مروری بر تأثیر تنش‌های مختلف در ذخیره بتاکاروتن در ریزجلبک‌ها

آزیتا قربانی[۱]، مریم حسینی[۲*]

۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۰۷

پیام‌نگار: m.hosseini@azaruniv.ac.ir

چکیده

یکی از مهمترین دگرگشته (متابولیت)های تولید شده از ریزجلبک‌ها، بتاکاروتن است که در تهیه لوازم‌آرایشی، آنتی‌اکسیدان (پاداکنده) و پیش‌ساز ویتامین A کاربرد فراوان دارد. استفاده از ریزجلبک‌ها برای تولید بتاکاروتن به دلیل نیازهای تغذیه‌ای کمتر، بازده و سرعت بیشتر، از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه، تأثیر تنش‌های مختلف نوری، دما، شوری و قحطی مواد مغذی بر رشد ریزجلبک‌ها و تجمع بتاکاروتن در آن‌ها مورد بررسی قرارگرفته است. نتایج حاصل از تحقیقات گزارش شده، افزایش محتوای بتاکاروتن با افزایش غلظت نمک در تنش شوری را نشان می‌دهد. هرچند در غلظت های بسیار زیاد ذخیره بتاکاروتن کاهش می‌یابد. همچنین، تنش کمبود مواد مغذی برای منبع نیتروژن و فسفر بیشترین تأثیر را بروز داده است. عامل نور نیز به صورت کمی و کیفی بررسی شده که در میان تنش‌های دیگر بیشترین تأثیر را داشته است. کنش چند تنش به طور همزمان را نیز می‌توان به منظور تولید بتاکاروتن به کار برد.

کلیدواژه‌ها: ریزجلبک، بتاکاروتن، تنش.

۱. ترکیبات رنگی

رنگدانه‌ها عبارت‌اند از اجزای شیمیایی رنگی که طول موج‌های مشخص نور مرئی را جذب و بازتاب می‌کنند[۱]. ریزجلبک‌ها، علاوه بر *کلروفیل* که رنگدانه اصلی مؤثر در فرایند فوتوسنتز است، قادرند انواع دیگری از رنگدانه‌ها را تولید کنند. ترکیبات رنگی تولید شده توسط ریزجلبک‌ها براساس ساختار به دو دسته کلی *کاروتنوئیدها*[۱] و *فیکوبیلی پروتئین‌ها*[۲] تقسیم می‌شوند[۲].

۱-۱ کاروتنوئیدها

کاروتنوئیدها رنگدانه‌های آب‌گریز با ۴۰ اتم کربن‌اند. نقش *کاروتنوئیدها* در فرآیند فوتوسنتز، ذخیره نور، جمع‌آوری اکسیژن، اتلاف انرژی اضافی و تثبیت ساختار است[۱]. *کاروتنوئیدها* به دو

* تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده فنی مهندسی، گروه مهندسی شیمی

1. Carotenoids
2. Phycobiliproteins

دسته *کاروتن*[1] (هیدروکربن‌ها) و *زانتوفیل‌ها*[2] (هیدروکربن همراه اتم اکسیژن) تقسیم می‌شوند[۲].

کاروتنوئیدها عامل رنگ زرد، نارنجی و قهوه‌ای گلبرگ‌ها، میوه‌ها و گل‌ها هستند. علاوه بر این، رنگ پوست ماهی‌ها و پوسته‌های صدفی نیز ناشی از وجود این ترکیبات به‌شمار می‌آید. *کاروتنوئیدها* که به واسطه برخورداری از ساختار مزدوج قادر به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثر مخرب آن‌ها هستند، نه تنها به عنوان یک ماده رنگی بلکه به مثابه ترکیبی آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی، آرایش- بهداشتی و داروسازی به‌کار می‌روند[۲]. در طبیعت بیش از ۶۰۰ نوع *کاروتنوئید* شناخته شده است، که ۵۰ نوع آن پیش‌ساز ویتامین A است که شامل *آلفاکاروتن*، *بتاکاروتن* و *بتاکریپتوکسانتین*[3] است[۳].

۱-۲ بتاکاروتن

بتاکاروتن رنگدانه ای است که میزان فراوانی آن در *کاروتنوئید* ۹۰ ٪ است[۴]. *بتاکاروتن* در مولکول‌های لیپیدی در *کلروپلاست* ذخیره می‌شود[۵]. این رنگدانه در حکم رنگ مجاز در غذاها، پیش‌ساز ویتامین A در غذای انسان و دام، تهیه فرآورده‌های مولتی ویتامین و نیز فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی، در مقادیر بسیار زیاد مصرف می‌شود. مصرف آن به عنوان ضد سرطان نیز کاربرد فراوانی یافته است[۵و۶]. اگرچه نوع مصنوعی این فرآورده در بازار یافت می‌شود، اما از آنجا که نوع طبیعی آن به نسبت مساوی دارای تکپار سیس و ترانس است، در مقایسه با نوع مصنوعی که فقط به صورت ترانس یافت می‌شود، ارزش غذایی بیشتری دارد. اسرائیل، کالیفرنیای ایالات متحده آمریکا، استرالیا، اسپانیا و چین از جمله جاهایی‌اند که اولین بررسی‌ها برای تولید و خالص‌سازی تجاری *بتاکاروتن* در آن‌ها انجام شده است[۵و۷].

۲. منابع تولید بتاکاروتن

بتاکاروتن را می‌توان از طریق فرآورده‌های پتروشیمیایی تولید کرد و یا به صورت طبیعی تولید شود. در سال ۲۰۰۶، ۹۰٪ تولید آن ناشی از روش پتروشیمیایی بود[۸]. با وجود آن که نوع سنتز شیمیایی این فرآورده در بازار یافت می‌شود، اما نوع طبیعی آن ارزش غذایی بیشتری دارد. به منظور تولید طبیعی *بتاکاروتن* منابع طبیعی مختلفی چون، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، گیاهان، میوه‌ها و ریزجلبک‌ها یافت می‌شوند که در میان آنها، گیاهان و ریزجلبک‌ها بازده بیشتری دارند[۹]. انتخاب ریزجلبک به دلایلی مانند استخراج آسان‌تر محصول، سرعت رشد زیاد، ارزانی، در برداشتن گستره بیشتری از رنگدانه‌ها، بازده بالای فوتوسنتز، نیاز به زمین کشاورزی کمتر، قابل کشت بودن در تمام طول سال، قادر به ادامهٔ حیات در شرایط مختلف آبی مانند آب شور و شیرین و باقی ماندن آب به منظور مصارف آشامیدنی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است[۱۳-۱۰و۲].

۳. ریزجلبک‌ها

ریزجلبک‌ها، ریزاندامگانهای فوتوسنتزی پروکاریوت یا یوکاریوت‌اند که می‌توانند سریع رشد کنند و در شرایط سخت به علت ساختار تک سلولی یا چند سلولی ساده به راحتی به حیات خود دادامه دهند. ریزجلبک‌ها نخستین تولیدکنندگان اکسیژن به‌شمار می‌آیند، فرایندی که منجر به تشکیل جوّ کنونی زمین شد، و مهمترین مصرف‌کنندگان کربن‌دی‌اکسید به حساب می‌آیند[۱۴]. جلبک‌ها دارای کاربردهای بسیار دیگری هم هستند که می‌توان از مصرف آن‌ها به عنوان خوراک، کاربرد برای حاصلخیزی خاک و استفاده از عصاره آن‌ها در تولید فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی و نیز تولید ترکیبات آلی ارزشمندی مانند *بتاکاروتن* یاد کرد.

از مهمترین گروه‌های ریزجلبک‌های تولیدکننده *بتاکاروتن* می‌توان به *کلروفیتا*، *کریسوفیتا*، *باسیلاریوفیتا*، *گزانتوفیتا* و *رافیدوفیتا* اشاره کرد. تاکنون تنها دو گونه ریزجلبک به عنوان منبع تجاری *کاروتنوئیدها* شناخته شده‌اند؛ ریزجلبک *دونالیلا سالینا* برای انباشت *بتاکاروتن* و دیگری ریزجلبک سبز *هماتوکوکوس پلوویالیس*[4] که تجمع *آستاگزانتین*[5] در آن بیشتر است[۱۵]. *دونالیلا* ریزجلبکی است تخم مرغی شکل، فاقد دیواره سلولی سخت و توسط دو تاژک بلند و برابر، قادر به حرکت است؛ همچنین ریزاندامگان یوکاریوت مقاوم به نمک است، قابلیت تحمل شوری از ۰/۲٪ تا حالت اشباع ۳۵٪ را دارد و بهترین منبع طبیعی تولید تجاری *بتاکاروتن* شناخته

1. Carotene
2. Xanthophylls
3. β-cryptoxanthin

4. Haematococcus Pluvialis
5. Astaxanthin

شده است[۱۸-۱۶و۸و۷و۵]. هرچند مطالعات نشان می‌دهند که ریزجلبک‌های *دونالیلا اس‌پی* و *دونالیلا سالینا* برای تولید بتاکاروتن مناسب‌اند، اما اخیراً برخی گونه‌های دیگر ریزجلبک از جمله استیگماتوفیت‌ها[1] نیز بررسی شده‌اند که توانایی انباشت بتاکاروتن را دارند[۲۰و۱۹].

با وجود انباشت پردامنهٔ *بتاکاروتن* در ریزجلبک *دونالیلا*، برای کشت یک گونه خالص شرایط باید به صورت استرلیزه باشد. ایجاد شرایط استرلیزه پر هزینه و اجرای آن در مقیاس بزرگ[2] دشوار است و ایجاد آلودگی نقش بسزایی در کاهش میزان محصول خواهد داشت. یک راه‌حل جایگزین برای سیستم‌های استرلیزه، استفاده از کشت‌های مختلط ریزجلبک‌هاست. با توجه به این‌که در منابع مختلف گونه‌های متفاوت ریزجلبک یافت می‌شود می‌توان گونه‌های مختلط موجود در آب‌های طبیعی را انتخاب و با ایجاد محیط خاص، ریزجلبک غنی‌شده برای تولید *بتاکاروتن* بیشتر به دست آورد. با وجود تحقیقات فراوان برای تولید مواد مختلف از ریزجلبک‌های خالص، تاکنون کار اندکی برای تولید این مواد ذخیره‌ای در کشت‌های مختلط انجام شده است. در این میان می‌توان به تحقیقات اخیر انجام شده از جمله کار *موی پتر*[3] *و همکاران*[۱۱] و حسن‌پور و همکاران[۲۱] با کشت مختلط برای تولید حداکثر نشاسته و لیپید اشاره کرد. همچنین، اخیراً تولید قابل توجه بتاکاروتن در کشت مختلط ریزجلبک دریایچه خزر تحت تنش قحطی نیتروژن، از جانب مؤلفان گزارش شده است[۲۲].

از سوی دیگر، میزان *بتاکاروتن* تولید شده در رشد طبیعی ریزجلبک کم است، لذا برای اقتصادی بودن فرایند باید با دستکاری ژنتیکی و با وارد آوردن تنش بر ریزجلبک‌ها، میزان *بتاکاروتن* انباشته افزایش داد. از عوامل مؤثر در رشد ریزجلبک‌ها می‌توان به شدت نور، دمای رشد، شدت هم‌زدن، نوع و میزان مواد مغذی اشاره کرد. تغییر هرکدام از این پارامترها یک تنش تلقی می‌شود و می‌توانند بر انباشت *بتاکاروتن* در ریزجلبک تأثیر مثبت یا منفی داشته باشند. بنابراین در ادامه، تحقیقات انجام شده برای افزایش *بتاکاروتن* ذخیره شده با اعمال تنش مورد مطالعه قرار گرفته است.

۴. تولید تجاری بتاکاروتن

بیش از ۱۲ درصد وزن خشک ریزجلبک، *بتاکاروتن* است که در گلبول‌های چربی در کلروپلاست ذخیره می‌شود[۲۳]. گرچه تولید *بتاکاروتن* از *دونالیلا* در سامانهٔ استخر باز به صورت صنعتی انجام می‌شود[۲۴]، اما بیشتر از ۹۰درصد *بتاکاروتن* با روش شیمیایی به دست می‌آید تا پاسخگوی نیازهای روزانه باشد. تولید محصولات ریزجلبکی عیب‌هایی هم دارد که از جمله می‌توان به کنترل اندک فرآیند[۲۵] و مصرف زیاد کربن‌دی‌اکسید با بازده کم[۲۶] اشاره کرد. به طور کلی، تولید تجاری محصولات درون سلولی ریزجلبک‌ها نیازمند مراحل زیر است: ۱. تولید در بزرگ مقیاس باید انجام پذیر باشد؛ ۲. بازیابی زیست‌توده از محیط کشت رقیق صورت گیرد؛ ۳. متابولیت‌های تولید شده در ریزجلبک استخراج شوند؛ ۴. محصولات استخراج شده خالص شدند[۲۷]. کار روی ریزجلبک *دونالیلا سالینا* برای تولید *بتاکاروتن* در سال ۱۹۷۰ آغاز شد و تولید تجاری آن به عنوان یکی از محصولات اصلی ریزجلبک، در سال ۱۹۸۶ در استرالیا به‌شمار صنعتی درآمد. در سال ۲۰۰۱، بازار جهانی تولید *بتاکاروتن* از ۱۰ به ۱۰۰ تن در سال رسیده است[۲۸]. از این‌رو، بهای محصولات تولید شده از ریزجلبک‌ها در بازار جهانی زیاد بوده و در این بین رنگدانه‌ها دارای بهای بیشتری نیز هستند. بازار *کاروتنوئید* جهانی در سال ۲۰۱۴، بالغ بر ۱/۴ میلیارد دلار بوده است، که انتظار می‌رود این بازار در ۲۰۱۹ به ۱/۸ میلیارد دلار برسد[۷۰]. بهای چند رنگدانه مهم در جدول (۱) درج شده است.

بنابراین، یافتن راه‌کارهایی که به افزایش تولید این مواد ذخیره‌ای انجامند از اهمیت زیادی برخوردار است که در این میان می‌توان به وارد آوردن تنش‌های مختلف اشاره کرد.

جدول ۱. بهای جهانی اجزاء.

مواد ذخیره‌ای با ارزش	بازار جهانی (مقدار/ میلیون دلار آمریکا)	بها کیلوگرم/ دلار
کارتنوئیدها	۱۲۰۰[*]	-
بتاکاروتن	۲۶۱[*]	۳۰۰-۷۰۰[۲۹]
لوتئین	۲۳۳[*]	-

[*] http://www.reportlinker.com/p096628-summary/The-Global-Market-for- Carotenoids.html Last accessed 29/6/2013

1. Eustigmatophytes
2. Large Scale
3. Mooij Peter

۵. عوامل مؤثر بر رشد ریزجلبک‌ها

میزان انباشت و سرعت ساخت *بتاکاروتن* به عوامل زیست محیطی وابسته است[۳۰و۲۳]. عوامل فیزیکی و زیستی مختلف مؤثر بر رشد ریزجلبک‌ها در جدول (۲) درج شده است[۳۱]:

جدول ۲. پارامترهای مؤثر در رشد ریزجلبک‌ها.

عوامل محیطی	عوامل فیزیکی: نور(کمی، کیفی) دما اکسیژن pH، CO_2 شوری
	عوامل شیمیایی: غلظت مواد مغذی
عوامل زیستی	- پادتن‌ها (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) - رقابت با سایر گونه‌های ریزجلبکی
عوامل عملیاتی	- تنش‌های برشی ناشی از اختلاط - عمق کشت - انتقال جرم بین گاز و مایع - برداشت محصول

از مهمترین عوامل موثر در رشد، می‌توان به عوامل شیمیایی و فیزیکی از عوامل محیطی اشاره کرد که در ادامه به طور خلاصه بررسی خواهند شد.

۵-۱ عوامل شیمیایی مؤثر در رشد ریزجلبک‌ها

عوامل شیمیایی، عناصر موجود در ترکیب محیط کشت‌اند، که به دو دسته عناصر با مقدار زیاد و عناصر با مقدار کم[1] تقسیم‌بندی می‌شوند. از مهمترین عناصر با مقدار زیاد می‌توان کربن و نیتروژن را نام برد که سهم بسزایی در اسکلت ساختاری ریزجلبک دارند. عناصر با مقدار کم در واکنش‌های سلولی نقش دارند و مثلاً به عنوان هم‌عامل ایفای نقش می‌کنند.

کربن به صورتهای مختلف کربن‌دی‌اکسید، یون بی‌کربنات، اوره، گلوکز، نشاسته، گلیسرول و استات در اختیار ریزجلبک قرار می‌گیرد که هر کدام تأثیر متفاوتی در رشد و وزن خشک ریزجلبک دارد[۳۲]. به واسطه اهمیت کربن‌دی‌اکسید در رشد ریزجلبک‌ها، هوادهی و تأمین کربن‌دی‌اکسید مورد نیاز یکی از عوامل بسیار مهم برای تولید زیست‌توده فراوان از ریزجلبک‌ها به‌شمار می‌آید. نیتروژن در تقسیم سلولی نقش اساسی ایفا می‌کند. همچنین، این عنصر در ساخت اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نقش مهمی بازی می‌کند.

۵-۲ عوامل فیزیکی مؤثر در رشد ریزجلبک‌ها

الف. دما: بیشتر ریزجلبک‌ها در محدوده دمایی ۱۸ تا ۲۸ درجه سلسیوس از بیشترین رشد برخوردارند، اما در آب‌های گرم و نواحی سردسیر نیز یافت می‌شوند.

ب. نور: فرایند فوتوسنتز، انرژی نوری در محدودهٔ ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر را به‌کار می‌برد. مشخصه‌های نور به‌کار رفته برای رشد ریزجلبک‌ها از دو جنبه کیفیت (طول موج) و کمیت (شدت) دو عامل مهم برای منابع نور به‌کار رفته در رشد ریزجلبک‌ها است[۳۴و۳۳].

در صورتی که طیف امواج خروجی از منبع نوری به‌کار رفته با طیف جذبی رنگدانه‌های گیرنده نور در گونه فوتوسنتز کننده سازگار باشد، منبع نوری یادشده می‌تواند یک منبع پربازده برای رشد گونه مورد نظر محسوب شود[۳۵].

ج. همزدن و هوادهی: اختلاط محیط از چندین جنبه اهمیت دارد: ۱. تبادل گازهای مورد نیاز بین فاز گازی و مایع در محیط کشت تسهیل می‌شود؛ ۲. مواد لازم برای رشد در اختیار همه سلول‌ها قرار می‌گیرد و از انباشته شدن آن دریک نقطه خاص جلوگیری می‌شود؛ ۳. سلول‌ها نیز در نقاط مختلف پراکنده می‌شوند و در یک نقطه خاص انباشته نمی‌شوند.

د. pH: تنظیم pH محیط کشت، یکی از عوامل مهم و مؤثر بر رشد ریزجلبک‌ها و نیز سایر اندامگانهاست. ریزجلبک‌ها می‌توانند مقادیر pH از ۰/۵ تا ۱۱ را تحمل کنند. pH بهینه باید در ۰/۲± ۷/۵ کنترل شود که با افزودن کربن‌دی‌اکسید و اسید کنترل می‌شود. در مواردی فقط از هیدروکلریک اسید استفاده می‌شود[۳۶].

۶. تنش‌ها

محتوی سلولی ریزجلبک را می‌توان به دو روش افزایش داد[۴۰-۳۷].

1. Trace Element

۱. وارد آوردن تنش

۲. تغییر سوخت‌وساز و دستکاری ژنتیکی

تنش عبارت است از به کار بردن موقعیت مغایر با شرایط کشت عادی، به منظور افزایش محتوای سلولی ریزجلبک. بعضی گونه‌های ریزجلبک در شرایط تنش، به موازات ذخیره لیپید و کربوهیدرات، عوامل سوخت‌وساز ثانویه، از جمله رنگدانه‌ها را بیشتر ذخیره می‌کنند[۴۲و۴۱و۱]. از مهمترین تنش‌های موثر در افزایش انباشت *بتاکاروتن* می‌توان به قحطی مواد مغذی محیط کشت، افزایش شوری، افزایش شدت نور و تأثیر دما اشاره کرد[۴۴و۴۳].

برای وارد آوردن تنش دو شیوه قابل دسترس است: در روش اول می‌توان همزمان با رشد، تنش را نیز بر ریزجلبک وارد آورد. از آنجا که سرعت رشد کاهش می‌یابد، امکان کاهش کل محصولات تولید شده فراهم است[۴۵] اما روش دوم دو مرحله‌ای است، یعنی در مرحله اول تولید زیست‌توده را به حداکثر رساند و در مرحله دوم با اعمال شرایط تنش، انباشت اجزا افزایش داده خواهد شد. البته روش چند مرحله‌ای ممکن است، هزینه عملیاتی را نسبت به روش یک مرحله‌ای افزایش دهد[۴۷و۴۶].

۶-۱ تنش شوری

یکی از تنش‌های مهم و تأثیرگذار به منظور افزایش انباشت *بتاکاروتن*، میزان شوری یعنی غلظت سدیم کلرید موجود در محیط کشت است. این غلظت بر رشد ریزجلبک نیز تأثیرگذار است و از این‌رو باید غلظت بهینه در نظر گرفته شود. وارد آوردن تنش شوری می‌تواند به دو روش انجام شود. در روش اول، از همان ابتدای کشت غلظت بهینه نمک را وارد و نحوه رشد و میزان انباشت *بتاکاروتن* بررسی شود. در روش دوم ابتدا در یک غلظت کم ریزجلبک را کشت می‌دهند و پس از رسیدن به جمعیت مورد نظر، غلظت نمک را افزایش و میزان انباشت *بتاکاروتن* اندازه‌گیری می‌کنند[۲۸]. در بررسی *برویتزکا*[1] [۱۷] ابتدا ریزجلبک *دونالیلا سالینا* در نمک با غلظت ۵ ٪w/v کشت داده می‌شود و در مرحله دوم تنش شوری با غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد اعمال شد. در مرحله دوم، در غلظت نمک ۱۵ درصد، افزایش مشاهده و تغییر کمی در تعداد سلول‌ها برقرار شد، اما برای افزایش انباشت *بتاکاروتن* غلظت‌های ۲۰ تا ۲۵ درصد نمک به‌کار گرفته شده است. بعد از دو الی چهار روز فاز تأخیر، تغییر زیادی در میزان *کاروتنوئیدها* حاصل شده بود. میزان *کاروتنوئید* به غلظت نهایی نمک وابسته بوده و ربطی به مقدار اولیه آن نداشته است. غلظت بهینه افزایش *کاروتنوئید*، نمک ۲۵٪ بوده و رابطه مطلوبی با رشد ریزجلبک *دونالیلا سالینا* در این غلظت برقرار است. به بیانی دیگر، بیشترین *کاروتنوئید* انباشته، در بیشترین شوری است[۴۸و۱۷]. پس از افزایش غلظت شوری به علت وفق ریزجلبک با شرایط جدید، میزان رشد تا چند روز متوقف شده که به غلظت نمک تا هفت روز می‌تواند ادامه داشته باشد. هرچه نمک اولیه کمتر باشد، مدت زمان بیشتری طول می‌کشد که ریزجلبک شروع به رشد یا تولید دوباره *کاروتنوئید* کند.

بنابر دلایلی، گاهی کشت دو مرحله‌ای مناسب نیست، زیرا: ۱. غلظت کم نمک موجب حمله پروتوزواها می‌شود و این امر به اتلاف زیست‌توده ریزجلبک در استخرها منجر می‌شود؛ ۲. در غلظت نمک کمتر به علت وجود همزمان ریزجلبک *دونالیلاسالینا* با سایر گونه‌های ریزجلبک *دونالیلا* همچون *دونالیلا ویریدیس*[2] که تولیدکننده *کاروتنوئیدها* نیستند، موجب خروج *دونالیلا سالینا* از استخر می‌شوند؛ ۳. فرایند دو مرحله‌ای دشوار و نیازمند فضای بیشتری برای استخر است و بنابراین بسیار گران خواهد بود[۵۰و۴۹و۶].

تنش شوری تفاوت کمی را در رشد گونه‌های ریزجلبکی که از مناطق جغرافیایی مختلفی‌اند، به‌وجود می‌آورد[۱۷]. تنش شوری نمک بر انباشت کربوهیدرات‌ها هم موثر است[۱]. افزودن گلیسرول موجب می‌شود که تحمل تغییر شوری برای ریزجلبک راحت‌تر شود[۱۷].

در ایران نیز غلظت‌های مختلف شوری (۱۰، ۳۰، ۵۰ گرم بر لیتر) را *فتحی و همکارشان*[۵۱] بر ریزجلبک *کلرلا* بررسی کرده‌اند. بیشترین تعداد سلول پس از ۱۵ روز در غلظت نمک ۳۰ g/L اتفاق افتاده است و بیشترین غلظت *بتاکاروتن* در محیط با غلظت نمک ۵۰ g/L روی داده است.

اثر میزان شوری بر ریزجلبک *دونالیلا ترتیولکتا*[3] استخراج شده از دریاچه ارومیه نیز توسط *فاضلی و همکاران*[۵۲] مورد بررسی قرار گرفته است. این بررسی در بازه ۰/۰۵ تا ۳ مولار نمک انجام شده است، که بیشترین مقدار *کاروتنوئید* به دست آمده در غلظت ۰/۵

1. Borowitzka

2. Dunaliella Viridis

3. Dunaliella Tertiolecta

مولار در فاز سکون و برابر با ۱۱/۷۳ mg/L است. در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* غلظت بهینه شوری برای رشد گونه بین ۱۸ تا ۲۲ درصد NaCl و غلظت بهینه برای تولید *کاروتنوئید* بیشتر از ۲۷ درصد NaCl گزارش شده است[۴۴].

۶-۲ تنش نور

انباشت *بتاکاروتن* در ریزجلبک وابسته به شدت و کیفیت نور به‌کار گرفته شده است[۵۳]. کیفیت نور می‌تواند به صورت تغییر طول موج نور به‌کار رفته در طیف نورهای مرئی باشد مثلاً، کاربرد نورهای آبی[۵۴]، قرمز و یا تغییر طیف نور و استفاده از تابش فرابنفش A تنش کیفی نور به‌شمار می‌آید، که موجب افزایش محتوای *بتاکاروتن* در ریزجلبک می‌شود. مطالعات انجام شده توسط *یانکه*[1] *و موقداس*[2] نشان داده‌اند که استفاده از نور فرابنفش A سبب افزایش چشمگیر انباشت *کاروتنوئیدها* و *بتاکاروتن* می‌شود، اما در میزان رشد بی‌تأثیر بوده است[۵۵و۵۶] و کاربرد همزمان نورهای (۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر) PAR[3] و (۳۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر) تابش فرابنفش A باعث افزایش انباشت اجزاء و افزایش رشد سلولی می‌شود[۵۵]. تأثیر دو نور PAR و نور فرابنفش A بر میزان انباشت *کاروتنوئیدها* بر ریزجلبک *دونالیلا باردااویل* توسط *یانکه*[۵۵]، نشان داد که این تنش موجب افزایش انباشت *کاروتنوئیدها* شده بدون این که از سرعت رشد ریزجلبک در محیط کشت بکاهد. همراه با حضور نور فرابنفش A با شدت (۳۸ µmol m^{-2} s^{-1})، شدت‌های مختلف از PAR (۳۰-۱۵۰۰ µmol m^{-2} s^{-1})، مورد بررسی شده است. نور آبی با شدت (۲۰۰ µmol m^{-2} s^{-1})، نیز تفاوت چندانی با نور سفید ندارد. همچنین، نور (۲۹۰ تا ۳۳۰ نانومتر) فرابنفش B نیز بر انباشت *کاروتنوئیدها* موثر نبوده است.

در شدت نور زیاد مقدار *بتاکاروتن* ذخیره شده نیز افزایش می‌یابد[۵۷]. در بررسی *لامرس* در محیط کشت با ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با افزایش شدت نور از ۱۰۰ به ۱۰۰۰ µmolphotonsm^{-2} s^{-1} افزایش چشمگیری در محتوای *بتاکاروتن* مشاهده شد و به حداکثر مقدار خود یعنی ۳/۱ درصد وزن خشک رسید[۳۹]. برای بررسی تأثیر مقدار اولیه *بتاکاروتن* در مقابل نور نیز آزمایشی انجام شده است. از این قرار که به نمونه غنی از *بتاکاروتن* (قرمز رنگ) و نمونه‌ای با *بتاکاروتن* کمتر (سبز رنگ) نور تابانده شده است، نمونه غنی از *بتاکاروتن* در شدت‌های نور بالا رشد داشته ولی نمونه ریزجلبک با *بتاکاروتن* کمتر رشدش متوقف و حتی کمتر نیز شده است[۴۸]. همچنین، میزان شدت نور بر میزان تکپارهای *بتاکاروتن* موثر است. انباشت *بتاکاروتن* (نسبت تکپار سیس به ترانس) در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* که در چرخه تقسیم قرار دارد به پیوستگی شدت نور وابسته است[۵۸].

شدت نور کم به نفع تکپار سیس و شدت نور بالا به سود تکپار ترانس است. یعنی، این نسبت در مقادیر تابش کم (۲۰-۵۰ µmol/photons/m^2 /s^{-1}) در مقایسه با مقادیر تابش بالا (۲۰۰-۱۲۵۰ µmol/photons/m^2 /s^{-1})، افزایش می‌یابد[۵۹].

۶-۳ تنش کمبود مواد غذایی

عرضه مواد مغذی محدود یا قحطی مواد مغذی، رشد ریزجلبک را تحت تأثیر قرار می‌دهد، از این‌رو سلول خصوصیات فیزیولوژیکی خود را تغییر می‌دهد و با انباشت مولکول‌های خاص به مقاومت در برابر این تنش می‌پردازد[۴۴]. نشان داده شده است که قحطی نیترات و سولفات موجب انباشت *بتاکاروتن* در ریزجلبک نوع طبیعی[4] می‌شود[۶۰]. همچنین، در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* نیز، قحطی نیتروژن، فسفر و گوگرد انباشت *بتاکاروتن* در سلول را افزایش داده است[۶۱]. محدودیت نیتروژن و فسفر بر سیستم فوتوسینتیک ریزجلبک *دونالیلا ترتیولکتا* تأثیر می‌گذارد. بهینه غلظت فسفر در رشد ریزجلبک‌های *دونالیلا سالینا* و *دونالیلا ویریدیس* بازه ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۲۵ g/L از KH_2PO_4 و غلظت بیشتر از ۵ g/L بازدارنده رشد است[۶۲]. در برخی از مراجع، در بین قحطی نیتروژن، فسفر و گوگرد، بیشترین افزایش بتاکاروتن انباشته مربوط به قحطی فسفر است[۶۳]. در مطالعه‌ای دیگر، بیشترین تأثیر مربوط به قحطی نیتروژن است و وارد آوردن تنش نیتروژن نیز بعد از رسیدن به رشد کافی زیست‌توده است. با قحطی نیتروژن سرعت تقسیم سلولی کاهش و حجم سلول‌ها و چگالی آن‌ها افزایش می‌یابد. همچنین، با قطع نیتروژن میزان انباشت *بتاکاروتن* نیز بیشتر می‌شود[۳۸]. در تنش قحطی نیتروژن که توسط *لامرس و*

1. Jahnke
2. Mogedas
3. Photosynthetically Active Radiation
4. Wild type

همکاران[۳۸] بر روی ریزجلبک *دونالیلا سالینا* مورد بررسی قرار گرفته است، با قحطی نیتروژن، میزان *بتاکاروتن* از ۱/۲۸ به حداکثر مقدار ۱۴ mg LCV^{-1} رسیده است. آزمایشهایی به صورت ناپیوسته و پیوسته در غلظت های مختلف نیتروژن، از قحطی نیتروژن تا نیتروژن سرشار به منظور بررسی دینامیک ذخیره سازی کربن (کربن کل، چربی و بتاکاروتن) در حالت پایدار محیط کشت *دونالیلا سالینا* انجام شده است. ذخیره *بتاکاروتن* و *تری گلیسرید* در شرایط محدودیت نیتروژن و یا مملو از نیتروژن به هم وابسته است[۶۴]. نیز مشاهده شده است که نسبت رنگدانه های *آلفاکاروتن* و *بتاکاروتن* در مقابل *کلروفیل* تحت تنش محدودیت نیتروژن[۶۵] و محدودیت فسفر، افزایش می‌یابد[۶۶]. در پژوهشی دیگر، در سامانه‌ای با محلول دوفازی، تحت تنش کمبود نیتروژن، نسبت *کاروتن* به *کلروفیل* ۳۳ برابر می‌شود[۲۴]. همچنین در پژوهشی تأثیر قحطی نیتروژن بر دو محیط کشت خالص ریزجلبک دونالیلا سالینا و مختلط دریاچه خزر بررسی شده است، که با وارد آمدن این تنش مقدار بتاکاروتن در ریزجلبک دونالیلا سالینا از مقدار اولیه ۷/۵ به مقدار نهایی پروتئین g/ بتاکاروتن ۱۴/۸mol و در ریزجلبک دریای مازندران از مقدار اولیه ۷ به مقدار نهایی پروتئین g/ بتاکاروتن ۱۳/۵mol رسید[۲۲].

۶-۴ تنش دمایی

هرچند تغییرات دما نیز در برخی مراجع به عنوان تنش بررسی‌شده، اما از اهمیت کمتری برخوردار است. یکی از بررسی‌ها توسط *گاربایو*[1] *و همکاران*[۶۷] در زمینهٔ ریزجلبک *کلامیدوماناس اسیدوفیلا*[2]، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با شدت نور ۱۶۰ µE m^{-2} s^{-1} انجام شده و تأثیر شدت نور زیاد، تابش فرابنفش A و دما بررسی شده است. در شدت نور ۲۴۰ µE m^{-2} s^{-1} میزان کل *کاروتنوئید* تولید شده معادل ۱/۶ ± ۵۷/۵ mg L^{-1} و میزان *بتاکاروتن* تولید شده معادل ۰/۲ ± ۸/۳ mg L^{-1} به دست آمده است که تفاوت چشمگیری با شرایطی ندارد که شدت نور در آن ۱۰۰۰ µE m^{-2} s^{-1} باشد. این ریزجلبک در شرایط کشت عادی نیز *بتاکاروتن* تولید می‌کند، اما تحت تنش‌هایی چون تابش فرابنفش A، (۱۰ µE m^{-2} s^{-1}) و یا در دمای ۴۰ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد. نیز مشاهده شده است که کاهش دما از ۳۰ درجه سلسیوس به ۱۰ درجه سلسیوس موجب دو برابر شدن محتوای بتاکاروتن و چهار برابر شدن نسبت تکپارهای سیس/ترانس *بتاکاروتن* می‌شود[۶۸]. در مقابل این گزارش، پژوهشی دیگر نشان می‌دهد که کاهش دما از ۲۶ به ۱۵ درجه سلسیوس، تاثیری بر این نسبت ندارد[۶۹].

۶-۵ همزمانی تنش‌ها

به‌کارگیری همزمان تنش‌ها نیز در منابع مختلف بررسی شده است، که آثار مختلفی را بروز داده‌اند. یکی از مهمترین مشاهدات مربوط به اعمال همزمان تنش‌ها بر ریزجلبک‌ها، کار *لامرس*[3] *و همکاران*[۳۹] بوده که در آن نور از شدت کم ۲۰۰µmol photons m^{-2} s^{-1}، به شدت زیاد ۱۴۰۰ µmol photons m^{-2} s^{-1} افزایش داده شده است. در هر شدت نور ۴ حالت مطالعه شده است: ۱. اعمال فقط تنش نوری؛۲. همراه با قحطی نیتروژن؛ ۳. همراه با شوری بالا؛ ۴. همراه با کاهش دمای آزمایش. نتیجهٔ این بررسی نشان داده است که در تمامی حالت‌هایی که شدت نور زیاد بوده است، *بتاکاروتن* تولید شده است، اما در شدت نور کم فقط در نمونه‌ای که همراه با قحطی نیتروژن بوده است، *بتاکاروتن* تولید و بیشترین تولید *بتاکاروتن* مربوط به شدت نور زیاد با قحطی نیتروژن همراه است.

پارامترهای شدت نور، pH، قحطی نیتروژن و غلظت نمک بر ریزجلبک *دونالیلا اس پی* در محیط کشت *جانسون* اصلاح شده توسط *چلکلی*[4] *و همکاران*[۸] بررسی شده است که بیشترین غلظت *بتاکاروتن* و تعداد سلول‌ها، به ترتیب، سلول /۰/۲۶۱ ng و ml/ سلول $۴/۲ \times ۱۰^{۶}$ بوده که در pH = ۷، سدیم نیترات با غلظت ۵ mM، نمک سدیم کلرید با غلظت ۲۰٪ و نور با شدت ۴۸ kerg cm^{-2} s^{-1} اتفاق افتاده است. در بررسی دیگر نشان داده شده است که، در مقیاس‌های بزرگ و صنعتی جهت تولید *بتاکاروتن* توسط ریزجلبک *دونالیلا سالینا* از تنش‌های شوری و قحطی نیتروژن به صورت همزمان استفاده می‌شود[۱].

1. Garbayo
2. Chlamydomonas Acidophila
3. Lamers
4. Çelekli

جدول ۳. تأثیر تنش‌ها بر محتوی بتاکاروتن ریزجلبک‌ها.

ریزجلبک	نوع تنش	مرجع
دونالیلا سالینا	شوری	۱۷، ۴۳، ۴۷، ۴۸
دونالیلا	شوری	۴۹
کلرلا	شوری	۵۰
دونالیلا ترتیولکتا	شوری	۵۱
ریزجلبک	نوری	۵۲
دونالیلا سالینا	نوری	۳۸، ۴۷، ۵۳، ۵۸
دونالیلا بارداویل	نوری	۵۴، ۵۵، ۵۶
دونالیلا	کمبود مواد مغذی	۴۳، ۶۱
ریزجلبک	کمبود مواد مغذی	۵۹، ۲۳
دونالیلا بارداویل	کمبود مواد مغذی	۶۰
دونالیلا اس‌پی	کمبود مواد مغذی	۶۲
دونالیلا سالینا	کمبود مواد مغذی	۳۷، ۳۸، ۶۳
دونالیلا ترتیولکتا	کمبود مواد مغذی	۶۴
دریای مدیترانه شرقی	دونالیلا ترتیولکتا	۶۵
کلادیماناس اسیدوفیلا	دمایی	۶۶
دونالیلا بارداویل	دمایی	۶۷
دونالیلا سالینا	دمایی	۶۸
دونالیلا اس‌پی	شوری، نوری، کمبود مواد مغذی	۸
دونالیلا سالینا	شوری، کمبود مواد مغذی	۱
دونالیلا سالینا و ریزجلبک مختلط دریاچه خزر	کمبود مواد مغذی	۲۲

۷. نتیجه‌گیری کلی

مروری بر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بـه منظـور انباشـت بیشتر *بتاکاروتن*، باید ریزجلبک تحت تنش قرار گیرد و شرایط رشد آن از حالت عادی خارج شـود. در میـان تـنش‌هـا، بیشـترین تـأثیر مربوط به تنش شدت نور و بعد تنش قحطی نیتروژن است. همزمانی تنش‌های شدت نور و قحطی نیتـروژن نیـز موجـب انباشـت بیشـتر *بتاکاروتن* در ریزجلبک‌ها می‌شود.

مراجع

[1] Markou, G., Nerantzis, E., "Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions." Biotechnology advances. 31(8): p. 1532-1542, (2013).

[2] Mulders, K. J., "Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities." Journal of Phycology. 50(2): p. 229-242, (2014).

[3] Faure, H. "Les caroténoïdes: 1. Métabolisme et physiologie. in Annales de biologie clinique." (1999).

[4] 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): p. 180-185, (2011).

[5] Ben-Amotz, A., Shaish, A., Avron, M., "The biotechnology of cultivating Dunaliella for production of β-carotene rich algae." Bioresource technology. 38(2): p. 233-235, (1991).

[6] Borowitzka, L.J., Borowitzka, M, A., "Commercial production of β-carotene by Dunaliella salina in open ponds." Bulletin of Marine Science. 47(1): p. 244-252, (1990).

[7] Moulton, T., Borowitzka, L., Vincent, D., "The mass culture of Dunaliella salina for β-carotene: from pilot plant to production plant." in Twelfth International Seaweed Symposium. Springer. (1987).

[8] Celekli, 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): p. 183-189, (2006).

[9] Ribeiro, B., Barreto, D., Coelho,M., "Technological aspects of β-carotene production." Food and Bioprocess Technology. 4(5): p. 693-701, (2011).

[10] Brányiková, I., "Microalgae—novel highly efficient starch producers". Biotechnology and bioengineering. 108(4): p. 766-776, (2011).

[11] Mooij, P., "Survival of the fattest." Energy & Environmental Science. 6(12): p. 3404-3406, (2013).

[12] Chisti, Y., "Biodiesel from microalgae." Biotechnology advances. 25(3): p. 294-306, (2007).

[13] Christaki, E., "Functional properties of carotenoids originating from algae." Journal of the Science of Food and Agriculture. 93(1): p. 5-11, (2013).

[۱۴] فرامرزی، م.، بیوتکنولوژی ریزجلبک‌ها. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، (۱۳۸۹).

[15] Del Campo, J. A., "Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp.(Chlorophyta)." Journal of biotechnology. 76(1): p. 51-59, (2000).

[16] ASHOK, P., "Biofuels from algae." (2014).

[17] Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., "Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga Dunaliella salina." Journal of Applied Phycology. 2(2): p. 111-119, (1990).

[18] Ben-Amotz, A., "Production of β-carotene and vitamins by the halotolerant alga Dunaliella, in Pharmaceutical and Bioactive Natural Products." Springer. p. 411-417, (1993).

[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 :۱۱۷ . p. 257-263, (2012).

[20] Li, Z., "Profiling of carotenoids in six microalgae (Eustigmatophyceae) and assessment of their β-carotene productions in bubble column photobioreactor." Biotechnology letters. 34(11): p. 2049-2053, (2012).

[21] Hassanpour, M., "Gravimetric enrichment of high lipid and starch accumulating microalgae." Bioresource technology. 196: p. 17-21, (2015).

[۲۲] ابراهیمی، س.، قربانی، آ.، حسینی، م.، ذخیره بتاکاروتن در میکروجلبک خالص دونالیلا سالینا و مختلط دریای خزر تحت قحطی نیتروژن. مهندسی بیوسیستم ایران، (۱۳۹۵).

[23] Del Campo, J. A., García-González, M., Guerrero, M. G., "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives." Applied microbiology and biotechnology. 74(6): p. 1163-1174, (2007).

[24] León, R., "Microalgae mediated photoproduction of β-carotene in aqueous–organic two phase systems." Biomolecular Engineering. 20(4): p. 177-182, (2003).

[25] Borowitzka, L., ""Commercial Dunaliella production: history of development. Profiles on biotechnology: servicio de publicaciones, Universidad Santiago de Compostela, A Coruna: p. 235-245, (1992).

[26] Chaumont, D., "Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture." Journal of Applied Phycology. 5(6): p. 593-604, (1993).

[27] Grima, E. M., "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics." Biotechnology advances. 20(7): p. 491-515, (2003).

[28] Hejazi, M., Holwerda, E., Wijffels, R., "Milking microalga Dunaliella salina for β-carotene production in two- phase bioreactors." Biotechnology and bioengineering. 85(5): p. 475-481, (2004).

[29] Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X., "Microalgae as sources of carotenoids." Marine drugs. 9(4): p. 625-644, (2011).

[30] Shariati, M. Hadi, M. R., "Microalgal biotechnology and bioenergy in Dunaliella.": INTECH Open Access Publisher. (2011).

[31] Griffiths, M. J., Harrison, S. T., "Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production." Journal of Applied Phycology. 21(5): p. 493-507, (2009).

[32] Cuaresma, M., "Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga Chlamydomonas acidophila grown with different carbon sources in batch systems." Journal of industrial microbiology & biotechnology. 38(1): p. 167-177, (2011).

[33] Wang, C. -Y., C. -C. Fu, Y. -C. Liu, Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of Spirulina platensis. Biochemical Engineering Journal. 37(1): p. 21-25, (2007).

[34] Danesi, E., Rangel, C., Carvalho. J., "Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis." Biomass and Bioenergy. 26(4): p. 329-335, (2004).

[۳۵] امرئی، ح. د.، اصلاح طیفی نور سبز به منظور افزایش رشد ریزجلبک سبز- آبی، (۱۳۹۱).

[36] Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M., "Dunaliella biotechnology: methods and applications." Journal of Applied Microbiology. 107(1): p. 14-35, (2009).

[37] Eonseon, J., Lee, C. -G., "Secondary carotenoid accumulation in Haematococcus (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology." Journal of microbiology and biotechnology. 16(6): p. 821-831, (2006).
[38] Lamers, P. P., "Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved Dunaliella salina, a unicellular green microalga." Journal of biotechnology. 162(1): p. 2.27-1, (2012).
[39] Lamers, P. P., "Carotenoid and fatty acid metabolism in light- stressed Dunaliella salina." Biotechnology and bioengineering. 106(4): p. 638-648, (2010).
[40] Beer, L. L., "Engineering algae for biohydrogen and biofuel production." Current opinion in biotechnology. 20(3): p. 264-271, (2009).
[41] Gateau, H., "Carotenoids of Microalgae Used in Food Industry and Medicine." Mini reviews in medicinal chemistry, (2016).
[42] D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R., "Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews. 58: p. 832-841, (2016).
[43] Beihui, L., Kun, L. Y., "In vitro biosynthesis of xanthophylls by cell extractsof a green alga Chlorococcum". Plant Physiology and Biochemistry. 39(2): p. 147-154, (2001).
[44] Raja, R., Hemaiswarya, S., "Exploitation of Dunaliella for β-carotene production." Applied Microbiology and Biotechnology. 74(3): p. 517-523, (2007).
[45] Adams, C., "Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae." Bioresource technology. 131: p. 188-194, (2013).
[46] Aflalo, C., "On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga Haematococcus pluvialis." Biotechnology and bioengineering. 98(1): p. 300-305, (2007).
[47] Del Río, E., "Efficiency assessment of the one- step production of astaxanthin by the microalga Haematococcus pluvialis." Biotechnology and bioengineering. 100(2): p.397-402, (2008).
[48] Borowitzka, L., Moulton, T., Borowitzka, M., "The mass culture of Dunaliella salina for fine chemicals: from laboratory to pilot plant." in Eleventh International Seaweed Symposium. Springer. (1984).
[49] Borowitzka, L., Moulton, T., Borowitzka, M., "Salinity and the commercial production of beta-carotene from Dunaliella salina." Algal Biomass: An Interdisciplinary Perspective: p. 217-222, (1985).
[50] Moulton, T., "Competition between Dunaliella species at high salinity." in Twelfth International Seaweed Symposium. Springer. (1987).
[51] Fathi, M., Asem, A., "Investigating the impact of NaCl salinity on growth, β-carotene, and chlorophyll a in the content life of halophytes of algae Chlorella sp." AACL Bioflux. 6(3): p. 241-245, (2013).
[52] Fazeli, M., "Effects of salinity on β-carotene production by Dunaliella tertiolecta DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran." Bioresource Technology. 97(18): p. 2453-2456, (2006).
[53] Senger, H., "The influence of light intensity and wavelength on the contents of α-and β-carotene and their xanthophylls in green algae." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 18(2-3): p. 273-279, (1993).
[54] Fu, W., "Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga Dunaliella salina with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution." Applied microbiology and biotechnology. 97(6): p. 2395-2403, (2013).
[55] Jahnke, L. S., "Massive carotenoid accumulation in Dunaliella bardawil induced by ultraviolet-A radiation." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 48(1): p. 68-74, (1999).
[56] Mogedas, B., "β-Carotene production enhancement by UV-A radiation in Dunaliella bardawil cultivated in laboratory reactors." Journal of bioscience and bioengineering, 20 (1) :p. 47-51.
[57] Ben-Amotz, A., Avron, M., "On the factors which determine massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga Dunaliella bardawil." Plant Physiology. 72(3): p. 593-597, (1983).
[58] 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): p. 389-395, (1990).
[59] 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): p. 609-618, (2000).
[60] Becker, W., "21 Microalgae for Aquaculture". Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology: p. 380, (2004).
[61] Ben-Amotz, A., "Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of Dunaliella bardawil Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta)." Journal of plant physiology. 131(5): p. 479-487, (1987).
[62] Milko, E., "Study of the requirements of two Dunaliella species in mineral and organic components of the medium." Moscow University, Vestnik. Biologia. 6: p. 21-23, (1962).
[63] Phadwal, K., Singh, P., "Effect of nutrient depletion on β-carotene and glycerol accumulation in two strains of Dunaliella sp." Bioresource technology. 9 :(١)٠p. 55-58, (2003).
[64] Bonnefond, H., "Coupling and uncoupling of triglyceride and beta-carotene production by Dunaliella salina under nitrogen limitation and starvation." Biotechnology for Biofuels. 10(1): p. 25, (2017).

[65] Geider, R., "Responses of the photosynthetic apparatus of Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation." European Journal of Phycology. 33(4): p. 315-332, (1998).

[66] Krom, M., "Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea." Limnology and Oceanography. 36(3): p. 424-432, (1991).

[67] Garbayo, I., "Effect of abiotic stress on the production of lutein and β-carotene by Chlamydomonas acidophila." Process Biochemistry. 43(10): p. 1158-1161, (2008).

[68] Ben-Amotz, A., "Effect of low temperature on the stereoisomer composition of beta-carotene in the halotolerant alga dunaliella bardawil (chlorophyta)." Journal of phycology. 32(2): p. 272-275, (1996).

[69] Gómez, P. I., "The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of Dunaliella salina (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions." Biological research. 38(2-3): p. 151-162, (2005).

[70] http://www.reportlinker.com/p096628-summary/The-Global-Market-for- Carotenoids.html Last accessed 29/6/2013.