فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۲۲- ۱۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

بهینه‌سازی تولید نشاسته توسط جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* با روش سطح پاسخ

فاطمه قلی‌زاده *: کارشناس ارشد زیست‌شناسی گیاهی، جهاد دانشگاهی مازندران، ایران، fatemegholizade@yahoo.com
طاهره قنبری: کارشناس ارشد بیوشیمی، جهاد دانشگاهی مازندران، ایران، taherehghanbari@yahoo.com
وحید شریفی: دکتری شیمی تجزیه، جهاد دانشگاهی مازندران، ایران، vsharifi@umz.ac.ir
ندا سلطانی **: استاد زیست‌شناسی گیاهی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران، soltani6@yahoo.com
سید محمد علوی: کارشناس میکروبیولوژی، جهاد دانشگاهی مازندران، ایران، mohammadalavi2003@yahoo.com

چکیده

مقدمه: ریزجلبک سبز *کلامیدوموناس رینهاردتی*[1] به‌عنوان سیستم مدل جلبکی در پژوهش‌های فیزیولوژی، مورفولوژی، ژنتیک و سوخت‌های زیستی مورد توجه است. هدف از انجام این مطالعه بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید نشاسته توسط این جلبک است. با این نگرش، تأثیر pH و شدت‌های نوری بر جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور تأثیر توأم عوامل pH و شدت نور بر رشد و تولید نشاسته توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت[2] و روش سطح پاسخ ارزیابی شد. میزان نرخ رشد با اندازه‌گیری وزن خشک و مقدار نشاسته با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

نتایج: با تجزیه و تحلیل نمودار سطح پاسخ و حل معادلهٔ به‌دست‌آمده ، مقدار بهینه pH و شدت نور برای رسیدن به حداکثر نرخ رشد، به‌ترتیب ۷/۴ و ۷۴۰۰ لوکس و به‌منظور دستیابی به حداکثر میزان نشاسته ۸ و ۵۳۰۰ لوکس تعیین شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که شدت نور و pH نقش مهمی در تولید نشاسته و نرخ رشد در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* دارند. علاوه بر این، مشخص شد که روش سطح پاسخ به‌منظور افزایش تولید نشاسته در این ریزجلبک مفید است.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی شرایط کشت، جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی*، روش آماری سطح پاسخ، نرخ رشد، نشاسته.

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
**پژوهشکده محیط زیست و توسعه پایدار، سازمان محیط زیست.

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

جلبک‌ها موجودات تک‌سلولی یا چندسلولی هستند که با انجام فتوسنتز قادر به تولید مواد غذایی هستند. عوامل محیطی مانند دما، نور، pH و مواد مغذی علاوه بر تأثیر بر فتوسنتز و نرخ رشد جلبک، بر فعالیت متابولیسم سلولی و ترکیبات آن نیز مؤثرند (۱). در میان این عامل‌ها، تنظیم نور به‌دلیل اثر مستقیم بر مکانیسم‌های فتوسنتزی، عامل مهمی در تعیین شرایط بهینه برای کشت محسوب می‌شود. در حضور مواد مغذی، راندمان کشت ریزجلبک‌ها به‌طور عمده توسط شدت نور و دما کنترل می‌شود (۲).

هیدروژن، از جمله ترکیباتی است که جلبک تولید می‌کند و می‌تواند به‌عنوان منبع انرژی در نظر گرفته شود. جلبک‌ها برای تولید هیدروژن، از متابولیت‌هایی مانند نشاسته و گلوکز در فرایند کاتابولیسم استفاده می‌کنند (۳). براساس گزارش‌های ارائه‌شده، گونه‌های *کلامیدوموناس*، *کلرلا*[۳]، *سندسموس*[۴] و چندین گونه سیانوباکتر قادر به تولید هیدروژن هستند (۴).

جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی*، جلبکی تک‌سلولی است که اغلب به‌عنوان یک سیستم مدل در مطالعات مختلف استفاده می‌شود (۵). این جلبک، تحت شرایط بی‌هوازی، با استفاده از انرژی نور، هیدروژن را از آب تولید می‌کند. تشکیل هیدروژن در این جلبک سبز، به‌طور طبیعی تحت شرایط استرس غذایی و محیطی انجام می‌شود (۶). در بسیاری از ریزجلبک‌ها مانند جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی*، تحت شرایط استرس، تولید مواد ذخیره‌ای پرانرژی مانند نشاسته و چربی (تری آسیل گلیسرول) افزایش می‌یابد (۷). استات به‌عنوان منبع اصلی کربن مصرف می‌شود و نشاسته در سلول‌ها ذخیره می‌شود. بین غلظت نشاسته و تولید هیدروژن، رابطه‌ای مستقیم وجود دارد. همچنین نشاسته در هنگام تولید هیدروژن استفاده می‌شود (۸). پژوهش‌هایی درخصوص بررسی تأثیر شرایط محیطی بر میزان نرخ رشد و تولید نشاسته در ریزجلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* در ایران صورت نگرفته است اما پژوهش‌هایی پیرامون بررسی تأثیر شرایط کشت بر میزان تولید بیومس و سایر ترکیبات شیمیایی مانند پروتئین و اسیدهای چرب در ریزجلبک‌ها انجام شده است (۹ و ۱۰).

به‌منظور کاهش هزینه‌های پژوهش‌ها و انجام حداقل آزمایش‌های موردِنیاز، از روش‌های آماری برای طراحی آزمایش‌ها استفاده می‌شود. یکی از روش‌های آماری استفاده‌شده در بهینه‌سازی شرایط کشت، روش سطح پاسخ[۵] است. با استفاده از این روش تعداد کمتری آزمایش موردِنیاز است و برای سیستم‌های چندعاملی نیز مفید است. در این روش رابطه میان عامل‌های گوناگون نیز بررسی می‌شود (۱۱).

جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* در زمینهٔ پژوهش‌های انرژی زیستی (هیدروژن زیستی و دیزل زیستی) اهمیت ویژه‌ای دارد و نیز عامل‌های محیطی بر نرخ رشد و تولید نشاسته در این جلبک تأثیرگذار است؛ با توجه به همین امر، هدف از این پژوهش دستیابی به شدت نور و pH بهینه جهت افزایش نرخ رشد و تولید نشاسته در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* با استفاده از روش آماری سطح پاسخ و با استفاده از طرح مرکب مرکزی[۶] بوده است.

مواد و روش‌ها

گونهٔ جلبکی و شرایط کشت: ریزجلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* از دانشگاه بیلفلد آلمان تهیه شد. به‌منظور تهیهٔ استوک، جلبک‌ها بر روی محیط کشت استاندارد تریس- استات- فسفات (TAP)[۷] حاوی NH_4Cl (۷/۵ میلی‌مولار)، $MgSO_4$ (۰/۴۱ میلی‌مولار)، $CaCl_2$ (۰/۳۴ میلی‌مولار)، K_2HPO_4 (۰/۶۲ میلی‌مولار)، KH_2PO_4 (۰/۴۱ میلی‌مولار)، گلاسیال استیک اسید (۰/۱ ٪)، EDTA (۱۷۱ میکرومولار)، $ZnSO_4$ (۳۱ میکرومولار)، H_3BO_3 (۱۸۴ میکرومولار)، $MnCl_2$ (۷/۲ میکرومولار)، $CoCl_2$ (۲/۲ میکرومولار)، $CuSO_4$ (۶/۳ میکرومولار)، $(NH_4)MO_7O_{24}$ (۴/۹ میکرومولار) و Tris (۲۰ میلی‌مولار) در فلاسک ۱۰۰۰میلی‌لیتر رشد داده شدند. به‌منظور تنظیم pH از بافر Hepes[۸] استفاده شد. هوادهی با پمپ آکواریوم HAILEA و با شدت خروجی ۲۰۰ ml/min انجام شد. آزمایش‌ها تحت شرایط نور کنترل‌شده در اتاق کشت (فیتوترون) با قابلیت تنظیم دما (در دمای ۱±۲۲) با نوردهی پیوسته انجام شد و لامپ‌های فلورسنت به‌منظور تأمین نور استفاده شد. شدت نور با استفاده از دستگاه لوکس‌متر لوترون مدل LX-105[۹] در حدود ۵۰۰۰ لوکس (۷۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه) تنظیم شد (۸).

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

طراحی آزمایش: به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* با هدف دستیابی به بالاترین نرخ رشد و بیشترین میزان تولید نشاسته از نرم‌افزار آماری دیزاین اکسپرت استفاده شد. برای طراحی آزمون، دو عامل شدت نور و pH در نظر گرفته شد که هر عامل دارای سه سطح مختلف بود (جدول ۱). عامل‌ها، در نرم‌افزار وارد و آزمون سطح پاسخ طراحی شد.

اثر این دو عامل بر دو پاسخ نرخ رشد و میزان تولید نشاسته ارزیابی شد. ۱۳ آزمون توسط نرم‌افزار طراحی شد. آزمون‌ها در آزمایشگاه انجام شد و اطلاعات حاصل وارد نرم‌افزار شد. مدلی به‌منظور دستیابی به بالاترین نرخ رشد و مدلی جهت حصول بیشترین میزان تولید نشاسته ارائه شد. مقادیر پیش‌بینی‌شدهٔ نرخ رشد و میزان نشاسته توسط مدل‌های به‌دست‌آمده در آزمایشگاه انجام شد.

جدول ۱- عامل‌های انتخاب‌شده در نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و سطوح آن‌ها

عامل	سطح ۱ (۱-)	سطح ۲ (۰)	سطح ۳ (۱)
شدت نور (لوکس)[۱۰]	۲۰۰۰	۵۰۰۰	۸۰۰۰
pH	۶	۷	۸

تعیین نرخ رشد: به‌منظور دستیابی به میزان نرخ رشد جلبک‌های کشت‌داده‌شده در شرایط نوری و pHهای مختلف، اندازه‌گیری دانسیته نوری (۱۲)، غلظت کلروفیل (۱۳) و وزن خشک (۱۴) با فاصلهٔ زمانی یک روز در میان انجام شد.

نرخ رشد طبق معادلهٔ زیر محاسبه شد:

μ نرخ رشد و N_1 و N_2 به‌ترتیب میزان بیومس (وزن خشک) در زمان‌های t_1 و t_2 است (۱۵).

اندازه‌گیری میزان نشاسته: اندازه‌گیری میزان نشاسته با استفاده از روش اصلاح‌شدهٔ اسیدسولفوریک- UV انجام شد. برای این کار عصاره جلبکی با استفاده از اتانول ۸۰درصد و بن ماری جوش استخراج شد. به یک میلی‌لیتر از محلول حاصل، اسیدسولفوریک غلیظ اضافه شد و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در طول موج ۳۱۵ نانومتر خوانده شد. براساس مقایسه میزان جذب خوانده‌شده با منحنی استاندارد گلوکز، مقدار نشاسته در نمونهٔ جلبکی محاسبه شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ورژن ۹ و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل[11] استفاده شد.

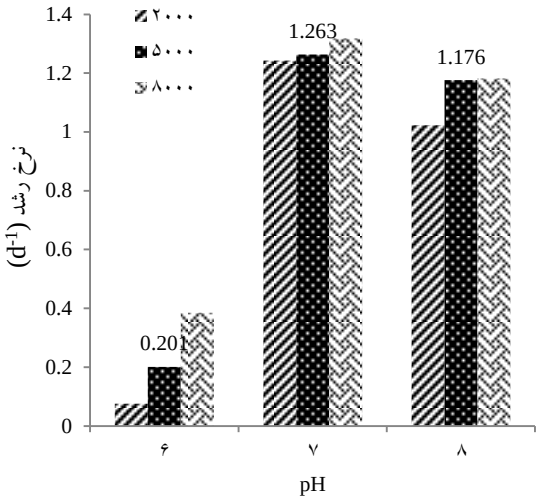
نتایج

مدل‌سازی: طرح آزمایشی سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط کشت در افزایش نرخ رشد و میزان تولید نشاسته با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی انجام شد. در این روش، مجموعه‌ای از ۱۳ آزمایش طراحی شد که دارای ۵ تکرار در نقطه مرکزی است (جدول ۲).

نتایج اثر شدت نور و pH بر نرخ رشد: بررسی اثر متقابل pH و شدت نور بر نرخ رشد نشان داد که بیشترین مقدار نرخ رشد در هر سه شدت نور مختلف (۲۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس)، در pH=۷ مشاهده شد و کمترین مقدار نرخ رشد در pH =۶ مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۲- طراحی دیزاین اکسپرت همراه با پاسخ‌های اندازه‌گیری‌شده. در این طراحی، نرخ رشد و میزان نشاسته به‌عنوان پاسخ در نظر گرفته شده است.

شماره آزمایش	عامل ۱ (pH)	عامل ۲ (شدت نور)	پاسخ ۱: نرخ رشد (روز $^{-1}$)	پاسخ ۲: نشاسته (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
۱	۰	-۱	۱/۲۴۳	۰/۰۱۸
۲	۰	۰	۱/۲۳	۰/۰۱۹
۳	۱	-۱	۱/۰۲۳	۰/۰۲۹
۴	۱	۱	۱/۱۸۲	۰/۰۳۲
۵	۱	۰	۱/۱۷۶	۰/۰۳۸
۶	۰	۰	۱/۲۸۴	۰/۰۱۷
۷	-۱	۱	۰/۳۸۵	۰/۰۰۹
۸	-۱	-۱	۰/۰۷۶	۰/۰۰۵
۹	۰	۰	۱/۲۶۲	۰/۰۲۱
۱۰	۰	۰	۱/۲۶۶	۰/۰۲
۱۱	-۱	۰	۱/۲۰۱	۰/۰۰۶
۱۲	۰	۱	۱/۳۱۸	۰/۰۱۴
۱۳	۰	۰	۱/۲۷۱	۰/۰۱۹



شکل ۱- اثر pH بر نرخ رشد (روز $^{-1}$) در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* در شدت‌های نور مختلف.

تحلیل نتایج سطح پاسخ: مدل حاصل از روش سطح پاسخ با معادله ۱ نشان داده شده است که در نرخ رشد (Y) به عنوان تابعی از مقدار متغیرهای مستقل است.

معادله ۱:

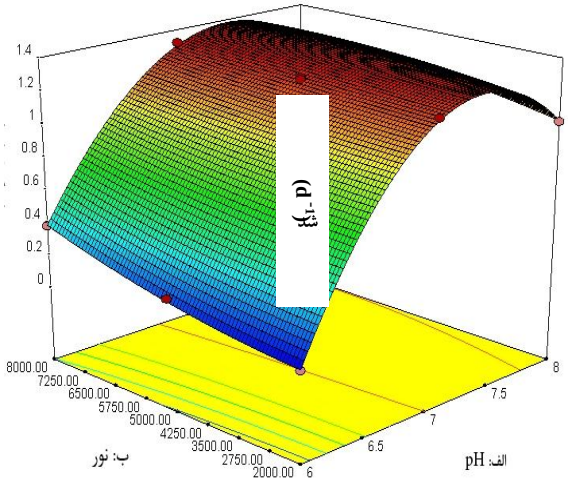
$$Y = ۱/۲۷ + ۰/۴۹ \times A - ۰/۰۳۷ \times B + ۰/۰۳۸ \times AB + ۰/۵۹ \times A^2 - ۰/۰۸۰ \times A^2B + ۰/۰۵۱ \times AB^2$$

در این فرمول Y مقدار نرخ رشد جلبک، A مقدار pH محیط کشت و B میزان شدت نور است.

همان‌طور که در معادله ۱ مشاهده می‌شود، ضریب هر دو عامل شدت نور و pH، مثبت است که بیانگر تأثیر هر دو عامل بر نرخ رشد است. از میان این دو عامل، با توجه به ضریب خطی pH (۰/۴۹) می‌توان گفت که اثر آن بر نرخ رشد، نسبت به شدت نور با ضریب خطی (۰/۰۳۷) بیشتر است. براساس ارزیابی آماری معادله ۱، مدل مناسب، یک مدل چند جمله‌ای درجه دوم بود. داده‌های تحلیل واریانس، دقت این مدل درجه دوم را تأیید می‌کند. شاخص F معیاری از انحراف داده‌ها از مقدار میانگین است و به‌طور کلی برای مدلی که نتایج آزمایش را با موفقیت پیشگویی می‌کند، مقدار F معمولاً بسیار بالا است. مقدار prob>F کمتر از ۰/۰۵ است که به معنی معنی‌داربودن مدل است. نتایج نشان می‌دهد که هر دو عامل مستقل بر میزان نرخ رشد تأثیر به‌سزایی دارند. محاسبهٔ عدم تطابق[۱۲]، نشان‌دهنده صحت داده‌های مدل است. درواقع معنی‌دارنبودن این شاخص مطلوب است. مقدار این شاخص برای رگرسیون معادله ۱، معنی‌دار نیست و p =۰/۳۵۰۹ است.

تأثیر متغیرهای مستقل بر نرخ رشد در شکل ۲ 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 رابطهٔ شماره ۱ مشاهده می‌شود که pH تأثیر عمده‌ای بر تغییرات نرخ رشد داشته است ($p<0.0001$). به‌طوری که در محدوده pH=۷، میزان نرخ رشد به‌طور چشمگیری افزایش یافته است.

با حل معادلهٔ شماره ۱ و تجزیهٔ نمودار سطح پاسخ (شکل ۲)، شدت نور و pH بهینه به‌منظور رسیدن به حداکثر رشد، به‌ترتیب ۷۴۰۰ لوکس و ۷/۴ است.

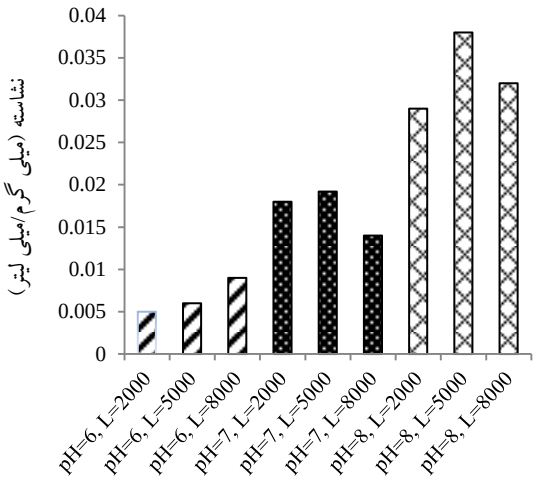


شکل ۲- منحنی سطح پاسخ. تأثیر شدت نور و pH بر نرخ رشد در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی*

تأیید تجربی مدل: برای تأیید نتایج فوق، ریزجلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط مدل (شدت نور ۷۴۰۰، لوکس و pH = ۷/۴) کشت داده شد و نرخ رشد حاصل از آن اندازه‌گیری شد. پاسخ مشاهده‌شده نرخ رشد برابر با ۱/۳۶ بود. نتایج نشان داد که همبستگی بالایی بین پاسخ پیش‌بینی‌شده (۱/۳۸) و پاسخ عملی به‌دست‌آمده در آزمایشگاه وجود دارد که تأییدی بر معتبربودن مدل است (جدول ۳).

جدول۳- ارزیابی تجربی مدل. هر دو عامل در شرایط بهینه در نظر گرفته شده‌اند.

شاخص‌های مستقل	مقدار بهینه	نرخ رشد پیش‌بینی‌شده	نرخ رشد اندازه‌گیری‌شده
pH	۷/۴	۱/۳۸	۱/۳۶
شدت نور	۷۴۰۰		



شکل ۳- نمودار میزان نشاسته تولیدی در شدت‌های نوری و pHهای مختلف

بررسی اثر شدت نور و pH بر میزان تولید نشاسته: میزان نشاستهٔ تولیدی برای هریک از آزمایش‌ها طراحی شد در نمونه‌های برداشت‌شده از انتهای مرحلهٔ رشد تصاعدی محاسبه شد و نتایج به‌صورت نمودار نشان داده شد. میزان تولید نشاسته در pH=۸ از سایر pH ها (۶ و ۷) بیشتر بود. در نور ۵۰۰۰ لوکس و pH=۸ بیشترین میزان تولید نشاسته به دست آمد. کمترین میزان تولید نشاسته در شدت نور ۲۰۰۰ و pH=۶ حاصل شد (شکل ۳).

محاسبات طرح آماری: مدل حاصل از روش سطح پاسخ با معادله ۲ نشان داده شده است که در مقدار تولید نشاسته (Y) به‌عنوان تابعی از مقدار متغیرهای مستقل است.

معادله ۲:

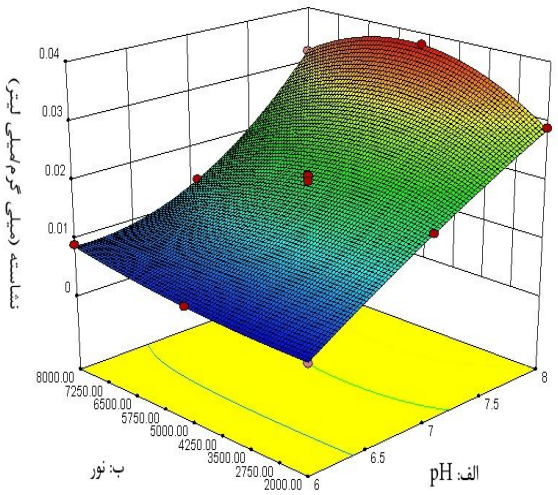
$$Y = ۰/۰۱۹ + ۰/۰۱۶ - A \times ۲ \times ۱۰^{-۳} + B \times ۱۰^{-۳} + ۲/۷۷۶ - A^2 \times ۳/۲۲۴ \times ۱۰^{-۳} + B^2 \times ۳/۷۵ \times ۱۰^{-۳} - A^2B \times ۴/۲۵۰ \times ۱۰^{-۳} AB^2$$

در این فرمول Y مقدار تولید نشاسته در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی*، A مقدار pH محیط کشت و B میزان شدت نور است.

همان‌طور که در معادله ۲ مشاهده می‌شود، ضریب عامل pH، مثبت و ضریب عامل شدت نور، منفی است که نشان می‌دهد که افزایش pH اثر مثبت بر روی تولید نشاسته دارد و افزایش شدت نور دارای اثر منفی بر تولید نشاسته است. براساس ارزیابی آماری معادله ۲، مدل مناسب، یک مدل چند جمله‌ای درجه دوم بود. داده‌های تحلیل واریانس، دقت این مدل درجه دوم را تأیید می‌کند. در این مدل مقدار prob>F کمتر از ۰/۰۵ است که به‌معنی معنی‌داربودن مدل است. نتایج نشان می‌دهد که عامل pH بر میزان تولید نشاسته مؤثر است. اما تأثیر شدت نور بر میزان تولید نشاسته معنی‌دار نیست. مقدار شاخص عدم تطابق، برای رگرسیون معادله ۲، معنی‌دار نیست و p =۰/۳۵۰۹ است که نشان‌دهندهٔ صحت داده‌های مدل است.

تحلیل نتایج سطح پاسخ: تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان تولید نشاسته در شکل ۴ 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 رابطهٔ شماره ۲ مشاهده می‌شود که pH تأثیر عمده‌ای بر تغییرات میزان تولید نشاسته داشته است ($p<0.0001$). به‌طوری که در محدودهٔ pH=۸، میزان تولید نشاسته به‌طور چشمگیری افزایش یافته است.

با حل معادله شماره ۲ و تجزیه نمودار سطح پاسخ (شکل ۴)، شدت نور و pH بهینه به‌منظور رسیدن به حداکثر نشاسته، به‌ترتیب ۵۳۰۰ لوکس و ۸ است.



شکل ۴- منحنی سطح پاسخ. تأثیر شدت نور و pH بر نشاسته در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی*

تأیید تجربی مدل: به‌منظور تأیید نتایج فوق، ریزجلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی* در شرایط بهینهٔ پیشنهادشده توسط مدل (شدت نور ۵۳۰۰، لوکس و ۸ = pH) کشت داده شد و میزان نشاستهٔ حاصل از آن اندازه‌گیری شد. میزان نشاسته تولید شده در آزمایشگاه برابر با ۰/۰۳۴ بود. نتایج نشان داد که همبستگی بالایی بین پاسخ پیش‌بینی‌شده (۰/۰۳۸) و پاسخ عملی به‌دست‌آمده در آزمایشگاه وجود دارد که تأییدی بر معتبربودن مدل است (جدول ۴).

جدول۴- ارزیابی تجربی مدل. هر دو عامل در شرایط بهینه در نظر گرفته شده‌اند.

شاخص‌های مستقل	مقدار بهینه	نشاسته پیش‌بینی‌شده	نشاسته اندازه‌گیری‌شده
pH	۸	۰/۰۳۸	۰/۰۳۴
شدت نور	۵۳۰۰		

بحث و نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی شرایط رشد، عامل اصلی در تکنولوژی کشت انبوه ریزجلبک‌ها است. بنابراین جهت درک رفتار گونه‌های جلبکی تحت عوامل مختلف محیطی، تعیین شاخص‌های مختلف رشد ضروری به نظر می‌رسد. بررسی اثر متقابل بین این عوامل و مدل‌سازی شاخص‌های رشد، منجر به دستیابی شرایط بهینه رشد در کشت گونه‌های مدنظر در مقیاس صنعتی می‌شود (۲). بررسی میان‌کنش متقابل بین چندین عامل، به‌منظور جایگزینی تکنولوژی استفاده از جلبک در تولید تجاری سوخت زیستی ضروری است (۱).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که دو عامل pH و شدت نور بر نرخ رشد و میزان تولید نشاسته مؤثرند. نرخ رشد جلبک در pH=۶ بسیار کمتر از سایر pHها بود و در pH=۷/۴، جلبک رشد بهتری را نشان داد. پژوهش‌های انجام‌شده بر *سراتیوم لیناتوم*[۱۳]، *هتروکاپسا تریکوترا*[۱۴]، *پروروسنتروم مینیموم*[۱۵] و *کلامیدوموناس اپلانتا*[۱۶] نشان داد که بسیاری از گونه‌های جلبکی در محدودهٔ pH (۷/۶- ۷/۰) رشد می‌کنند (۱). ویسویکی[۱۷] و سانتیکول[۱۸] رشد *کلامیدوموناس اپلانتا* را در محدودهٔ pH (۸/۴- ۱/۴)، مطالعه کردند. هیچ رشدی

در محدوده ۱/۴ تا ۳/۴ مشاهده نشد. رشد در pHهای بالاتر در *کلامیدوموناس اپلانتا* (با رشد بهینه در ۷/۴) مشاهده شده است. رشد تصاعدی برای بیش از ۵ روز در ۵/۴ تا ۸/۴ مشاهده شده است. اما حداکثر رشد در pH=۷/۴ به دست آمده است که با نتایج حاصل از پژوهش ما انطباق دارد (۱۷). نتایجی که کیم[۱۹] و همکاران به دست آوردند نیز نشان داد که pH بهینهٔ رشد در گونه‌های *کلرلا* معادل ۷ بود که مشابه نتایج حاصل از این پژوهش است (۱۸). سلطانی و همکارانش، اثر pHهای مختلف (۵، ۷ و ۹) را بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی جلبک *فیشرلا آمبیگوآ*[۲۰] بررسی کردند که نشان داد نرخ رشد در pH=۹ و pH=۷ مشابه بود، اما رشدی در pH=۵ مشاهده نشد (۱۴). یافته‌های حاصل از این مطالعات، نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. از آنجایی‌که pH، حلالیت و دسترسی دی‌اکسیدکربن و دیگر مواد غذایی ضروری را تعیین می‌کند، می‌تواند تأثیر مهمی بر متابولیسم جلبکی داشته باشد. به‌علت جذب کربن غیرآلی توسط جلبک، pH به‌طور معنی‌داری در محیط کشت جلبکی افزایش می‌یابد. حداکثر رشد جلبکی در محدودهٔ pH خنثی رخ می‌دهد. pH بالاتر دسترسی به کربن دی‌اکسیدکربن را محدود می‌کند که موجب مهار رشد جلبکی می‌شود (۱).

از میان سه شدت نوری مختلف (۲۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس) که در پژوهش حاضر بررسی شد، براساس نتایج حاصل، شدت نور ۷۴۰۰ لوکس به‌عنوان شدت نور بهینه برای دستیابی به بهترین نرخ رشد به دست آمد که معادل ۹۷ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه بود. با توجه به مطالعه‌ای که سیف آبادی و همکارانش انجام دادند، در بررسی اثر شدت‌های نوری مختلف ۳۷/۵، ۶۲/۵ و ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه بر نرخ رشد *کلرلا ولگاریس*[۲۱]، بالاترین نرخ رشد ۱/۱۳ در روز در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه به دست آمد (۱۹). هو[۲۲] و همکارانش، اثر شدت نور، تحت شرایط نوردهی پیوسته، بر نرخ رشد ویژه را در انتهای مرحلهٔ رشد تصاعدی در جلبک *سندسموس ابلیکوم*[۲۳] بررسی کردند. نرخ رشد ویژه با افزایش شدت نور افزایش می‌یابد. همچنین تولید بیومس و نرخ تثبیت دی‌اکسیدکربن با افزایش شدت نور به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۰). در مطالعاتی که جهت تولید هیدروژن از جلبک *کلامیدوموناس* انجام گرفته و در آن، مرحلهٔ رشد هوازی در محیط کشت TAP، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه اعمال شده (۲۱-۲۳)، نتایجی مشابه نتایج پژوهش حاضر به دست آمده است.

شدت نور موجب افزایش رشد سلولی، تولید کربوهیدرات و لیپید و بهبود بازده تثبیت دی‌اکسیدکربن شده است (۲۰). بررسی‌ها نشان می‌دهد که شدت نور، با اثر بر فتوسنتز، رشد جلبک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سازگاری به نور از طریق چندین مکانیسم مانند تغییر 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 (۱).

افزایش شدت نور بیش از حد اشباع، موجب بازدارندگی نوری می‌شود. این فرایند به‌دلیل اختلال در تیغه‌های کلروپلاستی در اثر شدت نور بالا و غیرفعال‌شدن آنزیم‌های دخیل در تثبیت دی‌اکسیدکربن است (۱).

نشاسته به‌عنوان یکی از منابع اصلی انرژی شیمیایی

نقش مهمی در چرخهٔ سلولی ایفا می‌کند. این پلی‌ساکارید در پلاستیدهای جلبک‌های سبز و گیاهان عالی ذخیره می‌شود و در هر دوی این موجودات زنده، هریک از مراحل مسیر متابولیکی توسط ایزوفرم‌های آنزیمی متنوعی انجام می‌شود (۲۴). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که میزان نشاسته در شدت نور ۲۰۰۰ لوکس از دو شدت نور (۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ لوکس) بسیار کمتر است. همچنین در شدت نور ۵۴۰۰ لوکس، بیشترین میزان نشاسته تولید شد. در بررسی اثر pH بر میزان تولید نشاسته مشاهده شد که با افزایش pH از ۶ به ۸ میزان تولید نشاسته بیشتر می‌شود. در پژوهشی که زنگ[۲۴] و همکاران انجام دادند، به‌منظور انباشت نشاسته در جلبک *تتراسلمیس سابکوردیفورمیس*[۲۵]، pH محیط کشت بر روی ۸ تنظیم شد (۲۵). در پژوهش حاضر نیز بیشترین میزان نشاسته در pH=۸ به دست آمد. این در حالی است که در برخی دیگر از پژوهش‌ها، به‌منظور افزایش تولید نشاسته در جلبک‌ها، pH محیط کشت در حدود ۷ تنظیم شده است (۲۶، ۲۷). بررسی‌های به‌عمل‌آمده نشان داده است که مقدار کربن تثبیت‌شده در لیپیدها و کربوهیدرات‌ها (نشاسته)، به‌شدت تحت تأثیر عامل‌های محیطی است (۱).

کیم و همکاران، اثر عامل‌های مختلف مانند شدت نور، دما، pH و فسفات بر تولید بیومس را در سه جلبک سبز، با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی کردند. آن‌ها اظهار داشتند که استفاده از روش سطح پاسخ، به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد مفید است (۱۸). کابوسی و همکاران نیز اظهار داشتند که روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط به‌منظور تولید آنزیم آلفا آمیلاز از باکتری *باسیلوس آمیلولیکویی فسینز*، کارایی مطلوبی دارد (۲۸). در پژوهش حاضر نیز از روش سطح پاسخ استفاده شد که به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید نشاسته سودمند واقع شد.

تکنولوژی تولید سوخت‌های زیستی از منابع تجدیدپذیر در حال گسترش است. جلبک‌ها منابع ارزشمندی به‌منظور تولید متابولیت‌های مؤثر و سوخت‌های زیستی هستند. براین‌اساس دستیابی به روش‌های نوین در زمینهٔ بهبود بازده این محصولات نیازمند پژوهش‌های بیشتری است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش در بهینه‌سازی تولید نشاسته و با درنظرگرفتن نقش نشاسته در تولید هیدروژن، می‌توان پژوهش‌های بیشتری با هدف افزایش بیشتر تولید نشاسته انجام داد. علاوه بر این، به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد استفاده از نرم‌افزارهای طراحی آزمایش همانند دیزاین اکسپرت پیشنهاد می‌شود. این پژوهش نشان می‌دهد که تغییر شدت نور و pH بر نرخ رشد مؤثر است. همچنین تغییر pH، عامل مؤثری در میزان تولید نشاسته در جلبک *کلامیدوموناس رینهاردتی است*.

References

(1) Juneja A, Ceballos RM, Murthy GS. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*. 2013; 6(9): 4607-38.

(2) Bouterfas R, Belkoura M, Dauta A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica*. 2006; 25(3): 647-56.

(3) Chochois V, Constans L, Dauvillée D, Beyly A, Solivérès M, Ball S, et al. 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*. 2010; 35(19): 10731-40.

(4) Milledge J, Heaven S. Methods of energy extraction from microalgal biomass: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2014; 13: 301-20.

(5) Bonente G, Pippa S, Castellano S, Bassi R, Ballottari M. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(8): 5833-47.

(6) Saleem M, Chakrabarti MH, Abdul Raman AA, Hasan DuB, Ashri Wan Daud WM, Mustafa A. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH. *International journal of hydrogen energy*. 2012; 37(6): 4930-4.

(7) Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC biotechnology*. 2011; 11(1): 1-15.

(8) Tamburic B, Zemichael FW, Maitland GC, Hellgardt K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011; 36(13): 7872-6.

(9) Naderi Farsani M, Meshkiniy S, Manaffar R, Asal Pishe Z. Response of growth, protein and fatty acid content of *Desmodesmus cuneatus* to the repletion and depletion of nitrogen. *Biological Journal of Microorganism*. 2015; 3(12): 59-68.

(10) Blair MF, Kokabian B, Gude VG. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2014; 2(1): 665-74.

(11) Chang C-Y, Lee C-L, Pan T-M. Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006; 72(4): 654-61.

(12) Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Sing SF. Standard methods for measuring growth of algae and their composition. *Algae for Biofuels and Energy*. 1st ed. Netherlands: Springer; 2013: 265-84.

(13) Hemschemeier A, Melis A, Happe T. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis research*. 2009; 102(2-3): 523-40.

(14) Soltani N, Khavari-Nejad RA, Yazdi MT, Shokravi S, Fernández-Valiente E. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 22(6): 571-6.

(15) Levasseur M, Thompson PA, Harrison PJ. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources1. *Journal of Phycology*. 1993; 29(5): 587-95.

(16) Albalasmeh AA, Berhe AA, Ghezzehei TA. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*. 2013; 97(2): 253-61.

(17) Visviki I, Santikul D. The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2000; 38(2): 147-51.

(18) Kim W, Park JM, Gim GH, Jeong S-H, Kang CM, Kim D-J, et al. Optimization of

culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2012; 35(1-2): 19-27.

(19) Seyfabadi J, Ramezanpour Z, Khoeyi ZA. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*. 2011; 23(4): 721-6.

(20) Ho S-H, Chen C-Y, Chang J-S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology*. 2012; 113: 244-52.

(21) Wu S, Li X, Yu J, Wang Q. Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and Bradyrhizobium japonicum. *Bioresource technology*. 2012; 123: 184-8.

(22) Scoma A, Bertin L, Pintucci C, Raddi S, Fava F. Inhibition of photosystem 2 in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H 2 production in sulfur-depleted cultures. *International journal of hydrogen energy*. 2012; 37(14): 10604-10.

(23) Godman JE, Molnár A, Baulcombe DC, Balk J. RNA silencing of hydrogenase (-like) genes and investigation of their physiological roles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical Journal*. 2010; 431(3): 345-51.

(24) Busi MV, Barchiesi J, Martín M, Gomez-Casati DF. Starch metabolism in green algae. *Starch-Stärke*. 2014; 66(1-2): 28-4.

(25) Zheng Y, Chen Z, Lu H, Zhang W. Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by Tetraselmis subcordiformis in a rectangular airlift photobioreactor. *African Journal of Biotechnology*. 2013; 10(10): 1888-901.

(26) Fernandes B, Dragone G, Abreu AP, Geada P, Teixeira J, Vicente A. Starch determination in *Chlorella vulgaris* a comparison between acid and enzymatic methods. *Journal of Applied Phycology*. 2012; 24(5): 1203-8.

(27) de-Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, Lebsky VK, Bustillos JJ. 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*. 2002; 48(6): 514-21.

(28) Kaboosi H, Tabari N, Samadlouie HR. Optimization of α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using response surfaces methodology. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 11: 79-90.

---

[1]- *Chlamydomonas reinhardtii*
[2]- Design Expert
[3]- *Chlorella*
[4]- *Scenedesmus*
[5]- Response Surface Methodology (RSM)
[6]- Central composite (CCD)
[7]- Tris-Acetate Phosphate
[8]- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
[9]- LUTRON
[10]- Lux
[11]- Excel
[12]- Lake of fit
[13]- *Ceratium lineatum*
[14]- *Heterocapsa triquetra*
[15]- *Prorocentrum minimum*
[16]- *Chlamydomonas applanata*
[17]- Visviki
[18]- Santikul
[19]- Kim
[20]- *Fischerella ambigua*
[21]- *Chlorella vulgaris*
[22]- Ho
[23]- *Scenedesmus obliqum*
[24]- Zheng
[25]- *Tetraselmis subcordiformis*

Optimization of starch production by *Chlamydomonas reinhardtii* using response surfaces methodology

Fatemeh Gholizadeh *
M.Sc. of Plant biology, Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Mazandaran, Iran, fatemegholizade@yahoo.com
Tahereh Ghanbari
M.Sc. of Biochemistry, Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Mazandaran, Iran, taherehghanbari@yahoo.com
Vahid Sharifi
PhD of Analytical chemistry, Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Mazandaran, Iran, vsharifi@umz.ac.ir
Neda Soltani
Professor of plant biology, Research Institute of Applied Science, ACECR, Tehran, Iran. Research Center of Environment and Sustainable Development, Tehran, Iran, soltani6@yahoo.com
Seyed Mohammad Alavi
B.Sc. of Microbiology, Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Mazandaran, Iran, mohammadalavi2003@yahoo.com

Abstract

Introduction: Green microalga *Chlamydomonas reinhardetii* is concerned as a model system to study algal physiology, morphology, genetics and biofuel production. The aim of this study was optimization of the growth and starch production conditions. With this respect, the effect of pH and light intensities was investigated in alga *Chlamydomonas reinhardetii.*

Materials and methods: 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.

Results: Regarding to the response surface curve, maximum growth rates and starch content were achieved at pH 7.4 and 8; and light intensity 7400 and 5300 lux respectively.

Discussion and conclusion: Results showed that light intensity and pH play an important role in starch productivity of *Chlamydomonas reinhardtii*. Moreover, it was found that the response surface methodology was useful for enhancing the starch production in the algae.

Key words: *Chlamydomonas reinhardetii*, Growth rate, Optimization of culture conditions, Response surface method, Starch

* Corresponding author
Received: May 9, 2015 / **Accepted:** December 30, 2015