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 مقدارهای بالای نمک دریاچه ارومیه (۲۰ درصد وزنی ـ 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 ـ حجمی) نمک دریاچه ارومیه (شاهد)، محلول ۲۰ درصد (وزنی ـ حجمی) نمک دریاچه ارومیه، محلول ۲۰ درصد (وزنی ـ حجمی) نمک دریاچه ارومیه به 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 می‌توان عنوان نمود که اگرچه جلبک دونالیلا سالینا مقاوم به شوری است ولی تنش شوری ۲۰ درصد (وزنی ـ 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 به‌عنوان پیش‌ساز بیوسنتز ویتامین آ را افزایش داده و می‌توان 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.*

* عهده دار مکاتبات
+ E-mail: h.azimi@azaruniv.ac.ir

مقدمه

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

دونالیلا سالینا جلبکی شور پسند بوده و توانایی زنده ماندن در مقدارهای بالای نمک (تا حدود ۲۰ درصد وزنی ـ حجمی) را دارد. برمبنای گزارش های علمی اگرچه دونالیلا سالینا متحمل به شوری می‌باشد ولی در همان حال مقدارهای بالای نمک با کاهش کارآیی متابولیسمی بر رشد و نمو آن اثر منفی دارد [۹-۱۲]. در شرایط شور بیوسنتز ترکیب های 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 [۱۳-۱۵]. تیامین یا ویتامین ب ۱، در واکنش‌های دکربوکسیلاسیون و ترانس ستولاسیون نقش بازی می‌نماید [۱۳]. دکربوکسیلاسیون در مسیرهای متابولیسمی مهمی مانند تبدیل پیروات 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 رنگریزه‌ها را که در تحمل به تنش‌های محیطی نقش دارند بهبود ببخشد.

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 بتاکاروتن است که جزو کاروتنوئیدها بوده و در کلروپلاست گیاهان، جلبک‌ها و سیانوباکترها حضور دارد [۱۶-۱۹]. از سویی کاروتنوئیدها در صنایع دارویی، آرایشی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بتاکاروتن نوعی کاروتنوئید است که در جلبک دونالیلا سالینا در شرایط شور بیوسنتز آن افزایش چشمگیری پیدا می‌کند[۲۰-۲۲]. 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 ترپن‌ها که بتا کاروتن را نیز شامل می‌شود، با هدف بررسی امکان افزایش بیوسنتز ترپن ها مورد بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

جلبک دونالیلاسالینا 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 ۲±۲۸ 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 دی اکسید بهره گرفته شد [۱۵]. پس از رشد بهینه سلول‌ها، ۱۰۰ میلی لیتر از این سلوها برداشت شده و به محیط کشت‌هایی استریل که شامل تنش شوری ۲ درصد (وزنی ـ حجمی) نمک دریاچه ارومیه (شاهد)، محلول ۲۰ درصد (وزنی ـ حجمی) نمک دریاچه ارومیه و محلول ۲۰ درصد (وزنی ـ 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 ـ 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، اندازه گیری میزان جذب دانسیته نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر، وزن خشک توده زیستی با ترازوی دقیق، میزان رنگیزه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئیدها) با اسپکتروفتومتر، پروتئین محلول کل به روش بردفورد اندازه‌گیری شد.

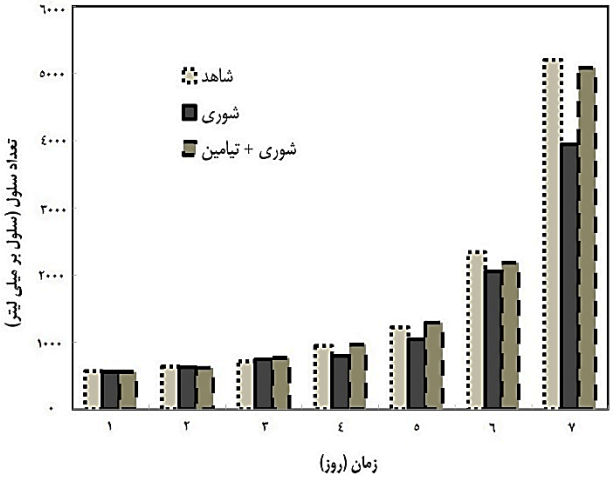
نتیجه‌ها و بحث

تعداد سلول جلبک دونالیلا سالینا

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 دونالیلاسالینا ادامه یافته است. ولی در مقایسه با شاهد با افزودن نمک به میزان ۲۰ درصد به محلول کشت از سرعت تقسیم سلولی کاسته است. درحالی 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 دی اکسید با مقدار مناسب و

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

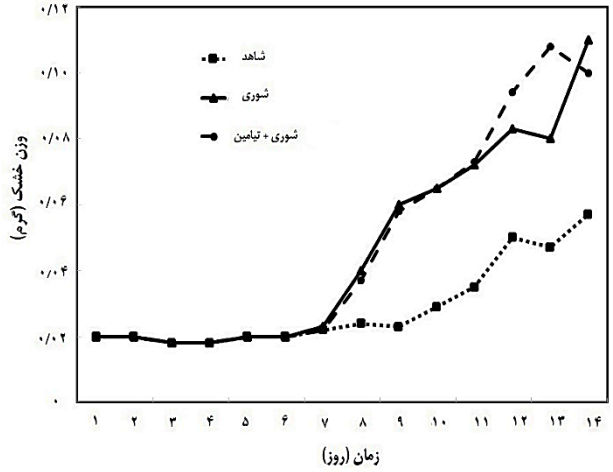
طی مطالعه‌ای که بر روی جلبک دونالیلاسالینای جدا شده از دریاچه مهارلو شیراز در غلظت‌های متفاوتی از شوری (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴/۵ مولار سدیم کلرید) انجام شده است، بیش‌ترین رشد جلبک در شوری ۲ مولار رخ داد و با افزایش میزان شوری رشد آن‌ها کاهش پیدا می‌کند[۲۳].



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

وزن خشک

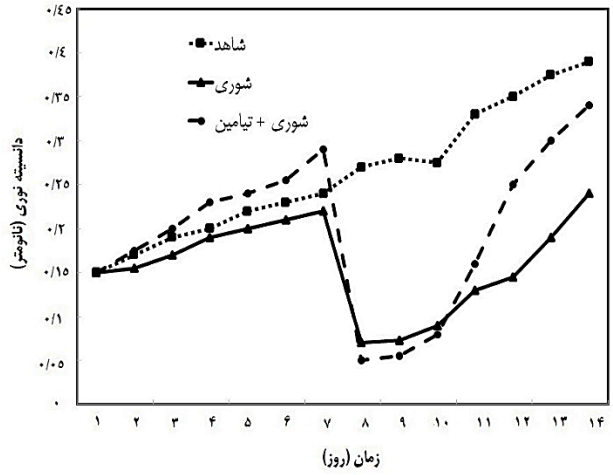
نتیجه‌های به دست آمده از روند تغییرهای وزن خشک نشان داد که با اعمال تنش شوری از روز هفتم، بین آن‌ها از نظر وزن خشک تولید شده توسط سلول‌های جلبک دونالیلاسالینا تفاوت دیده شد و با گذشت زمان این اختلاف بیش‌تر شد. در بین تیمارهای مورد مطالعه همواره کم‌ترین میزان وزن خشک تولید شده به تیمار شاهد و بیش‌ترین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



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

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 طوری‌که 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.

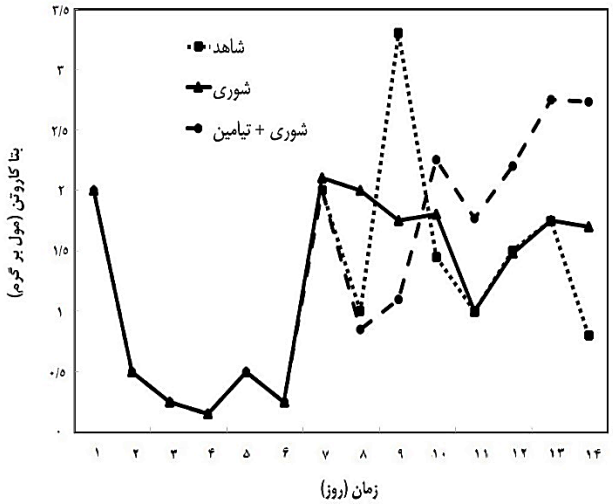


شکل ۳- مقایسه سه نمودار تغییر جذب نور در استرس شوری

(۱) Cuaresma

آنالیز بتاکاروتن

همانطوری که نمودارهای آنالیز بتاکاروتن شاهد، شوری، شوری به‌همراه تیامین در طی ۱۴ روز نشان می‌دهد 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 بیش‌تر شد (شکل ۴). به طوری‌که در تنش شوری ۲۰ درصد (وزنی ـ حجمی) نمک دریاچه ارومیه به‌همراه ۲۵ میکرومولار تیامین بیش‌ترین میزان تجمع بتاکاروتن بدست آمد. در بین تیمارهای مورد مطالعه کم‌ترین میزان بتاکاروتن به تیمار شاهد تعلق داشت و در روز ۱۴ام میزان بتاکاروتن در تیمار شوری به‌همراه 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 بیش‌ترین میزان بتاکاروتن در شوری ۵۰ گرم بر لیتر به دست آمد که تأییدی بر نتیجه‌های این یافته است.

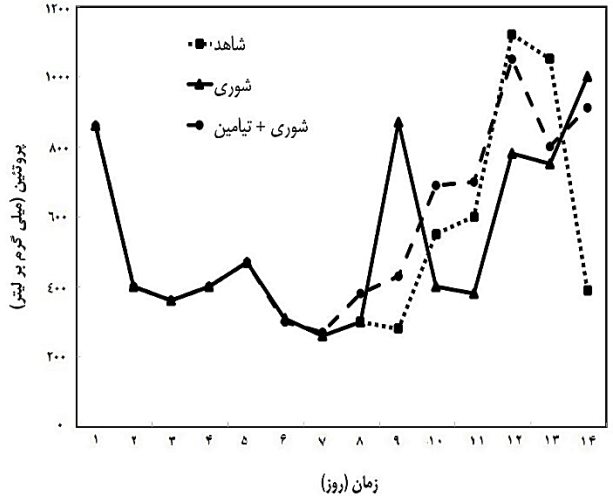


شکل ۴- مقایسه نمودارهای انالیز بتاکاروتن شاهد، شوری و شوری+تیامین در استرس شوری

آنالیزپروتئین

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 می‌تواند ناشی از افزایش تعداد سلول و ماده خشک در اثر گذر زمان باشد (شکل ۵). لازم به‌ذکر است که تغییرات میزان پروتئین با نتیجه‌های حاصل از میزان جذب دانسیته نوری تطابق دارد. *کیرولیا*[1] 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 آنزیم‌های سازگار کننده به شوری در جلبک دونالیلا سالینا افزایش می‌یابد که می‌تواند دلیل افزایش میزان پروتئین در شدت‌های بالای شوری باشد [۲۷]. گزارش های این پژوهشگران با نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش همخوانی دارد.



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

نتیجه‌گیری

اگرچه این مطالعه در حجم کوچک صورت گرفته است و برای نهایی نمودن نتیجه‌های آن مطالعه‌های بیش‌تر و کامل‌تری نیاز است. ولی، به طور کلی می‌توان عنوان نمود که اگرچه جلبک دونالیلا سالینا مقاوم به شوری است ولی تنش شوری ۲۰ درصد (وزنی ـ حجمی) 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 به‌عنوان پیش‌ساز بیوسنتز ویتامین آ را افزایش داده و می‌توان 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

(۱) Kirrolia

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 Cartenoids 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 β-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 β-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. Utln*. **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).