



**بهینه سازی رشد و تولید پروتئین در ریز جلبک *Chlorella vulgaris* با استفاده از رویه سطح پاسخ آریا وزیرزاده و کیانوش جعفری فرد**

**چکیده**

هدف این مطالعه بهینه سازی شرایط رشد و تولید پروتئین در ریز جلبک *C. vulgaris* در شرایط متفاوت محیطی و تغذیه‌ای با غلظت اولیه‌ی نیترات (۱۰۸۰-۳۲۴۰ میلی‌گرم بر لیتر)، غلظت اولیه‌ی فسفات (۶۰-۲۰ میلی‌گرم بر لیتر)، دوره‌ی نوری (۸-۲۴ ساعت روشنایی) و طول دوره‌ی پرورش (۵-۱۵ روز) با استفاده از رویه سطح پاسخ بود. بطور کلی بیشترین میزان رشد و پروتئین جلبک کلرلا در کمینه غلظت نیترات، بیشینه غلظت فسفات، دوره نوری ۱۷ ساعت و زمان ۱۱ روز بدست آمد. از میان متغیرهای مختلف ارزیابی شده برهم کنش دوره نوری و زمان بر پاسخ های تعداد ریزجلبک و مقدار پروتئین معنی دار بود. شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر رشد و پروتئین نیز در این مطالعه ارائه شده است.

**مواد و روش ها**

طراحی این آزمایش با استفاده از طرح آزمایش رویه‌ی سطح پاسخ (RSM) و روش طراحی مرکب مرکزی صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آمون واریانس داده‌ها برای اعتبار سنجی مدل‌های پیشنهادی انجام شد. تغییرهای اصلی مورد مطالعه در این آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است (Metting, 1996).

**جدول ۱: متغیرهای اصلی موردنظر و دامنه و سطوح آن‌ها جهت بررسی اثر آن‌ها بر ریز جلبک *C. vulgaris***

متغیر	واحد	دامنه و سطوح
غلظت اولیه‌ی نیترات	میلی‌گرم/ لیتر	+۱ ۳۲۴۰، ۰ ۲۱۶۰، -۱ ۱۰۸۰
غلظت اولیه‌ی فسفات	میلی‌گرم/ لیتر	۶۰ ۴۰، ۲۰
دوره‌ی نوری	ساعت	۲۴ ۱۶، ۸
زمان	روز	۱۵ ۱۰، ۵

شمارش سلول‌ها به دو روش لام هموسایتومتر و کدورت سنجی انجام شد (Buapet et al., 2008). استخراج پروتئین کل طبق روش بردفورد انجام شد (Baiee and Selman, 2016). جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر، در مقابل بلانک (۱/۵ میلی‌لیتر سود + ۶ میلی‌لیتر معرف بردافورد) قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی، میزان پروتئین کل نمونه‌ها بر حسب میکروگرم بر سلول محاسبه گردید.

**نتایج**

با افزایش غلظت اولیه‌ی نیترات تا ۲۱۶۰ میلی‌گرم بر لیتر، تعداد سلول ریز جلبک کاهش می‌یابد، اما در ادامه با افزایش غلظت اولیه‌ی نیترات تعداد سلول ریز جلبک افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین تعداد سلول زمانی است که غلظت اولیه‌ی نیترات در کمترین مقدار باشد. با افزایش غلظت اولیه‌ی فسفات، تعداد سلول ریز جلبک با یک شیب آرام افزایش یافته به طوری که بیشترین میزان تعداد سلول زمانی است که غلظت فسفات در حد بیشینه باشد. با افزایش دوره‌ی نوری تا حدود ۱۷ ساعت، تعداد سلول ریز جلبک افزایش می‌یابد، اما در ادامه با افزایش دوره‌ی نوری از تعداد آن کاسته می‌شود. با افزایش روزهای آزمایش تا روز ۱۱ تعداد سلول ریز جلبک افزایش یافته، اما پس از آن تا روز ۱۵ مقدار این شاخص کاهش می‌یابد. برهم کنش سطوح مختلف دوره‌ی نوری و زمان بر تعداد سلول ریز جلبک معنی‌دار بوده است که نتیجه‌ی آن به صورت سه بعدی در شکل (۲-۵) آورده شده است. در این شکل همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش دوره‌ی نوری تا حدود ۱۷ ساعت و طول دوره‌ی پرورش تا حدود ۱۱ روز تعداد سلول ریز جلبک افزایش و در ادامه کاهش یافته است. بیشینه‌ی تعداد سلول ریز جلبک در شرایطی به دست آمد که غلظت اولیه‌ی نیترات (۱۰۸۰/۶۹ میلی‌گرم بر لیتر)، غلظت اولیه‌ی فسفات (۶۰ میلی‌گرم بر لیتر)، دوره‌ی نوری



(۱۷/۵۸ ساعت) و زمان (۱۱/۱۸ روز) بودند. در این شرایط بیشینه‌ی تعداد سلول ریز جلبک حدود ۱۹۳ میلیون در میلی‌لیتر پیش‌بینی گردید (جدول ۲).

جدول ۲: بهترین سطوح متغیرهای اصلی فرایند برای دستیابی به سطح بیشینه‌ی تعداد سلول و میزان پروتئین در ریز جلبک *C. vulgaris*

فاکتور پاسخ	غلظت اولیه‌ی نیترات (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت اولیه‌ی فسفات (میلی‌گرم بر لیتر)	دوره‌ی نوری (ساعت)	زمان (روز)	میزان پاسخ	تابع مطلوبیت
تعداد سلول (میلیون در میلی لیتر)	۱۰۸۰/۶۹	۶۰/۰۰	۱۷/۵۸	۱۱/۱۸	۱۹۳/۵۰۹	۰/۹۶۴
پروتئین (پیکوگرم بر سلول)	۲۹۵۰/۱۷	۴۰/۱۰	۱۶/۹۸	۱۱/۳۱	۵/۶۸	۱/۰

با افزایش غلظت اولیه‌ی نیترات تا حدود ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان پروتئین کل کاهش یافته اما پس از آن با افزایش غلظت نیترات افزایش می‌یابد، به طوری که بیشینه‌ی میزان پروتئین کل زمانی است که غلظت نیترات در حد بیشینه باشد. با افزایش غلظت اولیه‌ی فسفات از ۲۰ تا حدود ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان پروتئین کل ثابت بوده اما پس از آن افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین میزان پروتئین کل زمانی است که غلظت اولیه‌ی فسفات در حد بیشینه باشد. با افزایش دوره‌ی نوری تا حدود ۱۷ ساعت، میزان پروتئین کل افزایش اما پس از آن کاهش می‌یابد. با افزایش روزهای آزمایش تا روز ۱۱، میزان پروتئین کل افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد. بیشینه‌ی میزان پروتئین کل در شرایطی به دست آمد که غلظت اولیه‌ی نیترات (۲۹۵۰/۱۷ میلی‌گرم بر لیتر)، غلظت اولیه‌ی فسفات (۴۰/۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، دوره‌ی نوری (۱۶/۹۸ ساعت) و زمان (۱۱/۳۱ روز) بودند. در این شرایط بیشینه‌ی میزان پروتئین کل ۵/۶۸ پیکوگرم بر سلول پیش‌بینی گردید (جدول ۲).

سپاسگزاری

هزینه مالی این پژوهش توسط دانشگاه شیراز تامین شده است.

منابع

- Baiee, M. A., & Salman, J. M. (2016). Effect of phosphorus concentration and light intensity on protein content of microalga *Chlorella vulgaris*. *Mesopotamia Environmental*, 2(2), 75-86.
- Buapet, P., Hiranpan, R., Ritchie, R. J., & Prathep, A. (2008). Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat. *Science Asia*, 34, 245-252.
- Metting Jr, F. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5-6), 477-489.