مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۳، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱ (ص ۴۰۹- ۳۹۵)
(علمی پژوهشی)

Investigation of environmental factors affecting the production of Lipid, Protein, and Betacarotene in *Dunaliella salina* microalgae

Mohammad Reza Hamidi[1], Ahmad Mohamadi[2*], Hamid Mashhadi[3], Fahimeh Mahmod Nia[4]

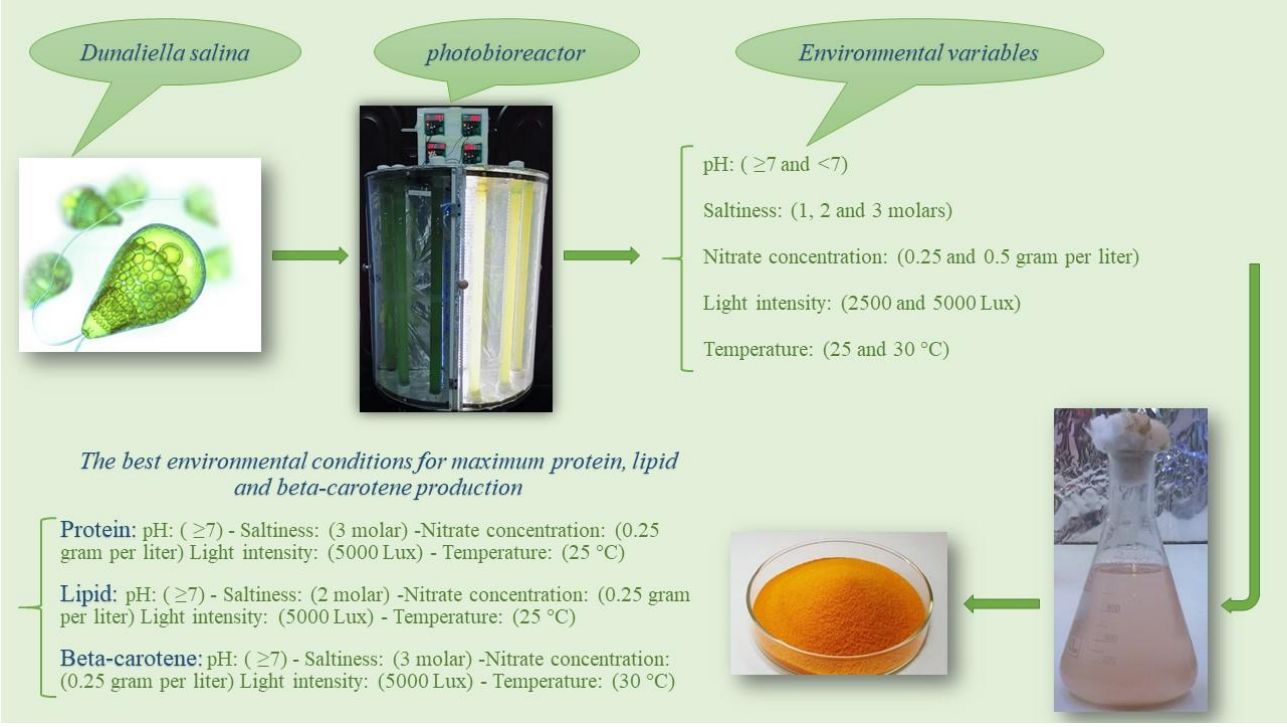
1. Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.

2. Corresponding Author, Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran. Email: A_mohamady@iau-arak.ac.ir

3. Department of Biosystem Mechanics, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.

4. Department of biology, Faculty of Science, Farhangian University, Tehran, Iran.

(Received: Nov. 30, 2021-Revised: Jan. 24, 2023- Accepted: Feb. 25, 2023)



Abstract: Microalgae can produce various products such as biofuel, proteins, and beta-carotene. Knowing the optimal conditions to produce these products is very important. In this research, the effect of environmental parameters on the production rate of each product in *Dunaliella salina* microalgae was investigated. saltiness (1, 2, and 3 M), pH above and below 7, nitrate concentrations of 0.25 and 0.5 g/L, light intensities of 2500 and 5000 lux, and temperature levels of 25 and 30 °C were studied. According to the results of this study, the highest cell density of algae was at 3 M salinity and pH higher than 7, nitrate concentration equal to 0.25 g/L, light intensity 5000 lux, and temperature 25°C. The same conditions of salinity 3 M, pH of more than 7, nitrate concentration of 0.25 M, light intensity of 5000 lux, and temperature of 25°C prevailed for the maximum production of microalgae biomass. Under these conditions, the highest amount of protein was produced in *Dunaliella salina* microalgae. But for lipid production, the optimal conditions were at a salinity of 2 M, pH more than 7, nitrate concentration of 0.25 g/L, light intensity of 5000 lux, and temperature of 25°C. Optimum production of betacarotene also occurred at 3 M salinity, pH more than 7, nitrate concentration 0.25 g/L, a light intensity of 5000 lux, and temperature of 30°C. By knowing these conditions, it is possible to achieve the maximum amount of production of products such as biofuel, protein, and betacarotene from *Dunaliella salina* microalgae.

Keywords: Microalgae, biofuel, light intensity, salinity.

بررسی پارامترهای محیطی تاثیر گذار بر تولید لیپید، پروتئین و بتاکاروتن در میکروجلبک دونالیلا سالینا

محمد رضا حمیدی[۱]، احمد محمدی[۲*]، حمیدمشهدی[۳]، فهیمه محمودنیا[۴]

۱. گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، واحد اراک دانشگاه آزاد اسلامی ، اراک، ایران .

۲. نویسنده مسئول، گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، واحد اراک دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران، ایمیل:A_mohamady@iau-arak.ac.ir

۳. گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، واحد اراک دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

۴. گروه بیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه فرهنگیان تهران، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۹- بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۹- تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۱۲/۶)

چکیده: ریزجلبک‌ها قادر هستند محصولات متنوعی نظیر سوخت زیستی، پروتئین ها و بتاکاروتن را تولید کنند. آگاهی از شرایط بهینه برای تولید این محصولات اهمیت بسیاری دارد. در این پژوهش تأثیر پارامترهای محیطی بر میزان تولید هر یک از محصولات در ریزجلبک دونالیلا سالینا بررسی گردید. مقادیر شوری ۱ ، ۲ و ۳ مولار، pH بالاتر و پایین تر از ۷، غلظت نیترات ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر، شدت تابش نور ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ لوکس و درجه حرارت ۲۵ و۳۰ درجه سلسیوس مورد مطالعه قرار گرفتند. طبق نتایج این مطالعه بالاترین تراکم سلولی جلبک در شوری ۳ مولار، pH بالاتر از ۷ ، غلظت نیترات برابر با ۰/۲۵، شدت تابش نور ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود. همین شرایط یعنی شوری ۳ مولار، pH بیش از ۷، غلظت نیترات ۰/۲۵، شدت تابش نور ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای حداکثر تولید زیست توده ریزجلبک حاکم بود. تحت همین شرایط بالاترین میزان پروتئین در ریزجلبک دونالیلا سالینا تولید گردید. اما جهت تولید لیپید شرایط بهینه شوری ۲ مولار، pH بیش از ۷، غلظت نیترات ۰/۲۵ گرم در لیتر، شدت تابش نور ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود. تولید بهینه بتاکاروتن نیز در شوری ۳ مولار، pH بیش از ۷، غلظت ۰/۲۵ نیترات، شدت تابش نور ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۳۰ درجه سلسیوس رخ داد. با آگاهی از این شرایط می توان با کمترین هزینه به بیشترین میزان تولید محصولاتی مانند سوخت زیستی، پروتئین و بتاکاروتن از ریزجلبک دونالیلا سالینا دست یافت.

واژه‌های کلیدی: ریزجلبک، سوخت زیستی، شدت تابش نور، شوری

مقدمه:

ریزجلبک‌ها سلول های یوکاریوت با قابلیت فتوسنتز هستند و می توانند ترکیبات ارزشمندی را تولید کنند. میکرو جلبک دونالیلا سالینا یک گونه تک سلولی یوکاریوت و بدون دیواره سلولی تمایز یافته است که شرایط معمول به رنگ سبز و در شرایط استرس به رنگ زرد متمایل به نارنجی دیده می شود (Pourhoseini et al., 2017). در شرایط استرس، ریزجلبک دونالیلا سالینا جهت حفاظت خود در برابر شدت نور بالا، بتاکاروتن و جهت مقابله با فشار اسمزی بیش ازحد گلیسرول تولید می کند (Borowitzka & Siva, 2007).

کاروتنوئیدها به عنوان گیرنده های فرعی نور عمل کرده و نورهای مرئی با طول موج ۴۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر را جذب می کنند. این ترکیبات نقش های حیاتی از جمله حفاظت سلول در برابر تشعشعات بالا، از بین بردن رادیکال های آزاد و غیره را دارا می باشند. ریزجلبک دونالیلا سالینا در شرایط تنش های شیمیایی نظیر فقر مواد غذایی، شوری زیاد و همچنین در تنش های حاصل از افزایش شدت نور، قادر به افزایش سنتز و تجمع کاروتنوئیدها تا ۴۲ پیکوگرم در سلول می باشد (Trenkenshu, 2005). بتاکاروتن یک رنگدانه ترپن دار است که درصد بالایی از کاروتنوئیدها را به خود اختصاص داده است و در مواردی نظیر رنگ های خوراکی، مواد غذایی، ساختمان ویتامین A، افزودنی در مواد آرایشی، ساختار مولتی ویتامین ها و در تولید مواد غذایی به کار می رود (Madadkar, 2011). برای تولید طبیعی بتاکاروتن منابع گوناگونی همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، گیاهان، میوه‌ها و ریزجلبک‌ها وجود دارند که در میان آنها گیاهان و ریزجلبک‌ها بازدهی بیشتری دارند (Ribeiro et al., 2011). ریزجلبک به دلیل سرعت رشد زیاد، داشتن گستره بیشتری از رنگدانه‌ها، بازده بالای فتوسنتز و نیاز به فضای کمتر، قابل کشت بودن در تمام طول سال، توانایی ادامه حیات در شرایط گوناگون همچون آب شور و شیرین، مورد توجه بیشتری است (Mulders et al., 2014). همچنین در پژوهش دیگری که بر روی استخراج بتاکاروتن از ریزجلبک دونالیلا سالینا انجام شد میزان بتاکاروتن بدست آمده با استفاده از کربن دی اکسید فوق بحرانی و حلال متانول به ترتیب ۱۱۵ و ۲۴۵ µg/g dry biomass گزارش شده است (Pour Hosseini et al., 2017).

از سوی دیگر ذخایر سوخت فسیلی زمین به سرعت در حال اتمام است و نیاز به منابع انرژی تجدید پذیر افزایش یافته است. بیودیزل اخیراً توجه خاصی را به خود به عنوان سوختی با آلودگی کم و تجدید پذیر جلب کرده است. در بین منابع تولید بیودیزل، جلبک به علت محتوای بالای چربی و رشد سریع جایگاه ویژه ای را کسب کرده است (Unpaprom et al., 2015). همچنین ایده استفاده از ریزجلبک‌ها در مقیاس زیاد اولین بار توسط دانشمندان آلمانی به منظور دستیابی به منابع پروتئین ارزان قیمت و جایگزینی آن با منابع پروتئین حیوانی مطرح شد (Soeder, 1986). بنابراین با توجه به اهمیتی که ریزجلبک ها درتولید سوخت های زیستی، پروتئین ها و بتاکاروتن دارند در این پژوهش شرایط زیست محیطی لازم برای تولید بهینه هر یک از این محصولات بررسی و تعیین می گردد تا با استفاده از نتایج این مطالعه محصولات مورد نیاز از ریزجلبک دونالیلا سالینا را به بالاترین میزان ممکن بدست آورد.

مواد و روش ها :

کشت اولیه:

ابتدا مقدار ۱۰۰میلی لیتر از ریزجلبک دونالیلا سالینا تهیه شده از شرکت آریان گستر در محیط کشت جانسون یک فتوبیوراکتور لوله ای تحت شدت نور ۲۵۰۰ لوکس، دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، غلظت نمک ۳ مولار و pH ۷ مورد کشت قرار گرفت. مقدار حجم زیست توده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. هوادهی از طریق پمپ اکواریوم مدل AQUA 9805 ساخت کشور چین انجام گرفت. پس

از ۵ روز مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از آن با تراکم ۱۰۴×۱۷۵۰۰ در میلی لیتر به هرکدام از محیط کشت های آماده در فتوبیوراکتور لوله ای عمودی (شکل ۱) منتقل گردید (Boonyaratpalin et al., 2001). حجم هر کدام از محیط‌های فتوبیوراکتور ۸۰۰ میلی لیتر بود. این دستگاه از نوع نیمه اتوماتیک بوده و اغلب شرایط محیطی (دما، شدت نور، میزان شوری و میزان pH) به صورت اتوماتیک کنترل می‌گردد.

فتوبیوراکتور ساخته شده از ۴ محیط جداگانه که تمام پارامترها از جمله میزان دما، شدت نور، مدت نوردهی و میزان هوادهی در هرکدام از محیط ها قابل کنترل هست، تشکیل‌شده است. در هر کدام از محیط ها از سه استوانه شیشه ای استفاده شد که به عنوان تکرار هر کدام از نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. هوادهی از طریق سنگ های انتهایی استوانه ها با استفاده از پمپ هوادهی با ترکیب مشخصی از دی‌اکسید کربن انجام گرفت. آزمایش ها در آزمایشگاه تخصصی میکرو جلبک دانشگاه آزاد اسلامی اراک انجام شد. آزمایش در قالب طرح فاکتوریل با استفاده از نرم افزار Design Expert V12 مورد بررسی قرار گرفت. شرایط زیست محیطی بکار رفته این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

شکل ۱- فتوبیوراکتور عمودی مورد استفاده در آزمایش

Figure 1- Vertical photobioreactor used in the experiment

جدول ۱- متغیرهای محیطی مورد استفاده در این مطالعه در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی

Table 1- Variables used in the current study under a full factorial design

غلظت نمک (مولار)	غلظت نیترات (گرم در لیتر)	شدت نور (لوکس)	دما (درجه سلسیوس)	pH	CO_2	طول دوره (روز)
۱	۰/۲۵	۲۵۰۰	۲۵	۷≥	٪۱۵	۱۵
۲	۰/۵۰	۵۰۰۰	۳۰	۷<		
۳						

با توجه به اینکه میزان pH با افزایش رشد میکرو جلبک و مواد غذایی داخل محیط کشت و دی اکسید کربن وارد شده به محیط دچار تغییر می‌گردد سعی گردید میزان این تغییر در حد رواداری یک واحد بیشتر نباشد. با توجه به تأثیر میزان نیترات در رشد ریزجلبک ها مقدار نیترات در محیط کشت های انتخابی مشخص گردید.

نمونه برداری و بررسی نحوه رشد:

بعد از انتقال ریزجلبک به فتوبیوراکتور، نمونه برداری به صورت روزانه انجام گردید و پارامترهای زیر دریک دوره ۱۵ روزه محاسبه، ثبت و بررسی گردید.

شمارش سلولی:

شمارش سلولی توسط لام نئوبار، با استفاده از روش Lavens & Sorgeloos (1996) به‌طور روزانه انجام گردید.

برای محاسبه نرخ رشد[1] و تکثیر سلولی از معادله زیر استفاده شد (Choonawala, 2007).

رابطه ۱- محاسبه نرخ رشد

$$SGR= Ln (mt_2/mt_1)/t_2-t_1; t_2>t_1$$

در این رابطه mt_1: تعداد سلول در زمان صفر، mt_2: تعداد سلول در زمان، t_1 و t_2 :زمان بر حسب روز است.

اندازه‌گیری کاروتنوئید :

به منظور تعیین کاروتنوئید ازهر نمونه به میزان ۵ میلی لیتر برداشته و جهت کاهش شوری ۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. سپس بوسیله دستگاه وکیوم مدل EDVARDS ساخت کشور انگلستان و کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون نمونه فیلتر شد. کاغذ صافی های حاوی نمونه در لوله آزمایش قرار داده و مقدار ۱۰ میلی لیتر استون ۰/۹درصد به هر کدام از لوله ها اضافه گردید. لوله ها توسط پارا فیلم پوشانده شد و در یک محیط کاملاً تاریک و خنک به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. نمونه ها با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/Vis 2100 PC ساخت کشور امریکا میزان کلروفیل را با استفاده از ۹ طیف نوری با طول موج های ۶۴۵،۶۳۰،۶۶۳ و ۷۵۰ نانومتر و میزان کاروتنوئید با استفاده از طیف نوری با طول موج ۴۵۰ نانومتر طیف سنجی شدند (Dere et al., 1998).

میزان زیست توده (وزن خشک):

از هر نمونه میزان ۱۴ میلی لیتر از محیط کشت به‌طور روزانه برداشت وپس از سانتریفیوژ جهت کاهش غلظت نمک با آب مقطر شسته شده و به مدت ۱۶ ساعت در داخل آون مدل HD ساخت کشور آلمان با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند (Ryckebosch, 2012). دقت دستگاه در حدود ۹۳ درصد بود که با محاسبه اختلاف تراکم سلول های اندازه گیری شده با لام نئوبار قبل و بعد از انجام سانتریفوژ به دست آمد.

استخراج پروتئین:

جهت استخراج پروتئین از ریزجلبک از روش لوری استفاده شد. معرف A از ترکیب ۱ میلی لیتر سولفات مس ، ۱ میلی لیتر سدیم پتاسیم تارتارات، ۴۹ میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال و ۴۹ میلی لیتر کربنات سدیم تهیه شدند. در زمان آزمایش ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۲/۵ میلی لیتر از معرف A مخلوط و ورتکس ساخت شرکت بهداد شد و ده دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول فولین رقیق شده به نسبت ۱ به ۱ با آب به هر نمونه اضافه و بلافاصله ورتکس شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور در طول موج ۷۲۴ نانومتر خوانده شد (Heo et al., 2005).

استخراج و اندازه گیری لیپید:

در این تحقیق استخراج با استفاده از دستگاه سوکسله مدل Soxtec 2050 ساخت کشور سوئیس انجام گردید. بدین منظور ۱۰ گرم از هر نمونه زیست توده خشک شده، به آرامی توسط هاون یکنواخت گردید و استخراج لیپید از آن توسط دستگاه سوکسله انجام شد. هر سیکل شامل جوشیدن به مدت ۲۵ دقیقه، استخراج لیپید به مدت ۴۰ دقیقه و بازیابی حلال به مدت ۱۵ دقیقه بود. استخراج تمامی نمونه‌ها بطور یکسان در سه مرحله انجام گردید. جهت استخراج از سه حلال متداول دی اتیل اتر، ان هگزان و ان پنتان با دمای نقطه جوش متفاوت و خلوص بالا استفاده گردید. برای حذف بقایای ریزجلبک، لیپید استخراج شده به وسیله فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد. هر یک از مراحل خشک کردن و استخراج لیپید با سه بار تکرار انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین گزارش شد. پس از تعیین مقدار لیپید، لیپید خشک شده در ۰/۴ میلی لیتر الکل ایزوپروپیل حل نموده و مقدار تری گلیسرید در لیپید اندازه گیری

1 Growth Rate (SGR)

گردید (Xin et al., 2010). جهت محاسبه درصد لیپید زیست توده فاز آلی جدا شده در یک ویال که از قبل وزن شده بود (W_1) ریخته شد و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در آون مدل HD ساخت کشور آلمان قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. پس از آن ویال ها دوباره وزن شدند (W_2) و میزان لیپید کل با اختلاف بین وزن اولیه و ثانویه (W_2-W_1) برحسب درصد محاسبه شد (Nigam et al., 2011).

آنالیز آماری:

در این پژوهش، داده های به‌دست‌آمده از میزان تراکم سلولی، زیست توده تولیدی، پروتئین، لیپید و کاروتنوئید تولیدی در یک طرح فاکتوریل با تکرارهای مساوی به‌صورت مقادیر میانگین محاسبه و اطلاعات و داده های به‌دست آمده در نرم‌افزار Excel 2016 وارد شد. همچنین برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار Design Expert V12 استفاده شد.

نتایج و بحث

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول-۲) تأثیر شوری، اسیدیته، نیترات، شدت تابش نور و دما بر تراکم سلولی ریزجلبک با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. همچنین اثر متقابل دو به دوی این عوامل به استثنای اثر متقابل شدت تابش نور و دما برتراکم سلولی با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. تأثیر عوامل شوری، اسیدیته، نیترات،شدت تابش نور و دما بر زیست توده جلبک با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. اثر متقابل دو به دوی این عوامل نیز به استثنای اثر متقابل شدت تابش نور و دما با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. اثر شوری، اسیدیته، نیترات، شدت تابش نور و دما بر میزان پروتئین تولیدی با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. تمامی اثرات متقابل دو به دو به استثنای اثر متقابل اسیدیته و نیترات، اثر متقابل نیترات و دما و اثر متقابل شدت تابش نور و دما بر تولید پروتئین با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. همچنین طبق نتایج جدول تجزیه واریانس تأثیر عوامل محیطی بر میزان لیپید تولید شده در جلبک دونالیلا سالینا مشاهده شد که اثر شوری، اسیدیته، نیترات، شدت تابش نور و دما و اثر متقابل دو به دوی این عوامل همگی با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود. تأثیر شوری، اسیدیته، نیترات، شدت تابش نور و دما و همچنین آثار متقابل دو به دوی آنها بر تولید بتاکاروتن با احتمال خطای ۱ درصد معنا دار بود.

اثر شرایط محیطی بر تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا :

در این تحقیق، بالاترین تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا در شوری ۳ مولار مشاهده گردید (شکل ۲). اما در مطالعه‌ای دیگری بهترین میزان شوری برای رشد جلبک دونالیلا سالینا در شوری یک مولار بود (Hashemi et al., 2019).

Mohammadkhani & Madadkar (2015) با ثابت در نظر گرفتن pH محیط به میزان ۷/۳ ، غلظت شوری مناسب برای بیشترین تعداد سلول را ۰/۵ و ۱ مولار اعلام کردند. بالاترین تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا در غلظت ۰/۲۵ نیترات مشاهده شد.

Ghorbani et al. (2018) تنش شدت نور بر نمونه های کشت مختلط دریاچه خزر و میکروجلبک خالص دونالیلا سالینا اعمال و چگونگی رشد، میزان کلروفیل تولید شده و تجمع بتاکاروتن را در گونه های مورد آزمایش مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش، شرایط عملیاتی آزمایش برای هر دو نمونه یکسان با pH ۷/۵ و میزان هم زدن ۱۶۰ دور در دقیقه بود. تنش نوری در شرایط عملیاتی یکسان و دمای ۲۶ تا ۲۸ درجه سلسیوس در روز ششم اعمال شد. با اعمال این تنش مقدار بتاکاروتن در میکروجلبک دونالیلا سالینا از مقدار اولیه ۵/۹ به مقدار پایانی ۵/۱۹ mol Beta-Carotene/g Protein و در میکروجلبک دریاچه خزر از مقدار اولیه ۷/۳ به مقدار پایانی ۷/۲۲ mol Beta-Carotene/g Protein رسید. شدت نور موثر بر تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا را ۱۵۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه بدست آوردند.

جدول۲- تجزیه واریانس تأثیر منابع تغییرات بر تیمارهای تحقیق

Table 2- Variance analysis of the effect of sources of changes on research treatments

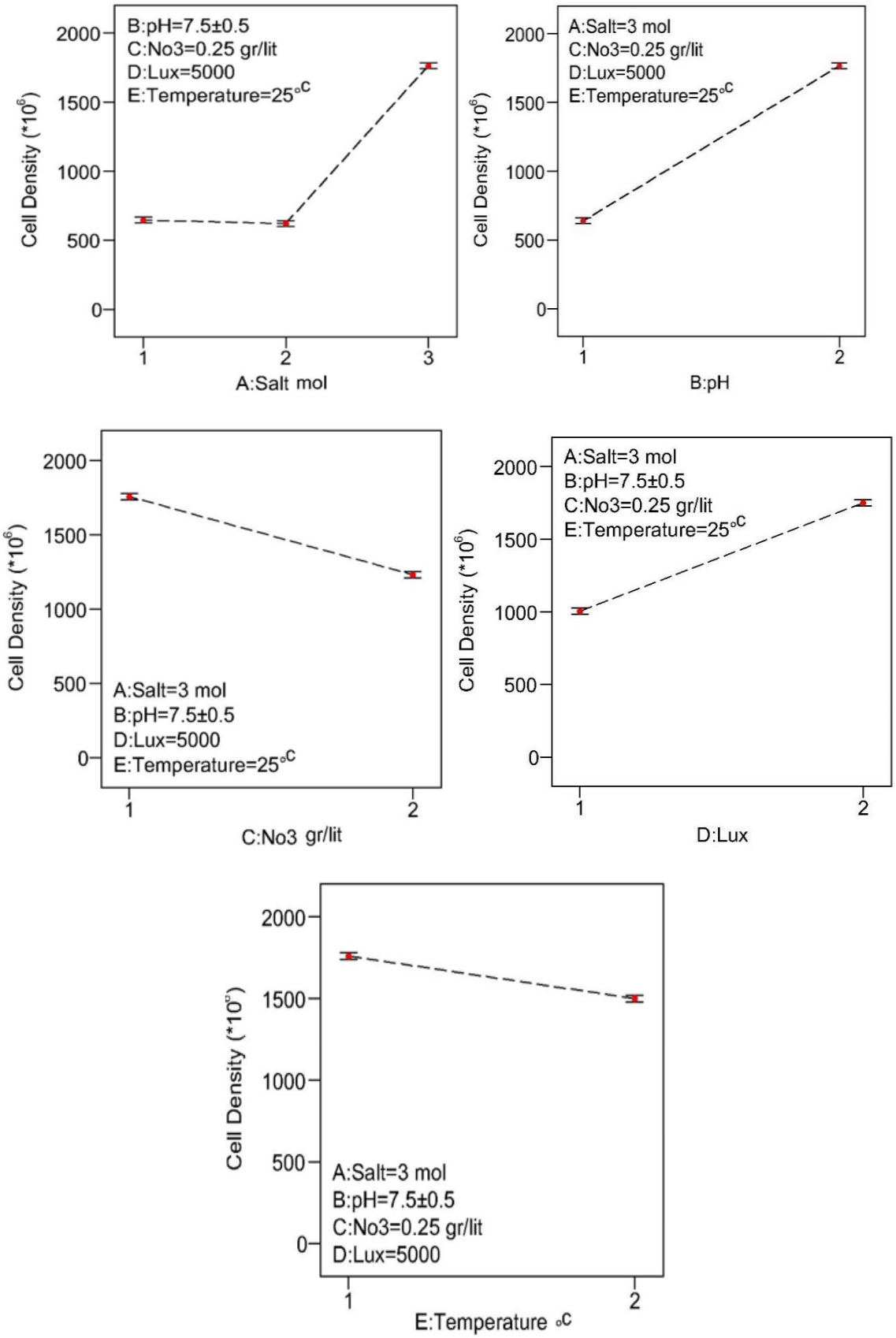
منابع تغییرات	درجه آزادی	تراکم سلولی	زیست توده	پروتئین	لیپید	بتاکاروتن
مدل	۳۶	۱/۴۸E+۰۰۵**	۴/۵۴E+۰۰۵**	۲۱/۱۵**	۱۲۱/۲۹**	۱۱۸/۶۲**
شوری	۲	۷/۸۰E+۰۰۵**	۲/۳۹E+۰۰۶**	۱۷۸۶/۴۴**	۱۷۹/۳۰**	۶۳۰/۰۵**
pH	۱	۱/۹۶E+۰۰۶**	۶/۰۲E+۰۰۶**	۲۹۵۶/۳۱**	۱۹۲۴/۰۷**	۱۳۹۱/۰۵**
نیترات	۱	۲/۱۵E+۰۰۵**	۶/۶۵E+۰۰۵**	۲۳/۶۶**	۸۲/۹۵**	۶۳/۰۲**
شدت تابش نور	۱	۲/۱۹E+۰۰۵**	۶/۷۸E+ ۰۰۵**	۵/۵۴**	۱۴۴۴/۳۱**	۷۰۲/۲۷**
دما	۱	۸۱۲۲۱/۸۸**	۲/۴۶E+۰۰۵**	۱۲۹/۰۴**	۸۳/۴۸**	۵۷/۲۰**
شوری - pH	۲	۲/۴۹E+۰۰۵**	۷/۶۷E+۰۰۵**	۵۰/۵۴**	۵۷/۹۸**	۱۹۲/۹۷**
شوری - نیترات	۲	۲۹۷۳۷/۱۷**	۹۰۱۸۴/۳۸**	۲/۵۳**	۳/۱۲**	۲/۵۶**
شوری – شدت تابش نور	۲	۲/۰۱E+۰۰۵**	۶/۱۶E+۰۰۵**	۵/۶۷**	۱۶/۰۹**	۷۲/۱۲**
شوری - دما	۲	۸۷۰۴**	۲۷۳۸۷/۴۲**	۱۵/۹۶**	۴/۲۷**	۶/۵۸**
pH- نیترات	۱	۲۲۵۶۳/۶۸**	۷۰۶۵۶/۰۵**	۰/۲۶ ns	۲/۳۹**	۳/۵۲**
pH- شدت تابش نور	۱	۵۱۴۶۳/۳۵**	۱/۶۰E+۰۰۵**	۴/۶۳**	۲۴۳/۴۵**	۱۳۴/۶۷**
pH- دما	۱	۱۳۹۷۷/۶۰**	۴۱۸۵۴/۶۴**	۲۲/۵۵**	۱۳/۷۶**	۹/۷۲**
نیترات – شدت تابش نور	۱	۶۱۳۹۷/۰۶**	۱/۸۶E+۰۰۵**	۱۲/۷۱**	۷/۴۴**	۲۶/۱۱**
نیترات - دما	۱	۴۸۹۰/۴۲**	۱۵۶۷۴/۶۴**	۱/۴۴ ns	۳/۹۱**	۲/۳۴**
شدت تابش نور - دما	۱	۱۶۱۸/۲۰ns	۵۳۸۴/۸۰ns	۰/۰۲ns	۹/۲۸**	۵/۳۳**
مقادیر باقیمانده	۱۱	۳۵۹/۷۲	۱۲۱۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۰۶۵	۰/۰۷۶
تعداد کل	۴۷					

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح یک درصد و پنج درصد

بیشترین رشد تراکم سلولی را در شدت نور ۱۵۰ میکرومول ثبت کردند. شکل ۲ نشان می دهد که با افزایش شدت نور میزان رشد و تراکم سلولی افزایش یافته است. علت این پدیده ممکن است بخاطر افزایش سرعت جذب مواد غذایی در این جلبک باشد (Ghezelbash et al., 2008). مناسب ترین دما برای تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا دمای ۲۵ درجه سلسیوس که همانند تحقیق انجام شده توسط Pourafrasiabi et al. (2013) است.

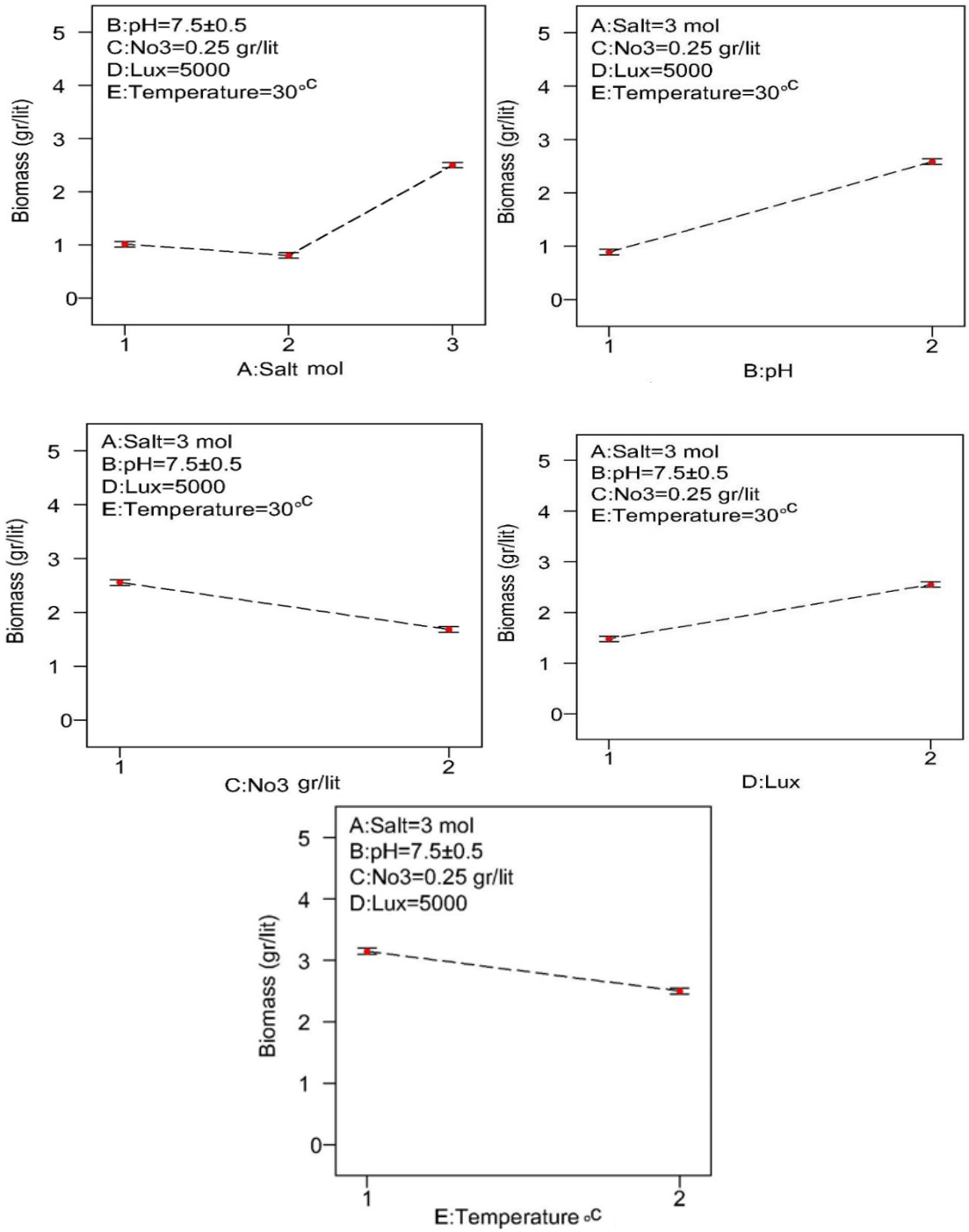
اثر شرایط محیطی بر زیست توده جلبک دونالیلا سالینا :

با توجه به تاثیرات معنادار پارامترهای محیطی بر میزان زیست توده تولید شده نتایج بدست آمده نشان داد که در جلبک دونالیلا سالینا میزان زیست توده جلبک مانند تراکم سلولی تابع شرایط محیطی بوده و عواملی مانند شوری، درجه حرارت و شدت نور می تواند بر میزان زیست توده تولیدی تأثیر بسزایی داشته باشد (Balat, 2010). نتایج بدست آمده نشان می دهد که بیشترین میزان زیست توده برای جلبک دونالیلا سالینا در شوری سه مولار بدست آمده است (قسمت A شکل۲) که این نتیجه با تحقیق انجام شده توسط Hashemi et al. (2019) که مناسب ترین غلظت شوری برای افزایش زیست توده تولیدی در جلبک سالینا را یک مولار معرفی کرده اند متفاوت است. علت این تفاوت شاید دراثرات متقابل پارامترهای دیگری مانند دما و اسیدیته محیط باشد که در این تحقیق مقدار pH بالای ۷ اسیدیته مناسب و غلظت نیترات ۰/۲۵ بدست آمده است. بالاترین میزان تولید زیست توده در شدت تابش نور برابر با ۵۰۰۰ لوکس است (قسمت D شکل۳). بالاترین میزان زیست توده جلبک سالینا در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده می‌شود (قسمت E شکل۳) . در شدت بالاتر نور میزان رشد سلولی افزایش یافته و جذب مواد مغذی از محیط کشت در زمان کمتری اتفاق می افتد و این باعث افزایش کارایی فتوسنتز شده و به میزان زیست توده افزوده می شود (Renaud et al., 2002).



شکل ۲- تأثیر عوامل محیطی مختلف (**A: Salt ، B: pH ، C: Nitrate ، D: Lux** و**E: Temperature**) بر تراکم سلولی جلبک دونالیلا سالینا

Figure 2- The effect of different environmental factors (A: Salt, B: pH, C: Nitrate, D: Lux and E: Temperature) on cell density of *Dunaliella salina* algae



شکل۳- تأثیر عوامل محیطی مختلف(A: Salt ، B: pH ، C: Nitrate ، D: Lux وE: Temperature) بر میزان زیست توده جلبک دونالیلا سالینا

Figure 3- The effect of different environmental factors (A: Salt, B: pH, C: Nitrate, D: Lux and E: Temperature) on biomass of *Dunaliella salina* algae

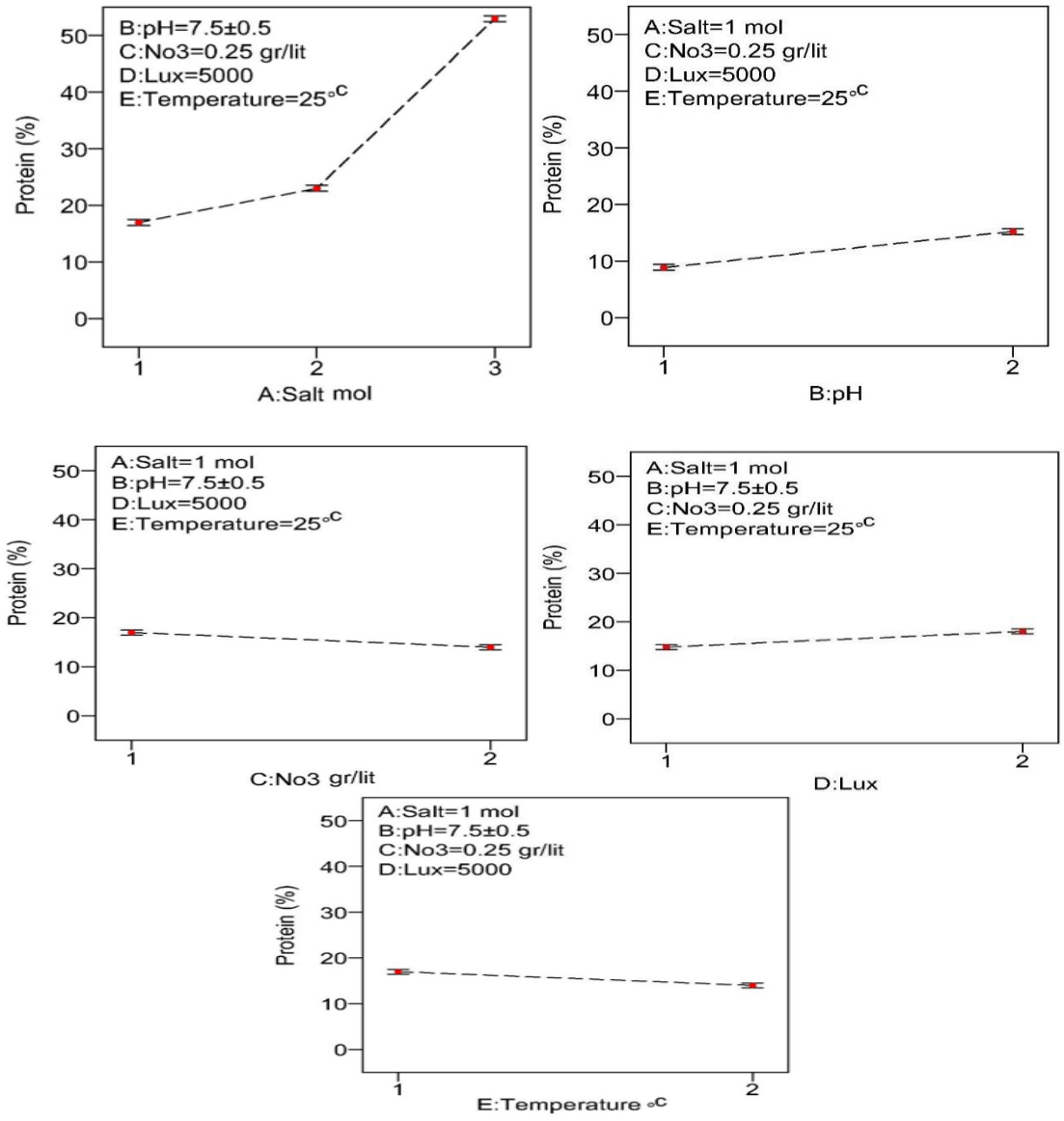
اثر شرایط محیطی بر میزان پروتئین جلبک دونالیلا سالینا :

بررسی آماری نشان دهنده اختلاف معنی داری بین محتوی پروتئینی در شرایط محیطی مختلف می باشد(جدول ۲).

همانگونه که در قسمت A شکل ۴ مشاهده می‌شود، بالاترین میزان پروتئین در شوری سه مولار بدست آمده و با افزایش میزان شوری مقدار پروتئین افزایش می یابد. نتیجه تحقیق چن[1] وهمکارش این

1 Chen, H. and Jiang, J. 2009

نتیجه را تأیید می کند (Chen & Jiang., 2009)درخصوص تأثیر میزان اسیدیته محیط نتایج نشان می دهد که بالاترین میزان پروتئین مربوط به pH بیشتر از ۷ می باشد (قسمت B شکل۴). درحالی که گارسیا[1]در تحقیق خود به تولید پروتئین در pH ۸ اشاره نموده است (Garcia et al., 2007). درخصوص میزان غلظت نیترات و تأثیر آن بر میزان پروتئین مشاهده می گردد که بالاترین میزان پروتئین تولیدی مربوط به غلظت نیترات برابر با ۰/۲۵ گرم در لیتر می باشد(قسمت C شکل۴). سطوح بالای نیتروژن در محیط کشت باعث افزایش غلظت پروتئین در سلول ریزجلبک ها می شود (Lourenco, 2006). همچنین درخصوص شدت تابش نور و دمای محیط، بالاترین میزان پروتئین در۵۰۰۰ لوکس و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تولید شده است(قسمت D شکل۴).



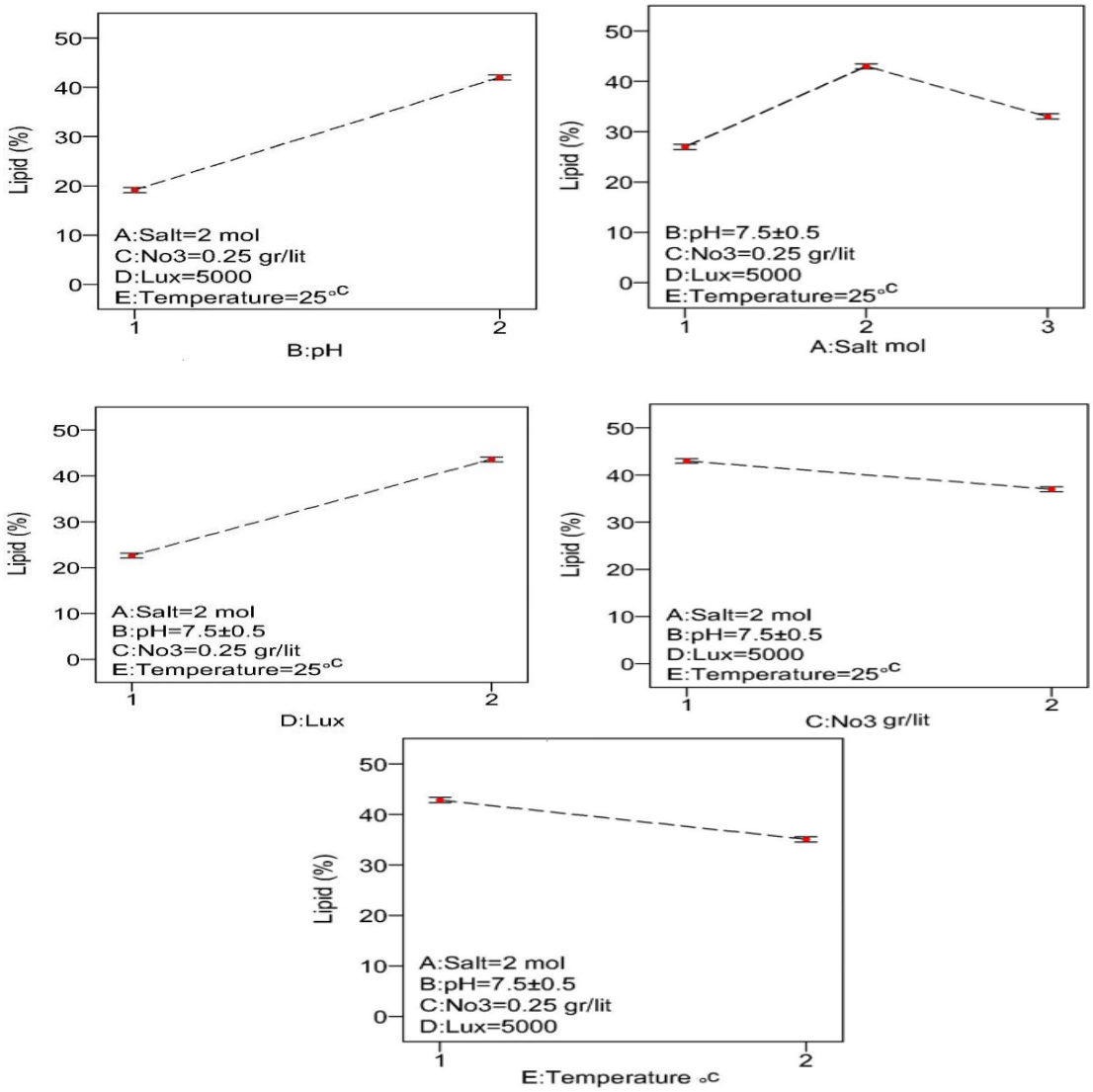
شکل۴- تأثیر عوامل محیطی مختلف(**A:Salt ، B:pH ، C:Nitrate ، D:Lux وE:Temperature**) بر میزان پروتئین جلبک دونالیلا سالینا

Figure 4- The effect of different environmental factors (A: Salt, B: pH C: Nitrate, D: Lux and E: Temperature) on the amount of *Dunaliella salina* algae protein

1 Garcia

اثر شرایط محیطی بر میزان لیپید جلبک دونالیلا سالینا :

با توجه به معنادار بودن اثرات شرایط محیطی بر میزان لیپید جلبک دونالیلا سالینا میزان بهینه این پارامترها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت مشخص نمودن بهینه ترین میزان شدت نور میزان دمای ۲۵درجه سلسیوس، میزان شوری ۲ مولار و pH بیشتر از ۷ درنظر گرفته شد و در این شرایط بهترین میزان شدت نور ۵۰۰۰ لوکس به دست آمد. نتیجه بدست آمده با نتیجه تحقیق در مورد تأثیر دما بر میزان تولید لیپید در میکروجلبک دونالیلا سالینا با ثابت نگاه داشتن شدت تابش نور برابر با ۵۰۰۰ لوکس، شوری برابر با ۲ مولار و pH بیشتر از ۷ مشاهده می شود که با افزایش دما از ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس بر تولید لیپید افزوده و پس از این دما با افزایش دما میزان تولید لیپید کاهش می‌یاد. بیشترین لیپید تولید شده در دمای ۲۵ درجه مشاهده می شود (قسمت E شکل ۵).



شکل۵- تأثیر عوامل محیطی مختلف (A:Salt ، B:pH ، C:Nitrate ، D:Lux وE:Temperature) بر میزان لیپید جلبک دونالیلا سالینا

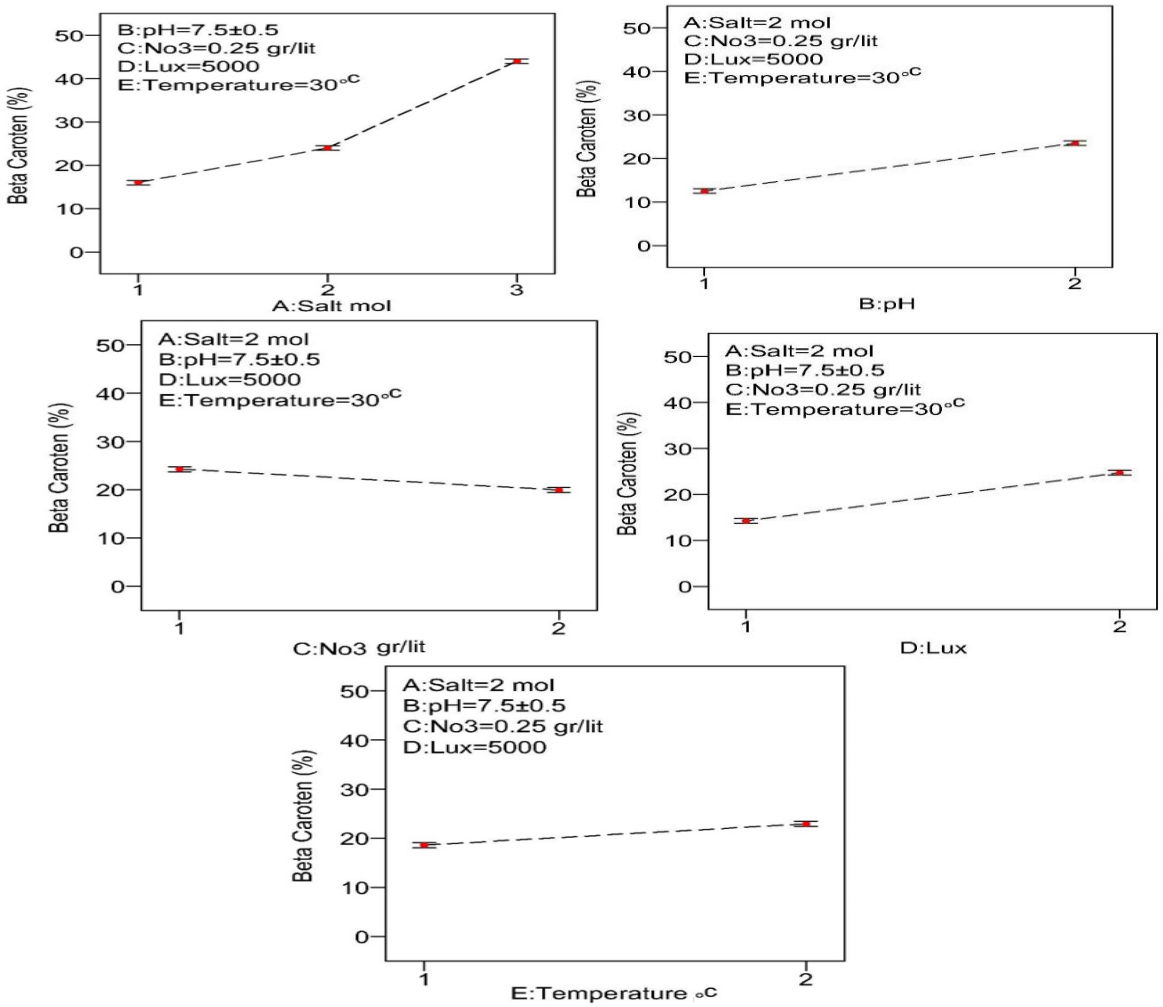
Figure 5- The effect of different environmental factors (A: Salt, B: pH, C: Nitrate, D: Lux and E: Temperature) on the amount of lipids in *Dunaliella salina* algae

درخصوص میزان تولید لیپید در شوری های مختلف نتایج نشان می دهد که بیشترین میزان لیپید با درنظر گفتن دمای ۲۵ درجه سلسیوس، میزان pH محیط بیشتر از ۷ و شدت تابش ۵۰۰۰ لوکس در شوری

۲ مولار بدست آمده و با افزایش شوری این میزان کاهش می یابد (قسمت A شکل۵). بیشترین میزان لیپید در اسیدیته بالاتر از ۷ بدست آمد (قسمت B شکل ۵). بالاترین میزان تولید لیپید در غلظت نیترات برابر با ۰/۲۵ بود (قسمت C شکل۵). بررسی اثر شدت تابش نور نشان داد که بالاترین میزان تولید لیپید در شدت تابش نور برابر با ۵۰۰۰ لوکس است (قسمت D شکل۵).

اثر شرایط محیطی بر میزان بتاکاروتن جلبک سالینا :

فاکتورهای مختلفی از جمله نور، شوری، دما، pH و مقدار ماده غذایی مخصوصاً نیترات در رشد جلبک ها تأثیر به سزایی دارند. دقت در تنظیم فاکتورهای فوق میتواند کمک شایانی به کشت بهتر آنها بنماید. نور و شوری از عوامل مهمی هستند که نوسان مقدارشان در میزان کلروفیل، کاروتنوئید و رشد سلول تأثیرگذار است (Salmaninejad, 2016). یکی از مهمترین فاکتورهای مورد نظر در تولید ریزجلبک ها تولید کاروتنوئید و به تبع بتاکاروتن می باشد. بتا کاروتن کاروتنوئید غالب در بازار است و سایر کاروتنوئیدها مانند لیکوپن، آستاگزانتین، کانتاکسانتین و لوتئین سهم بازار بسیار کمتری دارند. کاروتن به عنوان یک رنگدانه طبیعی در غذا و برای میگو استفاده می شود (Boonyaratpalin et al., 2001). مهم ترین منبع تولید کننده بتاکاروتن جلبک سبز تک سلولی دونالیلا سالینا است که ایجاد کاروتنوئید درکلروپلاست آلگ و تحت شرایط استرس صورت می گیرد (Tavallaei et al., 2011).



شکل۶- تأثیر عوامل محیطی مختلف (A: Salt ، B: pH ، C: Nitrate ،D: Lux وE: Temperature) بر میزان بتاکاروتن جلبک دونالیلا سالینا

Figure 6- The effect of different environmental factors (A: Salt, B: pH, C: Nitrate, D: Lux and E: Temperature) on the amount of beta-carotene in *Dunaliella salina* algae

نتایج بدست آمده نشان می دهد که بالاترین میزان بتاکاروتن در شوری برابر با ۳ مولار مشاهده شد (قسمت A شکل۶). این مقدار مشابه نتیجه بدست آمده در مطالعه Hashemi et al. (2019) که در آن بالاترین مقدار بتاکاروتن تولیدی از این جلبک در غلظت ۳/۵ مولار به دست آمد. Zarandi Miandooab et al. (2015) بالاترین میزان تولید بتاکاروتن را در شوری ۲ مولار ثبت کردند. همچنین بیشترین میزان تولید بتاکاروتن در اسیدیته بالاتر از ۷ بود. Tavallaei et al. (2010) بیشترین تولید بتاکاروتن را در pH برابر با ۸/۵ ثبت نمودند. بالاترین میزان بتاکاروتن در غلظت برابر با ۰/۲۵گرم در لیتر نیترات مشاهده شد (قسمت C شکل۶). شدت تابش نور ۵۰۰۰ لوکس بالاترین میزان تولید بتاکاروتن را به همراه دارد (قسمت D شکل۶). در مطالعه انجام شده توسط Zarandi Miandooab et al. (2015) بیشترین میزان بتاکاروتن در تیمار با شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بدست آمد و بالاترین میزان تولید بتاکاروتن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود (قسمت E شکل۶). در تحقیقی که توسط Dorinde et al. (2010) انجام شد از دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تولید بتاکاروتن از جلبک دونالیلا سالینا استفاده گردید. Soroush (2016) نیز از دمای ۲۸ درجه سلسیوس در تولید بتاکاروتن از جلبک دونالیلا سالینا استفاده نمود.

نتیجه گیری کلی:

بر طبق نتایج این مطالعه در شرایط محیطی شوری ۳ مولار، pH بیش از ۷، غلظت ۰/۲۵گرم در لیتر نیترات، شدت تابش نور برابر با ۵۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، بالاترین تراکم سلولی، بالاترین مقدار زیست توده و بالاترین میزان پروتئین بدست می‌آید. اما برای تولید لیپید تنها باید شوری در حد ۲ مولار باشد و سایر شرایط یکسان است. برای تولید حداکثر بتاکاروتن نیز تنها باید دما به ۳۰ درجه سلسیوس برسد. با نتایج بدست آمده در این مطالعه با کمترین هزینه می توان بیشترین تولید محصولات را از ریزجلبک دونالیلا سالینا داشت. با توجه به تفاوت مشاهده شده در تأثیرگذاری پارامترهای محیطی(دما، نور، اسیدیته محیط،شوری و میزان نیترات) در دو بخش تولید زیست توده و ماده مؤثره (لیپید، بتاکاروتن و پروتئین) به نظر می رسد که با اعمال شرایط مناسب جهت تولید زیست توده با حجم بالا امکان تولید حداکثری در بخش لیپید، بتاکاروتن و پروتئین بوجود نیاید. زیرا افزایش بتاکاروتن و لیپید مستلزم افزایش شوک از طریق اعمال دمای بالا میزان شوری زیاد و شدت لوکس بالا می باشد درصورتی که با اعمال این پارامترها میزان تولید زیست توده کاهش می یابد. لذا می توان با طراحی و ساخت فتوبیوراکتور دو فازی و تقسیم دوره رشد لگاریتمی به دو مرحله (مرحله اول اعمال پارامترهای مناسب جهت تولید حداکثری زیست توده و مرحله دوم اعمال تنش های مورد نیاز جهت تولید حداکثری لیپید و بتاکاروتن) این امکان را فراهم ساخت تا میزان عملکرد کیفی ریزجلبک تولید شده را افزایش داد.

سپاسگزاری:

از ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک و همچنین مدیر محترم مرکز تحقیقات علوم گیاهی کاربردی جهت هماهنگی های لازم برای استفاده از امکانات بخش زیست فناوری در مراحل مختلف تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارم.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Balat, H. (2010). Prospects of biofuel for a sustainable energy future: a critical assessment. *Energy, Education, Science and Technology*, 24(2), 85-111.

Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G. & Schlipalius, L.E. (2001). Effects

of ß-carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of Penaeus monodon. *Aquaculture Research*, 32, 182-190.

Borowitzka, M. & Siva, C. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (*Chlorophyta, Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567-590.

Chen, H. & Jiang, J. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *The Journal of Cellular Physiology*, 219, 251-258.

Choonawala, B. (2007). *Spirulina production in brine effluent from cooling towers*. Ph. D. dissertation, Durban University of Technology.

Dere, S., Gunes, T. & Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric Determination of Chlorophyll-A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Botany*, 22(1), 13-17.

Dorinde, M., Kleinegris, M., Janssen, M., Brandenburg, W.A. & Wijffels, R.H. (2010). The selectivity of milking of *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 12, 14-23.

Garcia, F., Freile-Pelegrin, Y. & Robledo, D. (2007). Physiological characterization of *Dunaliella sp. (Chlorophyta Volvocales)* from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*. 98(7), 1359-1365.

Ghezelbash, F., Farboodnia, T., Heidari, R. & Agh, N. (2008). Biochemical Effects of Different Salinities and Luminance on Green Microalgae *Tetraselmis chuii*. *Research Journal of Biological Sciences*, 3(2), 217-221.

Ghorbani, A., Hosseini, M. & Ebrahimi, S. (2018). Investigation of Light Stress Effect on Beta-Carotene Storage in Pure and Mixed Cultures of Microalgae. *Nashrieh Shimi va Mohandesi Shimi Iran*, 37(2), 221-228. (In Farsi)

Hashemi, S. A., Pajoum Shariati, F., Delavari Amrei, H. & Heydarinasab, A. (2019). Growth Pattern and β-Carotene Production of *Dunaliella salina* Cells in Different Salinities. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 16(4), 45-50. (In Farsi)

Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K.W. & Jeon, Y. J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 96(14), 1613-1623.

Lavens, P. & Sorgeloos, P. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. *FAO* Fisheries Technical Paper No. 361, from https://www.fao.org/3/w3732e/w3732e.pdf

Lourenço, S. O. (2006). Rima (Ed), Cultivation of marine microalgae – principles and applications. (SP. 588p)

Madadkar Haghjou, M. (2011). Induction of Paraquat Tolerance in *Dunaliella* by Using Some Pretreatments. *Iranian Journal of Plant Biology*, 10(3), 71-86. (In Farsi)

Mohammad Khani, R. & Madadkar Haghjou, M. (2015). Evaluation of growth rate, protein content and some physiological characteristics from two salt water *phytoplanktonic* species, microalga *Dunaliella*, under different environmental conditions. *Journal of Marine Science and Technology*, 14(2), 25-42. (In Farsi)

Mulders, K.J., Lamers, P.P., Martens, D.L. & Wijffels, R.H. (2014). Phototrophic Pigment Production with Microalgae Biological Constraints and Opportunities. *Journal of Phycology*, 50(2), 229-242.

Nigam, S., Prakash, M. & Sharma, R. (2011). Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3) 124-129.

Pourafrasiabi, M., Ramezanpour, Z., Imanpour Namin, J. & Sadeghi Rad, M. (2013). Effect of temperature and light intensity on cell concentration and growth rate of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Fisheries Science and Technology* ,2(1), 13-23. (In Farsi)

Pour Hosseini, R., Tavakoli, O. & Sarrafzadeh, M. (2017). Experimental optimization of SC CO2 extraction of carotenoids from *Dunaliella salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 121, 89-95.

Renaud, S. M., Thinh, L., Lambrinidis, G. & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in

batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195- 214.

Ribeiro, F. B., Lanna, E. A. T., Bomfim, M. A. D., Donzele, J. L., Quadros, M. & Cunha, P. S. L. (2011). True and apparent digestibility of protein and amino acids of feed in Nile tilapia. *Brazilian Journal of Animal Science*, 40 (5), 939-946.

Ryckebosch, E., Muylaert, K. & Foubert, I. (2012). Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 189-198.

Salmaninejad, M. (2016). Effect of culture mediums and light intensity on growth and carotenoides of *Dunaliella salina* in Urmia Lake. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 28(4), 771-783. (In Farsi)

Soeder, C. J. (1986). A historical outline of applied algology. In Handbook of Microalgal Mass Culture; Richmond, A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL. pp. 25-41

Soroush, S. (2016). Investigation on Production of the Beta-Carotene Biopolymer from Dunaliella Salina Algae in Saline Water of the Urmia Lake. M.Sc. thesis of Polymer engineering. Maragheh University. (In Farsi)

Tavallaei, S., Mazaheri Asadi, M. & Rostami, K.H. (2011). The cultivation of *Dunaliella salina* algae and production of carotenoids from it, a step towards stable development. In: Proceeding of *Second National Conference on Agriculture and Sustainable Development (Opportunities and Challenges Ahead)*, 2 March., Shiraz Islamic Azad University, Shiraz, Iran, pp.1-7. (In Farsi)

Trenkenshu, R.P. (2005). Simplest models of microalgae growth, 2 queasy continuous culture, *Ecologia moray*, 67, 98-110.

Unpaprom, Y., Tipnee, S. & Ramaraj, R. (2015). Biodiesel from green alga *Scenedesmus acuminatus*. *International Journal of Sustainable and Green Energy*. Special Issue: Renewable Energy Applications in the Agricultural Field and Natural Resource Technology, 4(1), 1-6.

Xin, L., Hong Ying, H., Jia, Y. & Yin Hu, W. (2010). Enhancement effect of ethyl-2-methyl acetoacetate on triacylglycerol's production by a freshwater microalga, *Scenedesmus sp*. LX1. *Bioresource Technology*, 101(24), 9819-9821.

Zarandi Miandooab, L., Bagherie Najar, M., Hejazi, M. & Chaparzadeh, N. (2015). Expression analysis of *Dunaliella salina* key genes involved in β-carotene biosynthesis under various salinity and light conditions. *Journal of Plant Process and Function*, 4(12), 85-93. (In Farsi)