Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۰، جلد ۳، شماره ۳، تابستان ۸۹، صفحه ۸۱ تا صفحه ۸۴

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف آهن و فسفات بر تولید ویتامین E در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella tertiolecta*

سارا سعادتمند[۱]، لیلا خسروی[۲]، حمید فهیمی[۳]

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. s_saadatmand@yahoo.com
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۶

چکیده

در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف آهن (٦٤٤ و ٤٤٤، (شاهد) ٢٤٤ ، ١٤٤، ٠گرم در لیتر) و فسفات (۰/۱ و ۰/۰۷۵ ، ۰/۰۳۵ (شاهد) ، ۰/۰۱۵ و ۰ گرم در لیتر) بر تولید ویتامین E در جلبک سبز تک سلولی *D.tertiolecta* در طی یک دوره ٤٥ روزه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در غلظت ٦٤٤ گرم در لیتر آهن در مقایسه با شاهد (٢٤٤ گرم در لیتر) میزان ویتامین E افزایش می‌یابد و در غلظت صفر گرم در لیتر آهن میزان ویتامین E به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. هم چنین مشاهده گردید در غلظت ۰/۱ گرم در لیتر فسفات در مقایسه با شاهد (۰/۰۳۵ گرم در لیتر) میزان ویتامین E افزایش و در غلظت صفر گرم در لیتر فسفات میزان ویتامین E کاهش می‌یابد.

کلید واژه: *Dunaliella tertiolecta*، آهن، فسفات، ویتامین E.

مقدمه

دونالیه لا جلبک سبز تک سلولی متعلق به خانوادهٔ پلی بلفاریداسه (Polyblepharidaceae) از شاخهٔ کلروفیتا (Chlorophyta) و راستهٔ ولوکال‌ها (Volvocales) می‌باشد که فاقد دیوارهٔ سلولی بوده و قدرت تحمل زیادی نسبت به شدت نور بالا دارد(۵). میزان تحمل این جنس نسبت به شوری بالای آب متفاوت بوده، برخی از گونه‌ها در آب دریا با شوری ۴ مول و برخی دیگر در شوری‌های اشباع قدرت بقا دارند. بردباری به تنش شوری در گیاهان با افزایش میزان آنزیم‌ها و سوبستراهای آنتی اکسیدان ارتباط مستقیم دارد. در *Dunaliella tertiolecta* افزایش شوری سبب کاهش رشد و افزایش فعالیت آنزیم مونوهیدروآسکوربات ردوکتاز می‌شود که این امر سبب افزایش تنفس تاریکی می‌گردد (۴). به عکس در شوری‌های پایین سلول‌ها در مقادیر گلوتاتیون و آلفا توکوفرول افزایش و در میزان آ سکوربات کاهش نشان می‌دهند(۴). توکوفرول‌ها آنتی اکسیدان‌هایی هستند که از زیان‌های ناشی از تنش‌های اکسیداتیو ممانعت می‌نمایند. توکوکرومانال‌ها شامل چهار ایزوفرم از توکوفرول‌ها و چهار ایزوفرم از توکوترینول‌ها می‌باشند که از این میان آلفا توکوفرول فراوان‌ترین و فعال‌ترین ایزوفرم در بافت‌های جانوری است. توکوفرول‌ها در رژیم غذایی انسان به عنوان مکمل غذایی و نگهدارنده کاربرد دارند. تنها سلول‌های فتوسنتز کننده قادرند مقادیر قابل توجهی توکوفرول تولید نمایند(۸). در بین جلبک‌هایی که تاکنون

www.SID.ir

Archive of SID

مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، *Dunaliella tertiolecta* قادر است مقادیر قابل توجهی توکوفرول تولید نماید. در این تحقیق تاثیر غلظت‌های مختلف آهن و فسفات بر میزان تولید ویتامین E (آلفا توکوفرول) در این جلبک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و کشت جلبک

جلبک *D.tertiolect* از دریاچه ارومیه منطقه جبل جمع آوری شد و در محیط کشت ASW ۱/۲ کشت و تخلیص گردید(۳). یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبکی از جلبک‌های خالص شده به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع استریل انتقال داده شد. سپس در هر فلاسک به طور مجزا تیمارهای ۶۴۴ و ۴۴۴، (شاهد) ۲۴۴، ۱۴۴، ۰گرم در لیتر آهن کلاته به صورت $FeCl_3(6H2O)/EDTA$ و ۰/۱ و ۰/۰۷۵، ۰/۰۳۵ (شاهد) ، ۰/۰۱۵ و ۰ گرم در لیتر فسفات اعمال گردید. نمونه‌های جلبکی در pH برابر ۷/۵ و در میزان روشنایی ۲۵۰ کوانتوم در متر مربع در ثانیه با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی که توسط لامپ فلورسنت ایجاد شده بود و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای جبران آب تبخیر شده هر سه روز مقداری محیط کشت به محیط اضافه گردید. هم چنین از پمپ هوا جهت تهویه هوا و افزایش میزان رشد جلبک استفاده شد. تاثیر غلظت‌های مختلف بر تعداد سلول و رشد آن هر ۵ روز یک بار با شمارش تعداد جلبک توسط لام هماسیتومتر تا روز ۴۵ بررسی گردید.

استخراج و اندازه‌گیری ویتامین E

جهت بررسی تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان ویتامین E در روزهای ۵ ، ۱۵ و ۲۵ بعد از تلقیح، نمونه‌برداری انجام شد. ۱۰ میلی لیترسوسپانسیون جلبکی سانتریفوژ گردید و سپس با ۰/۵ میلی‌لیتر استات آمونیم ۵٪ برای از بین بردن نمک‌ها شستشو داده و از فیلترهای شیشه‌ای که از قبل خشک شده و وزن‌گیری شده بودند عبور داده شد و مجدداً سانتریفوژ گردید. رسوب جلبکی در ۵٪w/v پیروگالول متانول هموژنیزه شد. بعد از صابون‌سازی (مخلوط با سود یا پتاس) نیم ساعت در اتانول رفلاکس گردید. سپس به آن اترپترولیوم و اتردی ایزوپروپیل اضافه و فاز آلی و معدنی با قیف جداکننده جدا گردید، سپس ماده شناور رویی مجدداً سانتریفوژ گشت. رسوب حاصل در حجم کمی از متانول مجدداً حل شده و به ستون HPLC تزریق گردید(۱).

نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان ویتامین E در روزهای ۵، ۱۵ و ۲۵ بعد از تلقیح تحت تیمارهای مختلف آهن نشان می‌دهد که در پنجمین روز تیماردهی میزان ویتامین E در غلظت ۶۴۴ گرم در لیتر در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها افزایش معنی‌داری در سطح خطای ۵٪ یافته است. در پانزدهمین روز پس از تیماردهی، میزان ویتامین E در غلظت‌های آهن صفر و ۱۴۴ گرم در لیتر کاهش معنی‌داری نسبت به‌شاهد ($۲۴۴gl^{-1}$) داشته ودر غلظت ۶۴۴ گرم در لیتر آهن افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد یافته است.در بیست و پنجمین روز پس از تیماردهی با آهن میزان ویتامین E در غلظت‌های ۴۴۴ و ۶۴۴ گرم در لیتر افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد یافته است.نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان ویتامین E در روزهای ۵، ۱۵ و ۲۵ بعد از تلقیح تحت تیمارهای‌مختلف فسفات نشان می‌دهد که در پنجمین روز تیماردهی میزان ویتامین E در تیمارهای مختلف فسفات تغییر معنی‌داری نیافته است. در پانزدهمین روز پس از تیماردهی‌میزان ویتامین E با افزایش میزان فسفات افزایش یافته و در غلظت ۰/۱ گرم در لیتر فسفات میزان ویتامین E به بیشترین میزان خود رسیده است.در بیست و پنجمین‌روز پس ازتیماردهی با غلظت‌های مختلف‌فسفات‌مشاهده گردید که افزایش میزان فسفات‌سبب افزایش‌میزان ویتامین E در سلول می‌گردد به طوری که در غلظت ۶۴۴ گرم در لیتر فسفات بیشترین میزان ویتامین E در سلول تولیدمی‌گردد (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف آهن و فسفات بر میزان ویتامین E در روز های مختلف بعد از تلقیح

غلظت / روز		۵	۱۵	۲۵
آهن	شاهد	۰/۴۵±۰/۰۵	۰/۷۸±۰/۰۴	۰/۸۶±۰/۰۱
	۰	۰/۴۳±۰/۰۴	۰/۵۶±۰/۰۱	۰/۶۴±۰/۰۱
	۱٤٤	۰/۴۲±۰/۰۴	۰/۶۸±۰/۰۴	۰/۷۵±۰/۰۱
	٤٤٤	۰/۴۸±۰/۰۳	۰/۷۶±۰/۰۴	۱/۷۵±۰/۰۲
	٦٤٤	۰/۵۶±۰/۰۵	۰/۷۸±۰/۰۳	۲/۳۳±۰/۰۸
فسفات	شاهد	۰/۵۷±۰/۰۴	۰/۷۸±۰/۰۱	۰/۷۸±۰/۰۱
	۰	۰/۳۹±۰/۰۴	۰/۵۸±۰/۰۱	۰/۷۵±۰/۰۰۹
	۱٤٤	۰/۵۵±۰/۰۲	۰/۸۷±۰/۰۲	۱/۹۸±۰/۰۷
	٤٤٤	۰/۳۸±۰/۰۴	۰/۹۵±۰/۰۱	۲/۱۹±۰/۰۵
	٦٤٤	۰/۴۱±۰/۰۳	۱/۴۷±۰/۰۷	۲/۱۱±۰/۰۸

بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از تیمارهای مختلف فسفات در محیط کشت *Dunaliella tertiolecta* نشان داد که این آنیون بر تولید ویتامین E در جلبک تاثیرگذار بوده و افزایش غلظت فسفات در محیط کشت سبب افزایش میزان آلفا توکوفرول می‌گردد. در بررسی‌هایی که توسط Weiss و همکاران در سال ۲۰۰۱ در ارتباط با جذب سولفات‌ها و فسفات‌ها در جلبک *Dunaliella salina* صورت گرفت مشاهده گردید که جذب Pi با استاکیومتری درون تراوش یون‌های سدیم به نسبت $1Na^{+}/1Pi$ در ارتباط می‌باشد و یونوفورهای Na^{+} و بازدارندگان برون تراوش آن از تجمع Pi در درون سلول ممانعت می‌نمایند (۹). از طرفی کاهش میزان Pi در محیط رشد جلبک سبب افزایش در جذب سدیم و فسفات می‌گردد. بنابر نتایج به دست آمده و بررسی‌های صورت گرفته در ارتباط با Vmax و Km مربوط به این دو یون وجود یک سیم پورتر برای جذب سدیم و فسفات به اثبات رسیده است. در دریاچه‌های با شوری بالا افزایش تولید آلفا توکوفرول توسط جلبک *Dunaliella tertiolecta* مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد جذب بالای سدیم سبب افزایش درون تراوش فسفات و افزایش تولید ویتامین E می‌گردد. این یافته‌ها با نتایج ما در ارتباط با تاثیر افزایش میزان فسفات بر افزایش تولید ویتامین E در جلبک *Dunaliella tertiolecta* مطابقت دارد. نتایج مربوط به تاثیر غلظت‌های مختلف آهن در تولید ویتامین E در جلبک *Dunaliella tertiolecta* نشان داد که افزایش غلظت آهن در اولین روزهای بعد از کشت تاثیری در میزان آلفاتوکوفرول ندارد اما پس از گذشت دو تا سه هفته سبب افزایش معنی‌داری در میزان آلفاتوکوفرول می‌گردد. آهن فراوان‌ترین فلز قابل انتقال در زمین است و یک عنصر ضروری در بسیاری از فعل و انفعالات متابولیسمی دستگاه فتوسنتزی موجودات فتوسنتز کننده می‌باشد(۷). علی‌رغم فراوانی آهن در سطح صخره‌ها، غلظت آهن در اقیانوس‌های دنیا کم

www.SID.ir

Archive of SID

بوده و همیشه کمبود آهن یک عامل محدود کننده برای فیتوپلانکتون‌ها می‌باشد(۶).

Greene و همکاران در سال ۱۹۹۲ در بررسی‌هایی که بر روی *Dunaliella tertiolecta* انجام دادند مشاهده نمودند که کمبود آهن میزان کارایی تولید انرژی در فتوسیستم II را کاهش می‌دهد و مانع تحریک الکترون و انتقال آن به کمپلکس جمع کننده نور (LHCII) می‌گردد (۲). کاهش کارایی انتقال الکترون و به دنبال آن کاهش فتوسنتز سبب کاهش تولیدات گیاهی از جمله متابولیت‌های اولیه و ثانویه می‌گردد. بنابر افزایش میزان آلفا توکوفرول بدنبال افزایش آهن که در بخش نتایج این تحقیق مطرح گردیده با یافته‌های به دست آمده ازپژوهش‌های قبلی هم راستا می‌باشد.

منابع

1. Carballo- Cardenas, E. C., Tuan ,P.M., Janssen, M., Wijffels, R.H.(2003). Vitamin E (β-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. Marine Biotechnology: Basic and Applications, 20; 139 147.

2.Greene, R.M., Geider, R.J., Kolber, Z., Falkowski, P.G.(1992). Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eukaryotic marine algae. Plant Physiol, 100; 565-575.

3. Guillard ,R.R.L., Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can J Microbiol, 8; 229-239.

4. Leland, S., Jahnke , A.L. W.(2003). Long term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. Journal of Plant Physiology, 160; 1193-1202.

5. Leoblich, L.A. (1969). Aplanospores of *Dunaliella salina* (Chlorophyta). J Protozool, 22-23.

6. Martin, J.H.(1992). Iron as a limiting factor in oceanic productivity. In P Fakowiski, A Woodhead, eds, Primary Productivity and Biogeochemmical Cycles in the Sea. Plenum Press, New York, 123-137.

7. Raven, J.A. (1990). Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathways. New Phytol,116; 1-18.

8. Ogbonna, C. J.(2009). Microbial production of tocopherols: current state and prospects. Applied Microbiology and biotechnology, 10; 217-225.

9. Weiss, M., Haimovich, G., Pick, U. (2001). Phosphate and sulfate uptake in the halotolerant alga *Dunaliella* are driven by Na+- symport mechanism. Journal of plant physiology, 158; 1519 1525.

www.SID.ir