Archive of SID

مهندسی بیوسیستم ایران، دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص ۷۲۵-۷۲۱)

ذخیره بتاکاروتن در میکروجلبک خالص دونالیلا سالینا و مختلط دریای خزر تحت قحطی نیتروژن

آزیتا قربانی[۱]، مریم حسینی[۲]، سیروس ابراهیمی[۳]*

۱.کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران[۱]

۲. استادیار، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران[۲]

۳. دانشیار، دانشکده مهندسی شیمی، مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران[۳]

(تاریخ دریافت: ۲۳/ ۱/ ۱۳۹۵ – تاریخ تصویب: ۱۷/ ۸/ ۱۳۹۵)

چکیده

بتاکاروتن جزء کاروتنوئیدها و از معروف‌ترین رنگدانه‌های طبیعی شناخته‌شده می‌باشد. از مهمترین منابع تولید بتاکاروتن میکروجلبک‌ها می‌باشند. به دلیل هزینه‌های بالای استریلیزاسیون کشت‌خالص، دراین مطالعه نحوه رشد، میزان کلروفیل تولید شده و نحوه تجمع بتاکاروتن در نمونه کشت‌مختلط دریاچه‌خزر برای اولین بار تحت استرس کمبود مواد مغذی بررسی و با نمونه خالص میکروجلبک دونالیلاسالینا در همان شرایط مقایسه گردید. در این مطالعه، غلظت بتاکاروتن در میکروجلبک دونالیلاسالینا و میکروجلبک دریاچه‌خزر در ابتدا و پس از اعمال استرس قحطی نیتروژن (پس از ۱۸۸ ساعت)، به ترتیب از ۷/۵ به ۱۴/۸ و از ۷/۰ به ۱۳/۵ mol Beta-Carotene/g Protein رسید. با اعمال استرس مقدار پروتئین در میکروجلبک دونالیلاسالینا از مقدار اولیه ۳۴۱/۸ به مقدار نهایی ۹۵۰/۱ mg/L و در میکروجلبک دریاچه‌خزر از مقدار اولیه ۳۵۷/۱ به مقدار نهایی ۱۰۱۰/۰ mg/L رسید. شرایط عملیاتی هر دو نمونه یکسان با pH=۷/۵ و دور همزدگی ۱۶۰ rpm و بازه دمایی ۲۶–۲۴ درجه سانتی‌گراد بود. این پژوهش نشانگر نتایج مشابه مقدار بتاکاروتن تجمع یافته در کشت مختلط میکروجلبک دریاچه‌خزر و کشت خالص میکروجلبک دونالیلا می‌باشد. از آن‌جایی که کشت مختلط میکروجلبک نسبت به کشت خالص اقتصادی‌تر بوده و نیاز به تجهیزات گران‌قیمت و استریلیزاسیون ندارد، لذا امکان صنعتی‌شدن تولید بتاکاروتن توسط کشت مختلط دریاچه‌خزر بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: میکروجلبک دونالیلا سالینا، میکروجلبک دریاچه خزر، بتاکاروتن، استرس قحطی نیتروژن

مقدمه

کاروتنوئیدها دسته‌ای از رنگدانه‌ها هستند که نقش بسیار مهمی در جذب نور گیاهان دارند. از کاروتنوئیدهای مهم می‌توان به بتاکاروتن، آلفاکاروتن، لیکوپن وگزانتوفیل اشاره کرد. بتاکاروتن به دلیل کاربردهای فراوان به صورت صنعتی، در بعضی کشورها در حال تولید می‌باشد. از دلایل تولید بتاکاروتن استفاده از آنها تحت عنوان رنگدانه‌های غذایی، مکمل‌های تغذیه‌ای در صنایع غذایی برای سلامتی انسان و همچنین برای تهیه لوازم آرایشی می‌توان اشاره کرد. بتاکاروتن به عنوان آنتی اکسیدان نیز کاربرد داشته، نقش پیش‌ساز ویتامین A را ایفا کرده و در بدن تبدیل به ویتامین A می‌شود.

استفاده از میکروجلبک‌ها در تولید بتاکاروتن در مقایسه با تولید آن از گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها به دلیل گستردگی کشت، نیازهای تغذیه‌ای کمتر، راندمان بیشتر، کارایی بهتر محصول و امکان کشت در تمام طول سال از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Brányiková *et al*. 2011, Chisti, 2007, Mooij, *et al*. 2013, Mulders, *et al*. 2014). در میان میکروجلبک‌ها، میکروجلبک دونالیلا (Dunaliella) که به عنوان منبع تجاری جهت تولید کاروتنوئیدها شناخته شده است، در استرس‌های مختلف توانایی تجمع بتاکاروتن تا بیش از ۱۰٪ وزن خشک خود را دارد (Ben-Amotz, 1993، Del Campo, *et al*. 2000). اما کشت خالص دونالیلا باید در محیط استریل صورت گیرد. استفاده از کشت خالص منجر به هزینه‌های استریلیزاسیون نگهداری و فرآیند کشت، تجهیزات گران قیمت و مصرف بالای انرژی می‌شود. بنابراین استفاده از کشت مختلط می‌تواند باعث کاهش هزینه‌های تولید به طور قابل توجهی شود. با استفاده از کشت‌های مختلط، از آن جایی که نیازی به استریل کردن محیط کشت نمی‌باشد، کنترل و عملیات فرآیند آسان‌تر و بنابراین در مقیاس صنعتی از نقطه نظر مهندسی مطلوب‌تر است. طبق پژوهشی که توسط Loosdrecht & salehizaedh

* نویسنده مسئول : sirous.ebrahimi@epfl.ch

www.SID.ir

Archive of SID

(2004) جهت تولید مواد درون سلولی از زیست توده انجام گرفت، هزینه استفاده از کشت مختلط، تقریبا نصف هزینه تمام شده جهت کشت خالص زیست توده می‌باشد (Salehizadeh and Van Loosdrecht 2004).

جهت تولید بتاکاروتن از میکروجلبک‌ها می‌توان از سیستم‌های کشت باز و بسته استفاده کرد. جهت بررسی پارامترهای مختلف، استفاده از سیستم‌های کشت بسته یعنی فتوبیوراکتورها مناسب‌تر می‌باشد، چرا که شرایط تحت نظارت و کنترل می‌باشد. از عوامل مؤثر در رشد میکروجلبک‌ها می‌توان به شدت نور، دمای رشد، شدت همزدگی، نوع و میزان مواد مغذی اشاره کرد. هرکدام از این عوامل می‌توانند تأثیر منفی یا مثبتی نیز بر تجمع بتاکاروتن در میکروجلبک داشته باشند. اگر هر کدام از این پارامترها به صورت جداگانه بررسی گردند، به عنوان یک استرس تلقی شده و می‌توان تأثیر آن‌ها را تحلیل کرد (Markou and Nerantzis, 2013).

دانشمندان بسیاری تولید بتاکاروتن در کشت خالص میکروجلبک تحت استرس قحطی نیتروژن و همزمانی استرس‌ها را بررسی نموده‌اند (Celekli and Dönmez, 2006، Lamers, *et al*. 2012; Garibay-Hernández, *et al*. 2013)، اما تاکنون کشت مختلط میکروجلبک جهت تولید رنگدانه‌ها مطالعه نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه مقایسه میزان بتاکاروتن تجمع یافته در گونه میکروجلبک دریاچه خزر به صورت مختلط و کشت خالص میکروجلبک دونالیلا سالینا به عنوان بهترین منبع میکروجلبک جهت تولید بتاکاروتن، تحت استرس قحطی نیتروژن می‌باشد.

(بخش تجربی) مواد و روش‌ها

میکروجلبک و محیط کشت

جهت کشت خالص، میکروجلبک دونالیلا سالینا ۱۹/۱۸ از پژوهشکده بیوتکنولوژی شمالغرب کشور خریداری شد. جهت کشت نمونه مختلط، نمونه‌های آب حاوی میکروجلبک از دریاچه خزر تهیه گردید. گونه‌های میکروجلبک در محیط کشت مایع با pH = ۷ کشت داده شدند. محیط کشت استفاده شده، جانسون اصلاح شده بود (Johnson *et al*. 1968) و روزانه ۵ میلی‌مولار منبع کربن اضافه می‌شد. محیط کشت به ازای هر لیتر حاوی مواد زیر بود:

$MgCl_2.6H_2O$, 1.5 g; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 g; KCI, 0.2 g; $CaCI_2.6H_2O$, 0.26 g; $NaNO_3$, 0.41 g; $NaHCO_3$, 1.2 g; (pH adjusted to 7.5 with HCl); KH_2PO_4, 0.035 g; H_3BO_3, 0.0006 g

و ۲ سی سی محلول ریزمغذی (Vishniac and Santer, 1957) به ازای هر لیتر محیط کشت افزوده می شد، که شامل مواد زیر در یک لیتر بود:

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

کشت در ارلن‌هایی (با ظرفیت ۵۰۰ سی سی) و به حجم ۳۰۰ سی سی انجام شد. دور همزن در طول آزمایش بر روی ۱۶۰ rpm تنظیم شده بود. میزان غلظت نمک NaCl در تمامی مدت ثابت و برابر با ۰/۵ M و نوردهی از قسمت پایین (Hejazi, *et al*. 2004) و با شدت ۵۰۰ µmol photons m^{-2} s^{-1} توسط لامپ‌های فلوئورسنت انجام می‌شد. در استرس محدودیت نیتروژن، مقدار نیتروژن در خوراک از ۰/۸۳ به ۰/۴۱ گرم در لیتر کاهش داده شد. بنابراین در ابتدا نیتروژن در محیط کشت موجود بود که پس از ۱۸۸ ساعت نگهداری و افزایش غلظت توده زیستی به میزان مورد نظر، به اتمام رسید و آزمایش وارد مرحله استرس (محدودیت نیتروژن) شد. دمای آزمایش ۲۶ – ۲۴ درجه سانتی‌گراد بود.

آنالیز رنگدانه‌ها

جهت اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌ها تمامی مراحل آنالیز در دمای اتاق و در تاریکی انجام می‌گیرد. ابتدا ۲ سی سی از نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتیریفیوژ (Hettich-EBA20, Germany) و محلول رویی جدا شده، و به میکروجلبک باقی مانده، ۲ سی سی استن ۸۰ درصد اضافه و ورتکس گردید. سپس مجددا به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سرانجام میزان جذب در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰، ۴۷۰، ۴۸۰، ۵۴۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر خوانده و جهت محاسبه غلظت رنگدانه‌ها در روابط زیر قرار گرفت (Hartmut 1983، Eijckelhoff and Dekker, 1997).

آنالیز بتاکاروتن:

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

آنالیز کلروفیل a :

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

آنالیز کل کاروتنوئیدها:

$$C_1 = 12.21\ A_{663} - 2.81\ A_{646}$$

$$C_2 = 20.13\ A_{646} - 5.03\ A_{663}$$

$$C_{x+c} = (1000\ A_{470} - 3.27\ C_1 - 104\ C_2)/229$$

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

اندازه‌گیری توده زیستی

جهت اندازه گیری توده زیستی، میزان رشد با شمارش تعداد سلول‌ها، توسط لام شمارش نئوبار با میکروسکوپ نوری (Leica,

www.SID.ir

Archive of SID

American) به صورت روزانه انجام گرفت، که این امر موجب شد خطای اندازه‌گیری طول فاز تاخیر بیشتر از یک روز نباشد. همچنین دانسیته نوری[1] (OD) محیط کشت نیز جهت بررسی رشد سلولی به طور روزانه با اندازه‌گیری طیف جذبی نور مرئی توسط اسپکتروفتومتر (Pharo 300, Merck, Germany) در طول موج ۶۸۰ نانومتر انجام گرفت (Borowitzka *et al*. 1990; Hejazi, *et al*. 2004, Garbayo, *et al*. 2008).

اندازه‌گیری پروتئین و نیتروژن

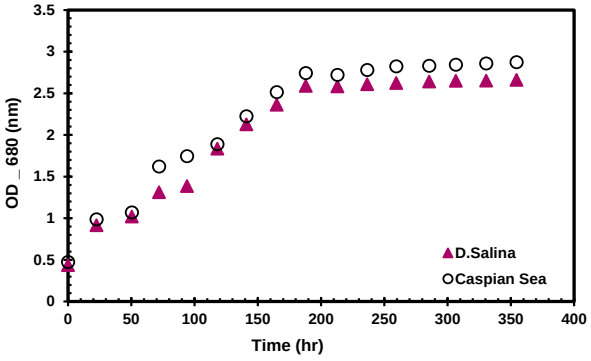
مقدار پروتئین نسبت مستقیمی با مقدار زیست توده دارد و ۵۵ – ۳۰ درصد وزن خشک میکروجلبک را پروتئین تشکیل می‌دهد (López *et al*. 2010). لذا با اندازه گیری مقدار پروتئین می‌توان تغییرات زیست توده را بررسی نمود. برای سنجش میزان پروتئین زیست توده ابتدا ۰/۱ سی سی نمونه میکروجلبک را در آب جوش قرار داده و سپس از روش لوری[2] استفاده شد (Harvey *et al*. 2006; Waterborg, 2009). برای اندازه گیری نیتروژن از روش اصلاح شده Cataldo استفاده شده است (Cataldo *et al*. 1975). در این روش ابتدا سرباره نمونه سانتریفیوژ شده توسط فیلتر با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر صاف می‌شود. سپس ۰/۲۵ میلی‌لیتر از سرباره صاف شده درون لوله آزمایش قرار داده شده و ۰/۸ میلی‌لیتر از محلول ٪۵ (w/v) اسیدسولفوریک غلیظ + سالیسیلیک-اسید به لوله آن اضافه می‌شود. محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود. سپس به محلول، ۷/۶ میلی‌لیتر محلول سود ۵ مولار اضافه می‌شود. و چون واکنش گرمازاست، لذا اجازه داده می‌شود محلول تا رسیدن به دمای اتاق سرد شود. در نهایت میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شده و میزان نیتروژن موجود توسط منحنی استاندارد اندازه گیری می‌شود. نیتراته کردن سالیسیک‌اسید در محیط اسیدی (حاوی سولفوریک اسید غلیظ) تولید کمپلکس آجری رنگ می‌نماید.

نتیجه‌ها و بحث

بررسی تاثیر استرس قحطی نیتروژن

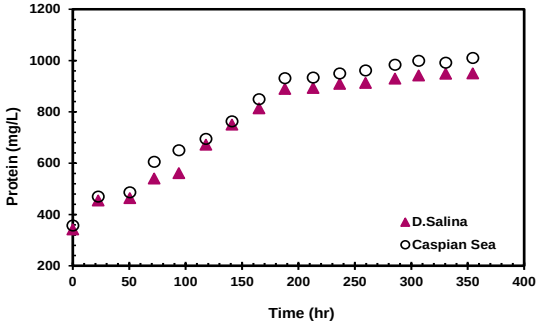
همان‌طور که پیش‌تر ذکر گردید، استرس قحطی نیتروژن از استرس‌های مهم جهت افزایش میزان بتاکاروتن ذخیره شده در میکروجلبک می‌باشد. در پژوهش حاضر جهت اعمال این استرس میزان نیتروژن موجود در خوراک کاهش یافت که این مقدار نیز پس از ۱۸۸ ساعت به اتمام رسید. در تمامی طول دوره شرایط عملیاتی برای هر دو گونه یکسان و ثابت بود. این آزمایش سه بار تکرار و نتایج نمایانگر تکرار پذیری آزمایش‌ها می‌باشد.

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، گونه خالص میکروجلبک دونالیلا سالینا و گونه مختلط دریاچه خزر با مایه تلقیح اولیه یکسان کشت داده شده و شروع به رشد نمودند. رشد هر دو گونه با شیب یکسانی ادامه یافت و پس از ۱۸۸ ساعت، همزمان با اتمام مقدار نیتروژن متوقف گردید. مقدار زیست توده نمونه دریاچه خزر در هر دو مرحله دارای رفتاری مشابه با مقدار زیست توده نمونه خالص دونالیلا سالینا بود.



شکل ۱. میزان جذب دانسیته نوری بر حسب زمان، تاثیر استرس قحطی نیتروژن بر رشد سلولی نمونه‌های مختلط و خالص.

در این استرس نیز میزان پروتئین جهت اطمینان از میزان رشد اندازه گیری شد. مطابق شکل ۲ این نمودار نیز نمایان‌گر مراحل رشدی مشابه با نمودار دانسیته جذب میکروجلبک بود. بدین نحو که قبل از اتمام میزان نیتروژن، پروتئین در میکروجلبک ذخیره گشت، اما پس از شروع دوره قحطی میزان پروتئین ثابت باقی مانده و افزایشی در تجمع آن مشاهده نشد. میزان پروتئین موجود در میکروجلبک دونالیلا سالینا و دریاچه خزر مشابه بودند.



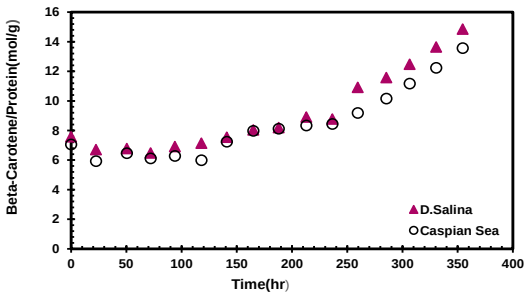
شکل ۲. تاثیر استرس قحطی نیتروژن بر میزان تجمع پروتئین در گونه‌های مختلط و خالص.

1 .Optical Density
2. Lowry Protein Assay

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳ میزان بتاکاروتن تجمع یافته به ازای پروتئین را در گونه‌های خالص دونالیلا سالینا و نمونه مختلط دریاچه خزر نمایش می‌دهد. در مرحله اول رشد و قبل از اعمال استرس، میزان بتاکاروتن تقریبا ثابت بوده و پس از اعمال استرس میزان بتاکاروتن سلولی افزایش می‌یابد. میزان بتاکاروتن در اولین روز اعمال استرس در کشت‌های خالص و مختلط میکروجلبک به ترتیب برابر با ۷/۵ و ۷/۰ mol Beta-Carotene/g Protein بود. پس از اتمام دوره استرس، بتاکاروتن تجمع یافته در میکروجلبک دونالیلا سالینا به ۱۴/۸ و در نمونه دریاچه خزر به ۱۳/۵ mol Beta-Carotene/g Protein رسید. روند تغییرات در هر دو نمونه کشت خالص دونالیلا سالینا و کشت مختلط خزر مشابه بوده و افزایش ۹۷ و ۹۳ درصدی در بتاکاروتن تجمع یافته در کشت خالص و مختلط را به ترتیب نشان می‌دهد.



شکل ۳ تاثیر استرس قحطی نیتروژن بر میزان تجمع بتاکاروتن در گونه‌های مختلط و خالص.

اعمال استرس نیتروژن نیز بعد از رسیدن به رشد کافی توده زیستی می‌باشد. با قحطی نیتروژن سرعت تقسیم سلولی کاهش یافته و حجم سلول‌ها و چگالی آن‌ها افزایش می‌یابد. همچنین با قطع نیتروژن میزان تجمع بتاکاروتن نیز بیشتر می‌گردد (Lamers *et al*. 2012). در استرس قحطی نیتروژن که توسط Lamers et al. (2012) بر روی میکروجلبک دونالیلا سالینا مورد بررسی قرار گرفته است، با قحطی نیتروژن، میزان بتاکاروتن از ۱/۲۸ mg LCV^{-1} به حداکثر مقدار ۱۴ mg LCV^{-1} رسیده است (Lamers *et al*. 2012). این گزارش براساس واحد جرم میکروجلبک در لیتر محیط کشت می‌باشد لیکن در این گزارش مبنا مول بتاکاروتن در واحد جرم پروتئین می‌باشد.

با وجود گزارشات فراوان مبنی بر تجمع مواد ذخیره‌ای در کشت‌های خالص (Garibay-Celekli and Dönmez 2006, Hernández, *et al*. 2013)، کشت مختلط میکروجلبک بسیار محدود بررسی شده است. به عنوان مثال، تولید نشاسته در میکروجلبک مختلط آب‌های طبیعی توسط hassanpour (2015) و Mooij (2013) بررسی و با اعمال شرایط خاص مقدار نشاسته ذخیره شده در میکروجلبک افزایش یافت (Mooij *et al*. 2001; Hassanpour *et al*. 2015). در این پژوهش نیز برای اولین بار محیط کشت مختلط برای تولید بتاکاروتن مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان دهنده ظرفیت ذخیره‌ای بالای بتاکاروتن در میکروجلبک دریاچه خزر و استفاده از آن به عنوان جایگزینی مناسب برای کشت خالص، با هزینه های عملیاتی بسیار کمتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مزایای استفاده از کشت های مختلط، در این تحقیق پتانسیل میزان تجمع بتاکاروتن در میکروجلبک مختلط دریاچه خزر تحت شرایط رشد معمولی و استرس بررسی و با کشت خالص دونالیلا سالینا مقایسه گردید. نتایج به دست آمده رشد و قابلیت تجمع بتاکاروتن در هر دو گونه و افزایش قابل توجه تجمع بتاکاروتن را با اعمال استرس قحطی نیتروژن نشان می‌دهد. بنابراین نتایج این پژوهش، کشت مختلط میکروجلبک دریاچه خزر را به عنوان منبع و جایگزین مناسبی جهت تولید بتاکاروتن معرفی می‌نماید که باعث کاهش هزینه‌ها و مقرون به صرفه‌تر شدن فرآیند صنعتی شدن تولید بتاکاروتن از جلبک‌ها می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران، در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه سهند جهت کمک‌های ارزشمندشان طی این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست نمادها

ردیف	علامت اختصاری	توضیحات	بعد
۱	OD	چگالی نوری	–
۳	rpm	سرعت همزدگی	rounds per minute
۴	ND*	کمبود نیتروژن	

* Nitrogen Deficiency

REFERENSES

Ben-Amotz, A. (1993). Production of β-carotene and vitamins by the halotolerant alga Dunaliella. *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, Springer: 411-417.

Borowitzka, M. A., L. J. Borowitzka and D. Kessly (1990). Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga Dunaliella salina. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 111-119.

Brányiková, I., B. Maršálková, J. Doucha, T. Brányik, K. Bišová, V. Zachleder and M. Vítová (2011). Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and bioengineering*, 108(4), 766-776.

www.SID.ir

Archive of SID

Cataldo, D., M. Maroon, L. Schrader and V. Youngs (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science & Plant Analysis*, (1)6, 71-80.

Celekli, A. and G. Dönmez (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β-carotene accumulation by a new isolate of Dunaliella sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 183-189.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.

Del Campo, J. A., J. Moreno, H. Rodríguez, M. Angeles Vargas, J. n. Rivas and M. G. Guerrero (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp.(Chlorophyta). *Journal of biotechnology*, 76(1), 51-59.

Eijckelhoff, C. and J. P. Dekker (1997). A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β-carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis research*, 52(1), 69-73.

Finn, B., L. M. Harvey and B. McNeil (2006). Near-infrared spectroscopic monitoring of biomass, glucose, ethanol and protein content in a high cell density baker's yeast fed-batch bioprocess. *Yeast*, 23(7), 507-517.

Garbayo, I., M. Cuaresma, C. Vílchez and J. M. Vega (2008). Effect of abiotic stress on the production of lutein and β-carotene by Chlamydomonas acidophila. *Process Biochemistry*, 43(10), 1158-1161.

Garibay-Hernández, A., R. Vazquez-Duhalt, L. Serrano-Carreón and A. Martinez (2013). Nitrogen limitation in Neochloris oleoabundans: a reassessment of its effect on cell growth and biochemical composition. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(7), 1775-1791.

Hartmut, K. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls b of leaf extracts in different solvents. *Analysis (Peach, K & Tracey, MV, eds)*, 4, 142-196.

Hassanpour, M., M. Abbasabadi, S. Ebrahimi, M. Hosseini and A. Sheikhbaglou (2015). Gravimetric enrichment of high lipid and starch accumulating microalgae. *Bioresource technology*, 196, 17-21.

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

Johnson, M. K., E. J. Johnson, R. D. MacElroy, H. L. Speer and B. S. Bruff (1968). Effects of salts on the halophilic alga Dunaliella viridis. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1461-1468.

Lamers, P. P., M. Janssen, R. C. De Vos, R. J .Bino and R. H. Wijffels (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved Dunaliella salina, a unicellular green microalga. *Journal of biotechnology*, 162(1), 21-27.

López, C. V. G., M. d. C. C. García, F. G. A. Fernández, C. S. Bustos, Y .Chisti and J. M. F. Sevilla (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource technology*, 101(19), 7587-7591.

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

Mooij, P. R., G. R. Stouten, J. Tamis, M. C. van Loosdrecht and R. Kleerebezem (2013). Survival of the fattest. *Energy & Environmental Science*, 6(12), 3404-3406.

Mulders, K. J., P. P. Lamers, D. E. Martens and R. H. Wijffels (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology*, 50(2), 229-242.

Salehizadeh, H. and M. Van Loosdrecht (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology advances*, 22(3), 261-279.

Vishniac, W. and M. Santer (1957). The thiobacilli. *Bacteriological Reviews*, 21(3), 195.

Waterborg, J. H. (2009). The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, Springer, 7-10.

www.SID.ir