



## کشت میکسوتروف ریز جلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*)

### تحت استرس نیتروژن به منظور تولید روغن خوراکی

امیر رضا طاهباز<sup>۱</sup>، محمدعلی نعمت‌اللهی<sup>۲\*</sup>، سید ولی حسینی<sup>۳</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۲

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

#### چکیده

چندین سال است که ریزجلبک‌ها نوید بخش تولید پایدار و مقرون به صرفه خوراک، سوخت و مواد شیمیایی شناخته شده‌اند. بسیاری از گونه‌های جلبکی لیپیدها را به صورت تری آسیل گلیسرول با ترکیبات اسیده‌ای چرب مشابه روغن‌های گیاهی (TAG) تولید می‌کنند. بنابراین ریزجلبک‌ها برای تولید پایدار روغن‌های خوراکی طبیعی گزینه مناسبی هستند. در این تحقیق به بررسی اثر کشت میکسوتروف و شوک نیتروژنی بر روی وزن خشک، مقدار چربی و پروفایل اسیده‌ای چرب ریزجلبک کلرلا ولگاریس پرداخته شد. در این تحقیق از محیط کشت BBM و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای کشت ریزجلبک‌ها استفاده شد. شاخص‌های شمارش سلولی، نیترات، pH، وزن خشک، وزن چربی، درصد چربی و پروفایل اسیده‌ای چرب اندازه‌گیری شدند. نتایج حاکی از معنی‌داری کشت میکسوتروف و شوک نیتروژنی بر مقدار زیستوده و مقدار چربی بود ( $P < 0.05$ ). بر طبق این نتایج مشخص شد برای تولید وزن خشک، کشت میکسوتروف گلوکز ۱۰۰ در صد نیترات محیط کشت BBM با  $916/66 \pm 35/11$  میلی‌گرم در لیتر، برای مقدار چربی، کشت میکسوتروف گلوکز ۲۵ در صد نیترات محیط کشت BBM با  $49/61 \pm 0/36$  میلی‌گرم در لیتر و برای لینولنیک linolenic acid (امگا۳)، کشت اتوتروف ۱۰۰ در صد نیترات محیط کشت BBM با  $19/72 \pm 0/1$  درصد بیشترین مقادیر تولید را دارا بودند. در نتیجه، مشخص شد که شوک نیتروژنی باعث کاهش بیومس سلولی، افزایش روغن ریز جلبک‌ها و همچنین کاهش اسیده‌ای چرب امگا ۳ می‌شود.

واژگان کلیدی: کلرلا ولگاریس، اتوتروف، میکسوتروف، شوک نیتروژنی، تری آسیل گلیسرول



## **Mixotroph culture of (*Chlorella vulgaris*) microalgae under nitrogen stress to produce an extract edible oil**

**Amir Reza Tahbaz<sup>1</sup>, Mohammad Ali Nematollahi<sup>2\*</sup>, Seyed Vali Hosseini<sup>3</sup>**

1. MSc Graduated, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

**Received: 07-Sep-2021**

**Accepted: 24-May-2021**

### **Abstract**

For several years, microalgae have been known to promise sustainable and cost-effective production of food, fuel and chemicals. Many algal species produce lipids as triacylglycerols with fatty acid compounds similar to vegetable oils (TAGs). Therefore, microalgae are a good choice for the sustainable production of natural edible oils. In this study, the effect of mixotroph culture and nitrogen shock on dry weight, fat content and profile of fatty acids of *Chlorella vulgaris* were investigated. In this study, BBM culture medium used at temperature 25°C to grow microalgae. Cell count indices, nitrate, pH, dry weight, fat weight, fat percentage and profile of fatty acids were measured. The results showed that mixotroph culture and nitrogen shock are significant on biomass and fat content ( $p < 0.05$ ). Based on the results, it was determined that for dry weight, the glucose mixotroph with 100% nitrate in BBM medium  $916.66 \pm 35.11$  mg/l, for the amount of fat in mixotrophic culture, glucose with 25% nitrate in BBM culture medium  $49.61 \pm 0.36$  mg/l and for linolenic acid (omega 3) autotrophic culture with 100% nitrate  $19.72 \pm 0.1\%$  had the highest production values. In conclusion, nitrogen shock reduces cell biomass and increases microalgae oil, as well as decreases omega-3 fatty acids.

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*, Autotrophic, Mixotroph, Nitrogen shock, Triacylglycerol.

## ۱. مقدمه

نیاز آنها به زمین‌های حاصلخیز برای پرورش، انرژی بالاتر، ویسکوزیته و چگالی کمتر ریزجلبک‌ها را به‌گزینه مناسب‌تری به‌جای منابع زمینی جهت تولید لیپید معرفی می‌کند (Rodolfi et al., 2009).

تغییر شرایط محیطی علاوه بر تأثیر بر میزان رشد و تولید چربی می‌تواند بر کیفیت لیپید ریزجلبک‌ها نیز اثرگذار باشد. ریزجلبک‌ها ترکیبی از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع ۲۲ الی ۵۲ کربنه تولید می‌کنند (McMillan et al., 2013). مواد غذایی کاربردی مبتنی بر ریزجلبک‌ها به‌عنوان آینده تولید پالایشگاه‌های زیستی برای صنایع غذایی و خوراکی در حال تکامل هستند. ریزجلبک‌ها به‌عنوان منبع مطلوبی برای تولید ارزش افزوده امگا ۳ PUFA (به‌عنوان مثال EPA و DHA) در مقایسه با منابع حیوانی و گیاهی به‌نظر می‌رسند. ریزجلبک‌ها در مقایسه با سایر منابع تولید روغن، توانایی تولید بازده بالاتر PUFA را دارند. گونه‌هایی از ریزجلبک‌ها مانند *Schizochytrium sp.*، *Crythecodinium cohnii* و *Phaeodactylum tricornutum* توانایی تولید مقدار قابل توجهی ارزش افزوده امگا ۳-PUFA را دارند. امگا ۳‌های مشتق شده از ریزجلبک‌ها کاربرد وسیعی دارد و می‌توانند به‌عنوان متابولیت‌های تقویت‌کننده سلامت انسان و ترکیبات سرکوب‌کننده بیماری در نظر گرفته شوند. رفتار دارویی PUFA‌های مبتنی بر ریزجلبک‌ها به‌درمان چندین بیماری از جمله NCD<sup>۴</sup> در انسان کمک می‌کند. امروزه بیماری‌های قلبی و عروقی به‌عنوان عامل اول تهدید جوامع پیشرفته در نظر گرفته می‌شود. از سویی رابطه تنگاتنگی بین الگوی تغذیه‌ای ناسالم و ایجاد این گونه بیماری‌ها وجود دارد. مصرف روغن‌های نباتی با درجه اشباعیت بالا و با ترکیب نامناسب اسیدهای چرب از عوامل افزایش سکت‌های قلبی گزارش شده است. تهیه و ترویج روغن‌های حاصل از ریزجلبک‌ها که دارای کیفیت بالای تغذیه‌ای و فاقد اسیدهای چرب مضرند،

جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به سمت ۹ میلیارد نفر می‌رود، که از نظر تهیه مواد غذایی مناسب و پایدار منجر به چالش‌های جهانی خواهد شد. چندین سال است که ریزجلبک‌ها نوید بخش تولید پایدار و مقرون به‌صرفه خوراک، سوخت و مواد شیمیایی شناخته شده‌اند (Vanthoor-Koopmans et al., 2013). ریزجلبک‌ها، هنگامی که به صورت فتواتوتروفی و در فضاهای باز رشد می‌کنند، در چرخه‌های طبیعی روز و شب از نور خورشید و کربن دی‌اکسید استفاده می‌کنند. بنابراین می‌توان آن‌ها را "ریزپلنت‌ها" در نظر گرفت و محصولات آن‌ها به‌سادگی به‌عنوان محصولات گیاهی شناخته می‌شوند (Gunstone, 2011). برخلاف محصولات کشاورزی سنتی، ریزجلبک‌ها می‌توانند در زمین‌های غیر قابل کشت پرورش داده شوند و برای به‌دست آوردن بازدهی مشابه به زمین کمتر احتیاج دارند (Wijffels and Barbosa, 2010). مانند گیاهان، آن‌ها منبع بالقوه پروتئین خوراکی، کربوهیدرات و چربی‌ها هستند. بسیاری از گونه‌ها لیپیدها را به‌صورت تری‌آسیل‌گلیسرول با ترکیبات اسیدهای چرب مشابه روغن‌های گیاهی (TAG) تولید می‌کنند (Doughman et al., 2007) و برخی از آن‌ها اسیدهای چرب با ارزش بالا ایکوزاپنتانویک اسید (EPA) و دیکوزاهگزانویک اسید (DHA) را تولید می‌کنند. بنابراین ریزجلبک‌ها برای تولید پایدار روغن‌های خوراکی طبیعی و به‌ویژه در مواد غذایی گزینه جالبی هستند. ریزجلبک‌ها اهمیت تجاری و زیست محیطی زیادی به‌عنوان پایه زنجیره غذایی و تولیدکننده اکسیژن دارند و همچنین یک منبع طبیعی از ترکیبات باارزش مانند اسیدهای چرب، استروئیدها و کاروتنوئیدها هستند (Lau et al., 2014). ترکیب چربی ریزجلبک‌ها برای مقاصد مختلفی مورد بررسی قرار می‌گیرد. همچنین میزان بالای چربی ریزجلبک‌های دریایی و عدم

<sup>۱</sup> گیاهان آبی با ابعاد میکرومتری‌اند.

<sup>۲</sup> triglyceride

<sup>۳</sup> Polyunsaturated fatty acids

<sup>۴</sup> non-communicable disease

کلرلا کروی یا بیضوی هستند و قطر سلول‌ها از ۲ تا ۱۵ میکرومتر متغیر می‌باشند. آن‌ها به طور گسترده‌ای در شرایط مختلف مانند آب شیرین، آب شور و خاک توزیع می‌شوند و حتی با گل‌سنگ‌ها و پروتوزوئا همزیستی دارند. کلرلا چرخه زندگی جنسی ندارد و خود را از طریق تولید اتواسپور غیرجنسی تکثیر می‌کند (Bar E et al., 1995). استوک این ریزجلبک از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در شهر تهران تهیه شد و به آزمایشگاه کشت جلبک گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید.

## ۲.۲. محیط کشت

برای پرورش ریزجلبک‌ها از محیط کشت BBM با فرمول زیر استفاده شد (Lam and Lee, 2012). برای کشت هر لیتر محیط کشت جلبک ۱۰ سی‌سی از استوک A (ماکرو نوترینت‌ها) و ۱ سی‌سی از استوک B (میکرو نوترینت‌ها) استفاده شد.

جدول ۱- مقدار نمک‌های معدنی در محلول‌های مادری برای تهیه محیط کشت BBM (Lam and Lee, 2012)

استوک	نوع ماده	مقدار مصرف (گرم)	حجم مورد نظر (برای تهیه استوک)
A	NaNO <sub>3</sub>	25	۱ لیتر
	CaCl <sub>2</sub>	2.5	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.5	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.5	
	NaCl	2.5	
B	EDTA	50	۱ لیتر
	KOH	31	
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.98	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1(ml)	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.4	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82	
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.44	
	MoO <sub>3</sub>	0.71	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.57	
	Co(NO <sub>3</sub> ).7H <sub>2</sub> O	0.49	

گامی به سوی تامین سلامت جامعه و کاهش هزینه‌های درمانی محسوب می‌شود (Katiyar and Arora, 2020). بنابراین این تحقیق در جهت استخراج روغن با کیفیت از منابع ریزجلبک کلرلا ولگاریس انجام شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. گونه ریزجلبک

در این تحقیق از ریزجلبک کلرلا ولگاریس استفاده شد. این ریزجلبک به طبقه علمی (حوزه: یوکاریوت، فرمانرو: پروتیستا، بخش: کلروفیتا، رده: تربوک سیوفیه‌سه، راسته: کلرلاس، خانواده: کلرلاسه آ، جنس: کلرلا، گونه: کلرلا ولگاریس) تعلق دارد (Beijerinck, 1890). کلرلا نوعی جلبک سبز تک سلولی و غیر متحرک است. کلرلا ولگاریس گونه‌ای از این تیره است که اولین بار توسط Beijerinck در سال ۱۸۹۰ توصیف شد. معمولاً سلول‌های

<sup>1</sup> Chlorella vulgaris

میلی گرم در لیتر سدیم استات +۶ گرم  $\text{NaNO}_3$  در استوک A محیط کشت، تیمار ۶: کشت میکسوتروف با اضافه کردن روزانه ۴۰ میلی گرم در لیتر گلوکز +۶ گرم  $\text{NaNO}_3$  در استوک A محیط کشت.

### ۵.۲. شمارش سلولی

برای شمارش سلولی از میکروسکوپ نوری و لام نئوباراستفاده شد و به وسیله فرمول زیر محاسبه استفاده شد: (Banerjee et al., 2011)

= تعداد سلول در هر میلی لیتر

$$10000 \times \frac{\text{ضرب رقیق سازی}}{5} \times \text{تعداد سلول های شمارش شده}$$

### ۶.۲. تعیین نیترات

برای اندازه گیری نیترات از کیت اندازه گیری نیترات آراک شیمی و دستگاه اسپکتوفتومتری مدل UV-2100 در طول موج ۳۵۰ نانومتری استفاده شد (Lau et al., 2014).

### ۷.۲. تعیین pH

برای اندازه گیری pH، از pH متر مدل Benchtop 210 استفاده شد.

### ۸.۲. برداشت و خشک کردن ریزجلبک

برای برداشت زیستوده ریزجلبکها از روش سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ و مدت زمان ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس زیست توده سانتریفیوژ شده ۲ بار دیگر برای از بین بردن نمک های معدنی موجود در کشت سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، زیست توده ریزجلبکی بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در داخل آون قرار گرفت و بعد از مدت ۲۴ ساعت زیست توده ریزجلبکی آ سیاب و به پودر ریزجلبک تبدیل شد و به این ترتیب با وزن کشی آن بر روی ترازو وزن خشک زیست توده محاسبه شد.

### ۳.۲. کشت ریزجلبک کلرلا ولگاریس

در مرحله کشت، تیمار بندی آزمایش اجرا شد. این تحقیق در غالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. در این مرحله از ظروف پلاستیکی با حجم ۵۰۰ سی سی استفاده شد. ابتدا آب شهری به مدت ۲۴ ساعت در محیط قرار داده شد تا کلر زدایی شود. سپس به مدت ۱۵ دقیقه جوشیده و مقدار ۴۵۰ سی سی به هر ظرف ریخته شد و به هر ظرف پنج سی سی از استوک A و نیم سی سی از استوک B اضافه شد و سپس با استفاده از محلول تنظیم کننده pH (محلول رقیق شده اسید کلریدریک و سدیم هیدروکسید) اسیدیته ابتدایی کشت روی ۷/۵ تنظیم شد. مقدار ۵۰ سی سی استوک جلبک با تراکم  $10^6 \times 15$  سلول در هر میلی لیتر به هر ظرف منتقل شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور ۴۰۰۰ لوکس لامپ با نور زرد رنگ ۱۲ ولت و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. در طول دوره کشت نیز هوادهی ۲۴ ساعته انجام شد (Fan et al., 2008). به منظور اندازه گیری شمارش سلولی، pH و نیترات آب هر یک روز در میان مقدار ۱۵ سی سی از کشت جلبکها نمونه گیری شده و بلافاصله مقدار ۱۵ سی سی آب جوشیده خنک شده در دمای محیط به محیط کشت جلبک اضافه شد. در ضمن برای کشت جلبک در این تحقیق از نور به دام افتاده با استفاده از فویل آلومینیومی استفاده شد.

### ۲.۴. تیمارهای آزمایش

تیمارهای آزمایش عبارت بودند از تیمار ۱ (شاهد): کشت اتوتروف +۲۵ گرم  $\text{NaNO}_3$  در استوک A محیط کشت، تیمار ۲: کشت میکسوتروف با اضافه کردن روزانه ۴۰ میلی گرم در لیتر سدیم استات + ۲۵ گرم  $\text{NaNO}_3$  در استوک A محیط کشت، تیمار ۳: کشت میکسوتروف با اضافه کردن روزانه ۴۰ میلی گرم در لیتر گلوکز +۲۵ گرم  $\text{NaNO}_3$  در استوک A محیط کشت، تیمار ۴: کشت اتوتروف +۶ گرم  $\text{NaNO}_3$  در استوک A محیط کشت، تیمار ۵: کشت میکسوتروف با اضافه کردن روزانه ۴۰

## ۲.۹. استخراج چربی (GAT)

استخراج چربی با استفاده از روش سوکسوله انجام شد. ابتدا کاپها (ظرفهای فلزی) تمیز داخل آون گذاشته شد تا خشک شود. بعد داخل دسی کاتور گذاشته تا خنک شود سپس وزن کاپها اندازه گیری شد. در مرحله بعد نمونه‌های ریزجلبکی در روی کاغذ صافی وزن کرده و داخل کارتوش مخصوص دستگاه قرار داده شد. سپس ۷۵ سی سی دی اتیل اتر نیز برای هر نمونه به دستگاه اضافه شد. برای استخراج و اندازه گیری چربی به زمان نیاز است. در ساعت اول برای حل شدن چربی، کاپ و کارتوش در حالت حل شدن در دی اتیل اتر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ساعت دوم کارتوش و کاپ از هم جدا شد و شست شو توسط دی اتیل اتر برای جداسازی چربی انجام شد. در نهایت کاپها به همراه چربی به آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت منتقل شد تا دی اتیل اتر تبخیر شود. بعد از آن وزن ظرف همراه با روغن محاسبه شد و از وزن ظرف اولیه کم شد تا میزان وزن چربی محاسبه شود (Manirakiza et al., 2000).

## ۱.۰.۲ محاسبه درصد چربی

میزان اندازه گیری درصد چربی از تقسیم وزن چربی به وزن خشک ریزجلبک طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد چربی} = \frac{\text{وزن روغن}}{\text{وزن خشک}} \times 100$$

## ۱.۱.۲ پروفایل اسیدهای چرب

به منظور بررسی پروفایل اسیدهای چرب از تکنیک گاز کروماتوگرافی استفاده گردید. ابتدا ۲۵ میلی‌گرم از وزن خشک ریزجلبکی را داخل لوله آزمایش ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر بنزن و ۱ میلی‌لیتر محلول NaOH ۵٪ در صد در متانول به لوله آزمایش اضافه شد. در لوله آزمایش محکم بسته شد. سپس لوله آزمایش در حمام آب به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دید و بعد در دمای محیط سرد شد. سپس ۱ میلی‌لیتر

محلول ۱۴ درصد BF3 در متانول به لوله آزمایش اضافه شد. دوباره لوله آزمایش در حمام آب داغ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بعد در دمای محیط قرار داده شد تا خنک شود. ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله آزمایش اضافه شد. در مرحله بعد، ۲ سی سی محلول اشباع NaCl و ۲ سی سی هگزان نیز اضافه و به مدت ۱ دقیقه همزده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد تا دو فاز تشکیل شود. در پایان، با تزریق یک میکرولیتر از فاز رویی هگزان به دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل GC-RTX-7890A – USA دارای دکتور FID و ستون 2330- Restec-Canada (105m\*250um\*0.2um) پروفایل اسید چرب مورد ارزیابی قرار گرفت (Park and Goins, 1994).

## ۱.۲.۲ تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق، نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف از تجزیه واریانس یک طرفه (One way- ANOVA) و دوطرفه (Two way- ANOVA) و با استفاده از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها و بررسی وجود و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین نتایج حاصله استفاده گردید. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ صورت گرفت.

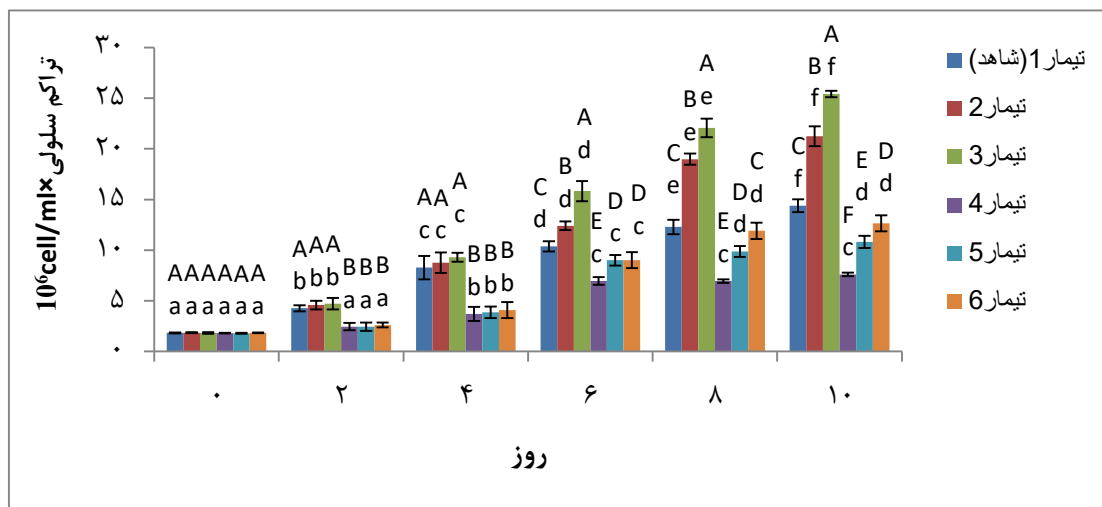
## ۳. نتایج

### ۱.۳. تراکم سلولی

با توجه به نمودار شکل ۱ نتایج در مورد تراکم سلولی نشان داد اثر تیمار، اثر زمان و اثر تیمار در زمان معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در روز صفر اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در روز دوم، تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $P > 0.05$ ) اما در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌دار

معنی‌دار افزایشی داشتند ( $P < 0/05$ ) اما در تیمار ۴ و ۵ اختلاف معنی‌دار کاهش‌ی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) در تیمار ۶ نیز نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). در روز دهم، تیمار ۳ و ۲ نسبت به تیمار شاهد در سطح معنادار افزایشی بودند ( $P < 0/05$ ) اما در تیمارهای ۴ و ۵ و ۶ اختلاف معنی‌دار کاهش‌ی نسبت به تیمار شاهد داشتند ( $P < 0/05$ ).

کاهش‌ی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در روز چهارم، تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند ( $P > 0/05$ ) اما در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌دار کاهش‌ی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در روز ششم، در تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار افزایش‌ی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) اما در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌دار کاهش‌ی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در روز هشتم، تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد اختلاف

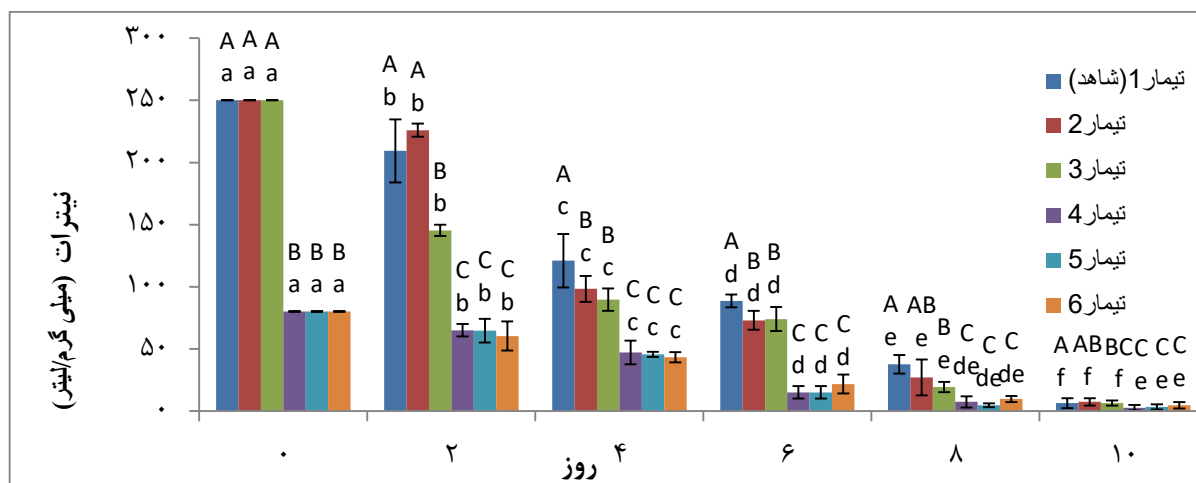


شکل ۱- نمودار تغییرات تراکم سلولی در میان تیمارها در کشت ریزجلبک کلرلا ولگاریس  
حروف بالانویس بزرگ بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در یک روز خاص می‌باشد ( $P < 0/05$ )  
حروف بالانویس کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار بین یک تیمار خاص در روزهای مختلف می‌باشد ( $P < 0/05$ )

دار کاهش‌ی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در روز چهارم، بین تیمارهای ۴، ۵، ۳، ۲ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنادار کاهش‌ی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در روز هشتم، بین تیمار ۲ با تیمار شاهد اختلاف معناداری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ )، اما بین تیمارهای ۴، ۳، ۵ و ۶ اختلاف معنادار کاهش‌ی با تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در روز دهم نیز اختلاف معنی‌دار بین تیمار ۲ با تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0/05$ )، اما بین تیمارهای ۴، ۳، ۵ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0/05$ ).

### ۲.۳. نیترا

با توجه به نمودار شکل ۲ نتایج در مورد نیترا کشت نشان داد اثر تیمار، اثر زمان و اثر تیمار در زمان معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). در روز صفر، در تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0/05$ )، اما تیمارهای ۴، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌دار کاهش‌ی نسبت به تیمار شاهد داشتند ( $P < 0/05$ ). در روز دوم، بین تیمار ۲ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) اما بین تیمارهای ۴، ۳، ۵ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار

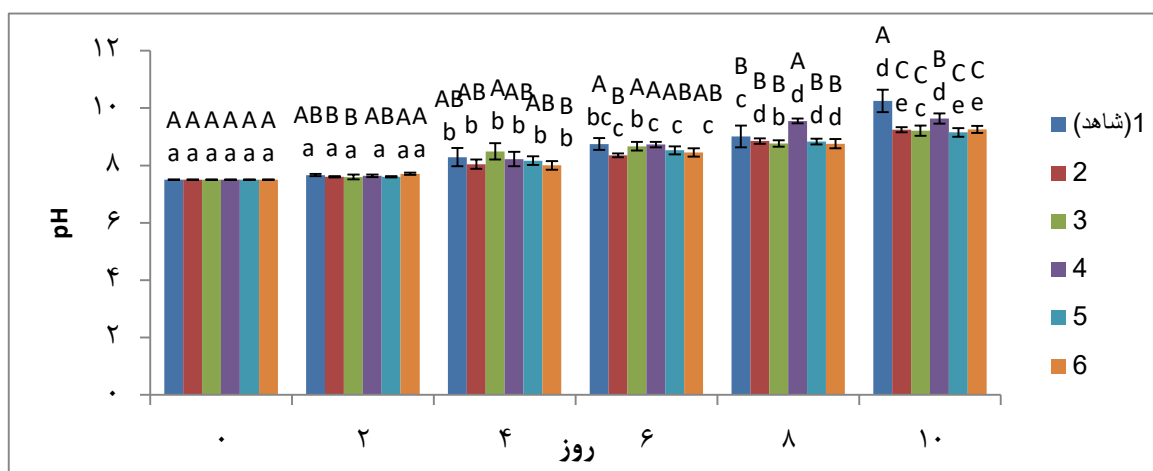


شکل ۲- نمودار تغییرات نیترات در محیط کشت‌های مختلف در کشت ریزجلبک کلرلا ولگاریس  
حروف بالانویس بزرگ بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در یک روز خاص می‌باشد ( $P < 0.05$ )  
حروف بالانویس کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار بین یک تیمار خاص در روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ )

### ۳.۳. pH

معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در روز ششم، بین تیمار ۲ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بین تیمار ۵، ۴، ۳ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در روز هشتم، بین تیمارهای ۵، ۳، ۲ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) اما بین تیمار ۴ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار افزایشی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در روز دهم، بین تیمارهای ۴، ۳، ۲، ۵ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

با توجه به نمودار شکل ۳ نتایج در مورد pH کشت نشان داد اثر تیمار، اثر زمان و اثر تیمار در زمان معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در روز صفر، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در روز دوم، بین تیمارهای ۵، ۴، ۳، ۲ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در روز چهارم نیز، بین تیمارهای ۵، ۴، ۳، ۲ و ۶ با تیمار شاهد اختلاف



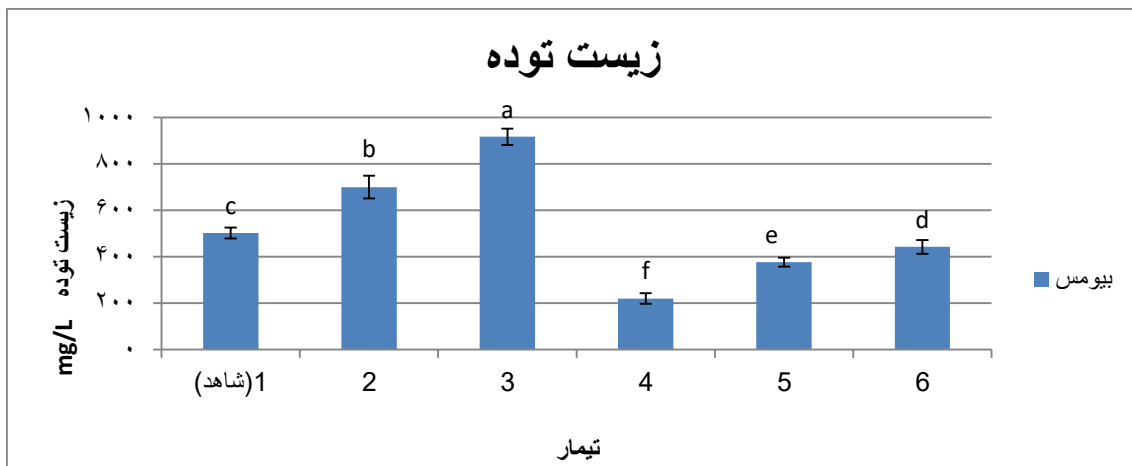
شکل ۳- نمودار تغییرات pH در تیمارهای مختلف کشت ریزجلبک کلرلا ولگاریس  
حروف بالانویس بزرگ بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در یک روز خاص است ( $P < 0.05$ )  
حروف بالانویس کوچک بیانگر اختلاف معنی‌دار بین یک تیمار خاص در روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ )



### ۴.۳. وزن خشک

باتوجه نمودار شکل ۴ در مورد وزن خشک اختلاف معنی‌دار در تیمار ۳ و ۲ نسبت به تیمار شاهد به طور افزایشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). اما در تیمار ۴، ۵ و ۶

نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بالاترین میزان وزن خشک مربوط به تیمار شماره ۳ به مقدار  $916/67 \pm 35/11$  میلی میلی‌گرم در لیتر و پایین‌ترین میزان وزن خشک مربوط به تیمار شماره ۴ به مقدار  $219/22 \pm 33/47$  میلی‌گرم در لیتر بود.

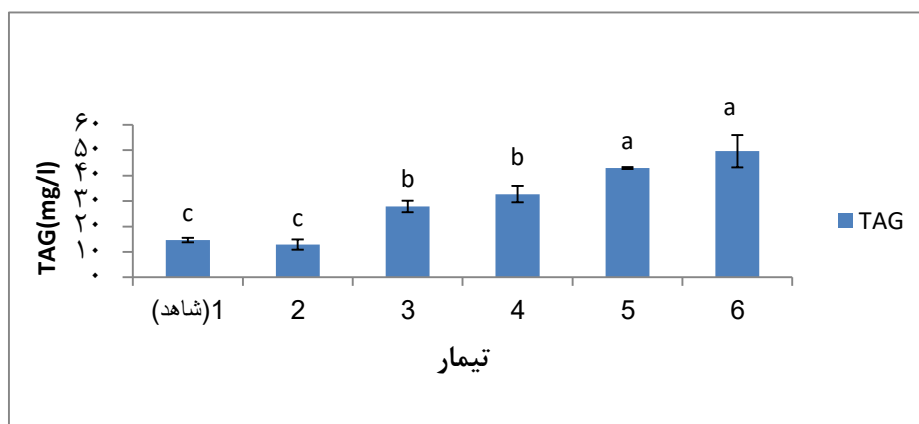


شکل ۴- نمودار میانگین میزان وزن خشک موجود بین تیمارهای مختلف بر حسب میلی‌گرم در لیتر در ریزجلبک کلرلا ولگاریس حروف متفاوت در بالای هر ستون در نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0/05$ )

### ۵.۳. میزان چربی (TAG)

باتوجه به نتایج نمودار شکل ۵ در مورد مقدار چربی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد. در تیمار ۲ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ), اما در تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌دار

افزایشی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بالاترین میزان چربی مربوط به تیمار شماره ۶ با  $49/0 \pm 61/36$  میلی‌گرم در لیتر و پایین‌ترین میزان درصد چربی مربوط به تیمار شماره ۲ با  $12/2 \pm 88/01$  میلی‌گرم در لیتر بود.

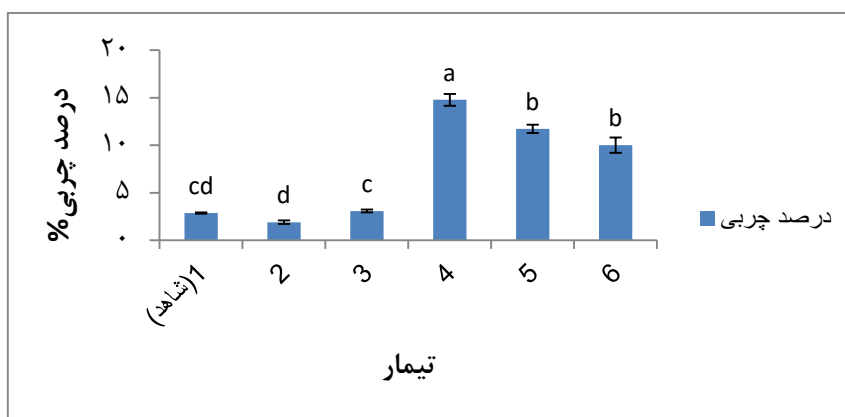


شکل ۵- نمودار میانگین میزان چربی موجود بین تیمارهای مختلف بر حسب میلی‌گرم در لیتر در ریزجلبک کلرلا ولگاریس حروف متفاوت در بالای هر ستون در نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0/05$ )

### ۶.۳. درصد چربی

به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار افزایشی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بالاترین میزان درصد چربی مربوط به تیمار شماره ۴ با  $14.0 \pm 77/62$  درصد و پایین‌ترین میزان درصد چربی مربوط به تیمار شماره ۲ با  $1.9 \pm 0/18$  درصد می‌باشد.

باتوجه به نتایج در شکل ۶ در مورد درصد چربی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در تیمارهای ۳ و ۲ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) ولی در تیمارهای ۵، ۴ و ۶ نسبت



شکل ۶- نمودار درصد چربی موجود بین تیمارهای مختلف بر حسب درصد در ریز جلبک کلرلا ولگاریس حروف متفاوت در بالای هر ستون در نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد هیپتا دکانوئیک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بین تیمارهای ۳ و ۲ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار افزایشی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در تیمار ۶ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). اما در تیمارهای ۴ و ۵ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بالاترین میزان درصد هیپتا دکانوئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۲ با درصد  $4.0 \pm 88/09$  و پایین‌ترین میزان درصد هیپتا دکانوئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۴ با  $2.0 \pm 67/04$  درصد می‌باشد.

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد سیس هیپتا دکانوئیک اسید اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد استئاریک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). تیمارهای ۲، ۴، ۵ و ۶ نسبت به تیمار شاهد اختلاف

### ۷.۳. پروفایل اسیدهای چرب

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد پالمیتیک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). اما بین تیمارهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). بالاترین میزان درصد پالمیتیک اسید مربوط به تیمار شماره ۲ با  $27.1 \pm 95/59$  درصد و پایین‌ترین میزان درصد پالمیتیک اسید مربوط به تیمار شماره ۵ با  $12.4 \pm 24/33$  درصد می‌باشد.

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد پالمیتولئیک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در تیمار ۳ و ۲ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بالاترین میزان درصد پالمیتولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۱ با درصد  $4.0 \pm 73/48$  و پایین‌ترین میزان درصد پالمیتولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۴ با  $3.0 \pm 63/05$  درصد می‌باشد.

تیمارهای ۲، ۳ و ۶ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار افزایشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). اما در تیمارهای ۴ و ۵ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). بالاترین میزان در صد لینولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۳ با  $21/75 \pm 0/03$  درصد و پایین‌ترین میزان در صد لینولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۱ با  $18/0 \pm 6/13$  درصد می‌باشد.

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد لینولئیک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در تیمارهای ۲، ۳، ۴ و ۵ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). ولی در تیمار ۴ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). بالاترین میزان در صد لینولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۱ با  $19/0 \pm 72/1$  درصد و پایین‌ترین میزان در صد لینولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۲ با  $14/1 \pm 84/32$  درصد می‌باشد.

معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). اما در تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار کاهشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بالاترین میزان در صد استئاریک اسید مربوط به تیمار شماره ۱ با  $8/0 \pm 55/62$  درصد و پایین‌ترین میزان در صد استئاریک اسید مربوط به تیمار شماره ۳ با  $7/0 \pm 21/19$  درصد می‌باشد.

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد اولئیک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در همه تیمارهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار افزایشی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بالاترین میزان در صد اولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۵ با  $24/0 \pm 28/29$  درصد و پایین‌ترین میزان در صد اولئیک اسید مربوط به تیمار شماره ۱ با  $16/0 \pm 9/29$  درصد می‌باشد.

باتوجه به نتایج در جدول ۳ در مورد لینولئیک اسید اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در

جدول ۲- میانگین (انحراف معیار  $\pm$  میانگین) پروفایل اسیدهای چرب بر حسب درصد بین تیمارهای مختلف

تیمار	کنتراول (۱)					
	۶	۵	۴	۳	۲	کنتراول (۱)
پالمیتیک	$24/2 \pm 84/11^{ab}$	$1 \pm 24/33^b$	$24/0 \pm 27/02^b$	$26/0 \pm 95/13^{ab}$	$27/1 \pm 95/59^a$	$26/0 \pm 94/5^{ab}$
پالمیتوئیک	$3/0 \pm 71/007^b$	$3/0 \pm 65/16^b$	$3/0 \pm 63/05^b$	$4/0 \pm 26/007^{ab}$	$4/0 \pm 27/73^{ab}$	$4/0 \pm 73/48^a$
هیپتا دکانوئیک	$3/0 \pm 21/13^c$	$2/0 \pm 83/09^d$	$2/0 \pm 67/04^d$	$4/0 \pm 23/06^b$	$4/0 \pm 88/09^a$	$3/0 \pm 41/14^c$
سیس هیپتا دکانوئیک	$1/0 \pm 33/07^a$	$1/0 \pm 28/09^a$	$1/0 \pm 24/18^a$	$1/0 \pm 25/007^a$	$1/0 \pm 29/007^a$	$1/0 \pm 24/007^a$
استئاریک	$8/0 \pm 06/16^{ab}$	$8/0 \pm 51/07^a$	$8/0 \pm 51/07^a$	$7/0 \pm 21/19^b$	$7/0 \pm 99/19^{ab}$	$8/0 \pm 55/62^a$
اولئیک	$21/0 \pm 95/23^b$	$24/0 \pm 28/29^a$	$22/0 \pm 73/07^a$	$18/1 \pm 89/01^c$	$18/0 \pm 06/03^c$	$16/0 \pm 9/29^d$
لینولئیک	$20/1 \pm 94/08^{ba}$	$19/1 \pm 22/01^{cb}$	$19/0 \pm 34/63^{cb}$	$21/0 \pm 75/03^a$	$20/1 \pm 73/01^{ba}$	$18/0 \pm 6/13^c$
لینولئیک	$15/1 \pm 59/64^b$	$15/1 \pm 58/1^b$	$17/0 \pm 37/34^{ab}$	$15/0 \pm 82/6^b$	$14/1 \pm 84/32^b$	$19/0 \pm 72/1^a$

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0/05$ ).

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

ریز جلبک‌ها منبع جایگزین جذابی برای روغن هستند. ساختار ساده و تک سلولی آنها امکان بهره‌وری بالقوه بالاتر از محصولات سنتی دانه‌های روغنی را فراهم می‌کند. آن‌ها با محصولات کشاورزی رقابت نمی‌کنند و می‌توانند در آب شور یا نمک رشد کنند. فقط از نور خورشید، کربن دی‌اکسید و مواد مغذی ضروری مانند نیتروژن و فسفر استفاده می‌کنند (Rodolfi et al., 2009). پتانسیل تولید همزمان محصولات ارزشمند مانند رنگدانه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و داروها و همچنین وزن خشک برای خوراک دام یا کود را دارند (Mata et al., 2010). محصولات حاصل از روغن جلبک شامل بیودیزل، روغن‌های مخصوص، مواد آرایشی، مواد مغذی و مواد غذایی اند (Apt and Behrens, 1999). یکی از مهمترین چالش‌هایی که باید از آن عبور کرد تا تولید روغن جلبکی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و از نظر زیست محیطی مطلوب باشد، بهبود زیست توده جلبکی و بهره‌وری چربی و همچنین حداکثر غلظت چربی جمعی قابل دستیابی است (Sheehan et al., 1998). چندین فاکتور محیطی مانند دما (Converti et al., 2009)، نور (Rodolfi et al., 2009) و مواد مغذی (به عنوان مثال فسفات، نیترات و سیلیکات) (Chisholm, Shifrin and 1981) در ترکیب و بهره‌وری چربی‌های ریز جلبکی تأثیر دارند. محدودیت نیتروژن (N) متداول‌ترین روش افزایش محتوای چربی است. دستکاری آن ارزان و آسان است و تأثیر قابل اعتماد و قوی بر محتوای لیپید در بسیاری از گونه‌ها دارد (Chelf, 1990). با این حال شرایط استرسی که محتوای چربی را افزایش می‌دهد مانند محدودیت N، سرعت رشد را نیز کاهش می‌دهد و بنابراین ممکن است باعث بهبود بهره‌وری کلی چربی نشود (Lardon et al., 2009). در شرایط محدودیت نیتروژن، توانایی سلول‌ها در سنتز ترکیبات حاوی نیتروژن مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و کلروفیل کاهش می‌یابد. از آنجا که این ترکیبات برای رشد و تقسیم سلولی لازم هستند، سرعت رشد به غلظت نیتروژن داخل سلول وابسته‌اند. رشد

سرانجام متوقف می‌شود، اما با توجه به شرایط، فتوسنتز همچنان ادامه دارد. شار متابولیک کربن جذب شده در طی فتوسنتز از سنتز پروتئین به تولید چربی یا کربوهیدرات هدایت می‌شود (Li et al., 2008). در این تحقیق به بررسی تأثیر کشت اتوتروف و میکسوتروف (گلوکز و سدیم استات) در غلظت معمول نیتروژن در محیط کشت و شرایط کمبود آن در محیط کشت BBM روی وزن خشک، مقدار روغن، درصد چربی و پروفایل اسیدهای چرب در ریز جلبک کلرلا ولگاریس پرداخته شد. ریز جلبک کلرلا ولگاریس، بیشترین مقدار وزن خشک را در تیمار شماره ۳ (کشت میکسوتروف گلوکز با ۱۰۰ درصد نیترات محیط کشت BBM) با مقدار ۹۱۶/۳۵±۶۶/۱۱ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار وزن خشک در تیمار شماره ۴ (کشت اتوتروف با ۲۵ درصد نیترات محیط کشت BBM) با مقدار ۲۱۹/۲۲±۳۳/۴۷ میلی‌گرم در لیتر داشت. در کشت اتوتروف تیمار ۱ در نسبت کربن به نیتروژن ۶/۲، در کشت میکسوتروف تیمار (سدیم استات) نسبت کربن به نیتروژن ۸/۷۲، در کشت میکسوتروف تیمار (گلوکز) نسبت کربن به نیتروژن ۱۱/۴۵، در کشت اتوتروف تیمار ۴ نسبت کربن به نیتروژن ۱۹/۳، در کشت میکسوتروف تیمار ۴ (سدیم استات) نسبت کربن به نیتروژن ۲۶/۸۴ و در کشت میکسوتروف تیمار ۶ (گلوکز) نسبت کربن به نیتروژن ۳۵/۲۳ بدست آمد. بهترین نسبت کربن به نیتروژن برای رشد ریز جلبک‌ها ۱۰ پیشنهاد شده است (Rafiee et al., 2020). براساس تحقیقات علمی موجود، دانشمندان دریافتند در اکثر ریز جلبک‌ها، کشت میکسوتروفیک نسبت به کشت اتوتروفیک به دلیل فعال بودن هردو مسیر فتوسنتز و شیمیوسنتز (جذب مستقیم مواد آلی محلول) باعث افزایش وزن خشک ریز جلبک‌ها می‌شود. مشخص شده است که بهترین ترکیب آلی برای کشت میکسوتروف ریز جلبک کلرلا ولگاریس گلوکز است که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. Weibao Kong و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر کشت میکسوتروف، هتروتروف و اتوتروف را روی بیومس

لیپید و غلظت زیست توده در سطوح مختلف نیتروژن را نشان داد (Stephenson *et al.*, 2010). Benjamas Cheirsilp و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر سه کشت میکسوتروف، هتروتروف و اتوتروف را روی میزان چربی ریزجلبک کلرلا ولگاریس مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند در کشت میکسوتروف نسبت به کشت اتوتروف ۲/۵ برابر مقدار روغن استخراج شده افزایش پیدا خواهد کرد (Cheirsilp and Torpee, 2012).

کربن‌های آلی به طور کلی از طریق دو مسیر، چرخه گلی اگزالات و چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA) متابولیزه می‌شوند (Perez-Garcia *et al.*, 2011). سیترات سنتاز، ایزوسیترات دهیدروژناز و سوکسینیل-کوآ، که می‌توانند متابولیت‌های متوسط چرخه TCA را فراهم کنند در کشت میکسوتروفیک تقویت می‌شوند. علاوه بر این، کاهش دهیدروژناز جریان مالات بیشتری را به سمت سنتز اسیدهای چرب وادار می‌کند (Boyle and Morgan, 2009). این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت چرخه TCA در کشت میکسوتروفیک بهبود یافته و در نتیجه سنتز اسیدهای چرب بیشتری در سلول‌های *C. vulgaris* ایجاد می‌شود. فیزیولوژی سلول کلرلا ولگاریس تحت محدودیت نیتروژن به طور چشمگیری تغییر می‌کند. افزایش محدودیت نیتروژن منجر به محتوای چربی بالاتر و پروتئین و رنگدانه کمتر می‌شود. گزارش شده است که ترکیب اسیدهای چرب لیپیدهای جلبک با محدودیت نیتروژن تغییر می‌کند. در مطالعه (Griffiths و همکاران ۲۰۱۲)، متابولیسم *C. vulgaris* از تولید اسیدهای چرب اشباع نشده (لینولئیک اسید و لینولنیک اسید) به تولید اسیدهای چرب اشباع (استئاریک اسید و اولئیک اسید) تحت محدودیت نیتروژن تغییر پیدا کرد (Griffiths *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای که

ریزجلبک کلرلا ولگاریس بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بیشترین مقدار وزن خشک مربوط به کشت میکسوتروفیک است (Kong *et al.*, 2011). در مورد شاخص pH همچنین دریافتند که در کشت ریزجلبک با گذشت زمان به دلیل جذب کربن دی‌اکسید و افزایش جمعیت سلولی، محیط کشت به تدریج قلیایی می‌شود. همچنین دیده شد که مقدار pH در کشت میکسوتروف نسبت به اتوتروف به دلیل متابولسم مواد آلی در فرایند تنفس و آزاد شدن کربن دی‌اکسید مقدار pH پایین‌تر از کشت اتوتروفیک است که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

مقدار روغن استخراج شده در این تحقیق نشان داد که بیشترین مقدار روغن استخراج شده مربوط به تیمار ۶ (کشت میکسوتروف گلوکز با ۲۵ درصد نیترات محیط کشت BBM) با مقدار  $49/0 \pm 61/36$  میلی‌گرم برلیتر و کمترین مقدار روغن استخراج شده مربوط به تیمار ۲ (کشت میکسوتروف سدیم استات با ۱۰۰ درصد نیترا تمحیط کشت BBM) با مقدار  $12/88 \pm 2/01$  میلی‌گرم در لیتر است. Conway و Dortch (۱۹۸۴) دریافتند که در زمان محدودیت نیتروژن، کمپلکس پروتئین-کلروفیل کاهش می‌یابد. این کمپلکس در غشا تیلاکوئید قرار داشته و انرژی نورانی را به مرکز واکنش‌های فتوسنتز می‌نقل می‌کند. با ادامه یافتن فتوسنتز، در حالیکه تقسیم سلولی به دلیل کمبود مواد مغذی متوقف شده است، چربی در سلول انباشته می‌شود. تحت شرایط کمبود مواد مغذی، سنتز لیپیدها به سمت ذخیره تری‌گلیسیریدها و لیپیدهای خنثی پیش می‌رود (Dortch and Conway, 1984). Stephenson و همکاران (۲۰۱۰) اثر نیترات (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۵۰ میلی‌گرم در لیتر) را روی کشت کلرلا ولگاریس بررسی کردند، در حالی که Hsieh و همکاران اثر اوره (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) را در کشت یک گونه کلرلا دریایی بررسی کردند. هر دو مطالعه رابطه معکوس بین محتوای

<sup>1</sup> Citrate synthase

<sup>2</sup> Succinyl coenzyme A synthetase

## نتیجه گیری کلی

در این تحقیق اثرات کشت میکسوتروفیک (گلوکز و سدیم استات) و اتوتروفیک در بستر شوک نیتروژنی روی وزن خشک، میزان روغن و پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک کلرلا ولگاریس بررسی شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان وزن خشک در محیط کشت میکسوتروفیک گلوکز با مقدار ۱۰۰ درصد نیترات محیط کشت BBM و پایین ترین میزان وزن خشک در کشت اتوتروف با ۲۵ درصد نیترات محیط کشت BBM بدست آمد. در کشت اتوتروف تیمار ۱ نسبت کربن به نیتروژن ۶/۲، در کشت میکسوتروف تیمار ۲ (سدیم استات) ۸/۷۲ و در کشت میکسوتروف تیمار ۳ (گلوکز) نسبت کربن به نیتروژن ۱/۴۵ بدست آمد. اما بالاترین مقدار چربی در کشت میکسوتروفیک گلوکز و ۲۵ درصد نیترات محیط کشت BBM و پایین ترین درصد چربی در کشت اتوتروف با میزان ۱۰۰ درصد نیترات محیط کشت BBM بدست آمد. در مورد پروفایل اسیدهای چرب نیز در این تحقیق مشاهده شد، موقع شوک نیتروژنی مقدار اولئیک اسید افزایش و در حالت عادی کاهش می یابد. در موقع شوک نیتروژنی مقدار لینولنیک اسید کاهش و در حالت عادی کشت افزایش می یابد و در مورد اسیدهای چرب دیگر تغییرات محسوسی دیده نشد. در نتیجه کشت میکسوتروف به طور کلی باعث افزایش زیست توده و شوک نیتروژنی باعث کاهش آن و افزایش چربی در ریزجلبک ها خواهد شد.

Ioannis-Dimosthenis Adamakis و همکاران در سال ۲۰۱۸ روی اثر غلظت نیترات (۴۲، ۴۲۵ و ۱۲۷۵ میلی گرم در لیتر) در پروفایل اسیدهای چرب داشتند به این نتیجه رسیدند که در هر ۳ غلظت تغییرات خاصی روی پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، استئاریک اسید و لینولئیک اسید مشاهده نشد. اما در اولئیک اسید بیشترین مقدار ۴۲ درصد در غلظت ۴۲ میلی گرم در لیتر و کمترین مقدار ۱۶ درصد در غلظت ۴۲ میلی گرم در لیتر مشاهده شد، که با نتایج حاصل از این تحقیق تطابق دارد (Adamakis et al., 2018). در مطالعه ای که Xiao-Fei Shen و همکاران در سال ۲۰۱۹ تولید بیودیزل از کلرلا ولگاریس تحت گرسنگی نیتروژن در کشت های اتوتروفیک و میکسوتروفیک داشتند مشاهده کردند که در اسیدهای چرب های پالمیتیک اسید، سیس هپتا دکانوئیک اسید و استئاریک اسید تغییرات خاصی مشاهده نشد. ولی درصد اولئیک اسید در کشت میکسوتروف تقریباً ۲ برابر اتوتروف بود ولی درصد لینولنیک اسید در کشت اتوتروف بیشتر از میکسوتروف بدست آمد. در واقع آن ها دریافتند که کشت میکسوتروف باعث افزایش اولئیک اسید و کشت اتوتروف باعث افزایش لینولنیک اسید می شود که با نتایج حاصل از این تحقیق تطابق دارد (Shen et al., 2019).

## ۵. منابع

## References

- Adamakis, I.-D., Lazaridis, P.A., Terzopoulou, E., Torofias, S., Valari, M., Kalaitzi, P., Rousonikolos, V., Gkoutzikostas, D., Zouboulis, A., Zalidis, G., 2018. Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. *Environmental Science and Pollution Research* 25(23), 23018-23032.
- Apt, K.E., Behrens, P.W., 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of phycology* 35(2), 215-226.

- Banerjee ,S., Hew, W.E., Khatoon, H., Shariff, M., Yusoff, F.M., 2011. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology* 10(8), 1375-1383.
- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., Arad, S. M., 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *Journal of Plant Physiology*, 146(4), 527-534.
- Beijerinck, M. W., 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen. *Algen. Bot. Ztg.*, 48, 725-772.
- Boyle, N.R., Morgan, J.A., 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC systems biology* 3(1), 1-14.
- Cheirsilp, B., Torpee, S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology* 110, 510-516.
- Chelf, P., 1990. Environmental control of lipid and biomass production in two diatom species. *Journal of Applied Phycology* 2(2), 121-129.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48(6), 1146-1151.
- Dortch, Q., Conway, H., 1984. Interactions between nitrate and ammonium uptake: variation with growth rate, nitrogen source and species. *Marine Biology* 79(2), 151-164.
- Doughman, S.D., Krupanidhi ,S., Sanjeevi, C.B., 2007. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Current diabetes reviews* 3(3), 198-203.
- Fan, L.-H., Zhang, Y.-T., Zhang, L., Chen, H.-L., 2008. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science* 325(1), 336-345.
- Griffiths, M.J., van Hille, R.P., Harrison, S.T., 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology* 24(5), 989-1001.
- Gunstone, F., 2011. Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses. John Wiley & Sons, p329.
- Katiyar, R., Arora, A., 2020. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Research* 46, 101800.
- Kong, W., Song, H., Cao, Y., Yang, H., Hua, S., Xia, C., 2011. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *African Journal of Biotechnology* 10(5), 11620-11630.
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2012. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied energy* 94 ,303-308.
- Lau, K.Y., Pleissner, D., Lin, C.S.K., 2014. Recycling of food waste as nutrients in *Chlorella vulgaris* cultivation. *Bioresource technology* 170, 144-151.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology* 81(4), 629-636.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P., 2000. Single step clean-up and GC-MS quantification of organochlorine pesticide residues in spice powder. *Chromatographia* 52(11), 787-790.

- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews* 14(1), 217-232.
- McMillan, J.R., Watson, I.A., Ali, M., Jaafar, W., 2013. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied energy* 103, 128-134.
- Park, P., Goins, R., 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* 59(6), 1262-1266.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M., De-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research* 45(1), 11-36.
- Rafiee, Gh., Rezaei Tavabe, K., Motamedi N., 2020. Effects of different media in production of marine microalgae *Chlorella* spp. using commercial agriculture fertilizers. *Aquatics Animal Nutrition* 5(2), 51-60 (in persian).
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 102(1), 100-112.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory* 328, 1-294.
- Shen, X.-F., Qin, Q.-W., Yan, S.-K., Huang, J.-L., Liu, K., Zhou, S.-B., 2019. Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation in autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology* 31(3), 1589-1596.
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W., 1981. Phytoplankton lipids interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles 1. *Journal of phycology* 17(4), 374-384.
- Stephenson, A.L., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G., 2010. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels* 1, 47-58.
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H., 2013. *Biorefinery of microalgae for food and fuel*. *Bioresource technology* 135, 142-149.
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329(5993), 796-799.