استفاده از آب پنیر بعنوان محیط کشت جایگزین در تولید جلبک *دونالیلا سالینا*

آرمین نبی زاده قولنجی[۱]، محمود رضازاد باری[۲*]، بهروز آتشبار[۳]، صابر امیری[۴]، محمد لطفی گشایش[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، موسسه آموزش عالی صبا، ارومیه
۲- دکتری، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۳- دکتری، استادیار گروه اکولوژی و ارزیابی ذخایر آبزیان، پژوهشگاه دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه
٤- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰٤/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۷/۳۰)

چکیده

هدف این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلف آب پنیر و محیط کشت والنه جهت تولید بیومس *Dunaliella salina* و ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی آنبود. بدین منظور سه فاکتور شامل غلظت محیط کشت والنه (صفر تا ۵۰ میکرولیتر)، درصد آب پنیر (صفر تا ۵ درصد) و زمان گرمخانه گذاری (صفر تا ١٤ روز)در قالب طرح باکس بانکن شامل ۱۷ نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش درصد آب پنیر و همچنین محیط کشت والنه، تراکم سلولی افزایش یافت ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در صورتی که با افزایش مقدار والنه میزان کلروفیل و کاروتنوئید افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). افزایش زمان گرمخانه گذاری باعث کاهش تراکم سلولی، کلروفیل و کاروتنوئید شد اما اختلاف معنی‌داری در میزان کلروفیل و کاروتنوئید نداشت (P>۰/۰۵)، ولی در میزان تراکم سلولی اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).با افزایش درصد آب پنیر و زمان گرمخانه گذاری تا روز ۷ مقدار پروتئین افزایش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵). افزایش غلظت محیط کشت والنه نشان دهنده افزایش مقدار پروتئین تا روز ۷ از زمان گرمخانه گذاری بود اما از روز ۹ به بعد، مقدار پروتئین به مرور کاهش یافت و در روز ١٤ به کمترین مقدار خود رسیدکه این کاهش تاثیر معنی‌داری از نظر آماری نداشت (P>۰/۰۵). شرایط بهینه در روز ۵ گرمخانه گذاری، ۵ درصد آب پنیر و صفر درصد محیط کشت والنه بدست آمد. در شرایط بهینه مقدار تراکم سلولی، پروتئین و کاروتنوئید به ترتیب $۲/۷٤\times۱۰^{+۷}$، ۲۸۸/۷۵mg/kg، ۰/۲۰۲mg/ml بود.

کلید واژگان: *دونالیلا سالینا*، آب پنیر، محیط کشت والنه، بیومس، کلروفیل

*مسئول مکاتبات: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

۱- مقدمه

دونالیلا سالینا یک ریزجلبک هالوتولورنت دریایی است که به عنوان منبع غنی بتاکاروتن شناخته می‌شود. این جلبک تک سلولی، یوکاریوتی، فاقد دیواره پلی ساکاریدی، دوتاژکه، متحرک، معمولا گرد با ابعاد ۱۱-۹ میکرومتر و فتوسنتز کننده است [۵-۱]. در شرایط رشد مناسب قادر به ذخیره سازی بتاکاروتن به مقدار ۱۳/۸ درصد نسبت به وزن خشک جلبک می‌باشد. از ترکیبات مهم درون سلولی این جلبک می‌توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول، پروتئین و ویتامین‌ها اشاره نمودکه بخش عمده این ترکیبات دارای خاصیت ضد اکسیدانی و ضد سرطانی می‌باشند[۷-٦]. در کنار بتاکاروتن اعضای دونالیلا حاوی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی ارزشمند مانند آلفاکاروتن، وایولاگزانتین، نئوگزانتین، لوتیئن و زاکزانتین هستند[٤]. جنس دونالیلا متعلق به ردهChlorophyceae، راسته Volvocales و شاخه Chlorophyta می‌باشد. قبل از این جلبک را در خانوادهPolyblepharidaceae و برخی به علت شباهت آن با جلبکChlamydomonas آن را در خانواده Chlamydomonadaceae قرار داده‌اند[۸]. جلبک تک سلولی *دونالیلا سالینا* از تولید کنندگان مهم دریا و دریاچه‌های نمکی فوق اشباع است که اهمیت تجاری و زیست محیطی زیادی به عنوان پایه زنجیره غذایی و تولید اکسیژن دارد[۱۱-۹].

روش سطح پاسخ (RSM[1]) در برگیرنده گروهی از تکنیک‌های ریاضی و آماری است که امکان رسیدن به شرایط بهینه در سیستم‌های پیچیده را فرآهم می‌آورد. پایه تئوریکیRSM یک ابزار قوی برای بهینه سازی تجربی است که رابطه‌ای را بین متغیرهای مستقل و متغیرهای وابسته جست و جو می‌کند. طرح باکس بانکن[2]یک طرح مستقل درجه دوم است که در برگیرنده طرح‌های فاکتوریل کامل یا ناقص نمی‌باشد. در این طرح، ترکیب‌های تیمارها در لبه‌های فضای فرآیند قرار ندارند بلکه در میانه‌ها و مرکز واقع شده‌اند. این طرح‌ها قابل چرخش بوده و هر فاکتور باید دارای سه سطح باشد[۱۲].

1. Response surface methodology
2. BOX-Behnken

آب پنیر مایعی است که در طی فرآیند کواکوله شدن[3] شیر ودر طی فرآیند تولید پنیر به وجود می‌آید. در واقع آب پنیر یا همان پروتئین آب پنیر در طی مراحل تهیه پنیر از پنیر دلمه شده جدا می‌شود وحاوی نیمی از ترکیبات اصلی موجود در شیر کامل می‌باشد. این مایع ارزشمند به علت غنی بودن از ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و مواد معدنی مختلف از دیرباز به عنوان یک غذای مکمل یا جایگزین شیر مادر در رژیم غذایی کودکان یا جیره غذایی دام‌های تازه متولد شده استفاده می‌شود. این ماده حدود ۹۵-۸۵ درصد از حجم شیر و مقدار قابل توجهی (حدود ۵۵ درصد) مواد مغذی شیر را تشکیل می‌دهد. آب پنیر همچنین حاوی پروتئین‌های محلول (۰/۸-۰/٦ درصد)، چربی (۰/۵-۰/٤ درصد) و نمک‌های معدنی (۱۰-۸ درصدوزن خشک) می‌باشد. از اجزای دیگر قابل ارزیابی می‌توان به اسید لاکتیک، اسید سیتریک، ترکیبات ازته غیر پروتئینی و ویتامین‌های گروه B اشاره کرد. آب پنیر حاوی لاکتوز، پروتئین‌های محلول، مواد معدنی محلول، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و آنزیم هاست. پروتئین‌های آب پنیر ارزش بیولوژیک بالایی دارند. آب پنیر حاوی اسیدهای آمینه ضروری خصوصا اسیدهای آمینه گوگرد دار نظیر متیونین و سیستئین می‌باشد کم چرب بوده و حاوی مواد معدنی نظیر کلسیم، فسفر، منیزیم، روی، سدیم، پتاسیم و انواع ویتامین‌های محلول در آب نظیر ویتامین B_{12}، B_6، B_5، B_2، اسید فولیک و اسید آسکوربیک می‌باشد.آب پنیر به دلیل وجود پروتئین‌های محلول، مواد معدنی، اسیدهای آلی و ویتامین‌ها به عنوان پایه محیط کشت در باکتری‌ها، جلبک‌ها و مخمرها مورد استفاده قرار می‌گیرد. از نمونه‌های بارز آن می‌توان به تهیه نوشابه پروبیوتیکی بر پایه آب پنیر با استفاده از استارتر *لاکتوباسیلوسکازئی*و *استرپتوکوکوسترموفیلوس* اشاره کرد. همچنین تولید نوشیدنی تخمیری در محیط کشتبر پایه آب پنیر، تولید پروتئین تک یاخته از آب پنیر و همچنین افزایش تراکم سلولی (بیومس) ریزجلبک سبز *سندسموس آبلیکیوس*[4]در محیط کشت برپایه آب پنیر جهت تولید سوخت زیستی و غیره را بیان نمود[۲۰-۱۳].

3. Coagulation
4. *Scenedesmus obliquus*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

یکی از محصولات استراتژیک که در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد کاروتنوئیدها و به ویژه بتاکاروتن می‌باشد که به طور طبیعی در ارگانیسم‌های فتوسنتتیک سنتز می‌شود. همچنین به علت جهت‌گیری به سمت تولید کاروتنوئیدها از روش‌های بیوسنتتیک توجه به منابع طبیعی آنها افزایش یافته است. مهم‌ترین منبع تولید کننده بتاکاروتن جلبک سبز تک سلولی دونالیلا است که ایجاد کاروتنوئید در کلروپلاست آلگ و تحت شرایط استرس صورت می‌گیرد [۲۱]. قیمت محیط کشت مورد استفاده یکی از فاکتورهای اصلی در قیمت تمام شده محصول تولیدی به روش زیست فناوری است. با توجه به گران قیمت بودن محیط کشت‌های مورد استفاده جهت کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا*هدف این تحقیق جایگزینی محیط کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با غلظت‌های متفاوت آب پنیر و بررسی تأثیر آن در تولید بیومس و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی*دونالیلا سالینا* می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ریزجلبک *دونالیلا سالینا* از پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه که به روش مولکولی جنس و گونه آن به اثبات رسیده بود و قبلا توسط کارشناسان پژوهشکده فعال سازی شده بود تهیه گردید.لوگول، استون و سدیم پتاسیم تارتارات از شرکت شارلو اسپانیا، سدیم هیدروکسید از شرکت اپلیچم آلمان و بقیه مواد شیمیایی نظیر سدیم کربنات، معرف فولین و سولفات مس از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا*

مقدار ۲۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی در شرایط استریل به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت*دونالیلا سالینا*که با ترکیب محیط کشت والنهو غلظت‌های مختلفی از آب پنیر تهیه گردیده بود اضافه شد. جهت ایجاد شرایط ایده آل رشد به منظور رشد حداکثری ریزجلبک‌ها میزان شوری محیط کشت روی ۳ مولار NaCl تنظیم گردید. pHمحیط کشت نیز روی ۷/۵ تنظیم شد و جهت تنظیم pH از اسید کلریدریک و NaOH استفاده گردید. دمای محل نگهداری محیط کشت‌ها در ۲۵ درجه سانتیگراد تنظیم شد.و تحت تابش نور با شدت ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. از پمپ هوا جهت هوادهی مداوم نمونه‌ها استفاده گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز در همین شرایط نگهداری شدند[۲۳-۲۲].

۲-۲-۲- اندازه‌گیری رشد (شمارش سلولی)

توسط سمپلر از هر نمونه جلبکی مقدار معینی برداشته شد و روی لام مخصوص شمارش (لام نئوبار) ریخته شد و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ سلول‌ها شمارش شد. تعداد سلول‌های موجود در ۱۰ مربع از این لام شمارش شده و میانگین آن ثبت گردید. از آنجائی که سلول‌ها متحرک بودند سلول‌های موجود در نمونه قبلا توسط بلور ید (محلول لوگول) بی حرکت شدند[۲۲].

۲-۲-۳- اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید کل

مقدار کلروفیلaو b، کلروفیل کل(a+b)و کاروتنوئیدها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شده و بر روی رسوب سلولی باقی مانده ۵ میلی لیتر استون ۸۵ درصد ریخته شد و بعد از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. مخلوط حاصل مجددا به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نور محلول رویی در طول موج‌های ۶۳۳، ۶۴۴ و ۴۵۲ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر(England, Jenway, 6320 D) خوانده شد. به کمک رابطه‌های زیر میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید بر حسب میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد[۲۴].

$$C_{chl\ a} = 10.3 \times E_{633} - 0.918 \times E_{644}$$
$$C_{chl\ b} = 19.7 \times E_{644} - 3.87 \times E_{633}$$
$$C_{car} = 4.20 \times E_{452.5} - 0.0264 \times C_{chl\,a} - 0.496 \times C_{chl\,b}$$

۲-۲-۴- اندازه‌گیری پروتئین کل

غلظت کل پروتئین با استفاده از روش لوری تعیین گردید. در یک میلی لیتر از نمونه، یک میلی لیتر از معرفA (مخلوط مساوی از:

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

محلول در حدود ۲۰ درصد کربنات سدیم به آرامی در حال تکان دادن به محلول تارتارات سولفات مس اضافه شد، تا غلظت نهایی مشخص ۰/۱ درصد سولفات مس (پنج آبه) ۰/۲۱ درصد پتاسیم تارتارات، ۱۰ درصد کربنات سدیم، سود(N۰/۸۰)،SDS(۱۰ درصد) و آب مقطر اضافه شده و اجازه داده شد تا به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتیگراد) به صورت ایستا قرار گیرد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از معرف B (یک قسمت معرف Folin-ciocalteuفنل با ۵ قسمت آب مقطر مخلوط) اضافه شده و بلا فاصله مخلوط گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر(England, Jenway, 6320 D) در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد[۲۵].

۲-۲-۵- طرح و آنالیز آماری

در این پژوهش سه متغیر مستقل شامل غلظت محیط کشت والنه(A)، درصد آب پنیر(B) و زمان گرمخانه گذاری (C) در سه سطح با به کار گیری روش سطح پاسخ طرح باکس بانکن مورد مطالعه قرار گرفت. پس از جمع آوری داده‌ها از مدل درجه دوم برای برازش و آنالیز رگرسیون در سطح خطای نوع اول α= ۰/۰۵ استفاده شد.در نهایت شرایط بهینه با استفاده از روش‌های عددی و بر اساس تابع مطلوبیت تعیین گردید. جهت انجام طرح و آنالیز آماری و همچنین رسم نمودارها از نرم افزار SAS نسخه ۹/۳ استفاده شد.

Table 1 Actual and coded levels of independent factors according to Box-behnken design

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean
A	Chesse whey	%	Numeric	0	5	-1	1	2.5
B	Walne medium	µL	Numeric	0	50	-1	1	25
C	Incubation time	Day	Numeric	0	14	-1	1	7

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شمارش سلولی

در این مطالعه مطابق شکل ۱(A)با افزایش درصد آب پنیر،رشد سلولی افزایش یافت و مطابق شکل ۱ (B) با افزایش مقدار محیط کشت والنه نیز رشد سلولی افزایش داشت ولی مطابق (شکل ۱ (C)) با گذشت زمان تراکم سلولی کاهش یافت. مطابق شکل ۱ (A) با افزایش درصد آب پنیر از صفر به ۵ درصد تراکم سلولی از $۱/۳\times۱۰^{۶}$به $٤/٥\times۱۰^{۶}$در لیتر افزایش داشت. در صورتی که نتایج حاصل از شکل ۱ (B) نشان داد که با افزایش مقدار والنه از صفر میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر تراکم سلولی از $۲/۳\times۱۰^{۶}$ به $٤/٧\times۱۰^{۶}$ در لیتر افزایش یافت. با افزایش مدت زمان کشت (شکل ۱ (C)) تراکم سلولی به مرور کاهش یافت، به طوری که میزان سلول اولیه وارد شده به محیط و مقدار تراکم سلولی در آخرین روز کشت (روز ١٤) اختلاف معنی‌داری باهم داشتند (P<۰/۰۵). شایان ذکر است طبق نتایج بدست آمده از نمودار شکل ۱ (A و B) با افزایش درصد آب پنیر و همچنین محیط کشت والنه، تراکم سلولی افزایش یافت ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اما نحوی و همکاران (۲۰۰۰) به این نتیجه رسیدند که استفاده از آب پنیر در محیط کشت مخمر قرمز رنگ *ردوترولا آکنیوروم* باعث افزایش رشد سلولی (بیومس) مخمر شده است.Salla و همکاران (۲۰۱٦) طی مطالعه‌ای اثر کنسانتره پروتئین آب پنیر را بر روی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از کنسانتره پروتئین آب پنیر در محیط کشت جلبک باعث افزایش تراکم سلولی (بیومس) *اسپیرولینا پلاتنسیس* شده است[۲۷-۲٦]. شایان ذکر است که نتایج هر دو تحقیق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مغایرت دارد.

فاکتورهای مختلفی از جمله نور، دما، pH، شوری و مقدار ماده غذایی در رشد جلبک‌ها تاثیر به سزایی دارند. دقت در تنظیم فاکتورهای فوق می‌تواند کمک شایانی به کشت بهتر آنها بنماید. نور و شوری از عوامل مهمی هستند که نوسان مقدارشان در میزان کلروفیل، کاروتنوئید و رشد سلول تاثیر گذار است [۸]. مواد معدنی موجود در آب پنیر نظیر کلسیم، فسفر، منیزیم، روی، سدیم و پتاسیم در برخی از ترکیبات شیمیایی محیط کشت والنه وجود دارد و همچنین آب پنیر حاوی انواع ویتامین‌های محلول

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

در آب نظیر ویتامین B_{12}، B_6، B_5، B_2، اسید فولیک و اسید آسکوربیک می‌باشد[۱۸]. از این بین ویتامین B_{12} و B_2 برای رشد *دونالیلا سالینا* بسیار ضروری است و باعث افزایش تراکم سلولی شده است. از سوی دیگر با افزایش مدت زمان کشت میزان مواد غذایی موجود در محیط کشت کاهش یافته است و این امر باعث کاهش تراکم سلولی در روزهای پایانی محیط کشت شده است.

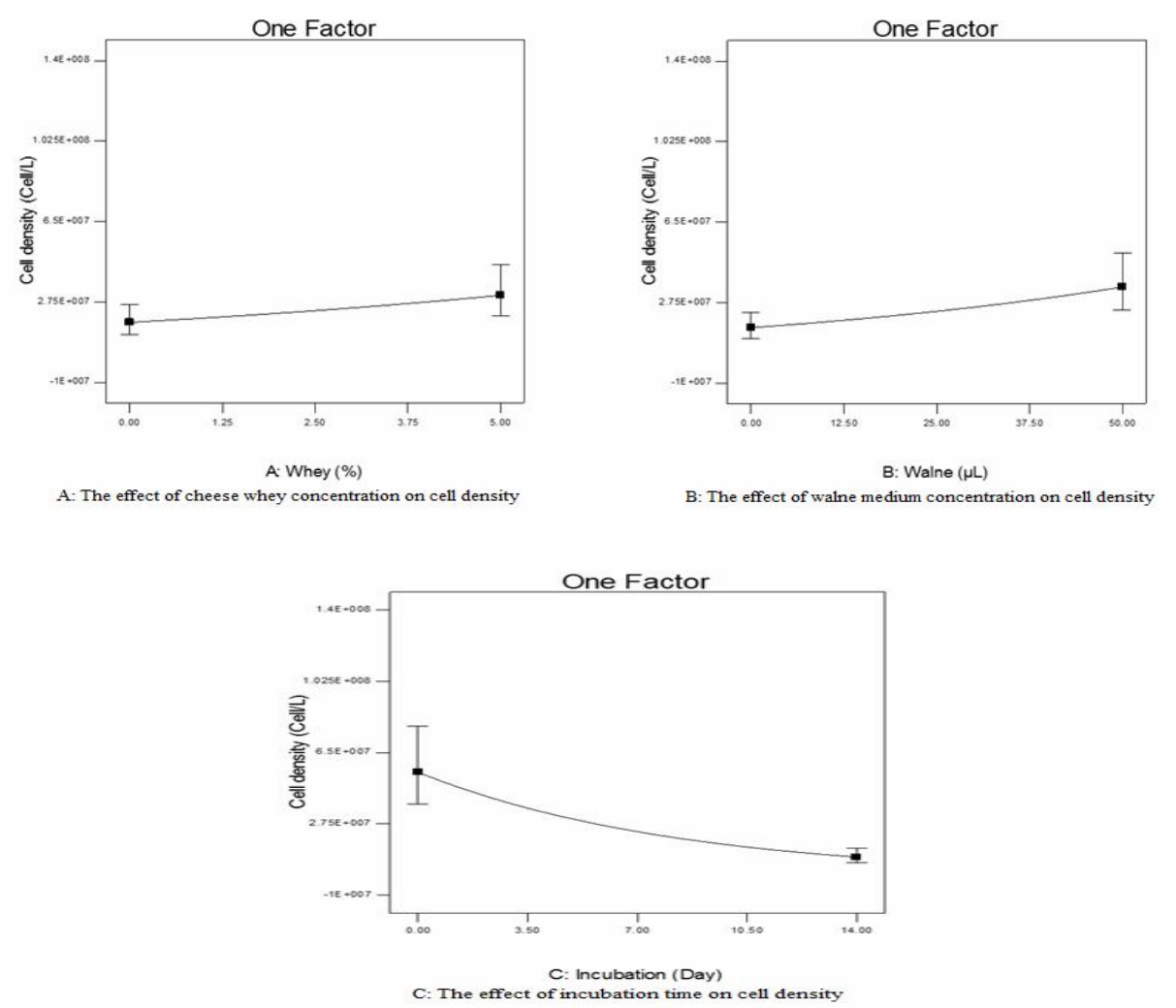


Fig 1 The effect of independent factors on cell density

۳-۲- کلروفیل

نتایج حاصل ازنمودار (A) شکل ۲ نشان داد که با افزایش مقدار والنه مقدار کلروفیل افزایش یافت و این افزایش اختلاف معنی‌داری را به وجود آورد (P<۰/۰۵). اما با توجه به نمودار (B) شکل ۲ مشخص می‌گردد که با افزایش مدت زمان کشت مقدار کلروفیل کاهش یافت اما این کاهش اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). شکل ۲ (A) نشان داد که با افزایش مقدار والنه از صفر میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر مقدار کلروفیل از ۰/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر به ۰/۹۰ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش یافت. اما شکل ۲ (B) نشان داد با افزایش زمان گرمخانه گذاری از روز صفر تا روز ۱٤ مقدار کلروفیل از ۰/٦٥ میلی گرم بر میلی لیتر به ۰/٤۱ میلی گرم بر میلی لیترکاهش یافت. بر اساس نتایج

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

آنالیز واریانس (جدول شماره ۲) درصد آب پنیر در مقادیر مطالعه شده بر روی میزان کلروفیل معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵).

Salla و همکاران (۲۰۱٦)به این نتیجه رسیدند که استفاده از کنسانتره پروتئین آب پنیر در محیط کشت ریزجلبک اسپیرولینا به دلیل وجود سطح بالای نیتروژن باعث افزایش غلظت کلروفیل در جلبک اسپیرولینا می‌شود.کلروفیل باعث جذب نور خورشید و تبدیل آن به انرژی می‌شود. این ماده برای بدن انسان بسیار مفید است و به عنوان یک عامل آنتی اکسیدان قوی باعث کاهش تخریب سلول‌ها به وسیله عوامل سرطان زای محیطی می‌شود. با افزایش مقدار والنه در محیط کشت به دلیل افزایش سطح نیتروژن مقدار کلروفیل افزایش یافته است همچنین منیزیم موجود در آب پنیر که تشکیل دهنده مولکول کلروفیل و با آنزیم‌های مختلف در ارتباط است می‌تواند بهره وری فتوسنتز ریزجلبک را افزایش داده و منجر به افزایش میزان کلروفیل در سلول‌ها شود. اما با افزایش زمان به دلیل کاهش مواد غذایی در محیط و تنش‌های دمایی خفیفی که رخ داده باعث کاهش غلظت کلروفیل در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* شده است[۲۹-۲۷].

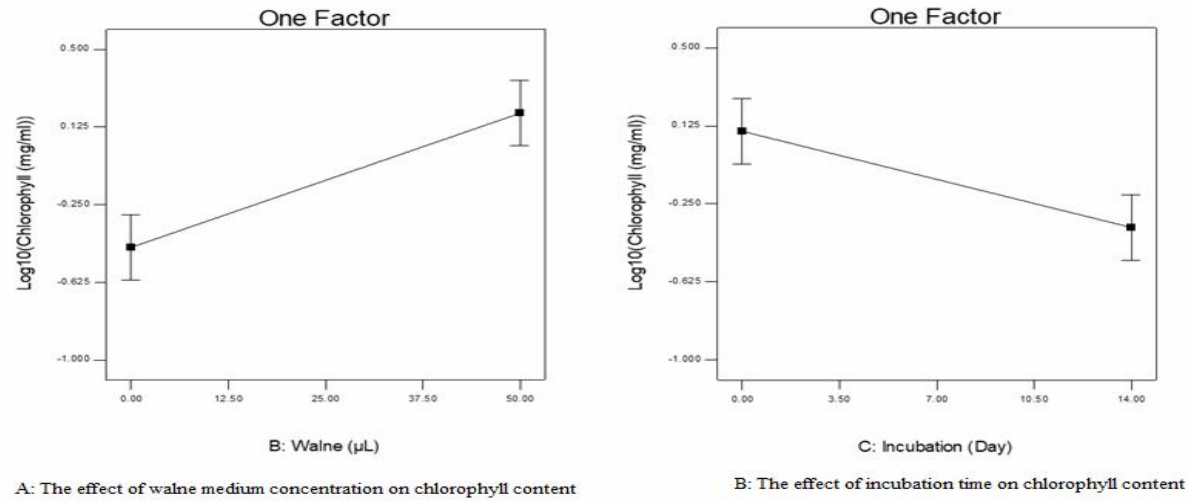


Fig 2 The effect of independent factors on total chlorophyll content

۳-۳- کاروتنوئید

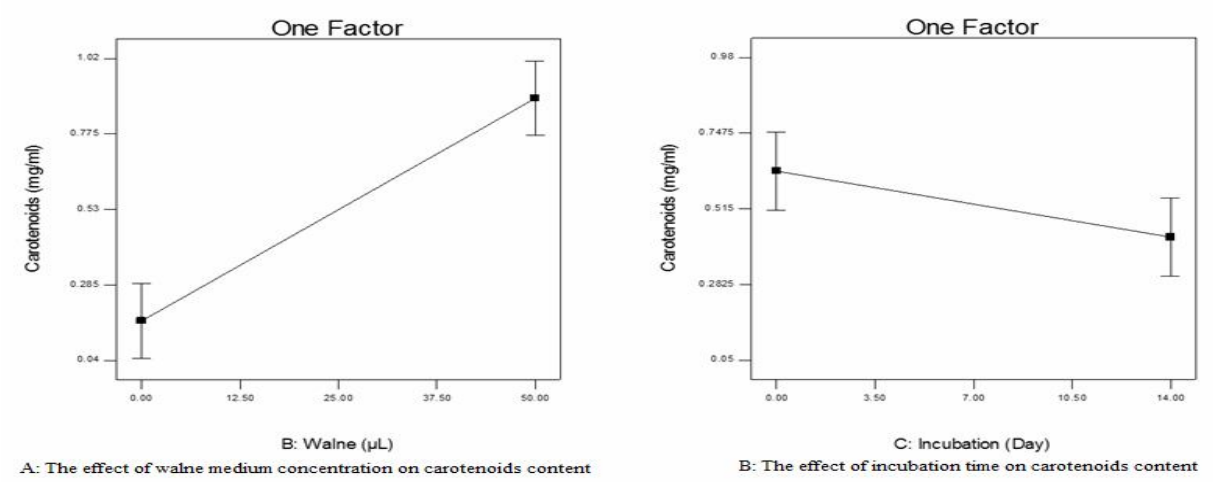
تحلیل نتایج حاصل از نمودار (A) شکل ۳ نشان داد که با افزایش مقدار والنه در محیط کشت میزان کاروتنوئید افزایش یافت و این افزایش اختلاف معنی‌داری را به وجود آورد(P<۰/۰۵). نتایج حاصل از نمودار (B) شکل ۳ بیانگر کاهش مقدار کاروتنوئید با افزایش زمان گرمخانه گذاری است اما این کاهش اختلاف معنی‌داری نداشت(P>۰/۰۵). با افزایش مقدار والنه طبق نمودار (A) شکل ۳ از صفر میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر مقدار کاروتنوئید از ۰/۱۳ میلی گرم بر میلی لیتر به ۰/۸۸ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش یافت. اما مطابق نمودار (B) شکل ۳ با افزایش زمان گرمخانه گذاری از روز صفر تا روز ۱٤ مقدار کاروتنوئید از ۰/٦۳ میلی گرم بر میلی لیتر به ۰/۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش یافت. طبق نتایج آنالیز واریانس (جدول شماره ۲) درصد آب پنیر در مقادیر مطالعه شده بر روی میزان کاروتنوئید معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

نحوی و همکاران (۲۰۰۰) دریافتند که استفاده از آب پنیر به دلیل وجود لاکتوز در این ماده باعث افزایش تولید کاروتنوئید در مخمر قرمز رنگ *ردوترولا آکنیوروم* شده است [۲٦]. کاروتنوئیدها به عنوان گیرنده‌های فرعی نور عمل کرده و نورهای مرئی با طول موج ٤۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر را جذب می‌کنند. این ترکیبات نقش‌های حیاتی از جمله حفاظت سلول در برابر تشعشعات بالا، از بین بردن رادیکال‌های آزاد و غیره را دارا می‌باشند. در تنش‌های شیمیایی نظیر فقر مواد غذایی، شوری زیاد و در تنش‌های حاصل از افزایش نور جلبک *دونالیلا سالینا* قادر به افزایش سنتز و تجمع کاروتنوئیدها تا ٤۲ پیکوگرم در سلول می‌باشد[۳۰]. شوری محیط کشت *دونالیلا سالینا* در این آزمایش روی ۳ مولار (۸٤ گرم NaCl در لیتر) تنظیم شده بود و با توجه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

به این که کاروتنوئید در میزان شوری بالا تولید می‌شود تنش شوری سبب افزایش تولید کاروتنوئید شده است. اما در روزهای پایانی چونریزجلبک خود را با شریط موجود وقف داده و از حالت تنش خارج شده باعث کاهش میزان کاروتنوئید شده است.

همچنین در این مطالعه سعی شد تا در حد امکان از ایجاد تنش‌های محیطی جلوگیری گردد که شاید این هم علتی در کاهش کاروتنوئید تولیدی در روزهای پایانی باشد.



A: The effect of walne medium concentration on carotenoids content

B: The effect of incubation time on carotenoids content

Fig 3 The effect of independent factors on total carotenoids content

۳-٤- پروتئین کل

نتایج حاصل از نمودار (A) شکل ٤ نشان دادبا افزایش مقدار والنهمیزان پروتئین افزایش یافت که از نظر آماری معنی‌دار بود(P<۰/۰۵). اما نمودار (B) شکل ٤ نشانگر این است که درصد آب پنیر بر مقدار پروتئین اثر غیرخطی و غیر معنی‌دار دارد (P>۰/۰۵). همچنین نمودار (C) شکل ٤ بیانگر این است که زمان گرمخانه گذاری نیز بر مقدار پروتئین دارای اثر غیرخطی و البته غیر معنی‌دار است (P>۰/۰۵). با افزایش مقدار والنه (نمودار (A) شکل ٤) از صفر میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر مقدار پروتئین از ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ۳۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم رسید اما با افزایش درصد آب پنیر (نمودار (B) شکل ٤) از صفر به ۵ درصد مقدار پروتئین از ۳۳۰ میلی گرم برکیلوگرم به ۲۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۲/۵ درصد آب پنیر کاهش یافت،سپس به مقدار ۳۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۵ درصد آب پنیر افزایش یافت. در حالی که با افزایش زمان گرمخانه گذاری (نمودار (C) شکل ٤) مقدار پروتئین ابتدا از ۱٦۵ میلی گرم بر کیلوگرم به ۲۸۵ میلی گرم بر کیلوگرم در روز ۷ افزایش یافت، اما با رسیدن به روزهای پایانی مقدار پروتئین به مرور کاهش یافت و به ۱٦۵ میلی گرم بر کیلوگرم مقدار اولیه رسید.طبق نمودار (D) شکل ٤ با افزایش درصد آب پنیر و زمان گرمخانه گذاریتا روز ۷ مقدار پروتئین افزایش یافتو این افزایش اختلاف معنی‌داری را به وجود آورد(P<۰/۰۵). اما از روز ۹ به بعد مقدار پروتئین به مرور کاهش یافت. همچنین مطابق نمودار (E) شکل ٤ با افزایش مقدار محیط کشت والنه و زمان گرمخانه گذاری مقدار پروتئین به مرور افزایش یافت و در روز ۷ به بیشترین مقدار خود رسید اما از روز ۹ به بعد مقدار پروتئین به مرور کاهش یافت و در روز ١٤ به کمترین مقدار خود رسید ولی این کاهش تفاوتمعنی‌داری از نظر آماری نداشت (P>۰/۰۵).Salla و همکاران (۲۰۱٦)طی مطالعه-ای دریافتند که استفاده از کنسانتره پروتئین آب پنیر در محیط کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* سبب افزایش پروتئین در این ریزجلبک‌ها می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت[۲۷]. سطوح بالای نیتروژن در محیط کشت باعث افزایش غلظت پروتئین در سلول ریزجلبک‌ها می‌شود[۲۹]. با توجه به این که میزان ترکیبات ازته در آب پنیر زیاد می‌باشدباعث افزایش رشد و به تبع آن افزایش میزان پروتئین در ریزجلبک‌ها می-گردد[١٦]. به نظر می‌رسد علت اینکه در پژوهش حاضر میزان آب پنیر بر بیومس و مقدار پروتئین اثر معنی‌دار نداشته است به دلیل از بین رفتن سلول‌های *دونالیلا سالینا* در مدت زمان مورد بررسی باشد. همانطور که قبلاً اشاره شد با گذشت زمان کشت تراکم سلولی کاهش داشت ولی پروتئین‌ها با از بین رفتن سلول در محیط کشت رهاشده و موجب افزایش مقدار پروتئین شده است که البته از نظر آماری معنی‌دار نبود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

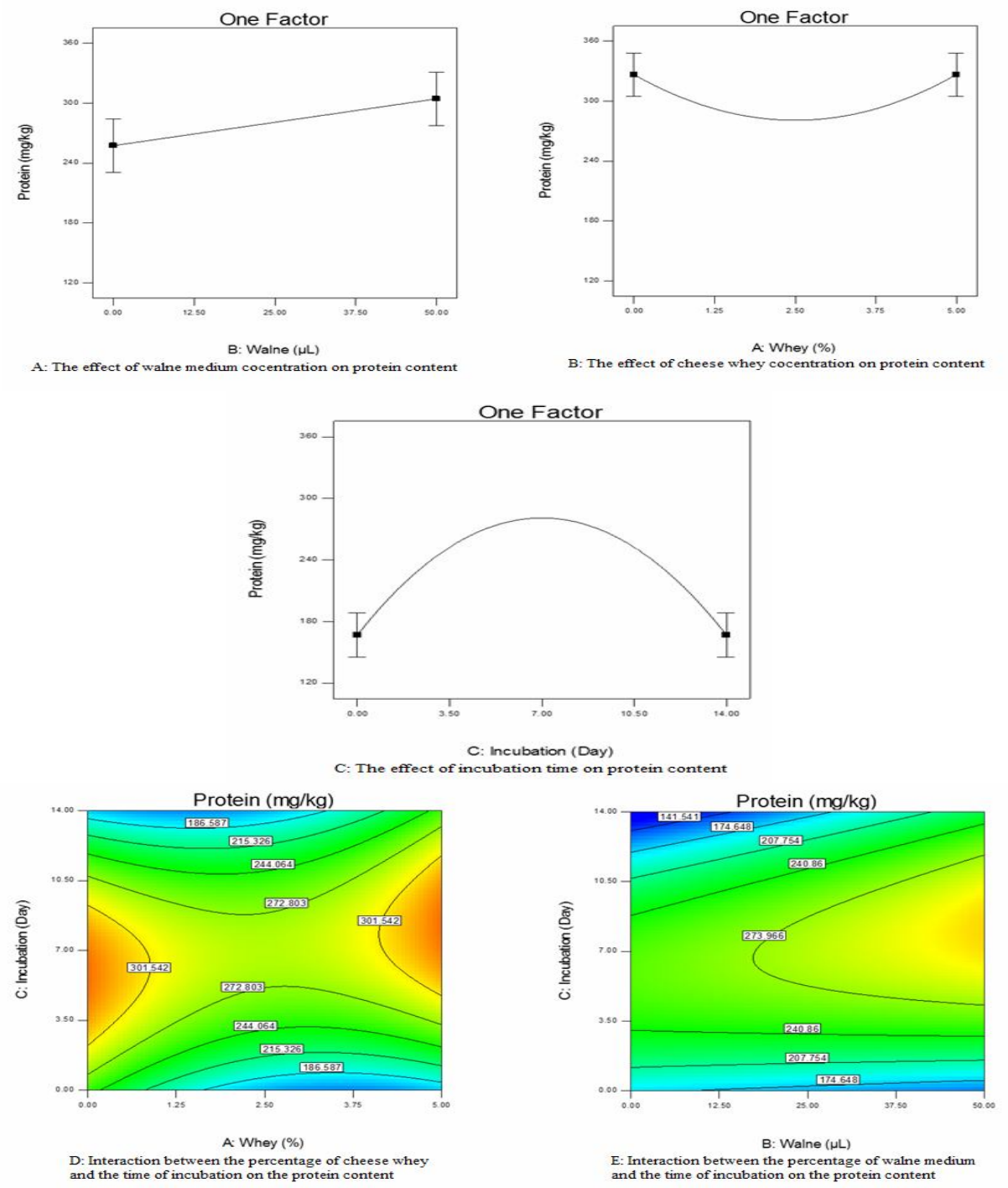


Fig 4 The effect of independent factors on total protein content

۳-۵- بهینه سازی

شرایط بهینه با توجه به مقادیر درصد آب پنیر و زمان گرمخانه گذاری در محدوده مورد مطالعه و کمترین میزان محیط کشت والنه و همچنین بیشینه مقدار دانسیته سلول و پروتئین و کمینه مقدار کاروتنوئید به صورت بهینه سازی عددی محاسبه شد. بهترین شرایط شامل روز ۵ با درصد آب پنیر ۵ درصد و محیط کشت والنه صفر درصد با تابع مطلوبیت بهینه سازی ۰/۸۲ می-باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

Table 2 Analysis of variance table (A: Cell density, B: Total chlorophill, C: Carotenoieds, D: Protein)

A	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value (Prob > F)	
	Model	2.61	3	0.87	9.19	0.0177	significant
	A-Whey (%)	0.22	1	0.22	2.32	0.1882	
	B-Walne Medium (µL)	0.53	1	0.53	5.64	0.0635	
	C-Incubation Time (Day)	2.55	1	2.55	26.93	0.0035	
	Residual	0.47	5	0.094			
	Lack of Fit	0.35	4	0.087	0.7	0.7031	not significant
	Pure Error	0.12	1	0.12			
	Cor Total	3.08	8				
	R-Squared=0.85		Ln(Cell density (Cell/L)) =16.97+0.27* A+0.39* B-0.85* C				
B	**Source**	**Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F Value**	**p-value (Prob > F)**	
	Model	1.39	3	0.46	7.99	0.0028	significant
	A-Whey (%)	0.12	1	0.12	2.12	0.1693	
	B-Walne (µL)	0.84	1	0.84	14.47	0.0022	
	C-Incubation (Day)	0.43	1	0.43	7.37	0.0177	
	Residual	0.75	13	0.058			
	Lack of Fit	0.54	9	0.06	1.11	0.4961	not significant
	Pure Error	0.22	4	0.054			
	Cor Total	2.14	16				
	R-Squared=0.65		Log10(Chlorophyll (mg/ml))=-0.13-0.12* A+0.32* B-0.23* C				
C	**Source**	**Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F Value**	**p-value (Prob > F)**	
	Model	0.97	2	0.49	17.51	0.0004	significant
	B-Walne Medium (µL)	0.9	1	0.9	32.64	0.0001	
	C-Incubation Time (Day)	0.071	1	0.071	2.57	0.1374	
	Residual	0.3	11	0.028			
	Lack of Fit	0.087	8	0.011	0.15	0.9858	not significant
	Pure Error	0.22	3	0.073			
	Cor Total	1.28	13				
	R-Squared=0.76		Chlorophyll (mg/ml)=0.53+0.36* B-0.1* C				
D	**Source**	**Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F Value**	**p-value (Prob > F)**	
	Model	77410.48	5	15482.1	14.91	0.0001	significant
	B-Walne Medium (µL)	4394.53	1	4394.53	4.23	0.0642	
	AC	6601.56	1	6601.56	6.36	0.0284	
	BC	4900.01	1	4900.01	4.72	0.0526	
	A^2	8822.97	1	8822.97	8.5	0.0141	
	C^2	54948.02	1	54948.02	52.92	< 0.0001	
	Residual	11422.2	11	1038.38			
	Lack of Fit	7353.59	7	1050.51	1.03	0.519	not significant
	Pure Error	4068.61	4	1017.15			
	Cor Total	88832.68	16				
	R-Squared=0.88						

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

٤- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده نشان داد که با افزایش درصد آب پنیر و همچنین محیط کشت والنه، تراکم سلولی افزایش یافت ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، در صورتی که با افزایش مقدار والنه میزان کلروفیل و کاروتنوئید افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری را به وجود آورد (P<۰/۰۵). افزایش زمان گرمخانه گذاری باعث کاهش تراکم سلولی، کلروفیل و کاروتنوئید شد. اما این کاهش اختلاف معنی‌داری را در میزان کلروفیل و کاروتنوئید ایجاد نکرد (P>۰/۰۵)، ولی در میزان تراکم سلولی اختلاف معنی‌داری را به وجود آورد (P<۰/۰۵). بررسی اثر متقابل درصد آب پنیر و زمان گرمخانه گذاری نشان داد با افزایش درصد آب پنیر و زمان گرمخانه گذاری تا روز ۷ مقدار پروتئین افزایش یافت و این افزایش اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).همچنین بررسی اثر متقابل مقدار محیط کشت والنه و زمان گرمخانه گذاری نیز نشان دهنده افزایش مقدار پروتئین تا روز ۷ با افزایش مقدار محیط کشت والنه و زمان گرمخانه گذاری است، به طوری که از روز ۹ به بعد مقدار پروتئین به مرور کاهش یافت و در روز ١٤ به کمترین مقدار خود رسید ولی این کاهش تاثیر معنی‌داری از نظر آماری نداشت (P>۰/۰۵).

٥- منابع

[1] Simon, D. P, Anila, N, Gayathri, K, & Sarada, R, 2016, Heterologous expression of β-carotene hydroxylase in *Dunaliella salina* by Agrobacterium-mediated genetic transformation, Algal Research, 18, 257-265.

[2] Hejazi, M, Hosseinzadeh Gharjeh, N, Mohammadzadeh Jalaly, H, Jafaripour, D, Heydarzadeh, S,& Mazaheri Mogaddam, M, 2014, The effect of UV on β-carotene production rate in green microalga Dunaliella, 1st International & 13th Iranian Genetics Congress, 1-5.

[3] Amaninejad, P, Emadi, H, Emtiazjoo, M,& Hosseinzadeh Sahhafi, H, 2010, Effects of Dunaliella microalgae (*Dunaliella salina*) on different immune indeses (complements c3, c4 and antioxidant capacity) in rainbow trout (oncrohynchus mykiss), Scientific and research Journal of Marine Biology, 3-21.

[4] Pour Hoseiny, S,& Tavakoli, O, 2013, Production of β-carotene from Microalgae *Dunaliella Salina*, The Eighth Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and the Fourth National Bioethics Conference, 1-5.

[5] Borhani Sabzevar, A, Gorbanli, M,& Satei, A, 2011, Comparison of the effects of isosomatous solutions (polyethylene glycol, ethylene glycol, sucrose, Mannitol, salt and glycerol) on growth and morphology of *Dunaliella salina*, Journal of Marine Science and Technology, 1-13.

[6] Van Poppel, G, & Goldbohm, R. A, 1995, Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention, The American journal of clinical nutrition, 62(6), 1393S-1402S.

[7] Gomez, P. I, Barriga, A, Cifuentes, A. S, & Gonzalez, M. A, 2003, Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta, Biological Research, 36(2), 185-192.

[8] Salmaninejad, M, 2015, Effect of culture mediums and light intensity on growth and Carotenoides of *Dunaliella Salina* in Urmia Lake, Journal of Plant Research, 28(4), 771-783.

[9] Lee, S. Y, Kim, S. H, Hyun, S. H, Suh, H. W, Hong, S. J, Cho, B. K, & Choi, H. K, 2014, 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, 49(6), 996-1004.

[10] García, F, Freile-Pelegrín, Y, & Robledo, D, 2007, Physiological characterization of Dunaliella sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico, Bioresource technology, 98(7), 1359-1365.

[11] Hosseini Tafreshi, A, & Shariati, M, 2009, Dunaliella biotechnology: methods and applications, Journal of applied microbiology, 107(1), 14-35.

[12] Montgomery, D. C, 2017, Design and analysis of experiments, John Wiley & Sons, 490-506.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

[13] Jelen, P, 2011, Whey processing utilization and products, Encyclopedia of Dairy Sciences, 731-737.

[14] Vahedi, E, Rafe, A,& Ghorbani Hasan-Saraei, A, 2015, Investigating Textural properties for a mixture of whey proteins and isolated rice bran proteins, Specialty of Food Science and Technology, 13(1), 73-79.

[15] Safaei Firoozabadi, M.S, Zarezadeh Mehrizi, M, Hedaiat, N,& Nasri Hasani, Y, 2012, Effects of using Cheese whey on performance and qualitative properties of eggs on Native chickens with cold stress, Veterinary Journal of Islamic Azad University, Sanandaj Branch, 6(2), 47-52.

[16] Anvari, M, Alizadeh, A,& Sadeghipour, M, 2010, Optimization of single cell protein production of Cheese whey by *K. marxianus* whit Taguchi method, Journal of Biosciences, 1-10.

[17] Javanmard, M, Lighvani, H, Ghiasi Tarzi, B,& Rashidi, A, 2012, Extraction and purification of glycomacropeptide from whey to be used as a source of protein for phenylketonuria patients, Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 9-16.

[18] Jamali Far, H, Samadi, N, Fazeli, M,& Moshak, Z, 2011, Preparation of probiotic beverage based on whey using *Lactobacillus casei* and *Streptococcus thermophiles* starters, Comparative Pathobiology, 475-484.

[19] Abdulmaliki, F, Mazaheri Asadi, M,&Jahadi, M, 2009, Production ofFermented Beverage Based on Cheese whey using different Types of Kefirmicrofloursandinvestigation of its chemical and organoleptic characteristics, Journal of Nutrition Sciences and Food Technology of Iran, 21-32.

[20] Da Silva Borges, W, Araújo, B. S. A, Moura, L. G, Coutinho Filho, U, de Resende, M. M, & Cardoso, V. L, 2016, Bio-oil production and removal of organic load by microalga Scenedesmus sp. using culture medium contaminated with different sugars, cheese whey and whey permeate, Journal of environmental management, 173, 134-140.

[21] Tavallaei, S, Mazaheri Asadi, M,& Rostami, KH, 2010, The cultivation of *Dunaleilla salina* algae and the production of carotenoids from it: a step towards stable development, The Second National symposium on Agriculture and Sustainable Development (opportunities and Future challenges), 1-7.

[22] Mokhberi, R, Rezaei, A,& Kordenaeej, A, 2015, Increased Production of Beta-Carotene and Glycerol in *Dunaliella Salina* Cell Culture by Ultrasound, Journal of Cell & Tissue, 6 (3), 397-408.

[23] Beheshtifar, S,& Shariati, M, 2013, Effect of Titanium on growth and synthesis of photosynthetic pigments in unicellular green alga *Dunaliella salina*,Journal of Plant Research (Journal of Biology of Iran), 28(1), 42-52.

[24] Frank, G, & Wegmann, K, 1974, Physiology and biochemistry of glycerol biosynthesis in Dunaliella, Biologisches Zentralblatt,707-723.

[25] Bernardo, M. P, Coelho, L. F, Sass, D. C, & Contiero, J, 2016, l-(+)-Lactic acid production by Lactobacillus rhamnosus B103 from dairy industry waste, brazilian journal of microbiology, 47(3), 640-646.

[26] Nahvi, E, Vaez, M,& Emtiazy, G, 2000,Production of carotenoids from cheese whey with red yeast*Redotrolla akniyurum*, Isolated from the syrup of Tos-Taleghan trees, Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 4(3), 67-76.

[27] Salla, A. C. V, Margarites, A. C, Seibel, F. I, Holz, L. C, Brião, V. B, Bertolin, T. E, & Costa, J. A. V, 2016, Increase in the carbohydrate content of the microalgae Spirulina in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate, Bioresource technology, 209, 133-141.

[28] Hasan Soltan, T,Nowruzi, M,& Amozegar, M. A, 2016,Investigation of Chlorophyll a, b and Total Carotenoids as well as Antioxidant Activity of Four Green Algae Isolated from Golestan Shores of the khazar Sea, Journal of Cellular Biotechnology – Molecular, 6(24), 31-36.

[29] Lourenço, S. O, 2006,Cultivation of marine microalgae – principles and applications, Rima, São Carlos.

[30] Trenkenshu, R.P, 2005, Simplest models of microalgae growth, 2 queasy continuous culture, Ecologia moray, 67, 98-110.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]

Use of cheese whey as an alternative culture medium for the production of *Donalia Salina* algae

Nabizadeh Gholenji, A. [1], Rezazade Bari, M. [2*], Behrooz Atashbar[3], Saber Amiri [4], Mohammad Lotfi Goshayesh[5]

1. MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Saba Institute of Higher Education, Urmia, Iran
2. Associate Professor,Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Department of Ecology and Resource Assessment, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
4. PhD student, Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology,Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5. MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

(Received: 2017/07/19 Accepted:2017/10/22)

The aim of this study was to investigate the effects of different concentrations of cheese whey and Walne culture medium to produce *Dunaliella salina* biomass and evaluation of its biochemical properties. For this purpose, three factors including the concentration of Walne culture medium (0-50 µl), the percentage of cheese whey (0-5 %) and incubation time (0-14 days) using Box-Behnken design with 17 Runs were studied. Results showed that increasing of cheese whey percentage and Walne culture medium caused to increase cell density but it was not statistically significant ($p>0.05$). Increasing of the Walne culture medium led to increasing chlorophyll and carotenoids and showed a significant difference ($p<0.05$). The cell densityand the amount of chlorophyll and carotenoids decreased gradually with increasing incubation time, however, there was no significant difference observed in the levels of chlorophyll and carotenoids ($p>0.05$). Significant differences were observed between the different treatments in producing cell density ($p<0.05$). The protein content was significantly increased with increasing of cheese whey percentage and incubation period up to 7th ($p<0.05$). Also, increasing in Walne culture medium concentration resulted in increasing the protein content until day 7 of the incubation period and decreased (from day 9 onwards) over time and reached its lowest level on day 14 but no significant differences was detected through the period ($p>0.05$). Optimum conditions were obtained on day 5 of incubation, 5 percent of cheese whey and zero percent of the Walne culture medium. In the mentioned condition the amount of cell density, protei and carotenoid was $2.74\times10^{+7}$, 288.75 mg/kg, 0.202 mg/ml respectively.

Keywords: *Dunaliella salina*, Cheese whey, Walne medium, Biomass, Chlorophyll

* Corresponding Author E-Mail Address: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-06-13]