

بررسی تولید پلیمرزیستی بتاکاروتن از جلبک دونالیلا سالینا در آب شور دریاچه ارومیه

حمیدرضا عظیمی*

گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

عزت اله اسفندیاری

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

اسماعیل کریمی

گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

سیما سروش، سیما ناظمی

گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

چکیده: به منظور بررسی تأثیر تیامین بر رشد و نمو و میزان تجمع بتاکاروتن در جلبک دونالیلا سالینا در محیط شور، محیط کشت جلبک با مقادیر بالای نمک دریاچه ارومیه (۲۰ درصد وزنی - حجمی) همراه با تیامین تهیه و اثرهای آن بر رشد جلبک مورد ارزیابی قرار گرفت. جلبک دونالیلا سالینا در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و شدت نور ۱۰۰ لوکس در شیکرانکوباتور، رشد داده شد. تیمارهای مورد مطالعه شامل محلول ۲ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه (شاهد)، محلول ۲۰ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه، محلول ۲۰ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه همراه ۲۵ میکرومولار تیامین بود. در این پژوهش برای تعیین اثر بخشی یا نبود اثر بخشی تیمارهای مورد مطالعه، پارامترهای شمارش سلولی، وزن خشک، میزان جذب شدت نور، میزان کلروفیل کل، کاروتنوئید کل، پروتئین و سرانجام کاروتن موجود در نمونه ارزیابی شد. به طور کلی می توان عنوان نمود که اگرچه جلبک دونالیلا سالینا مقاوم به شوری است ولی تنش شوری ۲۰ درصد (وزنی - حجمی) سبب کاهش تقسیم سلولی آن می شود که بیانگر اثرهای منفی آن بر متابولیسم سلول است. افزودن تیامین همراه با کاهش اثرهای منفی شوری بر متابولیسم، تجمع بتاکاروتن به عنوان پیش ساز بیوسنتز و تیامین آ را افزایش داده و می توان از این ویتامین برای افزایش تولید این ترکیب با استفاده از جلبک مورد مطالعه بهره برد.

کلمات کلیدی: بتاکاروتن، تنش شوری، تیامین، دونالیلا سالینا.

KEYWORDS: β -carotene - Salinity stress - Thiamine - *Dunaliella salina*.

مقدمه

دونالیلا سالیبا جلبکی تک سلولی و فتوسنتز کننده بوده و از توانایی بالایی در بیوسنتز بتا کاروتن برخوردار می‌باشد [۳-۱]. چنان چه در کشورهای استرالیا و آمریکا در مقیاس تجاری بتا کاروتن از این جلبک در حال تولید است [۸-۴]. همچنین، از این جلبک به عنوان منبع مناسب برای تولید گلیسرول استفاده می‌شود.

دونالیلا سالیبا جلبکی شور پسند بوده و توانایی زنده ماندن در مقدارهای بالای نمک (تا حدود ۲۰ درصد وزنی - حجمی) را دارد. بر مبنای گزارش‌های علمی اگرچه دونالیلا سالیبا متحمل به شوری می‌باشد ولی در همان حال مقدارهای بالای نمک با کاهش کارایی متابولیسمی بر رشد و نمو آن اثر منفی دارد [۹-۱۲]. در شرایط شور بیوسنتز ترکیب‌های مهمی مانند ویتامین‌ها و کوآنزیم‌ها مانند تیامین دچار افت شده و کمبود آن‌ها با اثری منفی بر فرآیندهای حیاتی کاهش تولید ماده خشک را در پی خواهد داشت [۱۵-۱۳]. تیامین یا ویتامین ب ۱، در واکنش‌های دکربوکسیلاسیون و ترانس ستولاسیون نقش بازی می‌نماید [۱۳]. دکربوکسیلاسیون در مسیرهای متابولیسمی مهمی مانند تبدیل پروات به استیل کوآنزیم آ و چرخه کربس نقش بازی می‌کند که با کاهش بیوسنتز تیامین، تولید انرژی و سوبسترای اولیه برای بیوسنتز سایر متابولیت‌ها دچار افت شده سرانجام به شکل کاهش تعداد سلول و ماده خشک ظهور می‌یابد. امروزه نقش آنتی اکسیدانی تیامین در افزایش به تحمل تنش‌های محیطی اثبات شده است [۱۵] از این رو این ماده می‌تواند با دخالت در مسیر متابولیسمی، تولید برخی از رنگرزه‌ها را که در تحمل به تنش‌های محیطی نقش دارند بهبود بخشد.

ویتامین آ از ریزمغذی‌های مورد نیاز بدن است که کمبود آن در کشورهای در حال توسعه مانند ایران بیش از میانگین جهانی است. کمبود ویتامین آ سبب اختلال در بینایی، ضعف سیستم ایمنی بدن و افزایش دچار شدن به بیماری‌های عفونی می‌شود. پیش‌ساز ویتامین آ، پلیمر زیستی بتا کاروتن است که جزو کاروتنوئیدها بوده و در کلروپلاست گیاهان، جلبک‌ها و سیانوباکترها حضور دارد [۱۹-۱۶]. از سوی کاروتنوئیدها در صنایع دارویی، آرایشی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بتا کاروتن نوعی کاروتنوئید است که در جلبک دونالیلا سالیبا در شرایط شور بیوسنتز آن افزایش چشمگیری پیدا می‌کند [۲۲-۲۰]. استفاده از تیمارهایی که بتواند سامانه فیزیولوژیکی و مسیرهای متابولیسمی را هدف قرار دهد یکی از روش‌های بهبود افزایش بیوسنتز متابولیت‌ها در جلبک‌ها است. بنابراین با توجه به نقش تیامین در تولید سوبسترای اولیه برای بیوسنتز واحدهای سازنده ترین‌ها که بتا کاروتن را نیز شامل می‌شود، با هدف بررسی امکان افزایش بیوسنتز ترین‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

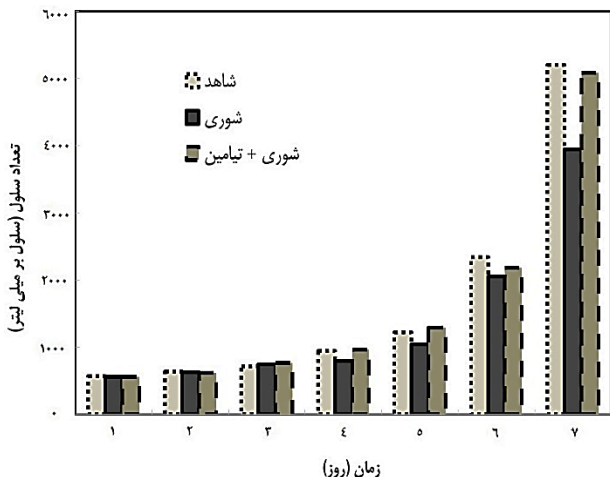
بخش تجربی

جلبک دونالیلا سالیبا در محیط کشت استریل جانسون با اسیدیته ۵/۷ برای تکثیر واکشت شده و در شرایط مناسب محیطی با شدت نور ۱۰۰ لوکس بر متر مربع با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت در ۲۴ ساعت، دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس در روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه تا رسیدن به غلظت مورد نظر نگهداری شدند. در طول دوره رشد جلبک، محلول به‌طور پیوسته هوادهی شده و برای تأمین کربن دی‌اکسید لازم برای اجرای چرخه کالوین هر روز با اسپری (هر اسپری به مدت ۴ ثانیه) این گاز با کپسول محتوی کربن دی‌اکسید بهره گرفته شد [۱۵]. پس از رشد بهینه سلول‌ها، ۱۰۰ میلی لیتر از این سلول‌ها برداشت شده و به محیط کشت‌هایی استریل که شامل تنش شوری ۲ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه (شاهد)، محلول ۲۰ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه و محلول ۲۰ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه به همراه ۲۵ میکرومولار تیامین بودند تلقیح شده و همانند شرایط بالا در شرایط مناسب نگهداری شدند. همه تیمارها در سه تکرار انجام شده و تیمار ۲ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه به عنوان شاهد به کار گرفته شد. در طول آزمایش برای تعیین جمعیت جلبک موجود در حجم مشخص، استفاده شد. پس از رشد نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز در شرایط تیمارهای یاد شده هر دو روز یک‌بار پارامترهای شمارش سلولی با استفاده از لام هماسی‌تومتر، اندازه‌گیری میزان جذب دانسیته نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر، وزن خشک توده زیستی با ترازوی دقیق، میزان رنگرزه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئیدها) با اسپکتروفتومتر، پروتئین محلول کل به روش بردفورد اندازه‌گیری شد.

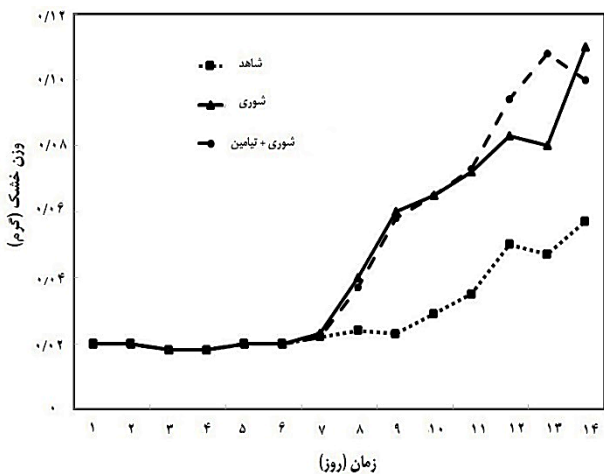
نتیجه‌ها و بحث

تعداد سلول جلبک دونالیلا سالیبا

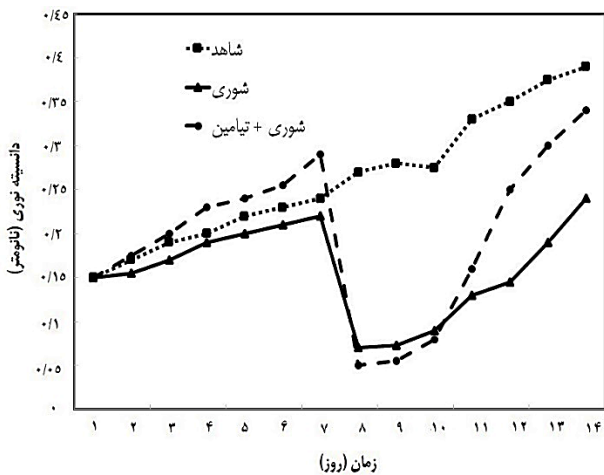
نتیجه‌های روند تغییرهای تعداد سلول در میلی لیتر محلول کشت نشان داد که با گذشت زمان تقسیم سلولی در هر سه تیمار مورد مطالعه در جلبک دونالیلا سالیبا ادامه یافته است. ولی در مقایسه با شاهد با افزودن نمک به میزان ۲۰ درصد به محلول کشت از سرعت تقسیم سلولی کاسته است. در حالی که با افزودن تیامین به محیط کشت شور، سرعت تقسیم سلولی در مقایسه با تیمار شوری افزایش یافته و با شاهد برابری می‌نماید (شکل ۱). تقسیم سلولی با سرعت مناسب زمانی اتفاق می‌افتد که ترکیب‌های مورد نیاز برای رشد سلول و سپس تقسیم آن، از کربن دی‌اکسید با مقدار مناسب و



شکل ۱- مقایسه سه نمودار میانگین تعداد سلول در استرس شوری



شکل ۲- مقایسه سه نمودار میانگین وزن خشک در استرس شوری



شکل ۳- مقایسه سه نمودار تغییر جذب نور در استرس شوری

کافی طی فرایندهای حیاتی سلول صورت گیرد. در شرایط دلخواه محیطی (شاهد) رشد سلول و تقسیم آن با سرعت خوبی ادامه می‌یابد، ولی وقتی که در شرایط شوری قرار می‌گیرد به دلیل کاهش حجم تولید ترکیب‌های مورد نیاز برای رشد سلول افت یافته و در اثر آن تقسیم سلولی کاهش می‌یابد (شکل ۱). با توجه به نقش فیزیولوژیک تیامین در فرایندهای حیاتی سلول، سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا را قادر می‌سازد تا تولید بیومولکول‌هایی مانند کربوهیدرات‌ها را افزایش داده و به سطح شاهد برساند.

طی مطالعه‌ای که بر روی جلبک دونالیلا سالینا جدا شده از دریاچه مهارلو شیراز در غلظت‌های متفاوتی از شوری (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴/۵ مولار سدیم کلرید) انجام شده است، بیش‌ترین رشد جلبک در شوری ۲ مولار رخ داد و با افزایش میزان شوری رشد آن‌ها کاهش پیدا می‌کند [۲۳].

وزن خشک

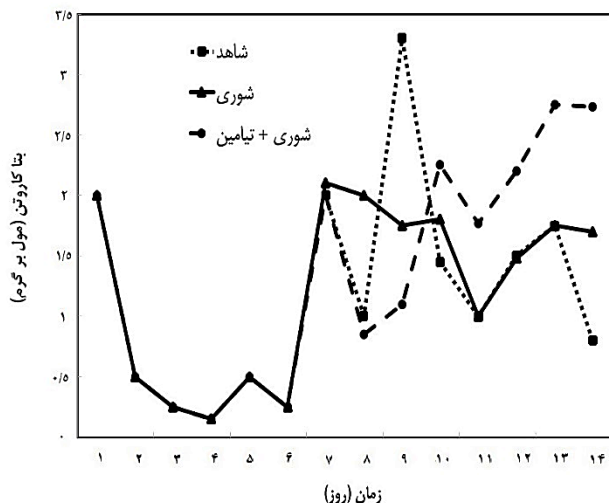
نتیجه‌های به دست آمده از روند تغییرهای وزن خشک نشان داد که با اعمال تنش شوری از روز هفتم، بین آن‌ها از نظر وزن خشک تولید شده توسط سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا تفاوت دیده شد و با گذشت زمان این اختلاف بیش‌تر شد. در بین تیمارهای مورد مطالعه همواره کم‌ترین میزان وزن خشک تولید شده به تیمار شاهد و بیش‌ترین میزان آن به تیمارهای شوری و شوری هم‌چنین تیامین تعلق داشت. به طوری که در مرحله نمونه برداری روز ۱۴م وزن خشک تولید شده در تیمارهای یاد شده در مقایسه با شاهد دوبرابر بود (شکل ۲).

میزان جذب شدت نور

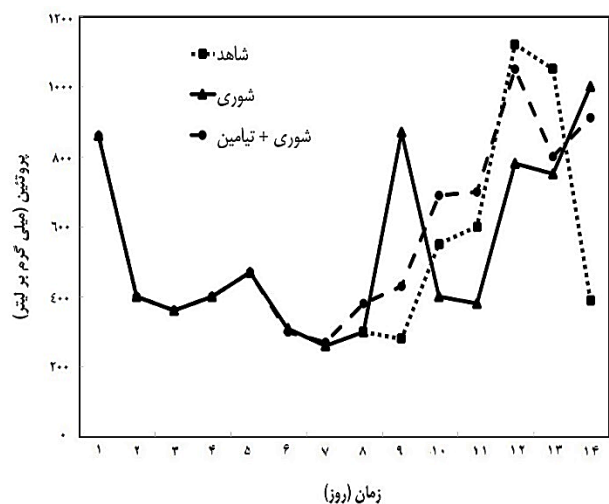
همان‌طوری که شکل ۳ میزان جذب دانسیته نوری که معیاری از رشد سلول‌ها است را نشان می‌دهد، کمترین میزان جذب نور به تیمار شوری و شوری به‌همراه تیامین تعلق داشت که به دلیل نمک دریاچه ارومیه بعد از اعمال تیمار در روز هشتم کاهش داشته و پس از آن باز افزایش یافته است و بیش‌ترین میزان جذب به تیمار شاهد تعلق دارد. به طوری که در تیمارهای شوری و شوری به‌همراه تیامین میزان جذب پس از اعمال استرس در روز هفتم تا روز دهم همواره روندی یکسان، از روز دهم به بعد تیمار شوری به همراه تیامین در مقایسه با تیمار شوری بیش‌تر بوده است. کوارسما^۱ و همکاران [۲۴] و حجازی و همکاران [۲۵] افزایش جذب شدت نور را در اثر افزایش شوری به‌ترتیب در جلبک‌های سندموس و دونالیلا سالینا گزارش کرده‌اند که به‌نوعی نتیجه‌های این پژوهش را تأیید می‌نماید.

(۱) Cuaresma

آنالیز بتاکاروتن



شکل ۴- مقایسه نمودارهای آنالیز بتاکاروتن شاهد، شوری و شوری+تیامین در استرس شوری



شکل ۵- مقایسه نمودارهای آنالیز پروتئین شاهد، شوری و شوری+تیامین در استرس شوری

سبب کاهش تقسیم سلولی آن می شود که بیانگر اثرهای منفی آن بر متابولیسم سلول است. افزودن تیامین ضمن کاهش اثرهای منفی شوری بر متابولیسم، تجمع بتاکاروتن به عنوان پیش ساز بیوستنز ویتامین آ را افزایش داده و می توان از این ویتامین برای افزایش تولید این ترکیب با استفاده از جلبک مورد مطالعه بهره برد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۵

همانطوری که نمودارهای آنالیز بتاکاروتن شاهد، شوری، شوری به همراه تیامین در طی ۱۴ روز نشان می دهد روند تغییر بتاکاروتن تا روز ۷ در تیمارهای مورد مطالعه یکسان بوده است. ولی پس از اعمال تیمارها تفاوت دیده شد و با گذشت زمان این اختلاف بیش تر شد (شکل ۴). به طوری که در تنش شوری ۲۰ درصد (وزنی - حجمی) نمک دریاچه ارومیه به همراه ۲۵ میکرومولار تیامین بیش ترین میزان تجمع بتاکاروتن بدست آمد. در بین تیمارهای مورد مطالعه کم ترین میزان بتاکاروتن به تیمار شاهد تعلق داشت و در روز ۱۴م میزان بتاکاروتن در تیمار شوری به همراه تیامین دو برابر شاهد بود. فتحی و همکاران در شوری به دست آمده از ۱۰، ۳۰ و ۵۰ گرم بر لیتر سدیم کلرید در میکروجلبک کلرلا گزارش کردند که بیش ترین میزان بتاکاروتن در شوری ۵۰ گرم بر لیتر به دست آمد که تأییدی بر نتیجه های این یافته است.

آنالیز پروتئین

نمودار تغییر پروتئین نشان داد که از روز هفتم به بعد میزان پروتئین در هر سه تیمار مورد بررسی افزایش داشته است. اگرچه روند تغییر پروتئین یکنواخت نیست اما، این افزایش می تواند ناشی از افزایش تعداد سلول و ماده خشک در اثر گذر زمان باشد (شکل ۵). لازم به ذکر است که تغییرات میزان پروتئین با نتیجه های حاصل از میزان جذب دانسیته نوری تطابق دارد. کیرولیا^۱ و همکاران [۲۶] گزارش کردند که میزان پروتئین جلبک سندسموس در مقدارهای پائین شوری پائین بوده و با افزایش شوری بر میزان پروتئین آن افزوده شد.

همچنین، مشخص شده است که بیان کردند که در شدت بالای شوری بیان برخی از آنزیم های سازگار کننده به شوری در جلبک دونالیا سالینا افزایش می یابد که می تواند دلیل افزایش میزان پروتئین در شدت های بالای شوری باشد [۲۷]. گزارش های این پژوهشگران با نتیجه های به دست آمده از این پژوهش همخوانی دارد.

نتیجه گیری

اگرچه این مطالعه در حجم کوچک صورت گرفته است و برای نهایی نمودن نتیجه های آن مطالعه های بیش تر و کامل تری نیاز است. ولی، به طور کلی می توان عنوان نمود که اگرچه جلبک دونالیا سالینا مقاوم به شوری است ولی تنش شوری ۲۰ درصد (وزنی - حجمی)

مراجع

- [1] Bellamy C., "Strategy for Improved Nutrition of Children and Women in Developing Countries, United Nations Children's Fund", UNICEF (1990).
- [2] Chidambara Murthy K.N., "Production of β -Carotene from Cultured *Dunaliella* Sp. and Evaluation of Biological Activities", India (2005).
- [3] Murthy K.N., Rajesha J., Vanitha A., Sowmya P.R., Mathadera Swamy, M., Ravishankar, G.A., In-Vivo Antioxidant Activity of Carotenoids from *Dunaliella Salina*-A Green Microalgae, *Life Sci.* **76** (12): 81-90 (2005).
- [4] Tafreshi A. H., Shariati M., Pilot Culture of Three Strains of *Dunaliella Salina* for β -Carotene Production in Open Ponds in the Central Region of Iran, *World. J. Biol.Psychiatry.* (22(9): 1003-1006 (2006).).
- [5] Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M., The Biotechnology of Cultivating *Dunaliella* for Production of β -Carotene Rich Algae, *Bioresour Technol*, **38**(2-3): 233-235 (1991).
- [6] Hejazi M.A., Wiiffels R.H., Effect of Light Intensity on β -Carotene Production and Extraction by *Dunaliella Salina* in Two-Phase Bioreactors, *Biomol. Eng.* **20** (4-6): 171-175 (2003).
- [7] Borowitzka L., Development of Western Biotechnology's Algal β -Carotene Plant, *Bioresour. Technol.* **38**(2-3): 251-252 (1991).
- [8] Ben-Amotz A., New Mode of *Dunaliella* Biotechnology: Two-Phase Growth for β -Carotene Production, *J. Appl. Phycol.* **7**(1): 65-8 (1995).
- [9] Gonzalez M.J., Moreno J., Monzano J.C., Florencio F.J., Guerrero M.G., Production of *Dunaliella Salina* Biomass Rich in 9-Cis- Beta-Carotene and Lutein in a Closed Tubular Photo Bioreactor, *J. Biotech.* **115**(1): 81-90 (2005).).
- [۱۰] یوسفی، م؛ "تالوفیتها"، انتشارات دانشگاه پیام نور، ۲۷۹ (۱۳۸۲).
- [11] Frank H.A, Cogdell R.J., Carotenoids in Photosynthesis, *Photochem. Photobiol.* **63**: 257-64 (1996).
- [12] Campo J., García-González M., Guerrero M., Outdoor Cultivation of Microalgae for Carotenoid Production: Current State and Perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:1163-1174 (2007).
- [13] Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P., Functional Properties of Carotenoids Originating from Algae, *J. Sci. Food. Agric*, **93**:5-11 (2013).
- [14] Yuan J.P., Peng J., Yin K., Wang J.H., Potential Health-Promoting Effects of Astaxanthin: A High-Value Carotenoid Mostly from Microalgae, *Mol. Nutr. Food. Res.* **55**:150-165 2011).).
- [۱۵] اسفندیاری، ع؛ محبوب، س؛ "بیوشیمی گیاهی" (جلد دوم)، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، ۳۲۲ (۱۳۹۳).
- [16] Eijckelhoff C., Dekker J.P., Determination of the Pigment Stoichiometry of the Photochemical Reaction Center of Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta.* **1231**(1): 21-28 (1995).).

- [17] Alan R., [The Spectral Determination of Chlorophyll a and b, as well as Total Carotenoids, using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution](#), *Plant. Physiol.* **144**: 307-313 (1994).
- [18] Eijckelhoff C., Dekker J.P., [A Routine Method to Determine the Chlorophyll a, Pheophytin a and \$\beta\$ -Carotene Contents of Isolated Photosystem II Reaction Center Complexes](#), *Photosynth. Res.* **52(1)**: 69-73 (1997).
- [19] Hartmut K., [Determinations of total Carotenoids and Chlorophylls b of Leaf Extracts in Different Solvents](#). *Analysis*, **4**: 142-196 (1983).
- [20] López C.V.G., García. [Protein Measurements of Microalgal and Cyanobacterial Biomass](#), *Bioresour. Technol.* **101(19)**: 7587-7591(2010).
- [21] Finn B., Harvey L.M., McNeil B., [Near-Infrared Spectroscopic Monitoring of Biomass, Glucose, Ethanol and Protein Content in a High Cell Density Baker's Yeast Fed-Batch Bioprocess](#), *Yeast.* **23(7)**: 507-517 (2006).
- [22] Waterborg J.H., [The Lowry Method for Protein Quantitation](#), "The Protein Protocols Handbook", Springer. (2009).
- [23] Nikokar K., Moradshahi A., Kharati M., [Influence of Salinity on the Growth, Pigmentation and Ascorbate Peroxidase Activity Dunaliella Salina Isolated from Maharlu Salt Lake in Shiraz, Iran](#). *J. Sci. Technol. Trans. A. Sci.* **28**: 117-125(2004).
- [24] Cuaresma M., Casal Ca., [Productivity and Selective Accumulation of Carotenoids of the Novel Extremophile Microalga Chlamydomonas Acidophila Grown with Different Carbon Sources in Batch Systems](#), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38(1)**: 167-177 (2011).
- [25] Hejazi M., Holwerda E., Wijffels R., [Milking Microalga Dunaliella Salina for \$\beta\$ -Carotene Production in Two-Phase Bioreactors](#), *Biotechnol. Bioeng.* **85(5)**: 475-481(2004).
- [26] Kirrolia A., Bishnoi N. R., Singh N., [Salinity as a Factor Affecting the Physiological and Biochemical Traits of Scenedesmus Quadricauda](#), *J. Algal. Biomass. Utiln.* **2**: 28-34 (2011).
- [27] Chen H., Jiang J., [Osmotic Responses of Dunaliella to the Changes of Salinity](#), *J. Cell. Physiol.* **219**: 251-258 (2009).