

بهینه سازی رشد و میزان چربی و کلروفیل ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در سطوح مختلف نیتروژن، فسفر و دوره نوری با استفاده از طراحی مرکب مرکزی (CCD)

آریا وزیرزاده*^۱ و حامد مقدس زاده^۱

*vazirzadeh@shirazu.ac.ir

۱- بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۷

چکیده

در این پژوهش، تاثیر غلظت نیترات (۲۲۵۰-۷۵۰ میلی گرم بر لیتر)، غلظت فسفات (۶۰-۲۰ میلی گرم بر لیتر) و دوره نوری (۲۴-۸ ساعت روشنایی) بر رشد و میزان چربی و کلروفیل ریزجلبک *Chlorella vulgaris* با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی (CCD) مورد بررسی قرار گرفت. صحت مدل کوادراتیک مورد استفاده برای توصیف تاثیر متغیرهای ورودی در پاسخ‌های مشاهده شده با استفاده از آزمون F و آنالیز واریانس و آنالیز رگرسیون تایید شد. نتایج این تحقیق نشان داد که حداکثر نرخ رشد (۲۵۵/۸۸ میلیون سلول در میلی لیتر) و همچنین حداکثر کلروفیل کل (۱۵/۳۴ درصد) در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، غلظت اولیه نیترات (۱۵۰۰ میلی گرم بر لیتر) و غلظت اولیه فسفات (۴۰ میلی گرم بر لیتر) حاصل شد. حداکثر میزان چربی کل (۱۷/۷۴ درصد) در دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی، غلظت اولیه نیترات (۷۵۰ میلی گرم بر لیتر) و غلظت اولیه فسفات (۲۰ میلی گرم بر لیتر) حاصل شد. غلظت‌های بهینه نیترات و فسفات و دوره نوری جهت دستیابی همزمان به حداکثر تراکم سلولی، کلروفیل کل و چربی کل نیز مورد بررسی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: شرایط محیطی و تغذیه‌ای، کلرلا ولگاریس، ترکیبات بیوشیمیایی

*نویسنده مسئول

مقدمه

جلبک‌ها امروزه کاربردهای فراوانی در زندگی انسان‌ها دارند که از جمله برای تامین غذای انسان و حیوان و آبزیان، در صنایع بهداشتی و دارویی، در صنایع تصفیه فاضلاب و اخیراً برای تامین سوخت استفاده می‌شوند. در شرایط عادی و اپتیمم پرورش، درصد چربی و نوع ترکیب جلبکها برای سوخت چندان مناسب نیست. لذا سعی می‌شود با ایجاد برخی تغییرات تغذیه‌ای و محیطی درصد چربی ریزجلبک‌ها را افزایش داد (Yoshioka et al., 2012). هنگامی که شرایط محیطی ریزجلبک‌ها پائین‌تر از حد ایده آل باشد واکنش ریزجلبک‌ها تغییر الگوی متابولیتی است. لذا زمانی که ریزجلبک‌ها تحت شرایط استرس محیطی باشند ترکیبات مواد مغذی تولیدی آنها تغییر می‌نماید. در مطالعات گذشته ثابت شده است که تغییر در میزان نیترات در درجه اول و تغییر فسفات و دوره نوری و سایر مواد مغذی با درجات کمتر منجر به تغییر متابولیت‌های جلبکها می‌گردد. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که کمبود نیترات منجر به کاهش قابل ملاحظه درصد پروتئین و در عوض افزایش زیاد درصد چربی جلبکها بخصوص از نوع تری گلیسیرید و اسیدهای چرب غیراشباع می‌گردد (Saha et al., 2013). ولی کاهش فسفات منجر به افزایش میزان کربوهیدرات جلبک‌ها می‌گردد. لذا با توجه نوع هدف می‌توان با ایجاد شرایط محیطی و تغذیه‌ای متنوع به ترکیبات و مواد متنوع دست یافت. در واقع، امروزه جلبک‌ها راکتورهای زیستی محسوب می‌گردند که برحسب نوع مواد ورودی به محیط کشت، متابولیت‌های اولیه و ثانویه نهایی تولیدی توسط جلبک مشخص می‌گردد. (Markou and Nerantzis, 2013). ذکر این نکته ضروری است که اگرچه با ایجاد کمبودهای تغذیه‌ای از قبیل فقر نیترات می‌توان میزان چربی جلبک‌ها را به حدی افزایش داد که قابل استفاده بعنوان سوخت‌های زیستی باشند، اما کمبود مواد مغذی همزمان منجر به کاهش شدید رشد جلبک‌ها نیز می‌گردد. لذا نیاز به تحقیقات جهت یافتن شرایط بهینه برای رشد جلبکها به منظور بهینه کردن شرایط می‌باشد بگونه‌ای که نه تنها درصد چربی جلبک افزایش

یابد بلکه رشد جلبک نیز در حدی باشد که از نظر اقتصادی و در مجموع تولید کل بیوماس ضربدر درصد چربی جلبک، در حد قابل قبولی باشد. مشکلی که برای مطالعه همزمان چند عامل وجود دارد نیاز به تکرار و تیمارهای زیاد و در نتیجه هزینه‌های زیاد می‌باشد که گاهی امکان انجام آنرا ناممکن می‌سازد (Chu et al., 2013). در سالهای اخیر روشهای جدیدی برای جایگزین روش‌های مطالعه سنتی شده است که یکی از این روش‌ها استفاده از تکنیک رویه سطح پاسخ (Response surface methodology (RSM) می‌باشد (Xin et al., 2010).

لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر سطوح مختلف منبع نیتروژن، فسفر و دوره نوری بر همکنش آنها بر رشد و میزان چربی و کلروفیل ریزجلبک *C. vulgaris* با استفاده از رویه سطح پاسخ و طراحی مربع مرکزی و گزارش تیمارهای با بیشینه رشد و بیشینه تولید چربی و کلروفیل می‌باشد.

مواد و روش کار**تهیه و کشت ریز جلبک *C. vulgaris***

استوک اولیه‌ی ریزجلبک *C. vulgaris* از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد و به منظور کشت و پرورش به بخش مهندسی و منابع طبیعی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انتقال یافت. محیط کشت BG-11 در شرایط استریل جهت کشت اولیه ریزجلبک استفاده شد.

طراحی آزمایش و تعیین سطوح مختلف نیترات، فسفات و دوره نوری

سه متغیر اصلی شامل: غلظت اولیه نیترات، غلظت اولیه فسفات و دوره نوری، برای بررسی مقدار تاثیر گذاری بر متغیرهای پاسخ، در نظر گرفته شد. برای بررسی تاثیر همزمان متغیرهای ورودی بر متغیرهای خروجی مورد نظر در سه سطح پایین (-۱)، متوسط (۰) و بالا (+۱) از طرح آماری رویه سطح پاسخ (Response Methodology)

جدول ۱: دامنه تغییرات نیترات، فسفات و دوره نوری واحدهای آزمایشی

Table 1: Range of input variables including nitrate, phosphate and photoperiod.

دامنه			فاکتور
+۱	۰	-۱	
۲۲۵۰	۱۵۰۰	۷۵۰	نیترات (میلی گرم/لیتر)
۶۰	۴۰	۲۰	فسفات (میلی گرم/لیتر)
۲۴	۱۶	۸	دوره نوری (ساعت)

Design Expert (version Surface) با کمک نرم افزار (8.0.3) و به شیوه طراحی مرکب مرکزی استفاده شد (جدول ۱). در این طرح آماری برای انجام آزمایشات مورد نظر با سه متغیر ورودی در سه سطح معین شده، در مجموع ۲۰ آزمایش توسط نرم افزار آماری پیشنهاد شد (جدول ۲).

جدول ۲. مقادیر پیشنهادی متغیرهای ورودی طراحی مرکب مرکزی و مقادیر واقعی و پیش بینی شده برای پاسخ های تعداد سلول،

میزان کلروفیل و درصد چربی در ریز جلبک *C. vulgaris*

Table 2: Predicted and observed values of response variables including cell count, total chlorophyll and total lipid in *C. vulgaris*

شماره آزمایش	مقادیر متغیرهای فرآیند			تعداد سلول ریز جلبک (میلیون در میلی لیتر)		کلروفیل کل (میلی گرم بر لیتر)		چربی (%)	
	X ₁	X ₂	X ₃	تخمین	آزمایش	تخمین	آزمایش	تخمین	آزمایش
۱	۱۵۰۰	۴۰	۱۶	۹۷/۱۶	۹۱/۸۸	۴/۶۷	۴/۹۱	۹/۵۲	۹/۳۸
۲	۱۵۰۰	۲۰	۱۶	۹۳/۸۲	۸۷/۲۸	۳/۸۶	۳/۶۵	۷/۳۶	۸/۱۷
۳	۱۵۰۰	۴۰	۱۶	۸۷/۱۴	۹۱/۲۸	۴/۲۱	۳/۶۶	۱۰/۴۶	۱۰/۵۸
۴	۲۲۵۰	۲۰	۸	۱۰۰/۰۰	۱۱۳/۸۸	۳/۸۴	۵/۵۷	۸/۶۰	۸/۲۵
۵	۷۵۰	۲۰	۲۴	۱۵۲/۷۶	۱۴۱/۰۸	۹/۱۱	۷/۷۱	۱۷/۰۳	۱۷/۷۴
۶	۲۲۵۰	۲۰	۲۴	۱۸۸/۲۲	۱۸۶/۲۸	۱۱/۳۰	۱۲/۱۸	۱۲/۰۴	۱۲/۲۸
۷	۷۵۰	۲۰	۲۴	۱۲۶/۷۴	۱۳۵/۴۸	۷/۱۲	۷/۶۸	۱۶/۰۴	۱۵/۵۸
۸	۲۲۵۰	۶۰	۸	۱۷۸/۴۰	۱۸۵/۸۸	۹/۷۴	۹/۸۴	۱۱/۳۴	۱۱/۸۳
۹	۲۲۵۰	۶۰	۲۴	۱۴۱/۰۰	۱۴۵/۰۸	۱۰/۵۲	۱۱/۶۸	۱۴/۶۸	۱۴/۴۵
۱۰	۷۵۰	۶۰	۸	۱۶۵/۱۶	۱۵۲/۲۸	۱۱/۴۳	۸/۹۲	۱۱/۲۵	۱۰/۰۵
۱۱	۱۵۰۰	۴۰	۱۶	۲۳۰/۴۴	۲۵۵/۸۸	۱۴/۸۵	۱۵/۳۴	۱۲/۹۶	۱۱/۳۳
۱۲	۱۵۰۰	۴۰	۲۴	۲۲۰/۵۲	۱۸۶/۲۸	۱۳/۸۴	۱۲/۰۱	۱۳/۰۹	۱۳/۲۸
۱۳	۱۵۰۰	۶۰	۱۶	۱۰۰/۲۸	۹۴/۰۸	۴/۵۶	۳/۳۵	۸/۷۷	۸/۳۲
۱۴	۱۵۰۰	۴۰	۱۶	۱۶۷/۲۸	۱۶۴/۶۸	۹/۷۳	۹/۵۹	۱۳/۸۹	۱۲/۹۰
۱۵	۷۵۰	۴۰	۱۶	۱۹۲/۱۵	۲۰۳/۸۸	۱۲/۸۶	۱۵/۲۳	۱۲/۸۹	۱۲/۹۴
۱۶	۷۵۰	۶۰	۲۴	۱۹۲/۱۵	۲۱۳/۸۸	۹/۴۳	۱۲/۲۵	۱۲/۸۹	۱۲/۱۸
۱۷	۱۵۰۰	۴۰	۱۶	۱۷۱/۱۳	۱۷۳/۲۳	۱۱/۸۷	۱۲/۲۳	۱۲/۸۹	۱۳/۴۹
۱۸	۱۵۰۰	۴۰	۸	۱۹۲/۱۵	۱۷۷/۸۸	۱۲/۸۶	۱۲/۷۷	۱۲/۸۹	۱۴/۵۲
۱۹	۲۲۵۰	۴۰	۱۶	۱۹۲/۱۵	۲۰۱/۸۸	۱۲/۸۶	۱۳/۰۹	۱۲/۸۹	۱۴/۱۱
۲۰	۱۵۰۰	۴۰	۱۶	۱۹۲/۱۵	۱۶۹/۰۸	۱۲/۸۶	۱۲/۶۲	۱۲/۸۹	۱۲/۹۵

X₁: غلظت اولیه نیترات (میلی گرم بر لیتر)؛ X₂: غلظت اولیه فسفات (میلی گرم بر لیتر)؛ X₃: دوره نوری (ساعت).

شمارش سلول‌های ریزجلبک

شمارش سلول‌های جلبک به دو روش لام هموسایتومتر و کدورت سنجی در طول موج ۶۸۰ نانومتر و با رسم منحنی استاندارد و هر ۱۲ ساعت یکبار انجام شد (فرامرزی و همکاران، ۱۳۸۹).

اندازه‌گیری نیترات و فسفات واکنشگر (ارتوفسفات)

میزان نیترات و فسفات نمونه‌ها به روش استاندارد (Greenberg and Clesceri, 1992) و با تهیه منحنی استاندارد و محلول‌های واکنشگر طبق دستورالعمل پیشنهادی و به روش رنگ‌سنجی سنجش شد.

سنجش چربی کل

میزان چربی کل به روش (Mujtaba et al., 2012) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۵۰ میلی لیتر نمونه در فاز ایستایی

برداشته و به مدت ۵ دقیقه در g ۱۷۰۰۰ سانتیفریوژ انجام گردید. پس از انجام سانتیفریوژ، محلول بالایی دور ریخته شد و محلول جدید با ترکیبات آب مقطر، کلروفرم و متانول با غلظت‌های (۱/۹، ۱، ۱)، به نمونه اضافه گردید. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه در g ۱۷۰۰۰ سانتیفریوژ انجام شد. نهایتاً جهت محاسبه چربی، تفاوت وزن نمونه قبل و بعد از حلال پرانی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کلروفیل

میزان کلروفیل به روش (Chen and Pei, 2016) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۲۰ میلی لیتر محلول ریزجلبک برداشته و در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید. پس از دورریختن مایع رویی و اضافه نمودن دی متیل فرمامید و سایر پروسه‌ای پیشنهادی پروتکل جذب نوری در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۴/۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شدند. محاسبه کلروفیل a و b به شیوه ذیل انجام می‌شود:

$$\begin{aligned} \text{جذب نوری طول موج } 647 \times (2/79) - (\text{جذب نوری در طول موج } 664/5 \times 12/7) &= \text{کلروفیل } a \\ \text{جذب نوری طول موج } 664/5 \times (4/62) - (\text{جذب نوری طول موج } 647 \times 20/7) &= \text{کلروفیل } b \\ \text{جذب نوری طول موج } 664/5 \times (8/80) + (\text{جذب نوری طول موج } 647 \times 17/90) &= \text{کلروفیل کل} \end{aligned}$$

نتایج

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین مقادیر راندمان واقعی و پیش‌بینی شده تفاوت کمی وجود دارد که نشان دهنده دقت بالای مدل در تخمین متغیر پاسخ (تعداد سلول ریزجلبک) است.

جدول آنالیز واریانس (ANOVA) که به منظور تایید اعتبار مدل جهت بررسی تعداد سلول ریزجلبک *C. vulgaris* مورد استفاده قرار گرفته است در جدول ۳ نشان داده شده است. پس از آنالیز واریانس، معادله رگرسیون بدست آمد که ضریب همبستگی^۱ بالای ۰/۹ را نشان می‌دهد.

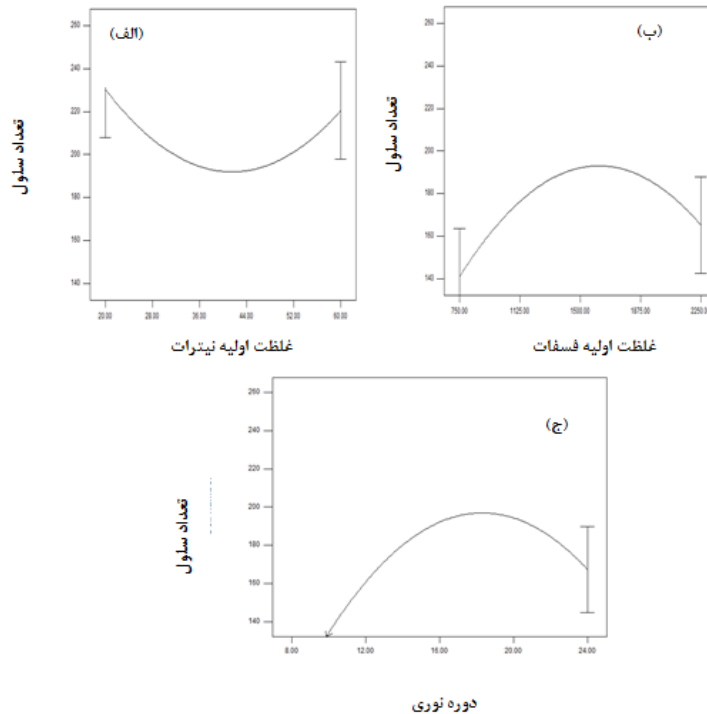
تأثیر متغیرهای اصلی فرآیند بر تعداد سلول**ریزجلبک *C. vulgaris***

تأثیر سطوح مختلف متغیرهای اصلی بر تعداد سلول ریزجلبک در (شکل ۱) نمایش داده شده است. شکل ۱ الف)، تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات بر تعداد سلول ریزجلبک را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت اولیه نیترات تا ۱۵۰۰ میلی گرم بر لیتر، تعداد سلول ریزجلبک افزایش می‌یابد، اما در ادامه با افزایش غلظت اولیه نیترات تعداد سلول ریزجلبک کاهش می‌یابد. شکل ۱ ب)، تأثیر غلظت‌های مختلف فسفات بر تعداد سلول ریزجلبک را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت اولیه فسفات از ۲۰ میلی گرم بر لیتر به ۴۰ میلی گرم بر لیتر، تعداد سلول ریزجلبک کاهش می‌یابد. اما با افزایش غلظت اولیه فسفات

¹ Residual

می‌دهد. با افزایش زمان نوردهی تا ۱۸ ساعت نرخ رشد و تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد و پس از آن روند نزولی در تعداد سلول ریزجلبک‌ها مشاهده می‌شود.

از ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر تعداد سلول‌های ریزجلبک افزایش می‌یابد. شکل (۱ ج)، تاثیر دوره نوری بر تعداد سلول ریزجلبک را نشان



شکل ۱. تاثیر متغیرهای اصلی فرآیند بر تعداد سلول ریزجلبک *C. vulgaris*

Figure 1: The effects of different levels of input variables on the cell count of *C. vulgaris*.

(ANOVA) که به منظور تایید اعتبار مدل جهت بررسی میزان کلروفیل کل در ریزجلبک *C. vulgaris* مورد استفاده قرار گرفته شده است در جدول ۳ نشان داده شده است. پس از آنالیز واریانس، معادله رگرسیون به دست آمد که ضریب همبستگی بالای ۰/۹۰ را نشان می‌دهد (جدول ۴).

تاثیر دوره نور بر میزان کلروفیل کل

شکل (۲)، تاثیر دوره نوری بر میزان کلروفیل کل را نشان می‌دهد. در این شکل همانطوریکه مشاهده می‌شود، با افزایش دوره نوری تا حدود ۱۸ ساعت، میزان کلروفیل افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد.

بهینه سازی متغیرهای فرآیند برای تعداد سلول ریزجلبک *C. vulgaris*

بهینه سازی تعداد سلول ریزجلبک در شرایطی بدست آمد که غلظت اولیه نیترات (۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، غلظت اولیه فسفات (۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) و دوره نوری (۱۶ ساعت) بودند. در این شرایط بهینه تعداد ریزجلبک ۲۵۵/۸۸ میلیون در میلی لیتر پیش‌بینی گردید.

بررسی میزان کلروفیل کل

همان‌گونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود بین مقادیر راندمان واقعی و پیش‌بینی شده تفاوت کمی وجود دارد که نشان دهنده دقت بالای مدل در تخمین متغیر پاسخ (میزان کلروفیل کل) است. جدول آنالیز واریانس

جدول ۳: تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) برای تعداد سلول ریزجلبک، میزان کلروفیل و درصد چربی در جلبک *C. vulgaris*

Table 3: ANOVA results for response variables including cell count, chlorophyll and lipid content.

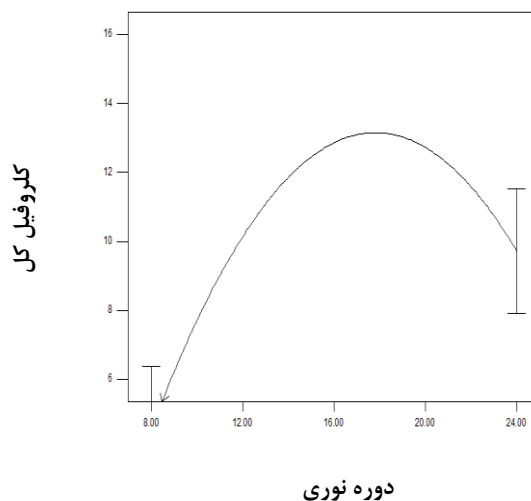
فاکتور پاسخ	منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	f مقدار	p مقدار
تعداد ریزجلبک	مدل	۳۸۳۶۲/۶۶	۹	۴۲۶۲/۵۱	۱۰/۲۰	۰/۰۰۰۶
	باقیمانده	۴۱۷۸/۰۱	۱۰	۴۱۷/۸۰		
	عدم برازش	۲۶۵۱/۶۱	۵	۵۳۰/۳۲	۱/۷۳	۰/۲۷
	خطای خام	۱۵۲۶/۴	۵	۳۰۵/۲۸		
	کل	۴۲۵۴۰/۶۸	۱۹			
کلروفیل	مدل	۲۶۷/۰۶	۹	۲۹/۶۷	۱۱/۰۳	۰/۰۰۰۴
	باقیمانده	۲۶/۹۰	۱۰	۲/۶۹		
	عدم برازش	۲۰/۳۸	۵	۴/۰۸	۳/۱۲	۰/۱۱۸۴
	خطای خام	۶/۵۲	۵	۱/۳۰		
	کل	۲۹۳/۹۷	۱۹			
چربی	مدل	۱۱۱/۳۸	۹	۱۲/۳۸	۱۰/۱۰	۰/۰۰۰۶
	باقیمانده	۱۲/۲۵	۱۰	۱/۲۲		
	عدم برازش	۸/۵۹	۵	۱/۷۲	۲/۳۴	۰/۱۸۵۶
	خطای خام	۳/۶۶	۵	۰/۷۳		
	کل	۱۲۳/۶۳	۱۹			

جدول ۴: نتایج تجزیه و تحلیل معادله رگرسیون برای متغیرهای پاسخ در ریزجلبک *C. vulgaris*

Table 4: Regression analysis for responses in *C. vulgaris*. Mean

تعداد ریزجلبک	انحراف از معیار	۲۰/۴۴	(ضریب همبستگی) R ²	۰/۹۰۱۸
میانگین ^۱	۱۶۰/۰۹	تنظیم شده R ²	۰/۸۱۳۴	
ضریب تغییرات (/.)	۱۲/۷۷	پیش بینی شده R ²	۰/۴۶۲۷	
باقیمانده پیش بینی شده	۲۲۸۵۵/۲۵	دقت کافی	۹/۹۱۴	
میزان کلروفیل	انحراف از معیار	۱/۶۴	(ضریب همبستگی) R ²	۰/۹۰۸۵
میانگین	۹/۸۰	تنظیم شده R ²	۰/۸۲۶۱	
ضریب تغییرات (/.)	۱۶/۷۴	پیش بینی شده R ²	۰/۲۸۳۹	
باقیمانده پیش بینی شده	۲۱۰/۵۲	دقت کافی	۹/۴۹۷	
درصد چربی	انحراف از معیار	۱/۱۱	(ضریب همبستگی) R ²	۰/۹۰۰۹
میانگین	۱۲/۲۲	تنظیم شده R ²	۰/۸۱۱۸	
ضریب تغییرات (/.)	۹/۰۶	پیش بینی شده R ²	۰/۴۳۳۵	
باقیمانده پیش بینی شده	۷۰/۰۴	دقت کافی	۱۲/۳۶۵	

¹ Mean



شکل ۲: تاثیر دوره نوری بر میزان کلروفیل کل در ریزجلبک *C. vulgaris*

Figure 2: The effects of photoperiod levels on the total chlorophyll content of *C. vulgaris*.

تاثیر متغیرهای اصلی فرآیند بر میزان چربی کل
تاثیر سطوح مختلف متغیرهای اصلی بر میزان چربی کل
در شکل ۳ نمایش داده شده است. شکل (۳ الف)، تاثیر
غلظت‌های مختلف نیترات بر میزان چربی کل نشان
می‌دهد. با افزایش غلظت اولیه نیترات میزان چربی کل
کاهش می‌یابد. شکل (۳ ب)،
تاثیر دوره نوری بر میزان چربی کل را نشان می‌دهد.
همان‌طوریکه در شکل مشاهده می‌شود با افزایش دوره
نوری تا حدود ۲۰ ساعت، میزان چربی کل افزایش می‌یابد
اما پس از آن روند ثابتی مشاهده می‌شود.

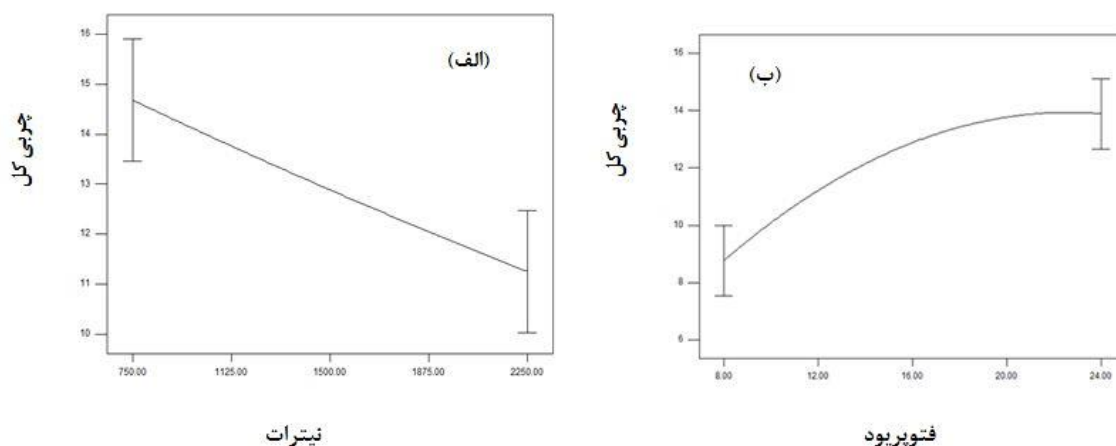
بهینه‌سازی متغیرهای فرآیند برای میزان چربی کل
بیشینه میزان چربی کل در شرایطی بدست آمد که غلظت
اولیه نیترات (۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، غلظت اولیه
فسفات (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و دوره نوری (۲۴ ساعت)
بودند. در این شرایط بیشینه میزان لیپد کل ۱۷/۷۴ درصد
پیش‌بینی گردید.

بهینه سازی متغیرهای فرآیند برای میزان کلروفیل
کل

بیشینه میزان کلروفیل کل در شرایطی به دست آمد که
غلظت اولیه نیترات (۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، غلظت
اولیه فسفات (۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) و دوره نوری
(۱۶ ساعت) بودند. در این شرایط بیشینه میزان کلروفیل
کل ۱۵/۲۳ میلی‌گرم بر لیتر پیش‌بینی گردید.

بررسی میزان چربی کل

همان‌طوریکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین مقادیر
راندمان واقعی و پیش‌بینی شده تفاوت کمی وجود دارد
که نشان دهنده دقت بالای مدل در تخمین متغیر پاسخ
(میزان چربی کل) است. جدول آنالیز واریانس
(ANOVA) که به منظور تایید اعتبار مدل جهت بررسی
میزان چربی کل توسط ریزجلبک *C. vulgaris* مورد
استفاده قرار گرفته شده است در جدول ۳ نشان داده
شده است. پس از آنالیز واریانس، معادله‌ی رگرسیون
بدست آمد که ضریب همبستگی بالای ۰/۹۰ را نشان
می‌دهد (جدول ۴).



شکل ۳: تاثیر سطوح مختلف متغیرهای اصلی بر میزان چربی کل ریزجلبک *C. vulgaris*.
Figure 3: The effects of different levels of input variables on the total lipid content of *C. vulgaris*.

بر طبق نتایج بدست آمده، با افزایش غلظت اولیه نیترات تا ۱۵۰۰ میلی گرم بر لیتر، تعداد سلول ریزجلبک افزایش می‌یابد اما در ادامه با افزایش غلظت اولیه نیترات تعداد سلول ریزجلبک کاهش می‌یابد. بطوریکه بیشترین تعداد سلول زمانی می‌باشد که غلظت اولیه نیترات در حد میانه باشد.

بهینه‌سازی متغیرهای فرآیند برای همه فاکتورهای مورد بررسی

بهترین سطوح متغیرهای اصلی فرآیند برای دستیابی به سطح بیشینه همه فاکتورهای مورد بررسی در ریزجلبک *C. vulgaris* در جدول (۵) ارائه شده است.

جدول ۵: سطوح اپتیمم متغیرهای اصلی فرآیند برای دستیابی به سطح بیشینه همه فاکتورهای مورد بررسی در ریزجلبک *C. vulgaris*

Table 5: optimum levels of input variables to achieve the maximum responses of all variables simultaneously.

تابع مطلوبیت	چربی کل (درصد)	کلروفیل کل (میلی گرم بر لیتر)	تعداد سلول ریزجلبک (میلیون در میلی لیتر)	دوره نوری (ساعت)	غلظت اولیه فسفات (میلی گرم بر لیتر)	غلظت اولیه نیترات (میلی گرم بر لیتر)
۰/۷۴	۱۵/۰۴۳۷	۱۳/۲۴۳۳	۱۹۵/۰۳۱	۱۶/۹۸	۲۰	۸۳۲/۸۲

نرخ رشد ریزجلبک بود. همچنین نتایج پژوهش (Guo et al., 2014) نشان داد که رشد جلبک در غلظت صفر متوقف شد و با افزایش میزان نیتروژن تعداد سلول ریزجلبک افزایش یافت. غلظت فسفات محیط یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده نرخ رشد و تراکم سلولی ریزجلبک‌هاست. در آزمایش‌های انجام شده با غلظت‌های متفاوت نیترات و فسفات، به دلیل بالاتر یا پائین تر رفتن نسبت N:P از مقدار بهینه (N:P = ۱:۴۵ - ۱:۳۰)، در غلظت‌های ۲۰-۴۰

بحث

به طور کلی محدودیت یا عدم وجود نیتروژن در محیط کشت به طور قابل توجهی رشد جلبک‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با افزایش غلظت اولیه نیتروژن، افزایش پدیده سایه اندازی رخ می‌دهد و در نتیجه باعث کاهش نرخ رشد ریزجلبک می‌شود. در یک تحقیق (Zhu et al., 2014) گزارش نمودند که تعداد سلول ریزجلبک، رابطه مستقیمی با حضور یا عدم حضور نیتروژن در محیط کشت دارد بطوریکه کاهش نیتروژن در محیط کشت باعث کاهش

فسفات کاهش رشد رخ داده است. نقش فسفر در محتوای چربی ریزجلبک *C. vulgaris* در شرایط فقر نیتروژن در پنج محیط کشت با غلظت‌های متفاوت نیتروژن و فسفر یا ترکیب آن‌ها توسط (Chu et al., 2013) انجام گرفت. در این آزمایش مشخص شد که تولید بیومس در شرایط فقر نیتروژن با مقدار کافی منبع فسفر شبیه محیط کشت کنترل می‌باشد که این مساله نشان دهنده اهمیت نسبت نیتروژن به فسفر در محیط کشت جلبک‌ها می‌باشد (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

نرخ رشد در بسیاری از ریزجلبک‌ها تحت شرایط شدت و دوره نوری بالا تا حد اشباع نوری، افزایش و پس از آن به دلیل پدیده‌ی مهار نوری کاهش می‌یابد. اثر درجه حرارت و دوره‌های تاریکی-روشنایی توسط (Han et al., 2013) انجام شد. نتایج نشان داد که ۳۰ درجه سانتی‌گراد، درجه حرارت اپتیمم برای افزایش بیومس بود. بر اساس مطالعه آنها، افزایش درجه حرارت در زمان روشنایی می‌تواند بیومس شبانه را کاهش دهد و پروفایل اسیدچرب را تغییر دهد (Yoshioka et al., 2012).

نتایج پژوهش (Martinez et al., 2000) بیان نمود متابولیسم فسفر با کاهش شدت و دوره‌های نوری در جلبک‌های سبز *Scenedesmus obliquus* افزایش پیدا می‌کند. علت چنین شرایطی را می‌توان به مکانیسم‌های جذب فسفر یعنی تجمع و مصرف در سلول‌های جلبکی نسبت داد (Brányiková et al., 2011). تاثیر نور، مواد مغذی و نسبت کربن به فسفر در جلبک سبز *Selenastrum capricornutum* توسط (Hessen et al., 2002) بررسی شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد، با افزایش شدت و دوره نوری نسبت فسفر به کربن، نسبت نیتروژن به کربن و همچنین میزان کلروفیل در جلبک سبز *S. capricornutum* کاهش می‌یابد.

به‌طور کلی ارتباط معکوسی بین غلظت نیترات و محتوای چربی سلول‌های ریزجلبک وجود دارد بطوریکه در شرایط محدودیت نیتروژن میزان چربی ریزجلبک به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Zhu et al., 2014). در یک آزمایش فقر نیتروژن به عنوان عامل تجمع چربی و کربوهیدرات مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه

بیشترین میزان تجمع چربی در ریزجلبک *Scenedesmus sp.* (طی ۵ روز فقر نیتروژن) و کربوهیدرات (۴۶/۶۵٪) (طی ۱ روز فقر نیتروژن) گزارش شد (Ho et al., 2012).

تولید چربی با افزایش نور افزایش پیدا کرده و حداکثر میزان چربی در دوره‌های روشنایی و شدت نوری بالاتر تا حد بیشینه‌ی تحمل ریزجلبک در شرایطی که پدیده مهار نوری رخ ندهد، تولید می‌گردد. افزایش دوره نوری تا آستانه‌ی تحمل ریزجلبک، باعث افزایش متابولیسم درون سلولی و تولید ترکیباتی از قبیل چربی، پروتئین، کربوهیدرات و ... می‌شود. تاثیر سطوح مختلف نور بر رشد و پروفایل اسیدچرب در جلبک *Isochrysis galbana* صورت گرفت. بر طبق این گزارشات ریزجلبک *I. galbana* تحت تاثیر نور سفید به مدت ۲۴ ساعت نسبت به نور سفید ۱۲:۱۲ (تاریکی: روشنایی) رشد بیشتری داشت. مشاهدات نشان داد که رشد ریزجلبک تحت تاثیر نور آبی بطور قابل توجهی بیش از دو نور دیگر (قرمز و سفید)، بود. محتوای چربی *I. galbana* تحت تاثیر نور سفید و نور آبی بترتیب ۹۸ میلی‌گرم بر لیتر و ۱۵۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. پروفایل چربی ریزجلبک، شامل ۳۵-۲۹ درصد چربی خنثی، ۴۷-۳۸ درصد گلیکوچربی و ۲۸-۲۰ درصد فسفوجربی گزارش شد. تحقیقات نشان داد که نور تأثیر بسزایی بر چربی کل و محتوای چربی (گلیکوچربی، فسفوجربی و ...) نداشت (Yoshioka et al., 2012). در پژوهشی دیگر، برای حصول بیشترین میزان بیومس و چربی از ریزجلبک *Hematococcus pluvialis* آزمایشی با ۹ استرس طراحی شد. این ۹ استرس شامل محدودیت نیتروژن و یا فسفر، شدت و کیفیت نور بود. تابش فعال نور، محیط کشت بدون فسفر و با نیتروژن کم منجر به تولید بیشترین بیومس با ۳۳ درصد چربی شد. دیود ساطع کننده‌ی نور سفید بدون فسفر نیز منجر به تولید بیومس بالا شد اما میزان چربی در این شرایط ۲۵ درصد گزارش شد. دیود ساطع کننده نور قرمز بدون فسفر با غلظت پایین نیتروژن، میزان کم بیومس با ۴۶٪ چربی را تولید کرد (Saha et al., 2013).

Greenberg A. and Clesceri, S., 1992.

Standard methods for the examination of water and wastewater: USA: American Public Health Association; ISBN 0-87553-207-1.

Guo, F., Wang, H., Wang, J., Zhou, W., Gao, L., Chen, L. and Liu, T., 2014.

Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. *Bioresource Technology*, 158: 19-24 . DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.144

Han, F., Wang, W., Li, Y., Shen, G., Wan, M. and Wang, J. 2013.

Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light–dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. *Bioresource Technology*, 132: 182-189 . DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.175

Hessen, D.O., Færøvig, P.J. and Andersen, T., 2002.

Light, nutrients, and P:C ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology*, 83(7): 1886-1898 . DOI: 10.1890/0012-9658(2002)083[1886:LNAPCR]2.0.CO;2.

Ho, S.H., Chen, C.Y. and Chang, J.-S., 2012.

Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113: 244-252. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.133

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این تحقیق توسط دانشگاه شیراز تامین شده است. از آقایان دکتر گلمکانی و دکتر یونسی بابت مشاورت‌های علمی سپاسگزاری می‌گردد. از آقای مهندس جعفری فرد بابت همکاری در انجام آزمایش‌ها و تحلیل نتایج تشکر می‌گردد.

منابع

فرامرزی، م.ع.، فروتن فر، ح. و شکیبایی، م.، ۱۳۸۹. بیوتکنولوژی ریزجلبک‌ها. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳۹۸ صفحه.

Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., 1988. *Micro-algal Biotechnology*: Cambridge University Press. Pp 241-327.

Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V. and Vítová, M., 2011. Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4): 766-776. DOI: 10.1002/bit.23016

Chen, X. and Pei, Y., 2016. Effects of sodium pentaborate pentahydrate exposure on *Chlorella vulgaris* growth, chlorophyll content, and enzyme activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132: 353-359. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.024

Chu, F.-F., Chu, P.N., Cai, P.J., Li, W.W., Lam, P.K. and Zeng, R.J., 2013. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*, 134: 341-346 . DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.131

- Markou, G. and Nerantzis, E., 2013.** Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8): 1532-1542 . DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.011
- Martnez, M., Sánchez, S., Jimenez, J., El Yousfi, F. and Munoz, L., 2000.** Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *BioresourceTechnology*, 73(3): 263-272 . DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.G. and Lee, K., 2012.** Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123: 279-283 . DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.057
- Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D. and Murray, P., 2013.** Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 128: 118-124 . DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.049
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. and Ying-xue, S., 2010.** Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14): 5494-5500. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.016
- Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H. and Morinaga, T., 2012.** Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 338: 111-117 . DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.01.005
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J. and Yuan, Z., 2014.** Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource technology*, 152: 292-298 . DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.092.

Optimization of growth, lipid and chlorophyll contents in *Chlorella vulgaris* under different conditions of nitrate, phosphate and photoperiod by central composite design (CCD)

Vazirzadeh A^{1*}, Moghadaszadeh H.¹

*vazirzadeh@shirazu.ac.ir,

1- Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz 71441-65186, Iran

Abstract

The effects of nitrate (750-2250 mg/L), phosphate (20-60 mg/L) and photoperiod (8-24 h) on the growth, chlorophyll content and lipid yield of *Chlorella vulgaris* were studied using central composite design (CCD) method. The second-order quadratic model was used to predict the effects of input variables on the output responses and the results were verified by F test, ANOVA and regression analyses. Results showed that maximum growth (255.88×10^6) as well as highest chlorophyll content (15.34%) were observed at 16 h of light, 1500 mg/L of nitrate and 40 mg/L of phosphate concentration. Also, condition of 24 h of light, 750 mg/L nitrate and 20 mg/L phosphate concentrations resulted in maximum percent of lipid content (17.74%). The optimization of culture condition for simultaneous achievement of highest levels of growth, chlorophyll and lipid content were investigated.

Keywords: Environmental and nutritional conditions, *Chlorella vulgaris*, Biochemical components

*Corresponding author