خالص سازی و شناسایی نسبی پیگمان کاروتنوئیدی *Haloarcula* sp. IRU1 آرکی بسیار نمک دوست جدا شده از دریاچهٔ نمک ارومیه

عزت عسگرانی[۱،*]، نسیم صفری[۱] و داود زارع[۲]

[۱] **تهران، دانشگاه الزهرا(س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۲] **تهران، پژوهشگاه عصر انقلاب، پژوهشکده بیوتکنولوژی**

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۵

چکیده

یک سویهٔ آرکیایی بسیار نمک دوست و مقاوم به پرتوهای پونیزه کننده گاما و نور فرابنفش به نام *Haloarcula* sp. IRU1 که از آب دریاچهٔ ارومیه جداسازی شده قادر به تولید رنگیزه های کاروتنوئیدی است. در این تحقیق، ابتدا به منظور استخراج کاروتنوئیدها، پس از امتحان روشهای متداول و استفاده از حلالهای مختلف در نهایت، شکستن سلول به کمک پودر شیشه نسبتاً نرم و استفاده از حلالهای استون و هگزان به عنوان بهترین روش انتخاب گردید. سپس جداسازی پیگمانها به روش کروماتوگرافی با لایه نازک انجام شد. بدین منظور، حلالهای مختلف با نسبتهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و بهترین الگوی جداسازی، با استفاده از حلالهای استون و پترولئوم اتر و به ترتیب با نسبت ۳۵ : ۶۵ به دست آمد. در این حالت شش باند مختلف بر روی پلیت TLC مشاهده شد که بزرگترین و قوی ترین باند در قسمت پایین و با کمترین مقدار RF بود. همچنین در این مرحله، از تعدادی استاندارد کاروتنوئیدی برای شناسایی مقدماتی پیگمانها استفاده گردید. بزرگترین باند مشاهده شده بر روی صفحه TLC (۷۰ درصد، Rf-value: ۰/۱۷) به عنوان پیگمان اصلی در این باکتری در نظر گرفته شد. سپس جذب نوری پیگمان اصلی در ناحیه طول موجهای ۶۰۰-۳۰۰ نانومتر اندازه گیری شد که طیف حاصله و نقاط ماکزیمم به دست آمده نشان دهنده شباهت ساختمانی این کاروتنویید با باکتیوروبرین است. نتایج FT-IR کاروتنوئید اصلی نیز شباهت زیادی بین پیگمان کاروتنوئیدی اصلی *Haloarcula* sp. IRU1 و باکتیوروبرین که دارای ۱۳ پیوند دوگانه کانجوگه و چهار گروه هیدروکسیل نوع سوم است، را نشان می دهد. البته در طیف FT-IR کاروتنوئید این آرکی علاوه بر مشاهده کششهای مربوط به پیوندهای C-O و O-H در طیف حاصل که به خوبی قابل تشخیص می‌باشد، کشش نسبتاً ضعیفی نیز مربوط به گروه کتونی نیز قابل مشاهده است. از طرف دیگر، نتایج اسپکتروفتومتری جرمی وزن مولکولی ۷۸۳ را برای این پیگمان نشان می دهد که ۴۳ دالتون با وزن مولکولی باکتیوروبرین اختلاف دارد. بر طبق اطلاعات به دست آمده از طیف H-NMR، علاوه بر مشخصه‌های ساختار کاروتنوئید باکتیوروبرین، می‌توان حضور یک گروه متیل کتون را نیز در ساختار این کاروتنوئید مورد توجه قرار داد. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده از طیف سنجیهای انجام شده برای شناسایی پیگمان اصلی در این باکتری پیشنهاد می شود کاروتنوئید اصلی این آرکیهالوفیل نیز مانند سایر باکتریهای اکستریم هالوفیل، کاروتنوئید باکتیوروبرین می‌باشد که در این‌جا به صورت استری شده با گروه استات وجود دارد.

واژه های کلیدی: *Haloarcula* sp. IRU1، کاروتنوئید، TLC، جذب نوری، FT-IR، اسپکتروفتومتری جرمی، H-NMR، دریاچه نمک ارومیه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۰۴۴۰۵۵ ، پست الکترونیکی: asgarani@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کاروتنوئیدها رنگیزه های ایزوپرونوئیدی محلول در چربی می‌باشند و در طبیعت به وفور یافت می‌شوند. این ترکیبات عامل رنگهای سبز، زرد، قرمز و نارنجی در برگهای گیاهان، میوه‌ها، گلها و حیوانات مانند پرندگان، حشرات، ماهیها وسخت‌پوستان می باشند (۵). کاروتنوئیدها رنگدانه‌هایی هستند که معمولاً در گیاهان، جلبکها و باکتریهای فتوسنتتیک، به دلیل نقش حیاتی آنها در فرآیندهای فتوسنتزی یافت می‌شوند. همچنین این رنگدانه-ها در بعضی از باکتریهای غیر فتوسنتزی، مخمرها و کپکها نیز به عنوان آنتی اکسیدانت و پایدارکنندهٔ غشاهای سلولی و به منظور حفاظت در برابر آسیبهای ناشی از نور و اکسیژن تولید می شوند (۸). حیوانات قادر به تولید این رنگدانه‌ها نیستند و آنها را از رژیم غذایی دریافت می‌کنند. کاروتنوئیدها در حیوانات باعث رنگی شدن آنها شده و در بدن آنها بعنوان آنتی اکسیدانهای بیولوژیک و پیش ساز ویتامین A فعالیت می‌کنند (۹) و علاوه بر دفاع درونی بدن در مقابل استرسهای اکسیداتیو، در حفاظت بدن در مقابل بیماریها و پدیده پیری نیز نقش دارند (۲ و ۱۷).

تاکنون ۷۰۰ کاروتنوئید مختلف شناسایی شده است (۷) و در حال حاضر این رنگیزه ها به عنوان مواد افزودنی مجازغذایی اهمیت ویژه ای پیدا کرده اند (۱۵). بیوسنتز کاروتنوئیدها در میکروارگانیسم ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۶). در این پژوهش کاروتنوئیدهای تولید شده توسط سویهٔ *Haloarcula* sp. IRU1 بررسی گردیده است. این سویه متعلق به آرکیهای بسیار نمک دوست است و از آب دریاچهٔ ارومیه جداسازی و شناسایی شده است (۱). کلونیهای این آرکی به دلیل حضور پیگمان کاروتنوئیدی قرمز و نارنجی هستند. معمولاً پیگمانتاسیون آرکیهای نمک دوست منجر به تولید کاروتنوئیدهای قرمز- نارنجی رنگ، غالباً با ساختار ۵۰ کربنه با نام باکتریوروبرین می گردد (۱۰ و ۱۱). در این مطالعه، ابتدا رنگدانه‌های کاروتنوئیدی میکروارگانیسم مورد نظر به ویژه فراوان‌ترین کاروتنوئید موجود در آن تخلیص و تا حد امکان شناسایی گردید. سپس به منظور تعیین ساختار پیگمان کاروتنوئیدی اصلی این سویه از روشهای اسپکتروفتومتری UV ، TLC ، NMR واسپکتروفتومتری جرمی استفاده گردید.

مواد و روشها

آرکی و محیط کشت: در مطالعه قبلی سویه مورد بررسی از آب دریاچه ارومیه جداسازی شده و با روشهای استاندارد میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و توالی یابی ژن 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفته و در بانک ژنی NCBIبا شماره HM625751.1 به ثبت رسیده است. این جدایه به صورت لیوفیلیزه در آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهرا(س) نگهداری می شود. طبق آزمایشات صورت گرفته توسط شیرزاد بهینه سازی شرایط رشد این آرکی اکستریموفیل انجام شده است. بنابراین در این تحقیق، محیط کشت مناسب و با شرایط بهینه به دست آمده برای رشد *Haloarcula* sp. IRU1 مورد استفاده قرار گرفت (۱). برای تهیه یک لیتر محیط کشت از این مواد بر حسب گرم استفاده شد: ۲۵۰ NaCl، $MgCl_2.6H_2O$ ۳۴/۶، $MgSO_4.7H_2O$ ۴۹/۴، Yeast extract ۵، $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۹۲، NaBr ۰/۵۸، KCl ۰/۵، $NaHCO_3$ ۰/۱۷. همه مواد از شرکت Merck تهیه شده است.

برای تهیه این محیط کشت، نمکهای اصلی محیط کشت شامل NaCl، $MgCl_2.6H_2O$ و $MgSO_4.7H_2O$، در یک ارلن و سایر مواد محیط کشت که شامل نمکهای با درصد پایین و عصاره مخمر می‌باشند، در یک ارلن دیگر، به طور مجزا، پس از اضافه کردن نیمی از آب مورد نیاز و تنظیم pH محیط بین ۷ – ۶/۸ و رساندن به حجم نهایی، در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده و

Archive of SID

www.SID.ir

سپس بلافاصله در شرایط استریل با هم مخلوط شدند. پس از تلقیح میکروارگانیسم، محیط کشت تهیه شده به نسبت یک به ده در چند ارلن مایر تقسیم شده و به مدت چهار روز در انکوباتور شیکردار با شرایط دمای ۴۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این مدت، محیط کشت حاوی باکتری، ابتدا در لوله‌های فالکون، به مدت ۲۰ دقیقه و با g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب حاصله توسط آب نمک ۱۵ درصد به صورت سوسپانسیون درآمد و مجدداً سانتریفیوژ گردید. سپس بیومس باکتریایی جمع آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تعیین بیومس آرکی: محیط کشت این سویه حاوی مقادیر زیادی نمک می باشد، بنابراین برای تعیین وزن بیومس خالص آرکی، نیاز به برآورد میزان رسوب نمکی می باشد که احتمالاً در هنگام سانتریفیوژ کردن همزمان با بیومس حقیقی رسوب می کند. بدین منظور حدود ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی آرکی و ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت فاقد آرکی که دارای تمام شرایط محیط کشت حاوی آرکی بود، در لوله های فالکونی که از قبل وزن آنها اندازه گیری شده بود سانتریفیوژ شدند. پس از خارج کردن محلول رویی، مجدداً فالکونها توزین شده و با کم کردن وزن رسوب نمک به دست آمده در فالکون حاوی محیط کشت فاقد باکتری از وزن به دست آمده از رسوب حاصله از فالکون حاوی محیط کشت واجد آرکی، وزن دقیق بیومس آرکی محاسبه گردید. برای تعیین وزن خشک آرکی فالکون حاوی بیومس به مدت ۷۲ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت، وزن رسوب خشک به دست آمده، اندازه گیری گردید.

شکستن دیواره سلول و استخراج عصاره کاروتنوئیدی: میزان مشخصی از بیومس آرکی درون یک لوله شیشه ای سرپوش دار ریخته شد و تقریباً به اندازه سه برابر وزن بیومس، به آن پودر شیشه نرم اضافه گردید. پس از افزودن استون به بیومس و پودر شیشه، به مدت پنج دقیقه ورتکس شد. سپس لایه رویی جمع آوری و مجدداً به رسوب باقیمانده استون اضافه گردید و عمل ورتکس کردن تکرار شد تا بیومس به طور کامل بی رنگ گردد. پس از انتقال کامل پیگمانها به استون، محلول حاصل به مدت ده دقیقه و با g × ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا ذرات پودر شیشه و باقی مانده سلولهای باکتری متلاشی شده از محیط خارج شوند. سپس به حجم محلول استون جمع آوری شده، هگزان اضافه گردید و به منظور جدا کردن دو فاز از یکدیگر، شستشو توسط آب مقطر انجام شد. این کار چندین بار تکرار گردید تا استون به طور کامل از هگزان جدا شده و تمامی پیگمانها به لایه هگزان منتقل شدند. به لایه رویی جمع آوری شده نمک سولفات سدیم بدون آب اضافه شد تا آب باقی مانده در محیط به طور کامل گرفته شود. برای تأیید روش انجام شده برای استخراج پیگمانها، این مراحل در شرایط مشابه سه بار تکرار گردید و هر بار بلافاصله جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه گیری مقدار کل کاروتنوئیدها: برای تعیین میزان کل کاروتنوئیدهای استخراج شده مراحل کار تا مرحله استخراج در هگزان انجام شده و حجم هگزان یادداشت گردید. سپس با اسپکتروفتومتر جذب آن را در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده و با توجه به فرمول زیر غلظت کاروتنوئیدها بر حسب میکروگرم در هر گرم وزن خشک باکتری محاسبه گردید:

$$\text{Total carotenoid } (\mu g/g \text{ of biomass}) = (\text{ml of acetone}) \times (A490) \times 10000 / 2500 \times (\text{biomass dry weight})$$

پس از استخراج کاروتنوئیدها در هگزان، محلول حاصل توسط دستگاه vacuum evaporator به طور کامل تغلیظ گردید. سپس عصاره باقی مانده در حجمی از استون که به اندازه حجم هگزان به کار رفته بود، حل شد. طیف جذب نوری محلول حاوی عصاره کاروتنوئیدی به دست آمده در

Archive of SID
www.SID.ir

هگزان، در ناحیه طول موجهای ۶۰۰ – ۳۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد و نقاط جذب ماکزیمم آن به دست آمد.

جداسازی و شناسایی پیگمانها: پس از تهیه عصاره کاروتنوئیدی، به منظور جداسازی و شناسایی پیگمانها روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) با استفاده از تعدادی مارکر استاندارد کاروتنوئیدی شامل بتاکاروتن، آستاگزانتین، کانتاگزانتین و زئاگزانتین به کاربرده شد. برای تهیه صفحات TLC از پلیت‌های شیشه‌ای و پودر سیلیکاژل $60F_{254}$ مرک استفاده شد. پلیت‌ها با ضخامت ۳۰۰ میکرون و توسط دستگاه مخصوص تهیه گردید. سپس برای فعال سازی صفحات TLC، پلیت های تهیه شده به مدت یک ساعت در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرارداده شدند. به منظور انجام کروماتوگرافی، ابتدا محلول کاروتنوئیدی توسط vacuum evaporator به طور کامل تغلیظ شد و عصاره روغنی باقی مانده در مقدار بسیار کمی استون حل گردید. سپس مقداری از نمونه توسط لوله مویین برداشته شده و به فاصله یک سانتیمتری از انتهای پلیت بر روی صفحه TLC قرار داده شد و بلافاصله درون تانک کروماتوگرافی که دارای حجمی از حلالهای استون و پترولئوم اتر به ترتیب با نسبت ۳۵ : ۶۵ بود، به مدت تقریباً ۴۵ دقیقه قرار داده شد. لازم به ذکر است که برای انجام کروماتوگرافی حلالهای مختلف با نسبتهای متفاوت مورد استفاده قرار گرفت. این حلال‌ها شامل اتیل استات– بنزن، استون – بنزن، متانول– کلرفرم و استون– پترولئوم اتر بود، که در این میان، بهترین الگوی جداسازی مشاهده شده، با استفاده از استون و پترولئوم اتر و به ترتیب با نسبت ۳۵ : ۶۵ به دست آمد. پس از این که حلال به انتهای صفحه TLC رسید و لکه ها به طور کامل از یکدیگر تفکیک شدند، پلیت از تانک کروماتوگرافی خارج و بلافاصله RF تمامی لکه ها محاسبه گردید. در مراحل بعدی و به منظور مقایسه مارکرهای موجود با لکه های مشاهده شده، هر یک از استانداردهای بتاکاروتن، آستاگزانتین، کانتاگزانتین و زئاگزانتین، به طور جداگانه و همزمان با نمونه حاوی عصاره کاروتنوئیدی بر روی صفحات TLC قرار داده و با همان نسبت حلالها کروماتوگرافی شدند.

تخلیص کاروتنوئید اصلی با استفاده از روش TLC: پس از انجام کروماتوگرافی و جداسازی پیگمانها و آشکار شدن باندهای متعدد ، به منظور انجام آنالیزهای بیش‌تر و تا حد امکان شناسایی دقیق تر، قوی ترین و بزرگترین باند مشاهده شده، از روی صفحه TLC برداشته شد. بدین منظور بلافاصله پس از خارج کردن پلیت از تانک کروماتوگرافی، ناحیه باند مورد نظر از روی صفحه TLC جمع آوری شد و فوراً درون ویالهای حاوی استون ریخته شد. در ادامه، ویالها ورتکس شده و سپس در دستگاه میکروفیوژ به مدت پنج دقیقه و با g × ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. بلافاصله پس از خارج کردن ویالها، محلول رویی توسط پیپت پاستور از روی رسوب پودر سیلیکاژل برداشته شد و به ظرف دیگری منتقل گردید.

اندازه‌گیری مقدار کاروتنوئید اصلی: پس از تخلیص و جمع آوری محلول استون حاوی کاروتنوئید اصلی، محلول حاصل کاملاً تغلیظ شد. سپس عصاره باقی مانده، مجدداً در حجمی از استون که به اندازه حجم هگزان به کار رفته در مرحله استخراج کل پیگمانها برای میزان مشخصی بیومس بود، حل گردید و جذب آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. سپس مقدار تقریبی این کاروتنوئید بر حسب میکروگرم در هر گرم وزن خشک باکتری محاسبه گردید.

آنالیز و شناسایی کاروتنوئید اصلی: برای آنالیز پیگمان کاروتنوئیدی تخلیص شده با روش کروماتوگرافی با لایه نازک، از روشهای طیف سنجی UV-Visible ، FT-IR ، MS و NMR استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

طیف سنجی UV-Visible: در این مطالعه، با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، نقاط ماکزیمم جذب کاروتنوئید اصلی در ناحیه طول موجهای ۶۰۰ – ۳۰۰ نانومتر اسکن شده و با طیف حاصل و نقاط ماکزیمم جذب به دست آمده از کاروتنوئید باکتریوروبرین و مشتقات نزدیک آن در حلال استون، در منابع موجود مقایسه گردید (۱۰ و ۱۸).

طیف سنجی FT-IR: برای گرفتن طیف پیگمان خالص سازی شده، از عصاره خشک به دست آمده دیسک KBr تهیه شد و طیف حاصل با طیف مربوط به کاروتنوئید باکتریوروبرین و مشتقات نزدیک آن در منابع موجود مقایسه گردید (۱۰ و ۱۸).

طیف سنجی جرمی: در این تحقیق، اسپکترومتری جرمی (EI MS) برای تعیین وزن مولکولی پیگمان کاروتنوئیدی مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت.

طیف سنجی NMR: برای گرفتن طیف H-NMR، عصاره کاروتنوئید مورد نظر کاملاً خشک شده و با حلال کلروفرم دوتره در دستگاه NMR ۵۰۰ مگاهرتز، طیف آن رسم گردید.

نتایج

آرکی مورد مطالعه یک میکروارگانیسم هوازی می‌باشد. در صورت تهیه محیط کشت آن در حجم یک به ده در ارلن مایر، باکتری از سرعت رشد بالاتری برخوردار بوده و در زمان کمتری به حداکثر رشد خود می‌رسد، که این زمان چهار روز می‌باشد. در طی این مدت رنگ محیط کشت کدر شده و به رنگ قرمز ـ نارنجی تغییر پیدا می‌کند. پس از سانتریفیوژ کردن محیط کشت حاوی باکتری و جمع آوری بیومس به دست آمده، میزان بیومس ۸/۲ گرم در لیتر محاسبه شد. وزن خشک بیومس حاصل نیز، پس از قرار دادن در آون ۷۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۷۲ ساعت، ۰/۱۷گرم در هر گرم از بیومس تر محاسبه شد.

اولین مرحله برای استخراج پیگمانهای کاروتنوئیدی، شکستن دیواره سلولی میکروارگانیسم می‌باشد. این آرکی اکستریموفیل که توانایی زیستن در غلظت بالای نمک را دارد، حداکثر تا نیم ساعت قادر به تحمل فشار اسمزی پایین آب مقطر می‌باشد و بیشتر سلولها بلافاصله متلاشی می‌شوند. البته در روند استخراج کاروتنوئیدها از این باکتری، استفاده از آب مقطر و سپس اضافه کردن حلال، شرایط چندان مطلوبی ایجاد نمی‌کرد و ترجیحاً از این کار صرف‌نظر شد. در این تحقیق، ابتدا سعی بر این بود که شکستن سلول و استخراج پیگمانها توسط متانول صورت گیرد. متانول به تنهایی حلال بسیار خوبی برای استخراج پیگمانهای کاروتنوئیدی از این باکتریها محسوب می‌شود (۴). البته این مشکل وجود داشت که در مرحله بعد با اضافه کردن حلال هگزان و شستشو با آب مقطر، مقدار قابل توجهی از کاروتنوئیدها تمایل زیادی به متانول از خود نشان می‌دادند و انتقال آنها از متانول به هگزان به خوبی اتفاق نمی افتاد. البته در صورت انجام تکانهای شدید، در نهایت لایه متانول به طور کامل بی‌رنگ می‌شد، ولی مقداری از پیگمانها به شکل ذرات توده‌ای شکل قرمز رنگ از محیط خارج شده و بین دو لایه قرار می‌گرفتند. حلالهای آلی دیگری از جمله دی‌اتیل اتر و همچنین مخلوط هگزان و دی‌اتیل اتر نیز به جای هگزان مورد استفاده قرار گرفت که تأثیر چندانی بر روند استخراج این پیگمانها نداشت. ناگزیر، روشهای دیگری مورد امتحان قرار گرفت که از جمله استفاده از استون به جای متانول در مرحله اول بود. استون نیز یکی از حلالهای رایج برای استخراج پیگمانهای کاروتنوئیدی از سلولهای مختلف محسوب می‌شود، اما در اغلب موارد کارآیی آن به اندازه متانول نمی‌باشد و برای افزایش بازده کار، استفاده از روشهای فیزیکی در کنار استون ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور همزمان با استون، پودر شیشه نسبتاً نرم نیز مورد استفاده قرار گرفت. با اضافه کردن استون و پودر شیشه به بیومس و ورتکس کردن آن، پیگمانها به طور قابل

Archive of SID
www.SID.ir

قبولی از بیومس خارج شد. پس از اضافه کردن هگزان به استون و شستشو با آب مقطر، پیگمانها به طور کامل به لایه هگزان منتقل شد. بنابراین، برای استخراج پیگمانها، در ابتدا از متانول استفاده شد . سپس با اضافه کردن استون و پودر شیشه به بیومس و ورتکس کردن آن، هر بار به مدت پنج دقیقه، پیگمانها به طور قابل قبولی از بیومس خارج شدند. این عمل دو الی سه بار تکرار گردید. پس از جمع آوری محلول استون و سانتریفیوژ کردن آن، محلول شفافی حاصل شد که فاقد ذرات پودر شیشه و باقی مانده سلولهای آرکی متلاشی شده بود. پس از اضافه کردن هگزان، برای جدا کردن دو فاز از یکدیگر، محلول حاصل چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. در نهایت، لایه هگزان جمع آوری شد و توسط نمک سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شد. اضافه کردن نمک، هر بار به میزان کم بوده و تا زمانی ادامه داده می‌شود که دیگر ذرات توده‌ای شکل از نمک تشکیل نشود (۷). هر بار استخراج کاروتنوئیدها از ۰/۲ گرم بیومس انجام شد و در هر بار تکرار، در نهایت ۸ میلی لیتر محلول هگزان حاوی پیگمانها جمع آوری شد. سپس جذب آنها در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد و مقادیر ۰/۸، ۰/۷۵ و ۰/۸۵، در سه تکرار جداگانه به دست آمد. طیف جذبی پیگمانها نیز در هگزان، در ناحیه طول موجهای ۶۰۰ - ۳۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل a - ۱).

برای محاسبه میزان کل کاروتنوئیدها در این سویه، متوسط ضریب خاموشی برای ماکزیمم جذب اصلی برای کاروتنوئیدها در استون در نظر گرفته شد، که مقدار۲۵۰۰ می‌باشد. مقدار تقریبی کاروتنوئیدهای موجود در وزن خشک طبق رابطه مخصوص ۸۲۸/۲ میکروگرم در هر گرم وزن خشک آرکی محاسبه شد.

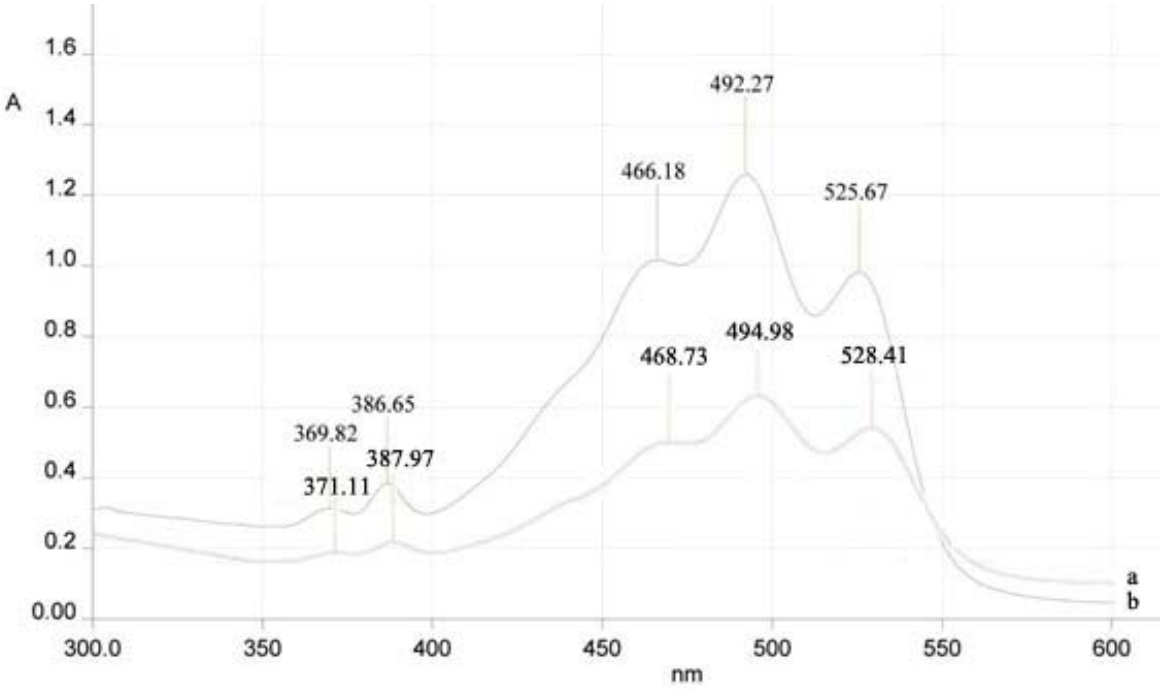
پس از تهیه عصاره کاروتنوئیدی، به منظور جداسازی، تخلیص و همچنین شناسایی پیگمانها، از روش کروماتوگرافی با لایه نازک و تعدادی از مارکرهای استاندارد کاروتنوئیدی استفاده گردید. در پایان کروماتوگرافی با لایهٔ نازک شش باند مختلف بر روی پلیت TLC مشاهده شد و Rf آنها، محاسبه و اندازه‌گیری شد (۰/۸۸،۰/۹۵ ، ۰/۷۸، ۰/۵۱، ۰/۴، ۰/۱۷ ، :Rf –values) که در بین آنها، اولین و پایین‌ترین باند، بزرگترین و قوی‌ترین بود و به عنوان پیگمان اصلی این آرکی مد نظر قرار گرفت (:۰/۱۷Rf-value، ۷۰ درصد). این پیگمانها عمدتاً طیفی از رنگهای قرمز، نارنجی و صورتی را در بر می‌گرفتند. به منظور شناسایی اولیه کاروتنوئیدها، از تعدادی مارکر استاندارد کاروتنوئیدی شامل بتاکاروتن، آستاگزانتین، کانتاگزانتین و زئاگزانتین استفاده شد. لازم به یاد آوری است به دلیل عدم وجود باکتریوروبرین به صورت تجاری امکان تهیه آن وجود نداشت. جهت مقایسه مارکرهای موجود با لکه های مشاهده شده، استانداردهای ذکر شده هر یک به طور جداگانه و همزمان با نمونه حاوی عصاره کاروتنوئیدی بر روی صفحات TLC قرار داده شد و با همان نسبت حلالها کروماتوگرافی شدند (نتایج نشان داده نشده است). طبق نتایج مشاهده شده از کروماتوگرافی نمونه عصاره کاروتنوئیدی با استانداردهای موجود، Rf استانداردهای آستاگزانتین و کانتاگزانتین، مشابه با Rf هیچ یک از لکه های موجود بر روی صفحه TLC نبود. اما با توجه به مشابهت Rf استانداردهای بتاکاروتن و زئاگزانتین با Rf دو پیگمان موجود بر روی صفحه TLC، می‌توان احتمال حضور این کاروتنوئیدها را در این آرکی مد نظر قرار داد.

به منظور انجام آنالیزهای بیشتر و تا حد امکان شناسایی دقیق‌تر، قوی‌ترین و بزرگترین باند مشاهده شده، از روی صفحه TLC برداشته شد. ابتدا، برای تعیین میزان تقریبی فراوان ترین رنگدانه کاروتنوئیدی موجود در این آرکی، پس از استخراج عصاره کاروتنوئیدی از ۰/۲ گرم بیومس و انجام کروماتوگرافی و جمع آوری پیگمان مورد نظر در استون، محلول حاصل کاملاً تغلیظ شد. سپس عصاره کاروتنوئیدی به دست آمده، مجدداً در ۸ میلی لیتر استون

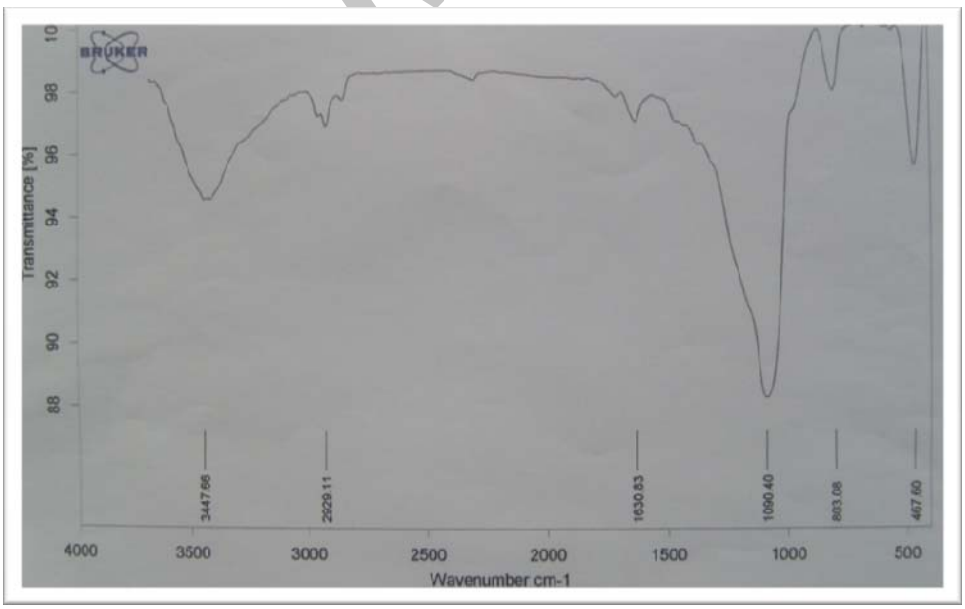
Archive of SID

www.SID.ir

حل گردید و جذب آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار این کاروتنوئید، ۵۶۴/۷ میکروگرم در هر گرم وزن خشک باکتری محاسبه شد.



شکل ۱- a) طیف جذبی مجموعه پیگمانها در هگزان b) طیف جذبی کاروتنوئید اصلی در استون.



شکل ۲- طیفFT-IR پیگمان اصلی. باندهای جذبی ویژۀ پلی ان های ایزوپرونوئید به خوبی قابل مشاهده است.

www.SID.ir

طیف جذبی کاروتنوئید اصلی در ناحیه طول موجهای ۶۰۰ –۳۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل b - ۱). مقادیر جذب ماکزیمم آن در حلال استون ۴۶۸/۹ و ۴۹۴/۹۸ و ۵۲۸/۴۱ می باشند. بنابراین، شباهت زیادی بین طیف جذبی و همچنین نقاط ماکزیمم جذب مربوط به کاروتنوئید باکتریوروبرین و پیگمان کاروتنوئیدی باکتری مورد نظر وجود دارد. در مقاله دکتر سایتو و همکاران (۱۸)، ماکزیمم جذب کاروتنوئید باکتریوروبرین در حلالهای اتانول، متانول و استون، ارائه شده است. مقادیر ذکر شده برای ماکزیمم جذب در حلال استون، ۴۶۹، ۴۹۴ و۵۲۷ نانومتر می‌باشد. همچنین در مقاله دکتر کوشواها و همکاران (۱۰)، علاوه بر نقاط ماکزیمم مطرح شده در استون، به وجود دو پیک کوچک مجاور نیز در طول موجهای ۳۶۸ و ۳۸۵ نانومتر اشاره شده است که این پیکها از مشخصه‌های رنگدانه‌های آلیفاتیک و کاملاً بدون حلقه می‌باشند.

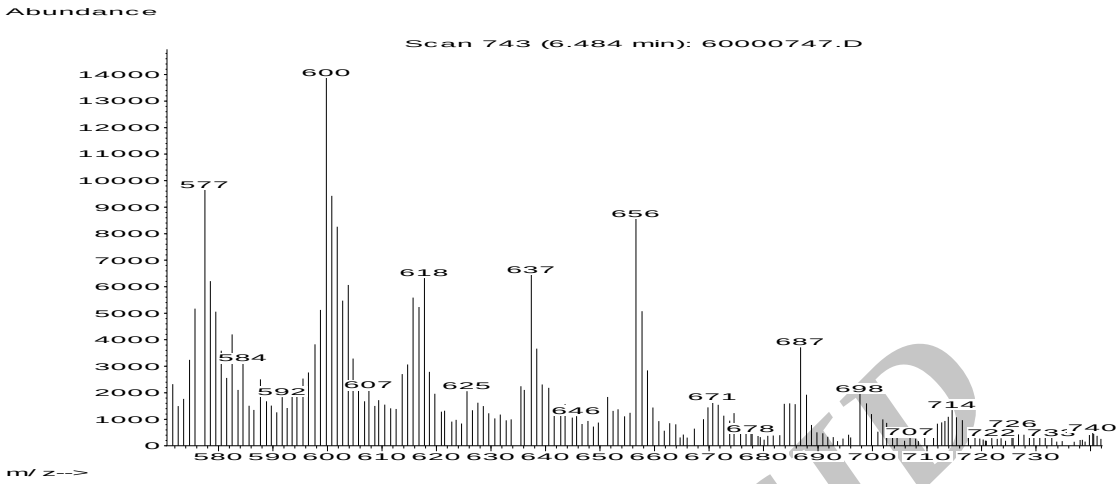
طیف FT-IR پیگمان کاروتنوئیدی مورد نظر در مقایسه با منابع مورد استفاده، تا حد زیادی مشابه طیف باکتریوروبرین بوده و باندهای جذبی ویژه پلی‌ان‌های ایزوپرنوئید در آن قابل مشاهده است مانند باندهای cm^{-1} ۳۴۴۷ (دنبالهٔ OH) ، cm^{-1} ۲۹۲۹ (دنبالهٔ C-H از $-CH_2$ و $-CH_3$)، cm^{-1} ۱۰۹۰ (امتداد C-O)، و cm^{-1} ۸۰۹ که معرف گروههای هیدروکسیل درجه سوم هستند (شکل ۲). بنابراین، کشش پیوندهای C-O و O-H در طیف حاصل به خوبی قابل تشخیص می‌باشد. بخشی از کشش مربوط به گروههای هیدروکسیل نوع سوم ضعیف است، اما قابل صرف نظر کردن نیست. نکته قابل توجه در طیف گرفته شده، مشاهده پیک کوچکی مربوط به کشش گروه C=O می‌باشد که اگر چه چندان قوی نیست ولی حائز اهمیت است و می‌تواند نشان‌دهنده تفاوتی جزئی در ساختار این پیگمان نسبت به باکتریوروبرین و مشتقات شناخته شده نزدیک آن باشد.

در مقایسه با طیفهای FT-IR باکتریوروبرین و سه مشتق نزدیک آن شامل مونوانهیدرو، بیس انهیدرو و تترااانهیدرو باکتریوروبرین در منابع موجود (۱۲–۱۰)، طیف کاروتنوئید مورد نظر، بیشترین شباهت را با طیفهای باکتریوروبرین و مونوانهیدرو باکتریوروبرین نشان می‌دهد. مونوانهیدروباکتریوروبرین نسبت به باکتریوروبرین، فاقد یک گروه OH می‌باشد. در سایر ترکیبات به ترتیب دو گروه و چهار گروه OH، وجود ندارند.

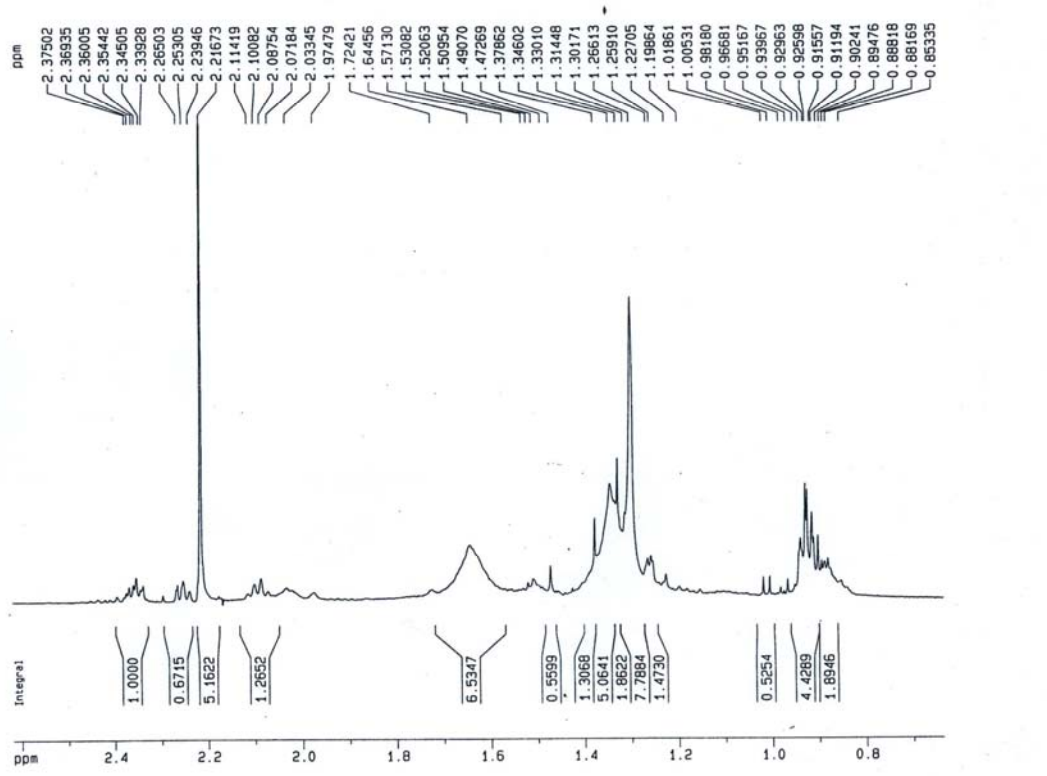
به منظور تأیید نتیجه مشاهده شده در طیف سنجی FT-IR و به دست آوردن اطلاعات بیشتر راجع به ساختار این پیگمان، جرم مولکولی پیگمان مورد نظر توسط دستگاه طیف سنجی جرمی (EI MS) نیز اندازه‌گیری شد. بر اساس طیف گرفته شده، وزن مولکولی ۷۸۳ دالتون برای این کاروتنوئید به دست آمد. با بزرگنمایی طیف حاصل سه وزن مولکولی شاخص ساختار کاروتنوئید باکتریوروبرین و دو مشتق نزدیک آن در طیف اسپکترومتری جرمی مشاهده شد، که شامل ۷۴۰ دالتون برای باکتریوروبرین، ۷۲۲ و ۷۰۴ دالتون به ترتیب برای مونوانهیدرو و بیس‌انهیدرو باکتریوروبرین بود (شکل ۳). دو ترکیب اخیر به ترتیب با از دست رفتن یک و دو مولکول آب از باکتریوروبرین به وجود می‌آیند. در مقایسه با باکتریوروبرین با جرم مولکولی ۷۴۰ دالتون، این پیگمان دارای اختلاف وزنی حدود ۴۳ دالتون با این کاروتنوئید می‌باشد. با بزرگنمایی طیف حاصل سه وزن مولکولی شاخص ساختار کاروتنوئید باکتریوروبرین و دو مشتق نزدیک آن در طیف اسپکترومتری جرمی مشاهده شد. بنابراین می‌توان این گونه نتیجه گیری کرد که به احتمال قوی پیگمان اصلی موجود در این باکتری از نظر پایه‌ای دارای ساختاری مشابه با کاروتنوئید باکتریوروبرین می‌باشد، با این تفاوت که این پیگمان دارای گروه عملکردی اضافه‌ای به اندازه وزن مولکولی به دست آمده می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- طیف بزرگنمایی شده اسپکترومتری جرمی کاروتنوئید اصلی پس از جداسازی بر روی ستون سیلیکاژل ۶۰ و خالص سازی آن. وزنهای مولکولی ۷۴۰ و ۷۲۲ دالتون در این طیف مشاهده می شود.



شکل ۴- طیف بزرگنمایی شده H-NMR کاروتنوئید اصلی

www.SID.ir

با وجود محدودیتهای موجود، به منظور دستیابی به اطلاعات بیشتر و تا حد امکان شناسایی کامل‌تر، از پیگمان مورد نظر طیف H- NMR نیز گرفته شد. برای گرفتن طیف NMR نیاز به مقدار زیادی ماده می‌باشد. با محدودیتهای موجود تا حد امکان کاروتنوئید مورد نظر استخراج و جمع‌آوری شد و توسط دستگاه H- NMR طیف آن به دست آمد. البته به دلیل کم بودن نمونه، در بخشی از طیف گرفته شده پیکهای نسبتاً ضعیفی ثبت شد. طیف به دست آمده بزرگنمایی شد (شکل ۴) و بر اساس جابه جاییهای شیمیایی (δ) مورد تجریه و تحلیل قرار گرفت. نکته قابل توجه در طیف گرفته شده، مشاهده پیک نسبتاً قابل توجهی برای هیدروژنهای گروه متیل متصل به گروه کتونی علاوه بر پیکهای مرتبط برای ساختار کاروتنوئیدهای باکتریوروبرین بود. جرم مولکولی این گروه ۴۳ دالتون می‌باشد که دقیقاً معادل اختلاف جرمی است که در طیف سنجی جرمی ثبت شده بود.

δ = ۳/۶ – ۴/۳ ppm برای هیدروژنهای گروههای الکلی

δ = ۱/۱ – ۱/۴ و ۵/۴ ppm برای هیدروژنهای گروههای اولفینی

δ = ۱/۷ ppm برای هیدروژنهای کربنهای آلیلی

δ = ۰/۸۵ – ۱ ppm برای هیدروژنهای گروههای متیل سیر شده

δ = ۲/۲ ppm برای هیدروژنهای گروه متیل، متصل به گروه کتونی (متیل کتون)

بر طبق نتایج مشاهده شده و اطلاعات به دست آمده از طیف H-NMR، علاوه بر مشخصه‌های ساختار کاروتنوئید باکتریوروبرین، می‌توان حضور یک گروه متیل کتون را نیز در ساختار این کاروتنوئید مورد توجه قرار داد.

بحث

در مطالعات قبلی نشان داده شد سویه *Haloarula* sp. IRU1که از دریاچه نمک ارومیه جداسازی شده، مقاومت نسبتاً بالایی نیز در برابر پرتوهای یونیزه کننده گاما و نور فرابنفش از خود نشان می دهد (۱). این سویه متعلق به خانواده *Halobacteriaceae* می باشد و کلونیهایی به رنگ نارنجی تولید می کند. اعضای این خانواده دارای کاروتنوئیدهای C-50 گروه باکتریروبرین هستند. تولید پیگمانهایی در دامنه قرمز تا نارنجی در میان میکروارگانیسم هایی که در دریاچه های نمک و شورابه ها زندگی می کنند متداول است (۱۲، ۱۶). دامنه جذب این پیگمانها در محدودهٔ ۶۰۰–۳۰۰ نانومتر قرار دارد و بیشترین جذب نوری در ۴۸۲ نانومتر نشان داده می شود. نقش این پیگمانها در محافظت در برابر اثرات پرتوهای فرابنفش نور خورشید موجود در زیستگاههای طبیعی این میکروارگانیسم ها به اثبات رسیده است (۳ و ۱۴).

برای تعیین میزان کل کاروتنوئیدها در این سویه، متوسط ضریب خاموشی برای ماکزیمم جذب اصلی برای کاروتنوئیدها در استون در نظر گرفته شد. مقدار تقریبی کاروتنوئیدها برای هر گرم وزن خشک آرکی محاسبه شد و حدوداً ۸۳۰ میکروگرم به دست آمد. این مقدار نشان می‌دهد که میزان تولید پیگمانهای کاروتنوئیدی در این آرکی در مقایسه با تعدادی از میکروارگانیسم‌های شناخته شده تولید کننده کاروتنوئید از جمله *Haloferax mediterranei* (۱۶)، همچنین باکتری مقاوم به پرتو *R. Radiotolerans* میزان نسبتاً مطلوبی محسوب می‌شود (۱۸). لیکن بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی باکتریهای مشابه، امکان بهینه کردن تولید پیگمانهای کاروتنوئیدی توسط این باکتریها، با ایجاد تغییراتی در میزان نمک و شرایط رشد آنها میسر می‌باشد در این راستا می‌توان تأثیر عوامل مختلف دیگری نظیر ترکیبات جهشزا و نیز اثر عوامل متعدد دیگری از جمله نور و تغییرات فشار اکسیژن را نیز مد نظر قرار داد (۱۳ و ۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

در جداسازی و شناسایی کاروتنوئیدهای این سویه با TLC، با وجود داشتن پیش فرض برای بزرگترین باند مشاهده شده و نیاز به استاندارد برای شناسایی مقدماتی آن، امکان تهیه مارکر آن مانند سایر استانداردهای رایج فراهم نشد. این پیگمان در درصدهای پایین استون، تمایل زیادی به فاز ثابت سیلیکاژل از خود نشان می‌داد و به سختی بر روی صفحه TLC حرکت می‌کرد. با افزایش نسبت استون به پترولئوم اتر، مشاهده شد که این باند با سهولت بیشتری از نقطه مبداء حرکت می‌کند. با توجه به ویژگی مشاهده شده از این باند، می‌توان حضور گروههای عملکردی قطبی و متعددی را در ساختار این پیگمان پیش بینی کرد. با توجه به اینکه این پیگمان فراوان‌ترین رنگدانه موجود در این باکتری می‌باشد به عنوان پیگمان کاروتنوئیدی اصلی در آن مد نظر قرار گرفت.

میزان کاروتنوئید اصلی در هر گرم از وزن خشک باکتری، تقریباً ۵۶۵ میکروگرم محاسبه شد که حدود ۷۰ درصد از کل پیگمانهای کاروتنوئیدی موجود در این باکتری می‌باشد، که این رقم، مقدار نسبتاً قابل توجهی محسوب می‌شود. در مقایسه با باکتری مقاوم به پرتو *Rubrobacter radiotolerans* که در مجموع از باکتیوروبرین و مونوانهیدرو باکتیوروبرین به میزان حدود ۷۰ درصد از کل کاروتنوئیدها برخوردار است (۱۸) و همچنین بسیاری از هالوباکتریها که میزان تولید باکتیوروبرین در آنها کمتر از *R. radiotolerans* گزارش شده است (۱۱)، این باکتری تولید کننده ارزشمندی برای این پیگمان محسوب می شود.

از مقایسهٔ شکل طیف جذب نوری و FT-IR کاروتنوئید اصلی با منابع موجود (۱۰، ۱۱و۱۸)، شباهت زیادی بین پیگمان کاروتنوئیدی اصلی *Haloarcula* sp. IRU1 و باکتیوروبرین که دارای ۱۳ پیوند دوگانه کانجوگه و چهار گروه هیدروکسیل نوع سوم است، مشاهده می شود. البته در طیف FT-IR کاروتنوئید این آرکی علاوه بر مشاهده کششهای مربوط به پیوندهای C-O و O-H در طیف حاصل که به خوبی قابل تشخیص می‌باشد، کشش نسبتاً ضعیفی نیز مربوط به گروه کتونی قابل مشاهده است، که در خور توجه می‌باشد. از طرف دیگر، نتایج اسپکتروفتومتری جرمی وزن مولکولی ۷۸۳ را برای این پیگمان نشان می دهد که ۴۳ دالتون با وزن مولکولی باکتیوروبرین اختلاف دارد. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده از طیف سنجیهای انجام شده برای شناسایی پیگمان اصلی در این باکتری، می‌توان این احتمال را در نظر گرفت که با مشتقی از کاروتنوئید باکتیوروبرین مواجه بوده که دارای گروه عملکردی اضافی نسبت به این کاروتنوئید می‌باشد.

باکتیوروبرین کاروتنوئید شاخص باکتریهای نمک دوست است. کوشواها و همکاران باکتیوروبرین و مونوانهیدروباکتیوروبرین را از *Halobacterium cutirubrum*, *H. halobium*, *H. salinarum*, *H. saccharovorum* و سایر باکتریهای نمک دوست به دست آوردند (۱۲-۱۰). البته مسیر بیوشیمیایی سنتز خانوادهٔ کاروتنوئیدهای باکتیوروبرین تنها در *Halobacterium* دیده نمی شود، بلکه در سایر باکتریهای گرم مثبت از جمله در باکتری بسیار مقاوم به پرتوهای یونیزه کننده *Rubrobacter radiotolerans* نیز به اثبات رسیده است. بنابراین می توان چنین استنباط کرد که آنزیمهای مشابه یا مسیرهای بیوشیمیایی یکسانی در بیوسنتز این ترکیبات دخالت دارند، زیرا انتشار ویژگیهای زیستی گوناگون ممکن است یا تابع یک الگوی ساده باشند یعنی فقط یکبار در طول تکامل اتفاق افتاده باشند یا از الگوی پیچیده ای مثل انتقال ژن و تکامل موازی متابعت کنند. از این دیدگاه ، بسیار جالب توجه است که خانوادهٔ باکتیوروبرین در باکتریهای مقاوم به پرتویی مانند *R. radiotolerans*، *H. salinarum* و *Haloarcula* IRU1مشاهده می شوند. لازم به یادآوری است که سایر باکتریهای مقاوم به پرتو از جمله *Deinococcus radiodurance* نیز پیگمانهایی قرمز- نارنجی تولید

Archive of SID

www.SID.ir

می کنند. بنابراین به نظر می رسد در بررسیهای تاکسونومیک، شناخت بیشتر و دقیق تر این پیگمانها حائز اهمیت باشد.

باکتریوروبرین با دارا بودن ۱۳ پیوند دوگانه کانجوگه در ساختار خود به طور مؤثری انرژی پرتوها را جذب می نماید و نیز به عنوان پاک کننده رادیکالهای آزاد شناخته می‌شود (۱۹)، بنابراین حضور آن در این آرکی اکستریم هالوفیل در مقاومت آن به استرسهای موجود در محیط زیست طبیعی و در شرایط آزمایشگاهی تأثیر به سزایی دارد. البته در مطالعات بعدی می توان فعالیت آنتی اکسیدانتی این پیگمان کاروتنوئیدی را مورد بررسی قرار داد و همچنین با بهینه سازی شرایط تولید پیگمان از این سویه به عنوان منبعی برای تولید یک ترکیب آنتی اکسیدانتی مناسب استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهرا(س) که بودجه تحقیقاتی این پروژه را فراهم نموده اند، قدردانی نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر کیارستمی در پیشبرد این کار تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱- شیرزاد، مهدیه. ۱۳۸۴. جداسازی و شناسایی ارکی بسیار نمک دوست از دریاچه ارومیه. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه الزهرا (س).

2- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90: 7915-7922

3- Asgarani, E., Funamizu, H., saito, T., Terato, H., Ohyama, Y., Yamamoto, O. and Ide, H. 1999. Mechanisms of DNA Protection in *Halobacterium salinarum*, an extremely halophilic bacterium. *Microbiol. Res* 154: 185-190

4- Asker, D., Awad, T. and Ohta, Y. 2001. Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TM^T: an Extremely Halophilc Canthaxanthin- Producing Archaeon. *Biosci. and Bioengin*. 93: 37-43

5- Britton, G., Liaeen-Jensen, S. and Pfander, H. 2004. Carotenoids handbook. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland

6- Cheng, Q. 2006. Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthsis genes. *J. Ind. Microbial. Biotechnol*. 33: 552-559

7- Delia, B., Rodriguez-Valera, F. and Kimura, M. 2004. Harvest Plus Handbook for Carotenoid Analysis

8- Kelly, M., Norgård, S. and Liaaen-Jensen, S. 1970. Bacterial carotenoids. XXXI. C50 carotenoids 5. Carotenoids of *Halobacterium salinarium*, especially bacterioruberin. *Acta Chem. Scand* 24: 2169-2182

9- Krinsky, N.I. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem* 66: 1003-1010

10- Kushwaha, S.C., Gochnaurer,M. B., Kushner, D. J., Kates, M. 1974. Pigments and isoprenoid compound in extremely and moderately halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol* 20: 241-245

11- Kushwaha, S.C., Kramer, J.K.G. and Kates, M. 1975. Isolation and characterization of C_{50} carotenoid pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum. Biochim. Biophys. Acta* 398: 303-313

12- Kushwaha, S.C., Juez-Pérez, G., Rodriguez-Valera, F., Kates, M. and Kushner, D.J. 1982. Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Can. J. Microbio*l 28: 1365-1372

13- Manikandan, M., Pasic, L.and Kannan V. 2009. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family Halobacteriaceae) by response surface methodology. *Biosource technology*100: 3107-3112

14- Mathews-Roth, M. M. 1987. Photoprotection by carotenoids. *Federation Proc*. 46: 1890-1893

15- Mortensen, A. 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure appl. Chem* 78: 1477-1491

Archive of SID
www.SID.ir

16- Oren, A. 2003. Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer academic publication.

17- Rao, A. V. and Rao, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmaco. Res*. 55: 207-216

18- Saito, T., Terato, H. and Yamamoto, O. 1994. Pigments of *Rubrobacter radiotoleranse*. *Arch. Microbiol* 162: 414 – 421.

19- Saito, T., Miyabe, Y., Ide, H. and Yamamoto, O. 1997. Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin. *Radiat. Phys. Chem* 50: 267 – 269

20- Wael, S. M. El-Sayed, Takaichi, S., Saida, H., Kamekura, M., Abu-Shady, M., Seki, H. and Kuwabara,T. 2002. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. *Plant Cell Physiol* 43: 379-383

Archive of SID

Partial purification and characterization of carotenoid pigment from *Haloarcula sp.* IRU-I, an extremely halophilic archaeon isolated from Uromia salt lake

Asgarani E. [1], Safari N.[1] and Zare D.[2]

[1]Biology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

[2]Biotechnology Research Center, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

An extremely halophilic archaeon, *Haloarcula* sp. IRU1 which isolated from Uromia lake can produce carotenoid pigments. In this study, we assayed several methods for pigment extraction by using different solvents, ultimately, the cell breakage by employing relatively soft glass powder and acetone:hexane as solvents was selected as the best method. Then, the pigments were separated by Thin Layer Chromatography. In order to pigment separating, we examined several solvents with different percentages and the best separating was performed with acetone:petroleum ether (35:65; v/v). There were appeared six bands on TLC plate and the first one with the least RF was the most high intensity band. A few carotenoid standards were used for primary identification of pigments. The highest intensity band on TLC plate was determined as the main pigment component in this archaeon and was scraped off from TLC for identification. For pigment analyzing, UV-Visible, FT-IR, Mass Spectrometry and NMR spectrums of this band were taken and compared with present references. These results suggested the main pigment of this archaeon is bacterioruberin which is sterified with acetate group.

Keywords*:* *Haloarcula* sp. IRU1, carotenoid, TLC, UV-Visible, FT-IR, Mass Spectrometry, NMR, Uromia salt lake

www.SID.ir