

افزایش تولید بتا-کاروتن و گلیسرول در کشت سلولی *Dunaliella salina* توسط امواج فراصوترقیه مخبری <sup>۱</sup>M.Sc.، آیت ا... رضایی <sup>۲</sup>Ph.D.، علاءالدین کردناییج <sup>۲</sup>Ph.D.

- ۱- دانشگاه پیام نور، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران، ایران  
 ۲- دانشگاه شاهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: arezaei@shahed.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۴

## چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر امواج فراصوت بر رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی در کشت جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* بود.

**مواد و روش‌ها:** امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و توان ۵ W/Cm<sup>3</sup>، به کشت‌های سلولی در روز چهاردهم واگشت در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اعمال شد. مدت زمان تابش امواج فراصوت به سلول‌ها ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه بود. شاخص‌های مورد اندازه‌گیری عبارت بود از: رشد سلولی، پروتئین کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، قندهای محلول، بتا-کاروتن و گلیسرول.

**نتایج:** نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان تابش امواج فراصوت رشد سلولی و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش یافت. در مقابل مقدار پروتئین کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، بتا-کاروتن و گلیسرول افزایش یافت. بیشترین میزان بتا-کاروتن و گلیسرول به‌عنوان متابولیت‌های مهم در حالت تیمار ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت به‌دست آمد که به ترتیب ۱۲/۳ و ۱۳/۵ میلی‌گرم در لیتر بود.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد امواج فراصوت با تحریک سلول‌ها و القای پاسخ‌های دفاعی و متابولیت ثانوی، باعث افزایش مقدار بتا-کاروتن و گلیسرول در سلول‌ها گردید.

**واژگان کلیدی:** *Dunaliella salina*، کشت سلولی، امواج فراصوت، بتا-کاروتن، گلیسرول

## مقدمه

جمله این کاربردها می‌توان به تیمار بذرها، گیاهان برای کاهش فاصله رشدی، کاهش و حذف آفات و بیماری‌ها و استفاده از آن در مهندسی ژنتیک و انتقال ژن اشاره کرد.

جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* از تولیدکنندگان مهم در دریا و دریاچه‌های نمکی فوق اشباع است (۱۰ و ۱۱). از ترکیب‌های مهم درون سلولی این جلبک می‌توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول، پروتئین و ویتامین‌ها اشاره نمود. بخش عمده این ترکیب‌ها دارای خاصیت ضداکسیدانسی و ضدسرطانی می‌باشند (۱۲ و ۱۳).

در زیست فناوری بر روش‌های تولیدی جایگزین برای افزایش محصولات طبیعی تمرکز زیادی وجود دارد. یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسی متابولیت‌های اولیه و ثانوی سلول‌ها مورد توجه قرار دارد، روش کشت سلولی است. دست‌ورزی کشت‌های سلولی با الیسیتورها یکی از استراتژی‌های مهم جهت القای متابولیت‌های ارزشمند در بیوتکنولوژی است. درارتباط با تاثیر عوامل فیزیکی از جمله امواج فراصوت بر سلول‌های جلبک *D. salina* مطالعه‌ای تاکنون صورت نگرفته است. بنابراین در این تحقیق سعی بر آن است تا با تابش امواج فراصوت بر سلول‌های این جلبک در محیط کشت تعلیقی، مقدار رشد و تولید متابولیت‌ها از جمله بتا-کاروتن و گلیسرول مورد مطالعه قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

**شرایط کشت و رشد:** مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در شرایط استریل به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع جانسون استریل، با غلظت نمک دو مولار NaCl و اسیدیته ۷/۵ در ارلن مایرهایی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر افزوده شد به طوری که تعداد سلول‌ها در هر ارلن مایر تقریباً  $3.0 \times 10^3$  در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی بود. سوسپانسیون‌های تهیه شده جلبکی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بر روی شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه تحت تابش نور فلورسنت با شدت ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲ هفته که کشت‌های جلبکی در اواسط مرحله خطی دوره رشد خود قرار گرفتند، تیمار فراصوت اعمال شد.

امروزه متابولیت‌های به دست آمده از سلول‌های جلبکی و گیاهی منبع ترکیبات مهم دارویی، بهداشتی، طعم دهنده‌های طبیعی، عطرها و رنگ‌ها می‌باشند. استفاده از کشت سلولی در تولید متابولیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد توجه قرار دارد. تولید متابولیت‌های سلولی با خصوصیات اقتصادی از طریق کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات تحت شرایط طبیعی دارد. کنترل دقیق شاخص‌های مختلف، سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند، درحالی‌که در شرایط طبیعی مرتب تحت تاثیر شرایط آب و هوایی و آفات و بیماری‌ها قرار دارد (۱).

القای تولید و تجمع متابولیت‌های ثانوی در سلول‌ها بخشی از پاسخ‌های دفاعی می‌باشد که توسط الیسیتورها یا محرک‌ها صورت می‌گیرد. از این رو تیمار سلول‌های جلبکی و گیاهی با چنین عواملی یکی از روش‌های سودمند برای افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت سلولی می‌باشد (۱). اخیراً مطالعات پراکنده ای روی اثرات زیستی امواج فراصوت در کشت سلول گیاهی صورت گرفته اما در خصوص اثرات تحریک کنندگی آن در تولید متابولیت‌ها در سلول‌های جلبکی اطلاعات چندانی وجود ندارد. افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی توسط امواج فراصوت با انرژی کم، گزارش شده است (۲، ۳ و ۴) و مشخص شده است که این افزایش در بیوسنتز متابولیت ثانوی بیشتر ناشی از القای فعالیت فیزیولوژیک سلول‌ها توسط فراصوت می‌باشد. به همین دلیل امواج فراصوت با شدت و انرژی کم به عنوان الیسیتور فیزیکی یا غیر زیستی مد نظر قرار می‌گیرد.

مطالعات نشان داده است که فراصوت با شدت زیاد برای ترکیبات زیستی مخرب بوده و غشای سلول‌ها را تخریب کرده و مولکول‌های زیستی نظیر آنزیم‌ها و DNA را غیر فعال می‌سازد (۵). از طرف دیگر نشان داده شده است که فراصوت با شدت و انرژی کم، طیف وسیعی از اثرات زیستی غیر کشنده داشته که از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. یکی از گسترده ترین اثرات غیر مخرب فراصوت روی سلول‌های زنده، افزایش در نفوذپذیری غشا است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده‌های درون سلولی را توسط سلول‌ها افزایش می‌دهد. گزارش‌هایی مبنی بر تغییر در بیان ژن، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌های خاص توسط تابش امواج فراصوت به سلول‌ها وجود دارد (۶، ۷، ۸ و ۹). امواج فراصوت کاربردهای فراوانی در کشاورزی دارد و از

**ترکیبات فنلی:** پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی در ظرف جداگانه برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی خارج سلولی Folin-cicolteu معرف ۱/۲۵ میلی‌لیتر از معرف ۷ درصد به رقیق شده (۱/۱۰) و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به رسوب سلولی و ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد و مقدار کل ترکیبات فنلی با استفاده از استاندارد اسید سالیسیک تعیین شد.

**پروتئین:** مقدار پروتئین به روش برادفورد (۱۶) اندازه‌گیری گردید. برای تعیین غلظت پروتئین‌های سلول جلبک، ۱ میلی‌لیتر از کشت سلولی نمونه برداری شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب سلولی بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (pH= ۶/۸) اضافه شد. برای متلاشی شدن سلول‌های جلبک و تسهیل در خروج پروتئین‌های داخل سلول‌ها، سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار داده شد. پس از انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه شد. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) قرائت شد و در انتها با استفاده از نمودار استاندارد آلومین سرم گاوی غلظت پروتئین نمونه‌ها به دست آمد.

**فلاونوئید کل:** برای سنجش فلاونوئیدها ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی با سرعت ۶۰۰۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد. به سلول‌های باقی مانده به نسبت ۹۹ به ۱ اتانول و اسید کلریدریک اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خنک شدن، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان

**تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت:** برای به‌کارگیری امواج فراصوت در دامنه‌های کیلوهرتز پایین، از یک سیستم حمام اولتراسونیک (FALC Instruments, Italy) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و پهنای باند ۳۲۰ هرتز به صورت پیوسته مطابق روش Rezae و همکاران (۱۴) استفاده گردید. امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان  $W/cm^3$  ۵، در مدت زمان‌های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه در روز چهاردهم واكشت سلول‌ها به کشت‌های سلولی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اعمال شد. سطح آب در داخل حمام اولتراسونیک حدوداً یک سانتی‌متر بالاتر از سطح محیط کشت درون ارلن‌ها بود. کشت‌های سلولی به مدت دو هفته در انکوباتور در دمای  $25 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بر روی شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه تحت تابش نور فلورسنت با شدت ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند.

**اندازه‌گیری رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی رشد:** توسط سمپلر از هر نمونه جلبکی مقدار کمی برداشته شد و روی لام مخصوص شمارش (لام نئوبار) ریخته شد و زیر میکروسکوب با بزرگنمایی ۱۰ سلول‌ها شمارش شد. تعداد سلول‌های موجود در ۱۰ مربع از این لام شمارش شده و میانگین آن ثبت گردید. از آنجائی‌که سلول‌ها متحرک بودند سلول‌های موجود در نمونه قبلاً توسط بلور ید بی حرکت شدند.

**کلروفیل و کاروتنوئید کل:** مقدار کلروفیل a و b، کلروفیل کل (a+b) و کاروتنوئیدها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. بر روی رسوب سلولی باقی مانده ۵ میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد 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 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نور محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۴ و ۴۵۲ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. به کمک رابطه‌های زیر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد (۱۵).

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

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

$$C_{car} = 4.20 \times E_{452.5} - 0.0264 \times C_{chl.a} - 0.496 \times C_{chl.b}$$

سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌ها برداشته شده و به آن‌ها ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۲۵ درصد اضافه شد و سپس به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در طول موج های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر مقدار جذب توسط اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) اندازه‌گیری گردید و مقدار MDA به کمک ضریب خاموشی ۱۵۵ /mM/cm محاسبه گردید (۲۰).

**پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی:** دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب سلولی ۲ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. به نمونه‌ها ۰/۸ میلی‌لیتر DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) میلی‌مولار اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت و انجام واکنش میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی سلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانتی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{A_{517} - A_{\text{کنترل}} \times 100}{A_{\text{کنترل}}} \right]$$

**محلول بلانک:** ۰/۸ میلی‌لیتر اتانول + ۲ میلی‌لیتر از نمونه و محلول کنترل: ۰/۸ میلی‌لیتر DPPH + ۲ میلی‌لیتر اتانول. A: جذب نور

**بتا-کاروتن:** از سوسپانسیون سلولی هرکدام از نمونه‌های جلبک ۱ میلی‌لیتر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و به نسبت ۲ به ۱ هگزان و اتانول به رسوب باقی مانده اضافه شد. به مدت ۱ دقیقه نمونه‌ها با ورتکس شدیداً هم‌زده شدند و سپس مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه نمونه‌ها سانتریفیوژ گردید. با جدا کردن فاز رویی (هگزان) و خواندن جذب در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) میزان بتا-کاروتن سلول‌ها از طریق فرمول زیر به دست آمد.

$$\beta\text{-Carotene } (\mu\text{g/ml}) = 25.2 \times A_{450}$$

جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد و مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد آپسیژنین محاسبه شد (۱۷).

**قندهای محلول:** یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به سلول‌های جلبکی باقی مانده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز ترسیم گردید. جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۸).

**آنتوسیانین کل:** ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی نمونه‌ها برداشته شد و نمونه‌ها به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شدند و در انتها جذب آن‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین، از ضریب خاموشی Cm-1M-1 ۳۳۰۰۰ استفاده شد (۱۹).

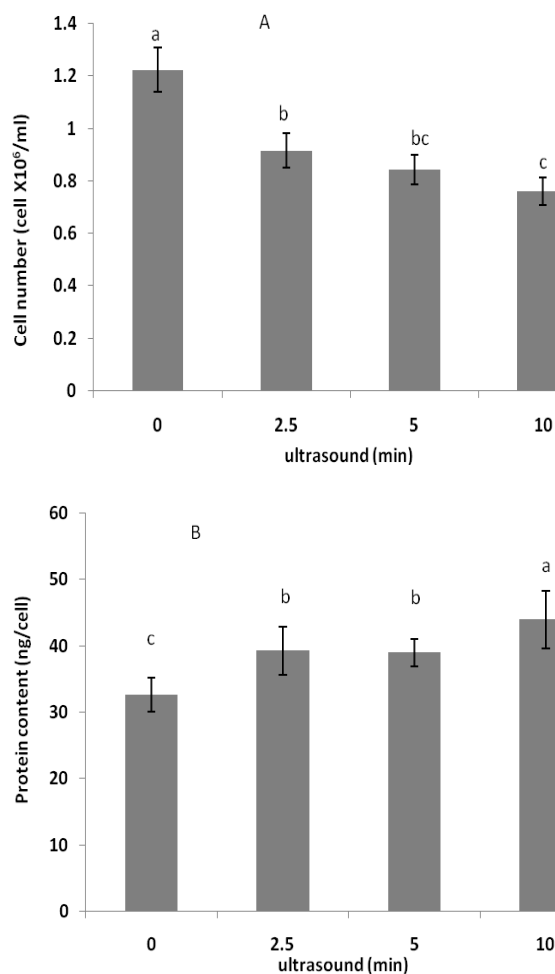
**تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی:** مقدار آسیب به غشاها با اندازه‌گیری مقدار مالونیل دی آلونید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تعیین شد. پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و به نمونه‌ها ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه شد. پس از هم‌زدن نمونه‌ها آن‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با قدرت ۱۰۰ و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm

## نتايج

## رشد سلولي و محتوي پروتئين

طبق نتايج به دست آمده ميزان رشد سلولها با افزايش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ده دقيقه نسبت به گروه شاهد تفاوت معني داري داشت، به طوري كه با افزايش زمان تابش تا زمان ده دقيقه از ميزان رشد سلولها كاسته شد و كمترين رشد سلولي در زمان ۱۰ دقيقه تابش امواج فراصوت مشاهده شد. در خصوص مقدار پروتئين محلول نيز با افزايش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۱۰ دقيقه، افزايش معني داري نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. به طوري كه بيشترين ميزان پروتئين محلول مربوط به تيمار ۱۰ دقيقه تابش امواج فراصوت بود (شكل ۱).

**گليسرول:** پنج ميلي ليتر از نمونه جلبكي به مدت ۵ دقيقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقيقه سانترifiوژ شد. مایع روبي پس از سانترifiوژ دور ريخته شد، به اين ترتيب گليسرولي كه از قبل درون نمونه بوده خارج گرديد. به سلولهاي باقي مانده به ميزان ۲ ميلي ليتر از محيط كشت جانسون اضافه شد. چند ثانيه نمونهها به آرامي تكان داده شد، سپس ميزان ۲۰۰ ميكروليتر نمونه جلبكي جدا و به آن ۱ ميلي ليتر پريودات و ۲/۵ ميلي ليتر استيل استن افزوده گرديد و به آرامي تكان داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقيقه در دماي ۴۵ درجه سانتي گراد قرار داده شدند. نمونهها مجدداً به مدت ۵ دقيقه با سرعت ۵۰۰۰ هزار دور در دقيقه سانترifiوژ شدند. پس از آن ميزان جذب نور مایع روبي در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپكتروفوتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد و به وسيله رسم منحنی استاندارد غلظت گليسرول محاسبه شد (۲۱).



شكل ۱: تغييرات ميزان رشد (A) و ميزان پروتئين (B) تحت اثر امواج فراصوت در كشت سلولي جلبكي *D. salina*. (مقادير نشان داده شده ميانه بين ۳ تکرار  $\pm SD$  (انحراف معيار) می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها در سطح  $P \leq 0.01$  است).

رنگیزه‌های فتوسنتزی

در تحقیق انجام شده افزایش زمان تابش امواج فراصوت باعث کاهش میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل و همچنین تا حدودی کاروتنوئیدها شده، به این صورت که میزان کاروتنوئیدها تا زمان پنج دقیقه تابش فراصوت کاهش داشت و با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۱۰ دقیقه میزان کاروتنوئید افزایش یافت (شکل ۲).

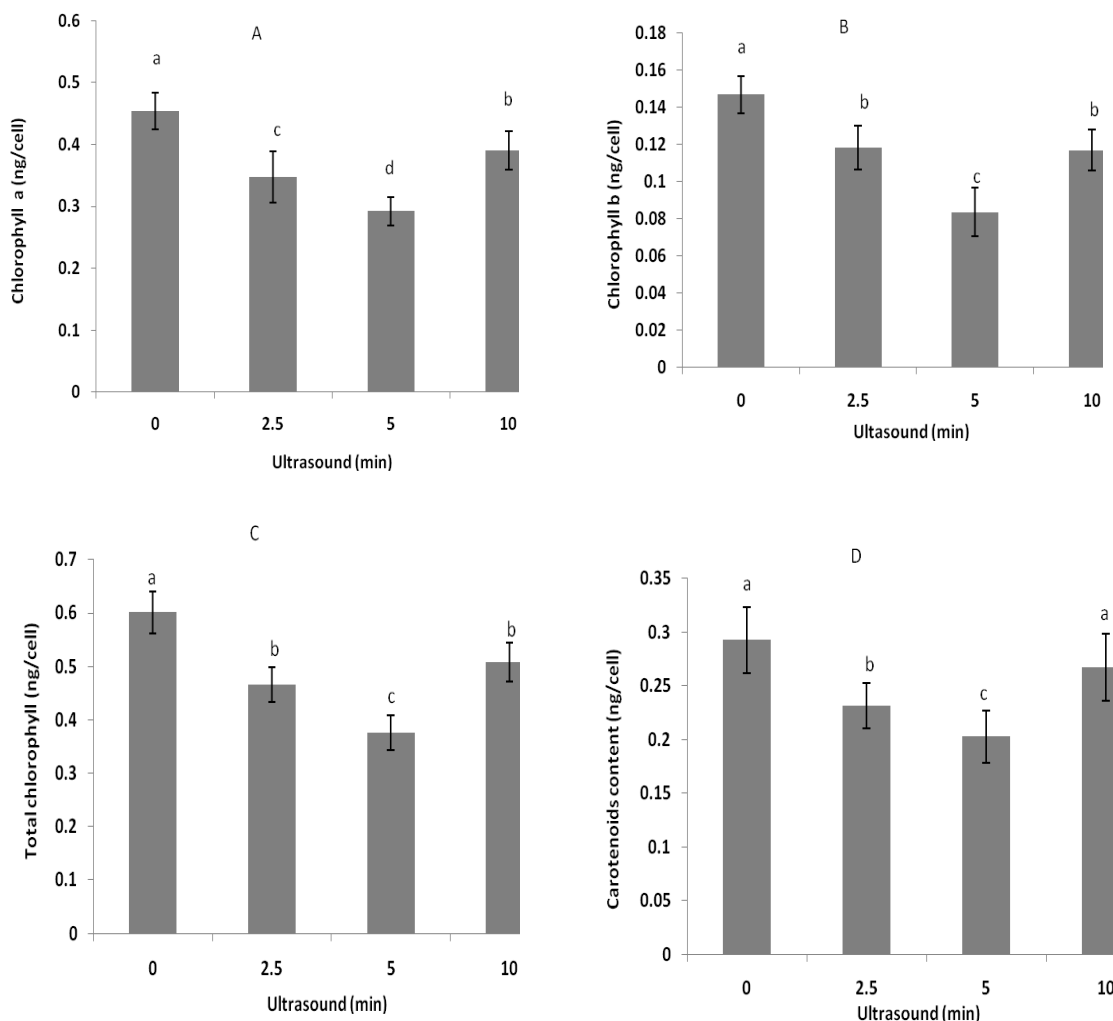
قندهای محلول و پراکسیداسیون لیپیدها

در این آزمایش با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۱۰ دقیقه مقدار قندهای محلول نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود و افزایش داشت (شکل ۳) در خصوص میزان پراکسیداسیون لیپیدها نیز با افزایش مدت زمان تابش امواج روند

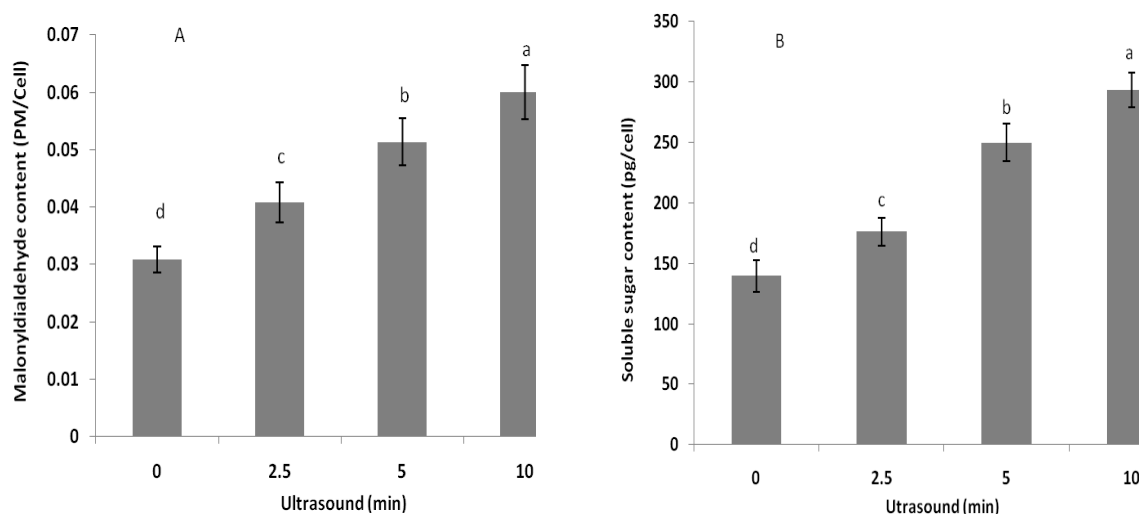
افزایشی مشاهده گردید و بیشترین آن در زمان ده دقیقه تابش اندازه‌گیری شد (شکل ۳).

تولید آنتوسیانین‌ها و پتانسیل آنتی‌اکسیدانسی

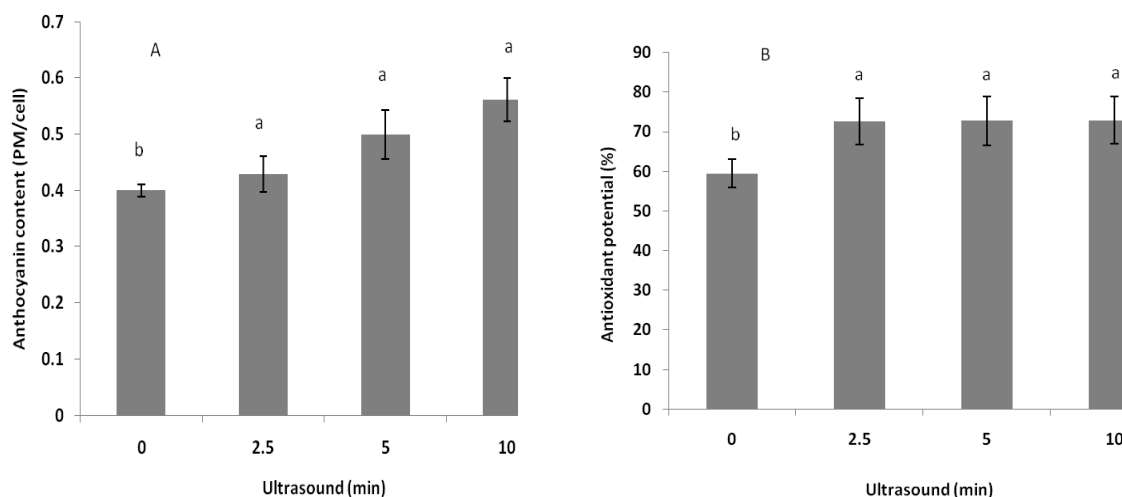
تیمار امواج فراصوت باعث القای تولید ترکیبات آنتوسیانینی در کشت‌های سلولی شد. به طوری که با گذشت زمان به تدریج بر میزان تولید آن‌ها به صورت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزوده شد. بیشترین مقدار این ترکیبات در زمان ده دقیقه تابش امواج فراصوت اندازه‌گیری شد. در تحقیق حاضر درصد پتانسیل آنتی-اکسیدانسی با افزایش زمان تابش امواج فراصوت به عنوان یک الیسیاتور و محرک سلول‌ها افزایش یافت. بیشترین پتانسیل آنتی-اکسیدانسی نیز در مدت زمان تابش ده دقیقه امواج مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۲: تغییر در میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئیدها (D) تحت اثر امواج فراصوت در کشت سلولی کشت سلولی جلبک *D. salina* (مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار  $\pm SD$  (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح  $P \leq 0.01$  است).



شکل ۳: تغییر در میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (A) و قندهای محلول (B) تحت اثر امواج فراصوت در کشت سلولی جلبک *D. salina* (مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD (انحراف معیار) می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها در سطح  $P \leq 0.01$  است).



شکل ۴: تغییر در میزان آنتوسیانینها (A) و پتانسیل آنتی اکسیدانی (B) تحت اثر امواج فراصوت در کشت سلولی جلبک *D. salina* (مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD (انحراف معیار) می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوتها در سطح  $P \leq 0.01$  است).

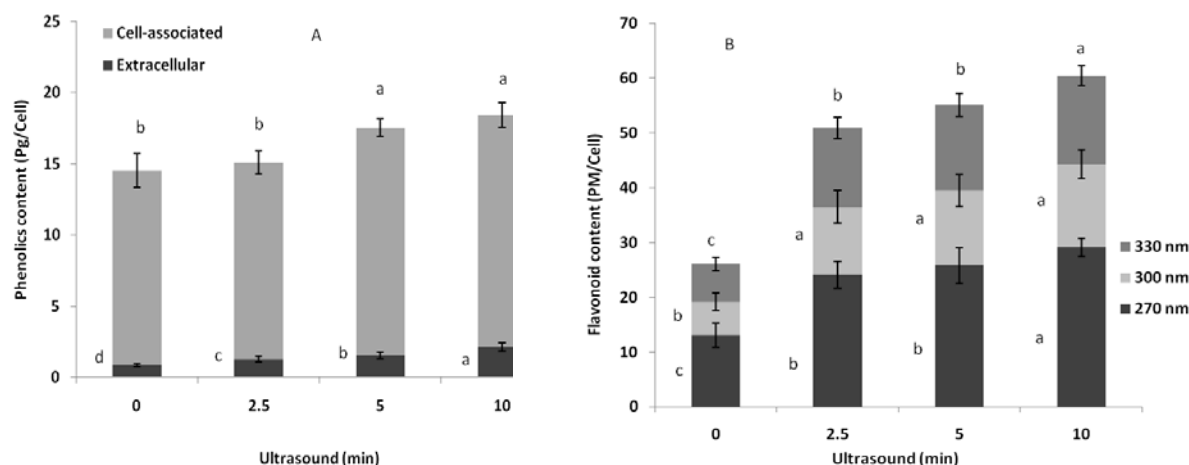
مقدار تولید این ترکیبات در زمان ده دقیقه تابش امواج بود (شکل ۵).

#### تولید گلیسرول و بتا-کاروتن

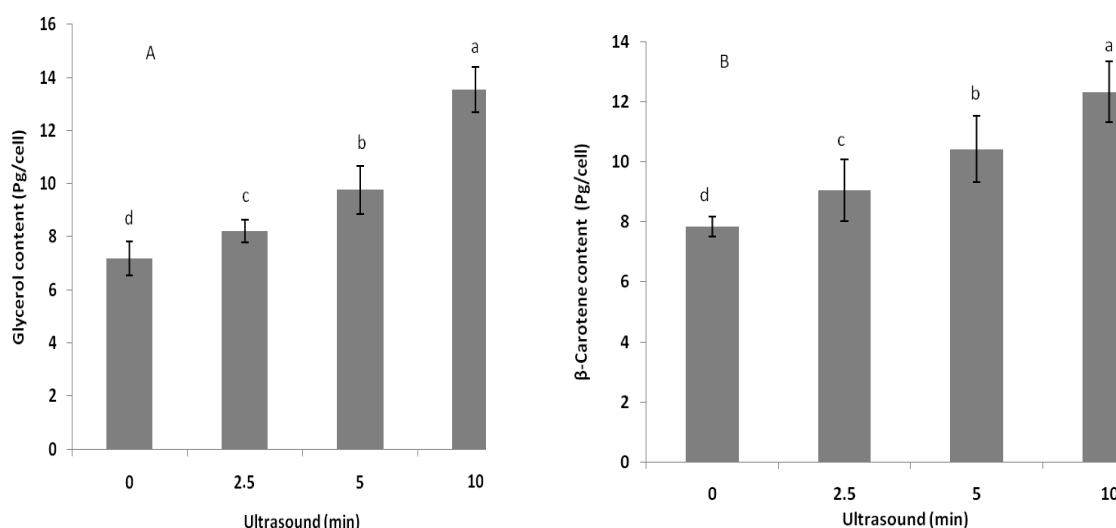
در این تحقیق مشاهده شد که با افزایش مدت زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ده دقیقه، میزان گلیسرول و بتا-کاروتن اندازه-گیری شده سلولهای جلبک نسبت به کشتهای شاهد افزایش معنی داری داشت که بیشترین مقادیر آنها به ترتیب ۱۲/۳ و ۱۳/۵ میلی گرم در لیتر بود که در مدت زمان تابش ده دقیقه اندازه گیری شد (شکل ۶).

#### تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

تیمار امواج فراصوت باعث القای تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشتهای سلولی گردید. به طوری که با گذشت زمان به تدریج بر میزان تولید آنها به صورت معنی دار نسبت به گروه شاهد افزوده شد. هر دو نوع ترکیبات فنلی با افزایش مدت زمان تابش امواج با یک روند صعودی و معنی دار نسبت به کنترل افزایش نشان دادند. البته بیشتر ترکیبات فنلی تولید شده از نوع درون سلولی بود. در خصوص فلاونوئیدها نیز در هر سه طول موج اندازه گیری شده، افزایش معنی دار نسبت به کشتهای کنترل در کلیه مدت زمانهای تابش مشاهده شد. بیشترین



شکل ۵: تغییر در میزان ترکیبات فنلی (A) و فلاونوئیدی (B) تحت اثر امواج فراصوت در کشت سلولی جلبک *D. salina* (مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD (انحراف معیار) می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح  $P \leq 0.01$  است).



شکل ۶: تغییر در میزان گلیسرول (A) و بتا کاروتن (B) تحت اثر امواج فراصوت در کشت سلولی جلبک *D. salina* (مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD (انحراف معیار) می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح  $P \leq 0.01$  است).

خصوص کشت‌های تعلیقی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیکی پر انرژی نظیر حفره‌زایی آکوستیک و جریان‌های میکروسکوپی می‌شود که باعث آسیب‌های مکانیکی و تنش برشی به سلول‌ها می‌شود (۲۳). بنابراین احتمال وجود تنش‌های مکانیکی در اثر امواج فراصوت وجود داشته که رشد سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نتایج نشان داد که با گذشت زمان و تحت اثر تیمار تا حدودی تولید پروتئین سلولی القا گردید. در خصوص اثرات بیوسنتزی امواج فراصوت در سلول گزارشاتی وجود دارد. مشاهده شده است که این امواج با شدت پائین، بیوسنتز پروتئین‌ها را در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های چغندر قند افزایش داد (۲۴).

## بحث

در ارتباط با اثر امواج فراصوت بر سلول گزارش شده است که افزایش مدت زمان تیمار امواج فراصوت با کاهش رشد و زنده مانی در سلول‌های گیاهی همراه بود (۲۲). Wang و همکاران (۳) نیز مشاهده نمودند که تابش امواج فراصوت به سلول‌های سرخدار (*Taxus yunnanensis*) منجر به کاهش محسوس درصد زنده بودن سلولی شد. از طرفی تابش کوتاه مدت فراصوت اثر معنی داری روی تولید دیتوده در کشت سلولی سرخدار (*Taxus chinensis*) نداشت (۲۳). به کارگیری فراصوت در



نهایی این اکسیداسیون نشان دهنده تخریب و افزایش نفوذپذیری غشای سلولها است (۳۰). آنزیم پراکسیداز به عنوان گیرنده و جمع کننده پراکسیدها عمل کرده و از اثرات مخرب این مولکولها می‌کاهد (۳۱ و ۳۲). گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش‌های دوگانه می‌باشند، این گونه‌ها علاوه بر آسیب به گیاه می‌توانند با القای مسیرهای سیگنال باعث فعال شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه شده و در نتیجه باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی شوند (۳۳). در تحقیقی که توسط Wu & Lin (۳۴) انجام شد تابش امواج فراصوت بر سلولها، باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در داخل و خارج سلولها و به دنبال آن افزایش مالون‌دی‌آلدهید شد. همچنین در جای دیگر افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و یک افزایش ۴۸/۶ درصدی در نشست الکترولیت‌ها در سلول‌های جلبک قرمز (*Cruentum porphyridium*)، پس از تابش امواج فراصوت مشاهده شد (۲۷). افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی به عنوان بخشی از پاسخ‌های دفاعی سلولها محسوب می‌شود که اثر امواج فراصوت بر تولید و افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی در تحقیقات گذشته نیز اثبات شده است (۳۳، ۳۵ و ۳۶).

ترکیبات فنلی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تاننها و آنتوسیانین و غیره می‌باشند. این مواد منافع قابل توجهی در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی دارند. همچنین سلولها با افزایش ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین در شرایط استرس، از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن می‌کاهد (۳۷). مطالعات ارتباط مثبتی بین مقدار ترکیبات آنتوسیانینی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی را نشان داده‌اند (۳۸). به طوری که در تحقیقات گذشته مشخص شده، بسیاری از ترکیبات فنلی به طور موثر رادیکال‌های گروه هیدروکسیل و پروکسیل را حذف کنند و از اکسید شدن چربی‌ها ممانعت به عمل آورند (۳۹). این ترکیبات آنتی‌اکسیدانت‌های نیرومندی تحت شرایط تنش می‌باشند و این خاصیت به دلیل ساختار اسکلتی و گروه فنل این متابولیت‌ها می‌باشد. گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به وسیله جاروبگری رادیکالها و سایر مکانیسم‌ها مانند فروکشی اکسیژن یکتایی از آسیب اکسیداتیو، سلولها را حفظ کرده و همچنین با جلوگیری از عمل لیپواکسیژناز از اکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کنند. سلول با استفاده از مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌تواند غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد و از این طریق از اثرات مخرب آن بکاهد. القای تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

همچنین امواج فراصوت به عنوان یک الیسیاتور باعث تحریک ژن‌ها شده و به دنبال آن منجر به افزایش پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیگنال‌دهی و تولید متابولیت‌های ثانوی شده، به صورتی که با تابش امواج فراصوت بر سلول‌های بنیادی گل داوودی محتوای RNA افزایش یافت و در پی آن محتوای پروتئین محلول نیز افزایش یافت و بین میزان RNA و پروتئین ضریب هم‌بستگی ۹۸ درصد وجود داشت (۲۶، ۲۵، ۳ و ۲۷).

به علت وجود تنش‌های مکانیکی در اثر امواج فراصوت ساختمان مولکولی کلروپلاست‌ها نیز ممکن است تخریب شود، و همین عامل می‌تواند دلیل خوبی برای کاهش میزان کلروفیل باشد. همچنین کاروتنوئیدها به عنوان یکی از رنگیزه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانتی (۲۷) گروه بزرگی از مولکول‌های ایروپروئیدی هستند که توسط اندام‌های فتوسنتزی ساخته می‌شوند (۲۸) اما آن‌ها به تخریب اکسیداتیو بسیار حساس هستند، به طوری که در این آزمایش با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۵ دقیقه از میزان ترکیبات کاروتنوئید به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاسته شد. اما در زمان تابش ۱۰ دقیقه امواج فراصوت مجدداً میزان کاروتنوئید افزایش یافت و بدون داشتن تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد هر دو گروه به یک میزان و دارای بیشترین مقدار بودند (شکل ۳) که این واقعه را می‌توان این گونه توجیه کرد که تابش امواج فراصوت در زمان بیشتر به عنوان یک تنش اکسیداتیو برای سلول به شمار می‌رود و سلول با افزایش میزان کاروتنوئید درون سلولی خود به عنوان آنتی‌اکسیدانت به مقابله با تنش می‌پردازد. برطبق نتایج به دست آمده توسط Chen و همکاران (۲۵) تابش امواج فراصوت بر سلول‌های جلبک *Porphyridium ceruentum* باعث افزایش ۲۷ درصد در میزان کاروتنوئید سلولها شد (۲۵).

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش زمان تابش امواج فراصوت، میزان مالون‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری شده در سلول‌های جلبک *D. salina* افزایش یافت (شکل ۴). امواج فراصوت با انرژی کم در کشت سلولی تعلیقی سرخدار چینی (*T. chinensis*) باعث القای پراکسیداسیون لیپید گردید (۲۹) و همچنین در تحقیقات Rezae و همکاران (۱۴) مشخص شد که امواج فراصوت به همراه متیل جاسمونات باعث افزایش در تولید مالون‌دی‌آلدهید در سلول‌های فندق شد. ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در استرس‌های مختلف می‌تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا شده که افزایش مالون‌دی‌آلدهید به عنوان محصول

ثانوی، باعث افزایش مقدار بتا-کاروتن و گلیسرول در سلول‌ها گردید. با توجه به اینکه امکان به‌کارگیری این تکنیک در دست-ورزی‌های بیوتکنولوژیک تولید ترکیبات سلولی بسیار راحت و ارزان است، استفاده از آن می‌تواند کمک شایانی به بالا بردن تولید ترکیبات مهم نماید که یکی از موانع مهم در مسیر تجاری سازی تولید متابولیت‌ها است.

### منابع

1. Dornenburg H, Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Tech*. 1995; 17(8): 674-684.
2. Wu J, Lin L. Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. *Biotechnol Prog*. 2002; 18: 862-866.
3. Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*. 2006; 15(4): 351-358.
4. Safari M, Ghanati F, Hajnoruzi A, Rezaei A, et al. Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. *Biotechnol Lett*. 2012; 34(6): 1137-41.
5. Frizzell L.A. Biological effects of acoustic cavitation. In Suslick, KS, (eds). *Ultrasound, its chemical, physical and biological effects*. VCH publishers, Inc. Germany; 1988; 287-303.
6. Unger C, Thomas P, McCreery R, Sweitzer H. Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Invest Radio*. 1997; 32: 723-727.
7. Barton S, Bullock C, Weir D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance, *Enzyme Microb Technol*. 1996; 18: 190-194.
8. Schmidt P, Rosenfeld E, Millner R, Schellenberger A. Effects of ultrasound on the catalytic activity of matrix-bound glucoamylase. *Ultrasonics*. 1987; 25: 295-299.
9. Crisosto C. Optimum procedures for ripening stone fruit. *Management of Ripening Fruit* (Univ. of California, Davis). *Postharvest Horticulture Series*. 1996; 9: 28-30.
10. Garcia F, Freile-pelegrin Y, Robledo D. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (*Chlorophyta*, *Volvocales*) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technol*. 2007; 98(7): 1359-1365.

با توجه به افزایش میزان پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدید در سلول‌ها جهت محافظت از اجزای سلولی، اسیدهای چرب غیر اشباع، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک که از اهداف مهم گونه‌های فعال اکسیژن بوده و پیشگیری از اختلالات متابولیکی و سلولی می‌باشد (۴۰). در خصوص اثرات امواج فراصوت بر ترکیبات فنلی در گذشته مطالعات اندکی صورت گرفته از جمله این که امواج فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در بادام زمینی شد (۴۱). Wu و همکاران (۳۴) نیز نشان دادند که فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در کشت سلولی جینسینگ شد. همچنین Rezaei و همکاران (۱۴) مشاهده کردند که در سلول‌های فندق قرار گرفته در معرض امواج فراصوت ترکیبات فنلی افزایش داشت.

در تحقیق حاضر با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ده دقیقه، میزان گلیسرول اندازه‌گیری شده سلول‌های جلبک افزایش یافت. در واقع امواج فراصوت به‌عنوان الیسیتوری برای تحریک سلول‌ها جهت تولید گلیسرول بیشتر می‌باشد. امواج فراصوت باعث افزایش تولید گلیسرول در سلول‌های گیاهان روغنی شده که می‌تواند برای سوخت‌های زیستی کاربرد داشته باشد (۴۲) و همچنین روغن‌های گیاهی را افزایش می‌دهد (۴۳). در این تحقیق مشاهده شد که با افزایش زمان تابش امواج فراصوت میزان بتا-کاروتن سلول‌ها نیز افزایش یافت. افزایش فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی از جمله بتا-کاروتن به‌عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله‌کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال در شرایط استرس گزارش شده است (۴۴). هماهنگ با یافته‌های این تحقیق، افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در سلول‌های گیاهی توسط امواج فراصوت با انرژی کم، گزارش شده (۲، ۴ و ۱۴) و مشخص شده است که این افزایش در بیوسنتز متابولیت ثانوی صرفاً ناشی از اثرات فیزیکی و مکانیکی نبوده بلکه بیشتر ناشی از القای فعالیت فیزیولوژیک سلول‌ها توسط امواج فراصوت می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشاهده شد که به‌کارگیری امواج فراصوت، باعث القای متابولیت ثانوی از جمله ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، بتا-کاروتن و گلیسرول و همچنین افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی شد. همچنین به‌نظر می‌رسد امواج فراصوت با تحریک سلول‌ها و القای پاسخ‌های دفاعی و متابولیت

11. Hosseini Tafreshi A, Shariati M. Dunaliella biotechnology: methods and applications. J Appl Microbiol. 2009; 107(1): 14-35.
12. Gomez PI, Barriga A, Cifuentes AS, Gonzalez MA. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* accumulated (strain ONC-007) and *Dunaliella bardawil* (ATCC30861) chlorophyta. Biol Res . 2003; 36(2): 185-192.
13. Poppel GV, Goldbohm RA. Epidemiologic evidence for beta-caroten and cancer prevention. Am J Clin Nutr. 1995; 62: 1393-1402.
14. Rezaei A, Ghanati F, Behmanesh M. Ultrasound potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. Ultrasound Med Biol. 2011; 37(11): 1938-1947.
15. Frank G, Wegmann K. Physiology and biochemistry of glycerol biosynthesis In *Dunaliella*. Biol Zbl. 1979; 93: 707-723.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.
17. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem. 2006; 97: 654-660.
18. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers FA, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28: 350-356.
19. Masukasu H, Karin O, Kyoto H. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. Plant Sci. 2003; 164(2): 259 - 265.
20. De Vos CHR, Schat H, De Waal MAD, Vooijs R, et al. Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. Physiol Plant. 1991; 82: 523-528.
21. Hadi MR, Shariati M, Afsharzadeh S. Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran. Biotechnol Bioproc Eng. 2008; 13(5): 540-544.
22. Liu YY, Yoshikoshi A, Wang BC, Sakanishi A. Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. Colloid Surf B: Biointerf. 2003; 27(4): 287-293.
23. Wu J, Lin L. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. Appl Microb Biotechnol. 2003; 62: 151-155.
24. Joersbo M, Brunstedt J. Sonication: a new method for gene transfer to plants. Physiol Plant. 1992; 85: 230-234.
25. Chen B, Huang J, Wang J, Huang L. Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. Colloid Surf B: Biointerf. 2008; 16(1): 88-92.
26. Liu YY, Wang BC, Zhao HC. Alternative stress effects on the Ca<sup>2+</sup> distribution in the *Chrysanthemum callus* cells. Colloids Surf B: Biointerf. 2001; 22(3): 245-249.
27. Wang XJ, Wang BC, Jia Y, Huo DQ, et al. Effect of sound stimulation on cell cycle of *chrysanthemum* (*Gerbera jamesonii*). Colloids Surf B: Biointerfaces. 2003; 29: 103-107.
28. Simkin AJ, Moreau H, Kuntz M, Pagny G, et al. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. J Plant Physiol. 2008; 165(10): 1087-1106.
29. Wu J, Ge X. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. Biotechnol Bioeng. 2004; 85(7): 714-721.
30. Wang SY. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. Plant Growth Regul. 1999; 18(3): 127-134.
31. Plazek A, Zur I. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Sci. 2003; 164(6): 1019-1028.
32. Zhou R, Li Y, Yan L, Xie J. Effect of edible coatings on enzymes, cell-membrane integrity, and cell-wall constituents in relation to brittleness and firmness of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua) during storage. Food Chem. 2011; 124: 569-575.
33. Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, et al. Duel action of the active oxygen species during plant stress responses, Cell Mo. Life Sci .2000; 57: 779-795.
34. Wu J, Lin L. Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. Biotechnol Prog. 2002; 18: 862-866.
35. Holková I, Bezáková L, Bilka F, Balazová A, et al. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. Plant Physiol Biochem. 2010; 48: 887-892.

36. Komaraiah P, Kishor PBK, Carlsson M, Magnusson KE, et al. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Sci.* 2005; 168: 1337–1344.
37. Plazek A, Zur I. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. *Plant Sci.* 2003; 164(6): 1019-1028.
38. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004; 74(17): 2157–2184.
39. Boscaiu M, Sanchez M, Bautista I, Donat P, et al. Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. *Bull UASVM Hort.* 2010; 67: 44-49.
40. Martinez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 1995; 77: 147–161.
41. Sales JM, Resurreccion AVA. Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chem.* 2010; 122: 795–803.
42. Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S, Noda H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.* 2008; 26(12): 668-673.
43. Siaty NG, Kimbaris AC, Pappas CS, Tarantilis PA, et al. Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy. *JAOCS.* 2006; 83: 53-57.
44. Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk J, Ostalowska A, et al. Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. *Toxicol Appl Pharm.* 2014; 1: 36-41.

## Increased Production of Beta-Carotene and Glycerol in *Dunaliella salina* Cell Culture by Ultrasound

Mokhberi R, M.Sc.<sup>1</sup>, Rezaei A, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Kordenaeej A, Ph.D.<sup>2</sup>

1. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Payame-Noor University, Teharn, Iran
2. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: [arezaei@shahed.ac.ir](mailto:arezaei@shahed.ac.ir)

Received: 3 Feb. 2015

Accepted: 19 May. 2015

---

### Abstract

**Aim:** The purpose of this study was to investigate the effect of ultrasound on growth and some physiological parameters in cultures of unicellular alga *Dunaliella salina*.

**Material and Methods:** Ultrasound waves were applied with a frequency of 40 kHz, and 5W/Cm<sup>3</sup> power, at the fourteenth day of subculture in a completely randomized design with 3 replications. Ultrasound exposure times to cells were 0, 2.5, 5 and 10 minutes. The parameters measured were: cell growth, total protein content, photosynthetic pigments, antioxidant potential, membrane lipid peroxidation, amount of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, soluble sugars, beta-carotene and glycerol.

**Results:** The results showed, due to increase of ultrasound irradiation time, cell growth and photosynthetic pigments were decreased. In contrast, total protein content, antioxidant potential, membrane lipid peroxidation, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, beta-carotene and glycerol were increased. Maximum amount of beta-carotene (12.3 mg/l) and glycerol (13.5 mg/l) as the main metabolites were obtained at 10 minutes treatment.

**Conclusion:** It seems that ultrasound waves increased beta-carotene, and glycerol production of the cell by induction of defensive responses and secondary metabolism.

**Keywords:** *Dunaliella salina*, Cell culture, Ultrasound, Beta-carotene, Glycerol