

## بررسی اثر استرس نمک و نور بر میزان رشد، محتوای بتاکاروتن و برخی ویژگی های فیزیکوشیمیایی ریز جلبک *دوناللیا سالیئا*

شهرزاد اوصیاء<sup>۱</sup>، مریم میزانی<sup>۲</sup>، عزیزالله زرگران<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: m.mizani@srbiau.ac.ir  
۳- استادیار گروه سیاستگذاری و برنامه ریزی غذا و تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه شهید علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۲۵

### چکیده

**سابقه و هدف:** *دوناللیا سالیئا* یک جلبک سبز تک یاخته‌ای، متحرک و فاقد دیواره سلولی است. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این جلبک، توانایی تولید و تجمع مقادیر زیاد بتاکاروتن است. پژوهش حاضر با هدف بررسی و بهبود میزان تولید کاروتنوئید، پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ریز جلبک *دوناللیا سالیئا* انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش حاضر ریز جلبک *دوناللیا سالیئا* در محیط کشت بهبود یافته‌ی جانسون تحت سه استرس شوری ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ molar و سه شدت نور صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  در ثانیه کشت داده شده و تأثیر پارامترهای فوق مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که افزایش سطح شوری تا میزان ۱/۵ molar تأثیر مثبت بر رشد داشته و شوری بالاتر موجب کاهش رشد می‌شود. بالاترین میزان رشد جلبک *دوناللیا* در شوری ۱/۵ mol و میزان نور ۵۰۰  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  بوده که این میزان برابر ۳۶/۱ cell/ml است و حداکثر میزان کارتنوئید برابر ۲۴/۹ mg/ml تولید شد. علاوه بر این بالاترین میزان محتوای کلروفیل در شوری ۰/۵ مولار، محتوای آنتی‌اکسیدان و پروتئین در شوری ۱/۵ مولار به ترتیب ۱۱/۵ mg/g، ۲۵/۳ درصد، ۶۲/۹ درصد به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** به طور کلی تأثیر پارامتر نور بر میزان رشد و مواد مؤثره‌ی موجود در *دوناللیا* بیشتر از پارامتر شوری بوده و کشت در نور با لوکس ۵۰۰ می‌تواند در کنار رشد خوب جلبک، محتوای بتاکاروتن، کلروفیل، پروتئین و آنتی‌اکسیدان آن را افزایش دهد. شوری ۱/۵ molar به عنوان بهینه‌ی شوری محیط کشت پیشنهاد می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** ریز جلبک، کلروفیل، پروتئین، آنتی‌اکسیدان، رئولوژی

### • مقدمه

انجام فتوسنتز هستند که برای حیاتشان روی زمین امری ضروری به شمار می‌آید. این ریزاندام‌ها در همه سامانه‌های آبی نظیر آب شیرشور، آب دریا، دریاچه‌های فوق شور و حتی در مناطق قطبی یافت می‌شوند (۱-۳).

جلبک‌ها بسته به ماهیت ذاتی‌شان در تحمل شوری به دودسته هالوفیل (نیازمند به نمک برای رشد بهینه) و هالوتالرن (دارای مکانیزم‌هایی جهت ارائه پاسخ‌های محیطی و حفظ حیات در محیط‌های بسیار شور) تقسیم بندی می‌شود. به عبارت دیگر جلبک‌های هالوتالرن (Halotolerant)

جلبک‌ها یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی زمین هستند که تشکیل فیلوژنتیک تحتانی سلسله گیاهان را تشکیل می‌دهند. حدود ۷۰ درصد سطح زمین با آب پوشانده شده است و جلبک‌ها در حدود ۸۵ تا ۹۰ درصد در فرایند فتوسنتز نقش دارند. ریز جلبک‌ها (Microphytes or Microalgae) جلبک‌های میکروسکوپی هستند که به صورت معمول در سامانه‌های آب شیرین یا شور دریایی وجود دارند. این دسته از ریزاندام‌ها گونه‌های تک سلولی بوده که به صورت تکی یا به صورت گروهی در زنجیره‌هایی قرار می‌گیرند. ریز جلبک‌ها قادر به

با تولید متابولیت‌های خاصی از آسیب‌های ناشی از شوک نمک محافظت می‌شوند (۴).

کاروتنوئیدها گروهی از رنگدانه‌ها هستند که علاوه بر نقشی که در تشکیل رنگدانه‌ها بر عهده دارند، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز برای آن‌ها گزارش شده است. حیوانات و انسان قابلیت سنتز آن‌ها را نداشته و باید از طریق رژیم غذایی دریافت شوند که پس از آن می‌توانند از شکل کاروتنوئیدی به شکل دیگر تبدیل گردند، هم‌چنین این ماده نقش مهمی در تشکیل ویتامین A بر عهده دارد. در واقع بتا کاروتن، کاروتنوئید پایه برای تشکیل ویتامین A می‌باشد (۵).

جلبک *دونالیا سالیئا* نخستین بار در سال ۱۸۳۸ در حوضچه‌های نمک گیر در جنوب فرانسه کشف و تحت عنوان هماتوکوکوس معرفی گردید. اما در سال ۱۹۰۵ نام *دونالیا* را بر روی آن گذاشتند. در سال ۱۹۸۳ جنس *دونالیا* و ۱۶ جنس دیگر را در رده *Chloroplycaea* قرار دادند (۶). جلبک تک سلولی *دونالیا سالیئا* از تولیدکنندگان مهم دریا و دریاچه‌های نمکی فوق اشباع است که اهمیت تجاری و زیست محیطی زیادی به عنوان پایه زنجیره غذایی و تولید اکسیژن دارد (۷-۹). *دونالیا* یک جلبک سبز تک سلولی، یوکاریوتی، دو تاژکه، متحرک، معمولاً گرد با ابعاد ۹-۱۱ میکرومتر، فتوسنتز کننده، هالوتورلنت و فاقد دیواره سلولی است که حاوی مقدار زیادی بتا کاروتن، اسیدهای حلال، مواد محرک ایمنی مانند فیکوسیائین، پلی ساکاریدها، آهن و روی می‌باشد (۱۰). هم‌چنین حاوی مقادیری پروتئین، گلیسرول، انواع کاروتنوئیدها، ویتامین C و ویتامین E نیز می‌باشد (۸) که این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی می‌باشند (۱۱، ۱۲).

یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این جلبک، توانایی تولید و تجمع مقادیر زیاد بتاکاروتن تحت شرایطی نظیر شوری زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی است که منجر به نارنجی شدن رنگ سلول و سوسپانسیون جلبکی می‌شود. این جلبک به عنوان منبع غنی بتاکاروتن شناخته می‌شود که در شرایط رشد مناسب قادر به ذخیره سازی بتاکاروتن تا حدود ۱۵ درصد نسبت به وزن خشک جلبک می‌باشد (۱۳).

*دونالیا سالیئا* از نظر ریخت‌شناسی، شبیه به کیلامیدوموناس بوده (۱۴) و از نظر فیزیولوژی، این ریزجلبک می‌تواند در فشار اسمزی بسیار بالا (۱۵)، دمای بالای آب (۷)، شدت نور زیاد (۱۶) و کمبود منابع غذایی نظیر نیتрат، سولفات و فسفات به زندگی خود ادامه دهد (۱۷). *دونالیا سالیئا*، مقاوم‌ترین جلبک یوکاریوت شناخته شده در برابر

غلظت بالای نمک است و می‌تواند تغییر نمک محلول را در بازه ۰/۵ تا ۵ مولار از سدیم کلرید تحمل کند (۳). این ریزاندام برای زنده ماندن در چنین شرایطی، غلظت بالایی از بتاکاروتن (حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد وزن خشک) را تولید و ذخیره می‌کند (۱۸، ۱۹).

مطالعات انجام شده بر روی ریز جلبک *دونالیا سالیئا* نشان می‌دهد که ترکیب کلی جلبک *دونالیا سالیئا* شامل کاروتنوئیدها ۱۰-۱۵ درصد، پروتئین ۳۰-۶۰ درصد، کربوهیدرات ۱۰-۱۸ درصد و لیپید ۱۴-۲۰ درصد وزن خشک است. این مقادیر از ترکیبات زیستی در جلبک *دونالیا سالیئا* پتانسیل بالقوه این جلبک را برای کاربرد در صنعت غذا و آرایشی بهداشتی به عنوان ماده‌ی مؤثره با کیفیت مناسب و قابلیت تولید در مقیاس بالا را نشان می‌دهد (۲۰). در سال ۲۰۰۶ Wang و همکاران اثر جلبک *دونالیا سالیئا* بر رنگ پوست و گوشت ماهی قزل آلا *Oncorhynchus mykiss* را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که بتاکاروتن، باعث افزایش رنگدانه در پوست و گوشت ماهی می‌گردد، هم‌چنین افزایش وزن و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ماهی را باعث می‌شود (۲۱). در سال ۲۰۱۸ Liu و همکارانش مطالعه‌ای با عنوان تأثیر غلظت شوری بر تولید زیست توده جلبک و حذف مواد مغذی از فاضلاب شهری توسط *دونالیا سالیئا* انجام دادند. این مطالعه امکان سنجش کشت انبوه ریز جلبک‌ها در فاضلاب شهری تحت کنترل با محیط زیست کنترل شده را ارزیابی کرده است. از بین کلیه ترکیبات مورد بررسی، رشد بهینه جلبک در سطح شوری ۳۰ در صد با غلظت ۷۵ در صد پساب فاضلاب (نسبت ۳:۱ فاضلاب و مخلوط آب شور-محیط رشد) مشاهده شد (۲۲).

در سال‌های اخیر توجه به رنگدانه‌های طبیعی مانند بتاکاروتن و کاربردهای آن در پرورش آبزیان و هم‌چنین تولید مکمل‌های دارویی و آنتی‌اکسیدانی رو به افزایش بوده است. رنگدانه‌ی بتاکاروتن طبیعی بر پایه‌ی جلبک به دلیل ماهیت آن دارای محتوای آنتی‌اکسیدانی بالایی بوده و تولید آن با استفاده از ایجاد تنش در ریز جلبک *دونالیا سالیئا* پتانسیل بالایی دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی و بهبود میزان تولید کاروتنوئید، پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استخراجی از ریز جلبک *دونالیا سالیئا* بواسطه تغییر در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مؤثر در نرخ رشد جلبک با هدف امکان استفاده از آن به عنوان یک منبع رنگدانه‌ای و آنتی‌اکسیدانی و منبع تأمین ویتامین، پروتئین و اسیدهای چرب در صنعت غذا و افزایش در ارزش تغذیه‌ای آن انجام شده

رئومتری استوانه‌های هم محور استفاده شد. نتایج ویسکوزیته بر حسب cp بیان گردید (۲۳).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پروتئین: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱-2,2-diphenyl-1-) DPPH - هیدرازیل (picrylhydrazyl)، طبق روش (۲۴) انجام شد. غلظت کل پروتئین با استفاده از روش لوری توسط معرف Folin-Ciocalteu phenol تعیین شد (۲۵).

ارزیابی محتوای کلروفیل‌ها و کارتنوئید: مقدار کلروفیل و کارتنوئیدها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. ۵ ml از سوپانسیون جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محلول روبی دور ریخته شد. بر روی رسوب سلولی باقی مانده ۵ ml استون ۸۵ در صد ریخته شد و بعد از همزدن در تاریکی به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط حاصل مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. میزان جذب نور محلول روبی در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۶۴ nm به کمک اسپکتروفتومتر خوانده شد. به کمک رابطه‌های زیر میزان کلروفیل a و b و در نتیجه کلروفیل کل و کارتنوئید بر حسب mg/ml بدست آمد (26).

رابطه (۱)

$$E_{644} \times 0.918 - E_{633} \times 10.3 = a$$

رابطه (۲)

$$E_{633} \times 3.87 - E_{644} \times 19.7 = b$$

رابطه (۳)

$$\text{غلظت کارتنوئید} = 4.2 \times E_{452} - 0.264 \times \text{غلظت کلروفیل a} - 0.496 \times \text{غلظت کلروفیل b}$$

## • یافته‌ها

**نتایج کشت:** کشت ریز جلبک دونالیا در شرایط مختلف نور و شوری مطابق طراحی آزمایش صورت گرفته انجام شد و نتایج به صورت (cell/ml) بیان شد.

شکل ۱ الف تأثیر همزمان پارامترهای شوری و میزان نور بر تعداد سلول‌ها را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص است، افزایش میزان نور به طور کلی تأثیر مثبت بر تعداد سلول‌های رشد یافته دارد. از طرفی بررسی تأثیر شوری بیانگر حالت زنگوله‌ای با نقطه‌ی بیشینه است که نشان می‌دهد افزایش شوری تا میزان حدود ۱/۵ mol تأثیر مثبت بر رشد داشته و شوری بالاتر موجب کاهش رشد می‌شود. لذا می‌توان گفت کشت تحت نور ۵۰۰ و شوری ۱/۵ mol بالاترین راندمان را دارد.

است. همچنین خواص رئولوژیکی ریز جلبک دونالیا سالیانا پس از رشد در محیط آبی مورد بررسی قرار گرفت.

## • مواد و روش‌ها

گونه جلبک و محیط کشت: استوک ریز جلبک دونالیا سالیانا با خواستگاه دریاچه‌ی مهارلو از بانک ملی جلبک ایران با شماره شناسه INASM0601 تهیه شد. کشت در محیط کشت تغییر یافته‌ی جانسون (Modified johnson) محصول شرکت مرک آلمان در انکوباتور همزن دار تحت نور انجام شد. در مرحله‌ی اول استوک جلبک طی دو مرحله کشت در شرایط دما، نور و شوری مطابق روش حجازی و همکاران انجام شد (۱۶). پس از ۲ مرحله کشت، استوک اولیه به ۲ لیتر افزایش یافته و جهت انجام تست‌های نهایی در یخچال نگهداری شد.

**طراحی آزمایش:** آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه سطح شوری ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ molar (با استفاده از نمک NaCl مرک، آلمان) با شدت‌های نور صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2\text{s}}$  (با استفاده از لامپ LED مهتابی رشد گیاه) طراحی و با ۳ تکرار مطابق با جدول ۱ اجرا شد. طراحی آزمایش با استفاده از نرم افزار Design Expert ver 10.1 انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از پژوهش با استفاده از نرم افزار Design-Expert 10.1 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) و با روش RSM صورت گرفت. آنالیز آماری داده‌ها با تجزیه واریانس ANOVA انجام شد. سطح معنی داری نتایج ۵ درصد ( $p < 0.05$ ) در نظر گرفته شد. هر تست سه بار تکرار شده و میانگین آن به عنوان نتیجه نهایی گزارش شد.

جدول ۱. تیمار تست‌های انجام شده بر اساس طراحی آزمایش

| سطح شوری (M) | شدت نور ( $\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ ) |     |
|--------------|---------------------------------------------------------|-----|
| ۱            | ۰/۵                                                     | ۰   |
| ۲            | ۰/۵                                                     | ۵۰۰ |
| ۳            | ۰/۵                                                     | ۲۵۰ |
| ۴            | ۱/۵                                                     | ۰   |
| ۵            | ۲/۵                                                     | ۰   |
| ۶            | ۱/۵                                                     | ۲۵۰ |
| ۷            | ۲/۵                                                     | ۲۵۰ |
| ۸            | ۱/۵                                                     | ۵۰۰ |
| ۹            | ۲/۵                                                     | ۵۰۰ |

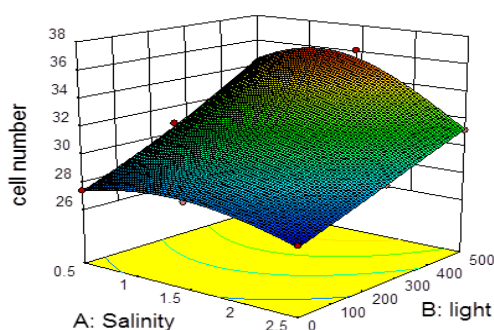
ارزیابی ویسکوزیته سوپانسون جلبک: ویژگی‌های رئولوژیکی سوپانسیون جلبک با استفاده از سیستم رئومتر Anton Paar (مدل MCR) ارزیابی شد. در این سیستم از اکسسوری

**جدول ۲.** میزان رشد ریزجلیک *دونالیلا سالینا* (تعداد سلول بر میلی لیتر) در شرایط آزمایش با ۳ تکرار

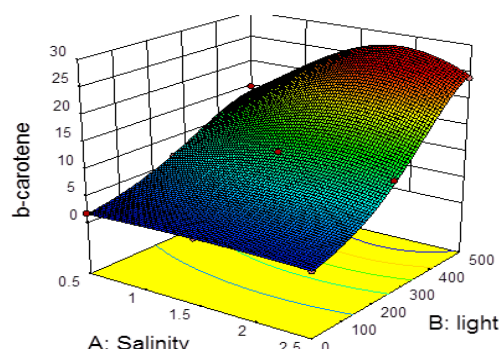
| شوری | نور | میانگین تعداد سلول (سلول بر میلی لیتر) | P-value |
|------|-----|----------------------------------------|---------|
| ۰/۵  | ۰   | $27.4 \pm 2.9$                         | ۰/۵۶۱   |
| ۰/۵  | ۵۰۰ | $34.2 \pm 2.23$                        | ۰/۳۴۴   |
| ۰/۵  | ۲۵۰ | $30.8 \pm 1.65$                        | ۰/۰۷۵   |
| ۱/۵  | ۰   | $28.1 \pm 0.65$                        | ۰/۵۴۷   |
| ۲/۵  | ۰   | $26.8 \pm 0.65$                        | ۰/۵۴۷   |
| ۱/۵  | ۲۵۰ | $31.4 \pm 0.94$                        | ۰/۲     |
| ۲/۵  | ۲۵۰ | $28.9 \pm 0.48$                        | ۰/۲     |
| ۱/۵  | ۵۰۰ | $36.1 \pm 0.95$                        | ۰/۰۹۱   |
| ۲/۵  | ۵۰۰ | $31.2 \pm 0.17$                        | ۰/۰۵۷   |

آنالیز واریانس با استفاده از مدل سازی quadratic انجام شده و با توجه به مقدار p-value داده‌ها از نظر آماری معنی‌دار بوده و با توجه به  $R^2 = 0.9963$  داده‌های تجربی انطباق خوبی با مدل ارائه شده دارد. جدول ۳ آنالیز واریانس تعداد سلول‌ها به عنوان پارامتر رشد را نشان می‌دهد.

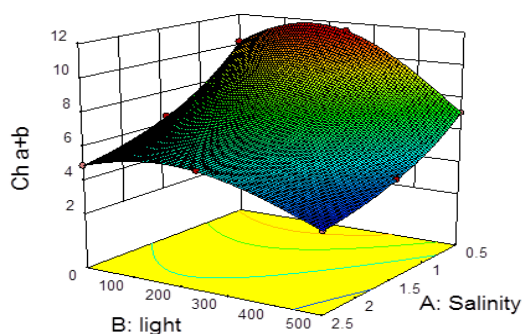
نتایج نشان می‌دهد با افزایش میزان نوردهی میزان تولید بتاکاروتن در دیواره سلولی افزایش می‌یابد. بررسی تأثیر متقابل شوری و نور بر میزان بتاکاروتن تولیدی در شکل ۱ ب نشان می‌دهد که در میزان نور صفر عملاً محتوای بتاکاروتن ناچیز بوده و افزایش شوری نیز تأثیری بر میزان تولید آن ندارد.



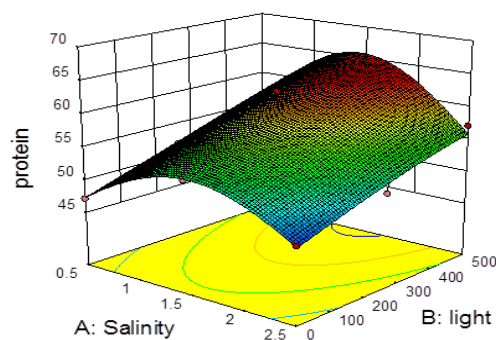
الف



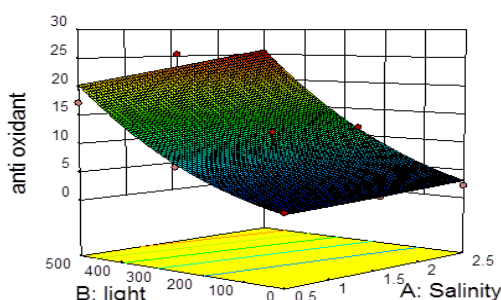
ب



ج



د



ه

شکل ۱. الف) تأثیر همزمان پارامترهای شوری و میزان نور بر تعداد سلول‌ها. ب) تأثیر متقابل شوری و نور بر میزان بتاکاروتن تولیدی. ج) بررسی تأثیر شوری و نور بر میزان تولید کلروفیل. د) تأثیر پارامترهای نور و شوری بر میزان تولید پروتئین. ه) تأثیر پارامترهای نور و شور

جدول ۳. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر فاکتورهای میزان شوری و شدت نور بر میزان رشد جلبک

| Source         | Sum of Squares   | df | Mean Square      | F Value  | p-value              |
|----------------|------------------|----|------------------|----------|----------------------|
| Model          | $8.78118E^{-10}$ | ۵  | $1.75624E^{-10}$ | ۱۶۰/۴۹۰۵ | ۰/۰۰۰۷۶۹ significant |
| A-Salinity     | $5.68529E^{-10}$ | ۱  | $5.68529E^{-10}$ | ۵۱/۹۵۳۹۶ | ۰/۰۰۵۵۰۵             |
| B-light        | $7.35989E^{-10}$ | ۱  | $7.35989E^{-10}$ | ۶۷۲/۵۷۰۱ | ۰/۰۰۰۱۲۶             |
| AB             | $5.26285E^{-12}$ | ۱  | $5.26285E^{-12}$ | ۴/۸۰۹۳۶۳ | ۰/۱۱۵۹۲۶             |
| A <sup>2</sup> | $7.56۰۹۸E^{-11}$ | ۱  | $7.56۰۹۸E^{-11}$ | ۶۹/۰۹۴۶۴ | ۰/۰۰۳۶۴۹             |
| B <sup>2</sup> | $4.4۰۳۸۲E^{-12}$ | ۱  | $4.4۰۳۸۲E^{-12}$ | ۴/۰۲۴۳۵۳ | ۰/۱۳۸۵۰۸             |
| Residual       | $3.28288E^{-12}$ | ۳  | $1.0۹۴۲۹E^{-12}$ |          |                      |
| Cor Total      | $8.814۰۱E^{-11}$ | ۸  |                  |          |                      |

افزایش میزان نور باعث افزایش میزان بتاکاروتن تولیدی شده و در کشت زیر نور بالا، افزایش شوری نیز تأثیر مثبت بر میزان بتاکاروتن تولیدی دارد. نتایج نشان می‌دهد بالاترین تولید بتاکاروتن در شوری  $1/5 \text{ mol}$  و میزان نور  $500 \text{ } \mu\text{mol}$  (photons  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) بوده که این میزان برابر  $24/9 \text{ mg/ml}$  است. نتایج سایر پژوهش‌ها نیز بیانگر این است که افزایش شوری تا میزان حدود ۲ مولار باعث افزایش میزان بتاکاروتن تولیدی شده و افزایش بیشتر آن نه تنها از رشد جلبک جلوگیری می‌کند بلکه تولید بتاکاروتن را نیز کاهش می‌دهد (11، 15).

آنالیز واریانس با استفاده از مدل سازی quadratic انجام شده و با توجه به مقدار p-value داده‌ها از نظر آماری معنی دار بوده و با توجه به  $R^2 = 0.9985$  داده‌های تجربی انطباق خوبی با مدل ارائه شده دارد. جدول ۴ آنالیز واریانس محتوای بتاکاروتن متناسب با پارامترهای آزمایش را نشان می‌دهد. کلروفیل از جمله مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده ریزجلبک دونا لیا سالینا بوده و نتایج بررسی میزان محتوای

کلروفیل‌های موجود در این جلبک در شکل ۱ ج آورده شده است. با توجه به شکل ۱ ج، به طور کلی تولید کلروفیل در غلظت‌های  $1/5$  و  $1/5 \text{ molar}$  بیشتر بوده و با افزایش غلظت میزان آن کاهش می‌یابد. همچنین در شوری  $2/5 \text{ molar}$  میزان تأثیر نور بر تولید کلروفیل کمتر از حالتی است که شوری در کمینه‌ی خود ( $0/5 \text{ molar}$ ) قرار دارد. در مقادیر  $0/5 \text{ molar}$  نمک نیز افزایش بیش از حد نور کاهش میزان تولید کلروفیل را در پی دارد. با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین میزان کلروفیل تولید شده در شوری  $0/5 \text{ molar}$  و شدت نور  $250$  (photons  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) گزارش شد.

آنالیز واریانس نتایج کلروفیل با استفاده از مدل سازی quadratic انجام شده و با توجه به مقدار p-value داده‌ها از نظر آماری معنی دار بوده و با توجه به  $R^2 = 0.9999$  داده‌های تجربی کاملاً با مدل ارائه منطبق است. جدول ۵ آنالیز واریانس محتوای کلروفیل متناسب با پارامترهای آزمایش را نشان می‌دهد.

جدول ۴. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر فاکتورهای میزان شوری و شدت نور بر میزان محتوای بتاکاروتن

| Source         | Sum of Squares | df | Mean Square   | F Value  | p-value              |
|----------------|----------------|----|---------------|----------|----------------------|
| Model          | ۰/۲۰۵۹۰۷       | ۵  | ۰/۰۴۱۱۸۱      | ۴۰۱/۰۳۶۱ | ۰/۰۰۰۱۹۶ significant |
| A-Salinity     | ۰/۰۰۴۹۶۱       | ۱  | ۰/۰۰۴۹۶۱      | ۴۸/۳۰۹۴۱ | ۰/۰۰۶۱۰۹             |
| B-light        | ۰/۱۸۶۳۳۱       | ۱  | ۰/۱۸۶۳۳۱      | ۱۸۱۴/۵۴۷ | $2/85E^{-05}$        |
| AB             | $4/45E^{-05}$  | ۱  | $4/45E^{-05}$ | ۰/۴۳۳۰۵۵ | ۰/۵۵۷۴۸۵             |
| A <sup>2</sup> | ۰/۰۰۳۰۷۲       | ۱  | ۰/۰۰۳۰۷۲      | ۲۹/۹۱۳۰۲ | ۰/۰۱۲۰۱۵             |
| B <sup>2</sup> | ۰/۰۱۱۴۹۹       | ۱  | ۰/۰۱۱۴۹۹      | ۱۱۱/۹۷۷۶ | ۰/۰۰۱۸۰۳             |
| Residual       | ۰/۰۰۰۳۰۸       | ۳  | ۰/۰۰۰۱۰۳      |          |                      |
| Cor Total      | ۰/۲۰۶۲۱۵       | ۸  |               |          |                      |

**جدول ۵. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر فاکتورهای میزان شوری و شدت نور بر میزان کلروفیل**

| Source         | Sum of Squares       | df | Mean Square          | F Value  | p-value              |             |
|----------------|----------------------|----|----------------------|----------|----------------------|-------------|
| Model          | ۰/۰۰۳۶۴              | ۵  | ۰/۰۰۰۷۲۸             | 5648.162 | ۳/۷۲E <sup>-۰۶</sup> | significant |
| A-Salinity     | ۰/۰۰۲۴۲۸             | ۱  | ۰/۰۰۲۴۲۸             | ۱۸۸۳۴/۳۸ | ۸/۵۳E <sup>-۰۷</sup> |             |
| B-light        | ۰/۰۰۰۶               | ۱  | ۰/۰۰۰۶               | ۴۶۵۵/۱۶۹ | ۶/۹۴E <sup>-۰۶</sup> |             |
| AB             | ۱/۸۶E <sup>-۰۹</sup> | ۱  | ۱/۸۶E <sup>-۰۹</sup> | ۰/۰۱۴۴۶۷ | ۰/۹۱۱۸۶۶             |             |
| A <sup>2</sup> | ۴/۷۹E <sup>-۰۵</sup> | ۱  | ۴/۷۹E <sup>-۰۵</sup> | ۳۷۱/۶۸۸۷ | ۰/۰۰۰۳۰۵             |             |
| B <sup>2</sup> | ۰/۰۰۵۶۵              | ۱  | ۰/۰۰۰۵۶۵             | ۴۳۷۹/۵۵۲ | ۷/۶E <sup>-۰۶</sup>  |             |
| Residual       | ۳/۸۷E <sup>-۰۷</sup> | ۳  | ۱/۲۹E <sup>-۰۷</sup> |          |                      |             |
| Cor Total      | ۰/۰۰۳۶۴۱             | ۸  |                      |          |                      |             |

بررسی تأثیر پارامترهای نور و شوری بر میزان تولید پروتئین بیانگر این است که مدل تأثیر شوری بر میزان تولید پروتئین بصورت زنگوله ای بوده و با افزایش آن ابتدا میزان پروتئین افزایش یافته و در ادامه در شوری‌های بالاتر از ۱/۵ molar میزان پروتئین شروع به کاهش می‌کند. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بر خلاف شوری، نور بر روی میزان پروتئین تولیدی تأثیر مثبت داشته و با افزایش نور میزان محتوای پروتئین دونالیا سالینا افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که در شوری ۱/۵ molar میزان پروتئین تولیدی ماکزیمم است. مطالعات پیشین نیز محتوای بالای پروتئین در این ریز جلبک را نشان داده اند. بررسی‌ها نشان داده است که عموماً میزان پروتئین در این ریز جلبک بالاتر از ۵۰ درصد بوده و میزان تولید آن وابسته به پارامترهای متفاوتی از جمله شوری آب است. بررسی تأثیر شوری بیانگر ماکزیمم تولید پروتئین در شوری حدود ۲ molar است (۲۷).

آنالیز واریانس نشان می‌دهد که تأثیر دو پارامتر نور و شوری بر روی میزان پروتئین معنادار بوده و با توجه به  $0/9556 =$

$R^2$  داده های تجربی با مدل ارائه شده تطابق مطلوبی دارد. جدول ۶ آنالیز واریانس محتوای پروتئین متناسب با پارامترهای آزمایش را نشان می‌دهد.

بررسی تأثیر پارامترها نشان می‌دهد که تغییر در میزان شوری تأثیری بر روی تولید محتوای آنتی اکسیدان نداشته و افزایش شوری تأثیر معناداری بر افزایش محتوای آنتی اکسیدان ندارد. از طرف دیگر با توجه به شکل ۱، افزایش نور کشت تأثیر زیادی بر محتوای آنتی اکسیدان داشته و این میزان را تا حدود ۲۰ برابر نیز افزایش می‌دهد.

نتایج بررسی ویسکوزیته نشان می‌دهد که ویسکوزیته‌ی محلول حاوی جلبک در انتهای دوره‌ی رشد تفاوت چندانی با ویسکوزیته‌ی آب نداشته و حدود ۱۵ درصد افزایش می‌یابد. همانطور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، ویسکوزیته‌ی محلول حاوی جلبک عملاً بیشتر از ۱۵ درصد نسبت به ویسکوزیته‌ی آب افزایش ندارد.

**جدول ۶. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر فاکتورهای میزان شوری و شدت نور بر میزان پروتئین**

| Source         | Sum of Squares       | df | Mean Square          | F Value  | p-value  |             |
|----------------|----------------------|----|----------------------|----------|----------|-------------|
| Model          | ۵/۲۹E <sup>-۰۷</sup> | ۵  | ۱/۰۶E <sup>-۰۷</sup> | ۱۲/۹۱۰۹۷ | ۰/۰۳۰۵۱۴ | significant |
| A-Salinity     | ۳/۵۱E <sup>-۱۰</sup> | ۱  | ۳/۵۱E <sup>-۱۰</sup> | ۰/۰۴۲۸۵۳ | ۰/۸۴۹۲۵۶ |             |
| B-light        | ۲/۸۹E <sup>-۰۷</sup> | ۱  | ۲/۸۹E <sup>-۰۷</sup> | ۳۵/۲۳۷۶۴ | ۰/۰۰۹۵۵۶ |             |
| AB             | ۳/۳۱E <sup>-۱۰</sup> | ۱  | ۳/۳۱E <sup>-۱۰</sup> | ۰/۰۴۰۴۷۴ | ۰/۸۵۳۴۲۵ |             |
| A <sup>2</sup> | ۲/۳۴E <sup>-۰۷</sup> | ۱  | ۲/۳۴E <sup>-۰۷</sup> | ۲۸/۶۱۵۸۳ | ۰/۰۱۲۷۷۸ |             |
| B <sup>2</sup> | ۵/۰۶E <sup>-۰۹</sup> | ۱  | ۵/۰۶E <sup>-۰۹</sup> | ۰/۶۱۸۰۸  | ۰/۴۸۹۱۴۱ |             |
| Residual       | ۲/۴۶E <sup>-۰۸</sup> | ۳  | ۸/۱۹E <sup>-۰۹</sup> |          |          |             |
| Cor Total      | ۵/۵۳E <sup>-۰۷</sup> | ۸  |                      |          |          |             |

جدول ۷. ویسکوزیته‌ی محلول حاوی جلبک

| شوری | نور | ویسکوزیته (سانتی پواز) |
|------|-----|------------------------|
| ۰/۵  | ۰   | $22/0 \pm 0.63/1$      |
| ۰/۵  | ۵۰۰ | $31/0 \pm 0.63/1$      |
| ۰/۵  | ۲۵۰ | $17/0 \pm 0.82/1$      |
| ۱/۵  | ۰   | $0.8/0 \pm 0.93/1$     |
| ۲/۵  | ۰   | $47/0 \pm 0.96/1$      |
| ۱/۵  | ۲۵۰ | $14/0 \pm 1.04/1$      |
| ۲/۵  | ۲۵۰ | $29/0 \pm 1.04/1$      |
| ۱/۵  | ۵۰۰ | $0.2/0 \pm 1.06/1$     |
| ۲/۵  | ۵۰۰ | $24/0 \pm 1.45/1$      |

بررسی نتایج نشان می‌دهد که افزایش نور تأثیر آنچنانی بر ویسکوزیته نداشته و صرفاً با افزایش شوری تا ۲٫۵ مولار و در نتیجه افزایش رشد *دونالیا سالی‌نا*، میزان ویسکوزیته‌ی محلول افزایش می‌یابد و لذا ویسکوزیته با شوری رابطه‌ی مستقیم و تا حدودی خطی مطابق با رابطه‌ی ۴ دارد.

رابطه ۴)

$$\text{Viscosity} = 0.0228 \times \text{Salinity} + 1.0609$$

## • بحث

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر پارامترهای شوری و نور بر روی میزان رشد *دونالیا سالی‌نا*، بتاکاروتن، کلروفیل، محتوای پروتئین، آنتی‌اکسیدان و ویسکوزیته‌ی محلول آن مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی به نظر می‌رسد تأثیر پارامتر نور بر میزان رشد و مواد مؤثره موجود در *دونالیا سالی‌نا* بیشتر از پارامتر شوری بوده و کشت در نور با لوکس بالا می‌تواند در کنار رشد بالای جلبک، محتوای بتاکاروتن، کلروفیل، پروتئین و آنتی‌اکسیدان آن را افزایش دهد. با توجه به اینکه کارتنوئیدها گیرنده‌های فرعی نور بوده و با جذب نورهای مرئی نقشی حیاتی در حفاظت از سلول در برابر تشعشعات بالا ایفا می‌کنند، لذا در تنش‌های حاصل از افزایش نور جلبک *دونالیا سالی‌نا* قادر به افزایش سنتز و تجمع کارتنوئیدها می‌باشد (۲۸). همچنین شوری ۱/۵ molar به عنوان بهینه‌ی شوری محیط کشت پیشنهاد می‌گردد. بررسی سایر مطالعات نشان می‌دهد که فاکتورهای مختلف از جمله نور، شوری، دما و pH تأثیر بسزایی در رشد جلبک دارد. دقت در تنظیم فاکتورهای فوق می‌تواند کمک شایانی به کشت بهتر جلبک و میزان مواد مؤثره آن داشته باشد (۲۹). نور و شوری به عنوان ۲ پارامتر مهم در مطالعات دیگر نیز بررسی شده‌اند. نیکوکار و همکاران در سال ۲۰۰۴ با

بررسی جلبک *دونالیا سالی‌نا* جدا شده از دریاچه‌ی مهارلو شیراز و با بررسی شوری‌های متفاوت بیشترین میزان رشد را در شوری ۲ molar مشاهده کردند (۳۰). در حالی که در بررسی *دونالیا سالی‌نا* موجود در دریاچه‌ی ارومیه رشد جلبک در شوری ۱ molar به بالاترین حد خود رسید (۳۱). به نظر می‌رسد شرایط خواستگاه اولیه‌ی جلبک و پارامترهای آب آن نیز بر روی اثر شوری در رشد تأثیرگذار است.

نکته‌ی مهم مورد اشاره در عمده‌ی تحقیقات به خصوص بر روی میزان شوری نشان‌دهنده تأثیر منفی شوری بر رشد جلبک و برعکس تأثیر مثبت آن بر میزان بتاکاروتن تولید شده است. مطالعات Borowitzka و همکاران در سال ۱۹۹۰ برای اولین بار تأثیر منفی شوری بر میزان رشد جلبک *دونالیا* را نشان داد (۳۲). برخی مطالعات میزان شوری بهینه برای رشد جلبک را در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد بیان کرده‌اند که از میزان بهینه‌ی بدست آمده در مطالعه‌ی حاضر بیشتر است. Gochbauer و همکاران با بررسی پارامتر شوری بر میزان رشد *دونالیا سالی‌نا* نشان دادند که غلظت نمک بهینه برای رشد *دونالیا* ۱۵ درصد می‌باشد (۳۳)، در حالی که در مطالعات انجام شده توسط قاسمی در سال ۱۹۹۹ این میزان ۱۰ درصد گزارش شد (۳۴). به نظر می‌رسد نوع زیرگونه انتخابی و شرایط رشد خواستگاه جلبک پارامتر مهمی در میزان شوری بهینه‌ی رشد جلبک است. به طوری که نتایج مطالعات نیکوکار و همکاران در سال ۲۰۰۴ که بر روی گونه‌ی *دونالیا سالی‌نا* جمع‌آوری شده از دریاچه‌ی ارومیه انجام شده به نتایج مطالعه‌ی حاضر نزدیکتر است (۳۵). مطالعات هاشمی غلظت بهینه نمک برای رشد *دونالیا سالی‌نا* از دریاچه‌ی ارومیه را ۱ molar گزارش کرد. این مطالعات نشان داد که در غلظت‌های بالاتر نمک تا ۲ molar نیز میکروجلبک رشد خوبی از خود نشان داده است. در عین حال بالاترین میزان بتاکاروتن تولید شده در غلظت نمک ۳٫۵ molar مشاهده شد (۳۶). بررسی‌ها نشان می‌دهد در غلظت‌های بالاتر نمک سلول‌ها با پدیده‌ی فشار اسمزی مواجه شده و ضمن کاهش رشد سلول، فعالیت سلولی به حد اقل می‌رسد (۳۷). سرمد و همکاران با کشت ریزجلبک *دونالیا سالی‌نا* در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ molar دریافتند که القای بتاکاروتن در سلول‌های جلبک کاملاً وابسته به سویه بوده و افزایش نمک باعث کاهش چشمگیر تعداد سلول‌ها و در نتیجه کاهش بتاکاروتن تولیدی می‌شود. در این مطالعه بیشترین بتاکاروتن تولیدی در محیط کشت با غلظت نمک ۱ molar و به میزان ۱۴٫۲ g/L گزارش شد (۳۸).

در یک بررسی کلی از نتایج حاصله می‌توان به این نکته دست یافت که در غلظت‌های پایین نمک، روند تولید بتاکاروتن

تعمیم بوده و برای بهینه کردن رشد و تولید بتاکاروتن باید به صورت اختصاصی بر روی همان سویه کار شود. به طور کلی ارتباط قوی میان ظرفیت طبیعی هر سویه و میزان پاسخ به عوامل القاگر محیطی وجود دارد. بنابراین امروزه تحقیقات به سمت مطالعات ژنتیکی و اصلاحات ژنتیکی به منظور افزایش و بهبود تولید محصول رفته است (۴۰، ۴۱).

متناسب با روند رشد بوده و با افزایش شوری رشد روند کاهشی پیدا می‌کند. نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر نمک، کاهش مقدار نرخ ویژه رشد، تولید بتاکاروتن به عنوان یک متابولیت ثانویه درون سلولی افزایش می‌یابد (۳۹). 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، شدیدا به سویه ریزجلبک نیز وابسته است و بنابراین نتایج حاصله تنها به سویه‌ی مورد مطالعه قابل

## • Reference

1. Rasoul-Amini S, Mousavi P, Montazeri-Najafabady N, Mobasher MA, Mousavi SB, Vosough F, et al. Biodiesel properties of native strain of *Dunaliella salina*. *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)*. 2014;4(1):39-41.
2. Raja R, Shanmugam H, Ganesan V, Carvalho I. Biomass from microalgae: an overview. *Oceanography: Open Access*. 2013;1-7.
3. Borowitzka L, Moulton T, Borowitzka M, editors. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. Eleventh international seaweed symposium; 1984: Springer.
4. Richmond A. Cell response to environmental factors. *CRC handbook of microalgal mass culture*: CRC Press; 2017. p. 69-100.
5. de Carvalho LMJ, Gomes PB, de Oliveira Godoy RL, Pacheco S, do Monte PHF, de Carvalho JLV, et al. Total carotenoid content,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*. 2012;47(2):337-40.
6. Mayne ST. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*. 1996;10(7):690-701.
7. García F, Freile-Pelegrín Y, Robledo D. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource technology*. 2007;98(7):1359-65.
8. Hosseini Tafreshi A, Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*. 2009;107(1):14-35.
9. Lee S-Y, Kim S-H, Hyun S-H, Suh HW, Hong S-J, Cho B-K, et al. Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrate deficiency and high light at different growth phases. *Process Biochemistry*. 2014;49(6):996-1004.
10. Giordano M, Pezzoni V, Hell R. Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*. 2000;124(2):857-64.
11. Gomez PI, Barriga A, Cifuentes AS, Gonzalez MA. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biological Research*. 2003;36(2):185-92.
12. Van Poppel G, Goldbohm RA. Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *The American journal of clinical nutrition*. 1995;62(6):1393S-402S.
13. Shaish A, Ben-Amotz A, Avron M. [41] Biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella*. *Methods in enzymology*. 1992;213:439-44.
14. Ginzburg M. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical research*. 1988;14:93-183.
15. Fazeli M, Tofighi H, Samadi N, Jamalifar H. Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*. 2006;97(18):2453-6.
16. Hejazi M, Wijffels R. Effect of light intensity on  $\beta$ -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomolecular Engineering*. 2003;20(4-6):171-5.
17. Celekli A, Dönmez G. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(2):183-9.
18. Phadwal K, Singh P. Effect of nutrient depletion on  $\beta$ -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource technology*. 2003;90(1):55-8.
19. Prieto A, Cañavate JP, García-González M. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of biotechnology*. 2011;151(2):180-5.
20. Natrah F, Yusoff F, Shariff M, Abas F, Mariana N. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*. 2007;19(6):711-8.
21. Wang Y-J, Chien Y-H, Pan C-H. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hypessobrycon callistus*. *Aquaculture*. 2006;261(2):641-8.
22. Liu Y, Yildiz I. The effect of salinity concentration on algal biomass production and nutrient removal from municipal wastewater by *Dunaliella salina*. *International Journal of Energy Research*. 2018;42(9):2997-3006.
23. Erni P, Fischer P, Windhab EJ, Kusnezov V, Stettin H, Läger J. Stress-and strain-controlled measurements of interfacial shear viscosity and viscoelasticity at

- liquid/liquid and gas/liquid interfaces. Review of scientific instruments. 2003;74(11):4916-24.
24. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995;28(1):25-30.
  25. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analytical biochemistry. 1977;83(2):346-56.
  26. Frank G. Physiology and biochemistry of glycerol biosynthesis in *Dunaliella*. 1974.
  27. Kumar D, Kastanek P, Adhikary SP. Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. Current Science. 2018;115(2):234-41.
  28. Trenkenshu R. Simplest Models Of Microalgae Growth 2. Queasycontinuous Culture. Ekologiya Morya. 2005(67):98.
  29. Rad FA, Aksoz N, Hejazi MA. Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. African Journal of Biotechnology. 2011;10(12):2282-9.
  30. Nikookar K, Moradshahi A, Kharati M. Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlou salt lake in Shiraz. Iranian Journal of Science and Technology (Sciences). 2004;28(1):117-25.
  31. shariati M, editor Study of beta-carotene synthesis in response to different concentration of heavy metal copper in unicellular green alga *Dunaliella salina*. 2nd Iranian National Conference of biotechnology; 2001; Karaj, Iran.
  32. Borowitzka MA, editor The mass culture of *Dunaliella salina*. Technical Resource Papers Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds; 1990.
  33. Gochnauer M, Kushwaha S, Kates M, Kushner D. Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. Archiv für Mikrobiologie. 1972;84(4):339-49.
  34. GHasemi H. Glycerol production by *Dunaliella* algae, A thesis presented to the Tarbiyat Modarres University: Tarbiat Modarres University; 1999.
  35. Nikoukar K, Moradshahi A, Kharati M. Influencer Of Salinity On The Growth, Pigmentation And Ascorbate Peroxidase Activity Of *Dunaliella salina* Isolated From Maharlou Salt. 2004.
  36. Hashemi SA, Pajoum shariati f, Delavari Amrei H, Heydarinasab A. Growth Pattern and  $\beta$ -Carotene Production of *Dunaliella salina* Cells in Different Salinities. Journal Of Food Technology And Nutrition. 2019;16(4 (64) #b00612):-.
  37. Tammam AA, Fakhry EM, El-Sheekh M. Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. African Journal of Biotechnology. 2011;10(19):3795-808.
  38. Sarmad J, Shariati M, Tafreshi AH. Preliminary Assessment of  $\beta$ -carotene Accumulation in Four Strains of *Dunaliella salina* Cultivated under the Different Salinities and Low Light Intensity. 2006.
  39. Montazeri-Najafabady N, Negahdaripour M, Salehi MH, Morowvat MH, Shaker S, Ghasemi Y. Effects of osmotic shock on production of  $\beta$ -carotene and glycerol in a naturally isolated strain of *Dunaliella salina*. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 2016;8:160-3.
  40. Zhu Q-L, Zheng J-L, Liu J. Transcription activation of  $\beta$ -carotene biosynthetic genes at the initial stage of stresses as an indicator of the increased  $\beta$ -carotene accumulation in isolated *Dunaliella salina* strain GY-H13. Aquatic Toxicology. 2020;222:105472.
  41. Xu Y, Ibrahim IM, Wosu CI, Ben-Amotz A, Harvey PJ. Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural  $\beta$ -carotene production. Biology. 2018;7(1):14.

## Investigation of the Effects of Saline Stress and Light Intensity on the Growth Rate of *Dunaliella salina* and Its Beta-carotene Content and Physiochemical Characteristics

Osia Sh<sup>1</sup>, Mizani M<sup>2</sup>, Zargaraan A<sup>3</sup>

1- Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- \*Corresponding author: Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: m.mizani@srbiau.ac.ir

3- Assistant Professor, Department of Food and Nutrition Policy and Planning Research, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 25 Aug, 2020

Accepted 16 Dec, 2021

**Background and Objectives:** *Dunaliella salina* is a unicellular, mobile green alga, which lacks a rigid cell wall. One of the unique characteristics of *Dunaliella salina* is the ability to produce and accumulate high contents of beta-carotene. The aim of the present study was to assess and enhance carotenoid, protein and antioxidant compound production in *Dunaliella salina* cells.

**Materials & Methods:** In this study, *Dunaliella salina* microalga was cultured in modified Johnson culture media under three levels of saline stress (0.5, 1.5 and 2.5 mol) and three levels of light intensity (0, 250 and 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) and then effects of these parameters were investigated.

**Results:** Results showed that increasing the level of saline stress up to 1.5 mol enhanced the cell growth; however, further increases led to decreases in the cell growth rate. The maximum growth rate of *Dunaliella salina* was achieved at 1.5 mol salinity and 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  light intensity, which was equal to 36.1 cell/ml and the highest content of carotenoids was 24.9 mg/ml. Furthermore, the highest contents of chlorophyll, antioxidants and proteins were 11.5 mg/g, 25.3% and 62.9%, respectively.

**Conclusion:** Light intensity included more effects on the growth rate and active ingredient content of *Dunaliella salina* than that it included on salinity. Cultivation under high light intensity (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) increased beta-carotene, chlorophyll, protein and antioxidant contents as well as the high cell growth rate. Salinity of 1.5 mol was suggested as the optimum culture media salinity.

**Keywords:** Microalgae, *Dunaliella salina*, Chlorophyll, Protein, Antioxidant, Rheology