TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP HỒ CHÍ MINH
TẠP CHÍ KHOA HỌC
KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ
ISSN: 1859-3100 Tập 15, Số 12 (2018): 14-24

HO CHI MINH CITY UNIVERSITY OF EDUCATION
JOURNAL OF SCIENCE
NATURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY
Vol. 15, No. 12 (2018): 14-24

Email: tapchikhoahoc@hcmue.edu.vn; Website: http://tckh.hcmue.edu.vn

SỰ TĂNG TRƯỞNG, TÍCH LŨY CAROTENOID VÀ LIPID CỦA *DUNALIELLA SALINA* DƯỚI CÁC ĐIỀU KIỆN ỨC CHẾ

Võ Hồng Trung*, Nguyễn Thị Bích Ngọc,
Nguyễn Thị Hồng Phúc, Trần Huỳnh Phong, Vũ Thị Thu Hồng
Bộ môn Hóa sinh – Độc chất, Khoa Dược –Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
Ngày nhận bài: 02-4-2018, ngày nhận bài sửa: 11-9-2018, ngày duyệt đăng: 21-12-2018

TÓM TẮT

Dunaliella salina là vi tảo lục đơn bào, có khả năng tổng hợp lượng lớn carotenoid, đặc biệt β-carotene trong các điều kiện ức chế khác nhau. Ba chủng D. salina được sử dụng cho nghiên cứu ảnh hưởng ức chế H_2O_2 và kết hợp với ánh sáng, độ muối cao lên sự tăng trưởng, tổng hợp carotenoid và lipid. Kết quả cho thấy 3 chủng D. salina có những đáp ứng khác nhau về tăng trưởng sau các điều kiện ức chế như mật độ tế bào tăng trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp ánh sáng cao và giảm trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp độ muối cao đối với hai chủng D. salina A9 và D. salina CCAP 19/18, mật độ tế bào ổn định đối với D. bardawil DCCBC 15 trong các điều kiện ức chế khác nhau. Hàm lượng carotenoid và lipid ở 3 chủng D. salina tăng, trong đó ở điều kiện ức chế kết hợp ánh sáng cao hàm lượng carotenoid và lipid cao hơn so với các điều kiện ức chế khác.

Từ khóa: *Dunaliella salina*, carotenoid, phương pháp Sulfo-Phospho-Vanillin.

ABSTRACT

The growth, carotenoid and lipid accumulation of Dunaliella salina cultivated under stress conditions

Dunaliella salina, a unicellular green microalgae, is capable of biosynthesising high carotenoid content, particularly β-carotene under different stress conditions. This study used three D. salina strains to investigate the growth, biosynthesis of carotenoid and lipid under stress conditions such as separate H_2O_2 and combination of high light intensity and salinity. The results indicated that the growth of three D. salina strains was different responses to stress conditions including increase for D. salina A9 and D. salina CCAP 19/18 under combination of H_2O_2 and high light intensity, and constant for D. bardawil DCCBC 15 under all stress conditions in cell density. Carotenoid and lipid contents of three D. salina strains increased significantly under stress conditions, in which combination of high light intensity was higher compared with the other stress conditions.

Keywords: *Dunaliella salina*, carotenoid, Sulfo-Phospho-Vanillin method.

1. Giới thiệu

Dunaliella salina (thuộc Dunaliellaceae) là một trong những vi tảo đơn bào có nhiều tiềm năng được sử dụng làm thực phẩm và dược phẩm trong nhiều năm qua. *D. salina* tăng

* Email: *vohongtrung2503@gmail.com*

trưởng trong nhiều điều kiện ức chế khác nhau gây ra sự sản xuất carotene có khả năng chống oxy hóa và kháng độc tế bào [1]. Sự tích lũy carotene ở *D. salina* có thể được kích thích bởi cường độ ánh sáng cao và các điều kiện nuôi cấy có thể dẫn đến giảm tốc độ tăng trưởng bao gồm nhiệt độ tới hạn, độ muối cao và hạn chế nitrogen [2].

Sự thay đổi độ muối đột ngột trong nuôi cấy *D. salina* tạo ra phase lag trong tăng trưởng và độ dài của phase lag phụ thuộc vào nồng độ muối và mức độ thay đổi của độ muối. Nồng độ carotene tăng sau ức chế muối cao, độ dài của phase lag phụ thuộc vào độ muối ban đầu và mức độ thay đổi của độ muối, tuy nhiên tốc độ tổng hợp carotene và nồng độ carotene phụ thuộc vào độ muối cuối cùng. Sự tăng hàm lượng carotene tổng là do sự tăng hàm lượng β-carotene [3]. Carotenoid từ *D. salina* có hoạt tính chống oxy hóa cao, *all-trans*-β-carotene và 9-/90-*cis*- β-carotene là carotenoid chính ở tảo. Carotenoid ở dạng *cis*, đặc biệt 9-/90-*cis*- β-carotene đóng vai trò chống oxy hóa chính trong dịch trích của tảo [4].

Nhiều nghiên cứu cho thấy trong điều kiện stress oxy hóa *D. salina* tăng tích lũy lipid. Bên cạnh đó, trong điều kiện nuôi cấy tối ưu gây stress oxy hóa bằng cách sử dụng H_2O_2 dẫn đến tăng hàm lượng lipid nội bào lên đến 44% so với mẫu đối chứng không có xử lý. Stress oxy hóa và sự tăng sản xuất lipid có mối liên kết với nhau, stress oxy hóa là trung gian gây tích lũy lipid [5]. Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu hiệu quả kết hợp H_2O_2 một yếu tố stress oxy hóa ngoại sinh và các điều kiện ức chế khác ở ba chủng *D. salina* tạo cơ sở cho nuôi cấy ứng dụng để làm tăng hàm lượng carotene trong các hệ thống mở.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Chủng Dunaliella salina

Hai chủng *Dunaliella salina* var. *bardawil* DCCBC 15 (*D. bardawil* DCCBC 15) và *Dunaliella salina* CCAP 19/18 được cung cấp bởi TS. Juergen E. W. Polle, Phòng Sinh học – Trường Đại học Brooklyn, New York, Hoa Kì. *D. salina* A9 được phân lập từ mẫu thu thập ở vùng ruộng muối Vĩnh Hảo, Bình Thuận.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

D. salina được nuôi cấy trên môi trường MD4 1,5M NaCl gồm 2 giai đoạn:

Giai đoạn nuôi tăng trưởng: Các chủng *D. salina* nuôi trên điều kiện ánh sáng trắng 50 µmol photon/m^2/s.

Giai đoạn nuôi ức chế: Sau 10 ngày nuôi cấy tăng trưởng *D. salina* được chuyển sang điều kiện ức chế khác nhau: 12,5 µM H_2O_2, H_2O_2 (12,5 µM) kết hợp với ánh sáng 300 µmol photon/m^2/s (H_2O_2 – AS) và H_2O_2 (12,5 µM) kết hợp với độ muối cao 4M NaCl (H_2O_2 – NaCl).

Các thí nghiệm thực hiện ở nhiệt độ 25 ± 2^0C và được lặp lại 3 lần.

2.3. Quan sát hình thái tế bào Dunaliella salina

Hình thái tế bào *Dunaliella* được quan sát dưới KHV quang học (X40).

2.4. Xác định sự tăng trưởng tế bào Dunaliella salina

Mật độ tế bào tảo được đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu. 200 µL mẫu tảo được lấy và cố định bằng lugol mỗi 2-3 ngày. Số lượng tế bào được đếm bằng buồng đếm hồng cầu có độ sâu 0,1 mm và diện tích ô vuông 1 mm^2. Mật độ tế bào trong 1 mL được tính theo công thức [6].

$D = \frac{n}{i}.10^4$x hệ số pha loãng

trong đó, n: tổng số tế bào đếm được

i: diện tích đếm

D: mật độ tế bào (tế bào/mL).

Tốc độ tăng trưởng được tính theo công thức [7]:

$\mu = \ln(N_1/N_0)/(t_1-t_0)$

trong đó, N_1, N_0: mật độ tế bào tại thời điểm 1 và 0

t_1, t_0: thời điểm 1 và 0.

2.5. Xác định hàm lượng carotenoid tổng

Lấy 1 mL dịch nuôi cấy, li tâm ở 1000×g trong 5 phút, phần tảo bên dưới được li trích với 3 mL ethanol: hexane (2:1 v/v). Thêm vào 2 mL H_2O và 4 mL hexane, lắc mạnh. Hỗn hợp li trích này được li tâm 1000×g trong 5 phút. Lớp sắc tố có hexane bên trên được đọc ở các bước sóng 450 nm, 662 nm và 645 nm. Hàm lượng carotenoid tổng được xác định theo công thức: Carotenoid (µg/mL) = A_{450} x 25,2 [8], [9].

Hàm lượng diệp lục tố a và b được xác định theo [10]:

Diệp lục tố a (µg/mL) = 11,75 (A662) – 2,35 (A645)

Diệp lục tố b (µg/mL) = 18,61 (A645) – 3,96 (A662)

Diệp lục tố tổng (µg/mL) = diệp lục tố a + diệp lục tố b

Trong đó: A645: độ hấp thụ ở bước sóng 645

A662: độ hấp thu ở bước sóng 662.

2.6. Xác định hàm lượng lipid bằng phương pháp Sulfo-Phospho-Vanillin

Thuốc thử Phosphovanillin: Hòa tan 0,06 g vanillin trong 2 mL ethanol nguyên chất, thêm 8 mL nước cất và lắc kĩ. Thêm 50 mL dung dịch acid phosphoric đậm đặc vào hỗn hợp trên và bảo quản trong tối cho quá trình phân tích [11], [12].

Xác định hàm lượng lipid ở *Dunaliella salina*: li tâm 1 mL dịch nuôi tảo ở 6000 rpm, 4^0C, 10 phút; phần cắn tế bào được li trích với 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách thủy 100^0C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung

5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37^0C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm [11], [12].

Đường chuẩn lipid: Dầu cải thương mại (hiệu Tường An) được pha trong chloroform (nồng độ 1 mg/mL), nồng độ lipid chuẩn (10-150 µg) được thực hiện trong các ống nghiệm có nắp. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ 90^0C, 10 phút để bay hơi chloroform. Thêm 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách thủy 100^0C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung 5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37^0C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm.

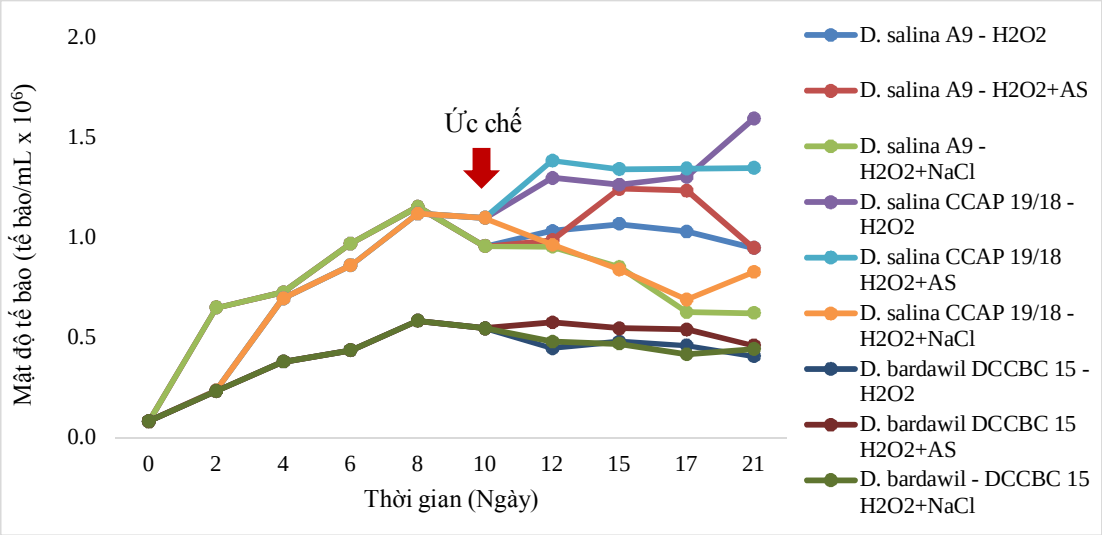
2.7. Xử lí số liệu

Số liệu được xử lí bằng Microsoft office Excel 2013 và phân tích one way ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Sự tăng trưởng của Dunaliella salina

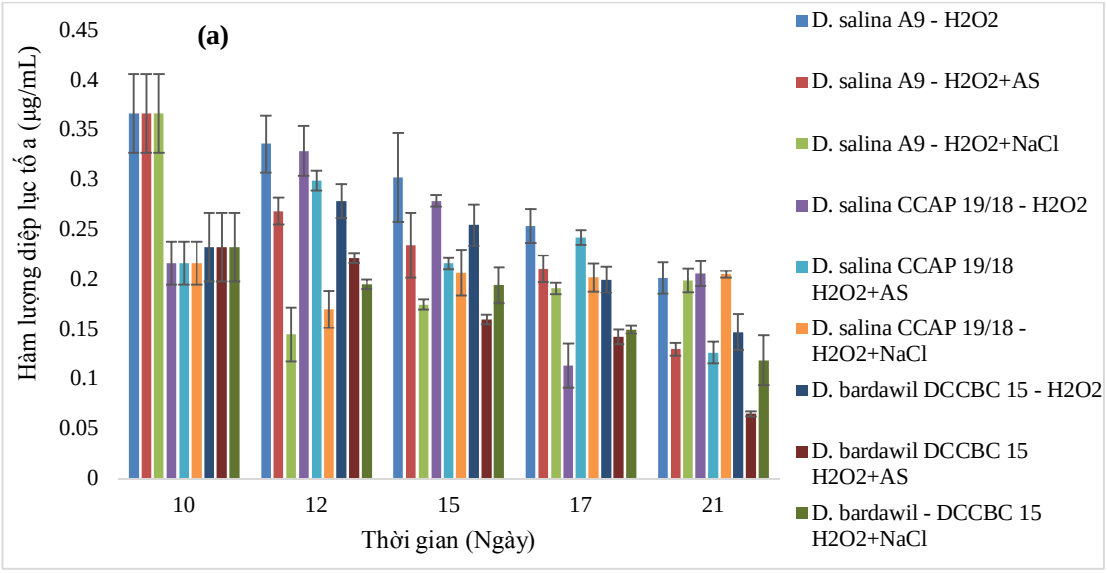
Trong giai đoạn nuôi cấy tăng trưởng tốc độ tăng trưởng của hai chủng *D. salina* A9 và *D. salina* CCAP 19/18 ($\mu = 0,333$/ngày và $\mu = 0,328$/ngày) cao hơn so với *D. bardawil* DCCBC 15 ($\mu = 0,243$/ngày) ($p = 0,018$). Ngoài ra, mật độ tế bào của ba chủng *D. salina* cũng không có sự khác biệt ý nghĩa ($p = 0,174$). Trong giai đoạn ức chế với các điều kiện ức chế khác nhau cho thấy: ở *D. salina* A9 điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp độ muối cao mật độ tế bào giảm so với hai điều kiện ức chế còn lại ($p = 0,016$); tương tự ở *D. salina* CCAP 19/18 điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp độ muối cao mật độ tế bào giảm so với hai điều kiện ức chế còn lại và có sự khác biệt ý nghĩa ($p = 0,000$); ở *D. bardawil* DCCBC 15 mật độ tế bào hầu như không có sự thay đổi sau ức chế giữa các điều kiện ức chế ($p = 0,021$) (Hình 1). Theo Xu và cộng sự, khi ức chế ánh sáng cao từ 200-1500 µmol/m^2/s cho thấy bốn chủng *D. salina* có sự thay đổi hình dạng tế bào từ hình oval sáng hình cầu, từ tế bào màu xanh sang màu cam [13]. Ở *D. tertiolecta* sự quang ức chế thực sự xảy ra trong thời gian ngắn (6 giờ đầu) sau ức chế ánh sáng cao (1000, 1500 và 2000 µmol/m^2/s), tuy nhiên sau 2 ngày ức chế ánh sáng cao liên tục *D. tertiolecta* đáp ứng được với điều kiện ánh sáng cao này và tốc độ tăng trưởng đạt được như điều kiện ánh sáng thấp. Điều này cho thấy *D. tertiolecta* có thể đáp ứng với phổ rộng ánh sáng cao từ 50-2000 µmol photons/m^2/s [14]. Theo Yilancioglu và cộng sự, khi xử lí H_2O_2 ngoại sinh nồng độ từ 200µM-4mM cho thấy sự sống sót của tế bào *D. salina* giảm dần, tuy nhiên nồng độ ROS và lipid tăng cao [5].

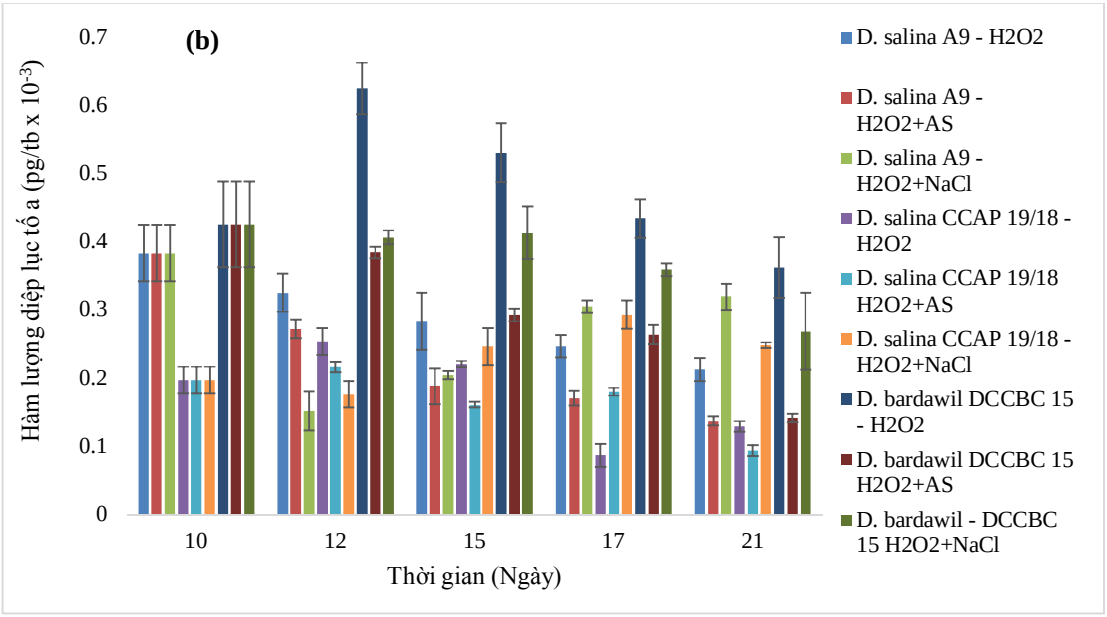


Hình 1. *Sự tăng trưởng của D. salina dưới các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau*

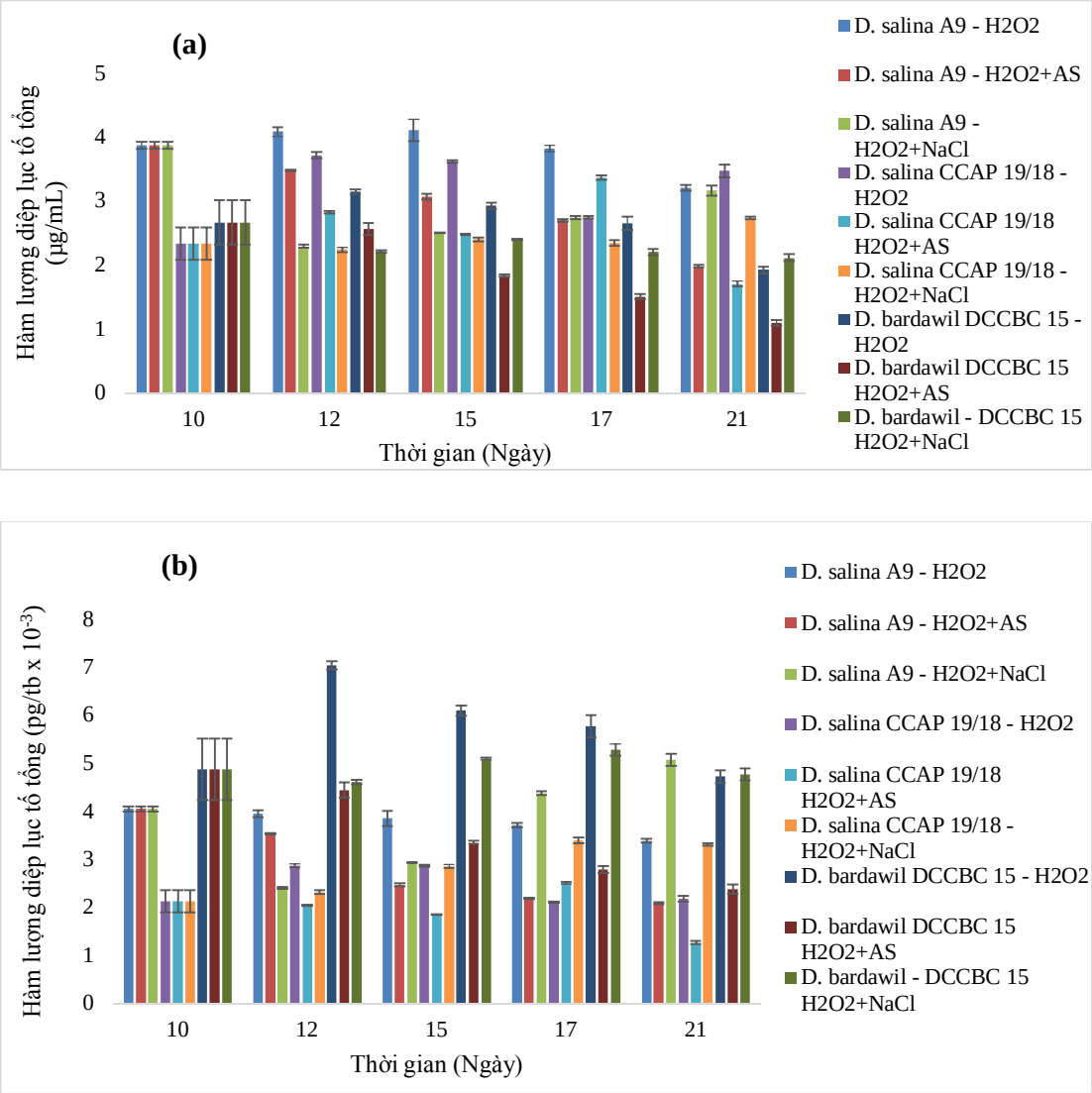
3.2. Hàm lượng diệp lục tố

Hàm lượng diệp lục tố a và diệp lục tố tổng (trên thể tích và tế bào) của ba chủng *D. salina* trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp với ánh sáng cao giảm và có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,005$). Tương tự ở *D. salina* A9 trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp độ muối cao 4M NaCl và *D. salina* CCAP 19/18 trong điều kiện ức chế H_2O_2 hàm lượng diệp lục tố cũng giảm và có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,005$). Trong khi đó, hàm lượng diệp lục tố của *D. salina* CCAP 19/18 trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp độ muối cao 4M NaCl, *D. bardawil* DCCBC 15 trong các điều kiện ức chế H_2O_2 riêng rẽ và H_2O_2 kết hợp độ muối cao 4M NaCl không có sự thay đổi rõ rệt sau ức chế ($p > 0,005$) (Hình 2, 3). Ở *D. tertiolecta* trong điều kiện ức chế ánh sáng cao 1000, 1500 và 2000 µmol photons/m^2/s, hàm lượng diệp lục tố thấp hơn so với điều kiện đối chứng (50 µmol photons/m^2/s); và tỉ lệ F_v/F_m giảm trong 5 giờ đầu ức chế và sau đó bắt đầu tăng trở lại. Ngoài ra, sau 2 ngày nuôi cấy, tỉ lệ F_v/F_m không có khác biệt giữa các điều kiện độ muối khác nhau khi nuôi trong điều kiện nuôi ánh sáng thấp; tuy nhiên tỉ lệ này có sự khác biệt giữa các độ muối khi nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng cao. Sự giảm tỉ lệ F_v/F_m cho thấy tế bào *D. tertiolecta* bị quang ức chế trong điều kiện ánh sáng cao [14].





Hình 2. *Hàm lượng diệp lục tố a trên thể tích (a) và trên tế bào (b) của D. salina dưới các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau*

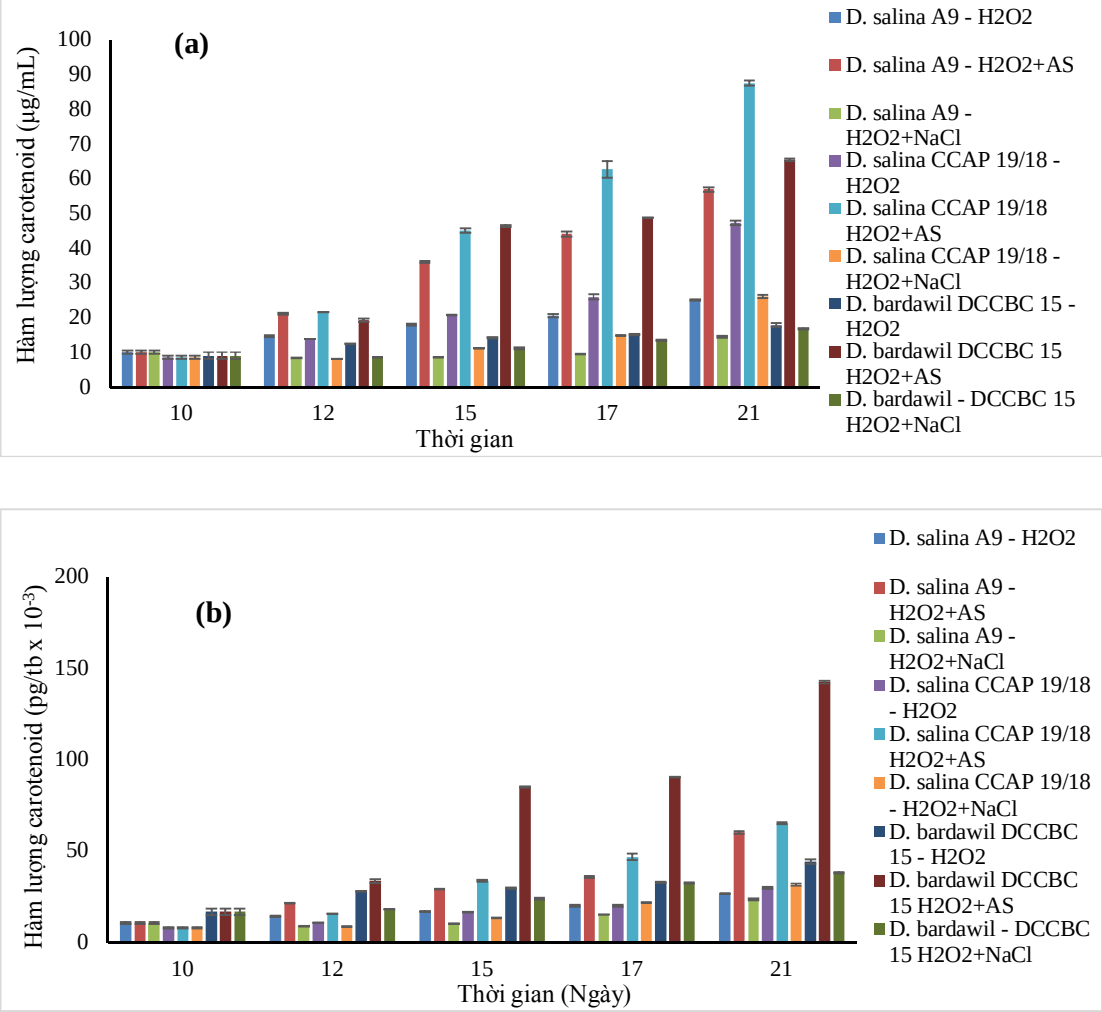


Hình 3. *Hàm lượng diệp lục tố tổng trên thể tích (a) và trên tế bào (b) của D. salina dưới các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau*

3.3. Hàm lượng carotenoid

Hàm lượng carotenoid trên thể tích và tế bào của ba chủng *D. salina* tăng sau ức chế dưới tất cả các điều kiện và có sự khác biệt ý nghĩa (p = 0,000). Hàm lượng carotenoid trên thể tích và trên tế bào của ba chủng *D. salina* trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp ánh sáng cao ở ngày 21 (*D. salina* A9: 56,969 µg/mL, 60,178x10^{-3} pg/tb; *D. salina* CCAP 19/18: 87,545 µg/mL, 65,008 x10^{-3} pg/tb; *D. bardawil* DCCBC 15: 65,470 µg/mL, 142,325 x10^{-3} pg/tb) cao hơn các điều kiện ức chế ức chế còn lại (p = 0,000). Ở ngày 21, hàm lượng carotenoid trên thể tích của *D. salina* CCAP 19/18 và trên tế bào của *D. bardawil* DCCBC 15 dưới điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp ánh sáng cao đạt cao nhất và hơn

so với các điều kiện còn lại (p = 0,000) (Hình 4). Kết quả cho thấy trong các điều kiện ức chế kết hợp có ánh sáng cao gây ra sự tích lũy carotenoid cao hơn các điều kiện ức chế khác. β-caroten được sản xuất lượng lớn ở *D. salina* khi đáp ứng với cường độ ánh cao; sự sản xuất carotenoid gắn với sự hình thành các giọt lipid và giảm nồng độ acid béo không bão hòa, tăng tích lũy các acid béo đặc hiệu (C16:0 và C18:1) [15]. Ở vi tảo sự sản xuất carotenoid liên quan đến cơ chế đáp ứng tổn thương oxy hóa của tế bào; trong điều kiện ức chế ánh sáng cao và cạn kiệt nitrogen hoặc kết hợp cả hai điều kiện có thể làm tăng tổn thương oxy hóa gây ra tăng tổng hợp carotenoid *D. bardawil* [16].

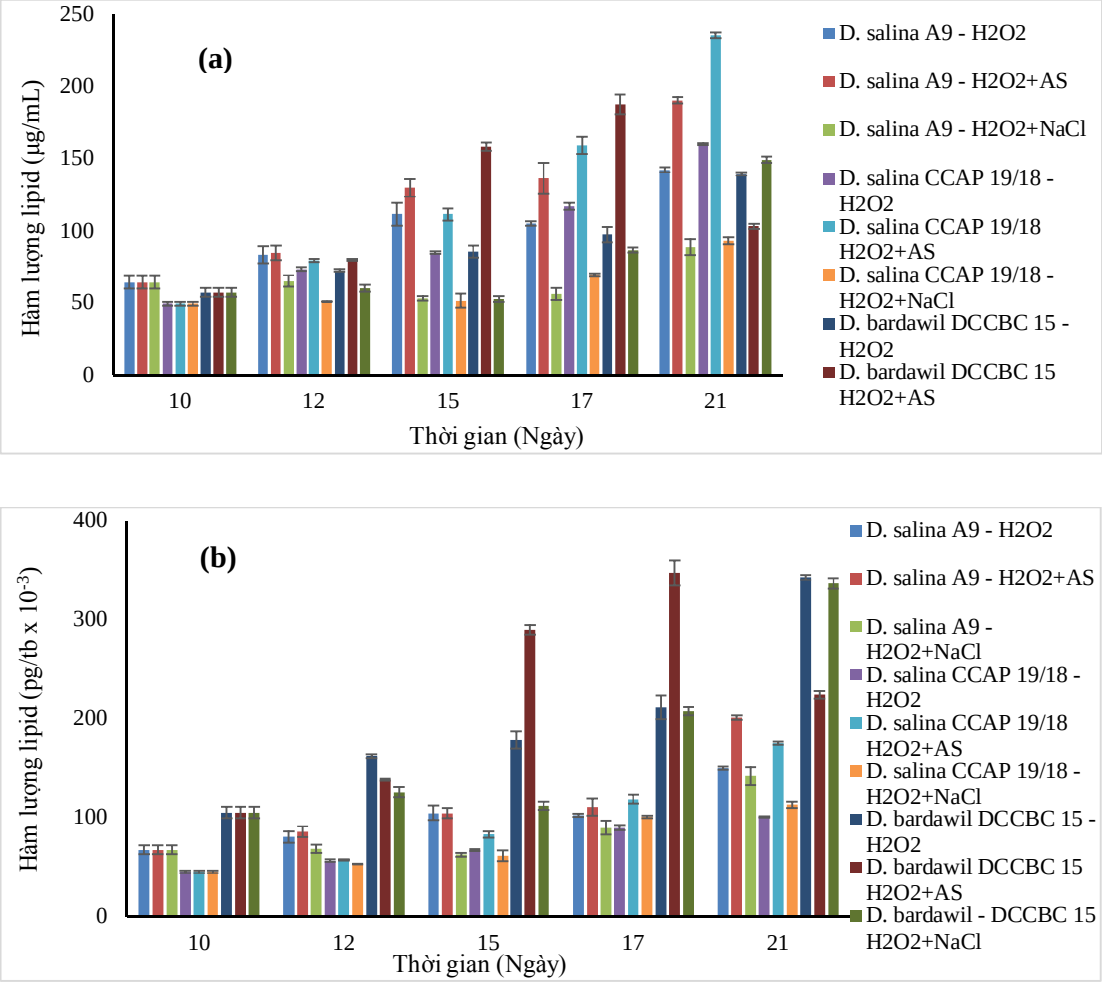


Hình 4. *Hàm lượng carotenoid trên thể tích (a) và trên tế bào (b) của D. salina dưới các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau*

3.4. Hàm lượng lipid

Tương tự hàm lượng carotenoid, hàm lượng lipid của ba chủng *D. salina* cũng tăng cao sau ức chế (p = 0,000). Trong đó, hàm lượng lipid trên thể tích của *D. salina* CCCAP 19/18 (235,620 µg/mL) trong điều kiện ức chế H_2O_2 kết hợp ánh sáng cao và hàm lượng

lipid trên tế bào của *D. bardawil* DCCBC 15 ở cả ba điều ức chế đạt nồng độ cao (342,508x10^{-3}, 224,246 x10^{-3}, 336,737 x10^{-3} pg/tb theo thứ tự) tại ngày 21 của quá trình nuôi cấy (p = 0,000) (Hình 5). Nhiều nghiên cứu cho thấy, ở vi tảo như *Dunaliella*, *Haematococcus* carotenoid thứ cấp và lipid được tổng hợp đồng thời trong các điều kiện nuôi cấy bất lợi. Vi tảo có tỉ lệ diện tích bề mặt/thể tích cao, tạo điều kiện đáp ứng nhanh với những điều kiện môi trường thay đổi và chúng có thể thay đổi nhanh sự chuyển hóa lipid trong các điều kiện môi trường này như ức chế muối. Các thí nghiệm ức chế muối dài hạn (2 tuần) có thể cho phép sự đáp ứng di truyền gây ra sự tổng hợp các protein cảm ứng muối và sự biểu hiện các gene ức chế muối [17]. Hầu hết vi tảo có khả năng tích lũy lượng lớn lipid trong phase cân bằng hay phase suy vong hơn tế bào ở phase tăng trưởng. Sự suy vong của tảo dẫn đến thay đổi trong con đường sinh tổng hợp lipid từ màng lục lạp hay các màng tế bào khác đến đến lipid trung tính dự trữ [18].



Hình 5. *Hàm lượng lipid trên thể tích (a) và trên tế bào (b) của D. salina dưới các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau*

4. Kết luận

Sự tăng trưởng của ba chủng *D. salina* có sự thay đổi khác nhau khi ức chế H_2O_2 kết hợp ánh sáng cao và độ muối cao. Trong các điều kiện ức chế có sự kết hợp ánh sáng cao cho thấy các chủng *D. salina* đạt hàm lượng carotenoid, lipid cao; tuy nhiên hàm lượng diệp lục tố giảm.

❖ ***Tuyên bố về quyền lợi:*** *Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Singh, M. Baranwal and S. M. Reddy, "Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by Dunaliella salina under stress," *Pharm Biol, 54*, pp. 2269-75, Oct 2016.

[2] P. P. Lamers, M. Janssen, R. C. De Vos, R. J. Bino and R. H. Wijffels, "Exploring and exploiting carotenoid accumulation in Dunaliella salina for cell-factory applications," *Trends Biotechnol, 26*, pp. 631-8, Nov 2008.

[3] Michael A. Borowitzka, Lesley J. Borowitzka, and D. Kessly, "Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga Dunaliella salina," *Journal of Applied Phycology, 2*, pp. 111-119, 1990.

[4] C. C. Hu, J. T. Lin, F. J. Lu, F. P. Chou and D. J. Yang, "Determination of carotenoids in Dunaliella salina cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract," *Food Chem, 109*, pp. 439-46, Jul 15 2008.

[5] K. Yilancioglu, M. Cokol, I. Pastirmaci, B. Erman and S. Cetiner, "Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated Dunaliella salina strain," *PLoS One, 9*, p. e91957, 2014.

[6] R. R. Guillard and M. S. Sieracki, "Counting cells in cultures with the light microscope," *Algal culturing techniques*, pp. 239-252, 2005.

[7] N. R. Moheimani, M. A. Borowitzka, A. Isdepsky, and S. F. Sing, "Standard methods for measuring growth of algae and their composition," in *Algae for biofuels and energy*, ed: Springer, 2013, pp. 265-284.

[8] A. Shaish, A. Ben-Amotz, and M. Avron, "[41] Biosynthesis of β-carotene in Dunaliella," in *Methods in Enzymology*. *213*, ed: Academic Press, 1992, pp. 439-444.

[9] A. Prieto, J. Pedro Canavate and M. Garcia-Gonzalez, "Assessment of carotenoid production by Dunaliella salina in different culture systems and operation regimes," *J Biotechnol, 151*, pp. 180-5, Jan 20 2011.

[10] H. K. Lichtenthaler and W. A. R., "Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents," *Biochemical Society Transactions, 11*, pp. 591-592, 1983.

[11] S. K. Mishra, W. I. Suh, W. Farooq, M. Moon, A. Shrivastav, M. S. Park, *et al.*, "Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method," *Bioresour Technol, 155*, pp. 330-3, Mar 2014.

[12] Jaeyeon Park, Hae Jin Jeong, Eun Young Yoon and S. J. Moon, "Easy and rapid quantifcation of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method," *Algae, 31*, 2016.

[13] Y. Xu, I. M. Ibrahim, C. I. Wosu, A. Ben-Amotz and P. J. Harvey, "Potential of New Isolates of Dunaliella Salina for Natural beta-Carotene Production," *Biology (Basel), 7*, Feb 1 2018.

[14] J. Seepratoomrosh, P. Pokethitiyook, M. Meetam, K. Yokthongwattana, W. Yuan, W. Pugkaew, *et al.*, "The Effect of Light Stress and Other Culture Conditions on Photoinhibition and Growth of Dunaliella tertiolecta," *Appl Biochem Biotechnol, 178*, pp. 396-407, Jan 2016.

[15] P. P. Lamers, C. C. van de Laak, P. S. Kaasenbrood, J. Lorier, M. Janssen, R. C. De Vos, *et al.*, "Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed Dunaliella salina," *Biotechnol Bioeng, 106*, pp. 638-48, Jul 01 2010.

[16] A. Salguero, B. de la Morena, J. Vigara, J. M. Vega, C. Vilchez and R. Leon, "Carotenoids as protective response against oxidative damage in Dunaliella bardawil," *Biomol Eng, 20*, pp. 249-53, Jul 2003.

[17] S. Mixson Byrd, J. M. Burkholder and P. V. Zimba, "Environmental stressors and lipid production by Dunaliella spp. I. Salinity," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 487*, pp. 18-32, 2017.

[18] S. Mixson Byrd and J. M. Burkholder, "Environmental stressors and lipid production in Dunaliella spp. II. Nutrients, pH and light under optimal or low salinity," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 487*, pp. 33-44, 2017.