پتانسیل تولید بتاکاروتن از دونالیلا سالینا دریاچه شاهی تحت استرس‌های شوری

زیبا مقدسی[1]، *مژگان امتیازجو[2]، محمد ربانی[2]، مرجان امتیازجو[3]، اذن‌اله آذرگشب[4] و نریمان مصفا[4]

[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: ۸۸/۱/۲٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/٦/۱۸

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 ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵،۳۰، ۳۵ و ٤۰ 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 (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤۰ درصد) در محیط کشت آنها بر میزان تولید بتاکاروتن اختلاف معنی‌داری (۰/۰۰۰۱) را نشان داد. بالاترین میزان تولید بتاکاروتن معادل ۰/۳۳ میکروگرم در لیتر در شوری ۲۵ درصد به‌دست آمد. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت تا میزان شوری ۲۵ درصد، مقدار بتاکاروتن افزایش و سپس کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن، دونالیلا سالینا، 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، ۲۰۰۷). بتاکاروتن یک رنگدانه تر پنوئیدی است که استفاده از آن به عنوان 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، ۲۰۰۷؛ Gomez و همکاران، ۲۰۰۳؛ Poppel و Goldbohm، ۱۹۹۵). بتاکاروتن دارای ایزومرهای مختلف مانند ۹ سیس و تمام ترانس است که ۸۰ درصد کل بتاکاروتن در دونالیلا را تشکیل می‌دهند (Gomez و همکاران، ۲۰۰۳). این جلبک می‌تواند در محیط کشت شامل طیف وسیعی از غلظت‌های مختلف نمک از ۰/۲۹ درصد تا حالت اشباع (٤۰۰ ppt) زنده بمانند (Hui و همکاران، ۲۰۰۹؛ Karni و Avron، ۱۹۸۸؛ Oliver و همکاران، ۲۰۰۹). از ترکیبات مهم درون سلولی دونالیلا می‌توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول،

*- مسئول مکاتبه: moz_emtyazjoo@yahoo.com

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 (۹ سیس، تمام ترانس) و پروتئین و ویتامین‌های ضداکسیدانی را نشان می‌دهد (Raja و همکاران، ۲۰۰۷؛ Takaji و همکاران، ۲۰۰۶؛ Gomez و همکاران، ۲۰۰۳؛ Vorst و همکاران، ۱۹۹٤؛ BenAmotz و Avron، ۱۹۸۳). در این رابطه پژوهش‌های زیادی برای تجمیع کردن کاروتنوئیدها در دونالیلا سالینا و *D. bardawil* در شرایط استرس زا انجام گرفته است. BenAmotz و همکارانش در سال ۱۹۸۸ با مطالعه بر روی *D. bardawil* نشان دادند که شدت نور باعث افزایش کاروتنوئیدها گردیده است (BenAmotz و همکاران، ۱۹۸۸). Borowitzka و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Cifuentes و همکارانش در سال ۱۹۹٦ 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، ۱۹۹٦؛ Markovits و همکاران، ۱۹۹۳؛ Araneda و همکاران، ۱۹۹۲). شوری یکی از پارامترهای مناسب برای این هدف در کشت‌های باز دونالیلا برای کاربردهای تجاری است (Gomez و همکاران، ۲۰۰۳). هدف این مطالعه نیز بررسی اثر این پارامتر برروی تجمع بتاکاروتن در دونالیلا سالینا جدا شده از دریاچه شاهی است.

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 استروپتومایسن استفاده شد (Rengasamy و همکاران، ۱۹۸۷؛ Lewin، ۱۹۹٦). همچنین با استفاده از تغییرات pH و چندین بار شستشو توسط سانتریفوژ (Eppendroph 5810 R) با محیط کشت جانسون، تابش اشعه ماورای بنفش به‌مدت ۱۰-۱۵ دقیقه و به‌کارگیری کاغذهای صافی با قطر منافذ متفاوت (٤٥٪ و ۱/۲ میکرون)، تغییرات شوری ۳۰-۵۰ درصد، دونالیلا به‌طور کامل خالص سازی شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Raja و همکاران، ۲۰۰۷؛ Massyuk، ۱۹۷۳؛ Michael Garcia و همکاران، ۲۰۰۷). محیط کشت اصلاح شده جانسون برای کشت جلبک استفاده شد. این محیط کشت از ترکیبات زیر تشکیل شده است: KH_2PO_4 (g) ۰/۰۳۳، KNO_3 ۱، $NaHCO_3$ ۰/۰٤۳، $CaCl_2$-$6H_2O$ ۰/۵، $MgSO_4$–$7H_2O$ ۰/۲KCl، ۰/۲$2H_2O$، $MgCl_2$– ۱/۵؛ Na_2EDTA (mg) ۱۸۹، $FeCl_3$- $6H_2O$ ۲٤٤، $MnCl_2$-$4H_2O$ ٤/۱، $ZnCl_2$ ٤/۱، $CoSO_4$-$6H_2O$ ۵/۱، $CuSO_4$,$5H_2O$ ٦، Na_2MOO_4-$2H_2O$ ۱۹، NH_4Cl-7H2O ۱۸، H_3BO_3 ٦۱ و غلظت های مختلف نمک ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤۰ درصد به محیط کشت اضافه شد. pH محیط کشت نیز روی ۸ تنظیم گردید (Garcia و همکاران، ۲۰۰۷). سلولها در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری با سر بطری‌های پنبه‌ای شفاف حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت تابش نور ۱۵۰۰ لوکس در یک دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی کشت داده

شد. چگالی سلولی اولیه 10^4 سلول انتخاب گردید (Fazeli و همکاران، ۲۰۰۶؛ Garcia و همکاران، ۲۰۰۷). بخشی از عملیات فوق در دانشکده علوم و فنون دریایی واحد تهران شمال و بخش دیگر در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد.

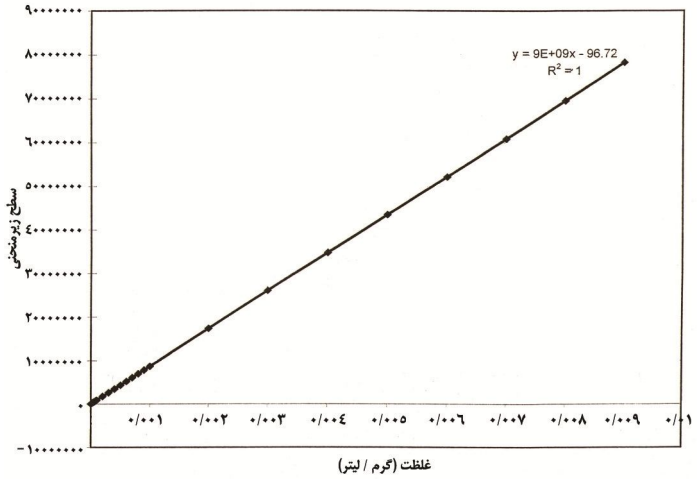
استخراج بتاکاروتن جلبک در تیمارهای مختلف شوری: تیمارهای نمکی توسط سانتریفوژ (Eppendroph 5810 R) با ۳۵۰۰ دور در دقیقه در مدت زمان ۱۰ دقیقه از محیط کشت جداسازی شدند. مجموعه تغلیظ شده جهت خشک شدن به دستگاه فریز درایر (Christ , Alpha 1-2 LD Plu) با دمای ۸۰- انتقال یافت. ۵ گرم پودر خشک از هر تیمار برای تعیین میزان بتاکاروتن استفاده شد. برای شکستن سلول‌ها و خروج بتاکاروتن از پوتر استفاده شد (Garcia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Chidambara و همکاران، ۲۰۰۵). عصاره‌گیری با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر استن ۹۹ درصد سرد و سانتریفوژ (Eppendroph 5810 R) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. هر بار قسمت رویی جمع‌آوری و به قسمت زیرین مجدداً استن اضافه شد. محلول به‌دست آمده توسط هگزان و نمک ۳ درصد در یک قیف جدا کننده کاملا مخلوط و به‌مدت ۲ ساعت به یخچال منتقل گردید تا فازها از همدیگر جدا شوند. به فاز بالایی ۱۵ میلی‌لیتر متانول ۹۲ 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 ۱۵ میلی‌لیتر دی اتیل اتر اضافه و سپس در طی ٤ مرحله کلریدسدیم ۳ درصد به محلول اضافه گردید. پس از جدا نمودن در دکانتور فاز زیرین دور ریخته شد و فاز روئی آن به دکانتور محتوی انهگزان، کلروفیل a و کاروتن ریخته شد (امتیازجو، ۱۳۷۹).

روش‌های خالص‌سازی عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از جلبک: برای جداسازی کاروتنوئیدها روش‌هایی دنبال شد که این روش‌ها شامل شکستن سلول تا خالص‌سازی بتاکاروتن می‌باشد. بعد از استخراج کاروتنوئیدها به‌همراه آنها ترکیبات غیرکاروتنوئیدی نیز وجود دارد و به‌عنوان ناخالصی محسوب می‌شوند که تا حد امکان باید جدا شوند. جهت جدا کردن ناخالصی‌ها و همچنین برخی از کاروتنوئیدها به جز بتاکاروتن از فرایند صابونی‌کردن استفاده شد. این واکنش با استفاده از متانولیک پتاس (پتاس و متانول به نسبت ۱۰: ۵) انجام شد. جهت اجتناب از آسیب به ساختار بتاکاروتن به جای حرارت در این واکنش نمونه‌ها به‌مدت یک شبانه روز در دمای اتاق به‌منظور 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 فتالئین به کار گرفته شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Garcia و همکاران، ۲۰۰۷؛ BenAmotz و Avron، ۱۹۸۳؛ Hatts، ۱۹۸۷؛ Mayer&Isler، ۱۹۷۱؛ Klavi، ۱۹۸۱). برای تعیین مقدار بتاکاروتن نمونه‌ها از آنالیز HPLC مدل *young Lin 9000, south korea* *Acme* نوع ستون *Lichrosphere Rp 100 C18* با اندازه ذرات ٤ میکرون و قطر ٤/٦ سانتی‌متر و طول ۲۵ سانتی‌متر در طول موج ٤٥٠ نانومتر توسط DAD/UV و در فاز متحرک استو نیتریل: متانول (۹:۱) استفاده شد (Fazeli و همکاران، ۲۰۰٦). 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 به‌دست آمد.

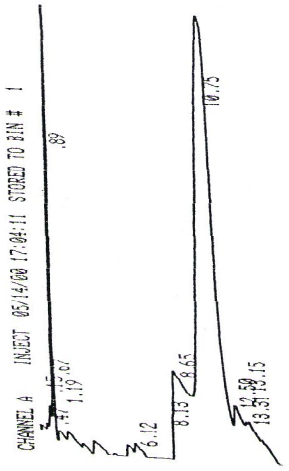
آنالیز آماری: داده‌های به‌دست آمده توسط بسته نرم‌افزاری Spss 16 و آنالیز آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز جلبک توسط دستگاه HPLC در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. بررسی نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های جلبکی با درصد شوریهای مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ 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 ۱ نشان داده شده است. بالاترین میزان تولید بتاکاروتن در شوری ۲۵ درصد و معادل ۰/۳۳ میکروگرم در لیتر است. بررسی آماری نتایج به‌دست 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 ۲ ارائه شده است. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت تا میزان شوری ۲۵ درصد، مقدار بتاکاروتن افزایش و سپس کاهش می‌یابد (شکل ۳).



شکل ۱- آنالیز غلظت‌های مختلف استاندارد بتاکاروتن توسط HPLC

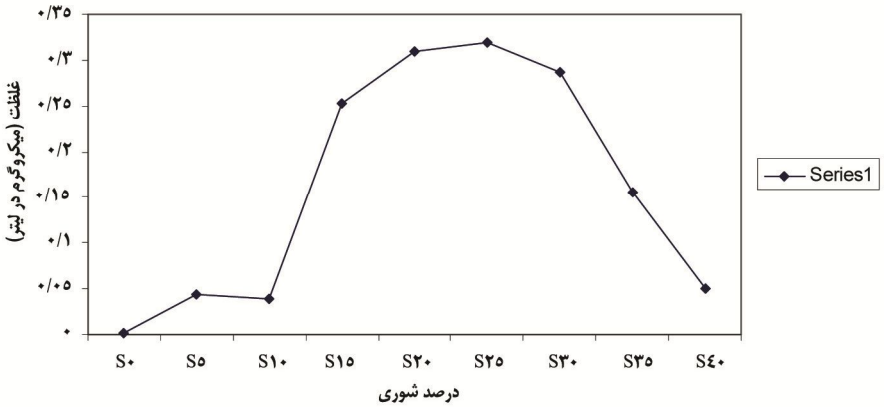


شکل ۲ - نمونه جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر [HPLC]

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار بتاکاروتن تولید شده توسط جلبک دونالیلا سالینا در غلظت‌های مختلف شوری

شوری (درصد)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	٤۰
غلظت (میکرو گرم بر لیتر)	۰	۰/۰٤۳±۰/۰۱۱	۰/۰۳۸± ۰/۰۰۲	۰/۲۵۲± ۰/۱۲۱	۰/۳۱۲±۰/۰۷۲	۰/۳۱۸ ±۰/۰۸۹	۰/۲۸٦±۰/۰٤٦	۰/۱۵٦ ±۰/۰۳۲	*۰/۰۵۱ ± ۰/۰۲٦

* Mean ± SD



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

شکل ۳ - اثر شوری‌های مختلف در محیط کشت دونالیلا سالینا بر تولید بتاکاروتن

بحث و نتیجه‌گیری

جلبک دونالیلا به‌دلیل نداشتن دیواره سلولی محکم در پاسخ به تغییرات خارج سلولی هیپو یا هیپراسموتیکی 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، ۲۰۰۷). تحقیقات صورت گرفته توسط Hui و همکاران در سال ۲۰۰۹، مشخص نمود که پاسخ اسموتیکی دونالیلا سالینا نسبت به تغییرات شوری با افزایش مقدار گلیسرول همراه است (Hui و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین Takaji و همکاران در سال ۲۰۰٦ نشان دادند که افزایش شوری از ۲/۹ به ۵/۸ درصد به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان گلیسرول را در دونالیلا افزایش داد (Takaji و همکاران، ۲۰۰٦). نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظتهای مختلف نمک در محیط کشت تا میزان شوری ۲۵درصد، مقدار بتاکاروتن افزایش و در غلظت‌های بالاتر شوری کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند مربوط به‌ویژگی 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، ۲۰۰۷). براساس جدول ۱ بهترین شوری تولید بتاکاروتن در شرایط معمولی عمدتاً با pH=۸ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و

۱۲ ساعت تاریکی برابر ۲۵ درصد با غلظت بتاکاروتن ۰/۳۳ میکروگرم بر لیتر می‌باشد. این نتیجه با نتایج Volcani در سال ۱۹٤٤ و Shilo و Oren در سال ۱۹۸۲ و امتیازجو در سال ۱۳۷۹ 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 ۵-۲۵ درصد برای رشد این دو جلبک مناسب است (Gomez و همکاران، ۲۰۰۳؛ Cifuentes و همکاران، ۱۹۹٦). Kushner و همکاران در سال ۱۹۷۸، غلظت نمک لازم برای رشد بهینه در جلبک *D. bardawil* و *D. tertiolecta* به‌ترتیب ۲۵-۵ درصد گزارش کردند. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج مذکور مطابقت دارد. Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۳ و BenAmotz در سال ۱۹۸۸، با مطالعه بر روی اثرات شوری بر تجمع کاروتنوئیدها در دونالیلا سالینا و *D. bardawil* ثابت کردند که افزایش نمک ۵/۸-۱۷/٤ درصد مولار باعث افزایش تولید بتاکاروتن گردیده است (Gomez و همکاران، ۲۰۰۳؛ BenAmotz و همکاران، ۱۹۸۸). Fazeli و همکاران در سال ۲۰۰٦ و Cifuentes در سال ۲۰۰۱، نشان دادند که شوری ۲/۹ درصد بر روی *D. terteolecta* باعث افزایش قابل ملاحظه کاروتنوئیدها در درون سلول شده است (Fazeli و همکاران، ۲۰۰٦؛ Cifuentes و همکاران، ۲۰۰۱). Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز نشان دادند که افزایش نمک از ۱۰ به ۳۵ درصد باعث افزایش رشد و تجمع بتاکاروتن در دونالیلا شده است (Garcia و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه حاضر نیز محرز گردید که با افزایش غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت این جلبک تا ۲۵ درصد، تولید بتاکاروتن نیز افزایش می‌یابد.

جدول ۲ - نتایج مقایسه سطح معنی‌داری دو به دو درصدهای شوری از نظر تولید بتاکاروتن

درصد شوری	p-value	درصد شوری	p-value
۵ ، ۱۵	< ۰/۰۰۱	۱۵ ، ٤۰	< ۰/۰۰۱
۵ ، ۲۰	< ۰/۰۰۱	۲۰ ، ۳۵	< ۰/۰۱
۵ ، ۲۵	< ۰/۰۰۱	۲۰ ، ٤۰	< ۰/۰۰۱
۵ ، ۳۰	< ۰/۰۰۱	۲۵ ، ۳۵	< ۰/۰۰٦
۱۰ ، ۱۵	< ۰/۰۰۱	۲۵ ، ٤۰	< ۰/۰۰۱
۱۰ ، ۲۰	< ۰/۰۰۱	۳۰ ، ۳۵	< ۰/۰٤۸
۱۰ ، ۲۵	< ۰/۰۰۱	۳۰ ، ٤۰	< ۰/۰۰۱
۱۰ ، ۳۰	< ۰/۰۰۱	-	-

منابع

۱- امتیازجو م.، ۱۳۷۹. شناسایی جلبک تک سلولی دونالیلا از خلیج‌فارس و استخراج بتاکاروتن از این ارگانیسم. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی واحد تهران شمال، ۱٤۱ 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 Northerm Chile III. Growth and beta carotene content of three isolates of *Dunaliella salina* from the Atacame Desert. *Revista de Biologia Marin 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 haloterant 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., Gonza´lez, 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. Invivo 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. Acumulation 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 βcarotene 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.[a]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.[b]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 cartenoids. 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. NewYork. 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., Caumettte, 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. [a]Raja, 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.[b]Raja, 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.[c]Raja, R., Hemaiswarya, S., and Rengasamy, R., 2007. Exploitation of *Dunaliella* for β carotene production. *Appl. Microbial Biotechnal*. 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 (Gigatrinales, Rhodolphyta). *Sea Res. Util*. 9, 67-73.
32.Rogers, L.J., and Gallon, J.R., 1988. Biochimistry of the algae and cyanobactria, 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 ChaimWeizmann, 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.

Journal of Fisheries
Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 5, No. 2, September 2011

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

Z. Moghadassi[1], *M. Emtiazjoo[2], M. Rabanie[2], M. Emtiazjoo[2], E. Azargashb[4] and N. Mosaffa[4]

[1]M.Sc. Marine Biology, Faculty of Marine Technology and Scienc, North Tehran Branch, Islamic Azad University, [2]Faculty of Marine Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, [3] Dept. of Biotechnology, USM University, Pinang, Malaysia, [4]Faculty 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: βcarotene; *Dunaliella salina*; Salinity; HPLC

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