مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۰ شماره ۲/ سال ۱۳۹۹/ صفحات ۱۳ تا ۲۸

# کاربرد آب‌پنیر بعنوان محیط کشت جهت کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا*

**آرمین نبی‌زاده قولنجی[۱]، محمود رضازاد باری[۲]*، صابر امیری[۳] و بهروز آتشبار[۴]**

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/٤ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۲٤

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی موسسه آموزش عالی صباء ارومیه،
[۲] استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۳] دانش آموخته دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[٤] استادیار گروه اکولوژی و ارزیابی ذخایر آبزیان پژوهشکده دریاچه ارومیه دانشگاه ارومیه
* مسول مکاتبه: Email: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

**چکیده**

**زمینه مطالعاتی:** *دونالیلا سالینا* یک ریزجلبک دریایی است که حاوی رنگدانه بتاکاروتن، فیکوسیانین، پلی‌ساکاریدها، آهن و روی می‌باشد. **روش کار:** در این تحقیق اثر نسبت‌های مختلف آب‌پنیر و محیط کشت والنه جهت تولید بیومس *دونالیلا سالینا* و ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی شامل ترکیبات فنلی کل، فلاونوئید کل، قندهای محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور سه فاکتور شامل غلظت محیط کشت والنه (صفر، ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر)، درصد آب پنیر (صفر، ۲/۵ و ۵ درصد) و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (صفر، ۷ و ١٤ روز) در قالب طرح Box-Behnken با ۱۷ نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. **نتایج:** نتایج نشان داد که با افزایش درصد آب پنیر و همچنین محیط کشت والنه، تراکم‌سلولی و مقدار فلاونوئید افزایش یافت، که این افزایش معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که زمان گرمخانه گذاری بر میزان تراکم‌سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قند محلول اثر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به طوری که با افزایش زمان گرمخانه-گذاری، تراکم‌سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قند محلول و فلاونوئید کاهش یافت. همچنین با افزایش درصد آب‌پنیر و زمان گرمخانه‌گذاری مقدار قند محلول در روزهای پایانی گرمخانه‌گذاری کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). با افزایش درصد آب‌پنیر مقدار فنل کل کاهش معنی‌داری نداشت و مقدار قند محلول ثابت ماند (P>۰/۰۵). با افزایش غلظت محیط کشت والنه و زمان گرمخانه‌گذاری، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قند محلول کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). شرایط بهینه در روز ۵ گرمخانه‌گذاری، ۵ ٪ آب‌پنیر و صفر درصد محیط کشت والنه بدست آمد. **نتیجه گیری نهایی:** بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، استفاده از آب‌پنیر بعنوان محیط کشت جهت کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا* موفقیت آمیز بوده است.

**واژگان کلیدی:** *دونالیلا سالینا*، تولید بیومس، آب پنیر، کشت

**مقدمه**

افزایش تقاضا برای غذاهای فراسودمند و سلامتی بخش باعث توجه هر چه بیشتر به منابع طبیعی نوین گردیده است (رحیمی و صارم‌نژاد ۱۳۹۹). ریزجلبک‌ها به علت دارا بودن ترکیبات زیست فعال منحصر به فرد، جزو غذاهای فراسودمند به شمار می‌آیند (شهیدی ۲۰۰٤).

*دونالیلا سالینا*[1] جلبک سبز تک سلولی است که در آب-های ساحلی، آب‌های شور و قسمت‌های صخره‌ای آب-های اقیانوسی زندگی می‌کند. سلول‌های دونالیلا بیضوی، کروی، گلابی شکل و مخروطی شکل با اندازه-های مختلف از ۵ تا ۲۵ میکرومتر طول و از ۳ تا ۱۳ میکرومتر عرض می‌باشند (تفرشی و شریعتی ۲۰۰۹). بیشترین اهمیت *دونالیلا سالینا* به دلیل قابلیت زیاد آن در جمع آوری سطوح مختلف بتاکاروتن است (سلمانی‌نژاد ۱۳۹۳). که در حال حاضر از بتاکاروتن جلبک دونالیلا به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی استفاده می-شود (پائیزی و همکاران ۱۳۹۱). تغذیه با جلبک دونالیلا به دلیل وجود ویتامین‌های C و E و مقادیر فراوان بتاکاروتن باعث افزایش فعالیت کمپلمان (عامل مکمل) و لیزوزیم شده و در نهایت باعث افزایش سطوح ایمنی بدن می‌شود (علیشاهی و کرمی‌فر ۱۳۹٤؛ آمر و همکاران ۲۰۰٤). همچنین میزان بالای پروتئین و قابل استفاده بودن آن، جلبک‌ها را به عنوان منبع با ارزش پروتئین مطرح نموده است (یحیی‌بیگی ۱۳۹۱). از این بین جلبک-های جنس کلرلا[2] و دونالیلا اهمیت بیشتری دارند. با توجه به این موضوع که گوشت دارای ٤۳ ٪ و سویا دارای ٤۸ ٪ پروتئین می‌باشد و جلبک دونالیلا، ۵۷ ٪ پروتئین دارد ارزش پروتئینی این موجودات مشخص می‌گردد (فرامرزی و همکاران ۱۳۸۹). از ترکیب‌های مهم این جلبک می‌توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول، پروتئین و ویتامین‌ها اشاره نمود که بخش عمده این ترکیبات دارای خاصیت ضد سرطانی و ضد اکسیدانی می‌باشند (مخبری و همکاران ۱۳۹٤).

آب‌پنیر به دلیل دارا بودن پروتئین‌های محلول در آب، مواد معدنی، اسیدهای آلی و ویتامین‌ها، به عنوان محیط کشت پایه در کشت میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و جلبک‌ها استفاده می‌شود. برای مثال می‌توان به تولید سوخت زیستی توسط ریزجلبک سبز سندسموس در محیط کِشتی بر پایه آب‌پنیر اشاره کرد (جمالی‌فر و همکاران ۱۳۸۹؛ نحوی و همکاران ۱۳۷۹؛ انوری و همکاران ۱۳۸۹؛ بورگس و همکاران ۲۰۱٦).

قیمت محیط کشت یکی از عوامل تأثیر گذار بر قیمت نهایی محصول تولیدی به روش زیست فناوری است. با توجه به گران قیمت بودن محیط کشت‌های مورد استفاده جهت کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا*، هدف پژوهش حاضر امکان سنجی کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا* در آب‌پنیر به عنوان محیط کشت و بررسی تولید بیومس *دونالیلا سالینا* می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

ریزجلبک *دونالیلا سالینا* که به روش مولکولی جنس و گونه آن به اثبات رسیده بود از پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. آب‌پنیر (جدول ۱، ترکیبات آب پنیر مورد استفاده را نشان می-دهد) از شرکت لبنیاتی سحر ارومیه خریداری شد. محیط کشت والنه نیز از پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه تهیه شد. لوگول، اسید کلریدریک و اسید سولفوریک از شرکت شارلو اسپانیا، DPPH از شرکت سیگما آلدریچ آلمان، سدیم هیدروکسید از شرکت اپلیچم آلمان و بقیه مواد شیمیایی نظیر سدیم کربنات، NaCl، معرف فولین و اتانول از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

### کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا*

در شرایط استریل به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت ترکیبی غلظت‌های مختلفی از والنه و آب‌پنیر، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی اضافه شد. pH محیط کشت روی ۷/۵ تنظیم شد که جهت تنظیم pH از اسید کلریدریک و NaOH استفاده گردید. به منظور ایجاد شرایط ایده‌آل رشد میزان شوری محیط کشت روی ۳ مولار NaCl تنظیم گردید. دمای محل نگهداری محیط کشت‌ها در ۲۵ °C تنظیم شد و تحت تابش نور با شدت ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱٤ روز در همین

[1] *Dunaliella salina*

[2] Chlorella

شرایط نگهداری گردید و از پمپ هوا (مدل Hailea ساخت کشور ژاپن) جهت هوادهی مداوم نمونه‌ها استفاده شد (بهشتی‌فر و شریعتی ۱۳۹۲؛ مخبری و همکاران ۱۳۹٤).

**اندازه‌گیری رشد (شمارش سلولی):** توسط سمپلر از هر نمونه جلبکی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و روی لام مخصوص شمارش (لام نئوبار) ریخته شد و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰x، 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) تثبیت شدند (مخبری وهمکاران ۱۳۹٤).

**جدول ۱- ترکیبات آب پنیر**

**Table 1- The whey composition**

| | |
|---|---|
| pH | 6.54±0.02 |
| Total sugars (g/L) | 4.64±0.12 |
| Total Protein (%) | 0.3 |
| Fat (%) | 0 |
| Phosphorus (%) | 3.35±0.14 |
| Potassium (ppm) | 36.51 |
| Sodium (ppm) | 10.99 |
| Fe (mg/L) | 0.62 |
| Cu (mg/L) | 0.88 |
| Dry matter (%) | 0.34641 |
| Salt | 0.124832 |
| Acidity | 0.002646 |
| Ca | 0.043589 |

**اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:** ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی برداشته شد و به مدت ۵ دقیقه در داخل سانتریفیوژ (مدل EBA200 ساخت شرکت Hettich آلمان) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی در ظرفی جداگانه برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی خارج سلولی نگهداری شد. به رسوب سلولی مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر معرف Folin-Cicolteu رقیق شده (۱/۱۰)، یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ ٪ و ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حرارت °C ٤٥ قرار داده شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در داخل سانتریفیوژ (مدل EBA200 ساخت شرکت Hettich آلمان) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. در انتها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۷٦٥ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰ ساخت شرکت Jenway انگلیس) خوانده شد و مقدار کل ترکیبات فنلی با استفاده از استاندارد اسید گالیگ تعیین شد (مخبری و همکاران ۱۳۹٤).

**اندازه‌گیری فلاونوئید کل:** برای سنجش فلاونوئیدها ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی برداشته شد و با سرعت ٦۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (مدل EBA200 ساخت شرکت Hettich آلمان) شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد. به سلول-های باقی مانده به نسبت ۹۹ به ۱ اتانول و اسید کلریدریک اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت (مدل JP-010S ساخت کشور چین) با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای °C ۸۰ قرار گرفت. پس از خنک شدن، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (مدل ۲۸۰۲ ساخت شرکت Unico آمریکا) در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰

نانومتر خوانده شده و مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد (جریدانه و همکاران ۲۰۰٦).

**اندازه‌گیری قندهای محلول**: یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل EBA200 ساخت شرکت Hettich آلمان) شد. مایع رویی دور ریخته شده و به سلول‌های جلبکی باقی مانده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ ٪ و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ ٪ اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت (مدل JP-010S ساخت کشور چین) با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت های مختلف گلوکز ترسیم گردید. جذب نوری نمونه ها و استاندارد ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰ ساخت شرکت Jenway انگلیس) در طول موج ٤۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (دوبویوس و همکاران ۱۹٥٦).

**اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی**: دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل EBA200 ساخت شرکت Hettich آلمان) شد. به رسوب سلولی ۲ میلی‌لیتر اتانول اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت (مدل JP-010S ساخت کشور چین) با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفت. به نمونه‌ها ۰/۸ میلی‌لیتر DPPH ۰/۳ میلی‌مولار اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت و انجام واکنش، میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در طول موج ٥۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ( مدل ۲۱۰۰ ساخت شرکت Jenway انگلیس) خوانده شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی طبق فرمول زیر محاسبه گردید (مخبری و همکاران ۱۳۹٤).

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

محلول بلانک: ۰/۸ میلی‌لیتر اتانول + ۲ میلی‌لیتر از نمونه

محلول کنترل: ۰/۸ میلی‌لیتر DPPH + ۲ میلی‌لیتر اتانول

A: جذب نور

## طرح و آنالیز آماری

در این پژوهش سه متغیر عددی (غلظت محیط کشت والنه (A)، درصد آب پنیر (B) و زمان گرمخانه گذاری (C)) با به کارگیری 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 Design expert نسخه ۷ استفاده شد.

**جدول ۲- سطوح فاکتورهای مورد مطالعه با استفاده از طرح باکس بنکن**

**Table 2 - 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 |

**جدول ۳- طرح آماری باکس بانکن**

**Table 3 - The Box-behnken statistical design**

| Run | Block | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 |
|---|---|---|---|---|
| | | A:Whey (%) | B:Walne Medium (µL) | C:Incubation Time (Day) |
| 1 | Block 1 | 2.5 | 0 | 14 |
| 2 | Block 1 | 0 | 50 | 9 |
| 3 | Block 1 | 5 | 0 | 9 |
| 4 | Block 1 | 2.5 | 25 | 9 |
| 5 | Block 1 | 2.5 | 50 | 4 |
| 6 | Block 1 | 2.5 | 50 | 14 |
| 7 | Block 1 | 0 | 0 | 9 |
| 8 | Block 1 | 2.5 | 25 | 9 |
| 9 | Block 1 | 5 | 50 | 9 |
| 10 | Block 1 | 0 | 25 | 14 |
| 11 | Block 1 | 5 | 25 | 14 |
| 12 | Block 1 | 2.5 | 25 | 9 |
| 13 | Block 1 | 2.5 | 0 | 4 |
| 14 | Block 1 | 2.5 | 25 | 9 |
| 15 | Block 1 | 2.5 | 25 | 9 |
| 16 | Block 1 | 0 | 25 | 4 |
| 17 | Block 1 | 5 | 25 | 4 |

## نتایج و بحث

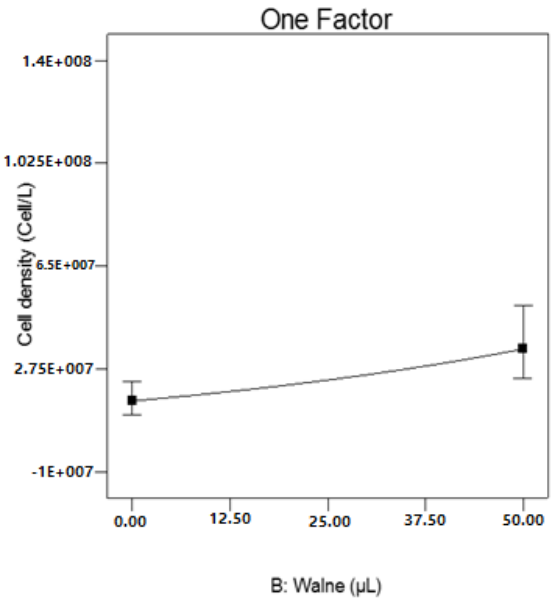
**شمارش سلولی**: در این مطالعه مطابق شکل ۱ با افزایش درصد آب‌پنیر از صفر به ۵ درصد تراکم‌سلولی از $۱/۳×۱۰^{۶}$ به $٤/٥×۱۰^{٦}$ سلول در لیتر افزایش یافت. در صورتی که نتایج حاصل از شکل ۲ نشان داد که با افزایش مقدار والنه از صفر میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر تراکم‌سلولی از $۲/۳×۱۰^{٦}$ به $٤/٧×۱۰^{٦}$ در لیتر افزایش یافت. شایان ذکر است طبق نتایج بدست آمده از شکل ۱ و ۲ با افزایش درصد آب‌پنیر و همچنین محیط کشت والنه، تراکم‌سلولی افزایش یافت ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اما با افزایش مدت زمان کشت (شکل ۳) تراکم‌سلولی به مرور کاهش یافت، به طوری که میزان سلول اولیه وارد شده به محیط و مقدار تراکم‌سلولی در آخرین روز کشت (روز ١٤) اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (P<۰/۰۵). نحوی و همکاران (۱۳۷۹) به این نتیجه رسیدند که استفاده از آب‌پنیر در محیط کشت مخمر قرمز رنگ *ردوترولا آکنیوروم* باعث افزایش رشد سلولی (بیومس) مخمر شده است. سالا و همکاران (۲۰۱٦) طی مطالعه‌ای اثر کنسانتره پروتئین آب‌پنیر را بر روی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از کنسانتره پروتئین آب‌پنیر در محیط کشت جلبک باعث افزایش تراکم‌سلولی (بیومس) *اسپیرولینا پلاتنسیس* شده است.

**جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس میزان تولید تراکم سلولی (بیومس)**

**Table 4 - The Analysis of variance table of cell density (biomass)**

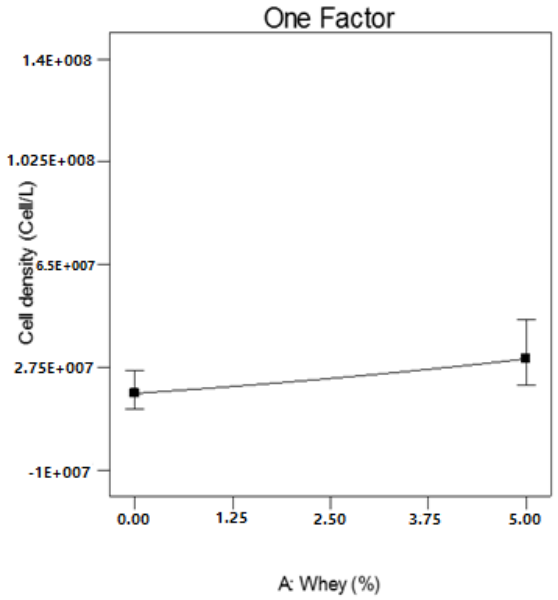
| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 2.61 | 3 | 0.87 | 9.19 | 0.0177 | significant |
| A-Whey (%) | 0.22 | 1 | 0.22 | 2.32 | 0.1882 | |
| B-Walne Medium (µL) | 0.53 | 1 | 0.53 | 5.64 | 0.0635 | |
| C-Incubation Time (Day) | 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 | Adj R-Squared | 0.75 | | | |

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 (سلمانی‌نژاد ۱۳۹۳). مواد معدنی موجود در آب‌پنیر نظیر کلسیم، فسفر، منیزیم، روی، سدیم و پتاسیم در برخی از ترکیبات شیمیایی محیط کشت والنه وجود دارد و همچنین آب‌پنیر حاوی انواع ویتامین‌های محلول در آب نظیر ویتامین $B_{12}$، $B_6$، $B_5$، $B_2$، اسید فولیک و اسید آسکوربیک می‌باشد (جمالی‌فر و همکاران ۱۳۸۹). که از این بین ویتامین $B_{12}$ و $B_2$ برای رشد *دونالیلا سالینا* بسیار ضروری است و باعث افزایش تراکم‌سلولی 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 تراکم‌سلولی در روزهای پایانی محیط کشت شده است.



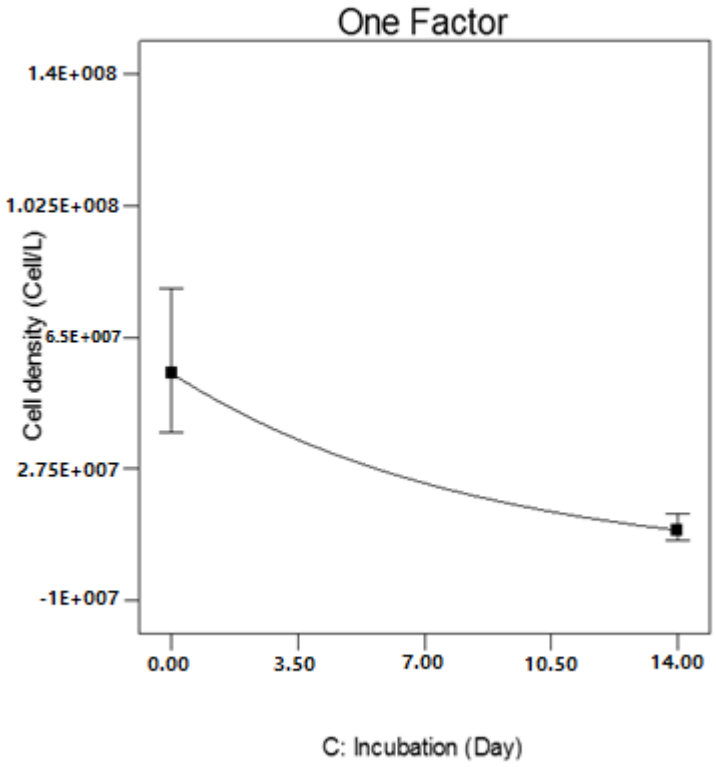

**شکل ۲- تاثیر محیط کشت والنه بر میزان تراکم‌سلولی**

**Figure 2 – The effect of Walne Medium on cell density**




**شکل ۱- تاثیر آب‌پنیر بر میزان تراکم‌سلولی**

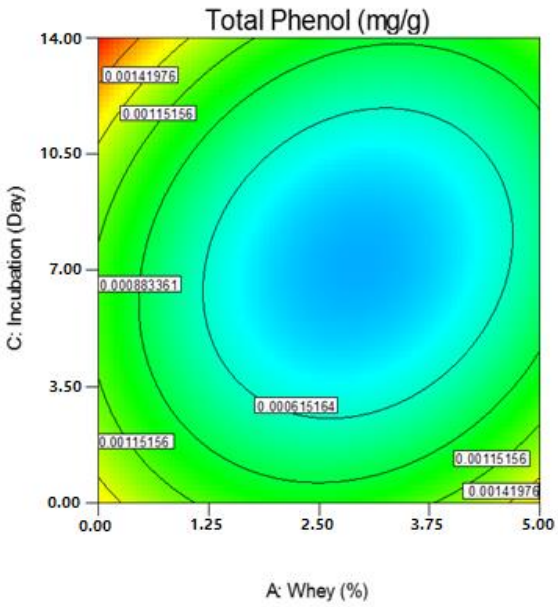
**Figure 1 - The effect of whey on cell density**




**شکل ۳- تاثیر زمان گرمخانه‌گذاری بر میزان تراکم‌سلولی**
**Figure 3 – The effect of incubation time on cell density**

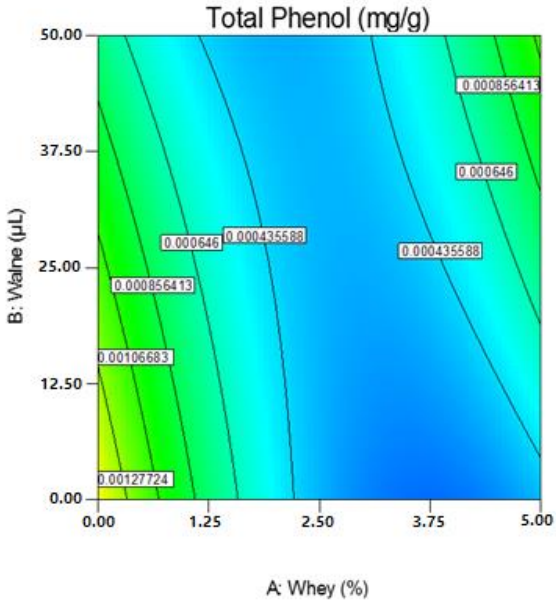
**ترکیبات فنلی**: نتایج بدست آمده از شکل ٤ نشان داد با افزایش درصد آب‌پنیر مقدار فنل کل کاهش یافته، اما این کاهش اختلاف معنی‌داری به وجود نیاورده است (P>۰/۰۵). با افزایش درصد آب‌پنیر از صفر به ٥ مقدار فنل کل از ۰/۰۰۱۲ mg/g به ۰/۰۰۰۷ mg/g کاهش یافت. مطابق شکل ٥ با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ١٤ روز مقدار فنل کل ابتدا کاهش یافت، به طوری که در روز هفتم به کمترین مقدار خود رسید اما از روز هفت به تدریج افزایش یافت و در روز ١٤ به مقدار اولیه خود رسید. با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ١٤ روز مقدار فنل کل از ۰/۰۰۱ mg/g در روز صفر به mg/g ۰/۰۰۰٤ در روز هفت کاهش یافت، اما از روز هفت به بعد مجددا مقدار فنل افزایش یافت و در روز ١٤ به مقدار اولیه خود یعنی ۰/۰۰۱ mg/g رسید. طبق شکل ٤ با افزایش هم زمان درصد آب‌پنیر از صفر به ٥ و مقدار والنه از صفر تا ٥٠ میکرولیتر فنل کل به تدریج کاهش یافت، اما اختلاف معنی‌داری به وجود نیاورد (P>۰/۰۵). با افزایش هم زمان درصد آب‌پنیر و محیط کشت والنه مقدار فنل کل از ۰/۰۰۱۳ mg/g در صفر درصد آب‌پنیر و صفر میکرولیتر والنه به ۰/۰۰۰٤ mg/g در ۳ ٪ آب‌پنیر و ۲٥ میکرولیتر والنه رسید، اما از ۳/۷٥ ٪ آب‌پنیر و ۳۰ میکرولیتر والنه مقدار فنل کل رفته رفته افزایش یافت و از ۰/۰۰۰٤ mg/g به ۰/۰۰۰۸ mg/g در ٥ ٪ آب‌پنیر و ٥٠ میکرولیتر والنه رسید. با توجه به شکل ٥ با افزایش هم زمان درصد آب-پنیر از صفر تا ٥ و زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ١٤ روز مقدار فنل کل ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت، ولی اختلاف معنی‌داری به وجود نیاورد (P>۰/۰۵). فنل کل در صفر درصد آب‌پنیر و روز صفر زمان گرمخانه‌گذاری از ۰/۰۰۱۱ mg/g به ۰/۰۰۰٦ mg/g در ۲/٥ ٪ آب‌پنیر و روز ٤ زمان گرمخانه‌گذاری کاهش یافت، اما از روز ٤ به بعد مقدار فنل کل به تدریج افزایش یافته و در روز ١٤ به بیشترین میزان خود رسید. بیشترین مقدار فنل کل در

آب‌پنیر صفر درصد و زمان گرمخانه‌گذاری ۱٤ روز به مقدار ۰/۰۰۱٤ mg/g بدست آمد. مطابق شکل ٦ با افزایش هم زمان مقدار محیط کشت والنه از صفر تا ۵۰ میکرولیتر و زمان گرمخانه‌گذاری (صفر تا ۱٤ روز) مقدار فنل کل افزایش یافت، به طوری که فنل کل از ۰/۰۰۰٤ mg/g به ۰/۰۰۱۳ mg/g افزایش یافت اما اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). محمدی‌یگانه و همکاران (۱۳۹٤) طی تحقیقی خواص آنتی‌اکسیدانی و فیزیکی‌شیمیایی نوشیدنی تخمیری آب پنیر-پسته را با استفاده از استارتر کفیر مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از آب‌پنیر حاوی ۵ ٪ حجمی/وزنی لاکتوز باعث افزایش میزان تولید فنل کل گردید. فنول‌ها گروه مهمی از ترکیبات طبیعی، با خواص آنتی‌اکسیدانی و دیگر خواص بیولوژیکی هستند (ال‌بکی و همکاران ۲۰۰۹). ترکیبات فنلی فواید قابل توجهی در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی دارند (پلازک و زور ۲۰۰۳). در تحقیقات گذشته مشخص شده بسیاری از ترکیبات فنلی به طور موثر رادیکال‌های گروه هیدروکسیل و پروکسیل را حذف می‌کنند و از اکسید شدن چربی‌ها ممانعت به عمل می‌آورند (بوسکیو و همکاران ۲۰۱۰). در دماهای پایین میزان ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد، درجه حرارت پایین همراه با شدت نور، استرس فتواکسی داتیو را با محدود کردن آنزیم‌های فتوسنتزی افزایش می‌دهد درنتیجه ترکیبات فنولی به عنوان محافظت کننده نوری افزایش می‌یابند (گلوز و آرتور ۲۰۰۲). بیشتر جلبک‌ها با قرار گرفتن در برابر این عوامل محیطی تنش‌زا تولید ترکیبات فنولی را در خود افزایش می‌دهند (جعفری و همکاران ۱۳۹٤). از آنجائیکه در این تحقیق تا حد امکان سعی شده است از ایجاد تنش‌های محیطی در محیط کشت جلبک *دونالیلا سالینا* جلوگیری شود، لذا منجر به کاهش تولید ترکیبات فنلی گردیده است. همچنین با توجه به این که ترکیبات فنلی در دمای پایین تولید می‌شود و دمای اعمال شده جهت رشد *دونالیلا سالینا* بالابود دلیل دیگری بر کاهش میزان ترکیبات فنلی بدست آمده می‌باشد (جعفری و همکاران ۱۳۹٤).



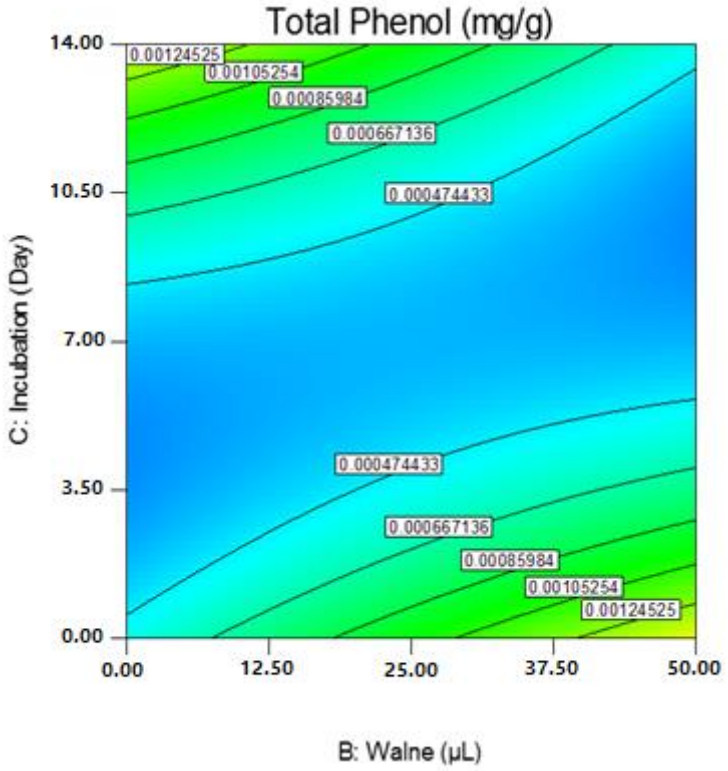

**شکل ۵- اثر متقابل درصد آب‌پنیر و زمان گرمخانه‌گذاری برفنل کل**

**Figure 5 – The Interaction of the whey percentage and incubation time on total phenol**




**شکل ۴- اثر متقابل درصد آب‌پنیر و محیط کشت والنه بر فنل کل**

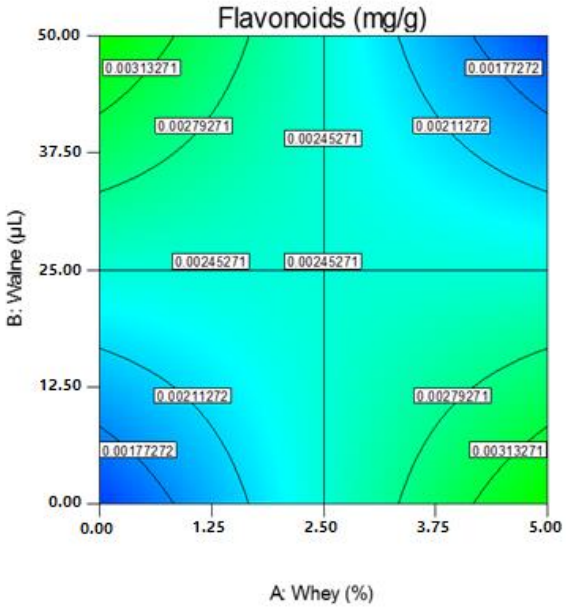
**Figure 4 – The Interaction of the whey percentage and Walne Medium on total phenol**




**شکل ۶- اثر متقابل محیط کشت والنه و زمان گرمخانه‌گذاری بر فنل کل**

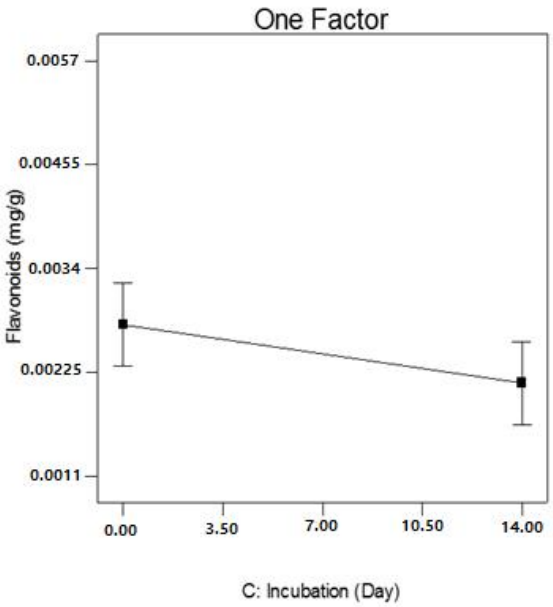
**Figure 6 – The Interaction of the Walne Medium and incubation time on total phenol**

**فلاونوئید کل**: نتایج حاصل از شکل ۸ نشان داد با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری میزان فلاونوئید کاهش یافت. با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ۱٤ روز مقدار فلاونوئید از ۰/۰۰۲۸ mg/g در روز صفر به mg/g ۰/۰۰۲ در روز ۱٤ کاهش یافت اما اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). طبق شکل ۷ با افزایش هم زمان درصد آب‌پنیر از صفر تا ۵ درصد و مقدار محیط کشت والنه از صفر تا ۵۰ میکرولیتر میزان فلاونوئید کل افزایش یافت به طوری که کمترین میزان فلاونوئید در آب‌پنیر صفر درصد و محیط کشت والنه صفر میکرولیتر به میزان ۰/۰۰۱۷ mg/g و بیشترین میزان فلاونوئید در آب-پنیر ۵ ٪ و محیط کشت والنه صفر میکرولیتر به میزان ۰/۰۰۳۱ mg/g بدست آمد. همچنین با افزایش درصد آب-پنیر از صفر تا ۵ و محیط کشت والنه از ۲۵ تا ۵۰ میکرولیتر مقدار فلاونوئید کل کاهش یافت، به طوری که بیشترین میزان فلاونوئید در مقدار والنه ۵۰ میکرولیتر و آب‌پنیر صفر درصد به میزان ۰/۰۰۳۱ mg/g و کمترین میزان آن در آب‌پنیر ۵ ٪ و والنه ۵۰ میکرولیتر به مقدار ۰/۰۰۱۷ mg/g بدست آمد که اختلاف بین کمترین مقدار فلاونوئید کل و بیشترین مقدار آن اختلاف معنی‌داری به وجود آورد (P<۰/۰۵).




**شکل ۷- اثر متقابل آب‌پنیر و محیط کشت والنه بر میزان فلاونوئیدها**

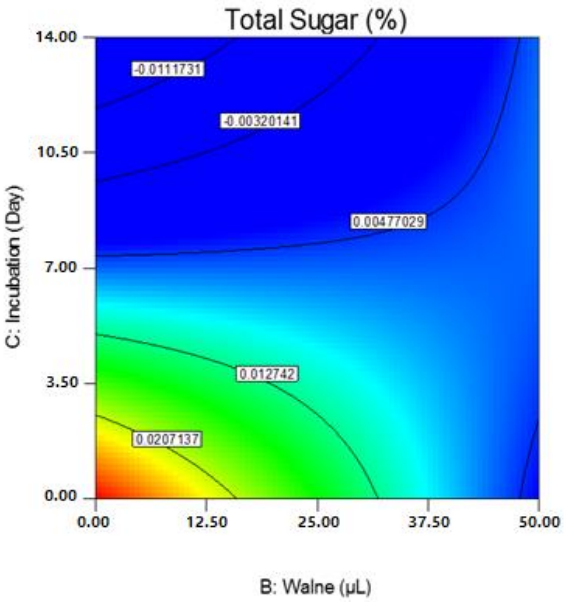
**Figure 7 – The Interaction of the whey percentage and Walne Medium on total flavonoid content**




**شکل ۸- تاثیر زمان گرمخانه‌گذاری بر میزان فلاونوئیدها**

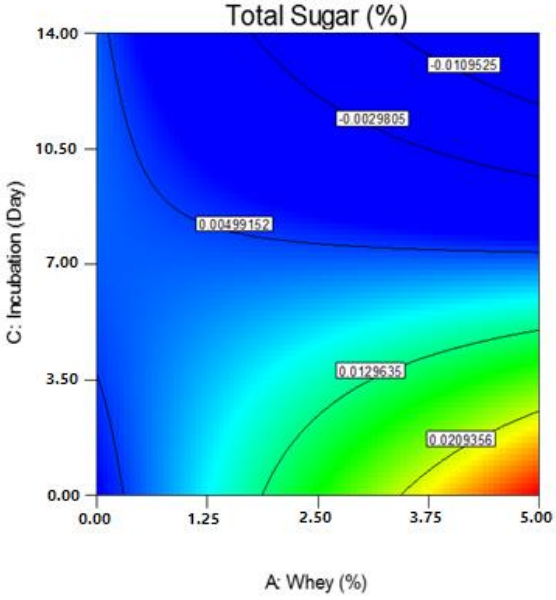
**Figure 8 – The effect of incubation time on total flavonoid content**

**قندهای محلول**: نتایج حاصل از شکل ۹ نشان داد با افزایش درصد آب‌پنیر از صفر تا ۵، مقدار قند محلول ثابت مانده و تغییری نکرد. طبق شکل ۱۰ با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ۱٤ روز مقدار قند محلول کاهش یافت، به طوری که در روز ۱٤ به کمترین میزان خود رسید و اختلاف معنی‌داری به وجود آورد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از شکل ۹ نشان داد با افزایش هم زمان درصد آب‌پنیر از صفر تا ۵ و زمان گرمخانه-گذاری از صفر تا ۱٤ روز مقدار قند محلول کاهش یافت، به طوری که کمترین مقدار قند محلول در روز ۱٤ زمان گرمخانه‌گذاری و آب‌پنیر ۵ ٪ و بیشترین میزان قند محلول در روز صفر زمان گرمخانه‌گذاری و ۵ ٪ آب‌پنیر اندازه‌گیری شد. که بین کمترین و بیشترین میزان بدست آمده اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). طبق شکل ۱۰ با افزایش هم زمان مقدار محیط کشت والنه از صفر تا ۵۰ میکرولیتر و زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ۱٤ روز مقدار قند محلول کاهش یافت. لذا کمترین مقدار قند محلول در مقدار محیط کشت والنه ۱۲ میکرولیتر و روز ۱٤ زمان گرمخانه‌گذاری و بیشترین مقدار آن در روز صفر زمان گرمخانه‌گذاری و صفر میکرولیتر محیط کشت والنه بدست آمد که اختلاف معنی‌داری بین کمترین و بیشترین میزان قند محلول با توجه به جدول آنالیز واریانس وجود داشت (P<۰/۰۵). سالا و همکاران (۲۰۱٦) دریافتند که رقیق کردن مواد مغذی محیط کشت Zarrouk و اضافه کردن کنسانتره پروتئین آب‌پنیر با مقدار بالای لاکتوز و سطح پایین فسفر، پتاسیم و آهن باعث افزایش تولید کربوهیدرات‌ها در ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌شود. غلظت نیتروژن در محیط کشت یک عامل اصلی است که بر تجمع کربوهیدارت‌ها در ریزجلبک‌ها تاثیر می‌گذارد.




**شکل ۱۰- اثر متقابل محیط کشت والنه و زمان گرمخانه‌گذاری قند کل**

**Figure 10 – The Interaction of the Walne Medium and incubation time on total sugar**

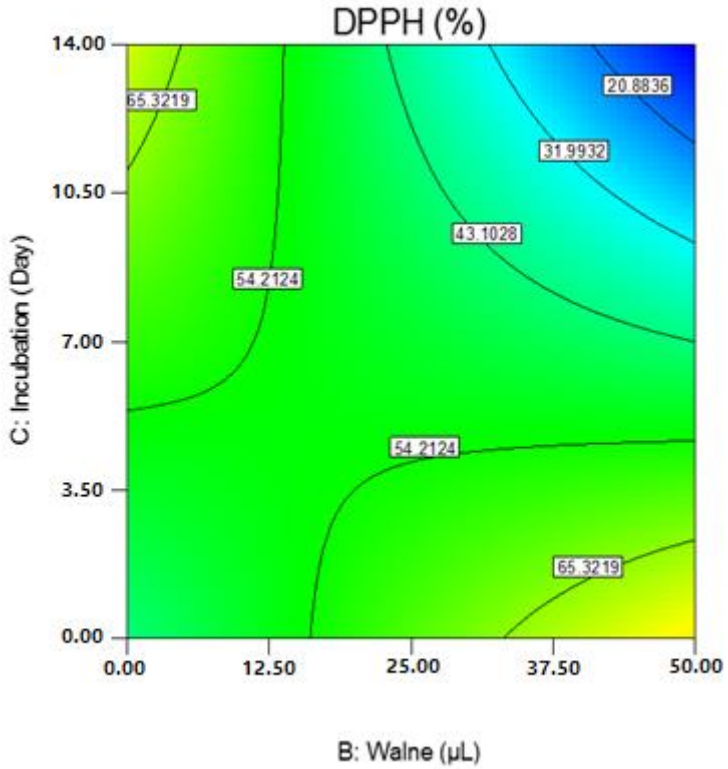



**شکل ۹- اثر متقابل درصد آب‌پنیر و زمان گرمخانه بر گذاری بر قند کل**

**Figure 9 – The Interaction of the whey percentage and incubation time on total sugar**

**پتانسیل آنتی‌اکسیدانی**: با دقت در شکل ۱۱ متوجه شدیم با افزایش مقدار محیط کشت والنه از صفر تا ۵۰ میکرولیتر مقدار پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته است. با افزایش مقدار محیط کشت والنه از صفر تا ۵۰ میکرولیتر میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی از ٦۰ ٪ به ٤۲ ٪ کاهش یافته است اما این کاهش اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). شکل ۱۱ نشان داد با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری مقدار پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ١٤ روز مقدار پتانسیل آنتی‌اکسیدانی از ٦۰ ٪ به ٤۵ ٪ کاهش یافت و این کاهش اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). طبق شکل ۱۱ با افزایش هم زمان مقدار محیط کشت والنه از صفر تا ۵۰ میکرولیتر و زمان گرمخانه‌گذاری از صفر تا ١٤ روز میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت به طوری که کمترین میزان پتانسل آنتی‌اکسیدانی در روز ١٤ زمان گرمخانه‌گذاری و ۵۰ میکرولیتر والنه به مقدار ۲۱ ٪ بدست آمد. بیشترین میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در روز یک زمان گرمخانه‌گذاری و مقدار محیط کشت والنه ۵۰ میکرولیتر به میزان ٦۵ ٪ بدست آمد. که نتایج بدست آمده نشان دهنده اختلاف معنی‌دار افزایش هم زمان مقدار محیط کشت والنه و زمان گرمخانه‌گذاری بود (P<۰/۰۵). محمدی‌یگانه و همکاران (۱۳۹٤) طی تحقیقی خواص آنتی‌اکسیدانی و فیزیکی‌شیمیایی نوشیدنی تخمیری آب‌پنیر-پسته را با استفاده از استارتر کفیر مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از آب‌پنیر حاوی ۵ ٪ حجمی/وزنی لاکتوز باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گردید. تحقیقات در مورد پتانسیل آنتی‌اکسیدانی موضوعی مهم در زمینه صنایع دارویی و غذایی است. اکسیداسیون حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند سبب از هم پاشیدگی غشاء سلول-ها، آسیب به پروتئین‌های غشایی و موتاسیون DNA و گسترش بسیاری از بیماری‌ها همچون سرطان، آسیب کبدی و بیماری‌های قلبی و عروقی گردد. اگر چه بدن دارای روندهای دفاعی هم چون آنزیم‌ها و مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی است که رادیکال‌های اکسیژن را دفع می-کند ولی قرار گرفتن مداوم در معرض مواد شیمیایی و

آلاینده‌ها می‌تواند منجر به افزایش تعداد رادیکال‌های آزاد خارج از توان بدن شود و موجب آسیب اکسیداتیو غیر قابل بازگشت گردد. بنابراین آنتی‌اکسیدان‌ها با خاصیت جاروکنندگی رادیکال‌های آزاد نقشی مهم در پیش‌گیری یا درمان بیماری‌های مرتبط با اکسیداسیون یا رادیکال-های آزاد ایفاء می‌کنند (حسن سلطان و همکاران ۱۳۹۵). به طور کلی تغییرات در محتوای آنتی‌اکسیدانی در سلول-های دونالیلا بستگی به غلظت منبع نیتروژن و NaCl محیط دارد. همچنین سطح آنتی‌اکسیدانی سلولی در *دونالیلا سالینا* با سطح پایین نیتروژن و غلظت NaCl بالا و شدت نور زیاد افزایش می‌یابد (هانا و همکاران ۲۰۰٤). در نتیجه با توجه به پایین بودن مقدار منابع نیتروژنی در این تحقیق، علت کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بودن مقدار منابع نیتروژنی باشد.




**شکل ۱۱- اثر متقابل محیط کشت والنه و زمان گرمخانه‌گذاری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی**

**Figure 11 – The Interaction of the Walne Medium and incubation time on antioxidant activity**

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با افزایش درصد آب‌پنیر و همچنین محیط کشت والنه، تراکم‌سلولی و فلاونوئید افزایش یافت که این افزایش در میزان فلاونوئید معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). افزایش زمان گرمخانه‌گذاری باعث کاهش تراکم‌سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قند محلول و فلاونوئید شد، که این کاهش در میزان تراکم-سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قند محلول اختلاف معنی-داری داشت (P<۰/۰۵). با افزایش درصد آب‌پنیر و زمان گرمخانه‌گذاری مقدار قند محلول در روزهای پایانی گرمخانه‌گذاری کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). با افزایش غلظت محیط کشت والنه و زمان گرمخانه‌گذاری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قند محلول کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). به طور کلی نتایج نشان داد که استفاده از آب‌پنیر بعنوان محیط کشت جهت کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا* موفقیت آمیز بوده است.

**منابع مورد استفاده**


انوری م، علیزاده ع و صادقی‌پور م، ۱۳۸۹. بهینه سازی تولید پروتئین تک‌یاخته از آب‌پنیر توسط *K.marxianus* به روش تاگوچی، مجله علوم زیستی، ٤(۳)،۱۰-۱.

بهشتی‌فر س و شریعتی م، ۱۳۹۲. اثر تیتانیوم بر رشد و تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی جلبک تک‌سلولی *دونالیلا سالینا*، مجله پژوهش-های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۱)، ۵۲-٤۲.

پائیزی م، عینعلی ع و شریعتی م، ۱۳۹۱. بررسی رابطه بین تجمع بتاکاروتن و مقاومت به تنش سرما با استفاده از کینتیک فلوئورسنس کلروفیل a در جلبک سبز تک‌سلولی Dunaliella، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷(۳)، ۳۷۵-۳٦۳.

جعفری ن، علوی ز و ابراهیم‌زاده م ع، ۱۳۹٤. ارزیابی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی دو گونه از جلبک‌های سبز به روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مجله علمی-پژوهشی دانشگاه الزهرا (زیست شناسی کاربردی)، ۲۹(۱)، ۵۱-۷۸.

جمالی‌فر ح، صمدی ن، فاضلی م و مشاک ز، ۱۳۸۹. تهیه نوشابه پروبیوتیکی بر پایه آب‌پنیر با استفاده از استارتر *لاکتوباسیلوس کازئی* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۸(۲)، ٤۸٤-٤۷۵.

حسن سلطان ط، نوروزی م و آموزگار م ع، ۱۳۹۵. بررسی میزان کلروفیل a و b و توتال کاروتنوئید و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی چهار گونه جلبک سبز جدا شده از سواحل گلستان دریای خزر، مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی، ٦(۲٤)، ۳٦-۳۱.

رحیمی س، صارم‌نژاد س، ۱۳۹۹. اثر تخمیر بر میزان ترکیبات فراسودمند آرد مالت برنج قهوه‌ای. پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۰ (۱)، ۱۵۰-۱۳۷.

سلمانی‌نژاد م، ۱۳۹۳. تاثیر محیط کشت و شدت نور بر رشد و کاروتنوئیدهای جلبک *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸(٤)، ۷۸۳- ۷۷۱.

علیشاهی م و کرمی‌فر م، ۱۳۹٤. مقایسه تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف جلبک *دونالیلا سالینا* بر میزان کاروتنوئید پوست و رنگ ماهی سورم، مجله دامپزشکی ایران، ۱۱(٤)، ۱۱-۱.

فرامرزی م ع، فروتن‌فر ح و شکیبائی م، ۱۳۸۹. بیوتکنولوژی ریزجلبک‌ها، تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

محمدی‌یگانه ز، خدائیان ف، حسینی س، صفری م، رضایی ک و موسوی م، ۱۳۹٤. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فیزیکی‌شیمیایی نوشیدنی تخمیری آب‌پنیر-پسته با استفاده از استارتر کفیر، فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، ۳(۱) ۸٤-٦۹.

مخبری ر، رضایی الف و کرد نایبج ع، ۱۳۹٤. افزایش تولید بتاکاروتن و گلیسرول در کشت سلولی *دونالیلا سالینا* توسط امواج فراصوت، مجله سلول و بافت، ٦(۳)، ۱۳-۱.

نحوی الف، واعظ م و امتیازی گ، ۱۳۷۹. تولید کاروتنوئید از آب‌پنیر توسط مخمر قرمز رنگ *ردوترولا آکنیوروم*، جداسازی شده از شیره درختان توس طالقان، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ٤(۳)، ۷٦-٦۷.

یحیی‌بیگی ف، ۱۳۹۱. انتقال ژن به *دونالیلا سالینا* با روش آگروباکتریوم تومه فاسینس، پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، ص ۱٤.

Abd El-Baky HH, El-Baz FK and El-Baroty GS, 2009. Natural preservative ingredient from marine alga Ulva lactuca L. International Journal of Food Science & Technology 44: 1688-1695.

Amar EC, Kiron V, Satoh S and Watanabe T, 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish & Shellfish Immunology 16: 527-537.

Boscaiu M, Sánchez M, Bautista I, Donat P, Lidón A, Llinares J and Vicente O, 2010. Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture 67: 44-49.

Close DC and McArthur C, 2002. Rethinking the role of many plant phenolics–protection from photodamage not herbivores. Oikos 99: 166-172.

Da Silva Borges W, Araújo BSA, Moura LG, Coutinho Filho U, de Resende MM and Cardoso VL, 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.

DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT and Smith F, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N, 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 97: 654-660.

El-Baky HA, El-Baz FK and El-Baroty GS, 2004. Production of Antioxidant by the Green Alga *Dunaliella salina*. International Journal of Agriculture & Biology 6: 49-57.

Hosseini Tafreshi A and Shariati M, 2009. Dunaliella biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 107: 14-35.

Plazek A and Zur I, 2003. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Science 164: 1019-1028.

Salla ACV, Margarites AC, Seibel FI, Holz LC, Brião VB, Bertolin TE and Costa JAV, 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.

Shahidi F, 2004. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. Journal Food Science 69: 9–146.

*Journal of Food Researches/vol.30 No.2/ 2020/pp 13-28*
*https://foodresearch.tabrizu.ac.ir*

# Application of whey as a medium for cultivation of *Donalia salina* microalgae

**A Nabizadeh Gholenji[1], M Rezazadeh Bari[2]*, S Amiri [3] and B Atashbar[4]**

Received: February 23, 2018 Accepted: April 13, 2019

[1]MSc, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Saba Institute of Higher Education, Urmia, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[3]PhD, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Ecology and Resource Assessment, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
*Corresponding author: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

**Introduction:** Microalgae are considered to be functional foods due to their unique bioactive compounds. *Dunaliella salina* is a single-celled green alga that lives in coastal waters, brackish waters, and rocky parts of ocean waters. This marine microalga contains beta-carotene pigment, phycocyanin, polysaccharides, iron, and zinc. *Dunaliella salina* is most important because of its high ability to collect various levels of beta-carotene. Beta-carotene of *Dunaliella salina* is currently widely used in the food and pharmaceutical industries. Feeding alkaline algae due to the presence of vitamins C and E and large amounts of beta-carotene increase the activity of complement and lysozyme, and ultimately increases the body's immune system. Also, the high level of protein and its usability has made algae a valuable source of protein. The price of the cultivation medium is one of the important factors affecting the final price of the biotechnological product. Whey is used as a culture medium for the cultivation of microorganisms, such as bacteria and algae, due to water-soluble proteins, minerals, organic acids, and vitamins. Regarding the high cost of culture medium used for microalgae cultivation, the aim of this study was to determine the feasibility of *Dunaliella salina* microalgae cultivation in whey as a cultivation medium and to study its biomass production.
**Material and methods:** In this research, the effect of different ratios of whey and Walne medium on the biomass production of *Dunaliella salina* and biochemical properties including total phenolic compounds, total flavonoid, soluble sugars and antioxidant activity were studied. For this purpose, three factors including the concentration of Walne medium (0, 25 and 50 µl), whey (0, 2.5 and 5%), and incubation time (0, 7 and 14 days) were studied using the response surface methodology in a Box-Behnken design with 17 samples. After collecting the data, a second-order model was used for fitting and regression analysis at $\alpha = 0.05$. Finally, the optimal conditions were determined using numerical optimization and based on the desirability function. Statistical analysis was done with Design-Expert 17. For the cultivation of *Dunaliella salina* microalgae, 20 ml of algal suspension was added to 100 ml of mixed medium with various concentrations of Walne medium and whey in a sterile condition. The pH of the culture medium was adjusted to 5.7 by 6N HCl and NaOH. In order to create an ideal growth condition, the salinity of the culture medium was constant. The incubation temperature was 25◦C and light intensity was 2500 lux. The samples were kept in the same conditions for 14 days and the air pump was used to prepare aerobic condition for the samples.
**Results and discussion:** The results showed that with increasing whey content as well as Walne medium, cell density and flavonoids increased, which it was statistically significant ($P<0.05$). The results showed that the incubation time had a significant effect on cell density, antioxidant activity and soluble sugar ($P<0.05$), and cell density, antioxidant activity, soluble sugar, and amount of

flavonoid decreased by increasing the incubation time. Also by increasing the percentage of whey and incubation time, the amount of soluble sugar decreased significantly at the end of incubation time ($P<0.05$). With increasing whey, total phenol content was not significantly decreased and soluble sugar content remained constant ($P<0.05$). By increasing the concentration of Walne medium and the incubation time, the antioxidant activity and soluble sugar decreased significantly ($P<0.05$). Minerals of whey such as calcium, phosphorus, magnesium, zinc, sodium and potassium are present in some of the chemical compounds of the Walne medium. As well as, whey contains a variety of water-soluble vitamins such as vitamins $B_{12}$, $B_6$, $B_5$, $B_2$, Acid folic acid and ascorbic acid which are essential to grow of *Dunaliella salina* and caused to increase its cell density. Sala et al. (2016) investigated the effect of whey protein concentrate on *Spirulina platensis* algae, and concluded that the use of whey protein concentrates in algae cultivation media increased the cell density (biomass) of *Spirulina platensis*. Generally, the changes in the antioxidant activity of *Dunaliella salina* cells depend on the concentration of nitrogen and NaCl sources. Also, the antioxidant level in *Dunaliella salina* increases with low nitrogen levels and high NaCl concentration and high light intensity. Therefore, due to the low nitrogen sources in this study, the antioxidant activity was decreased. Most algae increase the production of phenolic compounds under the environmental stress. Since this research has tried to minimize the environmental stresses in *Dunaliella salina* cultivation medium, it has reduced the production of phenolic compounds. Also, because phenolic compounds are produced at low temperatures, and the applied temperature to the growth of *Dunaliella salina* in this study was high which caused to reduce the amount of phenolic compounds. According to the literature, dilution of nutrients in Zarrouk medium and the addition of whey protein concentrate with high levels of lactose and low level of phosphorus, potassium and iron increase carbohydrate production in *Spirulina platensis*. So, the nitrogen concentration in the cultivation medium is a main factor that affecting the accumulation of carbohydrates in microalgae.

**Conclusion:** The optimum conditions were obtained at day 5 of incubation time, 5% whey and 0% of Walne medium. Based on the results of this study, the use of whey as a medium for cultivating *Dunaliella salina* microalgae has been successful.

**Keywords:** *Dunaliella salina*, Biomass production, Whey, Cultivation