بهینه‌سازی محیط کشت میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* جهت افزایش تولید نشاسته در ایران- ۱۳۹۳

حمید رمضانی اول ریابی[۱]، مهرداد آذین [*۲]، علی شیخی نژاد[۲]

۱. دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲. پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۶
شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2016.338642

چکیده

افزایش رشد جمعیت و ایجاد قدرت‌های اقتصادی بزرگ، موجب افزایش مصرف انرژی در دنیا شده است. در سال ۲۰۰۸ سوخت‌های فسیلی ۸۸ درصد از مصارف انرژی را در دنیا تشکیل می‌داد. ازآنجایی‌که در ایران سوخت‌های سیستم حمل‌ونقل، از اساسی‌ترین آلاینده‌ها بوده، جایگزین کردن این سوخت‌ها با سوخت‌های زیستی، شامل بیواتانل و بیودیزل می‌تواند در کاهش آلودگی محیط‌زیست، بسیار مؤثر باشد. برخی گونه‌های ریز جلبک، این توانایی رادارند که مقادیر بالایی کربوهیدرات، به‌جای لیپید تولید کنند. این ریز جلبک‌ها، برای تولید بیواتانول بسیار مناسب هستند، زیرا کربوهیدرات موجود در ریز جلبک، پس از استخراج به‌صورت کربوهیدرات قابل تخمیر مورداستفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی محیط کشت ریز جلبک، جهت افزایش تولید نشاسته است. این مطالعه به‌صورت روش میدانی، مشاهده و آزمون صورت گرفت. برای این منظور ریز جلبک *Chlorella vulgaris*، از محل کلکسیون ریز جلبکِ سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، در اردیبهشت‌ماه ۹۳ دریافت شد و محیط‌های کشت BBM و Z8 جهت انجام مطالعه انتخاب شدند. جذب نوری، شمارش سلولی و توده زیستی میکرو جلبک در این محیط‌ها، موردبررسی قرار گرفت. با توجه به اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) دو محیط کشت Z8 و BBM، برای *کلرلا*، محیط کشت BBM انتخاب شد. در ادامه، میزان رشد و تولید نشاسته در ریز جلبک موردنظر، به دست آمد. سپس طراحی آزمایش، جهت بهینه‌سازی محیط کشت کلرلا، صورت گرفت. نتایج نشان می‌دهد که افزایش نور، کاهش فسفر و نیتروژن سبب افزایش نشاسته در ریز جلبک کلرلا می‌شود، بنابراین C.*vulgaris* می‌تواند گزینه مناسبی به‌عنوان ماده اولیه در تولید بیواتانول باشد.

کلید واژه‌ها: بهینه‌سازی، ریز جلبک،*Chlorella vulgaris*، نشاسته

[*] نویسنده مسئول، پست الکترونیک: azin@irost.ir

۱. مقدمه

فیتوپلانکتون‌ها با بهره بردن از اشعه خورشید و مواد غذایی موجود در آب و از طریق عمل فتوسنتز، مواد غذایی موردنیاز خود را ساخته و به مصرف می‌رسانند. آن‌ها برای رشد به نور، دی‌اکسید کربن، شوری،pH مناسب، مواد مغذی و برخی به ویتامین‌ها و سایر مواد نیازمند هستند (Winkler *et al*., 2002). با توجه به اینکه جلبک‌های مختلف، تحت شرایط محیطی متفاوت، دارای رشد یکسانی نخواهند بود و همچنین با تغییر بعضی از عناصر غذایی، می‌توان میزان رشد و تراکم سلولی را به حداکثر مقدار خود، بخصوص در مقادیر انبوه رساند (Salavatian And Falahi, 2005). وابستگی اقتصاد جهان به سوخت‌های فسیلی و نیز، افزایش تقاضای انرژی در کشورهای در حال ظهور (به‌عنوان‌مثال هند و چین) و همچنین افزایش استفاده از سوخت‌های فسیلی، سبب افزایش دی‌اکسید کربن موجود در جو و ایجاد بحران گرم شدن کره زمین شده است؛ بنابراین، به خاطر وجود نیاز فوری به توسعه پایدار، استفاده از انرژی‌های مقرون به صرفه و تجدید پذیر، وجود دارد. در این راستا، اتانول زیستی از محصولات کشاورزی (نسل اول سوخت‌های زیستی)، منبعی از انرژی مقرون‌به‌صرفه از منابع تجدید پذیر است. با این حال این منبع، باعث محدودیت زمین و رقابت در زمین‌های زیر کشت زراعی با زمین زیر کشت، جهت تولید اتانول زیستی شده است. امروزه، ریز جلبک‌ها به‌عنوان یکی از مواد اولیه تجدید پذیر برای تولید سوخت‌های زیستی در نظر گرفته می‌شوند. مزایایی که سبب انتخاب آن‌ها شده است عبارتند از: رشد سریع، فتوسنتز بالا، بهره‌وری و زیست‌توده تولیدی بالا در مقایسه با دیگر محصولات انرژی. با توجه به ظرفیت بالا در ذخیره نشاسته، ریز جلبک *C. vulgaris* به‌ویژه به‌عنوان یک ماده خام برای تولید اتانول زیستی، به رسمیت شناخته‌شده است (Dragone *et al*., 2011). عنصر نیتروژن در ساخت اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نقش اساسی دارد. در بسیاری موارد نسبت بین مقدار نیتروژن و کربن در محیط کشت از اهمیت بالایی برخوردار است .به‌عنوان‌مثال، محدود کردن میزان نیتروژن، به تولید متابولیک‌هایی مانند اسیدهای چرب غیراشباع پلی ساکاریدهای ویژه‌ای می‌انجامد. فسفر به شکل فسفات و ارتوفسفات در آب دریا وجود دارد و به همین صورت نیز در ساخت محیط‌های کشت مورداستفاده قرارمی گیرد .علاوه بر نقش مهمی که فسفر در متابولیسم انرژی بازی می‌کند، این عنصر در ساختار اسیدهای نوکلئیک و فسفوپروتئین ها حضور دارد. میزان برداشت فسفریک اسید فرآیند وابسته به انرژی است. اگر چه میزان فسفر موجود در توده زیستی جلبک‌ها کمتر از ۱ درصداست؛ اما به دلیل پیوند این ترکیب به یون‌های دیگری مثل کربنات و آهن، میزان این عنصر یکی از عوامل محدودکننده رشد جلبک‌ها است. بعضی از جلبک‌ها فسفات را به‌صورت اجسام پلی فسفات ذخیره می‌کنند. نسبت ازت به فسفر در محیط کشت یک عامل تعیین‌کننده و مؤثر برای رشد و تولید دسته‌ای از متابولیت ها محسوب می‌شود (Shen, 2004 and Lee Grobbelaar, 2006). هدف از این مطالعه بهینه‌سازی محیط کشت *c.vulgaris*، جهت رسیدن به میزان بیشتری از ذخیره‌سازی نشاسته در ریز جلبک است. برای این منظور سه عامل شدت نور، میزان نیتروژن و فسفر موردبررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش کار: *C. vulgaris* آب شیرین، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران دریافت شد. دو محیط کشتBBM[1] وZ_8[2] مربوط به فیتوپلانکتون های آب شیرین انتخاب گردید (Faramarzi *et al*., 2011).

با توجه به جدول -۱ از stockA ۵ میلی‌لیتر، stockB،C و D هرکدام ۰/۵ میلی‌لیتر به ارلن ۱۰۰۰

۱-Bold's Basal Medium

۲-محیط کشت برای رشد اغلب فیتوپلانکتون ها

میلی‌لیتری منتقل شد و با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر، رسید و به کمک pH متر pH آن در ۶/۸ تنظیم شد. سپس در ۴ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری تقسیم و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید (اسماعیلی، ۱۳۷۹).

جدول-۱- نمک‌های معدنی و مقدار بکار رفته در محیط کشت BBM

استوک	نمک‌های معدنی	وزن (گرم)	حجم مورداستفاده (میلی‌لیتر)
A	$NaNO_3$	۲/۵	۱۰۰
	$MgSO_4.7H_2O$	۰/۷۵	
	K_2HPO_4	۱	
	$CaCl_2$	۰/۲۵	
	NaCl	۰/۲۵	
B	$ZnSO_4$	۰/۱۷	۱۰۰
	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۱۵	
	$MnCl_2$	۰/۱۴	
	H_3BO_3	۰/۱۱	
C	KOH	۰/۰۳	۱۰۰
	EDTA	۰/۵	
D	$FeSO_4$	۰/۴۹۸	۱۰۰
	HCl	۰/۵	

برای ساخت ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Z8 پس از تهیه استوک‌ها که روش تهیه در جدول-۲ آمده است؛ از استوک A ۱/۵ میلی‌لیتر، استوک B ۰/۵ میلی‌لیتر، استوک C ۵ میلی‌لیتر و استوک D ۰/۰۴ میلی‌لیتر با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس در ۴ ارلن تقسیم شد و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید(Staub, 1961). در زیر هود و در شرایط استریل، $۷/۶ \times ۱۰^{۶}$ cell/mL از *C.vulgaris* به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت BBM و Z8 منتقل شد و روی شیکر با ۱۶۰rpm و شدت نور $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ و دوره روشنایی و خاموشی ۱۲:۱۲ در یک دوره ۲۰ روزه قرار گرفت. آزمایش‌ها با دو تکرار صورت گرفت. هر دو روز یک‌بار از هریک از ارلن ها زیر هود، ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها برداشته و پس از هم زدن، با سمپلر،۲۵ میکرو لیتر از نمونه برداشته شد و با لام نئوبار تعداد سلول‌ها شمارش گردید، سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر طول‌موج ماکزیمم برای کلرلا،۶۸۷ نانومتر، به دست آمد و جذب نوری آن در ۶۸۷ نانومتر اندازه گرفته شد. روش‌های تعیین غلظت سلولی عبارت‌اند از: شمارش تعداد سلول‌ها به کمک هموسیتومتر (Hemacytometer)، این وسیله که به لام نئوبار نیز معروف است، عمدتاً برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون کاربرد دارد و در شمارش سلول‌های ریز جلبک‌های تک‌سلولی نیز به کار می‌رود. این لام درواقع حاوی یک محفظه میکروسکوپی به حجم ۰/۱ میلی‌لیتراست که نمونه موردنظر در آن محفظه قرار داده می‌شود .انواعی از تقسیم‌بندی‌های بسیار ریز، سطح این محفظه را به خانه‌هایی با گنجایش بسیار ریز تبدیل کرده است(Faramarzi *et al.*, 2011). تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر از فرمول زیر به دست می‌آید:

4×10^{6} × میانگین تعداد سلول شمارش شده

(Chen *et al.*, 2009).

جدول -۲-نمک‌های معدنی و مقدار بکار رفته در محیط کشت Z8

استوک	نمک‌های معدنی	وزن (گرم)	حجم مورداستفاده (میلی‌لیتر)
A	$NaNO_3$	۴/۶۵	۳۰
	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	۰/۵۷	
	$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲۴۹	
B	KH_2PO_4	۰/۳۱	۱۰
	Na_2CO_3	۰/۲۱	
C	C الف	۱*میلی لیتر	۱۰۰
	C ب	۱**میلی لیتر	
D	H_3BO_3	۰/۳۱	۱۰۰
	$MnCl_2.4H_2O$	۰/۲۲	
	$(NH_4)6MO_7O_{24}.4H_2O$	۰/۰۰۸	
	KBr	۰/۰۱	
	KI	۰/۰۱	
	$ZnSO_4$	۰/۰۲	
	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	۰/۰۱۴	
	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۱۲	
	$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	۰/۰۴	
	LiCl H_2O	۰/۰۰۵	

***۰/۱۳۵گرم $FeCl_2.6H_2O$ در ۰/۱۵ میلی‌لیتر HCl غلیظ و ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر**

**** ۰/۲۲گرم EDTA-Na در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر**

روش کدورت سنجی، راه دیگری جهت رسم منحنی رشد ریز جلبک‌ها است. به این منظور کدورت نمونه در طول‌موج موردنظر (۶۸۷ نانومتر) قرائت شد. درصورتی‌که منحنی استانداردی بر اساس میزان کدورت، در مقابل تعداد سلول‌ها باشد، می‌توان از روی کدورت حاصله، به تعداد سلول‌ها پی‌برد. منحنی استاندارد به این ترتیب رسم می‌شود که نمونه‌های مختلف با رقیق‌سازی و شمارش تعداد سلول‌ها و سپس قرائت جذب در طول موج مورد نظر(۶۸۷ نانومتر) به‌عنوان دو متغیر x و y در نظر گرفته می‌شود. با رسم میزان کدورت هر نمونه در مقابل تعداد سلول‌ها و پیدا کردن محدوده خطی بودن این تابع، می‌توان به نوعی منحنی استاندارد دست یافت. در مرحله بعد با واردکردن کدورت نمونه مورد آزمایش در معادله خط، می‌توان تعداد سلول‌ها را به‌صورت تقریبی به دست آورد (Faramarzi *et al.*, 2011). اندازه‌گیری وزن توده زیستی تولید شده در روزهای مختلف، یکی دیگر از معیارهایی است که برای رسم منحنی رشد ریز جلبک، به‌کاربرده می‌شود. وزن توده زیستی به دو صورت مرطوب و خشک قابل‌اندازه‌گیری است. سلول‌ها به کمک سانتریفوژ و یا صافی از محیط کشت جدا می‌شوند (Faramarzi *et al.*, 2011). برای به دست آوردن زیست‌توده بیشتر،

ریز جلبک از ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، به بطری‌های پلی‌اتیلنی (PET) ۱۵۰۰ میلی‌لیتری با سه تکرار منتقل شد. برای این منظور بطری‌های یکسان انتخاب گردید. درب آن برای عبور لوله‌های شیشه‌ای انتقال هوا سوراخ گردید و همچنین برای انتقال یکنواخت هوا در بطری‌ها از سه راهی آکواریوم استفاده شد. بر این اساس میکرو جلبک به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت BBM در بطری‌های ۱۵۰۰ میلی‌لیتری تلقیح گردید و تا ۱۲ روز کشت ادامه داده شد. جهت هوادهی از پمپ معمولی هوا استفاده شد. هر دو روز یک بار شمارش سلولی و کدورت محیط کشت اندازه‌گیری شد و در انتهای دوره نیز توده زیستی و میزان نشاسته اندازه گرفته شد. برای به دست آوردن توده زیستی *C. vulgaris*، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و پلیت سلولی حاصل تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد خشک و اندازه گرفته شد. برای سنجش نشاسته تولیدشده در زیست‌توده *C. vulgaris*، از معرف آنترون[1] استفاده شد (Lee and Shen, 2004). برای ساخت ۲۵ میلی‌لیتر محلول آنترون، ۶ میلی‌لیتر آب مقطر، با ۱۹ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ مخلوط گردید و ۳۸ میلی‌گرم پودر آنترون به آن اضافه شد، محلول در یک ظرف کهربایی‌رنگ نگهداری شد(Seifter *et al*., 1949). در ادامه منحنی استاندارد نشاسته به دست آمد. برای این منظور رقت‌های ۰/۰۰۱٪ تا ۰/۵٪ از نشاسته تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت‌های نشاسته با ۲ میلی‌لیتر محلول آنترون مخلوط شد و پس از گذاشتن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سرد شدن در دمای اتاق، جذب نوری آن در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد(Knudsen, 1997). معادله منحنی استاندارد با کمک نرم‌افزار اکسل verer.16، به دست آمد. برای استخراج نشاسته لازم است دیواره سلولی جلبک شکسته شود. برای شکستن دیواره سلولی و آزادسازی نشاسته، از روش اسیدی استفاده شد. برای این منظور ۰/۵ گرم زیست‌توده جلبکی، با ۲۵ میلی‌لیتر HCl ۰/۱ نرمال حل گردید و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به‌وسیله هم زن مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول با ۲۰۰۰ میکرو لیتر محلول آنتون مخلوط گردید و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و سپس جذب نوری آن در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد.۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر نیز با ۲۰۰۰ میکرو لیتر محلول آنترون به‌عنوان شاهد، مخلوط گردید و دستگاه اسپکتروفتومتر با آن صفر شد؛ سپس جذب نوری به‌دست‌آمده از شکستن دیواره سلولی ریز جلبک *C. vulgaris* در معادله خط به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد نشاسته قرار گرفت و میزان نشاسته تولیدی توسط *C. vulgaris*، بر اساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد(Devgoswami, 2013). تهیه منحنی استاندارد شمارش سلولی با اسپکتروفتومتر:

با این روش با خواندن جذب نوری از ریز جلبک‌ها و مقایسه آن با منحنی استاندارد می‌توان به تعداد سلول ریز جلبک پی برد. برای استانداردسازی، رقت‌های ۱٪ تا ۵۰٪(v/v) از نمونه‌های محیط کشت تهیه گردید (Pourafrasiabi *et al*., 2013). برای محاسبه نرخ رشد ویژه میکرو جلبک‌ها از فرمول $\mu = \frac{1}{t}(\ln xm/x0)$ استفاده شد.

(μ: نرخ رشد ویژه در میکرو جلبک،t: مدت‌زمان دوره کشت،x_m: میزان سلول نهایی،x_0: میزان سلول در ابتدای دوره)(Amini *et al*., 2010).

زمان دو برابر شدن سلول از فرمول $G=\ln 2\mu^{-1}$ به دست آمد.

(G: زمان دو برابر شدن سلول، μ: نرخ رشد ویژه در میکرو جلبک‌ها) میزان نشاسته تولیدشده در ریز جلبک‌ها از فرمول $P=C\times W/T$ به دست آمد. (P: میزان نشاسته تولیدشده، C: درصد نشاسته در ریز جلبک،W: وزن توده زیستی، T: مدت‌زمان کشت) (Shinde and Lele, 2010).

۱- Anthrone

در مرحله بعد جهت بهینه‌سازی محیط کشت *C. vulgaris*، طراحی آزمایش با نرم‌افزار Mini Tab و با استفاده از روش تا گوچی، با سه فاکتور غلظت نیتروژن، فسفر و شدت نور، در سه سطح (۱ ۰ ۱-) صورت گرفت. منبع نیتروژن در محیط کشت BBM، $NaNO_3$ بود که در سه سطح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. منبع فسفر نیز K_2HPO_4 و KH_2PO_4 بود که از هرکدام، سه سطح ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر انتخاب شد (اعداد نشان‌دهنده غلظت نمک‌های پتاسیم فسفات است). برای منبع نور نیز سه سطح شدت نور ۵۰/۷، ۴۱/۷۴ و ۳۴/۶۶ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه در نظر گرفته شد. منبع نور شامل ۶ لامپ مهتابی نور سفید متمایل به صورتی بود (Barghbani, 2012).

جدول -۳-تیمار طراحی شده توسط نرم‌افزار مینی تب

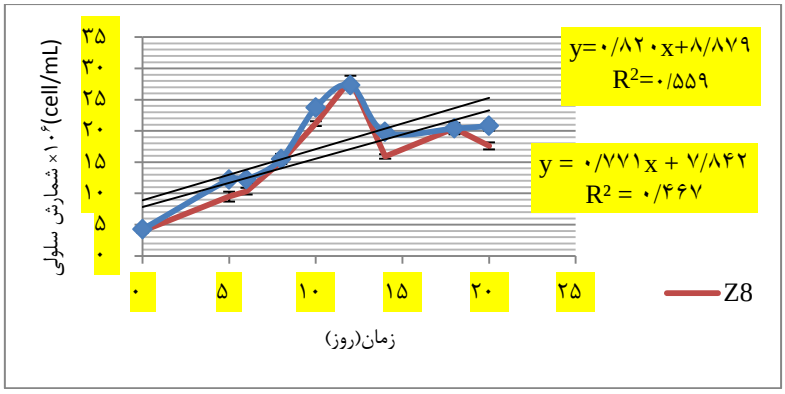
تیمار*	$NaNO_3$ (mg/L)	KH_2PO_4 (mg/L) K_2HPO_4	شدت نور ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	تیمار	$NaNO_3$ (mg/L)	KH_2PO_4 (mg/L) K_2HPO_4	شدت نور ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)
۱	۴۰۰	۵۰۰	۵۰/۷	۱۶	۴۰۰	۱۲۵	۳۴/۶۶
۲	۲۵۰	۲۵۰	۵۰/۷	۱۷	۲۵۰	۵۰۰	۳۴/۶۶
۳	۱۰۰	۱۲۵	۵۰/۷	۱۸	۱۰۰	۲۵۰	۳۴/۶۶
۴	۴۰۰	۲۵۰	۴۱/۷۴	۱۹	۴۰۰	۵۰۰	۵۰/۷
۵	۲۵۰	۱۲۵	۴۱/۷۴	۲۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰/۷
۶	۱۰۰	۵۰۰	۴۱/۷۴	۲۱	۱۰۰	۱۲۵	۵۰/۷
۷	۴۰۰	۱۲۵	۳۴/۶۶	۲۲	۴۰۰	۲۵۰	۴۱/۷۴
۸	۲۵۰	۵۰۰	۳۴/۶۶	۲۳	۲۵۰	۱۲۵	۴۱/۷۴
۹	۱۰۰	۲۵۰	۳۴/۶۶	۲۴	۱۰۰	۵۰۰	۴۱/۷۴
۱۰	۴۰۰	۵۰۰	۵۰/۷	۲۵	۴۰۰	۱۲۵	۳۴/۶۶
۱۱	۲۵۰	۲۵۰	۵۰/۷	۲۶	۲۵۰	۵۰۰	۳۴/۶۶
۱۲	۱۰۰	۱۲۵	۵۰/۷	۲۷	۱۰۰	۲۵۰	۳۴/۶۶
۱۳	۴۰۰	۲۵۰	۴۱/۷۴				
۱۴	۲۵۰	۱۲۵	۴۱/۷۴				
۱۵	۱۰۰	۵۰۰	۴۱/۷۴				

*تیمارهای نه‌گانه در سه تکرار انجام شدند

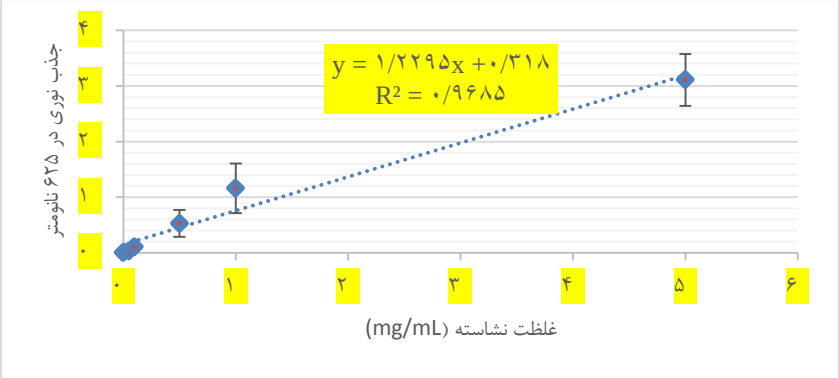
۳. نتایج

نتایج تجربی به‌دست‌آمده از کشت*C. vulgaris* در دو محیط کشت BBM و Z8 نشان داد، شیب‌خط به‌دست‌آمده از محیط کشت BBM بیشتر از Z8 است(نمودار-۱) منحنی استاندارد نشاسته با دستگاه اسپکتروفتومتری با ضریب همبستگی (R^2 =۰/۹۶۸۵) به دست آمد(نمودار-۲).

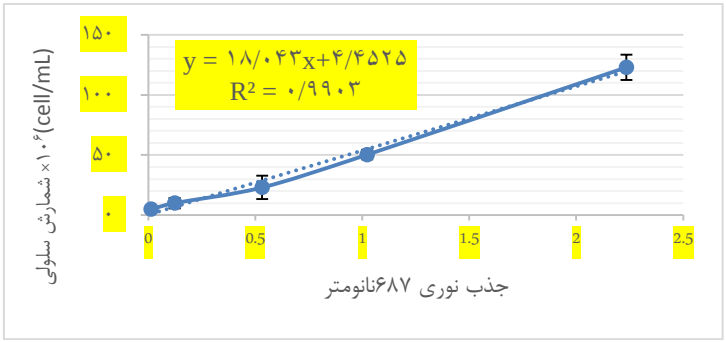
آزمون t زوج، برای تعیین بهترین محیط کشت میکرو جلبک کلرلا ولگا ریس با p< ۰/۰۵ معنی‌دار بودن اختلاف بین محیط کشت BBM و Z8 را نشان داد و محیط کشت BBM به‌عنوان محیط کشت مناسب‌تر برای *C. vulgaris* انتخاب شد. نرخ رشد ویژه ریز جلبک موردنظر در محیط کشت BBM و Z8، به ترتیب ۰/۰۷ و ۰ /۰۲ در روز بود.



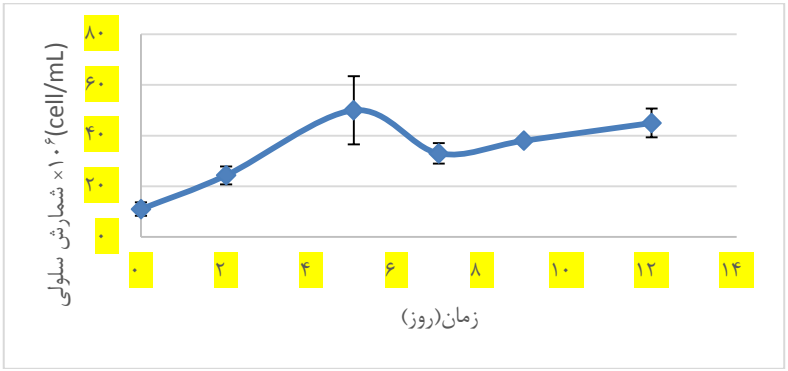
نمودار-۱- شمارش سلولی *C. vulgaris* در دو محیط کشت BBM و Z8 در مدت‌زمان ۲۰ روز شیب‌خط به‌دست‌آمده از محیط کشت BBM و Z8 به ترتیب ۰/ ۸۲۰ و ۰/۷۷۱ بود.



نمودار-۲ منحنی استاندارد نشاسته



نمودار-۳ منحنی استاندارد شمارش سلولی *C. vulgaris*



نمودار-۴- شمارش سلولی *C. vulgaris*، در مدت‌زمان ۱۲ روز در بطری‌های ۱۵۰۰ میلی‌لیتری

منحنی استاندارد شمارش سلولی در مقابل جذب نوری نیز با ضریب همبستگی (R^2=۰/۹۹۰۳) به دست آمد. (نمودار-۳) جذب محیط کشت‌های موردنظر خوانده شد و با معادله خط حاصل از منحنی استاندارد تعداد سلول به دست آمد.

در روز ۵ بعد از تلقیح، ریز جلبک بیشترین رشد سلولی را داشته است و پس‌ازآن ریز جلبک وارد مرحله سکون و سپس مرگ شده است(نمودار ۴)

جدول-۴-رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و میزان نشاسته در ریز جلبک *C. vulgaris*

زمان دو برابر شدن سلول (d)	۲/۷
میزان تولید نشاسته در روز ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$)	۶/۶
نرخ رشد ویژه کلرلا[$\mu(d)^{-1}$]	۰/۱۳

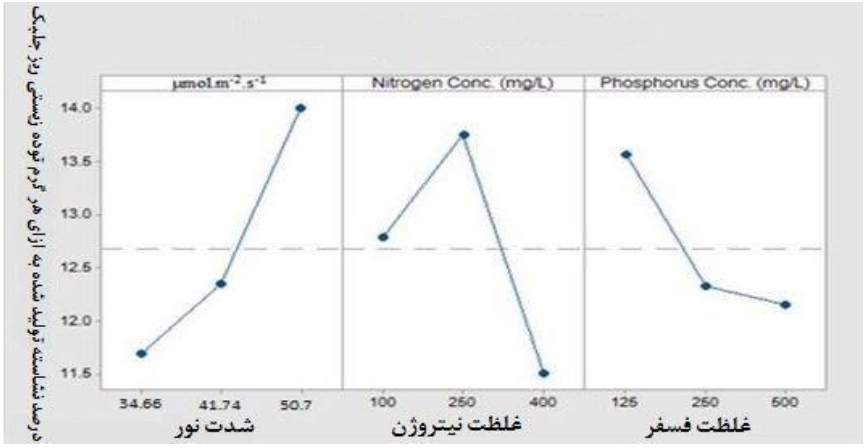
جدول-۵-میزان سلول، توده زیستی و مقدار نشاسته در تیمارها، مرحله بهینه‌سازی، در مدت ۱۲ روز

تیمار*	میانگین نشاسته (درصد وزنی)	میانگین توده‌زیستی (g/L)	میانگین شمارش سلولی($\times 10^6$cell/mL)
۱	۳۴±۰/۹۴	۲/۴۸	۹۳/۵۵
۲	۴۵±۱/۰۲	۲/۳۵	۸۱/۱۱
۳	۴۷±۰/۹۲	۲/۰۷	۲۰/۴۲
۴	۳۰±۰/۹۵	۱/۷۷	۴۲/۱
۵	۴۰±۰/۸۴	۲/۲۸	۲۵/۳
۶	۲۴±۰/۷۱	۱/۷۲	۴۵/۵
۷	۱۹±۰/۶۵	۱/۴۵	۳۴
۸	۲۷±۰/۹۱	۱/۶۶	۳۹/۴۵
۹	۲۰±۰/۴۱	۱/۵۳	۳۲/۵۲

*اعداد نشان‌دهنده میانگین سه تکرار±انحراف معیار می‌باشند.

میانگین مقدار توده زیستی خشک ریز جلبک موردنظر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت به ۳/۱۷۷ گرم و مقدار درصد نشاسته ریز جلبک‌های موردنظر در مدت ۱۴ روز، به ۲۹ درصد وزن توده زیستی رسید.

با توجه به طراحی آزمایش در جدول ۳ و نتایج به‌دست‌آمده از جدول ۵، افزایش میزان شدت نور، نیتروژن و فسفر سبب افزایش رشد سلولی در *C. vulgaris* شده است(تیمار ۱). تیمار ۳، میزان نشاسته بیشتری را نشان داد، ولی با توجه به توده زیستی بیشتر در تیمار ۲ و حاصل‌ضرب توده زیستی در میزان نشاسته، مقدار نشاسته در تیمار ۲ بیشتر از سایر تیمارها بود. با تو جه به آنالیز واریانس صورت گرفته با نرم‌افزار spss ،ver.16 =pبرای شدت نور، p=۰/۰۰۱ برای میزان نیتروژن و p=۰/۰۱۲ برای میزان فسفر که همگی کمتر از p= ۰/۰۵ بود، اثر فاکتور نور، نیتروژن و فسفر، بر میزان نشاسته تولیدشده توسط *C. vulgaris*، معنی‌دار بود.



تصویر-۱- نمودار به‌دست‌آمده از نرم‌افزار Mini Tab، تأثیر فاکتورهای مطالعه شده بر محیط کشت *C. vulgaris*(محور افقی شدت نور، غلظت نیتروژن و فسفر، محور عمودی درصد نشاسته)

با افزایش میزان نیتروژن از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، نشاسته افزایش نشان داده ولی از ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مقدار نشاسته بسیار کاهش پیداکرده است و همچنین میزان فسفر در مقدار ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولید بیشترین میزان نشاسته را باعث شده است. میزان نشاسته در ریز جلبک با افزایش شدت نور از ۳۴/۶۶ میکرو مول به ۵۰/۷ میکرو مول، افزایش‌یافته است(تصویر ۱).

۴. بحث و نتیجه گیری

این تحقیق با روش بهینه‌سازی محیط کشت ریز جلبک *C. vulgaris*، جهت افزایش تولید نشاسته، برای اولین بار در ایران انجام شد. تحقیقات دیگری که در ایران بر روی این ریز جلبک یادشده، انجام‌شده، بیشتر روی رشد سلولی، افزایش زیست‌توده و تولید چربی بوده است. سال ۹۳ تأثیر مکمل ریز جلبک *C. vulgaris* بر عوامل التهابی در بیماران مبتلابه کبد چرب غیرالکلی، بررسی شد و نتایج نشان داد مکمل *C. vulgaris* می‌تواند سبب بهبود عملکرد کبد، از طریق کاهش وزن گردد (Aliashrafi *et al*., 2014). حامدی و همکاران تأثیر هوادهی همراه دی‌اکسید کربن و یا بدون آن بر میزان رشد و محتوای لیپید، در دو محیط کشت N8 و SH4 ریز جلبک *C. vulgaris* را بررسی کردند؛ که در هر دو محیط کشت با افزایش دی‌اکسید کربن میزان رشد سلولی و لیپید افزایش یافت(حامدی و همکاران، ۲۰۱۲). صلواتیان و فلاحی اثر غلظت‌های مختلف عنصر کلسیم بر میزان رشد و بیوماس جلبک سبز C.*vulgaris* را بررسی کردند؛ آن‌ها به این نتیجه رسیدند که غلظت مؤثر کلسیم در محدوده ۰/۱ تا ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بوده و میزان مؤثر کلسیم نیز برای حداکثر رشد این جلبک ۲/۸ میلی‌گرم در لیتراست. درحالی‌که مقدار آن‌ها در محیط کشت شاهد ۹/۲ میلی‌گرم در لیتر بود. (Salavatian And Falahi, 2005). میزان نیتروژن در محیط کشت BBM ۲/۵ گرم بر لیتر و در محیط Z8 ۰/۴۷۱ گرم بر لیتر بود. نمودار-۱ نشان داد که شیب‌خط حاصل از معادله خط به‌دست‌آمده از رشد *C. vulgaris*، در محیط کشت BBM بیشتر از Z8 بوده است. همچنین وزن توده زیستی *C. vulgaris* در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BBM ۱/۷۳۸ گرم و در محیطZ8 ۱/۶۹ گرم بود. این نتایج نشان می‌دهد که میزان نیتروژن بیشتر در محیط کشت BBM نسبت به محیط کشت Z8، احتمالاً سبب رشد بیشتر ریز جلبک در محیط BBM نسبت به محیط کشت Z8 شده است (Shi *et al*., 2000). روشی که در ابتدای کار جهت هوادهی به ریز جلبک استفاده شد، هوادهی با شیکر بود. مزیت این روش نسبت به روش حباب دهی جلوگیری از آلودگی محیط کشت با سایر میکرو ارگانیزم‌ها است. جهت به

دست آوردن توده زیستی بیشتر، ریز جلبک موردنظر از پیش کشت به بطری‌های ۱۵۰۰ میلی‌لیتری به میزان یکسان ازنظر میزان سلولی ($cell/mL^{-1}$)، تلقیح شد و جهت هوادهی نیز از پمپ هوای معمولی استفاده شد. آزمایش‌ها نشان داد که این روش هوادهی سبب افزایش رشد ریز جلبک‌ها می‌شود. (Faramarzi *et al*., 2011). نرخ رشد ویژه به‌دست‌آمده از هوادهی به‌وسیله شیکر در *C. vulgaris* در محیط کشت BBM (d^{-1})۰/۰۷ بوده، درحالی‌که در هوادهی با پمپ هوا، (d^{-1})۰/۱۳ به دست آمد. هوادهی بر روی رشد و تولید اسید چرب گاما لینولئیک توسط *Spirulina platensis*، در فتوبیوراکتور توسط پمپ هوادهی نشان داد، در میزان درصد هوای محلول از ۴۱٪، ۸۸٪ و ۱۰۸٪ به ترتیب ۲/۳، ۶/۵ و ۷/۵ ($mg.g^{-1}$ وزن خشک سلول)، به دست آمد که نشان داد با افزایش هوادهی میزان توده زیستی افزایش‌یافته است و همچنین، باعث افزایش اسید چرب لینولئیک شده است. رشد ویژه با زیادشدن هوادهی، افزایش یافت (Ronda *et al*., 2012). تأثیر نیتروژن و دما در میزان رشد و تولید چربی، در دو ریز جلبک *C. vulgaris* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* نشان داد، رشد ویژه *کلرلا* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، (d^{-1})۰/۱۴ بوده ولی با افزایش دما میزان رشد ویژه، کاهش‌یافته و در دمای ۳۵ درجه به ۰/۰۱- رسید که نشان داد ریز جلبک *C. vulgaris* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد بهتری داشته است. ریز جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا نیز بیشترین رشد ویژه را در ۲۰ درجه سانتی‌گراد داشته است (Converti *et al*., 2009)؛ بنابراین میزان دما نیز فاکتوری است که بر میزان رشد ریز جلبک‌ها تأثیرگذار است. میزان نشاسته کلرلا قبل از مرحله بهینه‌سازی، درشدت نور $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ۵۰، ۲۹٪ وزن توده زیستی بود؛ جدول ۶ نشان می‌دهد، پس از انجام مراحل بهینه‌سازی این مقدار درشدت نور $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ۵۰/۷ به ۴۷٪ رسید.Dragone و همکاران تأثیر محدودیت غذایی در افزایش نشاسته را بررسی کردند. درشدت نور $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ۷۰، ۴۱ درصد وزن توده زیستی را، نشاسته تشکیل داد (Dragone *et al*.,2011). تحقیق حاضر نشان داد که کاهش منبع اولیه نیتروژن سبب افزایش نشاسته می‌شود (Dragon *et al*., 2011). دلیل احتمالی این است که در محدودیت نیتروژن، نیتروژن فقط در ساخت آنزیم‌ها و ساختارهای ضروری سلول استفاده می‌شود و دی‌اکسید کربن تثبیت‌شده، بجای تبدیل به پروتئین، به کربوهیدرات و چربی تبدیل می‌شود (Richardson *et al*., 1969; Rodolfi *et al*., 2009). علت بیشتر بودن میزان نشاسته در تحقیق حاضر ممکن است به علت تفاوت در محیط کشت و ریز جلبک استفاده‌شده باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: در تیمار اول با بیشترین مقدار نیتروژن، فسفر و بیشترین شدت نور، میزان سلول بیشتری به دست آمد که نشان داد، سه فاکتور نور، نیتروژن و فسفر نقش مهمی در رشد سلول داشته است. با در نظر گرفتن نتایج تمامی تیمارها نتیجه‌ای که حاصل شد، این بود که درصورتی‌که *C. vulgaris* در استرس کمبود مواد غذایی قرار گیرد، قادر خواهد بود میزان نشاسته بیشتری تولید کرده و در مرحله بعد مخمر، می‌تواند از این نشاسته استفاده کرده و اتانول زیستی (بیو اتانول) تولید کند.

با تشکر فراوان از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و کارکنان محترم آن، به‌ویژه سرکار خانم دکتر مظاهری، خانم شیخی نژاد، خانم جعفری و خانم کاظم نژاد که امکانات و تجهیزات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

منابع

Aliashrafi, S., Ebrahimi Mameghani, M., Kakaie, F., Javadzadeh, Y. and Asghari Jafarabadi, M., 2014. The Effect of Microalgae Chlorella vulgaris Supplementation on Inflammatory Factors in Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A double-blind randomized clinical trial. Journal of

Faramarzi, M. A. Forthantar, H., Patience, M. ۲۰۱۱. mohit kesht BOLD–mohit kesht

Z8.biotchnology microalgae. Iran University of Medical Sciences. 351-365p

Grobbelaar, J.2006. .Photosynthetic response and acclimation of microalgae to light fluctuations .Algal Cultures Analogues of Blooms and Applications Science Publishers, pp671–683.

Hamedi Sh., Akhavan Mahdavi, M., Ghashlaghi, R. 2012. tasire CO_2 bar mizan roshd va mohtavaye lipid cell microalgae *Chlorella vulgaris*. National Conference on New Technologies in the Chemical Industry. Mashhad, Ferdowsi University.

Knudsen, B. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant material used in animal feeding. Animal Feed Science and Technology. 67: 319-338.

Lee, Y. K. 2004. Algal Nutrition Heterotrophic Carbon Nutrition. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology,pp116-124.

Lee, Y. and Shen, H. 2004. Basic culturing Techniques. Handbook of microalgal cultur. biotechnology and applied phycology. 40

Pourafrasiabi, M., Ramezanpour, Z., Imanpour, N.J. And Sadeghi, R.M., 2013. Effects Of Temperature And Light Intensity On Cell Concentration And Growth Rate Ofdunaliella Salina Teodoresco, pp13-23.

Richardson, B., Orcutt, D., Schwertner, H., Martinez, CL. and Wickline, HE. 1969.Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. Applied microbiology.18(2):245-50.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M.R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor.*Biotechnology and bioengineering*. 102(1): 100-112.

Ronda, S., Bokka, C., Ketineni, C., Rijal, B. andAllu, P. 2012.Aeration effect on Spirulina platensis growth andγ–linolenic acid Mazandaran University of Medical Sciences, 24(112), pp.113-121.

Amini, K.Z., Seyfabadi, J. And Ramezanpour, Z., 2010. Effect Of Light Intensity And Photoperiod On Growth Rate And Biomass Of Chlorella Vulgaris, pp 11-20.

Barghbani, R., Rezaei, K. and Javanshir, A.2012 .Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach . International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. 1(2): 128–133.

Chen, Y., Chang, M., Chen, Y. and Chang, B. 2009. Comparing Neubauer Hemacytometer, SY Conventional, SY Located, and Automated Flow Cytometer F–100 Methods for Urinalysis. Lab Medicine, pp227-231.

Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P. and Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 48(6): 1146-1151.

Devgoswami, C. R. 2013. Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas .Africa journal of biotechnology, pp13128–13138.

Dragone, G., Fernandes, B., Abreu, A., Vicente, A. and Teixeira, J. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. Applied Energy. 88(10):3331-3335.

Esmaeli, A., 2001.

Faramarzi, M. A. Forthantar, H., Patience, M. ۲۰۱۱. avameleh fiziki moaser dar roshdeh microalgae. biotechnology microalgae. Iran University of Medical Sciences. 312p.

Faramarzi, M. A. Forthantar, H., Patience, M. ۲۰۱۱. raveshhaye rasme monhanie roshd microalgae. Iran University of Medical Sciences. 315-318p.

Shinde, S. and Lele, S. 2010. Statistical media optimization for lutein production from microalgae Auxenochlorellaprotothecoides SAG 211-7A. Int J Adv Biotechnol Res. 1: 104-114.

Staub, R. 1961. Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen BlaualgeOscillatoria rubescens DC. Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie, pp82-198.

Winkler, M., Heil, B., Heil, B. and Happe, T. 2002. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga Chlorella fusca. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. 1576(3): 330-334

production.Brazilian Journal of Microbiology.43(1): 12–20.

Salavatian, S. And Falahi, M., 2005. An Investigation On The Effects Of Varying Calcium Concentrations On The Growth And Biomass Of Chlorella Vulgaris. pp79-86.

Seifter, S., Dayton, S., Novic, B. andMuntwyler, E. 1949.The estimation of glycogen with the anthrone reagent.publisher not identified.

Shi, X.-M., Zhang, X.-W. and Chen, F. 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by Chlorella protothecoides on various nitrogen sources. Enzyme and Microbial Technology. 27 (3): 312-318.

Optimization of micro-algae Chlorella vulgaris culture to increase the production of starch in Iran-2014

Hamid Ramezani Aval Reiabi, Mehrdad Azin*, Ali Sheykhinejad

Institute of Biotechnology, Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Abstract

Increased population growth and the creation of major economic powers has led to increase in the world's energy consumption. In 2008, 88% of the energy consumption of the world was formed by fossil fuels. Since in Iran, fuel for transportation system produces the essential pollutants, substituting these fuels with biofuels, including bioethanol and biodiesel, can effectively reduce pollution in the environment. Some species of microalgae, have the ability to store high levels of carbohydrates, rather than lipids. These microalgae are good candidates for the production of bioethanol since the carbohydrates in their biomass, can be extracted and fermented to bioethanol. The purpose of this study was to optimize the microalgae culture, to increase the production of starch. This study was performed in laboratory scale. The microalga *Chlorella vulgaris* was procured from Persian Type Culture Collection (PTCC) of Iranian Research Organization for Science and Technology. Culture media BBM and Z8 were selected for growth and production of starch. Optical density, cell counting and dry biomass were measured in these media. Regarding significant difference ($P<0.05$) between the two media, BBM was selected for growth of Chlorella vulgaris. Growth rate and production of starch by microalga in this medium were optimized by experimental design. Resultsshown that increasing the light intensity, and decreasing the concentration of nitrogen and phosphorus can lead to increasing the amount of stored starch inside the cells. *Chlorella* was showed to be a suitable candidate for production of starch and hence, bioethanol.

Keywords:optimization, micro-algae, *Chlorella vulgaris*, starch

List of tables & figures

Table 1. Mineral salts and amount used in BBM medium
Table 2. Mineral salts and amount used in Z8 medium
Table 3. Treatment designed by mini-tab software
Table 4. Specific growth, doubling time and starch content in C. vulgaris microalgae
Table 5. The amount of cell, biomass and starch content in treatments, optimization stage, within 12 days.
Figure 1. C. vulgaris cell count in both BBM and Z8 media for 20 consecutive days from BBM and Z8 medium was 0.820 and 0.777, respectively.
Figure 2. Starch Standard Curve
Figure 3. The standard curve for C. vulgaris cell count
Figure 4. Cell viability of C. vulgaris, for a period of 12 days in 1500 ml bottles
Fig 1. Chart obtained from the Mini Tab software, the effect of the factors studied on C. vulgaris medium (horizontal axis of light intensity, nitrogen and phosphorus concentration, vertical axis of starch percentage)

*Corresponding author, E-mail: azin@irost.ir