# بررسی تولید بتاکاروتن از سویه بومی جلبک *دونالیلا سالینا*

سعیده تولایی[1*]، مهناز مظاهری اسدی[2]، خسرو رستمی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی-گرایش علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات
۲- عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
۳- عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
**(تاریخ دریافت: ۹۰/۰۲/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۵/۲۲)**

## چکیده

امروزه تمایل زیادی برای مصرف کاروتنویید های طبیعی در صنایع غذایی،دارویی، آرایشی و بهداشتی وجود دارد. کاروتنوییدها یکی از مکمل های غذایی بوده که به صورت طبیعی در ارگانیسم های فتوسنتیک سنتز می گردد.به علت سوگیری به سمت تولید کارتنوییدها از روش های بیوسنتیک توجه به منابع طبیعی آنها افزایش یافته است.میزان ایزومر ۹-سیس با دسترسی زیستی بالا در دونالیلا نسبت به دیگر منابع طبیعی آن بیشتر است و این میکروآلگ مهمترین منبع طبیعی تولید کننده بتاکاروتن می باشد،از این رو پرورش تجاری آن برای تولید پودر دونالیلا و یا تولید بتاکاروتن طبیعی به سه دهه می رسد. این جلبک قابلیت بالای زیست در شرایط متغیر محیطی را داراست، به طوری که رنج تحمل شوری بین ۰/٤ مولار تا ۵ مولار NaCl و رنج تحمل pH بین ۵/۵ تا ۱۱ را دارا می باشد. ایجاد کاروتنویید در کلروپلاست آلگ و تحت شرایط استرس صورت میگیرد. در این مطالعه به بررسی تولید بتاکاروتن توسط جلبک دونالیلا سالینا جداسازی شده از دریاچه نمک حوض سلطان، در شرایط مختلف NaCl و pH در محیط کشت جانسون پرداخته شده است.بررسی های فوق در یک دوره رشد چهل روزه صورت گرفت. نتایج حاصله نشان میدهد که پیگمانتاسیون متناسب با روند رشد بوده وبیشترین میزان رشد و تولید کاروتنویید در محیط کشت با شوری ۱۰٪ (در مقایسه با شوری ۲۰ و ۳۰ درصد)و pH برابر۸/۵ (در مقایسه با pH های ۷/۵ و ۹/۵)مشاهده گردید. بیشترین میزان تولید کاروتنویید در محیط فوق در چهل و دومین روز و در حدود ۱٤/۹۵ میلی گرم در لیتر محیط کشت ارزیابی گردید.

**کلید واژگان:** بتاکاروتن،دونالیلا سالینا،بیوتکنولوژی غذایی،دریاچه نمک

*مسئول مکاتبات: satavallaee@yahoo.com



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

## ۱- مقدمه

امروزه هدف از مصرف مواد خوراکی صرفا جهت تامین مواد مورد نیاز بدن نبوده بلکه وسیله ای جهت ارتقای کارایی بدن می باشد. کاروتنویید ها از مکمل های غذایی و از زیر مجموعه فیتوکمیکال ها بوده و به صورت طبیعی در ارگانیسم های فتوسنتتیک سنتز می گردد. بتاکاروتن یکی از بیشترین افزودنی ها ی به کار رفته در صنعت غذا به عنوان رنگ دهنده و عامل آنتی اکسیدان می باشد همینطور به علت عملکرد تغذیه ای که دارد می تواند اثرات فیزیولوژیک سودمند داشته و ریسک بیماری های مزمن را کاهش دهد و ازاین جهت به عنوان یک عامل فانکشنال به حساب می آید [۱].

امروزه به علت فعالیت بیشتر آنتی اکسیدانی، سازگاری زیستی بالاتر، حلالیت بهتر در چربیها تمایل زیادی برای مصرف کاروتنویید های طبیعی وجود دارد [۲].

بتاکاروتن تولید شده از روش های شیمیایی با میزان استروایزومر ترانس کامل تحت تاثیر قرار می گیردکه فعالیت بیولوژیکی کمتر و قابلیت پایینتری برای به دام انداختن اکسیژن آزاد دارا می باشد. حضور ایزومری ۹-سیس نشان دهنده کیفیت بتاکاروتن تولیدی می باشد که در منابع طبیعی یافت می شود. در واقع باندهای دوگانه زنجیره پلی انی کاروتنویيدها عامل ایجاد خصوصیات متنوع زیستی آنها می باشد.به علاوه اینکه در واکنش های بیولوژیکی اثرات مخرب زیست محیطی کمتر به جا گذاشته میشود و خلوص و کیفیت محصول افزایش می یابد. کشت و پرورش *دونالیلا* مهمترین پروسه طبیعی به کار گرفته شده برای تولید بتاکاروتن طبیعی است و بیشترین میزان ایزومری ۹-سیس بتاکاروتن در *دونالیلا* موجود است و از این رو از سال ۱۹۸۰ به صورت تجاری برای تولید پودر خشک شده *دونالیلا* یا بتاکاروتن استحصال شده از آن به کار گرفته شده است [۳].

جلبک تک سلولی *دونالیلا سالینا* متعلق به خانواده *Chlorophyceae*، دارای دو تاژک هم طول، کلروپلاست فنجانی و بدون دیواره سخت سلولی است که در محیط های شور به خصوص دریاچه های نمکی فوق اشباع یافت می گردد. تولید تجاری بتاکاروتن به عنوان سومین صنعت در رابطه با میکروالگها طبقه بندی می شود و به علت قابلیت هضم بالای آنها و عدم حضور دیواره سخت سلولی ممانعتی در مصرف آنها به صورت کامل وجود ندارد [۱].

ایجاد کاروتنویید در کلروپلاست الگ و تحت شرایط محیطی سخت(مانند دما، نمک و تشعشع بالا یا منابع نیتروژنی کم) القا می شود که در این زمان سلول به رنگ پرتقالی دیده می شود.تولید کاروتنوییدها در *دونالیلا* با میزان بالای بـتاکاروتن همراه است [۵].

به علاوه اینکه این جلبک منبع مهمی برای تولید گلیسرول و پروتیین باارزش بالا نیز می باشد و طبق جدول گرس می تواند به عنوان غذا استفاده شود [٦].

با توجه به شرایط اکولوژیکی خاص ایران و وجود منابع طبیعی این الگ مانند دریاچه های فوق اشباع ارومیه، قم، حوض سلطان و... امکان استخراج و جداسازی آن وجود دارد.

هدف از این مطالعه تعیین شرایط مناسب تولید کاروتنویید در جلبک *دونالیلای* جداسازی شده از یکی از دریاچه های نمک ایران میباشد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- نمونه برداری

نمونه برداری جلبک از دریاچه حوض سلطان قم صورت گرفت.این دریاچه در ٤٠ کیلومتری شمال شهرستان قم و ۸۵ کیلومتری جنوب تهران قرار دارد. نمونه برداری در فصل تابستان و از مناطقی صورت گرفت که آب به رنگ نارنجی دیده می شد. نمونه ها با حفظ شرایط بر روی یخ و در ظروف استریل دردار به آزمایشگاه منتقل گردید.

### ۲-۲- جداسازی *دونالیلا*

در زیر هود و شرایط کاملاً استریل، میزان ۰/۱ میلی لیتر ($۵\times۱۰^{٤}$ سلول در میلی متر مکعب) از جلبک های رشد یافته به طور جداگانه در روی پلیت‌های استریل حاوی محیط‌های کشت جامد آگار ریخته و کشت خطی داده شدند. سپس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰ لوکس نوری قرار گرفتند. پس از ظاهر شدن تک کلنی‌ها بر روی پلیت، تک کلنی‌ها به وسیله لوپ استریل به محیط مایع انتقال داده شد و جهت اطمینان از وجود سلول‌ها، با



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند. در ادامه کار از روش لوله های موئین استفاده گردید که در این روش، لوله‌های موئین تهیه و مقدار کمی از نمونه به صورت توالی رقت در پلیتی که در آن ۱۰ قطره محیط کشت استریل گذاشته شده بود، تلقیح گردیدند. در انتهای انجام عملیات خالص سازی دونالیلا، از تیمار آنتی‌بیوتیکی استفاده گردید. مخلوط آنتی‌بیوتیکی با غلظت نهایی ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلرامفنیکل آماده و به اندازه ٤ میکرولیتر به نمونه‌ها تلقیح شد. بعد از ۵ روز ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به فلاسک‌هایی محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک انتقال داده شدند [۷].

## ۲-۳- محیط کشت

جهت کشت دونالیلا، از محیط کشت اختصاصی آن یعنی محیط اصلاح شده جانسون استفاده شد که ترکیبی از سه محلول مختلف شامل محلول مواد معدنی اصلی، محلول آهن و محلول املاح تریس (یا بسیار جزئی) است. تنظیم pH با افزودن سود و اسید کلریدریک صورت گرفت.

برای تهیه این محیط، نمک های محلول آهن و تریس در دو ظرف جداگانه توزین و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. محلول مواد معدنی اصلی محیط کشت حاوی ترکیبات اصلی و پایه است که نمکهای آن به میزان تعیین شده توزین و با آب مقطر به حجم ۹۸۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سه محیط را مجزا از یکدیگر در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراداستریل کرده و پس از خنک شدن به وسیلهٔ پیپت استریل ،۱۰میلی‌لیتر از محیطهای کشت آهن و تریس به محیط پایه اضافه گردید تا حجم آن به یک لیتر برسد [۵].

## ۲-٤- شرایط کشت و رشد جلبک

جهت تکثیر دونالیلا و آماده نمودن کشت مادرسویهٔ خالص شده در محیط کشت اصلاح شده جانسون با ۸ : pH و نمک ۱۵٪ تلقیح شده و تحت تابش نور ۱۰۰۰ لوکس (۱۲ ساعت روشنی و ۱۲ ساعت تاریکی) قرار گرفت. برای جلوگیری از ایجاد حالت پالمیلوئید و نگهداشتن سلولها در مرحلهٔ رشد سریع محیط کشت اصلاح شده جانسون به صورت تدریجی به کشت مورد نظر افزوده شد. در اینحالت سلولها از فاز تأخیری خارج شده و پس از رسیدن به غلظت مناسب (حدود۳×۱۰^٦cells/mL) و ثابت شدن تعداد سلولها در هر میلی‌لیتر برای تلقیح به محیطهای کشت ساخته شده با میزان کلرور سدیم و pH مشخص از آن استفاده شد. محیط کشت‌های تلقیح شده برای ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی رشد داده شدند و به طور متوسط در دوره روشنایی۱۵۰۰ لوکس نور دریافت کردند [۸]. دمای اتاق در طول دورهٔ روشنایی به طور متوسط ۲۷ درجه سانتیگرادو در دورهٔ تاریکی به طور متوسط ۲۲°C بود.

شرایط رشد جلبک در سه شوری مختلف ۳۰، ۲۰ و ۱۰ درصد بررسی گردید.در مورد pH نیز به همین ترتیب مقادیر ۸/۵،۷/۵ و ۹/۵ در نظر گرفته شد(۱۰,۹).تلقیح در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت صورت گرفت و به تدریج ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در طول یک هفته به آن افزوده شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل pH و شوری است و شرایط دیگر ثابت در نظر گرفته شد.

## ۲-۵- بررسی روند رشد و شمارش تعداد سلول جلبک

برای شمارش سلولی از لام هموسیتومتر یا Neubauer استفاده گردید. جهت شمارش سلولها ابتدا محیط کشت به خوبی به هم زده شد تا یک محیط همگن به دست آید. سپس از این محیط یکنواخت شده مقداری محلول جلبکی بر داشته شد (به کمک پیپت استریل) و توسط یک قطره فرمالین ٤٪ پس از چند دقیقه سلولها ثابت گردید. شمارش در مربعهای بزرگ لام که طول هر ضلع آنها ۱میلی متر می باشد با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل بابزرگنمایی ٤۰ انجام گرفت و از فرمول زیر تعداد سلولها در ۱ میلی‌متر مکعب به دست آمد. متوسط تعداد سلول ها از میانگین شمارش تعداد سلول ها در چهار مربع موجود بر روی لام به دست می آید.

۱۰×متوسط تعداد سلولهای شمارش شده = تعداد سلولها در ۱ میلی متر مکعب از محیط کشت

## ۲-٦- بررسی روند رشد با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

برای بررسی روند رشد از روش اسپکتروفتومتری نیز استفاده گردید.مقداری از محلول هر نمونه بعد از مخلوط شدن کامل



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

محیط کشت برداشته (در حدود ٤ میلی لیتر) و در کووت ریخته و میزان جذب نور در مقابل بلانک مورد نظریعنی محیط کشت تلقیح نشده شفاف که غلظت نمک NaCl آن مشابه غلظت نمک کلرور سدیم محلول کشت نمونه است در طول موج ٦٨٠ نانومتر، خوانده شده و برای رسم منحنی رشد استفاده گردید [١١]. در این طول موج میزان جذب به دست آمده با تراکم توده سلولی در محیط کشت رابطه مستقیم دارد. دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده از نوع UV/VIS مدل Unicam8620 بود.

### ٢-٧- اندازه گیری کاروتنویید

برای استخراج کاروتنوئیدها و عصاره گیری ٤ میلی‌لیتر از محیط کشت همگن شده توسط پیپت استریل برداشته و سلولها درسانتریفوژ با دور ٥٠٠٠rpm به مدت ١٠ دقیقه جدا گردید. سپس بیومس جدا شده را با ٤ میلی‌لیتر از محلول استون: آب (٨٠:٢٠ حجمی) مخلوط نموده وبرای ایجاد شرایط بهینه به مدت ٢ دقیقه ورتکس گردید. این حلال توانایی استخراج کاروتنها را داراست. محلول حاصل مجدداً به مدت ٥ دقیقه در ٥٠٠٠rpm سانتریفیوژ گردید و از محلول رویی استفاده شد. میزان کاروتنوئید موجود در محلول به روش اسپکتروفتومتری در ٤٥٠ نانومتر در مقابل بلنک (استون/آب) خوانده شده است[١٢].

### ٢-٨- تهیه استاندارد بتا کاروتن

برای اندازه‌گیری بتاکاروتنوئید نیاز به رسم منحنی استاندارد است. برای رسم منحنی استاندارد از β- کاروتن خالص مارک SIGMA استفاده گردید. ٥ میلی گرم از نمونه استاندارد رادر ٥ میلی لیتر تتراهیدروفوران حل نموده و برای رسم منحنی استاندارد از رقتهای ٢، ٤ و ١٠ میلی گرم بر لیتراستفاده گردید و جذب آن در ٤٥٠ نانومتر در مقابل شاهد تتراهیدروفوران خوانده شد و براساس جذب نوری به دست آمده منحنی استاندارد رسم و معادلهٔخط آن محاسبه گردید.

### ٢-٩- آزمون آماری

روش آماری مورد استفاده برای بررسی نتایج، آزمون آنوا دو طرفه در سطح معنا داری ٠/٠٥ می باشد.آزمون های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver11.5 انجام گردید.اعداد مورد استفاده حاصل از میانگین سه تکرار بود.

## ٣- نتایج و بحث

### ٣-١- بررسی رشد

میکروالگ جدا شده با انجام آزمون های مورفولوژیکی زیرمیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.سلول های گلابی شکل متحرک با تاژک های هم طول و کلروپلاست فنجانی با بزرگنمایی ٤٠ به وضوح قابل مشاهده بود.

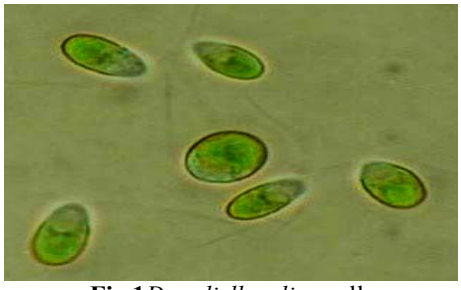

**Fig 1***Dunaliellasalina* cells

میزان رشد و تولید کاروتنویید در سیستم بتچ مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد بر اساس شمارش تعداد سلول در میلی متر مکعب و اندازه گیری دانسیته نوری با اسپکتروفتومتر در ٦٨٠ نانومتر پایش گردید. در طول دوره ٤٠ روزه، رشدی در محیط های کشت با شوری ٣٠ درصد مشاهده نشد بنابراین نتایج فقط در مورد محیط های کشت با ٢٠ و ١٠ درصد نمک گزارش می گردد. نمونه ها و شرایط تلقیح و کشت آنها در جدول شماره ١ آورده شده است.

**Table 1** Growth and culture condition of samples

| Container | NaCl% | pH | sample |
|---|---|---|---|
| 1 liter Erlenmeyer flask | 20 | 5.7 | A |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 20 | 5.9 | B |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 10 | 5.8 | C |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 10 | 5.9 | D |
| 500 mlErlenmeyer flask | 20 | 5.9 | E |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 10 | 5.7 | F |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 20 | 5.9 | G |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 20 | 5.8 | H |
| PET container | 20 | 5.9 | I |
| PET container | 20 | 5.9 | M |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 30 | 5.7 | N |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 30 | 5.8 | O |
| 1 liter Erlenmeyer flask | 30 | 5.9 | P |



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

پس از بررسی رشد می توان نتیجه گرفت به طور کلی جلبک در حدود دو هفته در فاز سازگاری به سر می‌برد و پس از آن رشد لگاریتمی خود را به مدت ۲ هفته ادامه می‌دهد. سپس یک فاز سکون کوتاه (در حدود یک هفته) را پشت سرگذاشته و وارد فاز مرگ می‌شود. نتایج حاصل از بررسی رشد به روششمارش تعداد سلول و اندازه گیری OD تا حدود زیادی بر یکدیگر منطبق می‌باشند. بیشترین میزان Biomass در دوره ٤٠ روزه حدود روز ۳۳ قابل مشاهده است. در روز ۲۱ رشد، یعنی پس از سه هفته از شروع تلقیح، نمونه‌های G, F, D, C و I همگی دارای بیش از ۱۰۰۰ سلول در میلی‌متر مکعب می‌باشند.

Cifuntes و همکارانش در سال ۱۹۹٦ دورهٔ رشد را در جلبک دونالیلا سالینا ٤٠ روزه در نظر گرفته‌اند [۱۳]. همچنین در مطالعهٔ Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۵ دوره‌های رشد مورد بررسی در جلبک دو نالیلا سالینا ٤٠ تا ٤٥ روزه در نظر گرفته شدند [۲]. البته بسته به شرایط محیط کشت و سویه مورد نظر دوره‌های رشد جلبک می‌تواند متفاوت باشد. در برخی مطالعات به علت محدودیت زمانی، دوره‌های رشد در مدت دو یا نهایت سه هفته مورد بررسی قرار می‌گیرد.

در مورد مقایسهٔ رشد در محیطهای مختلف، بیشترین رشد در محیط C، یعنی محیطی با pH:۸/۵ و شوری ۱۰ درصد مشاهده میشود به طوری که در روز ۳۳ رشد در هر میلی‌متر مکعب این محیط حدود ۵۵۰۰ سلول وجود دارد.

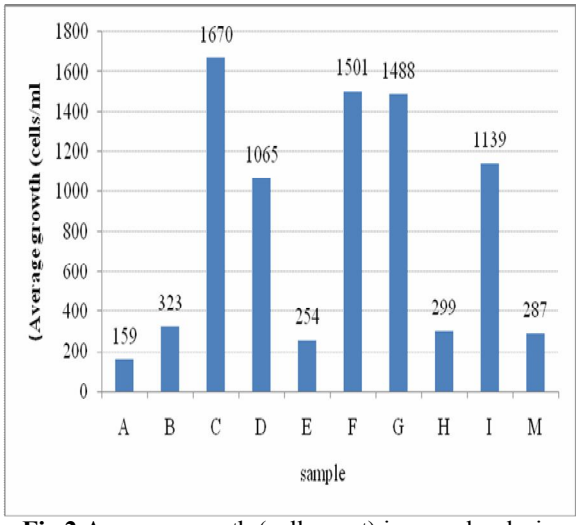


**Fig 2** Average growth (cell count) in samples during 37 days

علت توقف رشد در محیطهایی با نمک ۳۰ درصد می‌تواند به علت شوک اسمزی وارد شده به سلولها به دلیل تلقیح یکباره از محیطی با نمک حدود ۱۰ درصد به محیطی با ۲۰ درصد افزایش نمک باشد که به همین دلیل در یک دورهٔ ۵ هفته‌ای رشدی در محیطهای مذکور مشاهده نمی‌گردد.

اثر نمک محیط کشت بررشد جلبک، تحت تأثیر pH آن قرار می‌گیرد.

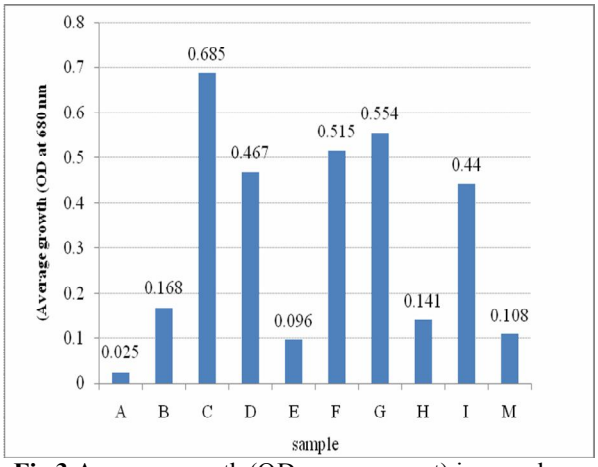


**Fig 3** Average growth (OD measurement) in samples during 39 days

بررسی اثر شوری بر روی جلبک *D.Salina* توسط محققان بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است و عمدهٔ این تحقیقات بر مبنای اندازه‌گیری میزان رشد و تولیدات سلولی (بخصوص کاروتنوئید) بوده است. به طور کلی روند افزایش شوری ،اثر منفی بر تولید تودهٔ زندهٔ سلولی دارد.

در سال ۱۹۸۹، Borowitzka نشان داد که روند رشد سلول با افزایش شوری کاهش می‌یابد [۱٤].

Kushnerو همکاران در سال ۱۹۹٦ نشان داند که غلظت نمک اپتیمم برای رشد دونالیلا ۱۵ درصد می‌باشد ،ولی در تحقیق انجام شده توسط قاسمی در سال ۱۳۷۸ این میزان ۱۰ درصد می‌باشد [۱۵].

در مطالعهٔ نیکوکار و همکاران در سال ۲۰۰٤ برروی تأثیر میزان نمک بر روی رشد دونالیلا سالینا (ایزوله شده از دریاچهٔ مهارلو) مشخص شد، بیشترین میزان رشد از بین محیطهای ۰/۵ تا ٤ مولار، در محیط کشت با ۲ مول نمک رخ می‌دهد [۱٦].



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

در پایان نامه کارشناسی ارشد سرکار خانم عمادی با عنوان بررسی فاکتورهای محیطی بر ارزش غذایی گونه دونالیلا سالینا نیز از بین شوری ۰/۵ تا ٤ مولار بیشترین رشد در شوری ۲ مولار و pH: ۸/۵ گزارش شده در این مطالعه دوره رشد ۲۸ روزه بررسی شده است [۱۰].

## ۳-۲- تولید کاروتنویید

میزان بتاکاروتن در روزهای ۲۱،۲۸،۳۵ و ٤۲ بر اساس میلی گرم در سلول و میلی گرم در لیتر محیط کشت اندازه گیری شد.

در بین تمامی نمونه‌ها تولید کاروتنوئیدها در نمونهٔ C از همه بیشتر بوده و به طور میانگین به حدود ۱۰ میلی گرم در لیتر محیط کشت می‌رسد. در روز ٤۲ میزان کاروتنوئید تولیدی در نمونهٔ C به ۹۵/۱٤ میلی گرم در لیتر محیط کشت و $۳۲\times۱۰^{-۱۰}$ میلی گرم در هر سلول می‌رسد.

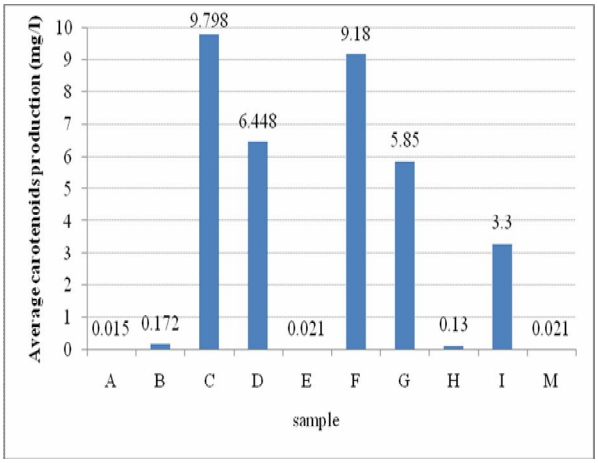


**Fig 4** Average carotenoids production in samples (mg/l)

بیشترین میزان تولید کاروتنوئیدها در حدود هفتهٔ ششم رشد جلبک قابل مشاهده است یعنی در بین روزهای ۳۰ الی ٤۰ ،بیشترین تولید کاروتنوئید حاصل می‌شود که البته این امر با رشد سلولها و تولید بیومس سلولی نیز قابل تطبیق است . کمترین میزان تولید کاروتنوئید نیز در محیط A مشاهده می‌شود (این نتایج با رشد سلولها در این محیطها رابطهٔ مستقیم دارد).

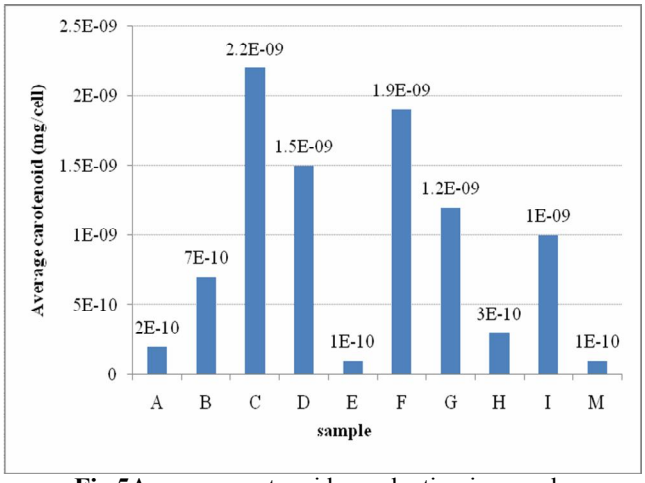


**Fig 5**Average carotenoids production in samples (mg/cell)

در مطالعهٔ فاضلی و همکاران در سال ۲۰۰٦ تأثیر شوری بر تولید β- کاروتن توسط دونالیلا که از دریاچهٔ نمک ارومیه جدا گردید، بررسی شد. اثر غلظت‌های نمک بین ۰/۵ تا ۳ مول از NaCl بر روی کاروتنوئید کل و β- کاروتن مطالعه گردید. نتایج نشان داد که بالاترین میزان کاروتنوئید ردیابی شده ۱۱/۷۳ میلی گرم در لیتر بود که در شوری معادل۰/۵ مولار کلرور سدیم و در فاز سکون به دست آمد. این نتایج نشان داد که میزان کاروتنوئیدها و نسبت ایزومرهای β-کاروتن در میکرو آلگ جدا شده از دریاچه ارومیه، با میزان نمک و مرحلهٔ رشد آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۱۲].

در تحقیق سرمد و همکاران سویه‌های دونالیلا سالینادر غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ مولار کلرور سدیم رشد داده شدند. در طی مطالعه، تولید بتاکاروتن به ازای واحد محیط کشت جانسون و همینطور به ازای هر سلول در مدت ۳۰ روز در کشت‌های بچ بررسی شدو نتیجه بررسی نشان داد که القای بتاکاروتن در سلول‌های جلبک کاملاً وابسته به سویهٔ آن می‌باشد به علاوه اینکه افزایش نمک باعث کاهش چشمگیر تعداد سلولها و در نتیجه کاهش میزان بتاکاروتن تولیدی به ازای واحد محیط کشت می‌گردد که مورد اخیر در مورد تمامی سویه‌های موجود در مطالعه صادق است. در این مطالعه بیشترین بتاکاروتن تولیدی ۱٤/۲میلی‌گرم به ازای ۱ لیتر از محیط کشت در سویهٔ Au-W و در محیط کشت با غلظت کلرور سدیم ۱ مولار به دست آمد که



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

با نتایج این پایان نامه تا حدود زیادی مطابقت دارد. در مطالعهٔ سرمد همچنین اشاره گردیده که یکی از عوامل تولید بتاکاروتن پایین به ازای هر سول می‌تواندبه علت غیر کاروتنوژنیک بودن سویه از نظر ژنتیکی باشد [۱۷].

در مطالعهٔ Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بررسی تأثیر نمک بر روی کمیت و کیفیت کاروتنوئیدهای یک سویه از دونالیلاسالینا و یک سویه از دونالیلا بار داویل، غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ مول از کلرور سدیم در دو محیط کشت PES و ART بررسی شدند. نتایج حاصله نشان داد که بیشترین میزان کاروتنوئید در هر سلول در غلظت ۲ مولار کلرور سدیم حاصل شده است [۱۸].

در پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان شناسایی دونالیلا و استخراج بتاکاروتن آن در خلیج فارس بیشترین تولید کاروتنویید در شوری ۲۵ درصد وpH برابر ۷ گزارش شده است[۹].

## ٤- نتیجه گیری

در یک بررسی کلی از نتایج حاصله می‌توان به این نکته دست یافت که روند تولید در کلیهٔ تیمارها تا حدود زیادی متناسب با روند رشد بوده است. تولید کاروتنویید تحت الشعاع تعداد و روند رشد و نکثیر سلول ها در هر محیط کشت قرار می گیرد. به علاوه با مقایسه نتایج این تحقیق با دیگر مطالعات متوجه می‌شویم که در هر بررسی، نتایج حاصله علاوه بر شرایط حاکم بر رشد و تولید محصول در جلبک، شدیداً به سویه نیز وابسته است و بنابراین نتایج حاصله تنها به سویه مورد مطالعه قابل تعمیم می‌باشد و برای بهینه کردن رشد و تولید محصول مورد نظر باید به صورت اختصاصی بر روی همان سویه کار شود. همچنین ترکیب فاکتورهای مختلف، اثرات پیچیده‌ای را بر میزان و کیفیت کاروتنهای القا شده در سلول می‌گذارد و نمی‌توان تنها یک ست آپ مشخص را برای کاروتنوژنسیس در این میکروآلک تبیین نمود.به طوز کلی ارتباط قوی میان ظرفیت طبیعی هر سویه و میزان پاسخ به عوامل القاگر محیطی وجود دارد. بنابراین امروزه بیشتر سوگیریها به سمت مطالعات ژنتیکی و دستکاری‌های ژنتیکی به منظور افزایش و بهبود تولید محصول می‌باشد.

امروزه در بیشتر نقاط دنیا به تولید انبوه جلبک *D.salina* در حوضچه‌های آب شور اقدام گردیده است. در واقع استفاده بهینه از استخرهای آب شور با تولید بالای جلبک دونالیلا راهی برای بهره برداری از این اکوسیستمها می‌باشد. در کشور ما نیز منابع آب شوری چون، دریاچه نمک قم، دریاچه ارومیه، دریاچه مهارلو شیراز می‌توانند قطب‌های تولید این جلبک مقاوم باشند این در حالی است که خود این منابع آبی حاوی جلبک فوق نیز می‌باشند. بهره‌برداری از تولیدات سلولی *D.salina* به صورت بتاکاروتن و گلیسرول و همینطور استفاده خود جلبک به صورت پودر شده امروزه در کشورهای مختلف جهان رایج و مرسوم است. در واقع رشد و کشت جلبک فوق جهت دستیابی به یک منبع بیولوژیکی، برای تولید بتاکاروتن و گلیسرول هدف عمده محققان و تولید کنندگان این جلبک را تشکیل می‌دهند. به این ترتیب حوضچه‌های آب شور منابع تولیدی جهت دو ترکیب مهم گلیسرول و بتاکاروتن محسوب می‌گردند تا به این ترتیب از هزینه‌های هنگفت تولید آنها به روشهای سنتز شیمیایی کاسته گردد. عمدتاً استفاده از منابع زیستی با فن‌آوری زیستی- بیوتکنولوژی امروزه یکی از موثرترین و کارآمدترین روشها برای برآوردن نیازهای جوامع بشری است. استفاده از منابع آبی از جمله جلبک سبز *D.salina* نیز در این میان سهم به سزایی را به خود اختصاص می‌دهد. جلبک *D.salina*به واسطه وجود بتاکاروتن می‌تواند در کیفیت رنگی محصولات دریایی که از آن تغذیه می‌کنند چون میگو و آرتیما موثر باشد. از دونالیلا به عنوان یک پروتیین تک یاخته یا S.C.P نیز استفاده می‌شود.

تهیه کلکسیون از گونه های مختلف دونالیلا در ایران ، شناسایی سویه هاو بررسی جامع پتانسیل آنها در تولید مواد طبیعی در کنار شناسایی مناطق مناسب کشت تجاری جلبک راهکار موثری در جهت صنعتی نمودن این تولیدات است.

## ۵- سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و در محل پژوهشکده بیوتکنولوژی این سازمان انجام گرفت.



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

## ٦- منابع


[1] Arvanitoyannis, I. S., Houwelingen-Koukaliaroglou, M. V, 2005, Fundamental foods:a survey of health claims ,pros and cons and current legislation ,critical reviews in food science and nutrition ,45:385-404.

[2] Gomez, P., Gonzalez, M., 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliellasalina* cultivated under laboratory conditions. Biol. Res., 38: 151-162.

[3] Ye, Z., Jiang,J.,Wu,G.,2008, Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella* :progress and prospects ,Biotechnology Advances ,121,1-9.

[4] Deshparde, A., 2005,Optimization of growth of *Dunaliellasalina* for carotenoid production ,A thesis presented to the faculty of the school of engineering, University of Southern California.

[5] Borowitzka, M. A., 2005, Carotenoid production using microorganisms ,AOCS Press ,chapter 9.

[6] Dufosse, L., Galaup, P., Yaron,A., 2005,Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use :a scientific oddity or an industrial reality ?,Trends in Food Science and Technology,16,389-406.

[7] Gomez, P., Gonzalez, M.,2001, Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalgae D. salinaTeodoresco (chlorophyta) ,Biological Research, V. 34, n.1.

[8] Heidari, R., Riahi,H., Saadatmand, S., 2000, Effect of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins in *Dunaliellasalina*Teodoresco,Journal of Science, Iran, 12.

[9] Emtiyazjoo,M.,1995, Identification and extraction of β-carotene from *Dunaliellasalina* isolated from Persian Gulf, A thesis presented to the Islamic Azad University.

[10] Emadi Jamali, M., 2000, Effect of environmental factors on the nutritional quality of *Dunaliellasalina*, A thesis presented to the ShahidChamran University.

[11] Lichtenthaler,H.K.,1987,Chlorophylls and carotenoids:pigments of photosynthetic biomembranes,Methods Enzymol.,148,350-382.

[12] Fazeli, M., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., 2006, Effect of salinity on β-carotene production by *Dunaliellatertolecta* DCCBC26 isolated from Urmia salt lake, north of Iran, Bioresource Technology, 97: 2453-2456.

[13] Cifuntes, A.M., Gonzales, A., Parra, O., 1996, The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliellasalina*, Biol. Res., 29,227-239.

[14] Borowitzka ,L.J., Borowitzka, M.A,1989, B-carotene (provitamin A) production with algae. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, Elsevier Applied Science, London, 15-26.

[15] Ghasemi,H.,1999,Glycerol production by *Dunaliella*algae,A thesis presented to the TarbiyatModarres University.

[16] Nikookar, K., Moradshahi, A., Kharati, M., 2004, Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliellasalina* isolated from Maharlu salt lake in Shiraz, Iranian Joural of Science and Technology, Vol. 28, No. A 1.

[17] Sarmad, J., Shariati, M., Tafreshi, A.H. ,2006, preliminary Assessment of B-carotene Accumulation in four strains of *Dunaliellasalina* cultivated under the different salinities and low light intensity, Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(8), 1492-1496.

[18] Gomez, P., Barriga, A., Cifuentes, A.S., Gonzalez, M., 2003, Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by D.salina (strain CONC-007) and D. bardawil (strain ATCC 30861) Chlorophyta, Biol. Res., 365-192.




[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]

# β-carotene production by native *Dunaliellasalina* strain

**Tavallaie, S. [1*], Rostami, Kh. [2], Mazaheri Asadi, M. [2]**

1. Student of Faculty of Agriculture, Science and Resereh Branch, Islamic Azad university(IAU)
2. Iranian Research Organizations for Science and Technology

**(Received: 2011/05/14 Accepted:2011/08/13)**

There is an increasing demand for using natural carotenoids in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.Carotenoids are one of the food supplements that is synthesized naturally in photosynthetic organism.For an attitude towards carotenoids production from biosynthetic passway, bioresources are more considered. Content of the bioavailable 9-sis steroisomer in *Dunaliella*, is higher than other natural carotenoids resources.This microalgae is the main natural resource for β-carotene production. *Dunaliellasalina* have been exploited commercially for β-carotene rich *Dunaliella* powder and natural β-carotene for three decades. This algae is able to live in various conditions, where it can live in saltish range between 0.4 to 5 M of NaCl and pH range between 5.5 to 11. Carotenoids are formed in algae chloroplast under stress condition.In this study the production of carotenoids by *Dunaliellasalina* isolated from Hoze-soltan salt lake, in different NaCl and pH condition in Johnson medium are investigated .The survey conducted within 40 days growth period.The results indicate that pigmentation correlates well with growth rate and the optimum amount for growth andcarotenoids production was determined in culture with 10% NaCl and pH equal to 8.5. The most amount for carotenoids was equal to 14.95 mg per lit in day 42.

**Keyword:** β-carotene, *Dunaliellasalina*, Food biotechnology, Salt lake

* Corresponding Author E-Mail Address: satavallaee@yahoo.com



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-26 ]