



جهاد دانشگاهی مازندران / حوزه پژوهش

بررسی اثر pH و شدت نور بر نرخ رشد و تولید نشاسته

در جلبک *Chlamydomonas*

کد طرح: 20-2204

زمینه فعالیت تخصصی:

بیوتکنولوژی جلبک

نام مسئول طرح:

فاطمه قلی زاده

اسفند ماه 1393

مشخصات مسئول و همکاران طرح:

رتبه علمی	تخصص	مسئولیت در طرح	نام و نام خانوادگی
-	کارشناسی ارشد زیست‌شناسی گیاهی - فیزیولوژی	مسئول	فاطمه قلی‌زاده
-	کارشناسی ارشد بیوشیمی	همکار	طاهره قنبری
-	دکتری شیمی تجزیه	همکار	وحید شریفی
دانشیار	دکتری زیست‌شناسی گیاهی - فیزیولوژی	همکار	ندا سلطانی
-	کارشناسی میکروبیولوژی	همکار	سید محمد علوی

چکیده فارسی:

ریزجلبک سبز *Chlamydomonas reinhardtii* به عنوان سیستم مدل جلبکی در تحقیقات فیزیولوژی، مرفولوژی، ژنتیک، سوخت‌های زیستی مورد توجه می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید نشاسته بوده است. با این نگرش، تأثیر pH و شدت‌های نوری در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* بررسی شد. بدین منظور تأثیر توأم این فاکتورها بر رشد و تولید نشاسته توسط نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ ارزیابی شد. میزان نرخ رشد با اندازه‌گیری وزن خشک و مقدار نشاسته با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. با حل معادله به دست آمده و تجزیه و تحلیل نمودار سطح پاسخ، مقدار بهینه pH و شدت نور برای رسیدن به حداکثر نرخ رشد، به ترتیب 7/4 و 7400 لوکس و به منظور دستیابی به حداکثر میزان نشاسته 8 و 5300 لوکس تعیین شد.

کلمات کلیدی:

تولید نشاسته، جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*، نرم‌افزار Design Expert، شدت نور،

نرخ رشد، pH.

فهرست مطالب :

7	فصل اول
7	کلیات تحقیق
8	1-1- مقدمه
10	1-2- اهداف طرح و دلایل انجام آن
13	1-3- تئوری مبنای طرح
13	1-3-1- طراحی آزمایش با نرم افزار
17	1-3-2- ایجاد مدل های آماری
18	1-3-3- طراحی آزمایش با نرم افزار Design expert
19	1-3-4- معرفی جلبک <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
22	1-3-5- مکانیسم تولید هیدروژن زیستی در جلبک
23	1-3-6- اهمیت بهینه سازی شرایط رشد
23	1-3-7- روش های مختلف اندازه گیری نرخ رشد
24	1-3-8- مقایسه روش های مختلف سنجش نشاسته
26	فصل دوم
26	پیشینه تحقیق
27	1-2- تاریخچه و سوابق انجام طرح در ایران
28	2-2- تاریخچه و سوابق انجام طرح در جهان

31	فصل سوم
31	روش اجرای تحقیق
32	1-3- شرح آزمایش و کارهای اجرایی
32	1-1-3- محیط کشت استوک
32	2-1-3- آماده‌سازی محیط کشت TAP
34	3-1-3- تلقیح
35	4-1-3- طراحی آزمون با نرم افزار
36	5-1-3- بررسی شدت نور و pH
37	6-1-3- بررسی نرخ رشد جلبک
39	7-1-3- تجزیه و تحلیل آماری
40	فصل چهارم
40	یافته‌های تحقیق
41	1-4- بررسی رشد جلبک <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
42	2-4- بررسی میزان تولید بیومس توسط جلبک <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
42	1-2-4- بررسی فاکتورهای مؤثر بر بیومس
49	3-4- بررسی فاکتورهای مؤثر بر نرخ رشد
49	1-3-4- محاسبات طرح آماری (با استفاده از روش سطح پاسخ)
56	2-3-4- بررسی اثر متقابل pH و شدت نور بر نرخ رشد
57	3-3-4- بررسی اثر شدت نور بر نرخ رشد

- 58..... 4-4- بررسی فاکتورهای مؤثر بر تولید نشاسته
- 58..... 1-4-4- بررسی اثر متقابل فاکتورهای مؤثر بر میزان تولید نشاسته
- 60..... 2-4-4- محاسبات طرح آماری (با استفاده از روش سطح پاسخ)
- 66..... فصل پنجم
- 66..... تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق
- 67..... 1-5- رسم منحنی رشد در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*
- 68..... 2-5- بهینه‌سازی محیط کشت
- 70..... 3-5- استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش
- 70..... 3-5- اثر pH بر نرخ رشد
- 73..... 4-5- اثر شدت نور بر نرخ رشد
- 75..... 5-5- اثر pH بر میزان تولید نشاسته
- 76..... 6-5- اثر شدت نور بر میزان تولید نشاسته
- 81..... پیشنهادات
- 82..... منابع و مأخذ

فصل اول

کلیات تحقیق

Archive of SID

1-1 - مقدمه

آلودگی هوا به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت عمومی در سراسر جهان به خصوص در کشورهای صنعتی و در حال توسعه محسوب می‌شود. در کشورهای صنعتی و در حال توسعه، تولید گازهای گلخانه‌ای توسط موتور خودرو سهم عظیمی در کیفیت هوای شهری دارد (Balat, 2008). استفاده از فراورده‌های نفتی دارای اثرات منفی زیست محیطی مانند انتشار گازهای گلخانه‌ای، اسیدی شدن اقیانوس‌ها و نشت نفت می‌باشد (Stigum, 2012). همچنین افزایش تقاضا برای انرژی و گرم شدن کره زمین دو مشکل مهمی است که جامعه مدرن با آن مواجه است. به همین دلیل در سال‌های اخیر انرژی حاصل از منابع تجدیدپذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و محققان بر روی توسعه منابع انرژی جایگزین مانند خورشید، باد، آب و سوخت‌های زیستی تمرکز کرده‌اند. ذخایر سوخت فسیلی زمین به سرعت در حال اتمام است و نیاز به منابع انرژی تجدیدپذیر به ویژه سوخت‌های زیستی افزایش یافته است. گیاهان آوندی مختلف مانند نیشکر، خرما، ذرت و سویا به طور بالقوه از سوخت‌های زیستی می‌باشند اما به دلیل اینکه از منابع مهم صنعتی به شمار می‌روند، استفاده از آن‌ها به این منظور مناسب نمی‌باشد. بنابراین ریزجلبک‌ها به عنوان نسل سوم منابع سوخت‌های زیستی می‌توانند راه حل مناسبی برای رفع مشکل انرژی باشند (Cakmak et al., 2012). جلبک‌ها می‌توانند بر روی زمین‌های کم حاصل و دارای آب با کیفیت پایین کشت شوند. استفاده از جلبک به عنوان یک منبع سوخت زیستی وابستگی به سوخت‌های فسیلی را کاهش می‌دهد (Assmann, 2011). ریزجلبک‌ها موجودات اولیه تبدیل‌کننده بیولوژیکی CO₂ به O₂ بر روی کره زمین هستند. آن‌ها دارای پتانسیل تولید ترکیبات ارزشمند مانند رنگدانه‌ها، ویتامین‌ها و مواد اولیه سوخت‌های زیستی می‌باشند. امروزه، ریزجلبک‌ها به طور وسیعی در صنایع مختلف مانند تصفیه فاضلاب، تولید مواد غذایی غنی از پروتئین، مواد افزودنی خوراکی، ترکیبات با ارزش افزوده و سوخت‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cakmak et al., 2012). جلبک‌ها موجودات تک سلولی یا چند سلولی هستند که با انجام فتوسنتز قادر به تولید مواد غذایی

می‌باشند. عوامل محیطی مانند دما، نور، pH و مواد مغذی علاوه بر تأثیر بر روی فتوسنتز و نرخ رشد جلبک، بر فعالیت متابولیسم سلولی و ترکیبات آن نیز مؤثرند (Juneja et al., 2013). بنابراین در کشت ریزجلبک‌ها عوامل رشد می‌بایست به صورت دقیق کنترل شود. بهینه‌سازی شرایط، عامل اصلی در کشت انبوه ریزجلبک‌ها می‌باشد. بنابراین جهت درک رفتار گونه‌های جلبکی تحت عوامل مختلف محیطی، تعیین پارامترهای مختلف رشد ضروری به نظر می‌رسد. بررسی اثر متقابل بین این عوامل و مدلسازی پارامترهای رشد، امکان بهینه‌سازی شرایط رشد را برای گونه‌های مختلف در مقیاس وسیع فراهم می‌آورد. در میان این فاکتورها، نور به دلیل اثر مستقیم بر مکانیسم‌های فتوسنتزی، فاکتور مهمی در تعیین شرایط بهینه برای کشت محسوب می‌شود. در حضور مواد مغذی، راندمان کشت ریزجلبک‌ها به طور عمده توسط شدت نور و دما کنترل می‌شود. بعلاوه دما و شدت نور، از فاکتورهای اصلی مؤثر بر تولید بیومس در کشت میکروجلبک‌ها در مقیاس بزرگ هستند (Bouterfas et al., 2006).

از جمله ترکیبات تولید شده توسط جلبک که می‌تواند به عنوان منبع انرژی در نظر گرفته شود هیدروژن می‌باشد. جلبک‌ها برای تولید هیدروژن، از متابولیت‌هایی مانند نشاسته و گلوکز در فرایند کاتابولیسم استفاده می‌نمایند (Chochois et al., 2010). از جمله ترکیبات مورد نیاز جهت تولید هیدروژن، نشاسته ذخیره شده در جلبک می‌باشد. اهمیت تخمیر نشاسته در تولید هیدروژن برای اولین بار توسط گیسیس و همکارانش شناخته شده است (Gibbs et al., 1986). دو مسیر مختلف، تولید هیدروژن در نور را احیاء می‌کنند. مسیر مستقیم وابسته به فتوسیستم II و مسیر غیرمستقیم مستقل از فتوسیستم II و متکی به احیاکننده غیرشیمیایی پلاستوکوئینون می‌باشد. متابولیسم نشاسته نقش مهمی در هر دو مسیر بازی می‌کند. تثبیت دی‌اکسیدکربن توسط ارگانیسم‌های فتوسنتزی و تبدیل آن به کربوهیدرات‌هایی مانند نشاسته در دو مرحله انجام می‌شود. در طی مرحله نوری، رنگیزه‌های جمع‌کننده نور (کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها)، به عنوان آنتن عمل نموده و انرژی خورشیدی را جمع‌آوری می‌کنند.

انرژی نور جذب شده به مراکز واکنش فتوشیمیایی¹ می‌رسد و سپس در این مراکز توسط یک سری مراحل انتقال الکترون به انرژی شیمیایی تبدیل می‌شود (Allakhverdiev et al., 2010).

1-2- اهداف طرح و دلایل انجام آن

امروزه یکی از چالش‌های اصلی جوامع مدرن، افزایش تقاضا و کاهش عرضه در منابع انرژی و همچنین مسائل مربوط به آلودگی‌های زیست محیطی و گرم شدن کره زمین می‌باشد. نگرانی در مورد آینده منجر به تمرکز علم بر روی منابع جایگزین، انرژی تجدیدپذیر، پایدار و سازگار با محیط زیست گردیده است. در حال حاضر هیدروژن با خصوصیات منحصر به فرد، به عنوان یکی از بهترین گزینه‌ها، به عنوان انرژی جایگزین در نظر گرفته شده است (Oncel and Sukan, 2011). هیدروژن یکی از سوخت‌های پاک است که علاوه بر اهمیت استراتژیک در کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای حاصل از وسایل نقلیه موتوری، سوختی تجدیدپذیر و سازگار با محیط زیست می‌باشد. محصول حاصل از سوختن هیدروژن پاک می‌باشد که متشکل از آب و مقدار کمی از اکسیدهای نیتروژن است. این گاز دارای خواص بسیار ویژه‌ای مانند سرعت زیاد اشتعال، عدد اکتان مؤثر بالا و فاقد سمیت می‌باشد، بنابراین به عنوان سوخت در حمل و نقل مورد استفاده قرار می‌گیرد (Balat, 2008). از سال 1970 تحقیقات قابل توجهی در خصوص تولید زیستی هیدروژن انجام شده است و تا سال 2000 به منظور پژوهش درباره این موضوع بیش از 100 میلیون دلار هزینه صرف شده است. پیل‌های سوختی و سایر فناوری‌ها جهت بهره‌برداری از هیدروژن به صورت تجاری در دسترس هستند و در وسایل نقلیه مانند هوندا (Honda s FCX) از هیدروژن به عنوان سوخت استفاده می‌شود (Milledge and Heaven, 2014).

بر اساس گزارش‌های ارائه شده، گونه‌های *Chlamydomonas*، *Chlorella* و *Scenedesmus* و چندین گونه سیانوباکتر قادر به تولید هیدروژن می‌باشند. مزیت اصلی تولید زیستی هیدروژن این است

¹reaction center

که هیدروژن در محیط کشت تجمع نمی‌یابد و هزینه جمع‌آوری و استخراج انرژی کاهش می‌یابد (Milledge and Heaven, 2014). توانایی ریزجلبک‌های یوکاریوتی در تولید هیدروژن، در شرایط بی‌هوازی حدود 60 سال پیش کشف شد. آنزیمی که این فعالیت برگشت‌پذیر را کاتالیز می‌کند، آنزیم Fe-Hیدروژناز می‌باشد که توسط مقدار ناچیزی از اکسیژن که طی فتوسنتز تولید می‌شود، غیرفعال می‌گردد. بنابراین، تولید هیدروژن وابسته به نور توسط جلبک‌های سبز مانند *Chlamydomonas reinhardtii*، در یک دوره بسیار کوتاه بعد از ایجاد شرایط بی‌هوازی مشاهده می‌شود (Antal et al., 2003).

بر اساس بررسی‌های انجام شده نشاسته، نقش کلیدی در تولید هیدروژن در جلبک‌ها بازی می‌کند (Tamburic et al., 2011). در سال 2000، Melis و همکارانش، پروتکلی آزمایشگاهی بر اساس حذف سولفور پیشنهاد دادند که منجر به تولید طولانی مدت هیدروژن می‌شود. این پروتکل مبتنی بر یک فرایند دو مرحله‌ای بود: در طول مرحله اول، فتوسنتز اکسیژنی منجر به تولید بیومس و ذخیره کربوهیدرات می‌گردید و در طول مرحله دوم (بی‌هوازی)، آنزیم هیدروژناز تحریک شده و هیدروژن تولید می‌کند. فقر گوگرد دو اثر مهم بر تولید هیدروژن دارد: (1) انباشته شدن نشاسته که پاسخ معمول به حذف مواد مغذی می‌باشد و (2) افت تدریجی فعالیت فتوسیستم II. هنگامی که سرعت تشکیل اکسیژن فتوسنتزی کمتر از نرخ تنفس می‌گردد، شرایط بی‌هوازی ایجاد می‌شود، که امکان القاء هیدروژناز و تولید میزان قابل توجهی هیدروژن در طی چند روز فراهم می‌شود و به موازات تولید هیدروژن، نشاسته تخریب می‌شود (Melis et al., 2000).

رشد جمعیت ریزجلبک‌ها، به سه عامل حیاتی نور، درجه حرارت و میزان مواد مغذی مانند نیتروژن، فسفر و غیره بستگی دارد. در واقع، نور بر میزان فتوسنتز، تنفس، تقسیم سلولی و نرخ رشد مؤثر است. همچنین این فاکتور بر فعالیت آنزیمی و سنتز ماکرومولکول‌ها تأثیر می‌گذارد. موجودات فتوسنتزکننده با استفاده از انرژی نور خورشید، کربن معدنی را به مولکول‌های آلی تبدیل کرده و بیومس تولید می‌نمایند.

فتوسنتز اکسیژنی با فعالیت دو نوع کمپلکس پروتئینی به نام‌های فتوسیستم I و II انجام می‌شود که فرایند انتقال الکترون از آب به NADPH را کاتالیز می‌کنند (Bonente et al., 2012). یکی از عوامل مهم دیگر در کشت جلبک‌ها pH است که به دلیل اثر آن بر تعیین حلالیت و در دسترس بودن دی‌اکسیدکربن و مواد غذایی ضروری می‌باشد. بر همین اساس تأثیر قابل توجهی در متابولیسم جلبک‌ها دارد. با توجه به جذب کربن توسط جلبک‌ها، pH می‌تواند به طور قابل توجهی در محیط کشت جلبک افزایش یابد. حداکثر رشد جلبک در حدود pH خنثی انجام می‌شود، اگر چه pH بهینه برای هر جلبک، pH محیط کشت اولیه است که جلبک از آن نمونه برداری شده و به آن سازگار شده است. تغییر pH محیط کشت ممکن است رشد جلبک را از طریق مهار متابولیسمی محدود کند (Juneja et al., 2013). جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* جلبکی تک سلولی است که اغلب به عنوان ارگانیسم مدل در مطالعات مختلف مانند کنترل چرخه سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعدادی از فاکتورها از جمله شدت نور در رشد و تکثیر این ارگانیسم نقش اساسی دارند. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که شدت نور بر نرخ رشد و فرایندهای متابولیسمی سلول‌ها مؤثرند (Ribeiro et al., 2013).

در سال‌های اخیر به منظور کاهش هزینه‌های تحقیقات و انجام حداقل آزمایش‌های مورد نیاز، از روش‌های آماری برای طراحی آزمایش‌ها استفاده می‌گردد. یکی از روش‌های آماری مورد استفاده در بهینه‌سازی شرایط کشت، روش سطح پاسخ² (RSM) می‌باشد. با استفاده از این روش تعداد کمتری آزمایش مورد نیاز بوده و برای سیستم‌های چند فاکتوری نیز مفید است. در این روش رابطه میان فاکتورهای گوناگون نیز در نظر گرفته می‌شود (Chang et al., 2006).

با توجه به اهمیت جلبک *Chlamydomonas* در حیطه انرژی (بیوهیدروژن و بیودیزل)، و تأثیر فاکتورهای محیطی بر نرخ رشد و تولید نشاسته در این جلبک، هدف این تحقیق، دستیابی به شدت نور و

²Response Surface Methodology (RSM)

pH بهینه، جهت افزایش نرخ رشد و تولید نشاسته در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* با استفاده از روش آماری سطح پاسخ (RSM) است.

1-3-1 - تئوری مبنای طرح

1-3-1-1 - طراحی آزمایش با نرم افزار

طرح آزمایشی الگویی است که برای انجام آزمایش‌ها و به منظور به دست آوردن اطلاعات دقیق و صحیح درباره عوامل مؤثر بر آزمایش به کار می‌رود. به عبارت دیگر، علم طرح آزمایش، علم طرح‌ریزی، اجرا، تجزیه آماری و نتیجه‌گیری در مورد آزمایش‌ها است. با اجرای طرح آزمایشی می‌توان مقدار بهینه نتایج اندازه‌گیری (پاسخ‌ها) و یا شرایطی که در آن، پاسخ‌های مغایر از سازگاری مناسبی برخوردار هستند را تعیین نمود.

1-3-1-1-1 - مفاهیم کلی

هدف از اجرای طرح آزمایشی، تعیین یک سری از شرایط مناسب تجربی و یا مقادیر فاکتورها می‌باشد که بر خصوصیت مورد مطالعه مؤثر هستند. فاکتور نامی است که به یک سری از متغیرهایی داده می‌شود که ممکن است بر روی خصوصیت یا خصوصیات مورد مطالعه، مؤثر باشند. ویژگی‌هایی از محصول یا فرایند را که قرار است بهینه شوند، پاسخ می‌نامند. بنابراین در اجرای طرح‌های آزمایشی، پژوهشگر با دو نوع متغیر روبرو است. فاکتورهایی که متغیرهای مستقل محسوب می‌شوند و پاسخ یا پاسخ‌هایی که متغیرهای وابسته نامیده می‌شوند. رابطه بین پاسخ (y) و فاکتورهای مورد مطالعه (x_i) را می‌توان به صورت زیر بیان کرد:

$$y = f(x_i) \quad i = 1, \dots, n$$

فاکتورهای آزمایشی به دو گروه فاکتورهای کیفی و کمی تقسیم می‌شوند. مقادیر مختلفی را که به فاکتورها اختصاص داده می‌شود سطح فاکتور³ می‌نامند. اصطلاح سطح نه تنها برای فاکتورهای کمی بلکه در مورد فاکتورهای کیفی نیز به کار می‌رود (Morgan, 1991).

1-3-1-2- مراحل اصلی اجرای طرح آزمایشی

اولین مرحله در اجرای طرح آزمایشی شامل انتخاب فاکتور یا فاکتورهای مؤثر بر پاسخ است. در صورتی که اطلاعات کافی در مورد فاکتورهای مؤثر موجود نباشد، لازم است اثرات کلیه فاکتورهایی را که ممکن است بر پاسخ مؤثر باشند را بررسی نموده و سپس فاکتورهای مؤثر را انتخاب نمود. برای این منظور می‌توان از طرح غربالی⁴ استفاده نمود. پس از انجام طرح غربالی ممکن است تعدادی از فاکتورها بر پاسخ آزمایش مورد نظر بی اثر باشند. چنین فاکتورهایی کنار گذاشته شده و با مابقی آنها مراحل بهینه‌سازی ادامه می‌یابد. از روش‌هایی که برای تشخیص مؤثر بودن یک فاکتور بر پاسخ در طرح غربالی به کار می‌رود روش نمودار احتمال نرمال⁵ است (Morgan, 1991). مرحله بعد در اجرای طرح آزمایشی تعیین سطوح فاکتورهای مؤثر بر پاسخ است. تعیین این سطوح می‌تواند بر اساس دانش و اطلاعات قبلی از سیستم شیمیایی مورد نظر و یا بر اساس نتایج به دست آمده از طرح غربال باشد. مرحله بعد در اجرای طرح آزمایشی، انتخاب روش بهینه‌سازی است. به طور کلی، روش بهینه‌سازی در دو گروه روش کلاسیک یک فاکتور در یک زمان (روش تک متغیره) و روش سیستماتیک (روش چند متغیره) قرار می‌گیرند. روش تک متغیره تنها زمانی به کار می‌رود که هیچ گونه برهم کنشی بین فاکتورها وجود نداشته باشد. از آنجایی که در اکثر موارد عملی، اثر یک فاکتور بخصوص بر پاسخ مورد مطالعه، به مقدار سایر فاکتورها وابسته است و یا به عبارت دیگر، بین فاکتورها برهم‌کنش وجود دارد استفاده از روش چند متغیره اجتناب ناپذیر است. روش‌های اصلی بهینه‌سازی چند متغیره شامل روش بهینه‌سازی متوالی و روش

³Factor level

⁴Screening design

⁵Normal probability plot

بهینه‌سازی همزمان می‌باشد. در آخرین مرحله از اجرای طرح‌های آزمایشی، شرایط بهینه بر اساس نتایج آزمایش‌ها و بر اساس مدلی که پاسخ را به فاکتورهای آزمایشی مرتبط می‌سازد پیش‌بینی می‌شود. با انجام آزمایش در شرایط بهینه پیش‌بینی شده می‌توان کیفیت مدل ایجاد شده را ارزیابی نمود.

1-3-1-3- طرح‌های هم‌زمان

طرح‌های هم‌زمان به دو گروه اصلی زیر تقسیم می‌شوند:

- 1- طرح‌هایی که هدف از اجرای آن‌ها تعیین فاکتورهای مؤثر بر پاسخ و تخمین اثر آن‌ها است.
- 2- طرح‌هایی که با اجرای آن‌ها امکان مدل‌سازی پاسخ و در نتیجه ترسیم رویه پاسخ فراهم می‌شود. رویه پاسخ، نموداری از پاسخ به صورت تابعی از فاکتورهای آزمایشی بوده و به این ترتیب پیش‌بینی شرایط بهینه را ممکن می‌سازد.

جهت تعیین فاکتورهای مؤثر بر پاسخ و تخمین اثر آن‌ها، از طرح‌های فاکتوریل دو سطحی⁶ استفاده می‌شود. در این طرح‌ها، هر یک از فاکتورها در دو سطح مورد بررسی قرار می‌گیرد (Morgan, 1991). طرح‌هایی که در آن‌ها بر مدل‌سازی تأکید می‌شود مستلزم مطالعه هر یک از فاکتورها در بیش از دو سطح می‌باشد. هدف اصلی در استفاده از این طرح‌ها، استخراج مدل و رویه پاسخ مربوطه است. به همین دلیل، گاه این طرح‌ها را طرح‌های رویه پاسخ نیز می‌نامند. طرح‌های مرکب مرکزی از جمله معروف‌ترین طرح‌هایی می‌باشند که در آن‌ها شرایط بهینه عملکرد با مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورهای آزمایشی تعیین می‌شود.

طرح‌های چند سطحی⁷

ترسیم رویه‌های پاسخ مستلزم مدل‌سازی پاسخ به صورت تابعی از فاکتورها و برهم‌کنش‌های مؤثر است. طرح‌های آزمایشی با بیش از دو سطح، جهت ایجاد مدل‌های خمیده⁸ برای توصیف رابطه کمی

⁶Two-level factorial design

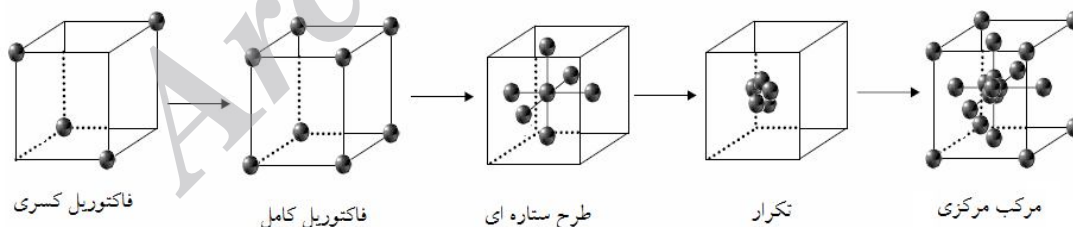
⁷Multi-level designs

پاسخ و فاکتورها به کار می‌روند. توصیف محدوده‌ی آزمایشی توسط طرح‌های چند سطحی ممکن است کروی و یا مکعبی باشد. طرح فاکتوریل سه سطحی از جمله طرح‌های مکعبی می‌باشد. برخی از انواع طرح‌های مرکب مرکزی و همچنین طرح‌های باکس-بنکن⁹ و دوهرلرت¹⁰ از جمله طرح‌های کروی محسوب می‌شوند. طرح فاکتوریل سه سطحی کامل با 3^f آزمایش (f تعداد فاکتورها می‌باشد)، طرحی مکعبی محسوب می‌شود. از این طرح تنها در مواردی که تعداد فاکتورها کم باشد استفاده می‌گردد. طرح‌های مرکب مرکزی جایگزین طرح‌های فاکتوریل سه سطحی کامل در مطالعه فاکتورهای متعدد می‌باشد. طرح‌های مرکب مرکزی از سه بخش مختلف تشکیل می‌شوند:

1- طرح فاکتوریل دو سطحی کامل و یا کسری

2- طرح ستاره‌ای¹¹ که از آن جهت افزایش تعداد سطوح فاکتورهای مورد مطالعه و توصیف روابط غیر خطی بین پاسخ و فاکتورها استفاده می‌شود.

3- نقطه مرکزی که اغلب جهت تخمین خطای خالص آزمایش به کار می‌رود (آزمایش در این نقطه چندین مرتبه تکرار می‌شود). بخش‌های تشکیل‌دهنده یک طرح مرکب مرکزی در شکل (1) دیده می‌شود (Breerton, 2003).



شکل 1- بخش‌های تشکیل‌دهنده طرح مرکب مرکزی (Breerton, 2003)

[^]Curved models

[^]Box- Behenken design

[^]Dohlerlert design

[^]Star design

1-3-2- ایجاد مدل‌های آماری

پس از اینکه نتایج آزمایشات بر مبنای طرح آزمایشی به دست آمد، یک مدل ریاضی برای ارتباط بین فاکتورهای مؤثر و پاسخ ایجاد می‌شود تا بتوان بر مبنای آن رویه پاسخ را به دست آورد. در این مرحله می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف مانند رگرسیون خطی چندتایی¹²، رگرسیون رویه پاسخ¹³، آنالیز اجزاء اصلی¹⁴ و حداقل مربعات جزئی¹⁵ به جستجوی مدل ریاضی و توصیف رابطه بین فاکتورها و پاسخ مورد مطالعه پرداخت.

1-2-3-1- تجزیه و تحلیل آماری مدل‌ها و انتخاب مناسبترین مدل

پس از ایجاد مدل توسط روش‌های رگرسیون خطی چندتایی یا رگرسیون رویه پاسخ، اعتبار مدل ایجاد شده از لحاظ آماری باید مورد ارزیابی قرار بگیرد. از جمله آماره‌هایی که برای ارزیابی مدل استفاده می‌شود می‌توان به موارد زیر اشاره کرد (Neter et al., 1996):

الف- آماره ضریب تعیین چندتایی¹⁶ (R^2) که از مقایسه بین مقدار داده تجربی و مقدار محاسبه شده از مدل برای آن داده بدست می‌آید. مقدار این آماره در محدوده 0-1 قرار داشته و بزرگی آن درجه خطی بودن رابطه بین متغیر وابسته و متغیرهای مستقل را بیان می‌کند.

ب- آماره F ، معیار دیگری برای ارزیابی مدل‌ها می‌باشد. مقدار این آماره از تقسیم مربع متوسط رگرسیون¹⁷ به مربع متوسط خطا¹⁸ بدست می‌آید. اگر مقدار F مدل بدست آمده از مقدار F بحرانی ثبت شده در جداول آماری بزرگتر باشد، وجود رابطه خطی بین متغیر وابسته و متغیرهای مستقل تأیید می‌شود.

¹² Multiple linear regression

¹³ Response surface regression

¹⁴ Principle component analysis

¹⁵ Partial least squares

¹⁶ Coefficient of multiple determination

¹⁷ Regression mean square

¹⁸ Residual mean square

پ- آماره خطای استاندارد تخمین¹⁹ (SE) نیز جهت بررسی اعتبار مدل مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقدار این آماره از ریشه دوم مربع متوسط خطا به دست می‌آید. بدیهی است که هر چه مقدار SE کمتر باشد مدل به دست آمده از کیفیت بالاتری برخوردار خواهد بود.

در نهایت با توجه به آماره‌های ذکر شده می‌توان مناسب بودن مدل ایجاد شده را تأیید و یا رد کرد. به‌طور کلی یک مدل مناسب باید دارای ویژگی‌های زیر باشد:

- R^2 نزدیک به 1

- F بزرگ

- SE کم

1-3-3- طراحی آزمایش با نرم‌افزار Design expert

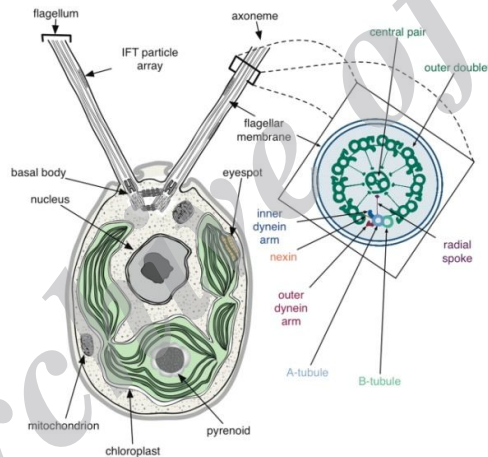
این نرم‌افزار در طراحی و تفسیر یک آزمایش چند فاکتوری مؤثر است. در این نرم‌افزار، پس از معرفی عوامل مؤثر بر آزمون و بر اساس تعداد فاکتورهای متغیر و سطوح تعریف شده، آزمایش‌ها طراحی می‌شوند. شرایط بهینه الزاماً جزو آزمون‌های انجام شده نیست. پس از انجام آزمون‌ها و وارد کردن داده‌ها در برنامه، تحلیل آماری انجام شده و بهترین شرایط ارزیابی می‌گردد. از جمله مزایای این روش بررسی چندین عامل متغیر به‌طور همزمان بر بازدهی و نیز صرفه‌جویی زمان و منابع می‌باشد. در این حالت، اثرات خطی و یا درجه دوم متغیرهای مورد آزمایش، نمودارهای کانتور و یا نقشه‌های توپوگرافی و مدل مناسب ارائه می‌شود. به این ترتیب تعیین مقادیر مناسب از هر متغیر و نیز درجه اهمیت هر کدام از آنها به سادگی قابل تعیین و پیش‌بینی است (Chakravarti and Sahai, 2002).

¹⁹Standard error of estimate

1-3-4 - معرفی جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

تحقیقات بر روی جلبک سبز تک سلولی *Chlamydomonas reinhardtii* تقریباً به مدت یک قرن قدمت دارد. این جلبک به دلیل چرخه زندگی ساده می‌تواند به آسانی تکثیر شود و رشد سریع و ژنوم هاپلوئید در سلول‌های آن، ویژگی‌هایی هستند که منجر به استفاده از آن به عنوان یک سیستم مدل مناسب در مطالعات مختلف می‌شود (Hemschemeier, 2005).

جلبک سبز *Chlamydomonas reinhardtii*، معمولاً در خاک و آب شیرین یافت می‌شود. قطر این جلبک در حدود 10 میکرومتر است و با استفاده از دو تاژک، در آب حرکت می‌کند (شکل 2) (Tamburic et al., 2011).



شکل 2- ساختار سلولی جلبک سبز *Chlamydomonas reinhardtii* (Tamburic et al., 2011)

این جلبک دارای کلروپلاستی بزرگ برای جذب حداکثر نور خورشید است. یکی از مزایای عمده استفاده از آن، اندازه نسبتاً بزرگ کلروپلاست آن است (شکل 2) که موجب می‌شود که جمع‌آوری انرژی نور مورد نیاز در فتوسنتز به طور مؤثری انجام شود. در نتیجه این جلبک می‌تواند در رقابت با سایر ریزجلبک‌ها و باکتری‌ها بیشتر رشد نماید. مزیت دیگر جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* این

است که نقشه ژنتیکی آن کاملاً مشخص شده است. این امر این امکان را به زیست شناسان می‌دهد که گونه‌های جهش‌یافته با قابلیت تولید هیدروژن بیشتر را طراحی نمایند (Tamburic et al., 2011). جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* می‌تواند با استفاده از انرژی نور، تحت شرایط بی‌هوازی، هیدروژن را از آب تولید نماید. تشکیل هیدروژن در این جلبک سبز تک سلولی به طور طبیعی تحت شرایط استرس غذایی انجام می‌شود. بعضی از محققان گزارش کردند که در طول فتوسنتز، جلبک سبز می‌تواند هیدروژن را با بازده بیش از 80% تولید نماید (Saleem et al., 2012).

1-4-3-1- شرایط رشد جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

فرایند کشت این جلبک را می‌توان بر اساس نحوه استفاده از منبع انرژی، به سه دسته کلی فتواتوتروفیک، هتروتروفیک و میکسوتروفیک، تقسیم کرد (Juneja et al., 2013). در رشد فتواتوتروفیک، طی فرایند فتوسنتزی، دی‌اکسیدکربن به عنوان تنها منبع کربن جذب می‌شود. در رشد هتروتروفیک، کشت در تاریکی با منبع کربن آلی انجام می‌شود (معمولاً در گونه‌های *Chlamydomonas* منبع کربن استات می‌باشد) و در رشد میکسوتروفیک، کشت در نور با افزودن استات انجام می‌شود (Harris, 2009).

جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی در محیط کشت مایع یا جامد (حاوی آگار) دارای نمک‌های معدنی ساده کشت داد (Harris, 2009). این جلبک به خوبی در محیط کشت 20°TAP رشد می‌کند. محیط کشت TAP حاوی تمامی نمک‌ها و عناصر ضروری برای تغذیه و رشد آن است. به علاوه تریس، منبعی مناسب برای تأمین کربن است که جلبک به منظور سنتز مولکول‌های آلی از آن استفاده می‌کند. عناصر میکرو در این محیط کشت شامل روی، بور، منگنز، کبالت، مس، مولیبدن، آمونیاک و آهن می‌باشند (Tamburic et al., 2011).

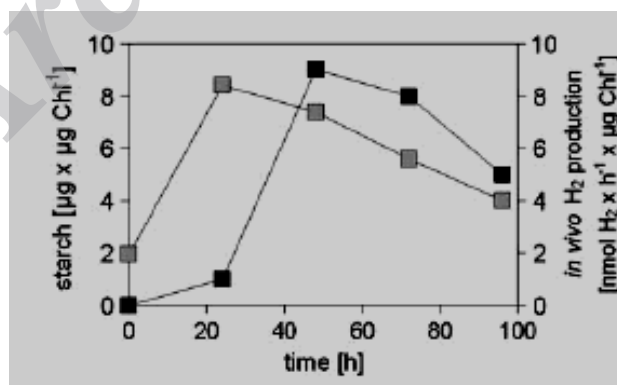
^۲ Tris-Acetate Phosphate

بهترین شدت نور برای کشت *Chlamydomonas*، دوره تابش فعال فتوسنتزی (PAR)²¹ معرفی شد. جهت کشت این جلبک‌ها در قفسه‌های کشت، لامپ‌های فلورسانت سفید سرد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Harris, 2009).

جلبک *Chlamydomonas* در آزمایشگاه در محدوده دمایی 20-25 درجه سانتی‌گراد به خوبی رشد می‌کند. گونه‌های وحشی و جهش یافته جلبک، حداقل دمایی 15 درجه سانتی‌گراد و حداکثر دمایی 35 درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کنند (Harris, 2009).

1-3-4-2- تولید نشاسته در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

در بسیاری از ریزجلبک‌ها مانند جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*، تحت شرایط استرس، مواد ذخیره‌ای پر انرژی مانند نشاسته تولید می‌گردد (Siaut et al., 2011). نشاسته در طول فاز مصرف اکسیژن، تولید می‌شود. در این فاز، استات به عنوان منبع اصلی کربن مصرف شده و نشاسته در سلول‌ها ذخیره می‌شود. بین غلظت نشاسته و تولید هیدروژن، رابطه‌ای مستقیم وجود دارد (شکل 3). همچنین مشاهده می‌شود که نشاسته در طول تولید هیدروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tamburic et al., 2011).

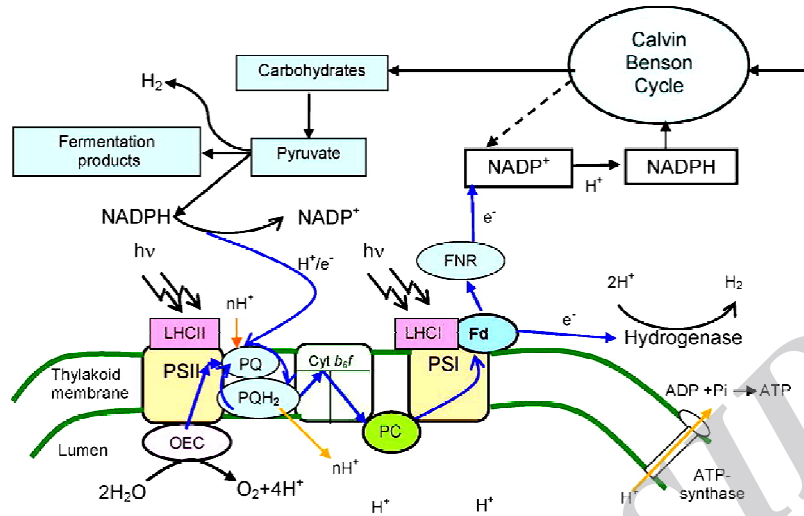


شکل 3- ارتباط میان غلظت نشاسته و تولید هیدروژن (Tamburic et al., 2011)

²¹ Photosynthetic Active Radiation

1-3-5 - مکانیسم تولید هیدروژن زیستی در جلبک

فرایندهای فتوسنتزی توسط انرژی نور جمع‌آوری شده در کمپلکس‌های جمع‌کننده نور در فتوسیستم I و فتوسیستم II، هدایت می‌شود. الکترون‌های حاصل از اکسیداسیون آب در کمپلکس OEC²² در فتوسیستم II در طول زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی از پلاستوکینون (PQ)، کمپلکس سیتوکروم b₆/f، پلاستوسیانین (PC)، فتوسیستم I و فرودوکسین عبور می‌کنند. سپس، فرودوکسین- NADP^+ اکسیدوردوکتاز، به منظور تولید محصول نهایی NADPH، الکترون‌ها را به NADP^+ منتقل می‌کند. H^+ توسط OEC و سیکل PQ/PQH₂ درون لومن تیلاکوئید رها می‌شود و توسط ATP سنتاز برای تولید ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد. ATP و NADPH تولید شده در طی فرایندهای فتوسنتزی اولیه در چرخه کالوین- بنسون جهت تثبیت CO₂ و تولید قندها و در نهایت نشاسته مصرف می‌شود. تحت شرایط بی‌هوازی، هیدروژناز، الکترون‌ها را از مولکول‌های احیاکننده فرودوکسین دریافت می‌کند و از آن‌ها برای احیا پروتون‌ها به مولکول‌های هیدروژن (H₂) استفاده می‌کند. در شرایط بی‌هوازی، آنزیم هیدروژناز الکترون‌ها را از فرودوکسین احیاء شده می‌پذیرد و با استفاده از آن‌ها، پروتون‌ها را به هیدروژن مولکولی احیاء می‌کند. همچنین در شرایط بی‌هوازی، نشاسته به عنوان منبع پروتون و الکترون برای تولید H₂ (از طریق NADPH، PQ، cyt b₆/f، PC و PSI) مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل 4) (Allakhverdiev et al., 2010).



شکل 4- نمایش شماتیک از تولید هیدروژن با استفاده از نور در طی فتوسنتز و تشکیل کربوهیدرات‌ها در ریزجلبک‌ها (Allakhverdiev et al., 2010).

1-3-6 - اهمیت بهینه‌سازی شرایط رشد

امروزه با توجه به اهمیت بهینه‌سازی شرایط کشت (شرایط غذایی و محیطی) بر رشد جلبک‌ها تحقیقات متعددی در این زمینه در جهان صورت می‌گیرد. از میان فاکتورهای محیطی مؤثر بر نرخ رشد جلبک‌های تک سلولی، شدت نور عامل مهمی محسوب می‌شود. Bonente و همکارانش گزارش کردند که سیستم فتوسنتزی در *Chlamydomonas reinhardtii* تحت شرایط شدت نوری مختلف تغییر می‌کند. در نور بالا، سلول‌ها نرخ رشد سریعتر و تولید بیومس بیشتری در مقایسه با شرایط نوری پایین دارند (Bonente et al., 2012).

1-3-7 - روش‌های مختلف اندازه‌گیری نرخ رشد

Moheimani و همکارانش در سال 2013 روش‌های مختلف اندازه‌گیری رشد جلبک را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مقاله به روش‌هایی مانند شمارش سلول توسط لام نئوبار، اندازه‌گیری دانسیته نوری،

تعیین وزن خشک، اندازه‌گیری میزان کلروفیل جهت تعیین رشد جلبک اشاره شده است (Moheimani et al., 2013).

1-3-8- مقایسه روش‌های مختلف سنجش نشاسته:

تعیین غلظت کربوهیدرات در محلول‌های آبی، مؤلفه بسیار مهمی در پژوهش‌های زیست محیطی، کاربردهای صنعتی در نفت، دارویی و صنایع غذایی می‌باشد. تنوع گسترده‌ی کربوهیدرات‌ها در این پژوهش‌ها، منجر به استفاده از تکنیک‌های مختلف اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات‌ها شامل کروماتوگرافی، الکتروفورز موئین²³، طیف‌سنجی مادون قرمز (IR)²⁴ و طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای (NMR)²⁵ شده است. استفاده از این روش‌ها نیاز به سرمایه‌گذاری مالی قابل توجه، مهارت‌های تحلیلی پیشرفته و زمان زیادی دارد. یکی از متنوع‌ترین روش‌های نسبتاً آسان و ارزان برای تعیین غلظت کربوهیدرات، روش رنگ‌سنجی می‌باشد. در این روش، بین محلول کربوهیدرات هیدرولیز شده و معرف واکنش انجام می‌شود. سپس محلول رنگی ایجاد شده در محدوده مرئی از طیف الکترومغناطیسی قابل تشخیص است. معرف‌هایی مانند فنول، فری سیانید آلکالین و آنترون، معمولاً به عنوان معرف مورد استفاده قرار می‌گیرند. در میان روش‌های رنگ‌سنجی به منظور آنالیز کربوهیدرات، روش فنول - اسیدسولفوریک DuBois و همکارانش (1956) مطمئن‌ترین روش تاکنون است و در محدوده گسترده‌ای از زمینه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. روش فنول - اسیدسولفوریک، به دهیدراته شدن ساکاریدهای هیدرولیز شده به مشتقات فورفورال در طول واکنش با اسید سولفوریک غلیظ بستگی دارد. واکنش بیشتر مشتقات فورفورال با فنول، کمپلکس‌های رنگی ایجاد می‌کند که نور را در محدوده مرئی جذب می‌کند و حداکثر جذب، در طول موج 490 نانومتر قابل مشاهده است. نکته قابل توجه در استفاده از روش فنول - اسیدسولفوریک این است که علی‌رغم سادگی کاربرد و استفاده وسیع،

²³ Capillary Electrophoresis

²⁴ infrared

²⁵ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

این روش معایب و مشکلاتی نیز دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد: اولاً معرف رنگی در این روش فنول می‌باشد که خطرات بی‌شماری برای سلامتی دارد. فنول و بخارات آن، خورنده پوست، چشم و سیستم تنفسی می‌باشند. تماس طولانی مدت آن با پوست منجر به ایجاد درماتیت یا سوختگی درجه دوم و سوم می‌شود. استنشاق طولانی مدت یا مکرر بخارات فنول موجب ادم ریه می‌گردد. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض فنول، تأثیر جدی بر سیستم عصبی مرکزی، کلیه‌ها و کبد دارد. فنول یکی از 126 آلاینده‌ای است که در حال حاضر توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا تعیین شده است. دوماً، روش استاندارد فنول-اسید سولفوریک، در مورد غلظت‌های گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش در مورد کمپلکس‌های کربوهیدراتی، محدودیت‌های زیادی را نشان می‌دهد. سوماً، واکنش شیمیایی کربوهیدرات‌ها با عامل مشتق‌سازی (اسید سولفوریک) به شدت به نوع کربوهیدرات (خنثی یا یونی)، وابسته می‌باشد. در نتیجه ضریب جذب مولی می‌تواند وابسته به بار یونی کربوهیدرات‌های آنالیز شده باشد (Albalasmeh et al., 2013).

با توجه به نتایج به دست آمده توسط Itagaki و همکارانش، Albalasmeh و همکارانش، روشی برای اندازه‌گیری غلظت قند و محتوای کربن محلول در آب را ارائه دادند که به جذب UV توسط مشتقات فورفورال تولید شده طی واکنش با اسیدسولفوریک غلیظ بستگی دارد. بر این اساس Albalasmeh و همکارانش، مقایسه‌ای بین روش فنول-اسیدسولفوریک استاندارد و روش پیشنهادی اسیدسولفوریک-UV با استفاده از محلول‌های آبی از کربوهیدرات‌های خنثی (گلوکز، فروکتوز، ساکاروز، نشاسته و دکستران) و کربوهیدرات‌های آنیونی (پلی گالاتورونیک اسید و زانتان) انجام دادند که به طور گسترده‌ای در تحقیقات زیست محیطی و کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به نکات اشاره شده، روش اسیدسولفوریک-UV، به دلیل حذف استفاده از فنول، سرعت بیشتر و همچنین دقت بالاتر، روش مناسب‌تری برای سنجش میزان نشاسته می‌باشد (Albalasmeh et al., 2013).

فصل دوم

پیشینه تحقیق

Archive of SID

2-1- تاریخچه و سوابق انجام طرح در ایران

امروزه استفاده از روش‌های طراحی آزمایش به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد ارگانیسم‌ها، با هدف کاهش هزینه‌ها و تسریع در حصول نتایج کاربرد فراوانی یافته است. هادی‌زاده و همکارانش به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از روش سطح پاسخ برای چهار فاکتور غلظت کلسیم، غلظت توئین-80، غلظت روغن زیتون و زمان انکوباسیون، استفاده نمودند (هادی‌زاده شیرازی و همکاران، 1391). در سال 2012، برقبانی و همکارانش با استفاده از روش تاگوچی، اثر چندین پارامتر شامل غلظت‌های NaCl ، NaHCO_3 ، FeSO_4 ، دما و رنگ نور را بر روی رشد جلبک *Chlorella vulgaris* مورد بررسی قرار دادند (Barghbani et al., 2012).

امینی خوئی و همکارانش، اثر سه شدت نور 37/5، 62/5 و 100 میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه را بر نرخ رشد، زمان دو برابر شدن و تولید بیومس ریزجلبک *Chlorella vulgaris* مورد بررسی قرار دادند (امینی خوئی و همکاران؛ 1389). معصومی و همکارانش، اثر سه محیط کشت در سه نور مختلف را بر رشد ریزجلبک *Tetraselmis suecica* مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌ها با سه تکرار در معرض شدت‌های نوری 500، 1500 و 2500 لوکس قرار گرفتند. تفاوت آماری معنی‌داری در بین تیمارهای نوری مختلف مشاهده شد (معصومی و همکاران، 1384).

طاهری و شریعتی، اثر pH و چند فاکتور دیگر را بر تولید زیست توده در جلبک *Dunaliella tertiolecta* مورد بررسی قرار دادند (Taheri and Shariati, 2013).

اکبری و همکارانش، اثر برخی از فاکتورهای محیطی (دما، pH و شوری) را بر رشد جلبک *Gracilaria corticata* در حوضچه‌های فایبر گلاس بررسی نمودند (اکبری، 1383).

در خصوص سنجش میزان نشاسته بر روی جلبک‌ها پژوهشی صورت نگرفته است.

2-2 - تاریخچه و سوابق انجام طرح در جهان

جلبک سبز *Chlamydomonas reinhardtii* به دلیل مزایای مختلف به عنوان سیستم مدل معرفی شده است و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌های مرفولوژی، فیزیولوژی، ژنتیک و غیره بر روی آن انجام شده است. امروزه استفاده از این جلبک در زمینه تولید سوخت‌های زیستی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (Batyrova et al., 2012; Ma et al., 2011).

Andrade و همکارانش از روش سطح پاسخ (RSM) به منظور ارائه بهترین شرایط کشت برای رشد و تولید بیومس در ریزجلبک‌های سرما دوست استفاده نمودند (Andrade et al., 2014).

Somnath و همکارانش از روش تاگوچی در تولید لوتئین از ریزجلبک *Auxenochlorella protothecoides* استفاده کردند (Shinde and Lele, 2010).

Ribeiro و همکارانش، اثر شدت نور را بر رشد و تکثیر جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش اثر سه شدت نور مختلف 5000، 970 و صفر لوکس بر روی رشد جلبک مورد ارزیابی قرار گرفت (Ribeiro et al., 2013).

Bouterfas و همکارانش، اثر شدت نور و دوره نوری²⁶ را بر روی نرخ رشد سه جلبک سبز آب شیرین (*Cosmarium* و *Coelastrum microporum*, *Selena strumminutum*) مورد مطالعه قرار دادند. آزمایشات به منظور تعیین نرخ رشد ویژه (μ max) و در محدوده‌ی وسیعی از شدت نور (30 تا 456 میکرومول مترمربع بر ثانیه) انجام شد (Bouterfas et al., 2006).

Oncel و همکارانش، اثر شدت نور و دوره های نور/ تاریکی را بر تولید هیدروژن در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در کشت‌های بسته (batch) مورد بررسی قرار دادند. شدت نور در

²⁶ photoperiod

محدوده 30-420 میکرو انیشتین مترمربع بر ثانیه ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، عنوان گردید که تولید هیدروژن به شدت نور بستگی دارد (Oncel and Sukan, 2011).
Ifeanyi و همکارانش در سال 2011، اثر نور و غلظت‌های متفاوت نمک را بر رشد جلبک *Aphanocapsa* بررسی نمودند. تحقیقات بر روی جلبک *Aphanocapsa* نمونه‌برداری شده از آب Shell petrol انجام شد و دریافتند که اثر شدت نورهای 5000، 3500 و 2000 لوکس بر رشد قابل توجه بوده و در روز نهم کشت افزایش قابل توجهی در تراکم بیومس مشاهده شد (Ifeanyi et al., 2011).

pH، یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر نرخ رشد ریزجلبک‌ها می‌باشد. Lustigman و همکارانش، جهت تعیین اثر pH بر رشد جلبک *Chlamydomonas*، نمونه‌ها را در pH های مختلف کشت دادند. مقادیر pH مختلف با استفاده از NaOH، 1 نرمال و HCl، 1 نرمال تنظیم شد. میزان رشد با قرائت دانسیته نوری تعیین گردید (Lustigman et al., 1995).

Visiki و Santikul در سال 2000 اثر pH را در محدوده 1/4 تا 8/4 بر رشد جلبک *Chlamydomonas applanata* بررسی نمودند. از میان pH های مورد مطالعه، در محدوده 1/4 تا 3/4، رشد مشاهده نشد. حداکثر رشد در pH=7/4 مشاهده شد (Visiki and Santikul, 2000).
Morone و Tolbert اثر pH را بر روی میزان جذب کربن در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* ارزیابی نمودند (Moroney and Tolbert, 1985).

Gibbs و همکارانش، گزارش نمودند که تخمیر نشاسته در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* با متابولیسم هیدروژن مرتبط است (Gibbs et al., 1986). Chochois و همکارانش نیز بیان کردند که تولید هیدروژن در فتوسیستم II به متابولیسم نشاسته وابسته است (Chochois et al., 2010). Makarova و همکارانش اظهار داشتند که هرچه مرحله هوازی کوتاه‌تر و تجمع نشاسته کمتر باشد، بازده تولید هیدروژن نیز کاهش می‌یابد. فرایند تولید هیدروژن به فعالیت باقیمانده

فتوسیستم II و میزان نشاسته ذخیره شده وابسته است (Makarova et al., 2007). Meuser و همکارانش، فعالیت هیدروژناز، تجمع و تخریب نشاسته در فرایند تولید هیدروژن را مورد ارزیابی قرار دادند (Meuser et al., 2009).

Archive of SID

فصل سوم

روش اجرای تحقیق

3-1-1- شرح آزمایش و کارهای اجرایی

3-1-1- محیط کشت استوک

به منظور تهیه استوک، جلبک‌ها بر روی محیط کشت استاندارد تریس - استات - فسفات (TAP) در فلاسک 1000 میلی‌لیتر رشد داده شدند. آزمایشات تحت شرایط نور کنترل شده در اتاق کشت (فیتوترون) با قابلیت تنظیم دما (در دمای 22 ± 1) با نوردهی پیوسته انجام شد. لامپ‌های فلورسنت به منظور تأمین نور مورد استفاده قرار گرفت. شدت نور با استفاده از دستگاه لوکس‌متر (5000 لوکس) اندازه‌گیری شد (Tamburic et al., 2011). نمونه‌ها با استفاده از سیستم هواده، هوادهی شدند.

3-1-2- آماده‌سازی محیط کشت TAP

3-1-2-1- تهیه محلول عناصر میکرو (Hutner s trace element)

تهیه یک لیتر محلول عناصر میکرو به شرح زیر انجام شد (جدول 1).

جدول 1- تهیه محلول عناصر میکرو

آب (میلی لیتر)	میزان (گرم)	ترکیب
250	50	EDTA disodium salt
100	22	ZnSO ₄ .7H ₂ O
200	11/4	H ₃ BO ₃
50	5/06	MnCl ₂ .4H ₂ O
50	1/61	CoCl ₂ .6H ₂ O
50	1/57	CuSO ₄ .5H ₂ O
50	1/10	(NH ₄)MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O
50	4/99	FeSO ₄ .7H ₂ O

برای تهیه یک لیتر محلول میکرو²⁷، هر ترکیب به صورت جداگانه در حجم آب مشخص شده حل گردید. همه محلول‌ها به جز EDTA مخلوط و جوشانده شدند. محلول حاصل به رنگ سبز تغییر رنگ داد. برای جلوگیری از اکسیداسیون FeSO_4 ، این ترکیب در انتها آماده گردید. سپس EDTA که قبلاً در آب جوش حل شده بود را به محلول فوق اضافه نمودیم. زمانی که همه ترکیبات حل شد، محلول تا دمای 70 درجه سرد شد. سپس 85 میلی لیتر محلول 20% KOH داغ به آن اضافه گردید. محلول نهایی به حجم 1 لیتر رسانده شد (Hutner et al., 1950). این محلول در محیط کشت تریس استات فسفات (TAP) مورد استفاده قرار گرفت.

3-1-2-2-2-2-1-3 ساخت یک لیتر محیط کشت TAP

به منظور ساخت یک لیتر محیط کشت TAP، ابتدا محلول‌های زیر آماده شد (جدول 2):

جدول 2- تهیه محیط کشت TAP

TAP salts	
ترکیب	مقدار (گرم) در 1000 میلی لیتر
NH_4Cl	15/0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4/0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2/0
Phosphate solution	
ترکیب	مقدار (گرم) در 10 میلی لیتر
K_2HPO_4	2/88
KH_2PO_4	1/44

Tris	
ترکیب	مقدار (گرم) در 1000 میلی لیتر
Tris	2/42

سپس جهت تهیه محیط کشت TAP محلول‌های بالا، با مقدار و حجم‌های زیر جهت تهیه یک لیتر محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت:

Tris، 2/42 گرم؛ محلول نمک، 25 میلی لیتر؛ محلول فسفات، 0/375 میلی لیتر؛ محلول عناصر میکرو، 1 میلی لیتر؛ گلاسیل استیک اسید، 1 میلی لیتر. pH محلول 7/2 تنظیم شد. محیط کشت آماده شده در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه اتوکلاو گردید. سپس در زیر هود لامینار در فلاسک‌های 1 لیتری ریخته شد. پس از سرد شدن محیط‌های کشت، تلقیح انجام گردید.

3-1-3- تلقیح

یک میلی لیتر از استوک حاوی تقریباً 1×10^6 سلول در میلی لیتر جلبک به ازای هر 100 میلی لیتر از محیط کشت جدید تلقیح شد (Weber, 1991). میزان تلقیحی جلبک در محیط کشت جدید حداقل 1×10^4 سلول در میلی لیتر در هر فلاسک بود (Cakmak et al., 2012; López-Elías et al., 2011).

3-1-4 - طراحی آزمون با نرم افزار

به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* با هدف دستیابی به بالاترین نرخ رشد و بیشترین میزان تولید نشاسته از نرم‌افزار آماری Design expert استفاده شد. برای طراحی آزمون، دو فاکتور (شدت نور و pH) در نظر گرفته شد که هر فاکتور دارای سه سطح مختلف بود (جدول 3). فاکتورهای ذکر شده در جدول 3، در نرم‌افزار وارد شد و آزمایش Response Surface طراحی شد (جدول 4).

اثر این دو فاکتور بر دو پاسخ (نرخ رشد و میزان تولید نشاسته) مورد ارزیابی قرار گرفت. 13 آزمون توسط نرم افزار طراحی شد. آزمون‌ها در آزمایشگاه انجام شد و اطلاعات حاصل وارد نرم‌افزار گردید. مدلی به منظور دستیابی به بالاترین نرخ رشد و مدلی جهت حصول بیشترین میزان تولید نشاسته ارائه گردید. مقادیر پیش بینی شده نرخ رشد و میزان نشاسته توسط مدل‌های بدست آمده در آزمایشگاه انجام شد.

جدول 3- فاکتورهای انتخاب شده در نرم‌افزار Design expert و سطوح آنها

فاکتور	سطح 1 (-1)	سطح 2 (0)	سطح 3 (1)
شدت نور (Lux)	2000	5000	8000
pH	6	7	8

جدول 4- شرایط به کار رفته در هر آزمایش Design expert

شماره آزمایش	شدت نور (لوکس)	pH
1	0	-1
2	0	0
3	1	-1
4	1	1
5	1	0
6	0	0
7	-1	1
8	-1	-1
9	0	0
10	0	0
11	-1	0
12	0	1
13	0	0

3-1-5 - بررسی شدت نور و pH

به منظور تعیین شدت نور و pH بهینه برای نرخ رشد و تولید نشاسته در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*، نمونه‌ها بر اساس آزمون‌های ارائه شده توسط نرم‌افزار Design expert (جدول 4)، آماده شدند. تنظیم نور دستگاه فیتوترون توسط دستگاه لوکس‌متر انجام شد. به منظور تنظیم pH از بافر HEPES²⁸ (50mM) استفاده شد (Gerloff-Elias et al., ۲۰۰۵). مقادیر مختلف pH، با استفاده از KOH، 1 نرمال و HCl، 1 نرمال به دست آمد.

²⁸ [2-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

3-1-6- بررسی نرخ رشد جلبک

به منظور دستیابی به میزان نرخ رشد جلبک‌های کشت داده شده در شرایط نوری و pH های مختلف، اندازه‌گیری دانسیته نوری، غلظت کلروفیل و بیومس با فاصله زمانی یک روزه انجام می‌شود.

3-1-6-1- تعیین دانسیته نوری

به منظور تعیین دانسیته نوری (Optical density) یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در شرایط استریل نمونه‌برداری شد. میزان جذب نوری توسط اسپکتروفوتومتر UV/Vis در بازه 400-800 نانومتر اسکن گردید. سپس با توجه به پیک جذب کلروفیل، طول موج مناسب جهت سنجش دانسیته نوری انتخاب شد. نمونه‌هایی با OD بیش از یک رقیق شد تا جذب در محدوده 1 - 0/1 به دست آید (Moheimani et al., 2013).

3-2-6-1-3- اندازه‌گیری غلظت کلروفیل

جهت تعیین غلظت کلروفیل، 200 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با 800 میکرولیتر استون مخلوط گردید. نمونه حاصل، به مدت 24 ساعت، در تاریکی و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس در 10000rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ و جذب مایع رویی در طول موج 652 نانومتر خوانده شد (Hemschemeier et al., 2009).

3-3-6-1-3- اندازه‌گیری وزن خشک

به منظور تعیین وزن خشک، ابتدا فیلترهای (0/45 میکرون) خشک و توزین شد. سپس سوسپانسیون سلول جلبکی با استفاده از پمپ خلاء فیلتر شده (شکل 5) و در آن در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت خشک گردید (Leganés et al., 1987; Soltani et al., 2006). فیلترهای حاوی بیومس خشک مجدداً توزین شده و سپس بر اساس تفاوت وزن اولیه و ثانویه، میزان ماده خشک جلبک بر حسب گرم در لیتر محاسبه گردید (شکل 6).



شکل 5- استفاده از پمپ خلاء به منظور فیلتر نمودن سوسپانسیون جلبکی



شکل 6- اندازه‌گیری میزان بیومس در طی دوره رشد با استفاده از فیلتر 0/45 میکرون

3-1-6-4- محاسبه نرخ رشد

نرخ رشد بر طبق معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{Growth rate ; } \mu = \text{Ln} (N_2 / N_1) / (t_2 - t_1)$$

μ نرخ رشد و N_1 و N_2 به ترتیب میزان بیومس در زمان های t_1 و t_2 می‌باشد (Levasseur et al.,

1993).

3-1-6-5- اندازه‌گیری میزان نشاسته

اندازه‌گیری میزان نشاسته با استفاده از روش اصلاح شده‌ی اسید سولفوریک - UV انجام شد. ابتدا

20 میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت 10 دقیقه در 10000rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی

دور ریخته شده و 10 میلی لیتر اتانول 80% بر بیومس اضافه نموده و به مدت 15 دقیقه در بن ماری جوش با کمک مبرد قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل، از فیلتر میلی پور 0/22 میکرون عبور داده شد. برای جداسازی نشاسته، فیلترهای حاوی نشاسته در آون با دمای 50 درجه سانتی گراد خشک شد. سپس با افزایش آب مقطر، به مدت 15 دقیقه جوشانیده شد. محلول حاصل مجدداً از کاغذ صافی واتمن 8 میکرون عبور داده شده و با آب مقطر به حجم 20 میلی لیتر رسانده شد. یک میلی لیتر از محلول حاصل، با 3 میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به سرعت مخلوط شده و به مدت 30 ثانیه ورتکس گردید. پس از افزودن اسید سولفوریک دما به شدت افزایش یافت. محلول به مدت 2 دقیقه در یخ سرد شد تا به دمای اتاق برسد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در طول موج 315 نانومتر خوانده شد. بر اساس مقایسه میزان جذب قرائت شده با منحنی استاندارد گلوکز، مقدار نشاسته در نمونه جلبکی محاسبه گردید (Albalasmeh et al., 2013).

3-1-6-6- تهیه منحنی استاندارد

برای تهیه منحنی استاندارد از گلوکز استفاده شد. بدین ترتیب که تراکم‌های صفر تا 55 میلی گرم در لیتر (0، 10، 20، 25، 35، 45 و 55 میلی گرم در لیتر) از گلوکز تهیه شد. مشابه روش فوق، به یک میلی لیتر از هر نمونه، 3 میلی لیتر اسیدسولفوریک افزوده، پس از ورتکس و هم دما نمودن با محیط، جذب در طول موج 315 نانومتر خوانده شد. سپس منحنی استاندارد ترسیم شده و معادله خط آن محاسبه گردید.

3-1-7- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار 9 Design expert و SPSS و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

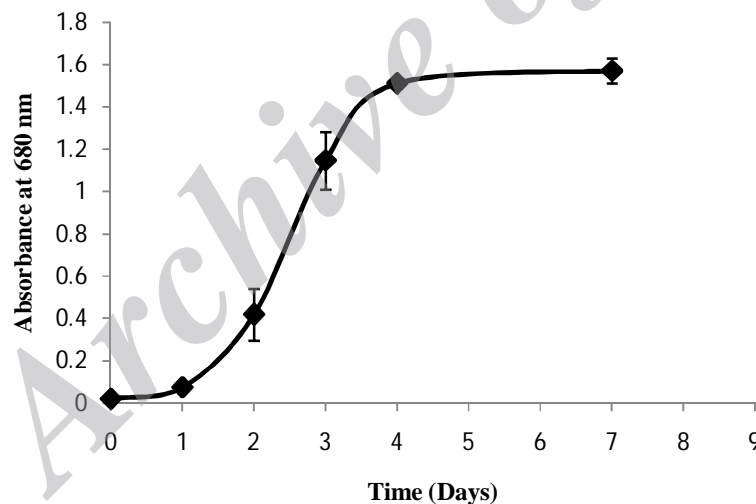
فصل چهارم

یافته‌های تحقیق

Archive of SID

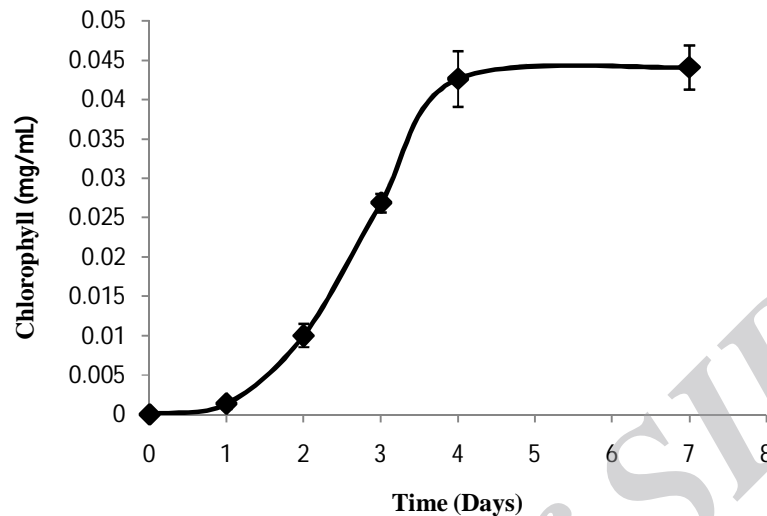
4-1- بررسی رشد جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

به منظور ترسیم منحنی رشد جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* پس از کشت جلبک (در pH=7 و شدت نوری 2000 لوکس دمای 25 درجه سانتی گراد)، با اندازه‌گیری دانسیته نوری، میزان کلروفیل و بیومس، منحنی رشد جلبک در طی 10 روز رسم گردید. بررسی منحنی رشد جلبک نشان داد که این ریزجلبک، بعد از طی دو روز فاز تاخیر (Lag phase) با محیط کشت سازگار شده است. این جلبک در شرایط فوق، چهار روز از زمان اولیه (t_0)، فاز رشد لگاریتمی (Log phase) را سپری نمود و به حداکثر رشد خود در محیط کشت رسید و سپس وارد فاز سکون (Stationary phase) گردید. بر این اساس، در آزمایش‌های بعدی، نمونه‌برداری جهت بررسی تغییرات فیزیولوژیک، 4 روز بعد از تلقیح اولیه در ابتدای فاز سکون انجام شد (شکل 5 و 6).



شکل 5- نمودار رشد ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* با استفاده از دانسیته نوری (OD_{680}). هر عدد

میانگین سه تکرار است.



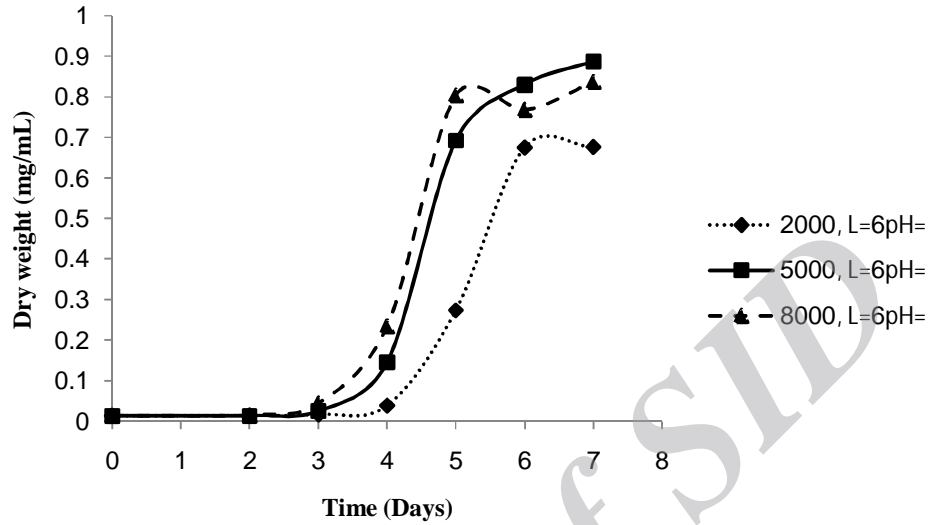
شکل 6- منحنی رشد ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* با استفاده از اندازه‌گیری غلظت کلروفیل. هر عدد میانگین سه تکرار است.

4-2-2- بررسی میزان تولید بیومس توسط جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

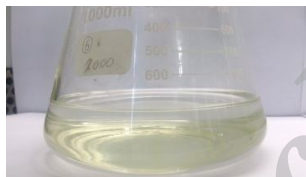
4-2-1- بررسی فاکتورهای مؤثر بر بیومس

4-2-1-1- بررسی اثر شدت نور

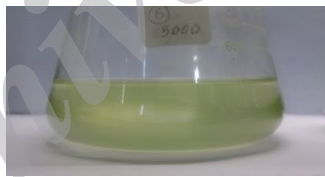
بررسی شدت نور بر رشد و تکثیر ریزجلبک در شدت‌های نوری متفاوت (۵۰۰۰، ۲۰۰۰، ۸۰۰۰ لوکس) انجام شد. نتایج در این پژوهش نشان می‌دهد که در $\text{pH} = 6$ ، رشد جلبک با چند روز تأخیر (Lag phase) آغاز می‌شود. به نظر می‌رسد که این تأخیر به دلیل سازگار شدن ریزجلبک‌ها با محیط کشت جدید باشد که دارای pH پایین‌تری نسبت به محیط کشت ریزجلبک است. در میان شدت‌های نور مختلف (۲۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس)، جلبک در نور ۸۰۰۰ لوکس، رشد بهتری (بیومس بیشتر) را نشان می‌دهد (شکل ۷ و ۸).



شکل 7- تفاوت در وزن خشک در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در pH=6 و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس).



در روز سوم pH=6, Light=2000



در روز سوم pH=6, Light=5000



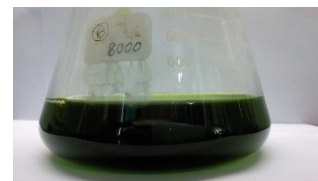
در روز سوم pH=6, Light=8000



در روز پنجم pH=6, Light=2000



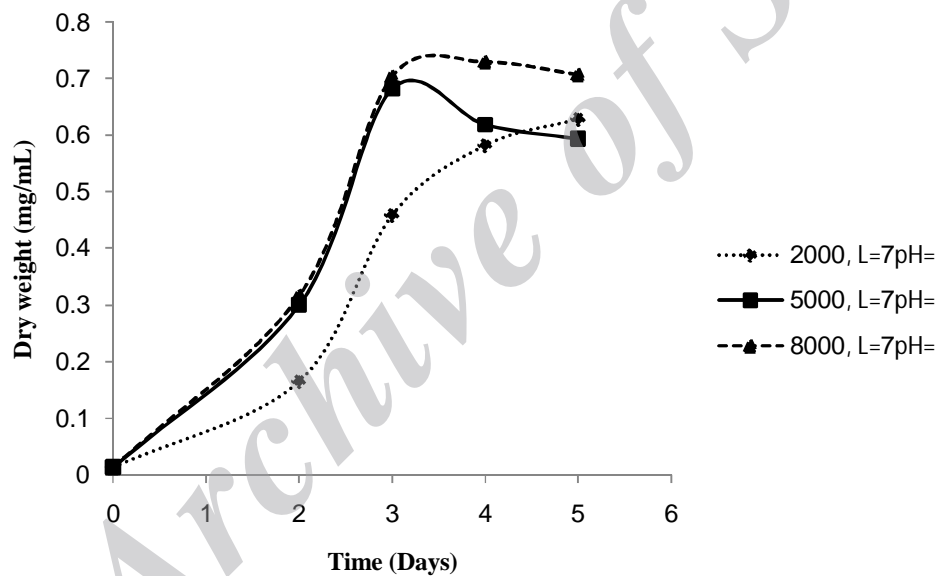
در روز پنجم pH=6, Light=5000



در روز پنجم pH=6, Light=8000

شکل 8- نمونه‌های جلبکی در pH=6 و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس) در روزهای سوم و پنجم رشد.

بررسی رشد جلبک در $pH=7$ و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس) با توجه به نمودار وزن خشک جلبک نشان می‌دهد که با توجه به اینکه pH اولیه جلبک تلقیحی با pH محیط جدید مشابه است، بنابراین بعد از یک روز فاز تاخیر وارد فاز رشد لگاریتمی شد. حداکثر رشد (ابتدای فاز سکون) ریزجلبک در شدت‌های نوری 8000 و 5000 لوکس تفاوت چندانی ندارد با این تفاوت که میزان رشد در 8000 لوکس در فاز سکون بیش از میزان رشد در 5000 لوکس است. حداکثر مقدار وزن خشک در شدت نور 2000 لوکس به میزان 0/58 میلی گرم بر میلی لیتر تفاوت قابل ملاحظه‌ای با حداکثر رشد 0/7 میلی گرم بر میلی لیتر در شدت نور 8000 لوکس مشاهده شده است. (شکل 9 و 10).



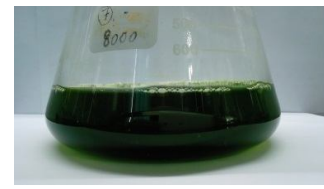
شکل 9- تفاوت در وزن خشک در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در $pH=7$ و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس).



سوم روز در $pH=7$, Light=2000



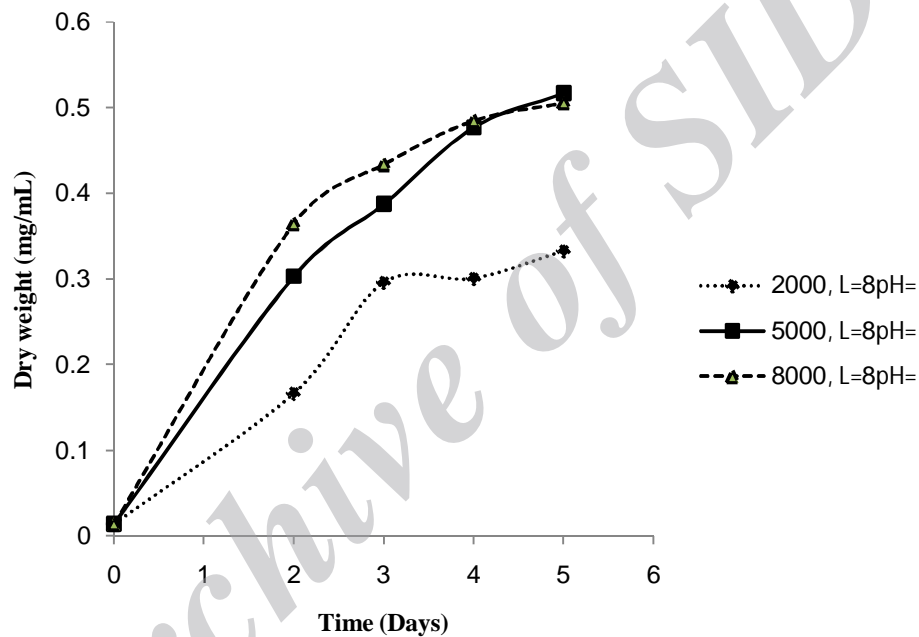
سوم روز در $pH=7$, Light=5000



سوم روز در $pH=7$, Light=8000

شکل 10- نمونه‌های جلبکی در $pH=7$ و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس) در روز سوم رشد.

بررسی داده‌های حاصل در pH=8 نشان می‌دهد که پس از سپری شدن فاز تاخیر کوتاه، جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* فاز رشد تصاعدی را با شیب بیشتری نسبت به نمودار pH=7 طی نمود. همانند رشد در pH=7، تفاوت چندانی میان دو شدت نوری 5000 و 8000 دیده نمی‌شود. در شدت نور 2000 لوکس، طول مدت زمان فاز رشد تصاعدی و میزان حداکثر رشد (انتهای فاز رشد تصاعدی) کمتر از دو شدت نوری دیگر می‌باشد (شکل 11 و 12).



شکل 11- تفاوت در وزن خشک در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در pH=8 و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس).



در روز سوم pH=8, Light=2000



در روز سوم pH=8, Light=5000

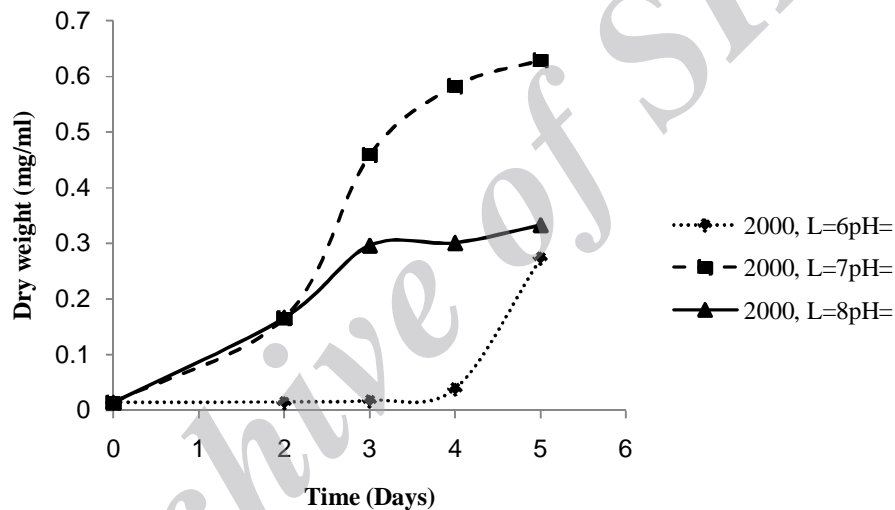


در روز سوم pH=8, Light=8000

شکل 12- نمونه‌های جلبکی در pH=7 و شدت‌های نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس) در روز سوم رشد.

4-2-1-2- بررسی اثر pH

نتایج حاصل از این مطالعه جهت مقایسه رشد ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در pH های مختلف (6، 7 و 8) و شدت نوری 2000 لوکس، در طی یک دوره 5 روزه نشان می‌دهد، pH=6 فاز تاخیر 4 روزه را نسبت به دو pH دیگر دارد. در انتهای روز چهارم رشد، میزان تولید بیومس (0/58 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در pH=7 بیشتر از بیومس تولیدی (0/3 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در pH=8 می‌باشد. بنابراین pH=7 محیط مناسب‌تری جهت رشد این ریزجلبک می‌باشد (شکل 13 و 14).



شکل 13- تفاوت در وزن خشک جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در شدت نور 2000 لوکس و pH های مختلف (6، 7، 8).



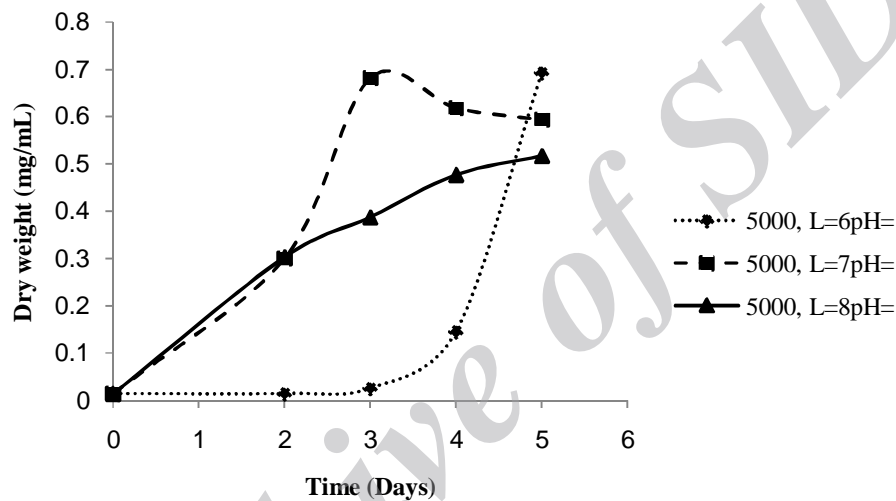
pH=6, Light=2000

pH=7, Light=2000

pH=8, Light=2000

شکل 14- نمونه‌های جلبکی در شدت نور 2000 لوکس و pH های مختلف (6، 7 و 8) در روز سوم رشد.

همانطور که در شکل 15 مشاهده می‌شود، میزان رشد و تولید بیومس در pH=7 نسبت به دو pH دیگر بیشتر است. همچنین این نمونه جلبکی در طی سه روز پس از تلقیح (مدت زمان کوتاهتری نسبت به سایر pHها) فاز رشد تصاعدی را گذرانده و به حداکثر میزان بیومس (0/68 میلی گرم بر میلی لیتر) رسیده است. فاز تاخیر در pH=6 به سه روز کاهش یافته است و در روز پنجم، بیومس (0/69 میلی گرم بر میلی لیتر) به میزانی مشابه با حداکثر رشد در pH=7 رسیده است. (شکل 15 و 16)



شکل 15- تفاوت در وزن خشک جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در شدت نور 5000 لوکس و pH های مختلف (6، 7 و 8).



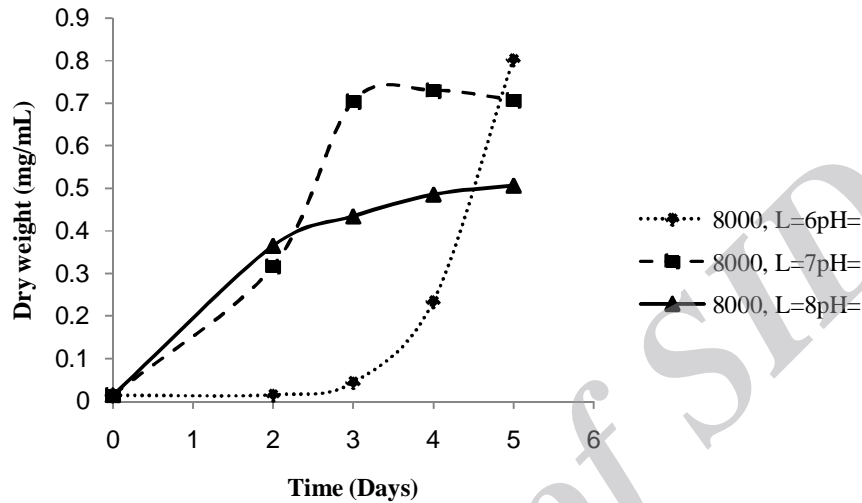
pH=6, Light=5000

pH=7, Light=5000

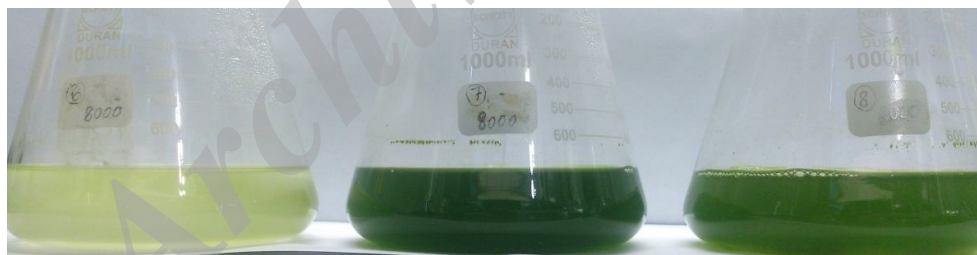
pH=8, Light=5000

شکل 16- نمونه‌های جلبکی در شدت نور 5000 لوکس و pH های مختلف (6، 7 و 8) در روز سوم رشد.

بررسی داده‌ها از نمودار زیر نشان می‌دهد که در شدت نوری 8000 لوکس نیز، pH=7، بیومس بیشتری تولید نمود و pH=6 با نتایج حاصل از شکل 11 مشابه است (شکل 17 و 18).



شکل 17- تفاوت در وزن خشک جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در شدت نور 8000 لوکس و pH های مختلف (6، 7 و 8).



pH=6, Light=8000

pH=7, Light=8000

pH=8, Light=8000

شکل 18- نمونه‌های جلبکی در شدت نور 8000 لوکس و pH های مختلف (6 و 7 و 8) در روز سوم رشد.

4-3- بررسی فاکتورهای مؤثر بر نرخ رشد

در این پژوهش اثر دو فاکتور pH و شدت نور بر نرخ رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی همزمان این دو فاکتور بر نرخ رشد از نرم‌افزار طراحی آزمایش 9 Design expert استفاده شد. نتایج حاصل از محاسبات آماری و نمودارها در زیر آمده است.

4-3-1- محاسبات طرح آماری (با استفاده از روش سطح پاسخ)²⁹

طرح آزمایشی سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط کشت در افزایش نرخ رشد با استفاده از طراحی Central composite انجام شد. با توجه به جدول 5، روش Central composite، مجموعه‌ای از 13 آزمایش را طراحی کرد که دارای 5 تکرار در نقطه مرکزی است.

جدول 4- جدول طراحی Design expert همراه با پاسخ‌های اندازه‌گیری شده. در این طراحی، نرخ رشد به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده است.

Std	Run	Factor ۱ A: pH	Factor ۲ B: irradiance	Response ۱ Growth rate (mg/ml)
7	1	0	-1	1/243
11	2	0	0	1/23
2	3	1	-1	1/023
4	4	1	1	1/182
6	5	1	0	1/176
12	6	0	0	1/284
3	7	-1	1	0/385
1	8	-1	-1	0/076
9	9	0	0	1/262
10	10	0	0	1/266
5	11	-1	0	1/201
8	12	0	1	1/318
13	13	0	0	1/271

²⁹Response surface methodology

مدل حاصل با معادله 1 نشان داده شده است که در نرخ رشد (Y) به عنوان تابعی از مقدار متغیرهای مستقل است.

معادله 1:

$$Y = +1.27 + 0.49 * A + 0.37 * B - 0.38 * AB - 0.59 * A^2 + 0.80 * A^2 B - 0.51 * AB^2$$

در این فرمول Y مقدار نرخ رشد جلبک، A مقدار pH محیط کشت و B میزان شدت نور می‌باشد. همانطور که در معادله 1 مشاهده می‌شود، ضریب هر دو فاکتور شدت نور و pH، مثبت می‌باشد که نشانگر تأثیر هر دو فاکتور بر نرخ رشد است. از میان این دو فاکتور، با توجه به ضریب خطی pH (0/49) می‌توان گفت که اثر آن بر نرخ رشد، نسبت به شدت نور با ضریب خطی (0/37) بیشتر می‌باشد. بر اساس ارزیابی آماری معادله 1، مدل مناسب، یک مدل چند جمله‌ای درجه دوم بود (جدول 6). داده‌های آنالیز واریانس (ANOVA)، دقت این مدل درجه دوم را تأیید می‌کند. پارامتر F معیاری از انحراف داده‌ها از مقدار میانگین است و به طور کلی برای مدلی که نتایج آزمایش را با موفقیت پیشگویی می‌کند، مقدار F معمولاً بسیار بالا است. مقدار $\text{prob} > F$ کمتر از 0/05 است که به معنی معنی‌دار بودن مدل می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که هر دو فاکتور مستقل بر میزان نرخ رشد تأثیر به سزایی دارند. محاسبه عدم تطابق³⁰، نشان‌دهنده صحت داده‌های مدل است. در واقع معنی‌دار نبودن این پارامتر مطلوب است. مقدار این پارامتر برای رگرسیون معادله 1، معنی‌دار نیست و $p = 0/3509$ می‌باشد (جدول 7).

³⁰ Lake of fit

جدول 5- نتایج آماری به دست آمده جهت انتخاب مدل مناسب افزایش نرخ رشد جلبک *Chlamydomonas*

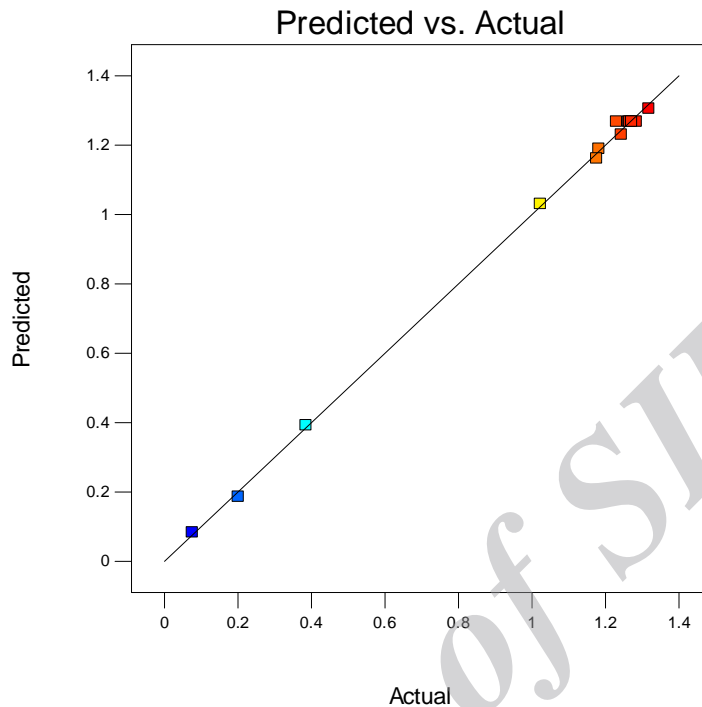
با *reinhardtii* استفاده از فاکتورهای شدت نور و pH.

p-value prob>F	درجه آزادی	میانگین مربعات	منبع
	1	12/83	اثر متقابل میانگین × کل
0/0242	2	0/64	اثر متقابل خطی × میانگین
0/8388	1	۰/۰۰۵۶۲۵	اثر متقابل تعامل دو عاملی × خطی
<0/0001	2	0/57	اثر متقابل درجه دوم × تعامل دو عاملی
0/0146	2	۰/۰۰۵۹۸۲	اثر متقابل درجه سوم × درجه دوم
	5	۰/۰۰۰۵۴۰۲	باقیمانده
	13	1/18	کل

جدول 6- آنالیز واریانس فاکتورهای مؤثر بر نرخ رشد جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات	F Value	p-value Prob> F	مدل
	6	0/41	901/01	<0/0001	مدل
	1	0/48	1053/81	<0/0001	pH (A)
	1	0/002813	6/24	0/0467	شدت نور (B)
	1	0/005625	12/47	0/0123	شدت نور × pH (AB)
	1	1/14	2526/31	<0/0001	A ²
	1	0/008427	18/68	0/0050	A ² B
	1	0/003536	7/84	0/0312	AB ²
	6	0/0004510			باقیمانده
	2	0/0005515	1/38	0/3509	عدم تطابق
	4	0/0004008			خطای خالص
	12				خطای کل

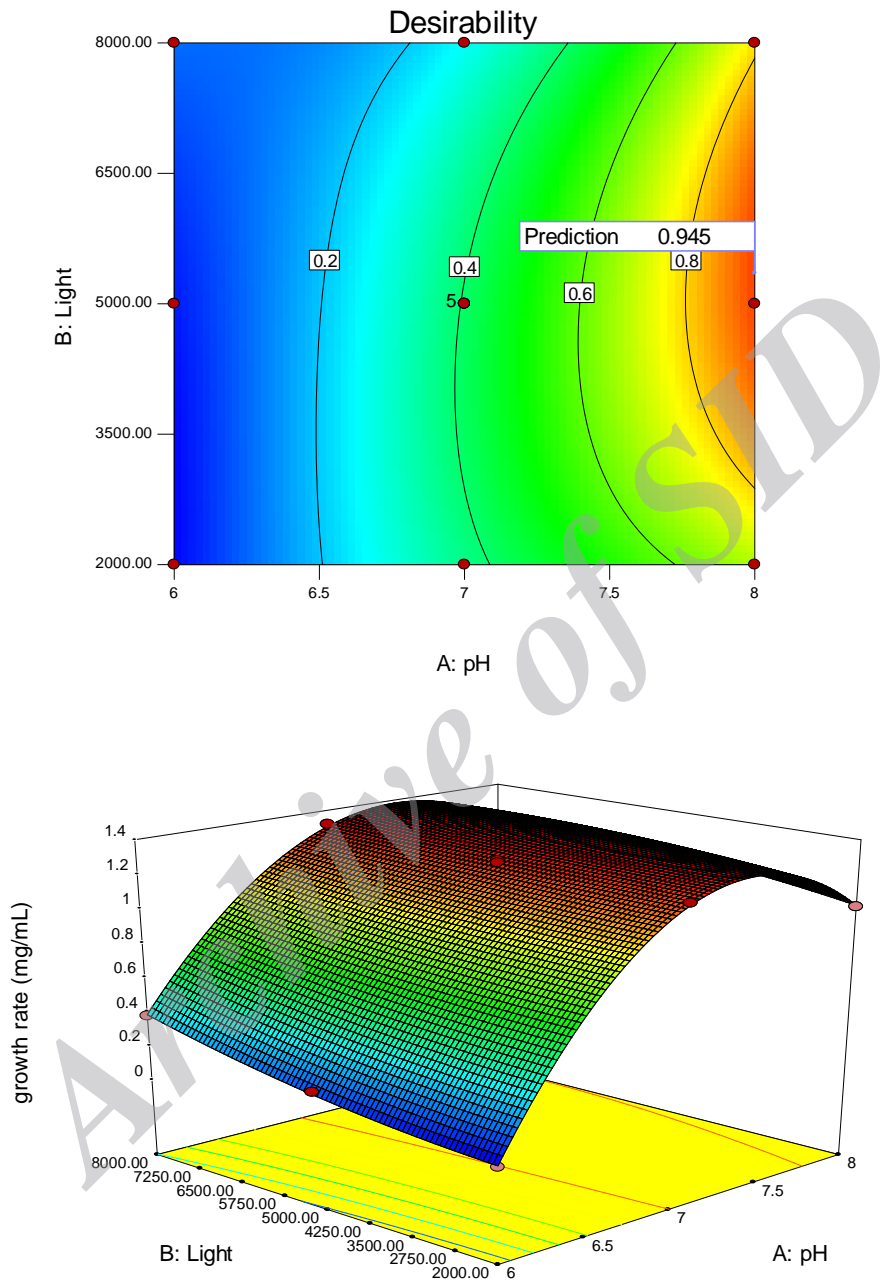
نمودار داده‌های تجربی در برابر پاسخ پیش‌بینی شده توسط مدل نشان داده شده است (شکل 19). همان‌طور که مشاهده می‌شود داده‌های تجربی در نزدیکی خط رسم شده قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده این است که داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل به داده‌های به دست آمده از آزمایش (داده‌های تجربی) نزدیک‌تر هستند.



شکل 19- نمودار داده‌های تجربی در برابر داده‌های پیش بینی شده توسط مدل

آنالیز نتایج سطح پاسخ

تأثیر متغیرهای مستقل بر نرخ رشد در شکل 20 نشان داده شده است. در این شکل تأثیر pH و شدت نور بر تغییرات نرخ رشد ملاحظه می‌شود. با توجه به ضریب متغیرهای مستقل در رابطه شماره 1 مشاهده می‌شود که pH تأثیر عمده‌ای بر تغییرات نرخ رشد داشته است ($p < 0.0001$). به طوری که در محدوده $pH=7$ ، میزان نرخ رشد به طور چشمگیری افزایش یافته است. با حل معادله شماره 1 و تجزیه نمودار سطح پاسخ (شکل 20)، شدت نور و pH بهینه به منظور رسیدن به حداکثر رشد، به ترتیب 7400 لوکس و 7/4 می‌باشد.



شکل 20- نمودار کانتور و نمودار سطح پاسخ. تأثیر شدت نور و pH بر نرخ رشد در

جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

تأیید تجربی مدل

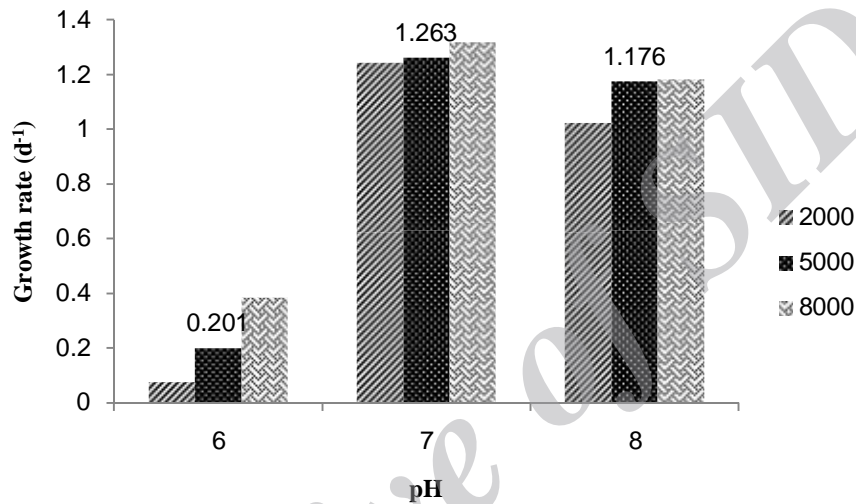
برای تأیید نتایج فوق، ریز جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط مدل (شدت نور، 7400 لوکس و $pH = 7/4$) کشت داده شد و نرخ رشد حاصل از آن اندازه‌گیری شد. پاسخ مشاهده شده نرخ رشد برابر با $1/36$ بود. نتایج نشان داد که همبستگی بالایی بین پاسخ پیش بینی شده ($1/38$) و پاسخ عملی به دست آمده در آزمایشگاه وجود دارد که تأییدی بر معتبر بودن مدل می‌باشد (جدول 8).

جدول 7- ارزیابی تجربی مدل. هر دو فاکتور در شرایط بهینه در نظر گرفته شده اند.

پارامترهای مستقل	مقدار بهینه	نرخ رشد پیش بینی شده	نرخ رشد اندازه‌گیری شده
pH	7/4	1/38	1/36
شدت نور	7400		

4-3-2- بررسی اثر متقابل pH و شدت نور بر نرخ رشد

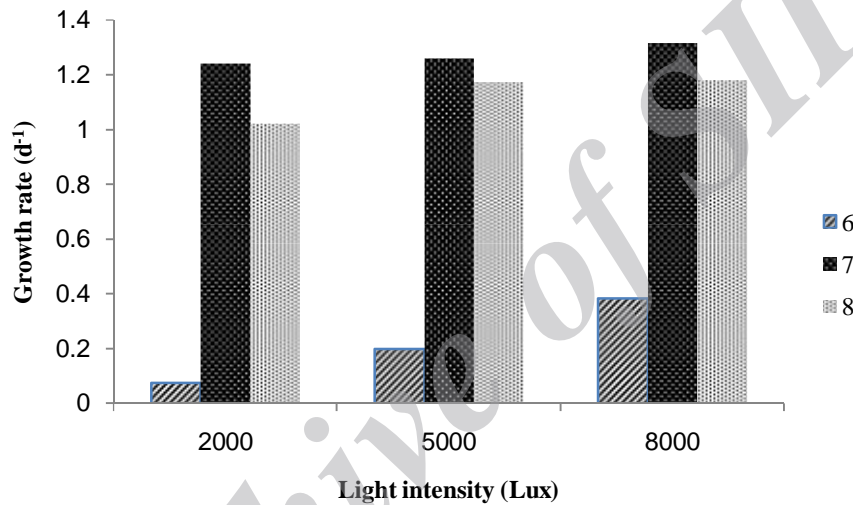
بررسی اثر فاکتور pH بر نرخ رشد نشان داد که بیشترین مقدار نرخ رشد در هر سه شدت نور مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس)، در pH=7 مشاهده شد و کمترین مقدار نرخ رشد در pH=6 مشاهده گردید (شکل 21).



شکل 21- اثر pH بر نرخ رشد در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در شدت‌های نور مختلف.

4-3-3- بررسی اثر شدت نور بر نرخ رشد

بررسی نتایج حاصل از اثر شدت نور بر نرخ رشد نشان می‌دهد که با افزایش شدت نور از 2000 لوکس به 8000 لوکس، نرخ رشد افزایش می‌یابد که در هر سه pH، این افزایش مشاهده می‌شود. کمترین میزان نرخ رشد در شدت نور 2000 لوکس مشاهده شده است (شکل 22).



شکل 22- اثر شدت‌های نور بر نرخ رشد در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در pH های مختلف (6، 7 و 8).

(8).

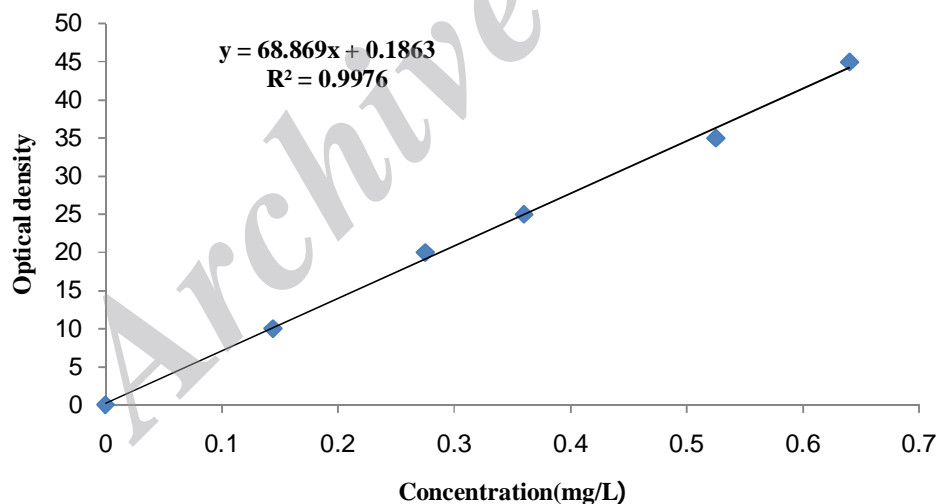
4-4 - بررسی فاکتورهای مؤثر بر تولید نشاسته

در این پژوهش اثر دو فاکتور pH و شدت نور بر میزان تولید نشاسته مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی همزمان این دو فاکتور بر تولید نشاسته از نرم‌افزار طراحی آزمایش 9 Design expert استفاده شد. نتایج حاصل از محاسبات آماری و نمودارها در زیر آمده است.

4-4-1 - بررسی اثر متقابل فاکتورهای مؤثر بر میزان تولید نشاسته

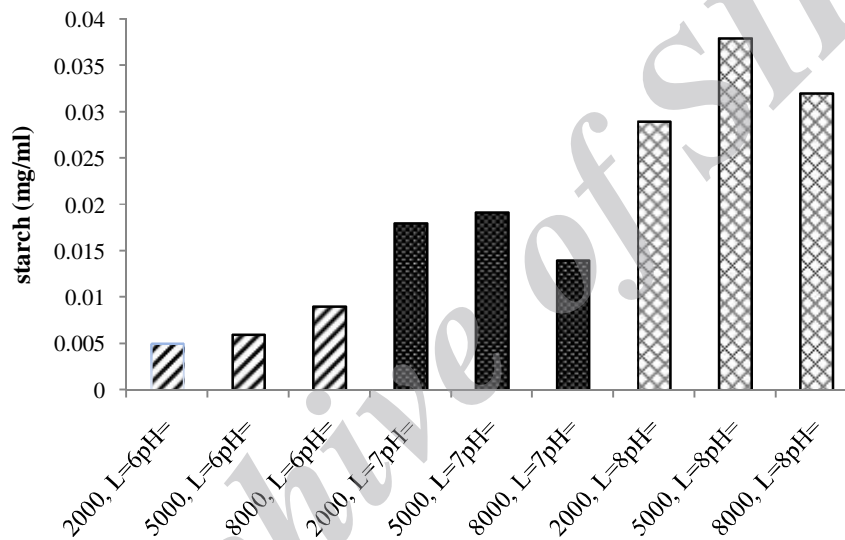
رسم منحنی استاندارد گلوکز:

به منظور بررسی میزان نشاسته تولیدی توسط جلبک، نمودار جذب نوری به غلظت‌های مختلف گلوکز ترسیم شده است (شکل 23)



شکل 23- نمودار دانسیته نوری بر غلظت‌های مختلف گلوکز.

میزان نشاسته تولیدی برای هریک از آزمایشات طراحی شده در نمونه‌های برداشت شده از انتهای فاز رشد تصاعدی بر اساس روش ذکر شده در فصل سوم (3-2-7-5) محاسبه گردید. و نتایج به صورت نمودار نشان داده شد. میزان تولید نشاسته در pH=8 از سایر pH ها (6 و 7) بیشتر بود. در نور 5000 لوکس و pH=8 بیشترین میزان تولید نشاسته به دست آمد. کمترین میزان تولید نشاسته در شدت نور 2000 و pH=6 حاصل شد (شکل 24).



شکل 24- نمودار میزان نشاسته تولیدی در شدت‌های نوری و pH های مختلف

4-4-2 - محاسبات طرح آماری (با استفاده از روش سطح پاسخ³¹)

همانطور که در خصوص نرخ رشد مطرح شد، طرح آزمایشی سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط کشت در افزایش تولید نشاسته با استفاده از طراحی Central composite انجام شد. با توجه به جدول 9، روش Central composite، مجموعه‌ای از 13 آزمایش را طراحی کرد که دارای 5 تکرار در نقطه مرکزی است.

جدول 8- جدول طراحی Design expert همراه با پاسخ‌های اندازه‌گیری شده. در این طراحی، میزان تولید نشاسته به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده است.

Std	Run	Factor ۱	Factor ۲	Response ۲
		A: pH	B: irradiance	Starch
۷	۱	۰	-۱	۰/۰۱۸
۱۱	۲	۰	۰	۰/۰۱۹
۲	۳	۱	-۱	۰/۰۲۹
۴	۴	۱	۱	۰/۰۳۲
۶	۵	۱	۰	۰/۰۳۸
۱۲	۶	۰	۰	۰/۰۱۷
۳	۷	-۱	۱	۰/۰۰۹
۱	۸	-۱	-۱	۰/۰۰۵
۹	۹	۰	۰	۰/۰۲۱
۱۰	۱۰	۰	۰	۰/۰۰۲
۵	۱۱	-۱	۰	۰/۰۰۶
۸	۱۲	۰	۱	۰/۰۱۴
۱۳	۱۳	۰	۰	۰/۰۱۹

³¹ Response surface methodology

مدل حاصل با معادله 2 نشان داده شده است که در نرخ رشد (Y) به عنوان تابعی از مقدار متغیرهای مستقل است.

معادله 2:

$$Y = +0.019 + 0.016 * A - 2 * 10^{-3} * B + 2.776 * 10^{-3} * A^2 - 3.224 * 10^{-3} * B^2 + 3.75 * 10^{-3} * A^2 B - 4.250 * 10^{-3} * AB^2$$

در این فرمول Y مقدار تولید نشاسته در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*، A مقدار pH محیط کشت و B میزان شدت نور می باشد.

همانطور که در معادله 2 مشاهده می شود، ضریب فاکتور pH، مثبت و ضریب فاکتور شدت نور، منفی می باشد که نشانگر اثر pH بر میزان تولید نشاسته و عدم تأثیر فاکتور شدت نور بر میزان تولید نشاسته است. بر اساس ارزیابی آماری معادله 2، مدل مناسب، یک مدل چند جمله ای درجه دوم بود (جدول 10). داده های آنالیز واریانس (ANOVA)، دقت این مدل درجه دوم را تأیید می کند. در این مدل مقدار $\text{prob} > F$ کمتر از 0/05 است که به معنی معنی دار بودن مدل می باشد. نتایج نشان می دهد که فاکتور pH بر میزان تولید نشاسته مؤثر می باشد. اما تأثیر شدت نور بر میزان تولید نشاسته معنی دار نیست. مقدار پارامتر عدم تطابق، برای رگرسیون معادله 2، معنی دار نیست و $p = 0/3509$ می باشد که نشان دهنده صحت داده های مدل می باشد (جدول 11).

جدول 9- نتایج آماری به دست آمده جهت انتخاب مدل مناسب تولید نشاسته در جلبک *Chlamydomonas*

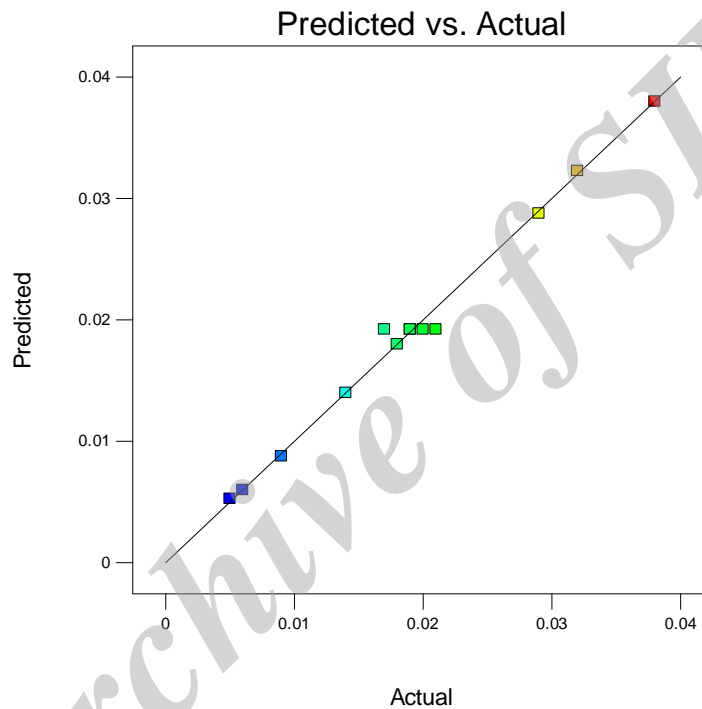
با استفاده از فاکتورهای شدت نور و pH.

منبع	میانگین مربعات	درجه آزادی	p-value prob<F
اثر متقابل میانگین × کل	۰/۰۰۰۴۶۹۳	1	
اثر متقابل خطی × میانگین	۰/۰۰۰۰۵۲۰۸	2	<۰/۰۰۰۱
اثر متقابل تعامل دو عاملی × خطی	۰/۰۰۰۰۰۰۲۵	1	0/8765
اثر متقابل درجه دوم × تعامل دو عاملی	۰/۰۰۰۰۱۸۲۲	2	0/1542
اثر متقابل درجه سوم × درجه دوم	۰/۰۰۰۰۲۱۴۲	2	0/0120
باقیمانده	۰/۰۰۰۰۰۱۷۶	5	
کل	۰/۰۰۰۰۴۴۷۹	13	

جدول 10- آنالیز واریانس فاکتورهای مؤثر بر میزان تولید نشاسته جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

منبع	درجه آزادی	F Value	p-value Prob> F	Significant
مدل	6	123/84	<۰/۰۰۰۱	Significant
(A) pH	1	339/38	<0/0001	
شدت نور (B)	1	5/30	0/0609	
A ²	1	14/11	<0/0094	
B ²	1	19/03	0/0048	
A ² B	1	12/43	0/0124	
AB ²	1	15/96	0/0072	
باقیمانده	6	0/000001509		
عدم تطابق	2	0/057	0/9452	not significant
خطای خالص	4	0/0000022		
خطای کل	12			

نمودار داده‌های تجربی در برابر پاسخ پیش‌بینی شده توسط مدل نشان داده شده است (شکل 25). همان‌طور که مشاهده می‌شود داده‌های تجربی در نزدیکی خط رسم شده قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده این است که داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل به داده‌های به دست آمده از آزمایش (داده‌های تجربی) نزدیک‌تر هستند.



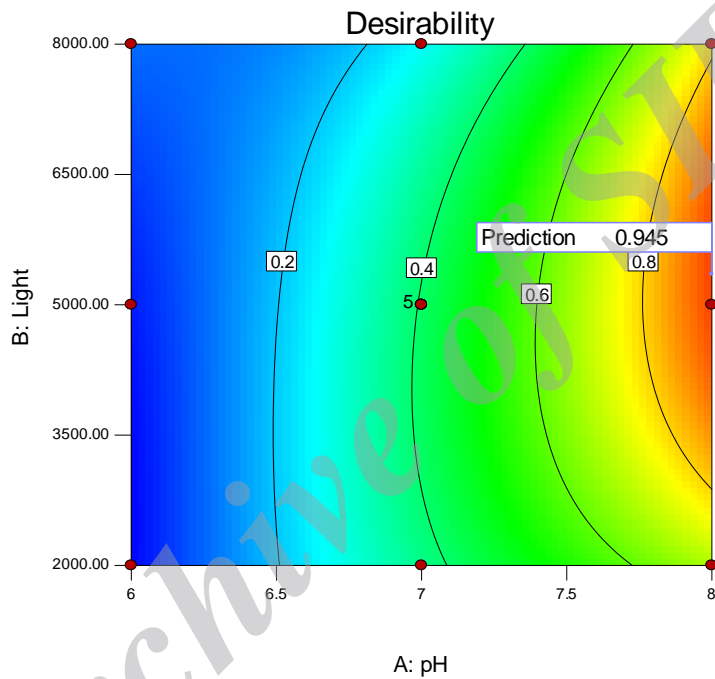
شکل 25- نمودار داده‌های تجربی در برابر داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل

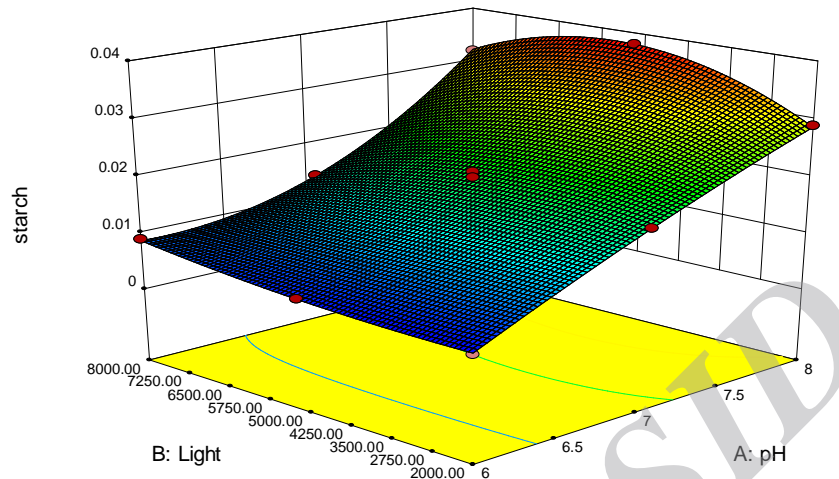
آنالیز نتایج سطح پاسخ

تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان تولید نشاسته در شکل 26 نشان داده شده است. در این شکل تأثیر pH و شدت نور بر تغییرات تولید نشاسته ملاحظه می‌شود. با توجه به ضریب متغیرهای مستقل در رابطه شماره 2 مشاهده می‌شود که pH تأثیر عمده‌ای بر تغییرات میزان تولید نشاسته داشته

است ($p < 0.0001$). به طوری که در محدوده $pH=8$ ، میزان تولید نشاسته به طور چشمگیری افزایش یافته است.

با حل معادله شماره 2 و تجزیه نمودار سطح پاسخ (شکل 26)، شدت نور و pH بهینه به منظور رسیدن به حداکثر نشاسته، به ترتیب 5300 لوکس و 8 می‌باشد.





شکل 26- نمودار کانتور و نمودار سطح پاسخ. تأثیر شدت نور و pH بر نشاسته در جلبک *Chlamydomonas*

reinhardtii

تأیید تجربی مدل

برای تأیید نتایج فوق، ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط مدل (شدت نور، 5300 لوکس و $\text{pH} = 8$) کشت داده شد و میزان نشاسته حاصل از آن اندازه‌گیری شد. پاسخ مشاهده شده نشاسته تولید شده برابر با 0/034 بود. نتایج نشان داد که همبستگی بالایی بین پاسخ پیش بینی شده (0/038) و پاسخ عملی به دست آمده در آزمایشگاه وجود دارد که تأییدی بر معتبر بودن مدل می‌باشد (جدول 12).

جدول 11- ارزیابی تجربی مدل. هر دو فاکتور در شرایط بهینه در نظر گرفته شده اند.

پارامترهای مستقل	مقدار بهینه	نرخ رشد پیش بینی شده	نرخ رشد اندازه‌گیری شده
pH	8	0/038	0/034
شدت نور	5300		

فصل پنجم

تجزیه و تحلیل یافته‌های

تحقیق

5-1- رسم منحنی رشد در جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas مدلی برای مطالعه فتوسنتز، کلروپلاست، فعالیت فلاژلی، شناخت سلول-سلول، کنترل چرخه سلولی و ریتم شبانه‌روزی است. به علاوه به علت نرخ رشد بالای آن، کشت آسان، بازده بالا در استفاده از نور خورشید (منبع انرژی) می‌باشد. به ویژه *Chlamydomonas reinhardtii* به عنوان میکروارگانیزم فتواتوتروفی شناخته شده است که توانایی بالایی در تثبیت دی‌اکسید کربن و قابلیت بالایی در انباشت نشاسته دارد (Busi et al., 2014).

ریزجلبک‌ها در طول مدت کشت خود 5 مرحله رشد را پشت سر می‌گذارند که عبارتند از:

- 1- مرحله القا یا رشد کند³² که در این مرحله، رشد (افزایش تراکم سلولی) ریزجلبک بسیار کند است تا ریزجلبک به شرایط کشت جدید سازگار شود.
- 2- مرحله رشد سریع (لگاریتمی)³³ که در این مرحله ریزجلبک به شرایط کشت جدید سازگار شده و به مدت چند روز به صورت لگاریتمی تکثیر پیدا کرده و تراکم آن افزایش می‌یابد.
- 3- مرحله رشد با نسبت کاهنده³⁴ که در این مرحله از کشت، ریزجلبک همچنان به افزایش تراکم خود ادامه می‌دهد ولی سرعت این افزایش تراکم، کندتر از مرحله رشد لگاریتمی است.
- 4- مرحله سکون یا ایستا³⁵ که در این مرحله تراکم سلولی ریزجلبک تقریباً ثابت باقی می‌ماند.
- 5- مرحله مرگ یا سقوط³⁶ که در این مرحله به دلیل اینکه مواد مغذی درون ظروف کشت و کیفیت آب به شدت کاهش یافته است، سلول‌های ریزجلبک می‌میرند و در نتیجه از تراکم سلولی ریزجلبک به شدت کاسته می‌شود. بهترین مرحله برای برداشت ریزجلبک به منظور

³²Lag or induction phase

³³Exponential phase

³⁴Phase of declining growth rate

³⁵Stationary phase

³⁶Death or "crash" phase

استفاده در تحقیقات و صنعت، مرحله سوم از نمودار رشد می‌باشد. با توجه به اینکه در شرایط مختلف کشت و همچنین برای گونه‌های مختلف ریزجلبک این نمودار رشد متفاوت است، ضروری است که نمودار رشد هر گونه در شرایط مختلف کشت به دست آید تا در مناسب‌ترین زمان و بهترین تراکم آن گونه نمونه‌برداری انجام شود (یقہ، 1389).

در این پژوهش، پیش از انجام مراحل بهینه‌سازی و بررسی میزان تولید نشاسته و نرخ رشد، منحنی رشد ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* به منظور دستیابی به انتهای فاز رشد تصاعدی رسم شد. این ریزجلبک مشابه سایر گونه‌ها در ابتدا به منظور سازگار شدن با محیط کشت جدید وارد فاز تأخیر گردید. پس از سازگاری با محیط کشت، رشد و تکثیر آن افزایش یافت تا زمانیکه به دلیل افزایش تعداد سلول‌ها وارد فاز سکون گردید که در این مرحله تعداد تکثیر و مرگ میر سلول‌ها یکسان است و نمودار به صورت خطی مشاهده می‌شود. همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود، جلبک پس از طی دو روز فاز تأخیر، وارد فاز رشد لگاریتمی شده و در روز پنجم به ابتدای فاز سکون رسیده است. نتایج دیگر مطالعات بر روی جلبک‌های سبز، یافته‌های حاصل از این تحقیق را تأیید می‌نماید. Palka و همکارانش در منحنی رشد *Chlamydomonas reinhardtii* نشان دادند که سلول‌ها پس از دو روز فاز تأخیر، در روز پنجم وارد ابتدای فاز سکون شدند (Palka et al., 2002). نمودار رشد جلبک *Chlamydomonas* در غلظت‌های مختلف آهن و فتوهتروتروفی پس از 6 روز به ابتدای فاز سکون رسیده است (Glaesener et al., 2013).

5-2 - بهینه‌سازی محیط کشت

بهینه‌سازی شرایط، عامل اصلی در تکنولوژی کشت انبوه ریزجلبک‌ها می‌باشد. بنابراین جهت درک رفتار گونه‌های جلبکی تحت عوامل مختلف محیطی، تعیین پارامترهای مختلف رشد ضروری به نظر می‌رسد. بررسی اثر متقابل بین این عوامل و مدلسازی پارامترهای رشد، منجر به دستیابی شرایط بهینه

رشد در تولید گونه‌های مورد نظر در مقیاس صنعتی می‌گردد. به طور کلی، رشد جمعیت ریزجلبک‌ها، به سه عامل حیاتی (نور موجود، درجه حرارت و میزان مواد مغذی مانند نیتروژن، فسفر و سیلیکات) برای دیاتومه‌ها)) بستگی دارد. در میان این فاکتورها، نور به دلیل اثر مستقیم بر مکانیسم فتوسنتز، فاکتور مهمی در تعیین شرایط بهینه برای کشت می‌باشد. دما و شدت نور از عوامل مهم در تولید بیومس در کشت ریزجلبک‌ها در مقیاس صنعتی هستند. در واقع، طول روز بر میزان فتوسنتز شبانه روزی، تنفس، تقسیم سلولی و نرخ رشد مؤثر است. همچنین این فاکتور بر فعالیت آنزیمی و سنتز ماکرومولکول‌ها تأثیر عمده‌ای دارد (Bouterfas et al., 2006). جلبک در طی مرحله فتوسنتز، با استفاده از نور و مواد غذایی، لیپید، پروتئین و کربوهیدرات تولید می‌کند. مقادیر این محصولات متابولیکی با شرایط محیطی و غذایی، مقدار شدت نور، سطح دی اکسید کربن، pH، دما، میزان مواد غذایی و به حضور یا غیاب دیگر ارگانیسم‌ها مرتبط است. کربن، هیدروژن و اکسیژن برای رشد جلبکی مورد نیاز است. مواد غذایی ماکرو شامل نیتروژن، فسفر، سولفور، پتاسیم و منیزیم می‌باشد. مواد غذایی میکرو مانند آهن، منگنز، کبالت، روی، مس و مولیبدن در مقادیر بسیار کم مورد نیاز است. شرایط محیطی (به خصوص نور و دما) و مواد غذایی غیر معدنی، مواد غذایی ماکرو و میکرو، ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. فاکتورهای دیگری مانند pH و حضور فلزات سمی فاکتورهای مهمی در تأثیر بر رشد جلبک و متابولیسم هستند. بررسی میان‌کنش متقابل بین چندین فاکتور محیطی و غذایی، به منظور جایگزینی تکنولوژی استفاده از جلبک در تولید تجاری سوخت زیستی ضروری می‌باشد (Juneja et al., 2013).

در پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر عوامل محیطی، اثر دو فاکتور pH و شدت نور بر نرخ رشد و میزان تولید نشاسته مورد ارزیابی قرار گرفت.

5-3 - استفاده از نرم افزار طراحی آزمایش

در این پژوهش به منظور دستیابی به شرایط بهینه رشد و افزایش میزان تولید نشاسته، از نرم افزار طراحی آزمایش Design Expert از روش آماری سطح پاسخ (RSM) استفاده شده است. در روش کلاسیک به منظور بهینه سازی محیط کشت معمولاً از طرح "یک متغیر در یک زمان" استفاده می شود که مستلزم تغییر تنها یک فاکتور و ثابت نگه داشتن سایر فاکتورها می باشد. این روش تک بعدی، وقت گیر بوده و برهم کنش بین متغیرها را نادیده می گیرد که ممکن است منجر به نتایج و تفاسیر نادرست گردد. در روش فاکتوریل، فاکتورها به طور همزمان مورد مطالعه قرار می گیرند و برهم کنش بین فاکتورها در صورت وجود تشخیص داده می شود (Martin et al., 2004). در فرآیندهای تخمیری، هنگامی که چندین فاکتور به طور همزمان در نظر گرفته می شود، استفاده از روش بهینه سازی میانکنش های میان فاکتورها ضروری است. به منظور بهینه سازی آماری، از طراحی فاکتوریل و آنالیز سطح پاسخ استفاده می گردد. مزیت به کارگیری روش طراحی فاکتوریل، به دست آوردن حداکثر اطلاعات فرآیند و کاهش تعداد آزمایش ها است. در این مورد، طراحی ترکیب مرکزی (CCD)، روش مفیدی است که برای آزمایشات متناوب به کار گرفته می شود. مقادیر قابل قبولی از اطلاعات با اجرای تعداد کمتری سنجش فراهم می شود، بنابراین هزینه کلی مرتبط با آنالیز کاسته می شود (Ho et al., 2012).

5-3 - اثر pH بر نرخ رشد

یکی از مهمترین فاکتورهای مؤثر در کشت جلبک pH است. از آنجائیکه pH حلالیت و دسترسی دی اکسید کربن و دیگر مواد غذایی ضروری را تعیین می کند، می تواند تأثیر مهمی بر متابولیسم جلبکی داشته باشد. به علت جذب کربن غیرآلی توسط جلبک، pH به طور معنی داری در محیط کشت جلبکی افزایش می یابد. حداکثر رشد جلبکی در محدوده pH خنثی رخ می دهد. pH فاکتور تعیین کننده اصلی غلظت های انواع کربن در آب است. pH بالاتر دسترسی به کربن دی اکسید کربن را محدود می کند که

موجب مهار رشد جلبکی می‌گردد. همچنین pH بالاتر تمایل جلبک به دی اکسید کربن آزاد را کاهش می‌دهد. در محیط‌های فتواتوتروفی، جایگزینی دی اکسید کربن برای فتوسنتز کمتر از کاهش فشار نسبی دی اکسید کربن است و بنابراین منجر به افزایش pH می‌شود. pH قلیایی انعطاف دیواره سلولی سلول مادر را افزایش می‌دهد که مانع از گسستن آن شده و در نتیجه زمان چرخه سلولی افزایش می‌یابد. pH قلیایی به طور غیرمستقیم موجب افزایش در انباشت تری گلیسرید می‌شود. مشابه pH قلیایی، شرایط اسیدی نیز می‌تواند جذب مواد غذایی را تغییر دهد یا سمیت فلزی را القا کند و در نتیجه بر رشد جلبک مؤثر است. بسیاری از گونه‌های جلبکی در محدوده pH (7/6 - 7/0) رشد می‌کنند. این نتیجه در تحقیقاتی بر روی *Prorocentrum Heterocapsa triquetra*، *Ceratium lineatum* و *Chlamydomonas applanata* مشاهده شده است (Juneja et al., 2013). سلطانی و همکارانش، اثر pH های مختلف (5، 7 و 9) و شدت‌های نور مختلف (3 و 300 میلی مول فوتون بر مترمربع ثانیه) را بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی جلبک *Fischerella ambigua* بررسی نمودند. نرخ رشد در pH=9 و pH=7 مشابه بود، اما رشد در pH=5 مشاهده نشد. افزایش شدت نور تأثیر قابل توجهی بر نرخ رشد نداشت. غلظت کلروفیل در pH=7 بیشتر از سایر موارد بود. غلظت کلروفیل با افزایش شدت نور از 3 تا 300 میلی مول فوتون بر مترمربع ثانیه، کاهش یافته است (Soltani et al., 2006).

Visviki و Santikul رشد *Chlamydomonas applanata* را در محدوده pH (1/4 - 8/4)، مورد مطالعه قرار دادند. هیچ رشدی در محدوده 1/4 تا 3/4 مشاهده نشد. رشد در pH های بالاتر در *Chlamydomonas applanata* (با رشد بهینه در 7/4) مشاهده شده است. رشد تصاعدی برای بیش از 5 روز در 5/4 تا 8/4 مشاهده شده است. اما حداکثر رشد در pH=7/4 به دست آمده است (Visviki and Santikul, 2000).

برخی از جلبک‌ها مانند *Dunaliella acidophila* در شرایط اسیدی محیط کشت، به منظور ممانعت از عدم تعادل اسمزی ناشی از غلظت‌های بالای H_2SO_4 با انباشت گلیسرول سازگار می‌شود. در حالیکه سایر گونه‌ها مانند *Chlamydomonas sp*، *Pinnilaria braunii* و *Var. amplicephala* تحت شرایط به شدت اسیدی (pH=1) لیپیدهای ذخیره‌ای مانند تری گلیسریدها را ذخیره می‌کنند. سازگاری دیگری که تحت شرایط اسیدی مشاهده شده است، افزایش در محتوی اسیدچرب اشباع است که در این حالت سیالیت غشا کاهش می‌یابد و غلظت‌های بالای پروتون مهار می‌شود. در یکی از گونه‌های *Chlamydomonas*، محتوی کل اسید چرب از 2% در pH=7 به 2/4% در pH=2/7 افزایش یافته که از نظر آماری افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد (Juneja et al., 2013).

اثرات pH بر جذب کربن *Chlamydomonas reinhardtii* مطالعه شد که بر این اساس در pH کمتر از 6/95 دی اکسید کربن در فتوسنتز استفاده می‌شود. در pH بالاتر (9/5-6/95)، HCO_3^- غالب است و جلبک نمی‌تواند به طور کارآمد کربن را ذخیره نماید در نتیجه برای حفظ فعالیت فتوسنتزی به کربنات نیازمند است (Moroney and Tolbert, 1985).

pH بهینه رشد در گونه‌های کلرلا 7 بود. در حالیکه برای *D. salina* DCCBC2 و *Dunaliella sp* این مقدار 8 بود. نتایج pH ها با محیط اولیه جلبکی (محل نمونه برداری) هماهنگ است. گونه‌های *Chlorella* از آب شیرین و *D. salina* DCCBC2 و *Dunaliella sp* از آب دریا جدا شده‌اند (Kim et al., 2012).

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، نرخ رشد در pH=6 بسیار کمتر از سایر pH ها بود و بر اساس نتایج به دست آمده از نرم افزار طراحی آزمایش pH=7/4 به عنوان pH بهینه معرفی گردید و نتایج آزمایشات این مدل را تأیید کرد. نرخ رشد با افزایش شدت نور از 2000 لوکس به 8000 لوکس افزایش یافت و شدت نور 7400 لوکس، مناسب برای رشد جلبک معرفی گردید.

5-4- اثر شدت نور بر نرخ رشد

شدت نور، از طریق اثر بر فتوسنتز، رشد جلبک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نرخ رشد، تحت تأثیر افزایش شدت نور، تابعی از سوش جلبکی و دمای محیط است. نرخ رشد جلبک در شدت نور اشباع حداکثر است و با کاهش یا افزایش در شدت نور کاهش می‌یابد. فرایند سازگاری نوری/انباشت نور در جلبک منجر به تغییرات در ویژگی‌های سلول بر اساس دسترسی نور و افزایش کارآمدی فتوسنتز می‌شود. سازگاری از طریق چندین مکانیسم مانند تغییرات در نوع و مقدار رنگیزه‌ها، نرخ رشد، نرخ تنفس تاریکی یا دسترسی به اسیدهای چرب ضروری رخ می‌دهد. جلبک‌ها توسط غشاهای کلروپلاستی بر محدودیت نور غلبه می‌کنند. افزایش شدت نور بیش از حد اشباع، موجب بازدارندگی نوری می‌شود. این فرایند به دلیل اختلال در تیغه‌های کلروپلاستی در اثر شدت نور بالا و غیرفعال شدن آنزیم‌های دخیل در تثبیت دی‌اکسید کربن می‌باشد. برای مثال، نرخ رشد جلبک *Dunaliella viridis* با افزایش شدت نور، تا 63% کاهش می‌یابد (Juneja et al., 2013). شدت نور، موجب افزایش رشد سلولی، تولید کربوهیدرات/لیپید و بهبود کارایی تثبیت دی‌اکسید کربن شده است. کربوهیدرات موجود در بیومس عمدتاً از گلوکز می‌باشد. اثر شدت نور بر رشد جلبک می‌تواند طول مدت محدودیت نوری، اشباع نور و شرایط مهار نوری طبقه بندی شود (Ho et al., 2012).

در میان سه شدت نوری مختلف (2000، 5000 و 8000 لوکس) که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت، بر اساس نتایج حاصل از روش طراحی مدل توسط نرم‌افزار، شدت نور 7400 لوکس به عنوان شدت نور بهینه در نرخ رشد به دست آمد که معادل 97 میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه می‌باشد. در مطالعاتی که جهت تولید هیدروژن از جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* انجام شده است، در فاز رشد هوازی در محیط کشت TAP و دمای 25 درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری 100 میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه را اعمال نمودند (Godman et al., 2010; Scoma et al., 2012; Wu et al., 2012).

با توجه به مطالعه انجام شده توسط سیف آبادی و همکارانش، در بررسی اثر شدت‌های نوری مختلف (37/5، 62/5 و 100 میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه) بر نرخ رشد *Chlorella vulgaris*، بالاترین نرخ رشد (1/13 در روز) در شدت 100 میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه به دست آمد (Seyfabadi et al., 2011). Sasi و همکارانش، اثر شدت نور بر سطح راکتور و طول موج آن را بر نرخ رشد جلبک *Chlorella vulgaris* مورد بررسی قرار دادند. هر دو عامل بر نرخ رشد مؤثر بود (Sasi et al., 2009). مطالعات انجام شده توسط پاول و همکارانش نشان داد که نرخ رشد جلبک *Chlorella vulgaris* به شدت نور و غلظت دی‌اکسیدکربن وابسته است. این محققان ثابت کردند که شدت نور در غلظت‌های خاصی از دی‌اکسید کربن، فاکتور محدودکننده‌ای برای نرخ رشد جلبک *Chlorella vulgaris* بود (Powell et al., 2009).

Bonente و همکارانش تغییرات دستگاه فتوسنتزی *Chlamydomonas reinhardtii* را در شدت‌های نوری مختلف مورد بررسی قرار دادند. در شدت‌های نور مختلف، تغییراتی در سیستم فتوسنتزی *Chlamydomonas reinhardtii* مشاهده شد. اگرچه در شدت نور زیاد، در مقایسه با شرایط نوری کنترل و نور کم، سلول‌ها نرخ رشد سریع‌تر و تولید بیومس بیشتری دارند، سلول‌های سازگار شده با شدت نور کم قادر به تولید بیومس بیشتری به ازای هر فوتون جذب شده می‌باشند. به دلیل اینکه قسمت عمده‌ای از نور جذب شده در سلول‌های سازگار شده با شدت نور بالا به صورت گرما منتشر می‌شود، در نتیجه بازده فتوسنتزی کاهش می‌یابد. چگونگی انتشار به شدت به تجمع LhcSR3 (یک پروتئین مربوط به کمپلکس جمع‌کننده نور) در ریزجلبک‌ها بستگی دارد. از سایر تغییرات ایجاد شده در ترکیب دستگاه فتوسنتزی سازگار با شدت نور بالا، افزایش محتوای کاروتنوئید، به خصوص زاگزانتین، و کاهش تنظیم ظرفیت جذب نور توسط کاهش محتوای کلروفیل در هر سلول می‌باشد. اثرات عمده سازگاری به نور کم شامل افزایش فعالیت مرحله 1 و 2 انتقال و افزایش سهم جریان الکترون چرخه‌ای می‌باشد. همچنین با افزایش شدت نور، محتوای کاروتنوئید نسبت به کلروفیل افزایش یافته و تنظیم

ظرفیت جذب نور با کاهش محتوای کلروفیل در هر سلول کاهش می‌یابد. اندازه آنتن در هر دو فتوسیستم I و II با تجمع تنظیم نمی‌شود و به ندرت اثر تنظیمی بر نسبت فتوسیستم I/II دارد. اثرات اصلی تجمع در نور کم شامل افزایش فعالیت مرحله انتقال یک و دو و جریان انتقال الکترون چرخه‌ای می‌باشد (Bonente et al., 2012).

اطلاعات موجود در خصوص سازگاری جلبک‌های سبز در شدت‌های نوری مختلف برخی تفاوت‌ها را نشان می‌دهد. در *Dunaliella salina* و *Dunaliella viridis* گزارش شده است که با افزایش تابش نور (18-20)، کاهش تدریجی اندازه آنتن در هر دو فتوسیستم مشابه دیاتومه‌ها *Skeletonema costatum* مشاهده شده است. در مقابل، در *Dunaliella tertiolecta* تغییرات استوکیومتری در فتوسیستم I در مقابل فتوسیستم II سریع‌تر از مدولاسیون اندازه آنتن است، پیشنهاد می‌شود که مکانیسم‌های سازگاری در ریزجلبک‌ها در گونه‌ها خاص هستند (Bonente et al., 2012).

Ho و همکارانش، اثر شدت نور (تحت شرایط نوردی پیوسته) را بر نرخ رشد ویژه در جلبک *Scenedesmus obliquum* را در انتهای فاز رشد تصاعدی بررسی نمودند. نرخ رشد ویژه به شدت با افزایش شدت نور در آغاز فرآیند افزایش می‌یابد و سپس به تدریج شدت نور پیوسته بیشتر می‌شود. بیشترین میزان نرخ رشد ویژه حدود $1/65-1/8 \text{ d}^{-1}$ در ناحیه نور اشباع (180-540 میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) بود. تولید بیومس و نرخ تثبیت دی اکسید کربن با افزایش شدت نور به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد تا به بیشترین مقدار می‌رسد (ShihHsin et al., 2012).

5-5 - اثر pH بر میزان تولید نشاسته

نشاسته به عنوان یکی از منابع اصلی انرژی شیمیایی نقش مهمی در چرخه سلولی ایفا می‌کند. این پلی‌ساکارید در پلاستیدهای جلبک سبز و گیاهان عالی ذخیره می‌شود و در هر دو ارگانیسم، هر یک از مراحل مسیر متابولیکی توسط ایزوفرم‌های آنزیمی متنوعی انجام می‌شود (Busi et al., 2014).

مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهد که ساختار نشاسته استخراج شده از *Chlamydomonas reinhardtii* در محیط کشت‌هایی با فقر نیتروژن را نمی‌توان از نشاسته ذخیره اندوسپرم ذرت تشخیص داد. نشاسته گیاهی در سه گروه (A, B و C) بر اساس الگوی X-ray مختلف دسته‌بندی می‌شوند. *Chlamydomonas reinhardtii* پلی ساکارید ذخیره‌ای نوع A را انباشت می‌کند (Buléon et al., 1997).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که با افزایش pH از 6 به 8 میزان تولید نشاسته افزایش می‌یابد. به منظور انباشت نشاسته در جلبک *Tetraselmis subcordiformis* pH محیط کشت بر روی 8 تنظیم شد (Zheng et al., 2013). در برخی از تحقیقات به منظور افزایش تولید نشاسته در جلبک‌ها، pH محیط کشت در حدود 7 تنظیم شد (de-Bashan et al., 2002; Fernandes et al., 2012).

5-6 - اثر شدت نور بر میزان تولید نشاسته

Chlamydomonas دارای یک کلروپلاست فنجانی شکل است که بخش زیادی از سلول را اشغال می‌کند. در این کلروپلاست ناحیه پروتئینی به نام پیرانوئید وجود دارد که نشاسته تولید می‌کند و اغلب همراه با گرانول‌های نشاسته احاطه شده است.

در طی فاز نوری، نشاسته در کلروپلاست ذخیره شده و در تاریکی تجزیه می‌گردد. الگوی ذخیره و تجزیه در طی نور پیوسته یا تاریکی، کنترل شبانه روزی را نشان می‌دهد. *Chlamydomonas* آمیلوپکتین و آمیلوز را انباشت می‌کند اما نسبت این دو بستگی به شرایط رشد دارد. تحت شرایط بی‌هوایی در تاریکی، تخمیر نشاسته منجر به تولید فورمات، استات و اتانول می‌شود (Harris, 2009).

اولین مطالعات در مورد ساختار نشاسته در ولوکس‌ها به تحقیق Bourne در سال 1950 بر می‌گردد که وجود گرانول‌های شبیه به نشاسته در پلاستیدهای بدون رنگ را در جلبک *polytomella* گزارش

کردند. ساختار و ترکیب نشاسته *Chlamydomonas* بر اساس شرایط کشت تغییر می‌کند. در کشت‌های بدون فقر غذایی با استات و نور، نشاسته انباشته شده خیلی کمتر از 5% آمیلوز است، در حالی که در فقر غذایی یا در سلول‌های محدود شده مقادیر این نسبت پلی ساکارییدی 15% تا 30% می‌باشد (Harris, 2009).

Klein و Thyssex دریافتند که در برخی از محیط‌های کشت، کمترین مقدار نشاسته در میانه فاز نوری و غیاب استات حاصل می‌شود. مقادیر نشاسته به طور یکنواخت بعد از تبدیل در تاریکی کاهش می‌یابد. این الگو در تضاد با نتایج قبلی در مورد کلرلا بود که در آن سنتز نشاسته به طور پیوسته افزایش می‌یابد و تنها در زمان تقسیم سلولی 2 ساعت قبل از فاز تاریکی کاهش می‌یابد. در *Chlamydomonas*، سلول‌هایی که در فاز تاریکی نمونه‌برداری شده‌اند به طور قابل توجهی نرخ سنتز نشاسته بالاتری از سلول‌ها در میانه فاز نوری دارند. سنتز نشاسته بالاتر در طی تاریکی در حضور استات حاصل شد. مقادیر نشاسته در طی نیمه اول شب به بیشترین مقدار می‌رسد و در نیمه‌ی دوم شب، در زمان تقسیم سلولی کاهش می‌یابد. در *Chlamydomonas* و در بیشتر جلبک‌های سبز، چرخه سلولی با ساعت شبانه روزی آغاز می‌شود. تجمع نشاسته در *Chlamydomonas reinhardtii* و *Chlamydomonas moewusii* در شرایط بی‌هوازی تحریک می‌شود. این پدیده به عنوان اثر پاستور شناخته شده است. این رخداد، به علت کاهش انتخابی در ATP است. ATP یک مهارکننده آلوستریک آنزیم فسفوفروکتوکیناز است که آنزیم کنترل‌کننده سرعت مسیر گلیکولیز می‌باشد. در شرایط بی‌هوازی، در جلبک‌های سبز، متابولیت‌های سلولی شکسته می‌شوند و گازهایی مانند استات، اتانول، فورمات، دی اکسید کربن و هیدروژن مولکولی در طی تخمیر نشاسته تولید می‌شود. ثابت شده است که مقدار نشاسته برای تولید هیدروژن مهم است (Harris, 2009).

مطالعات نشان داد که *Chlamydomonas* در شرایط فقر غذایی فتوتروفی، میکسوتروفی و هتروتروفی، مقادیر زیادی نشاسته انباشته می‌نماید. در فقر فسفات، جلبک‌هایی که به صورت فتوتروفی

رشد نموده‌اند، کربوهیدرات انباشته می‌کنند و در فقر نیتروژن، جلبک‌ها در یک دوره نور و تاریکی، نشاسته سنتز می‌کنند. نشاسته در کلروپلاست مکانیسم‌های کنترلی متفاوتی را نسبت به آن چه در مورد گلیکوژن سیتوزولی شناخته شده را نشان دهد. برای مطالعه این تنظیم پاسخ جلبک تک سلولی *Chlamydomonas reinhardtii* در شرایط فقر غذایی بررسی شده است. *Chlamydomonas reinhardtii* را در رشد محدود شده، در محدودیت دی اکسید کربن در نور و محدودیت استات در تاریکی، مقادیر زیادی نشاسته انباشت می‌کند.

به نظر می‌رسد که ذخیره نشاسته در *Chlamydomonas reinhardtii* به تنهایی تحت شرایط کنترل هسته‌ای است و می‌تواند با تغییرات در فعالیت آنزیمی مرتبط با متابولیسم نشاسته در ارتباط باشد. ارتباط قطعی بین توقف رشد و ذخیره نشاسته وجود دارد. بین شدت فقر غذایی به عنوان منعکس کننده تعداد تقسیمات انجام شده توسط سلول و سلول‌های انتقال یافته به محیط فاقد ماده غذایی و مقدار نشاسته انباشت شده ارتباط واضحی وجود ندارد. به عنوان مثال مقادیر زیاد نشاسته در حضور استات در محیط کشت فاقد فسفات (جایی که قادر به رسیدن به دانسیته سلولی بالا دارد) انباشته می‌شود. به علاوه استات در بسیاری از موارد در ارتباط با افزایش سنتز نشاسته بود و استات به نظر می‌رسد حداقل در مورد فقر نیتروژن در تاریکی همانند کارآمدی در نور استفاده شده است. در *Chlamydomonas reinhardtii* کمبود نشاسته در سلول‌های فاز ساکن بدون شرایط فقر در مقایسه با سایر پلی‌ساکاریدهای ذخیره‌ای در میکروارگانیسم‌ها متفاوت است (Ball et al., 1990).

مقدار کربن تثبیت شده در لیپیدها و کربوهیدرات‌ها (نشاسته)، بسیار تحت تأثیر فاکتورهای محیطی

و مواد غذایی در دسترس می‌باشد (Juneja et al., 2013).

Chlamydomonas reinhardtii یک ارگانیسم فتواتوتروفی می‌باشد که می‌تواند در محیط

TAP به صورت میکسوتروفی رشد کند. استات می‌تواند به وسیله ورود وابسته به ATP به گلی اکسالات

یا چرخه اسید سیتریک با تولید اکی والان‌های احیایی به تریوز متابولیزه شود. که با NAD(P)H

دهیدروژناز برای احیا پلاستوکوئینون استفاده می‌شود (Buléon et al., 1997). مکانیسم‌های تحت تأثیر استات بر فتوسنتز در آزمایشات رشد طولانی مدت موجب تغییر در بیان ژن می‌شود. در سطح رونویسی، استات مهارکننده نشر آنزیم‌های دخیل در احیا کربن فتوسنتزی و القا کننده چرخه گلی اکسالات به خصوص آنزیم‌های مالات سنتتاز و ایزوسیترات لیاز است (Ball et al., 1990).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که میزان نشاسته در شدت نور 2000 لوکس از دو شدت نور (5000 و 8000) لوکس کمتر می‌باشد. بر اساس مدل حاصل از روش آماری سطح پاسخ (RSM)، شدت نور بهینه 5400 لوکس به دست آمد.

مهمترین فاکتور که نرخ سنتز و انباشت نشاسته را تحت تأثیر قرار می‌دهد، شدت نور می‌باشد. در شدت نور 215 میلی‌مول بر مترمربع در ثانیه، نشاسته 8/5 درصد از وزن خشک بود و در شدت نور 330 میکرومول بر مترمربع در ثانیه، 40 درصد از وزن خشک را نشاسته تشکیل می‌دهد. فاکتور مهم دیگر فاز چرخه سلولی است. محتوی نشاسته بیشترین میزان (45 درصد) از وزن خشک را پیش از تقسیم سلولی است، اما در طی تقسیم، سطح سلولی به سرعت به حدود 13 درصد از وزن خشک در سلول‌های رشد یافته در نور یا حدود 4 درصد در تاریکی در طی فاز تقسیم کاهش می‌یابد. سلول‌هایی که در محیط کشت فقر فسفر یا نیتروژن رشد یافته‌اند، محتوی نشاسته سلولی به ترتیب تا 55 درصد یا 38 درصد وزن خشک افزایش می‌یابد، در حالیکه بعد از حدود 20 ساعت، تولید نشاسته متوقف شد و محتوی نشاسته کاهش یافت. برای تولید تجاری نشاسته، جهت دستیابی به جلبک غنی از نشاسته در محیط کشت‌های متراکم، شرایط کشت باید مورد توجه قرار بگیرد (Ike et al., 1998).

Rodjaroen و همکارانش، تولید بیومس و انباشت نشاسته را در سویه‌های ریزجلبک طبیعی در تایلند بررسی نمودند. تعداد کلی 25 ریزجلبک شامل 14 سویه جلبک سبز و 11 سویه سیانوباکتر تعیین شده است. در این میان، سویه سیانوباکتر جنس نوستوک *Nostoc TISTR 8872* با تولید بیومس، 0/26g(DW)/L بهترین نتیجه را نشان می‌دهد، در حالیکه بیشترین انباشت نشاسته در

N.muscurun.TISTR 8871 با بیش از 32/97 درصد به دست آمده است. انواع بیومس جلبکی به طور بالقوه منبع انرژی تولید هیدروژن هستند. مطالعات انجام شده در مورد تولید بیومس و انباشت نشاسته در ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 نشان داد که در طی رشد فتوسنتزی در محیط کشت TAP، دمای 25 درجه سانتیگراد و در حضور 2 درصد دی اکسید کربن به مدت 3 روز، 1/45 g(DW)/L بیومس و 0/77 g/L نشاسته تولید گردید (Busi et al., 2014).

Ike و همکارانش، در مورد جلبک سبز *Chlamydomonas reinhardtii* و *Dunaliella tertiolecta* کشت شده در محیط کشت Bristol اصلاح شده و محیط کشت f/2، وزن خشک بیومس جلبکی را به ترتیب 7/62 و 7/26g/L و مقدار نشاسته را 41/80 و 17/20 گرم بر لیتر گزارش کردند. نشاسته در ریزجلبک می تواند به شکل کربوهیدرات، گلوکز، قندها و دیگر پلی ساکاریدها یافت شود (Ike et al., 1998).

محتوی نشاسته در جلبک های سبز *Chlamydomonas reinhardtii*، *Chlorella vulgaris*، *Dunaliella salina*، *Scendesmus obliquus* و *Synechococcus sp* به ترتیب 17، 12-17، 32، 10-17 و 15 درصد از وزن خشک بود، در حالیکه در سیانوباکترهای *Anabaena cylindrical* و *Spirulina maxima* به ترتیب 25-30 و 13-16 درصد وزن خشک بود (Spolaore et al., 2006).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و همچنین با در نظر گرفتن نقش نشاسته در تولید هیدروژن، می توان تحقیقات بیشتری با هدف افزایش تولید نشاسته انجام داد. بعلاوه به منظور بهینه سازی شرایط رشد استفاده از نرم افزارهای طراحی آزمایش همانند Design Expert پیشنهاد می شود.

پیشنهادات

تکنولوژی تولید سوخت‌های زیستی از منابع تجدیدپذیر در حال گسترش می‌باشد. جلبک‌ها منابع ارزشمندی به منظور تولید متابولیت‌های مؤثر و سوخت‌های زیستی می‌باشند. بر این اساس دستیابی به روش‌های نوین در زمینه بهبود بازده محصولات نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد.

- ✓ انجام تحقیقات بیشتر پیرامون بهینه‌سازی محیط کشت ریزجلبک‌ها، در تولید تجاری جلبک‌ها بسیار مؤثر می‌باشد.
- ✓ تأثیر استرس‌های غذایی بر نرخ رشد و تولید متابولیت‌های ارزشمند مورد بررسی قرار گیرد.
- ✓ نرم‌افزارهای طراحی آزمایش به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد انواع جلبک‌ها مورد استفاده قرار گیرد.
- ✓ پروژه‌هایی پیرامون ریزجلبک *Chlamydomonas* به منظور تولید سوخت‌های زیستی و سایر ترکیبات ارزشمند انجام گیرد.
- ✓ مطالعات دستوری ژنتیکی در مسیرهای تولید فراورده نهایی و بهبود بازده تولید آن انجام شود.
- ✓ طراحی فتوبیوراکتور متناسب با فراورده مدنظر بررسی و ارزیابی شود.

منابع و مأخذ

Archive of SID

منابع و مأخذ

- اکبری، حسن؛ (1383). بررسی اثرات برخی از عوامل محیطی بر روی رشد جلبک قرمز *Gracilaria corticata* در حوضچه‌های فایبر گلاس، نشریه پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، شماره 64، ص 8.
- امینی خوئی، زهرا؛ (1389). اثر شدت و دوره‌های نور بر رشد و زیتوده میکروجلبک *Chlorella vulgaris*. نشریه عملی شیلات ایران، سال نوزدهم، شماره سه، ص 11.
- پقه، اسماعیل؛ (1389). نمودار رشد ریزجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) در کشت‌های استوک و کشت‌های بیرون. مجله علوم آبزیان، شماره 2، ص 11.
- معصومی، سیده زهرا؛ (1384). بررسی تأثیر رژیم نوری بر رشد میکروجلبک *Tetraselmis suecica* در محیط کشت‌های ویتامینه و فاقد ویتامین، نشریه امور دام و آبزیان، شماره هفتاد و چهار، ص 130.
- هادی‌زاده شیرازی، نجمه؛ (1391). جداسازی آنزیم لیپاز از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 حاصل از عفونت‌های سوختگی و بهینه‌سازی محیط کشت آن با استفاده از روش Box-Behnken. نشریه پژوهش‌های سلولی و ملکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد بیست و شش، شماره دو، ص 229.
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., and Ghezzehei, T. A. (۲۰۱۳). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers* ۹۷, ۲۵۳-۲۶۱.
- Allakhverdiev, S. I., Thavasi, V., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Klimov, V. V., Ramakrishna, S., Los, D. A., Mimuro, M., Nishihara, H., and Carpentier, R. (۲۰۱۰). Photosynthetic hydrogen production. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* ۱۱, ۱۰۱-۱۱۳.
- Andrade, L., González-López, J., Fenice, M., Martínez-Toledo, M., Pesciaroli, C., Maza-Márquez, P., and Juárez-Jiménez, B. (۲۰۱۴). Application of Response Surface Methodology (RSM) for Culture Conditions and Biomass Production of

- Psychrophilic Microalgae Isolated from High Mountains Lake During the ice-free Season. *International Journal of Environmental Research* ۸, ۷۹۹-۸۱۲.
- Antal, T., Krendeleva, T., Laurinavichene, T., Makarova, V., Ghirardi, M., Rubin, A., Tsygankov, A., and Seibert, M. (۲۰۰۳). The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* ۱۶۰۷, ۱۵۳-۱۶۰.
- Assmann, A. (۲۰۱۱). The potential for micro-algae and other "micro-crops" to produce sustainable biofuels, University of Michigan.
- Balat, M. (۲۰۰۸). Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *International Journal of Hydrogen Energy* ۳۳, ۴۰۱۳-۴۰۲۹.
- Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.-C., and Matagne, R. (۱۹۹۰). Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* ۶۶, ۱-۹.
- Barghbani, R., Rezaei, K., and Javanshir, A. (۲۰۱۲). Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* ۱, ۱۲۸-۱۳۳.
- Batyrova, K. A., Tsygankov, A. A., and Kosourov, S. N. (۲۰۱۲). Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *International journal of hydrogen energy* ۳۷, ۸۸۳۴-۸۸۳۹.
- Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R., and Ballottari, M. (۲۰۱۲). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *Journal of Biological Chemistry* ۲۸۷, ۵۸۳۳-۵۸۴۷.
- Bouterfas, R., Dauta, A., and Belkoura, M. (۲۰۰۶). The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *In "Limnetica"*.
- Brereton, R. G. (۲۰۰۳). "Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant," John Wiley & Sons.

- Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J., and Ball, S. (۱۹۹۷). Starches from A to C (*chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal). *Plant Physiology* ۱۱۵, ۹۴۹-۹۵۷.
- Busi, M. V., Barchiesi, J., Martín, M., and Gomez-Casati, D. F. (۲۰۱۴). Starch metabolism in green algae. *Starch-Stärke* ۶۶, ۲۸-۴۰.
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y. E., Ozkan, A. D., Elibol, Z., and Tekinay, T. (۲۰۱۲). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and bioengineering* ۱۰۹, ۱۹۴۷-۱۹۵۷.
- Chakravarti, R., and Sahai, V. (۲۰۰۲). Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods. *Process Biochemistry* ۳۸, ۴۸۱-۴۸۶.
- Chang, C.-Y., Lee, C.-L., and Pan, T.-M. (۲۰۰۶). Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC۰۶۲۳ in submerged cultures. *Applied microbiology and biotechnology* ۷۲, ۶۵۴-۶۶۱.
- Chochois, V., Constans, L., Dauvillée, D., Beyly, A., Solivérès, M., Ball, S., Peltier, G., and Cournac, L. (۲۰۱۰). Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy* ۳۵, ۱۰۷۳۱-۱۰۷۴۰.
- de-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K., and Bustillos, J. J. (۲۰۰۲). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian journal of microbiology* ۴۸, ۵۱۴-۵۲۱.
- Fernandes, B., Dragone, G., Abreu, A. P., Geada, P., Teixeira, J., and Vicente, A. (۲۰۱۲). Starch determination in *Chlorella vulgaris* a comparison between acid and enzymatic methods. *Journal of Applied Phycology* ۲۴, ۱۲۰۳-۱۲۰۸.
- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E., and PrÖschold, T. (۲۰۰۵). Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas*

- acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH ۲.۶). *Plant, Cell & Environment* ۲۸, ۱۲۱۸-۱۲۲۹.
- Gibbs, M., Gfeller, R. P., and Chen, C. (۱۹۸۶). Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii* III. Photoassimilation of acetate. *Plant physiology* ۸۲, ۱۶۰-۱۶۶.
- Glaesener, A. G., Merchant, S. S., and Blaby-Haas, C. E. (۲۰۱۳). Iron economy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in plant science* ۴.
- Godman, J. E., Molnár, A., Baulcombe, D. C., and Balk, J. (۲۰۱۰). RNA silencing of hydrogenase (-like) genes and investigation of their physiological roles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical Journal* ۴۳۱, ۳۴۵-۳۵۱.
- Harris, E. H. (۲۰۰۹). "The *Chlamydomonas* sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use," Access Online via Elsevier.
- Hemschemeier, A., Melis, A., and Happe, T. (۲۰۰۹). Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis research* ۱۰۲, ۵۲۳-۵۴۰.
- Hemschemeier, A. C. (۲۰۰۵). The anaerobic life of the photosynthetic alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., and Chang, J.-S. (۲۰۱۲). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology* ۱۱۳, ۲۴۴-۲۵۲.
- Hutner, S., Provasoli, L., Schatz, A., and Haskins, C. (۱۹۵۰). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society*, ۱۵۲-۱۷۰.
- Ifeanyi, V., Anyanwu, B., Ogbulie, J., Nwabueze, R., Ekezie, W., and Lawal, O. (۲۰۱۱). Determination of the effect of light and salt concentrations on *Aphanocapsa* algal population. *African Journal of Microbiology Research* ۵, ۲۴۸۸-۲۴۹۲.
- Ike, A., Toda, N., Murakawa, T., Hirata, K., and Miyamoto, K. (۱۹۹۸). Hydrogen photoproduction from starch in CO₂-fixing microalgal biomass by a halotolerant bacterial community. In "BioHydrogen", pp. ۳۱۱-۳۱۸. Springer.

- Juneja, A., Ceballos, R. M., and Murthy, G. S. (۲۰۱۳). Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* ۶, ۴۶۰۷-۴۶۳۸.
- Kim, W., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S.-H., Kang, C. M., Kim, D.-J., and Kim, S. W. (۲۰۱۲). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and biosystems engineering* ۳۵, ۱۹-۲۷.
- Leganés, F., Sánchez-Maeso, E., and Fernández-Valiente, E. (۱۹۸۷). Effect of indoleacetic acid on growth and dinitrogen fixation in cyanobacteria. *Plant and cell physiology* ۲۸, ۵۲۹-۵۳۳.
- Levasseur, M., Thompson, P. A., and Harrison, P. J. (۱۹۹۳). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources^۱. *Journal of Phycology* ۲۹, ۵۸۷-۵۹۵.
- López-Elías, J. A., Esquer-Miranda, E., Martínez-Porchas, M., Garza-Aguirre, M. C., Rivas-Vega, M., and Huerta-Aldaz, N. (۲۰۱۱). The effect of inoculation time and inoculum concentration on the productive response of *Tetraselmis chuii* (Butcher, ۱۹۵۸) mass cultured in F/۲ and ۲-F media. *Archives of Biological Sciences* ۶۳, ۵۵۷-۵۶۲.
- Lustigman, B., Lee, L., and Weiss-Magasic, C. (۱۹۹۵). Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* ۵۵, ۶۵-۷۲.
- Ma, W., Chen, M., Wang, L., Wei, L., and Wang, Q. (۲۰۱۱). Treatment with NaHSO_۳ greatly enhances photobiological H_۲ production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource technology* ۱۰۲, ۸۶۳۵-۸۶۳۸.
- Makarova, V. V., Kosourov, S., Krendeleva, T. E., Semin, B. K., Kukarskikh, G. P., Rubin, A. B., Sayre, R. T., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (۲۰۰۷). Photoproduction of hydrogen by sulfur-deprived *C. reinhardtii* mutants with impaired photosystem II photochemical activity. *Photosynthesis research* ۹۴, ۷۹-۸۹.
- Martin, N., Souza, S. R. d., Silva, R. d., and Gomes, E. (۲۰۰۴). Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology* ۴۷, ۸۱۳-۸۱۹.

- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (۲۰۰۰). Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* ۱۲۲, ۱۲۷-۱۳۶.
- Meuser, J. E., Ananyev, G., Wittig, L. E., Kosourov, S., Ghirardi, M. L., Seibert, M., Dismukes, G. C., and Posewitz, M. C. (۲۰۰۹). Phenotypic diversity of hydrogen production in chlorophycean algae reflects distinct anaerobic metabolisms. *Journal of biotechnology* ۱۴۲, ۲۱-۳۰.
- Milledge, J., and Heaven, S. (۲۰۱۴). Methods of energy extraction from microalgal biomass: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, ۱-۲۰.
- Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., Isdepsky, A., and Sing, S. F. (۲۰۱۳). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In "Algae for Biofuels and Energy", pp. ۲۶۵-۲۸۴. Springer.
- Morgan, E. (۱۹۹۱). Chemometrics: Experimental Design. John Wiley & Sons.
- Moroney, J. V., and Tolbert, N. E. (۱۹۸۵). Inorganic carbon uptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* ۷۷, ۲۵۳-۲۵۸.
- Neter, J., Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., and Wasserman, W. (۱۹۹۶). "Applied linear statistical models," Irwin Chicago.
- Oncel, S., and Sukan, F. V. (۲۰۱۱). "Effect of light intensity and the light: dark cycles on the long term hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by batch cultures". *Biomass and Bioenergy* ۳۵, ۱۰۶۶-۱۰۷۴.
- Palka, L., Palka-Santini, M., Chambon, S., Renz, D., Maurer, P., and Doerfler, W. (۲۰۰۲). Microscale Assay Monitors Algal Growth Characteristics. *Anal. Biochem* ۲۵۹, ۲۷۴-۲۷۸.
- Powell, E. E., Mapiour, M. L., Evitts, R. W., and Hill, G. A. (۲۰۰۹). Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half cell. *Bioresource technology* ۱۰۰, ۲۶۹-۲۷۴.
- Ribeiro, C. C., Choi, J., Fung, L., and Kushniryk, O. (۲۰۱۳). Effect of varying light intensity on cell abundance of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Expedition* ۲.

- Saleem, M., Chakrabarti, M. H., Abdul Raman, A. A., Hasan, D. u. B., Ashri Wan Daud, W. M., and Mustafa, A. (۲۰۱۲). Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH. *international journal of hydrogen energy* ۳۷, ۴۹۳۰-۴۹۳۴.
- Sasi, D., Hill, G., and Powell, E. (۲۰۰۹). Effect of light intensity on growth of *Chlorella Vulgaris* in a novel Circulating loop photobioreactor. *Department of Chemical Engineering, University of Saskatchewan, Canada*, ۲.
- Scoma, A., Bertin, L., Pintucci, C., Raddi, S., and Fava, F. (۲۰۱۲). Inhibition of photosystem ۲ in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H_۲ production in sulfur-depleted cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., and Khoeyi, Z. A. (۲۰۱۱). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology* ۲۳, ۷۲۱-۷۲۶.
- ShihHsin, H., ChunYen, C., and JoShu, C. (۲۰۱۲). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_۲ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology* ۱۱۳, ۲۴۴-۲۵۲.
- Shinde, S. D., and Lele, S. S. (۲۰۱۰). Statistical media optimization for lutein production from microalgae *Auxenochlorella protothecoides* SAG ۲۱۱-۷A. *Int J Adv Biotechnol Res* ۱, ۱۰۴-۱۱۴.
- Siaut, M., Cui n , S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylid s, C., and Li-Beisson, Y. (۲۰۱۱). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC biotechnology* ۱۱, ۷.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R. A., Yazdi, M. T., Shokravi, S., and Fern ndez-Valiente, E. (۲۰۰۶). Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS ۱۱ under different irradiance and pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* ۲۲, ۵۷۱-۵۷۶.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (۲۰۰۶). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* ۱۰۱, ۸۷-۹۶.

- Stigum, V. M. (۲۰۱۲). The effect of light and temperature on lipid production in microalgae.
- Taheri, R., and Shariati, M. (۲۰۱۳). Study of the inhibitory effect of the media culture parameters and cell population to increase the biomass production of *Dunaliella tertiolecta*. *Progress in Biological Sciences* ۳, ۱۲۳-۱۳۳.
- Tamburic, B., Zemichael, F. W., Maitland, G. C., and Hellgardt, K. (۲۰۱۱). Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy* ۳۶, ۷۸۷۲-۷۸۷۶.
- Visviki, I., and Santikul, D. (۲۰۰۰). The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Archives of environmental contamination and toxicology* ۳۸, ۱۴۷-۱۵۱.
- Weber, C. I. (۱۹۹۱). "Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms," Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.
- Wu, S., Li, X., Yu, J., and Wang, Q. (۲۰۱۲). Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *Bioresource Technology*.
- Zheng, Y., Chen, Z., Lu, H., and Zhang, W. (۲۰۱۳). Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. *African Journal of Biotechnology* ۱۰, ۱۸۸۸-۱۹۰۱.

Abstract

Green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* is concerned as a model system to study algal physiology, morphology, genetics and biofuels. The aim of this study was optimization the growth and starch production conditions. With this respect the effect of pH and light intensities was investigated in alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In this order, the combination effect of these factors on growth and starch production was evaluated by design-Expert software and response surface method. The growth rate and starch content were evaluated using dry weight and spectrophotometric method respectively. By solving the equations and analysis of the response surface curve, optimum pH and light intensity to achieve maximum growth rates were, ۷.۴ and ۷۴۰۰ lux; to achieve maximum starch content was determined ۸ and ۵۳۰۰ lux, respectively.

Key words: starch production, *Chlamydomonas reinhardtii*, Design Expert software, light intensity, growth rate, pH.



**Academic Center for Education, Culture & Research
of Mazandaran**

**The effect of pH and light intensity on growth rate and
starch production in *Chlamydomonas*. (۲۰۲۰-۲۰۲۴)**

Research group:

Algae Biotechnology

Principal Investigator (By):

Fatemeh Gholizadeh

march ۲۰۱۵