بررسی تأثیر تنش شدت‌نور در ذخیره بتاکاروتن توسط کشت‌خالص و مختلط میکروجلبک

آزیتا قربانی
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

مریم حسینی
گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

سیروس ابراهیمی*+
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

چکیده: بتاکاروتن یک رنگدانه قرمز ـ نارنجی است که در گیاهان و میوه ها یافت می‌شود. یکی از بهترین منابع تولید بتاکاروتن میکروجلبک‌ها می‌باشند. تاکنون تولید بتاکاروتن در نمونه‌های خالص بررسی شده است. به دلیل مشکل‌های عملی کشت‌های خالص، دراین مطالعه تنش شدت نور بر نمونه‌های کشت مختلط دریاچه خزر و میکروجلبک خالص دونالیلا سالینا اعمال و چگونگی رشد، میزان کلروفیل تولید شده و تجمع بتاکاروتن در گونه‌های مورد آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش ، شرایط عملیاتی آزمایش برای هر دو نمونه یکسان با pH ۷٫۵ و دور هم‌زدن ۱۶۰ rpm بود. تنش نوری در شرایط عملیاتی یکسان و دمای $۲۶ - ۲۸\ ^oC$ در روز ششم اعمال شد. با اعمال این تنش مقدار بتاکاروتن در میکروجلبک دونالیلا سالینا از مقدار اولیه ۵٫۹ به مقدار پایانی ۱۹٫۵ mol Beta-Carotene/g Protein و در میکروجلبک دریاچه خزر از مقدار اولیه ۷٫۳ به مقدار پایانی ۲۲٫۷ mol Beta-Carotene/g Protein رسید. غلظت پروتئین در آغاز و پایان فرایند کشت‌های خالص و مختلط به ترتیب از ۴۶۷٫۳ به ۱۲۳۹٫۹ mg/L و از ۴۹۵٫۲ به ۱۱۳۱٫۳ mg/L رسید. نتیجه‌های به دست آمده از این مطالعه، پتانسیل بالای میکروجلبک کشت مختلط دریاچه خزر به عنوان جایگزین مناسب میکروجلبک خالص دونالیلا را نشان می‌دهد. درنتیجه تولید بتاکاروتن با استفاده از میکروجلبک‌های مختلط دریاچه‌ی خزر که نیازی به استریلیزاسیون ندارد، اقتصادی‌تر از نمونه خالص بوده و به دلیل هزینه‌های کم‌تر، امکان صنعتی شدن آن افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن؛ تنش شدت نور؛ میکروجلبک دونالیلا سالینا؛ میکروجلبک دریاچه خزر.

KEYWORDS: *Beta carotene; Light stress; Microalgae dunaliella salina; Caspian sea microalgae.*

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: sirous.ebrahimi@epfl.ch

مقدمه

بتاکاروتن رنگدانه‌ای است که میزان فراوانی آن در کاروتنوئید ۹۰٪ می‌باشد [۱]. بتاکاروتن در مولکول‌های لیپیدی در کلروپلاست ذخیره می‌شود [۲]. این رنگدانه به عنوان رنگ مجاز در غذاها، پیش‌ساز ویتامین A در غذای انسان و دام، در فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی و به عنوان ضد سرطان مصرف می‌شود [۳، ۲]. حدود ۱۴ درصد وزن خشک میکروجلبک *دونالیلا سالینا* بتاکاروتن است [۳]. اولین کارهای تجاری برای تولید و خالص‌سازی بتاکاروتن در اسرائیل، کالیفرنیا، USA ، استرالیا، اسپانیا و چین انجام شده است [۴، ۲].

سنتز بتاکاروتن هم می‌تواند از فرآورده‌های پتروشیمیایی و هم به طور طبیعی باشد. در سال ۲۰۰۶ میلادی، ۹۰٪ سنتزها به روش پتروشیمیایی بود [۵]. برای تولید طبیعی بتاکاروتن منابع گوناگونی همچون، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، گیاهان، میوه‌ها و میکروجلبک‌ها وجود دارند که در بین آن‌ها، گیاهان و میکروجلبک‌ها بازده بیشتری دارند [۶]. انتخاب میکروجلبک به دلیل سرعت رشد زیاد، در برداشتن گستره بیش‌تری از رنگدانه‌ها، بازده بالای فتوسنتز و نیاز به زمین کشاورزی کم‌تر، قابل کشت بودن در تمام طول سال، قادر به حیات در شرایط گوناگون آبی همچون شور و شیرین و باقی ماندن آب برای مصرف‌های آشامیدنی، مورد توجه بیشتری می‌باشد [۱۰-۷]. در میان میکروجلبک‌ها، *میکروجلبک دونالیلا سالینا*[۱]، که گونه نمک دوست می‌باشد، بهترین منبع طبیعی برای تولید تجاری بتاکاروتن شناخته شده است [۱۳-۱۱، ۴].

محتوی سلولی میکروجلبک را می‌توان با دو روش افزایش داد [۱۷-۱۴]. ۱) به کار بردن موقعیت خاص محیط کشت ۲) با تغییر متابولیسم و دستکاری ژنتیکی. به کار بردن موقعیت خاص محیط کشت، اعمال موقعیت مغایر با شرایط کشت عادی (تنش‌ها) برای افزایش محتوی میکروجلبک می‌باشد. برخی گونه‌های میکروجلبک طی شرایط تنش، به موازات ذخیره لیپید و کربوهیدرات، متابولیت‌های ثانویه از جمله رنگدانه‌ها و ویتامین‌ها را ذخیره می‌کنند [۱۸]. از مهمترین تنش‌های موثر در افزایش بتاکاروتن می‌توان به افزایش شدت نور، قحطی مواد مغذی محیط کشت، افزایش شوری و تأثیر دما اشاره کرد.

تولید بتاکاروتن از میکروجلبک به طور معمول توسط یک گونه از میکروجلبک و با استفاده از کشت‌های خالص انجام گرفته است [۱۹، ۱۶].

از سوی دیگر استفاده از کشت خالص منجر به هزینه‌های استریلیزاسیون، تجهیزهای گران قیمت و مصرف بالای انرژی می‌شود. در صورتی که در کشت مختلط نیازی به شرایط استریل نیست و بخش چشمگیری از هزینه‌ها کاهش می‌یابد، اما تاکنون مطالعه‌ای برای تولید بتاکاروتن طی کشت مختلط میکروجلبک صورت نگرفته است. در مقاله مروری ارایه شده توسط *صالحی‌زاده* و *لوسدرخت*[۲] [۲۰] هزینه تولید انواع مواد درون سلولی از زیست توده بررسی و هزینه استفاده از کشت مختلط، به تقریب نصف هزینه تمام شده برای کشت خالص زیست توده می‌باشد. درنتیجه در این بررسی با توجه به کارایی بیشتر میکروجلبک *دونالیلا* در تولید بتاکاروتن، تولید بتاکاروتن توسط میکروجلبک *دونالیلا سالینا* به صورت خالص و گونه دریاچه خزر به صورت مختلط و تحت تنش شدت نور مورد پژوهش و بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

میکروجلبک و محیط کشت

برای تهیه کشت خالص، میکروجلبک *دونالیلا سالینا* ۱۹٫۱۸ از پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب کشور خریداری شد. برای کشت نمونه مختلط، نمونه‌های آب دارای میکروجلبک از دریاچه خزر تهیه شد. گونه‌های میکروجلبک در محیط کشت مایع با pH، ۷ کشت داده شدند. محیط کشت استفاده شده، جانسون اصلاح شده بود [۲۱] و روزانه ۵ میلی‌مولار منبع کربن به صورت سدیم بی‌کربنات افزوده می‌شد. محیط کشت به ازای هر لیتر دارای مواد زیر بود:

$MgCl_2.6H_2O$, 1.5 g; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 g; KCl, 0.2 g; $CaCl_2.6H_2O$, 0.26 g; $NaNO_3$, 0.83 g; $NaHCO_3$, 1.2 g; (pH adjusted to 7.5 with HCl); KH_2PO_4, 0.035 g; H_3BO_3, 0.0006 g

همچنین دو میلی‌لیتر محلول ریزمغذی [۲۲] به ازای هر لیتر محیط کشت افزوده می شد، که شامل مواد زیر در یک لیتر بود:

EDTA 100 mg, $ZnSO_4.7H_2O$ 4.4 mg, $CaCl_2.2H_2O$ 16.36 mg, $MnCl_2.4H_2O$ 10.12 mg, $FeSO_4.7H_2O$ 9.98 mg, $(NH_4)_6MO_7.O_{24}.4H_2O$ 3.02 mg, $CuSO_4.5H_2O$ 3.14 mg, $COCl_2.6H_2O$ 3.22 mg

کشت در ارلن‌هایی (با ظرفیت ۵۰۰ میلی‌لیتر) و به حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. میزان غلظت نمک NaCl در همه مدت ثابت و برابر با ۰٫۵ M بود. دور همزن ۱۶۰ rpm و نوردهی توسط

(۱) Dunaliella salina

(۲) Loosdrecht

لامپ‌های فلوئورسنت، از قسمت پایین [۲۳] و با شدت نور ۵۰۰ µmol photons/m^{2}s انجام می‌شد. در تنش شدت نور، در دمای آزمایش ۲۸ – ۲۶ درجه سلسیوس، پس از یک دوره نگهداری شش روزه و اینکه غلظت توده زیستی به میزان لازم رسید، شدت نور به ۱۵۰۰ µmol photons/m^{2}s افزایش داده شد.

اندازه‌گیری توده زیستی

برای اندازه‌گیری توده زیستی، میزان رشد با شمارش تعداد سلول‌ها توسط لام شمارش نئوبار با میکروسکوپ نوری (Leica, American) به صورت روزانه انجام گرفت، که این امر موجب شد خطای اندازه‌گیری طول فاز تاخیر، بیشتر از یک روز نباشد. همچنین دانسیته نوری[۱] (OD) محیط کشت نیز برای بررسی رشد سلولی به طور روزانه با اندازه‌گیری طیف جذبی نور مرئی در طول موج ۶۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Pharo 300, Merck, Germany) انجام گرفت [۲۴، ۲۳، ۱۲]. تعداد سلول‌ها با میزان جذب رابطه خطی داشتند. لازم به ذکر است، در موادی که دانسیته نوری بیش‌تر از ۰/۳ می شد، رقیق سازی برای نمونه‌های یاد شده انجام می‌گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین

مقدار پروتئین نسبت مستقیمی با مقدار زیست توده دارد و ۵۵ ـ ۳۰ درصد وزن خشک میکروجلبک را پروتئین تشکیل می‌دهد [۲۵]. درنتیجه با اندازه گیری مقدار پروتئین می‌توان تغییرهای زیست توده را بررسی نمود. برای سنجش میزان پروتئین زیست توده ابتدا پیش تیمار بر روی نمونه انجام شد، بدین صورت که ۰/۱ میلی‌لیتر از میکروجلبک در آب جوش قرار داده و سپس بقیه مرحله‌ها مطابق روش لوری[۲] انجام گرفت [۲۶، ۲۷].

آنالیز رنگدانه‌ها

برای اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌ها ابتدا ۲ میلی‌لیتر از نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Hettich-EBA20, Germany) و به محلول رویی جدا شده، ۲ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد افزوده و محلول توسط شیکر لوله همگن گشت. سپس دوباره به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سرانجام میزان جذب در طول موج های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰، ۴۷۰، ۴۸۰، ۵۴۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شده و برای محاسبه غلظت رنگدانه‌ها در معادله‌های زیر قرار گرفت [۲۸، ۲۹].

آنالیز بتاکاروتن:

$$C_c = 0.430\ A_{412} + 0.251\ A_{431} - 4.376\ A_{460} + 13.216\ A_{480}$$

آنالیز کلروفیل a :

$$C_a = -1.709\ A_{412} + 11.970\ A_{431} - 2.998\ A_{460} - 5.708\ A_{480}$$

آنالیز کل کاروتنوئیدها:

$$C_1 = 12.21\ A_{663} - 2.81\ A_{646}$$
$$C_2 = 20.13\ A_{646} - 5.03\ A_{663}$$
$$C_{x+c} = (1000\ A_{470} - 3.27\ C_1 - 104\ C_2)/229$$

که در این روابط C_c، C_a و C_{x+c} به ترتیب نشان دهنده غلظت‌های بتاکاروتن، کلروفیل a و کل کاروتنوئیدها بر حسب µM و A_λ میزان جذب در طول موج‌های مد نظر می‌باشد.

لازم به ذکر می‌باشد که تمامی مرحله‌های آنالیز در دمای اتاق و در تاریکی انجام گرفت.

نتیجه‌ها و بحث

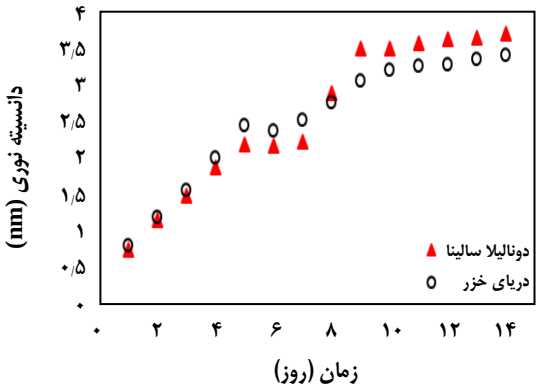
بررسی تأثیر تنش نوری

در این پژوهش اثر تنش نوری بر میزان بتاکاروتن از نظر کمی و با استفاده از لامپ‌های فلوئورسنت بررسی شد. آزمایش‌ها به‌صورت دو مرحله‌ای بر هر دو نمونه میکروجلبک اعمال و سه بار تکرار شد و داده های ارایه شده متوسط سه بار اندازه گیری می‌باشند. در مرحله اول چراغ‌های LED، دارای شدت نور ۵۰۰ µmol photons/m^{2}s زیر ارلن‌ها قرار گرفتند. اعمال تنش در روز ششم توسط لامپ‌های فلوئورسنت با شدت نور ۱۵۰۰ µmol photons/m^{2}s و به صورت افقی از کنار ارلن‌ها انجام شد. شرایط عملیاتی برای هر دو مرحله یکسان بود.

میزان رشد میکروجلبک‌ها در این قسمت توسط اندازه گیری مقدارهای جذب نوری و پروتئین گزارش شده‌اند. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، میکروجلبک‌ها رشد بسیار خوبی را در مرحله اول داشتند. پس از اعمال تنش نوری در روز ششم نیز در هر دو گونه کشت خالص و مختلط میکروجلبک‌ها افزایش غلظت با شیب بسیار اندکی دیده شد، به طوری که پس از تقریبا دو هفته افزایش غلظت توده زیستی متوقف شد. نکته‌ی چشمگیر در این بررسی چگونگی رشد میکروجلبک مختلط دریاچه خزر بود. قبل از اعمال تنش تعداد سلول‌ها نسبت به میکروجلبک *دونالیلا سالینا* بیش‌تر، اما پس از اعمال تنش با وجود رشد ملایم

(۱) Optical Density

(۲) Lowry Protein Assay



شکل ۱ـ میزان جذب دانسیته نوری بر حسب زمان، تاثیر تنش نوری در روز ششم بر رشد سلولی نمونه‌های مختلط و خالص.

دارای غلظت کمتری نسبت به گونه خالص میکروجلبک‌ها بود. با این حال همان‌گونه که از شکل مشخص است رشد هر دو نوع جلبک خوب و همچنان قابل مقایسه می‌باشد.

از آن جایی که میزان پروتئین تجمع یافته در میکروجلبک نشان دهنده میزان رشد می‌باشد، درنتیجه در این بررسی برای اطمینان از نتیجه‌ها، این پارامتر نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های به دست آمده نشان داده شده در شکل ۲ گواه رشد خوب هر دو نمونه‌ی میکروجلبک مختلط دریاچه خزر و خالص *دونالیلا سالینا* در مرحله اول و قبل از اعمال تنش می‌باشد. پس از رسیدن میکروجلبک به غلظت بالای توده زیستی، تنش در روز ششم اعمال و درنتیجه افزایش پروتئین نسبت به روز پیش دیده نشد. در روز هفتم و هشتم میزان پروتئین در هر دو نمونه افزایش یافت و پس از آن ثابت ماندن میزان پروتئین، نشانگر افزایش نیافتن غلظت میکروجلبک بود. نتیجه‌های به دست آمده از تغییرهای میزان پروتئین در نمونه‌های مختلط و خالص، مطابق نتیجه‌های به دست آمده از میزان جذب دانسیته نوری بود.

میزان کلروفیل a نیز می‌تواند نشان دهنده میزان رشد نمونه‌های میکروجلبک باشد. درنتیجه چنانچه در شکل ۳ نمایش داده شده است، میزان کلروفیل در مرحله اول رشدی متناسب با نتیجه‌های به دست آمده از میزان جذب و افزایش پروتئین داشت. هنگام اعمال تنش نیز چنین تطابقی دیده شد اما پس از اعمال تنش میزان کلروفیل تجمع یافته با شیب کمی افزایش یافت، که با دو نمودار نشان دهنده جذب و میزان افزایش پروتئین تفاوت اندکی دارد.

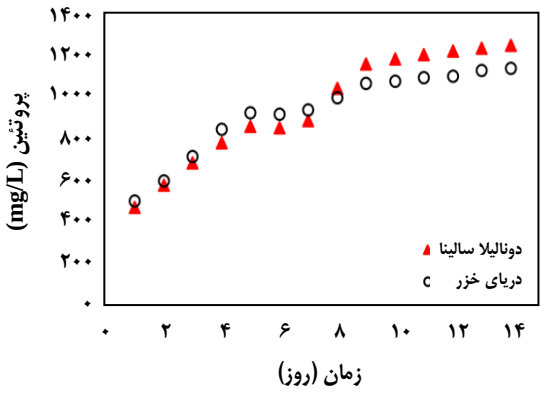
سرانجام شکل ۴ نشان دهنده تاثیر تنش نوری بر میزان بتاکاروتن تجمع یافته به ازای پروتئین در نمونه خالص *دونالیلا سالینا* و نمونه مختلط دریاچه خزر می‌باشد. با اعمال تنش نوری، میزان بتاکاروتن در میکروجلبک *دونالیلا سالینا* از ۱۱٫۴ در مدت ۹ روز به ۱۹٫۵ mol Beta-Carotene/g Protein و در نمونه دریاچه خزر از ۱۳٫۵ به ۲۲٫۷ mol Beta-Carotene/g Protein رسید. روند تغییرها در هر دو گونه همانند بوده و پس از اعمال تنش افزایش بتاکاروتن در حدود ۷۱ و ۶۸ درصد به ترتیب در میکروجلبک *دونالیلا سالینا* و دریای خزر دیده شد. شایان ذکر است، رنگ محیط کشت پس از اعمال تنش متمایل به نارنجی شد.

در پژوهش‌های دیگر انجام شده، افزایش میزان بتاکاروتن با تنش نور در میکروجلبک های خالص بررسی و گزارش شده است. *ژن لی*[۱] [۱۹] پس از کشت میکروجلبک *استیگماتوس پولیفم*[۲] در دمای ۲۳ درجه سلسویس و pH ۷٫۵ و شدت نور اولیه ۱۵۰ µmol/m^{2}s، تنش شدت نور ۳۰۰ µmol/m^{2}s، را اعمال نمود. میزان بتاکاروتن در این آزمایش از ۱۲ به ۴۰ mg/g DW پس از ۹ روز رسید. همچنین لامرس [۱۶] نیز تاثیر تنش شدت نور بر تولید بتاکاروتن توسط میکروجلبک همزمان با سایر تنش‌ها را بررسی نمود. نتیجه به دست آمده نشان دهنده افزایش میزان بتاکاروتن تجمع یافته در میکروجلبک در شدت نور بالا بود.

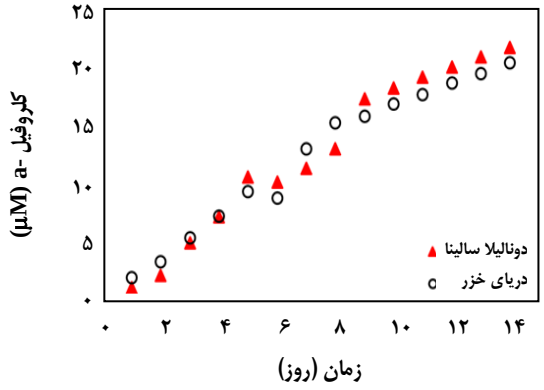
در پژوهش انجام شده دیگری اثر نور و دما بر روی مقدار تجمع بتا کاروتن در *دونالیلا سالینای* جدا شده از خاک شور بررسی و مقدار بیشینه ۱۱۷٫۹۹ میلی گرم بر لیتر بتاکاروتن در شدت نور ۲۴۵٫۶ µmol photons/m^{2}s و دمای ۲۲ درجه سلسیوس به‌دست آمد [۳۰]. مقدار افزایش پنج برابری تجمع بتا کاروتن از ۱٫۷۷ تا ۸٫۲۸ pg/cell در *دونالیلا سالینا* با افزایش شدت نور از ۸۰۰ تا لوکس ۲۳۰۰ نیز گزارش شده است [۳۱].

تنش نور همچنین می‌تواند با تغییر نوع نور، به صورت کیفی باشد. افزایش مقدار بتاکاروتن ذخیره شده توسط میکروجلبک با استفاده از اعمال تنش نور UV-A توسط *یانکه*[۳] *و موقداس*[۴] مورد بررسی قرار گرفته است [۳۳، ۳۲]. افزون براین استفاده همزمان از نورهای مرئی PAR[۵] و UV-A باعث افزایش تجمع

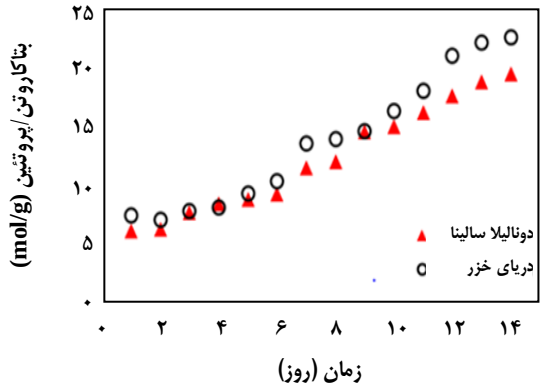
(۱) Zhen Li
(۲) Eustigmatos cf. polyphem
(۳) Jahnke
(۴) Mogedas
(۵) Photosynthetically Active Radiation



شکل ۲ـ تأثیر تنش نوری بر میزان تجمع پروتئین در گونه‌های مختلط و خالص.



شکل ۳ـ تأثیر تنش نوری بر میزان تجمع کلروفیل *a* در گونه‌های مختلط و خالص.



شکل ۴ـ تاثیر تنش نوری بر میزان تجمع بتاکاروتن در گونه‌های مختلط و خالص.

اجزاء و رشد سلولی می‌شود [۳۲]. برای مطالعه تاثیر نور بر بتاکاروتن، به نمونه میکروجلبک غنی از بتاکاروتن و نمونه‌ای با بتاکاروتن کمتر نور تابانیده شده و نمونه میکروجلبک غنی از بتاکاروتن در شدت‌های نور بالا رشد داشت [۳۴]. افزون براین درجه شدت نور بر میزان تجمع ایزومرهای بتاکاروتن در میکروجلبک موثر می‌باشد. در میکروجلبک *دونالیلا سالینا* تجمع بتاکاروتن (نسبت ایزومر سیس به ترانس) که در چرخه تقسیم قرار دارد وابسته به پیوستگی شدت نور می‌باشد [۳۵]. شدت نور زیاد به سود ایزومر ترانس و شدت نور کم به نفع ایزومر سیس می‌باشد. یعنی این نسبت در مقدارهای تابش کم (۲۰–۵۰ µmol photons/m^2s) در مقایسه با مقدارهای تابش بالا (۲۰۰–۱۲۵۰ µmol photons/m^2s)، افزایش می یابد [۳۶].

همچنین پژوهش دیگری بر روی استخراج بتاکاروتن از نمونه میکروجلبک *دونالیلا سالینا* تهیه شده از شرکت قشم سینای ایران با دو روش انجام شده است. میزان بتاکاروتن بدست آمده با استفاده از کربن دی اکسید فوق بحرانی و حلال متانول به ترتیب ۱۱۵ و ۲۴۵ µg/ g dry biomass گزارش شده است [۳۷].

با وجود بررسی های گسترده تولید بتاکاروتن در کشت‌های خالص، تاکنون مطالعه‌های بسیار اندکی بر روی مواد ذخیره‌ای در کشت‌های مختلط انجام شده است. به عنوان نمونه، *پترموی*[۱] و همکاران [۸] با ایجاد شرایط خاص کشت، میکروجلبک‌های قادر به ذخیره مقدارهای بالای نشاسته را بدست آوردند. این در حالی است که تاکنون از میکروجلبک مختلط برای تولید بتاکاروتن استفاده نشده است.

نکته دارای اهمیت در پژوهش حاضر، مشاهده ی ذخیره ی بیشتر بتاکاروتن در میکروجلبک دریاچه خزر نسبت به میزان بتاکاروتن تجمع یافته در میکروجلبک *دونالیلا سالینا* است. این امر نشان دهنده ظرفیت ذخیره‌ای بالای بتاکاروتن در میکروجلبک مختلط تهیه شده از دریاچه خزر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش مقدار بتاکاروتن ذخیره شده در میکروجلبک خالص *دونالیلا سالینا* و نمونه مختلط دریاچه خزر در شرایط رشد معمولی و تنش نور مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های به دست آمده رشد و قابلیت تجمع بتاکاروتن در هر دو گونه و افزایش تجمع بتاکاروتن را با اعمال تنش نشان می‌دهد.

(۱) Peter R. Mooij

بنابراین نتیجه‌های این پژوهش، پتانسیل بالای کشت مختلط میکروجلبک دریاچه خزر را در مقایسه با کشت خالص نشان می‌دهد. از این رو کشت های مختلط با هزینه‌های عملیاتی کم‌تر می‌توانند در آینده به عنوان منبع تولید بتاکاروتن مورد استفاده قرار گیرند.

فهرست نمادها

چگالی نوری	OD
سرعت همزدگی، Rounds per minute	rpm

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

قدردانی

بدینوسیله، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه سهند که همکاری و امکانات لازم برای این مطالعه را فراهم آورد، تشکر می‌شود.

مراجع

[1] Prieto A., Canavate J.P., García-González M., Assessment of Carotenoid Production by *Dunaliella salina* in Different Culture Systems and Operation Regimes, *Journal of Biotechnology*, **151**(2): 180-185 (2011).

[2] Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M., The Biotechnology of Cultivating *Dunaliella* for Production of β-Carotene Rich Algae, *Bioresource Technology*, **38**(2): 233-235 (1991).

[3] Borowitzka L.J., Borowitzka M.A., Commercial Production of β-Carotene by *Dunaliella salina* in Open Ponds, *Bulletin of Marine Science*, **47**(1): 244-252 (1990).

[4] Moulton T., Borowitzka L., Vincent D., "The Mass Culture of *Dunaliella salina* for β-Carotene: from Pilot Plant to Production Plant", *Twelfth International Seaweed Symposium.* Springer (1987).

[5] Çelekli A., Dönmez G., Effect of pH, Light Intensity, Salt and Nitrogen Concentrations on Growth and β-Carotene Accumulation by a New Isolate of *Dunaliella sp.*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**(2): 183-189 (2006).

[6] Ribeiro B.D., Barreto D.W., Coelho M.A.Z., Technological Aspects of β-Carotene Production, *Food and Bioprocess Technology*, **4**(5): 693-701 (2011).

[7] Brányiková, Microalgae—Novel Highly Efficient Starch Producers, *Biotechnology and Bioengineering*, **108**(4): 766-776 (2011).

[8] Mooij P.R., Survival of the Fattest, *Energy & Environmental Science*, **6**(12): 3404-3406 (2013).

[9] Chisti Y., Biodiesel from Microalgae, *Biotechnology Advances*, **25**(3): 294-306 (2007).

[10] Mulders K.J., Phototrophic Pigment Production with Microalgae: Biological Constraints and Opportunities, *Journal of Phycology*, **50**(2): 229-242 (2014).

[11] Ashok P., Biofuels from Algae, (2014).

[12] Borowitzka M.A., Borowitzka L.J., Kessly D., Effects of Salinity Increase on Carotenoid Accumulation in the Green Alga *Dunaliella salina*, *Journal of Applied Phycology*, **2**(2): 111-119 (1990).

[13] Ben-Amotz A., Production of β-Carotene and Vitamins by the Halotolerant Alga *Dunaliella*, *in Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, 411-417 (1993).

[14] Eonseon J., Lee C.-G., Polle J.E., Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus (Chlorophyceae)*: Biosynthesis, Regulation, and Biotechnology. *Journal of microbiology and biotechnology*, **16**(6): 821-831 (2006).

[15] Lamers P.P., Carotenoid and Fatty Acid Metabolism in Nitrogen-Starved *Dunaliella salina*, a Unicellular Green Microalga, *Journal of Biotechnology*, **162**(1): 21-27 (2012).

[16] Lamers P.P., Carotenoid and Fatty Acid Metabolism in Light-Stressed *Dunaliella salina*, *Biotechnology and Bioengineering*, **106**(4): 638-648 (2010).

[17] Beer L.L., Engineering Algae for Biohydrogen and Biofuel Production, *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(3): 264-271 (2009).

[18] Markou G., E. Nerantzis, Microalgae for High-Value Compounds and Biofuels Production: A Rview with Focus on Cultivation under Stress Conditions, *Biotechnology Advances*, **31**(8): 1532-1542 (2013).

[19] Li Z., A Novel Potential Source of β-Carotene: Eustigmatos cf. Polyphem (Eustigmatophyceae) and Pilot β-carotene Production in Bubble Column and Flat Panel Photobioreactors, *Bioresource Technology*, **117**: 257-263 (2012).

[20] Salehizadeh H., Van Loosdrecht M., Production of Polyhydroxyalkanoates by Mixed Culture: Recent Trends and Biotechnological Importance, *Biotechnology Advances*, **22**(3): 261-279 (2004).

[21] Johnson M.K., Johnson E.J., MacElroy R.D., Speer, H.L., Bruff B.S., Effects of Salts on the Halophilic Alga *Dunaliella viridis*, *Journal of Bacteriology*, **95**(4): 1461-1468 (1968).

[22]Vishniac W., Santer M., The thiobacilli. *Bacteriological Reviews*, **21**(3): 195-213 (1957).

[23] Hejazi M., Holwerda E., Wijffels R., Milking Microalga *Dunaliella salina* for β-Carotene Production in Two-Phase Bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering*, 475-481 (2004).

[24] Garbayo I., Effect of Abiotic Sress on the Production of Lutein and β-Carotene by *Chlamydomonas acidophila*, *Process Biochemistry*, **43**(10): 1158-1161 (2008).

[25] López C.V.G., Protein Measurements of Microalgal and Cyanobacterial Biomass, *Bioresource Technology*, **101**(19): 7587-7591 (2010).

[26] 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).

[27] Waterborg J.H., The Lowry Method for Protein Quantitation, in: "The Protein Protocols Handbook", 7-10 (2009).

[28] 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, *Photosynthesis Research*, **52**(1): 69-73 (1997).

[29] Hartmut K., Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls b of Leaf Extracts in Different Solvents, Analysis *(Peach, K & Tracey, MV, eds)*, **4**: 142-196 (1983).

[30] Wu Z., The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil, *Jundishapur Journal of Microbiology*, **9**(1): 1648-1663 (2016).

[31] Pisal D.S., Lele S., Carotenoid Production from Microalga, *Dunaliella salina*, *Indian Journal of Biotechnology*, **4**: 476-483 (2005).

[32] Jahnke L.S., Massive Carotenoid Accumulation in *Dunaliella bardawil* Induced by Ultraviolet-A Radiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **48**(1): 68-74 (1999).

[33] Mogedas B., *β-Carotene Production Enhancement by UV-A Radiation in Dunaliella Bardawil* Cultivated in Laboratory Reactors, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**(1): 47-51 (2009).

[34] Borowitzka L., Moulton T., Borowitzka M., "The Mass Culture of *Dunaliella salina* for Fine Chemicals: from Laboratory to Pilot Plant", *Eleventh International Seaweed Symposium*, (1984).

[35] Lers A., Biener Y., Zamir A., Photoinduction of Massive β-Carotene Accumulation by the Alga *Dunaliella bardawil* Kinetics and Dependence on Gene Activation, *Plant Physiology*, **93**(2): 389-395 (1990).

[36] Orset S.C., Young A.J., Exposure to Low Irradiances Favors the Synthesis of 9-cis β, β-Carotene in *Dunaliella salina* (Teod.), *Plant physiology*, **122**(2): 609-618 (2000).

[37] Hosseini S.R.P., Tavakoli O., Sarrafzadeh M.H., Experimental Optimization of SC-CO_2 Extraction of Carotenoids from *Dunaliella salina*, *The Journal of Supercritical Fluids*, **121**: 89-95 (2017).