱۰ میکرولیتر و در دیگری به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر اتانل ۹۶ درصد مرک، تحت شرایط استریل اضافه شد. پس از اتمام دوره رشد کلرلا (دوازده روز پس از تلقیح)، میزان آستاگزانتین و کلروفیل‌های این سه محیط کشت اندازه‌گیری و مقایسه شد.

اندازه گیری آستاگزانتین

برای استخراج آستاگزانتین به روش DMSO، ابتدا محیط کشت روی ورتکس به خوبی یکدست شد. سپس تحت شرایط استریل مقدار ۱۰ سی سی از محیط کشت در فالكون ۵۰ سی سی ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰ سی سی DMSO به ته نشست اضافه شد. محلول حاصل به کمک ورتکس به خوبی یکدست شد و به مدت ۱ ساعت در بن ماری ۷۰°C قرار گرفت. سپس میزان جذب این محلول توسط اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول DMSO به عنوان کنترل (بلانک) در آزمون اسپکتروفتومتری استفاده شد. غلظت آستاگزانتین توسط معادله منحنی استاندارد آستاگزانتین، که بر اساس جذب رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص ترسیم شده است، بدست آمد (Greenberg & Watras, 1989).

اندازه گیری کلروفیل‌ها

استخراج کلروفیل نیز بر اساس روش DMSO انجام شد؛ به این صورت که، محیط کشت روی ورتکس به خوبی یکدست شد. سپس، تحت شرایط استریل مقدار ۱۰ سی سی از محیط کشت در فالكون ۵۰ سی سی ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با احتیاط دور ریخته شد و ۴ سی سی DMSO به ته نشست، اضافه شد. محلول حاصل حدود ۱۶ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. در صورتی که پس از ۱۶ ساعت هنوز سلول‌ها به طور کامل رنگ خود را از دست نداده بودند مرحله استخراج با افزودن ۳ سی سی DMSO ادامه می‌یافت. سپس محلول حاصل به خوبی ورتکس، و توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد تا ذرات اضافی آن گرفته شود. جذب محلول صاف شده در دو طول موج ۶۴۹ و ۶۶۵ نانومتر خوانده شد. از محلول DMSO به عنوان کنترل (بلانک) در آزمون اسپکتروفتومتری استفاده شد. میزان کلروفیل a و کلروفیل b از طریق معادله‌های ۱ و ۲ محاسبه شد (Greenberg & Watras, 1989).

$$\text{Chlorophyll a: } (13.95 - A_{665}) - (6.88 - A_{649}) \quad \text{معادله (۱)}$$

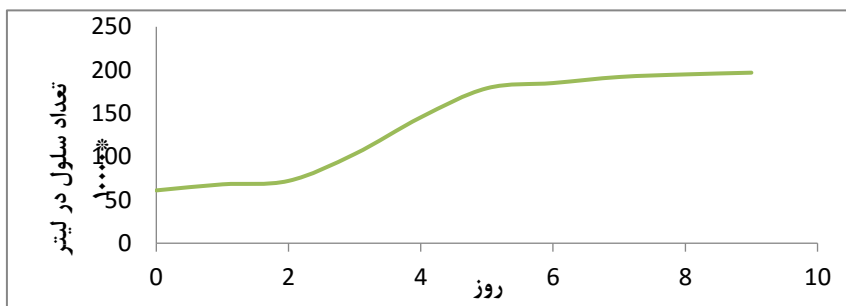
$$\text{Chlorophyll b: } (24.69 - A_{649}) - (7.32 - A_{665}) \quad \text{معادله (۲)}$$

اندازه گیری رشد سلولی

جهت بررسی تاثیر اتانل بر رشد سلولی، شمارش تعداد سلول‌ها با کمک لام نتوبار در سه ارلن انجام شد.

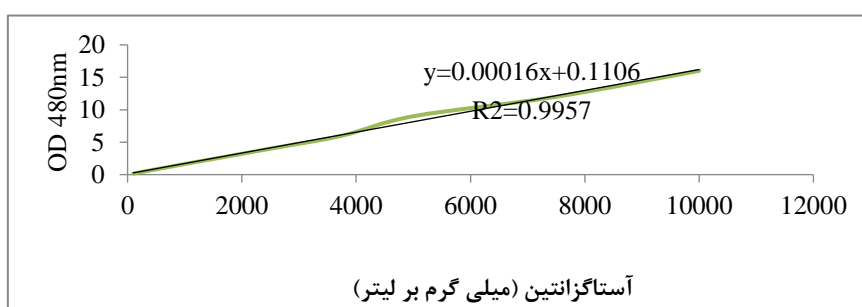
نتایج و بحث

منحنی رشد کلرلا مطابق شکل ۱ رسم شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود کلرلا سوروکینینا، ۴۸ ساعت پس از تلقیح، به فاز رشد لگاریتمی و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح، به مرحله سکون می‌رسد و نرخ رشد و مرگ یکسانی پیدا می‌کند.



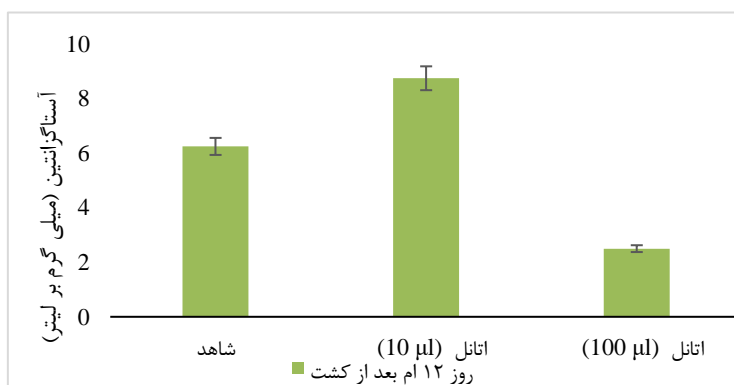
شکل ۱: منحنی رشد کلرلا

منحنی استاندارد آستاگزانتین مطابق شکل ۲ ترسیم شد تا با استفاده از معادله آن بتوان غلظت آستاگزانتین را در آزمایش‌های مختلف محاسبه کرد.



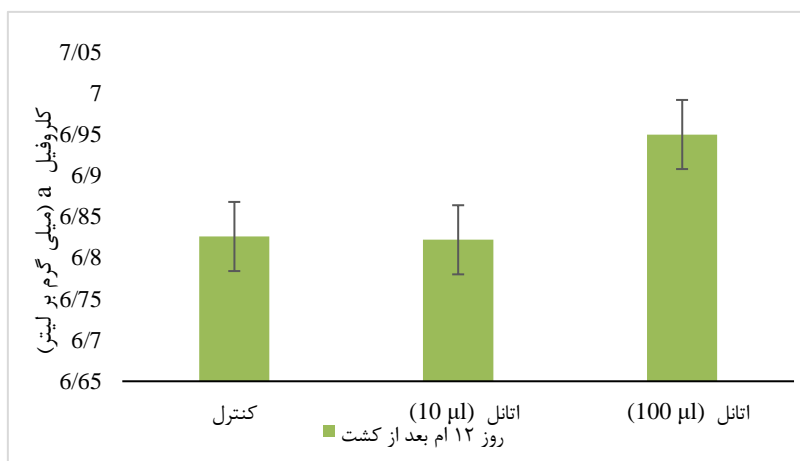
شکل ۲: منحنی استاندارد آستاگزانتین

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، مقدار آستاگزانتین تولیدی در حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل، نسبت به نمونه شاهد، ۱/۴ برابر افزایش یافته است. این در حالی است که حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل، میزان آستاگزانتین را ۲/۵ برابر نسبت به شاهد کاهش داده است.



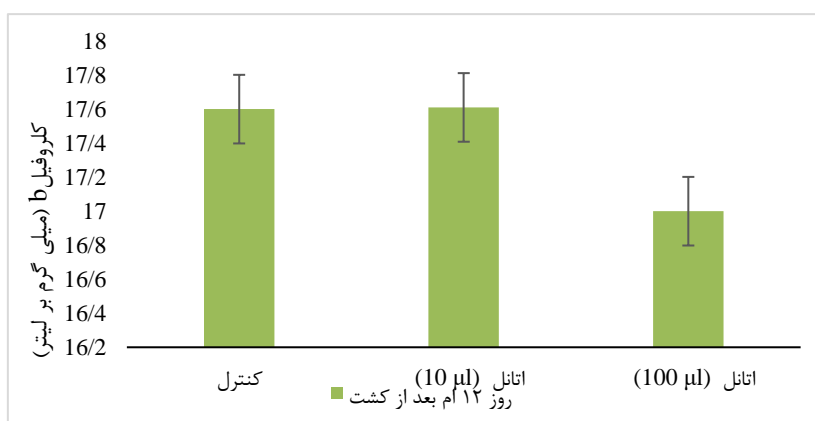
شکل ۳: مقایسه مقدار آستاگزانتین تولیدی در سه ارلن

در شکل ۴، مربوط به تولید کلروفیل a، مشاهده می‌شود که در حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل مقدار تولید کلروفیل a نسبت به نمونه شاهد چندان تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. در حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل نیز مقدار کلروفیل a، به میزان اندک (۱/۰۲) برابر افزایش داشته است.



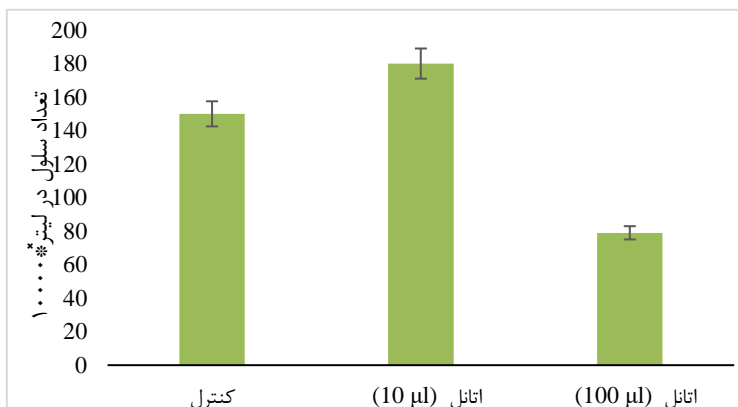
شکل ۴: مقایسه مقدار کلروفیل a تولیدی در سه ارلن

مقدار کلروفیل b، در شکل ۵ نشان می دهد که همانند آنچه در مورد کلروفیل a مطرح شد، در اینجا نیز حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل، تولید کلروفیل b را تغییر نداده است. در حضور ۱۰۰ میکرولیتر اتانل نیز، کلروفیل b، ۱/۰۳ برابر کاهش یافته است.



شکل ۵: مقایسه مقدار کلروفیل b تولیدی در سه ارلن

شکل ۶ تعداد سلول ها در روز دوازدهم بعد از کشت را نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود در حضور ۱۰ میکرولیتر اتانل، تعداد سلول ها نسبت به نمونه شاهد، ۱/۲ برابر افزایش داشته است. در حالی که ۱۰۰ میکرولیتر اتانل، اثر مهاری بر رشد داشته و تعداد سلول ها در این نمونه نسبت به شاهد، ۱/۸ برابر کاهش یافته است.



شکل ۶: مقایسه تعداد سلولها در سه ارن

همان طور که در نتایج ذکر شد، تولید آستاگزانتین در حضور ۱۰ میکرولیتر (در ۱۰۰ سی سی) اتانل افزایش یافته است. در سال ۲۰۰۹، Ren تاثیر افزایشی اتانل بر تولید ترکیبات لیپیدی در شیزوکیتریوم را گزارش کرد (Ren et al., 2009). وی طی تحقیقات به این نتیجه رسید که احتمالاً اتانل و محرک‌های دیگری که مورد استفاده قرار داده بود، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در تولید ترکیبات لیپیدی شدند. از آنجایی که تاکنون تاثیر اتانل بر تولید آستاگزانتین در هیچ ارگانیزی مطالعه نشده است، لذا منبع دقیقی برای توجیه خاصیت افزایشی اتانل بر تولید آستاگزانتین وجود ندارد. با توجه به نتایج تحقیقات Ren می‌توان گفت که احتمالاً در کلرلا نیز اتانل در مسیر سنتز آستاگزانتین، باعث افزایش فعالیت آنزیم خاصی شده و لذا تولید آستاگزانتین را از این طریق افزایش داده است. بعبارتی می‌توان گفت اتانل به صورت یک سیگنال عمل کرده و می‌تواند تولید آستاگزانتین توسط ریز جلبک کلرلا را تنظیم کند.

مشاهده شد که اتانل در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر (در ۱۰۰ سی سی) تولید آستاگزانتین در کلرلا را کاهش داده است. طبق تحقیقات، اتانل در غلظت بالا اثر مهاری بر رشد سلول داشته و در اینجا هم غلظت اتانل به حد مهار کننده تولید آستاگزانتین رسیده است.

نتایج نشان می‌دهد که اتانل در غلظت ۱۰ میکرولیتر به حد آستانه تحریک تولید کلروفیل‌ها نرسیده است، در حالی که ۱۰۰ میکرو لیتر اتانل باعث افزایش کلروفیل a و کاهش کلروفیل b شده است. این تفاوت در تاثیر اتانل، احتمالاً با تفاوت در نقش این دو کلروفیل مرتبط می‌باشد. کلروفیل a در فتوسنتز نقش اساسی و حیاتی ایفا می‌کند و در مرکز واکنش‌ها است، در حالی که کلروفیل b در جمع آوری و متمرکز کردن نور و تحویل آن به کلروفیل a نقش دارد (Green & Durnford, 1996). وقتی ریزجلبک با تنش مواجه می‌شود به صورت تدافعی، تولید آستاگزانتین، به جای کلروفیل b، افزایش می‌یابد؛ در واقع، نقش آستاگزانتین در فتوسنتز مشابه نقش کلروفیل b می‌باشد. لذا در برخورد با اتانل و مواجه کلرلا با تنش محیطی، تولید کلروفیل a به عنوان هسته واکنش‌های فتوسنتزی افزایش و کلروفیل b کاهش یافته است تا احتمالاً به جای آن، انرژی ریز جلبک صرف تولید آستاگزانتین شود؛ ولی، همان طور که ذکر شد این غلظت از اتانل برای تولید آستاگزانتین نیز اثر مهاری داشته است. اتانل در افزایش تولید

کلروفیل a، احتمالاً مکانیسمی مشابه آنچه در مورد آستاگزانتین بیان شد، داشته است و در واقع باعث افزایش فعالیت آنزیم ها می شود.

در مورد تعداد سلول ها در شکل ۶ مشاهده می شود که اتانل در غلظت کمتر (۱۰ میکرولیتر در ۱۰۰ سی سی) باعث افزایش تعداد سلول شده است. این میزان افزایش، نسبت به نمونه شاهد ۱/۲ برابر است. این در حالی است که افزایش آستاگزانتین در این نمونه، نسبت به نمونه شاهد به اندازه ۱/۴ برابر بوده است. این نتایج نشان می دهد که افزایش تولید آستاگزانتین نسبت به افزایش تعداد سلول ها، بیشتر بوده است؛ لذا، می توان گفت در استفاده از اتانل به عنوان محرک تولید آستاگزانتین در صنعت، مشکل چندانی به لحاظ افزایش رشد سلولی و مشکل هوادهی وجود نخواهد داشت.

نتیجه گیری کلی

همان طور که نتایج نشان می دهد، اتانل اثر افزایشی بر تولید آستاگزانتین توسط کلرلا دارد. از آنجایی که تاکنون جاسمونات و متیل جاسمونات جهت افزایش تولید آستاگزانتین در ریزجلبک هماتوکوکوس بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است، می توان گفت استفاده از اتانل در جهت افزایش تولید آستاگزانتین، بسیار مقرون به صرفه تر می باشد؛ چرا که، هم ارزان تر و هم در دسترس تر از محرک های دیگر است. لذا می توان نتیجه گرفت که استفاده از اتانل به عنوان محرک تولید آستاگزانتین توسط ریز جلبک، در صنعت، بسیار مناسب و مقرون به صرفه است.

در مورد رشد سلولی هم نتایج نشان می دهد که اتانل در غلظت کمتر، باعث افزایش تعداد سلول ها می شود. لذا جهت افزایش بیومس سلولی کلرلا (برای مصارف خوراکی) می توان از اتانل استفاده کرد و سپس اتانل را با طریق تبخیر کاملاً از بیومس، حذف کرد. در مورد تولید کلروفیل، همان طور که مشاهده می شود به دلیل تغییر بسیار کم در حضور اتانل، می توان نتیجه گرفت که اتانل محرک مناسبی جهت افزایش تولید کلروفیل ها نخواهد بود.

منابع

- Chacón-Ordóñez, T., Schweiggert, R. M., Bosy-Westphal, A., Jiménez, V. M., Carle, R., & Esquivel, P. (2017) Carotenoids and carotenoid esters of orange- and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) fruit and their post-prandial absorption in humans. *Food Chemistry*, 221: 673-682.
- Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., & Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Journal of Food Science*, 67: 2589-2595.
- García-Camacho, F., Sánchez-Miron, A., Molina-Grima, E., Camacho-Rubio, F., & Merchuck, J. C. (2012) A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *J Theor Biol*, 304: 1-15.

- Green, B. R., & Durnford, D. G. (1996)The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 685-714.
- Greenberg, E., & Watras, C. (1989)Field evaluation of a micro-extraction technique for measuring chlorophyll in lakewater without filtration *Hydrobiologia*. *Hydrobiologia*, 173: 193-197.
- Li, Y., Xu, H., Han, F., Mu, J., Chen, D., Feng, B., & Zeng, H. (2015)Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy-photoinduction cultivation regime. *Bioresour Technol*, 192: 781-791.
- Luangpipat, T., & Chisti, Y. (2016)Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae - Effects of salinity and other factors. *Journal of biotechnology*, 257: 47-57.
- Meng, Z., Zhang, B., Liu, B., Li, H., Fan, S., & Yu, D. (2017)High carotenoids content can enhance resistance of selected *Pinctada fucata* families to high temperature stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 61: 211-218.
- Noroozi, M., Omar, H., Napis, S., Hejazi, M. A., & Tan, S. G. (2012)Comparative biodiversity and effect of different media on growth and astaxanthin content of nine geographical strains of *Haematococcus pluvialis*. *African Journal of Biotechnology*, 11: 15049-15059.
- Ren, L. J., Huang, H., Xiao, A. H., Lian, M., Jin, L. J., & Ji, X. J. (2009)Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32: 837-843.
- Rioboo, C., O'Connor, J. E., Prado, R., Herrero, C., & Cid, A. (2009)Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aquat Toxicol*, 94: 229-237.
- Stahl, W., & Sies, H. (2005)Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta*, 1740: 101-107.
- Takaichi, S. (2011)Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar Drugs*, 9: 1101-1118.
- Yu, X., Chen, L., & Zhang, W. (2015)Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Front Microbiol*, 6: 56.

Effect of ethanol on pigments production in *Chlorella sorociniana* in autotrophic condition**Z.Khalili¹, H.Jalili^{2*}, M. Noroozi³****Received: 2017.5.31****Accepted:2017.12.17****Abstract**

Chlorella is a unicellular green algae that produces the highest amount of chlorophyll among of organisms. Some of important metabolites in *chlorella* are astaxanthin, chlorophyll a and chlorophyll b. So far some of chemicals used as inducer for increasing algal metabolites which one of them is ethanol. Effect of ethanol on cell growth and lipid content of microalgae and plants has been studied. In this research, the effect of ethanol on astaxanthin, chlorophyll a and b production in *chlorella sorociniana* was investigated for the first time. The result of spectrophotometry showed that addition of 10 µl of ethanol (in 100 ml) will enhance the astaxanthin for 1.4 times. However, chlorophyll production changed a little in the presence of 100 µl of ethanol. According to regulatory role of phytohormones in microalgae, it can be conclude that ethanol acts as a signal and regulates some of metabolites production.

Keywords: astaxanthin, chlorophyll, ethanol, microalgae, spectrophotometry

1-Msc student, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

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

*(Corresponding Author: hjalili@ut.ac.ir)

3-Assistant Professor, Faculty of Biological Sciences, University of Alzahra, Tehran, Iran