

پتانسیل تولید بتاکاروتن از دونالیلا سالیئا دریاچه شاهی تحت استرس‌های شوری

زیبا مقدسی¹، *مژگان امتیازجو²، محمد ربانی²، مرجان امتیازجو³، اذن‌اله آذرگشپ⁴ و نریمان مصفا⁴
¹ فارغ‌التحصیل بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، تهران، ایران، ² دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، تهران، ایران، ³ دانشگاه USM، گروه بیوتکنولوژی، پینانگ، مالزی، ⁴ دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم پزشکی، تهران، ایران
 تاریخ دریافت: 88/1/24؛ تاریخ پذیرش: 89/6/18

چکیده

کاروتنوئیدها به‌طور وسیع برای کاربرد دارویی، غذایی، ماده افزودنی و مواد آرایشی به‌عنوان رنگ‌ها و مواد ضداکسیدانی و ضدسرطانی استفاده می‌شوند. دونالیلا نیز به‌عنوان یک منبع طبیعی در تجمع مقدار زیاد کاروتنوئیدها مطرح می‌باشد. در این مطالعه اثر غلظت‌های نمک 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35 و 40 درصد روی تولید بتاکاروتن در میکروجلبک دونالیلا بررسی شده است. دونالیلا از دریاچه شاهی واقع در جنوب تهران جداسازی و خالص‌سازی گردید. جهت کشت انبوه، از محیط کشت جانسون تغییر یافته استفاده شد. ارلن‌های حاوی محیط کشت در شرایط مطلوب کشت داده شدند. جهت بررسی مقدار بتاکاروتن عصاره‌های به‌دست آمده از تیمارها با HPLC آنالیز گردید. نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های جلبکی با شوری‌های مختلف (0، 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35 و 40 درصد) در محیط کشت آنها بر میزان تولید بتاکاروتن اختلاف معنی‌داری (0/0001) را نشان داد. بالاترین میزان تولید بتاکاروتن معادل 0/33 میکروگرم در لیتر در شوری 25 درصد به‌دست آمد. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت تا میزان شوری 25 درصد، مقدار بتاکاروتن افزایش و سپس کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن، دونالیلا سالیئا، شوری، HPLC

مقدمه

طی سال‌های اخیر تحقیقات قابل ملاحظه‌ای برای استفاده از میکروجلبک‌ها به‌عنوان غذا و دارو از جمله دونالیلا صورت گرفته است. این جلبک به‌دلیل ذخیره بالایی از بتاکاروتن از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد (Raja و همکاران، 2007). بتاکاروتن یک رنگدانه تر پنوئیدی است که استفاده از آن به‌عنوان پیش ماده ویتامین A و داشتن خصوصیات ضداکسیدانی و ضدسرطانی و دافع رادیکال‌های آزاد در درمان بعضی از بیماری‌ها با ارزش می‌باشد (Raja

و همکاران، 2007؛ Gomez و همکاران، 2003؛ Poppel و Goldbohm، 1995). بتاکاروتن دارای ایزومرهای مختلف مانند 9 سیس و تمام ترانس است که 80 درصد کل بتاکاروتن در دونالیلا را تشکیل می‌دهند (Gomez و همکاران، 2003). این جلبک می‌تواند در محیط کشت شامل طیف وسیعی از غلظت‌های مختلف نمک از 0/29 درصد تا حالت اشباع (400 ppt) زنده بمانند (Hui و همکاران، 2009؛ Karni و Avron، 1988؛ Oliver و همکاران، 2009). از ترکیبات مهم درون سلولی دونالیلا می‌توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول،

*- مسئول مکاتبه: moz_emtyazjoo@yahoo.com

مواد و روش‌ها

کشت جلبک: نمونه‌برداری از آب دریاچه شاهی توسط بطری‌های دهانه گشاد استریل انجام شد. نمونه برداشت شده جهت خالص‌سازی دونالیلا از سایر پروکاریوت و یوکاریوت‌های موجود در دریاچه از تیمار دی‌اکسیدژرمانیوم و استروپتومايسن استفاده شد (Rengasamy و همکاران، 1987؛ Lewin، 1996). همچنین با استفاده از تغییرات pH و چندین بار شستشو توسط سانتریفوژ (R 5810 Eppendroph) با محیط کشت جانسون، تابش اشعه ماورای بنفش به مدت 10-15 دقیقه و به‌کارگیری کاغذهای صافی با قطر منافذ متفاوت (45٪ و 1/2 میکرون)، تغییرات شوری 30-50 درصد، دونالیلا به‌طور کامل خالص سازی شد (امتیازجو، 1379؛ Raja و همکاران، 2007؛ Massyuk، 1973؛ Michael Garcia و همکاران، 2007). محیط کشت اصلاح شده جانسون برای کشت جلبک استفاده شد. این محیط کشت از ترکیبات زیر تشکیل شده است: 1 g KNO_3 ، $0/033 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ ، $0/2 \text{ g KCl}$ ، $0/2 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، $0/043 \text{ g NaHCO}_3$ ، $0/5 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $1/5 \text{ g MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $189 \text{ mg Na}_2\text{EDTA}$ ، $244 \text{ mg FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $4/1 \text{ g ZnCl}_2$ ، $4/1 \text{ g MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، $5/1 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، $6 \text{ g Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، $19 \text{ g H}_3\text{BO}_3$ و غلظت‌های مختلف نمک 5، 10، 15، 25، 30، 35 و 40 درصد به محیط کشت اضافه شد. pH محیط کشت نیز روی 8 تنظیم گردید (Garcia و همکاران، 2007). سلولها در فلاسک‌های 500 میلی‌لیتری با سر بطری‌های پنبه‌ای شفاف حاوی 200 میلی‌لیتر محیط کشت در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد تحت تابش نور 1500 لوکس در یک دوره 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی کشت داده شد. چگالی سلولی اولیه 10^4 سلول انتخاب گردید (Fazeli و همکاران، 2006؛

پروتئین و ویتامین‌ها اشاره نمود. این جلبک از ویژگی منحصر به فردی برخوردار می‌باشد، به‌گونه‌ای که تحت شرایط مختلف استرس‌زا مانند شوری بالا، افزایش نور، محدودیت‌های غذایی نظیر فسفر و نیتروژن پاسخ‌های فیزیولوژی خاصی نظیر افزایش ساخت گلیسرول، تجمع کاروتنوئیدها، به‌خصوص بتاکاروتن (9 سیس، تمام ترانس) و پروتئین و ویتامین‌های ضداکسیدانی را نشان می‌دهد (Raja و همکاران، 2007؛ Takaji و همکاران، 2006؛ Gomez و همکاران، 2003؛ Vorst و همکاران، 1994؛ BenAmotz و Avron، 1983). در این رابطه پژوهش‌های زیادی برای جمع کردن کاروتنوئیدها در دونالیلا سالینا و *D. bardawil* در شرایط استرس‌زا انجام گرفته است. BenAmotz و همکارانش در سال 1988 با مطالعه بر روی *D. bardawil* نشان دادند که شدت نور باعث افزایش کاروتنوئیدها گردیده است (BenAmotz و همکاران، 1988). Borowitzka و همکارانش در سال 1990 و Cifuentes و همکارانش در سال 1996 ثابت کردند که افزایش شوری باعث تجمع کاروتنوئیدها در جلبک سبز دونالیلا سالینا شده است. پژوهش‌های انجام شده بر روی اثر دما نیز افزایش رشد و تولید بتاکاروتن را نشان داده است (Cifuentes و همکاران، 1996؛ Markovits و همکاران، 1993؛ Araneda و همکاران، 1992). شوری یکی از پارامترهای مناسب برای این هدف در کشت‌های باز دونالیلا برای کاربردهای تجاری است (Gomez و همکاران، 2003). هدف این مطالعه نیز بررسی اثر این پارامتر بر روی تجمع بتاکاروتن در دونالیلا سالینا جدا شده از دریاچه شاهی است.

شامل شکستن سلول تا خالص سازی بتاکاروتن می باشد. بعد از استخراج کاروتنوئیدها به همراه آنها ترکیبات غیر کاروتنوئیدی نیز وجود دارد و به عنوان ناخالصی محسوب می شوند که تا حد امکان باید جدا شوند. جهت جدا کردن ناخالصی ها و همچنین برخی از کاروتنوئیدها به جز بتاکاروتن از فرایند صابونی کردن استفاده شد. این واکنش با استفاده از متانولیک پتاس (پتاس و متانول به نسبت 10:5) انجام شد. جهت اجتناب از آسیب به ساختار بتاکاروتن به جای حرارت در این واکنش نمونه ها به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق به منظور کامل شدن واکنش صابونی شدن نگهداری شدند. پس از عمل صابونی کردن مخلوط وارد قیف جداسازی گردید تا دو فاز موجود از همدیگر جدا شوند. فاز فوقانی طی چند مرحله شستشو با آب مقطر و استفاده از محلول فنل فتالین به کار گرفته شد (امتیازجو، 1379؛ Garcia و همکاران، 2007؛ BenAmotz و Avron، 1983؛ Hatts، 1987؛ Mayer&Isler، 1971؛ Klavi، 1981). برای تعیین مقدار بتاکاروتن نمونه ها از آنالیز HPLC مدل 9000، south korea *young Lin Acme* نوع ستون *Lichrosphere Rp* با اندازه ذرات 4 میکرون و قطر 4/6 سانتی متر و طول 25 سانتی متر در طول موج 450 نانومتر توسط DAD/UV و در فاز متحرک استو نیتریل: متانول (9:1) استفاده شد (Fazeli و همکاران، 2006). برای سنجش میزان بتاکاروتن از بتاکاروتن استاندارد سیگما با کد C4582 استفاده شد و منحنی استاندارد ترسیم گردید. مقدار بتاکاروتن تیمارهای نمکی با استفاده از منحنی استاندارد و با توجه به سطح زیر منحنی به دست آمد.

آنالیز آماری: داده های به دست آمده توسط بسته نرم افزاری Spss 16 و آنالیز آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

Garcia و همکاران، 2007). بخشی از عملیات فوق در دانشکده علوم و فنون دریایی واحد تهران شمال و بخش دیگر در سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران انجام شد.

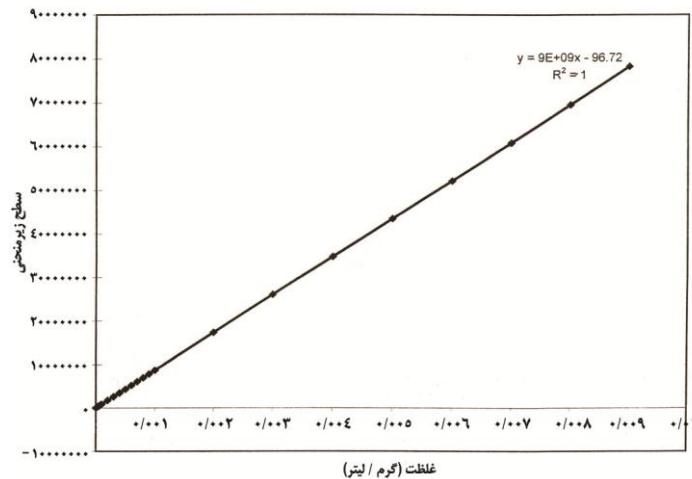
استخراج بتاکاروتن جلبک در تیمارهای مختلف شوری: تیمارهای نمکی توسط سانتریفوژ (R 5810 Eppendroph) با 3500 دور در دقیقه در مدت زمان 10 دقیقه از محیط کشت جداسازی شدند. مجموعه تغلیظ شده جهت خشک شدن به دستگاه فریز درایر (Christ , Alpha 1-2 LD Plu) با دمای 80- انتقال یافت. 5 گرم پودر خشک از هر تیمار برای تعیین میزان بتاکاروتن استفاده شد. برای شکستن سلول ها و خروج بتاکاروتن از پوتر استفاده شد (Garcia و همکاران، 2007؛ Chidambara و همکاران، 2005). عصاره گیری با استفاده از 10 میلی لیتر استن 99 درصد سرد و سانتریفوژ (R 5810 Eppendroph) با 5000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه استفاده گردید. هر بار قسمت رویی جمع آوری و به قسمت زیرین مجدداً استن اضافه شد. محلول به دست آمده توسط هگزان و نمک 3 درصد در یک قیف جدا کننده کاملاً مخلوط و به مدت 2 ساعت به یخچال منتقل گردید تا فازها از همدیگر جدا شوند. به فاز بالایی 15 میلی لیتر متانول 92 درصد اضافه گردید تا دو فاز از همدیگر جدا شدند. فاز بالا شامل اتر نفت، کلروفیل a، کاروتن و فاز پایین شامل متانول و کلروفیل b و گزانتوفیل است به فاز زیرین 15 میلی لیتر دی اتیل اتر اضافه و سپس در طی 4 مرحله کلرید سدیم 3 درصد به محلول اضافه گردید. پس از جدا نمودن در دکانتور فاز زیرین دور ریخته شد و فاز روئی آن به دکانتور محتوی ان هگزان، کلروفیل a و کاروتن ریخته شد (امتیازجو، 1379).

روش های خالص سازی عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از جلبک: برای جداسازی کاروتنوئیدها روش هایی دنبال شد که این روش ها

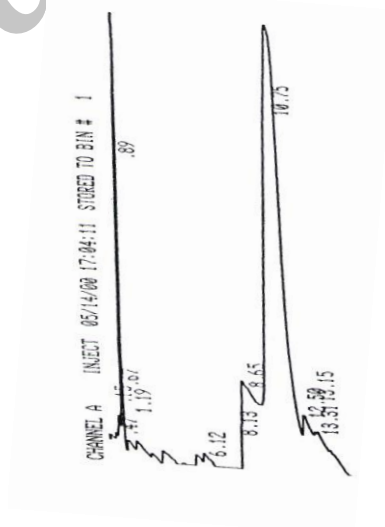
نتایج

نتایج به دست آمده از میانگین غلظت‌های مختلف بتاکاروتن تولید شده در شوری‌های مختلف نشان داد که ارتباط آماری معنی‌داری بین درصد شوری و تولید بتاکاروتن وجود دارد ($P < 0/001$). اختلاف معنی‌دار بین درصدهای شوری از نظر تولید بتاکاروتن با استفاده از آزمون تعقیبی توکی که برای مقایسه دو به دو میانگین‌ها است در جدول 2 ارائه شده است. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت تا میزان شوری 25 درصد، مقدار بتاکاروتن افزایش و سپس کاهش می‌یابد (شکل 3).

نتایج حاصل از آنالیز جلبک توسط دستگاه HPLC در شکل‌های 1 و 2 آمده است. بررسی نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های جلبکی با درصد شوریه‌های مختلف (0، 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35 و 40 درصد) در محیط کشت آنها نشان داد که افزایش میزان شوری باعث افزایش تولید بتاکاروتن گردیده است. نتایج حاصل از تأثیر درصد شوری‌های مختلف در تولید بتاکاروتن در جدول 1 نشان داده شده است. بالاترین میزان تولید بتاکاروتن در شوری 25 درصد و معادل 0/33 میکروگرم در لیتر است. بررسی آماری



شکل 1- آنالیز غلظت‌های مختلف استاندارد بتاکاروتن توسط HPLC

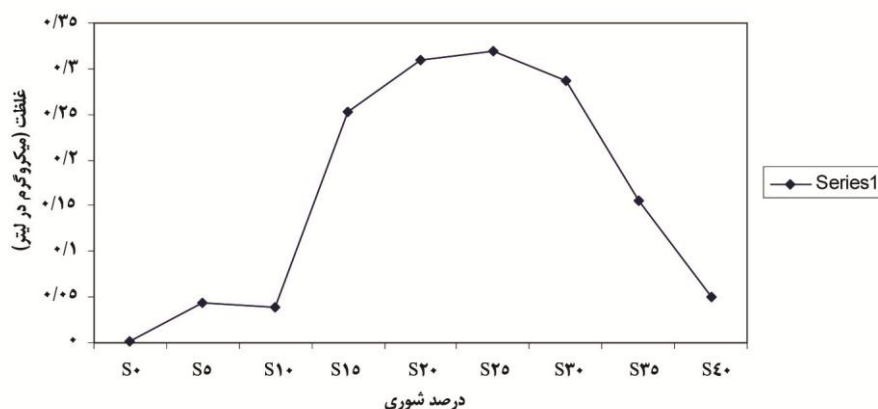


شکل 2 - نمونه جذب در طول موج 450 نانومتر [HPLC]

جدول 1- میانگین و انحراف معیار بتاکاروتن تولید شده توسط جلبک دونالیلا سالینا در غلظت‌های مختلف شوری

شوری (درصد)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
غلظت (میکروگرم بر لیتر)	0	0.043±0.011	0.002	0.121	0.312±0.072	±0.089	0.286±0.046	±0.032	±0.026
			0.038±	0.252±		0.318		0.156	°0.051

* Mean ± SD



Salinity(S): (0,5,10,15,20,25,30,35,40)

شکل 3 - اثر شوری‌های مختلف در محیط کشت دونالیلا سالینا بر تولید بتاکاروتن

بحث و نتیجه‌گیری

جلبک دونالیلا به دلیل نداشتن دیواره سلولی محکم در پاسخ به تغییرات خارج سلولی هیپو یا هایپراسموتیکی مثل شوری‌های بالا، با سنتز گلیسرول، تجمع بتاکاروتن و تغییرات حجم سلولی، تغییرات غلظت‌های یونی درون سلولی و بیان ژن‌های القاکننده بعضی پروتئین‌های مخصوص و آنزیم‌ها، تعادل اسمزی خود را حفظ می‌کنند (Raja و همکاران، 2007). تحقیقات صورت گرفته توسط Hui و همکاران در سال 2009، مشخص نمود که پاسخ اسموتیکی دونالیلا سالینا نسبت به تغییرات شوری با افزایش مقدار گلیسرول همراه است (Hui و همکاران، 2009). همچنین Takaji و همکاران در سال 2006 نشان دادند که افزایش شوری از 2/9 به 5/8 درصد به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان گلیسرول را

در دونالیلا افزایش داد (Takaji و همکاران، 2006). نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت تا میزان شوری 25 درصد، مقدار بتاکاروتن افزایش و در غلظت‌های بالاتر شوری کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند مربوط به ویژگی سازشی مهم جلبک باشد که بدون این‌که همه تولیدات انرژی خود را استفاده کند بتوانند شرایط‌های استرس شوری را تحمل کند. جلبک در غلظت‌های زیاد نمک با مهار کردن واکنش‌های متابولیکی خود باعث افزایش بقا خود برای یک مدت طولانی در شرایط نا مساعد می‌شوند (Alyabev و همکاران، 2007). براساس جدول 1 بهترین شوری تولید بتاکاروتن در شرایط معمولی عمدتاً با pH=8 و دمای 25 درجه سانتی‌گراد و شدت نور 1500 لوکس و دوره نوری 12 ساعت

دونالیلا سالیبا و *D. bardawil* ثابت کردند که افزایش نمک 5/8-17/4 درصد مولار باعث افزایش تولید بتاکاروتن گردیده است (Gomez و همکاران، 2003؛ BenAmotz و همکاران، 1988). Fazeli و همکاران در سال 2006 و Cifuentes در سال 2001، نشان دادند که شوری 2/9 درصد بر روی *D. tertiolecta* باعث افزایش قابل ملاحظه کاروتنوئیدها در درون سلول شده است (Fazeli و همکاران، 2006؛ Cifuentes و همکاران، 2001). Garcia و همکاران در سال 2007 نیز نشان دادند که افزایش نمک از 10 به 35 درصد باعث افزایش رشد و تجمع بتاکاروتن در دونالیلا شده است (Garcia و همکاران، 2007). در مطالعه حاضر نیز محرز گردید که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت این جلبک تا 25 درصد، تولید بتاکاروتن نیز افزایش می‌یابد.

روشنایی و 12 ساعت تاریکی برابر 25 درصد با غلظت بتاکاروتن 0/33 میکروگرم بر لیتر می‌باشد. این نتیجه با نتایج Volcani در سال 1944 و Shilo و Oren در سال 1982 و امتیازجو در سال 1379 مطابقت دارد. همچنین اثر غلظت نمک بر رشد و تولید بتاکاروتن در دو جلبک *D. bardawil* و *D. tertiolecta* نشان داد که دامنه شوری بین 5-25 درصد برای رشد این دو جلبک مناسب است (Gomez و همکاران، 2003؛ Cifuentes و همکاران، 1996). Kushner و همکاران در سال 1978، غلظت نمک لازم برای رشد بهینه در جلبک *D. bardawil* و *D. tertiolecta* به ترتیب 5-25 درصد گزارش کردند. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج مذکور مطابقت دارد. Gomez و همکاران در سال 2003 و BenAmotz در سال 1988، با مطالعه بر روی اثرات شوری بر تجمع کاروتنوئیدها در

جدول 2 - نتایج مقایسه سطح معنی‌داری دو به دو درصد‌های شوری از نظر تولید بتاکاروتن

p-value	درصد شوری	p-value	درصد شوری
< 0/001	40 ، 15	< 0/001	15 ، 5
< 0/01	35 ، 20	< 0/001	20 ، 5
< 0/001	40 ، 20	< 0/001	25 ، 5
< 0/006	35 ، 25	< 0/001	30 ، 5
< 0/001	40 ، 25	< 0/001	15 ، 10
< 0/048	35 ، 30	< 0/001	20 ، 10
< 0/001	40 ، 30	< 0/001	25 ، 10
-	-	< 0/001	30 ، 10

منابع

- 1- امتیازجو م، 1379. شناسایی جلبک تک سلولی دونالیلا از خلیج فارس و استخراج بتاکاروتن از این ارگانسیم. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی واحد تهران شمال، 141 صفحه.
2. Alyabyev, A.J.U., Loseva, N.L., Gordon, L.Kh., Andreyeva, I.N., Rachimova, G.G., Tribunskih, V.I., Ponomareva, A.A., and Kemp, R.B., 2007. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. *Thermochimica Acta* 458, 65–70.
3. Araneda, P., Jimenez, C., and Gomez-Silva, B., 1992. Microalgae from Northern Chile III. Growth and beta carotene content of three isolates of *Dunaliella salina* from the Atacama Desert. *Revista de Biología Marín de Valparaiso* (Chile) 27, 157-162.
4. Ben-Amotz, A., and Avron, M., 1983. On the factors which determine the massive β carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol*, 78, 593-7.
5. Ben-Amotz, A., Lers, A., and Avron, M., 1988. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*, 86: 1286-1291
6. Borowitzka, A.M., Borowitzka, L., and Kessly, D., 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl Phycol*. 2, 111-119
7. Cifuentes, A.S., Gonzalez, M.A., and Parra, O., 1996. The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Biol Res*. 29, 227-236.
8. Cifuentes, A.S., Gonzalez, M.A., Inostroza, I., and Aguilera, A., 2001. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *J. Phycol*. 37, 334–344.
9. Chidambara, M.K.N., Vanita, A., and Rajesha, A., 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* a green micro alga. *Life Sciences* 76, 1381-1390.
10. Elbaz, K.F., Aboul-Enein, A.M., El-Baroty, G.S., Youssef, A.M., and Abdel-Baky, H.H., 2002. Accumulation of anti oxidant vitamins in *Dunaliella salina*. *Online Journal of Biological Sciences* 2(4), 220-223.
11. Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., and Jamalifar, H., 2006. Effect of salinity on β carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology* 97, 2453-2456.
12. Garcia, F., Pelegrin, Y.F., and Robledo, D., 2007. Physiological characterization of *Dunaliella sp.* (Chlorophyta, volvocales) from Yocatan, Mexico. *Bioresource technology* 1359-1365.
13. Gomez, P., Barriga, A., Cifuentes, A.S., and Gonzalez, M.A., 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC30861) chlorophyta. *Biol Res*. 36, 185-192.
14. Hatts, W.T., 1987. Extraction of carotenoid pigments from algae Australian patent application, No 69260/87.
15. Hui, C., Jian, G.J., and Guang, H., 2009. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J. Agric. Food Chem*. 57 (14), 6178-6182.
16. Hui C., Jian G.J., and Guang H., 2009. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Cell Physiol*. 219(2), 251-258.
17. Karni, L., and Avron, M., 1998. Ion content of the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Cell Physiol*. 29, 1131-1314.
18. Klavi, H., 1981. Industrial and commercial uses of carotenoids. In *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*, ed. G. Britton, T.W. Pergamon Press, Oxford, pp. 309-328.
19. Kushner, D.J., 1978. Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria. In *Microbial Life in Extreme Environments* (ed. D.J. Kushner), pp. 171-215. New York. Academic Press.
20. Liwin, J., 1966. Silicon metabolism in diatom. Germanium-di-oxid a specific inhibitor of diatom growth. *J. Phycol*. 6, 1-12.

21. Markovits, A., Gianelli, M., Coneteros, R., and Erazo, S., 1993. Strain selection for β carotene production by *Dunaliella*. *World J. of Microbiol and Biotech* 9, 534-537.
22. Mayer, H., and Isler, O., 1971. Total syntheses in carotenoids, ed.o. Isler birkhauser Basle. pp.297-307.
23. Massyuk, 1973. Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization. Kiev; Naukova Dumka. Massyuk. 312 pp.
24. Michael A., Borowitzka, Christopher J., Siva, 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J. Appl Phycol.* 19, 567-590.
25. Oren, A., and Shilo, M., 1982. Population dynamics of *Dunaliella parva* in the Dead Sea. *J. of Limnol. Oceanogr.* 27(2), 201-211.
26. Oliver, B., Caumette, P., Garcia, J., and Mah, R.A., 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* 58, 27-38.
27. Poppel, G.V., and Goldbohm, R.A., 1995. Epidemiologic evidence for β carotene and cancer prevention. *Am J. Clin Nutr.* 62, 1393S - 402S.
28. ^aRaja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D., and Rengasamy, R., 2007. Protective effect of *Dunaliella salina* against experimentally induced fibrosarcoma on Wistar rats. *Microbial Re.* 162(2), 177-84.
29. ^bRaja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D., and Rengasamy, R., 2007. PCR-identification of *Dunaliella salina* (volvocales, chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbial Re.* 162, 168-176.
30. ^cRaja, R., Hemaiswarya, S., and Rengasamy, R., 2007. Exploitation of *Dunaliella* for β carotene production. *Appl. Microbial Biotechnol.* 74, 517-523.
31. Rengasamy, R., Prema, M., Govindarajan, I., and Elanchelian, K., 1987. Effect of antibiotics on the growth of *Hypnea valentine* (Turn). Mont (Gigartinales, Rhodolphyta). *Sea Res. Util.* 9, 67-73.
32. Rogers, L.J., and Gallon, J.R., 1988. Biochemistry of the algae and cyanobacteria, Oxford University press. 374 pp.
33. Takaji, M., Karseno, and Yoshida, T., 2006. Effect of salt concentration on intera cellular accumulation of lipids and triglyceride in marine micro algae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(3), 223-226.
34. Volcani, B., 1944. The microorganisms of the Dead Sea. In Papers collected to commemorate the 70th anniversary of Dr Chaim Weizmann, pp. 71-85. Rehovoth: Daniel Sie Research Institute.
35. Vorst, P., Baad, R.L., Mur, L.R., Korthals, H.J., and Van, D., 1994. Effect of growth arrest on carotene accumulation photosynthesis in *Dunaliella*. *Microbiol.* 140, 1411-1417.

Potential β carotene production from *Dunaliella salina* of Shahe Lake under salinity stress

**Z. Moghadassi¹, *M. Emtiazjoo², M. Rabanie², M. Emtiazjoo²,
E. Azargashb⁴ and N. Mosaffa⁴**

¹M.Sc. Marine Biology, Faculty of Marine Technology and Scienc, North Tehran Branch, Islamic Azad University, ²Faculty of Marine Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, ³ Dept. of Biotechnology, USM University, Pinang, Malaysia, ⁴Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University

Abstract

Carotenoids are widely being used in medical applications, foods, additive substances and cosmetic materials as colors, anti oxidants and anti cancers. *Dunaliella* as a natural source of mass concentration of carotenoids is considered. In this study, the effect of various salt concentrations of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40% on production of Beta Carotene in *Dunaliella Salina* microalgae was evaluated. *Dunaliella Salina* was isolated from Shahe Lake located in south of Tehran and was purified. The dense growth was performed in altered Janson medium. The flasks containing medium culture were cultured in suitable conditions. To evaluate beta carotene, the obtained extracts from samples were analyzed by HPLC. The results obtained from analysis of algae samples with different saltiness (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40%) in their culture medium showed a meaningful difference (0.0001) on production amount of beta carotene. The maximum production amount of beta carotene was 0.33 microgram in liter in saltiness of 25%. The observed results from this study showed that by increasing various concentrations in medium culture of this alga until %25 the production of beta carotene increased.

Keywords: β carotene; *Dunaliella salina*; Salinity; HPLC

*- Corresponding Author; Email: moz_emtyazjoo@yahoo.com