افزایش رشد ریزجلبک کلرلا (*Chlorella* sp.) در یک فتوبیوراکتور دو لایه با استفاده از محلول فیکوسیانین

زهرا خوبکار[1]، حسین دلاوری امرئی*[2]

[1]گروه مهندسی شیمی و نفت، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

[2]گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بجنورد، بجنورد، ایران.

*نویسنده مسئول: h.delavari@ub.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۶

چکیده

هدف این مطالعه بررسی میزان رشد، محتوای کلروفیل a و لیپید میکروجلبک کلرلا (*Chlorella* sp.)، تحت تابش نور سفید اصلاح شده با رنگدانه طبیعی فیکوسیانین (Phycocyanin) بوده است. بدین منظور در لایه جلویی یک فتوبیوراکتور دو لایه، ریزجلبک کلرلا کشت داده شد و لایه ی دیگر (لایه پشتی) با محلول فیکوسیانین پر شد. نتایج به‌دست آمده با فتوبیوراکتور شاهد (فاقد فیکوسیانین)، که در لایه جلویی آن به‌جای فیکوسیانین از آب دیونیزه استفاده شده بود، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. در لایه پشتی هر یک از راکتورها یک آینه نیز تعبیه گردید. فتوبیوراکتورها به‌مدت ۱۴ روز تحت تابش لامپ LED سفید با شدت نور $\mu mol\ photons\ m^{-2}s^{-1}$ ۴۹۰، در دمای $25\pm1^{\circ}C$ قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از فیکوسیانین محلول، نرخ بهره وری زیست توده و ماکزیمم نرخ رشد مخصوص را به‌ترتیب ۲۸ و ۴۰ درصد افزایش داده است. همچنین محتوای کلروفیل a در پایان دوره کشت حدود ۳۴ درصد افزایش پیدا کرد. اما اصلاح طیف توسط فیکوسیانین، محتوای لیپید سلولی را کاهش داده است. به طور کلی می‌توان گفت اصلاح طیفی نور توسط فیکوسیانین باعث افزایش نرخ تولید زیست‌توده و محتوی رنگدانه کلروفیل a در ریزجلبک کلرلا می‌شود.

واژگان کلیدی: میکروجلبک، فتوبیوراکتور، فیکوسیانین، کلرلا، اصلاح طیفی.

مقدمه

در کشت ریزجلبک، نور یک عامل مهم و کلیدی بوده و پارامترهایی مانند شدت نور، طول موج، چرخه روشنایی/ تاریکی و نوع منبع نور بر رشد سلول اثر می‌گذارد (Wang et al. 2007). به‌طورکلی، ریزجلبک‌ها قادر به حیات تحت تابش نور شدید، مانند تابش مستقیم نور خورشید به علت ایجاد پدیده‌ی اشباع نوری (photo inhibition) نیستند (Achara, 2012). حتی در شرایط مناسب نوری، ریزجلبک تنها می‌تواند از بخش کمی از طیف خورشیدی استفاده کند. اگرچه اختلافاتی در این زمینه بین گونه‌های مختلف وجود دارد؛ طیف‌های معمول نواحی آبی (۵۰۰-۴۰۰ نانومتر) و نواحی قرمز (۷۰۰-۶۰۰ نانومتر) است (Matthijs *et al.*, 1996)، به‌ویژه محدوده‌ی اشعه‌ی ماوراء بنفش (UV) (<۳۸۰ nm) اثرات زیان باری بر رشد ریزجلبک‌ها دارد (Jenkins and Gareth, 2009).

اخیراً تعدادی از پژوهشگران از تکنیک اصلاح طیفی به‌منظور افزایش رشد ریزجلبک‌ها در فتوبیوراکتورهای مختلف استفاده کرده‌اند. استفاده از رنگ فلورسانس لوموژن F (Lumogen F) وزن خشک ریزجلبک را از ۲۰ تا ۷۰ درصد افزایش داده است (Mohsenpour *et al.*, 2012). همچنین استفاده از پودر فلوئورسانس مشتق شده از Eu^{2+} ($Europium^{2+}$) به‌عنوان ماده مبدل طیف، تعداد سلول‌های ریزجلبک را نسبت به نمونه‌ی شاهد تا ۳۶ درصد افزایش داده است (Wondraczek *et al.*, 2013). همچنین در پژوهش دیگری، تغییرات طیفی اشعه‌ی UV-A به ناحیه فعال فتوسنتزی (Photosynthetically Active Radiation) با استفاده از ورق‌های پلی‌کربنات (PC) و پلی‌متیل متاکریلات (PMMA) پوشش داده شده با ماده

اصلاح طیف Uvitex OB به‌عنوان ابزاری برای افزایش نرخ رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که نرخ بهره‌وری زیست‌توده سلول‌هایی که در معرض نور اصلاح شده قرار داشتند به میزان ۷۴ و ۴۰ درصد (به‌ترتیب برای PC و PMMA) نسبت به نمونه شاهد افزایش پیدا کرد (Delavari Amrei *et al*., 2014). همچنین، پژوهش قبلی این محققان در سال ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از رنگ فلورسانس Uvitex OB (برای تبدیل نور UV-A به نور آبی)، بر روی دیواره ی یک فلاسک کشت، بهره‌وری زیست توده سیانوباکتری *سایتوکوکوس* (*Syanococcus*) را حدود ۳۸ درصد افزایش داده است (Delavari Amrei *et al*., 2014). در پژوهش دیگری از رنگ فلورسانس رودامین 6G (Rhodamin 6G) به‌عنوان پوشش فلورسنت برای افزایش نرخ رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. در یک فتوبیوراکتور صفحه تخت استفاده شد. نتایج این کار نشان داد که پوشش دیواره جلویی راکتور با رنگ مورد نظر موجب کاهش رشد ریزجلبک شده است، اما پوشش دیواره‌ی پشتی با این رنگدانه تولید زیست توده را تا ۵۰ درصد افزایش داده است (Delavari Amrei and Ranjbar, 2018). در تحقیق دیگری، از رنگ فسفرسانس برای اصلاح طیف استفاد و گزارش شد که تولید زیست توده ۵۰ درصد افزایش داشته است (Wondraczek *et al*., 2013).

می‌توان گفت که اصلاح طیفی نور به طریقی که نور تابشی را به محدوده‌ی طول موج‌های جذب میکروارگانیسم فتوسنتز کننده منتقل کند، باعث افزایش رشد خواهد شد. به‌همین دلیل در مطالعه حاضر، توانایی رنگدانه فیکوسیانین استخراج شده از سیانوباکتری *Spirulina platensis* در تبدیل طول موج‌های غیر کارامد نور سبز به طول موج‌های قرمز و اثر آن بر روی رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین محتوای رنگدانه کلروفیل a و تجمع لیپید نیز به‌دست آمده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت ریزجلبک: ریزجلبک *کلرلا* (*Chlorella* sp.; PTCC6010, Persian type culture) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و برای تست کارایی تبدیل فوتون مورد استفاده قرار گرفت. این ریزجلبک در محیط کشت رودیک (Rudic) و با pH تقریبی ۸ کشت داده شد (Klampaftis *et al*., 2009).

تهیه رنگدانه فیکوسیانین: رنگدانه طبیعی فیکوسیانین از ریزجلبک *Spirulina platensis* استخراج شد و برای اصلاح طیف مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور از سه مقدار متفاوت از ریزجلبک مورد آزمایش استخراج فیکوسیانین انجام شد و مقدار ۱g پودر خشک ریزجلبک *اسپیرولینا* به‌دلیل دارا بودن کیفیت رنگ مورد نیاز برای این کار انتخاب شد. پودر خشک با یک لیتر آب مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری شد. لازم به ذکر است که در طول ۲۴ ساعت، ظرف حاوی نمونه با فویل آلومینیوم پوشیده شد. سپس محلول با ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (Doke, 2005). پس از خارج کردن بقایای سلولی، فیکوسیانین حاصل به‌عنوان ماده اصلاح طیف در فتوبیوراکتور صفحه مسطح مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که ریزجلبک مورد نظر در فرآیند خشک کردن پاششی خشک شده است که باعث شده تا دیواره‌ی سلولی ریزجلبک شکسته شود و برای استخراج صرفاً از آب به‌عنوان حلال استفاده شود. بررسی پودر ریزجلبک در بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر میکروسکوپ نوری شکسته شدن دیواره سلولی را تایید می کند. میزان خلوص فیکوسیانین استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و با استفاده از رابطه ی زیر به‌دست آمد:

$$C-PC=(grade)=\frac{A_{620}}{A_{280}}$$

A_{620}= فیکوسیانین خالص و A_{280}= سایر پروتئین‌ها

روش اندازه‌گیری میزان خلوص رنگدانه

فیکوسیانین: میزان خلوص فیکوسیانین با استفاده از فرمول بالا محاسبه می‌شود، برای درجه (grade، گرید) مواد غذایی میزان خلوص مورد نیاز به درجه خلوص ۰/۷ و برای درجه‌های شیمیایی بالاتر نظیر reactive grade، ۳/۹ و برای آناتیکال درجه بالاتر از ۴ مورد نیاز است. در پژوهش انجام شده با جایگزینی مقدار چگالی نوری در ۶۲۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر این نسبت حدود ۰/۸ به‌دست آمد که خلوص رنگدانه استفاده شده آن را در گروه مواد غذایی قرار می دهد.

منبع تابش: از یک لامپ LED سفید به‌عنوان منبع نور استفاده شد. لامپ در ناحیه مرئی دارای دو پیک می باشد و تقریباً تمام طول موج های نور در محدوده ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر را پوشش می دهد. هرچند شدت آن در طول موج‌های مختلف متفاوت می‌باشد. شدت تمام لامپ‌های مورد استفاده بوسیله ی دستگاه کوانتومتر (QUA SKP215 SKYE Instruments Ltd, UK) از نظر تعداد فوتون خروجی یکسان سازی شد (Mohsenpour and Willoughby, 2016).

کشت در فتوبیوراکتور دو جداره: مرحله پیش کشت ریزجلبک درون یک فلاسک ارلن مایر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر (حجم کاری ۲۵۰ میلی‌لیتر) انجام شد. سپس ظرف کشت تحت تابش نور فلوئورسنت سفید با شدت $\mu mol\ photons\ m^{-2}s^{-1}$ ۱۰۰ قرار گرفت. پس از گذشت یک هفته از شروع کشت، محتویات ارلن مایر به‌طور مساوی بین دو راکتور صفحه تخت ساخته شده با صفحاتی از جنس پلکسی گلس (ابعاد راکتور cm^2 ۲۵×۴×۲۰) با گنجایش ۱۵۰۰ میلی لیتر (حجم کاری ۱۰۰۰ میلی لیتر) توزیع شد. در این پژوهش برای کشت ریزجلبک *Chlorella* sp. از محیط کشت Rudic و برای کشت سیانوباکتری *Spirulina platensis* از محیط کشت Zarrouk استفاده شد. برای هر فتوبیوراکتور در قسمت پشت آن یه قطعه آینه به منظور بازتابش نور تابیده شده قرار داده شد. در فتوبیوراکتورهای مورد استفاده در این پژوهش، محفظه‌ی کشت میکروجلبک در مجاورت منبع تابش و محفظه‌ی حاوی رنگدانه فیکوسیانین مابین محفظه‌ی کشت و آینه ی پشت راکتور قرار داشت. علت این نوع چیدمان این بود که پیش‌بینی می‌شد در صورتی که محفظه‌ی حاوی رنگدانه در مجاورت منبع تابش قرار داده شود، این رنگدانه همانند یک فیلتر عمل کرده و برخی از فوتون های قابل استفاده توسط ریزجلبک‌ها را فیلتر کند و از طرفی به‌دلیل ناپایداری این رنگدانه پروتئینی، در صورتی که فاصله-ی کمتری نسبت به منبع تابش داشت به‌دلیل وجود نور با شدت بالا احتمال تخریب رنگدانه در مدت زمان کوتاه‌تر افزایش پیدا می‌کرد. مطالعاتی در زمینه حساسیت رنگدانه فیکوسیانین نسبت به نور و دما انجام شده است، در یکی از این پژوهش ها گزارش شده که محلول فیکوسیانین در دمای 4^oC تا ۱۲۰ روز پایداری خود را تا حد بسیار زیادی حفظ می کند و در دمای 25 ± 2^oC پس از گذشت ۱۰ روز به میزان حدود ۸۰٪ پایداری خود را حفظ کرده است. این پژوهش نشان داد که درجه حرارت بحرانی برای پایداری فیکوسیانین 47^oC می باشد که در این درجه حرارت پایداری و زمان نیمه عمر با کاهش شدید روبرو می‌شود (Chaiklahan *et al.*, 2012). در پژوهش دیگری گزارش شده که نور با شدت 3×10^5 لوکس (Lux) به مدت ۲۴ ساعت می تواند تا ۸۰٪ رنگدانه را تخریب کند (Jespersen *et al.*, 2004). بنابراین هم نور و هم درجه حرارت اگر از حدی بالاتر باشد می تواند به سرعت رنگدانه را تخریب کند. به هر حال نور استفاده شده در پژوهش حاضر، بحدی نبوده که موجب آسیب جدی به رنگدانه‌ی فیکوسیانین شود. همچنین دمای آزمایش توانایی حفظ پایداری فیکوسیانین حداقل به‌مدت یک هفته را دارا بوده و پس از گذشت یک هفته از کشت محفظه‌ی حاوی رنگدانه تخلیه و با رنگدانه تازه پر شد. در فتوبیوراکتور شاهد محفظه‌ی مخصوص رنگدانه با آب دیونیزه پر شد. کشت در دمای

شکل ۱ - فتوبیوراکتور صفحه تخت دو لایه؛ پایین: نمونه شاهد، بالا: نمونه اصلی.

۲۵±۱°C انجام شد و مقدار تابش بر روی سطح راکتور برابر با ۴۹۰ µmol photons $m^{-2}s^{-1}$ و دوره نوردهی ۲۴ ساعت روشنایی و بدون دوره تاریکی انجام شد.

مشخصه‌های رشد: دانسیته نوری (OD) در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Philler Scientific, SU6100) اندازه‌گیری شد. رابطه بین غلظت زیست‌توده (X, gL^{-1}) یا همان وزن خشک سلولی و OD_{560} طبق معادله زیر به‌دست آمده است: (Delavari Amrei *et al*., 2015)

$$X = 0.49 \times OD_{560} \quad (۱)$$

دقت کار (R^2) این فرمول برابر با ۰/۹۸ می باشد. نرخ مخصوص رشد (µ, day^{-1}) با استفاده از معادله‌ی (۲) محاسبه شد:

$$\mu = \frac{\ln(\frac{X_t}{X_0})}{t} \quad (۲)$$

که در رابطه بالا X_t غلظت زیست توده ($mg1^{-1}$) در زمان t و X_0 غلظت در ابتدای کشت می‌باشد. همچنین نرخ بهره‌وری زیست توده (P, g L^{-1} day^{-1}) از طریق رابطه زیر به‌دست آمده است:

$$P = \frac{(X_f - X_0)}{t_f} \quad (۳)$$

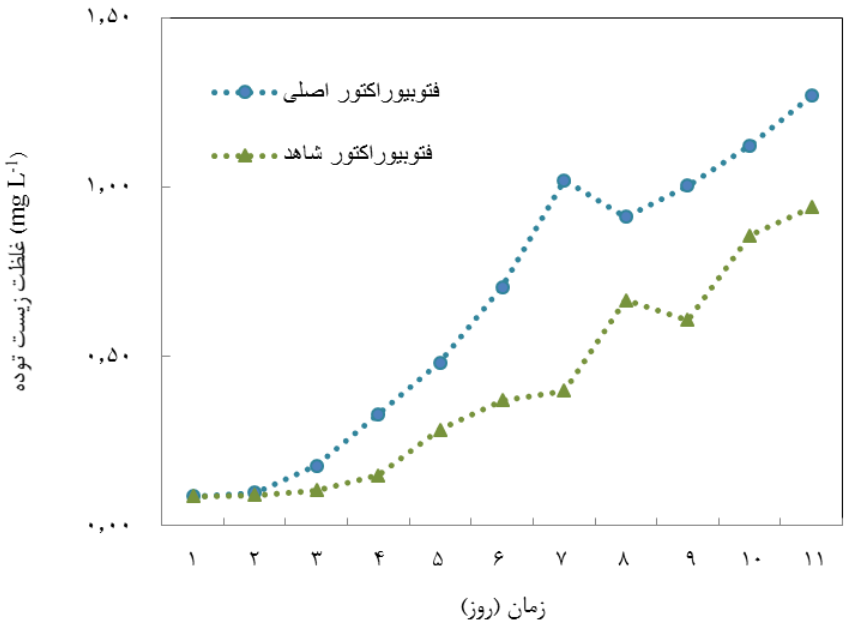
که X_f در رابطه بالا غلظت زیست توده در آخرین روز آزمایش یا همان زمان t_f می‌باشد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a: برای اندازه‌گیری طیف جذب رنگدانه استخراج شده، ۲ میلی‌لیتر از نمونه در ظرف مورد نظر ریخته شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (HERMLE, Z206A) شد. مایع بالای ریزجلبک‌های ته‌نشین شده دور ریخته شده و به جای آن ۲ میلی‌لیتر متانول به ظرف نمونه اضافه شد. نمونه حاصل به‌مدت ۴۵ دقیقه درون حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس رنگدانه‌ها به‌همراه ۲ میلی‌لیتر متانول درون حمام یخ به‌مدت یک شب قرار داده شد و بعد از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۲۵۰۰×g سانتریفیوژ شد تا بقایای سلولی جدا شود. نهایتاً برای تعیین محتوی کلروفیل a جذب نمونه حاصل در طول موج های ۶۶۲ و ۶۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis (Philler Scientific, SU6100) به‌دست آمد و از رابطه زیر استفاده شد:

$$Chlorophyll - a\ (C_a) = 11.75 \times OD_{662} - 2.350 \times OD_{645} \quad (۴)$$

اندازه‌گیری میزان جذب و شدت نور: میزان جذب محلول فیکوسیانین برای انجام آزمایش پایداری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که ۳ میلی‌لیتر از نمونه در داخل دستگاه قرار داده شد و جذب نمونه در ۶۲۰ نانومتر به‌دست آمد. همچنین برای اندازه گیری شدت نور مرئی از دستگاه کوانتومتر (QUA SKP215 SKYE Instruments Ltd, UK) استفاده شد (Mohsenpour and Willoughby 2016). اندازه گیری شدت نور با استفاده از دستگاه کوانتومتر باعث می‌شود که تمامی منابع نور مورد استفاده از لحاظ تعداد فوتون خروجی یکسان باشند. طیف انتشار و عبور محلول فیکوسیانین با استفاده از دستگاه نورسنج با وضوح زیاد (Lasertech, Aura 4000; England) به‌دست آمد.

اندازه‌گیری لیپید: در روش اصلاح شده (Bligh



شکل ۲ - منحنی رشد میکروجلبک کلرلا بر حسب زمان.

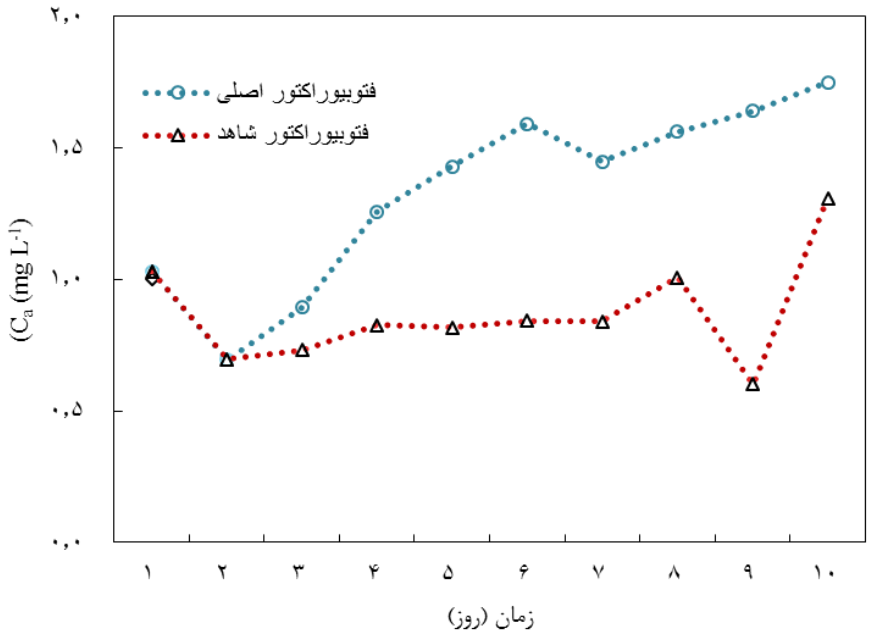
جدول ۱- مشخصه‌های رشد میکرو جلبک کلرلا.

نمونه	μ_{max} (day^{-1})	P ($g\ L^{-1}\ day^{-1}$)
فتوبیوراکتور اصلی	۰/۳۳۳	۰/۶۰۳۰
فتوبیوراکتور شاهد	۰/۲۰۳	۰/۴۳۵۵

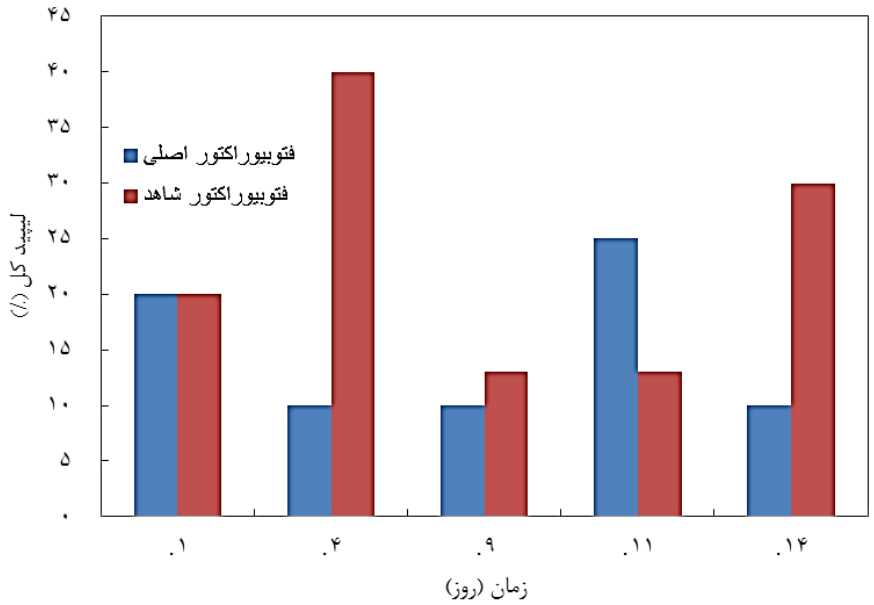
and DYER 1959) ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی میکروجلبک به‌مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۴۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد و پس از خارج کردن آب بالای نمونه، به سلول‌های جدا شده به نسبت ۸:۲:۱ به‌ترتیب کلروفرم، متانول و آب مقطر افزوده شد و نمونه به‌مدت ۸ ساعت در دستگاه شیکر (Domel vibromix50) با ۲۰۰rpm قرار داده شد. پس از آن با افزودن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی لیترکلروفرم محلولی دو فازی تشکیل شد. سانتریفیوژ مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۲۰۰ rpm موجب ایجاد یک مخلوط سه فازی شد. فاز آلی که در پایین لوله قرار داشت، به‌عنوان محلول حاوی روغن برداشت شد. فاز بالایی پس از افزودن ۲ میلی‌لیترآب مقطر و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم مجدداً سانتریفیوژ شد تا در دو مرحله روغن تولیدی استحصال شود. کلروفرم محلول در روغن تحت خلاء تبخیر شد و روغن باقیمانده توزین شد.

نتایج

در شکل ۲ منحنی رشد میکروجلبک کلرلا بر حسب زمان نشان داده شده است. حداکثر وزن خشک gL^{-1} ۱/۲۶ تحت تاثیر نور اصلاح شده با رنگدانه‌ی فیکوسیانین در فتوبیوراکتور اصلی به‌دست آمد. حداکثر وزن خشک به‌دست آمده برای فتوبیوراکتور شاهد $g\ L^{-1}$ ۰/۹ بود که از این نظر فتوبیوراکتور اصلی نسبت به فتوبیوراکتور شاهد ۲۶ درصد بیومس بیشتری تولید کرده است. همچنین نرخ بهره‌وری زیست‌توده (P) در فتوبیوراکتور اصلی نسبت به فتوبیوراکتور شاهد ۲۸ درصد بیشتر بود. همچنین ماکزیمم نرخ رشد مخصوص در راکتور اصلی نسبت به راکتور شاهد ۴۰ درصد افزایش نشان داد (جدول ۱).



شکل ۳ - تغییرات میزان کلروفیل بر حسب زمان.



شکل ۴ - تغییرات محتوی لیپید درون سلولی بر حسب زمان.

تغییرات میزان کلروفیل a بر حسب زمان در شکل ۳ آمده است. در هر دو فتوبیوراکتور با افزایش رشد میزان کلروفیل a نیز افزایش پیدا کرده است، البته این افزایش نرخ رشد کلروفیل a در راکتور اصلی بیشتر از راکتور شاهد بوده است. بررسی نسبت میزان کلروفیل a در دو راکتور نشان می‌دهد که در پایان هفته اول کشت راکتور اصلی نسبت به راکتور شاهد ۴۸ درصد کلروفیل a بیشتری تولید کرده است. همچنین در پایان هفته دوم کشت این نسبت برابر با ۲۶ درصد به‌دست آمد.

بررسی محتوای لیپید میکروجلبک کلرلا:

تغییرات محتوای لیپید سلولی بر حسب زمان در شکل ۴ ارائه شده است. حداکثر مقدار لیپید تولید شده در فتوبیوراکتور اصلی برابر با ۲۵ درصد و در هفته اول کشت به‌دست آمد در صورتی که در فتوبیوراکتور شاهد حداکثر مقدار لیپید برابر با ۴۰ درصد و در هفته دوم کشت به‌دست آمد. درهر دو راکتور با گذشت زمان از روز سوم تا روز هشتم

محتوای لیپید کاهش پیدا کرد و در روزهای پایانی کشت نمونه‌ها با افزایش نسبی محتوای لیپید مواجه شدند. نمونه‌گیری برای اندازه‌گیری لیپید در روزهایی که تست لیپید انجام شده صبح بوده است.

بحث

نور اصلاح شده با رنگ فلورسانس قرمز و آبی دارای طیف‌های مناسبی برای رشد ریزجلبک‌ها می‌باشد (Seo *et al*., 2014)، به همین علت استفاده از فیکوسیانین که رنگدانه‌ای فلورسانس می‌باشد و با دریافت طول موج‌های نور سبز، آن را در ناحیه نور قرمز انتشار می‌دهد، می‌تواند تاثیر قابل توجهی بر رشد ریزجلبک‌ها داشته باشد (Seo *et al*., 2014). مطالعات زیادی تاثیر مثبت نور قرمز نسبت به سایر طول موج‌های نور مرئی را بر رشد و افزایش رنگدانه‌ی سلولی تایید کرده است. به همین علت در این کار، در فتوبیوراکتور اصلی نسبت به فتوبیوراکتور شاهد رشد ریزجلبک *Chlorella* sp. افزایش قابل توجهی پیدا کرد. از نتایج حاصل از تاثیر نور اصلاح شده با فیکوسیانین بر میزان کلروفیل سلولی می‌توان نتیجه گرفت که تبدیل طیف ناکارامد نور سبز به نور قرمز می‌تواند کلروفیل سلولی را افزایش دهد. با توجه به اینکه فیکوسیانین دارای انتشار مناسبی در محدوده نور قرمز می باشد این مورد باعث شده است که علی رغم جذب طول موج‌های زرد و نارنجی توسط این رنگدانه، طول موج هایی که برای فتوسنتز مفید هستند، بازده فتوسنتز و نهایتاً نرخ تولید زیست توده در راکتور اصلی افزایش یابد.

در کارهای دیگری که توسط محققان انجام شده است به کارگیری رنگدانه رودامین 6G و یک ماده فسفری به نام $Sr_{0.4}Ca_{0.59}Eu_{0.01}S$ به‌ترتیب موجب افزایش ۵۰ و ۳۶ درصدی در میزان نرخ بهره‌بروی زیست توده و تعداد سلول‌ها شده است (Delavari Amrei and Ranjbar, 2018; Wondraczek *et al*., 2013). هر دو ماده اصلاح کننده طیف استفاده شده در این پژوهش‌ها تقریباً عملکردی مشابه فیکوسیانین استفاده شده در این تحقیق داشته‌اند یعنی تبدیل طول موج‌های کم فایده‌تر برای فتوسنتز مانند سبز یا زرد به طول موج های پرفایده‌تر مانند نارنجی یا قرمز. اما به هر حال استفاده از فیکوسیانین به‌عنوان یک رنگدانه طبیعی توانسته است رشد سلول‌ها را تا حد زیادی افزایش دهد.

به‌علاوه این‌که طبق گزارش Seo و همکاران (۲۰۱۴) نور قرمز نسبت به نور آبی بازده کوانتومی بهتری دارد و به‌همین دلیل آن‌ها شاهد افزایش رشد سلول هاو همچنین افزایش تولید رنگدانه کلروفیل a تحت تابش نور اصلاح شده به قرمز بوده‌اند (Seo *et al*., 2014). در این کار نیز افزایش محتوی کلروفیل a به‌دست آمده است که می‌توان گفت علت آن افزایش فوتون‌های قرمز در راکتور اصلی بوده است.

یکی از فاکتورهایی که بر تجمع لیپید سلولی تاثیر گذار است عامل فقر نیتروژن می‌باشد. بدیهی است که با گذشت زمان نیتروژن موجود در محیط کشت توسط ریزجلبک مصرف شده و سلول ها با فقر نیتروژن در محیط کشت مواجه می شوند. به همین علت در روزهای پایانی کشت تجمع لیپید سلولی افزایش یافته است. تحقیقات زیادی در زمینه تاثیر نوع نور بر تجمع لیپید سلولی ریزجلبک ها انجام شده است. در پژوهشی که توسط (Seo *et al*., 2014) انجام شد حداکثر مقدار لیپید تحت نور اصلاح شده با رنگ آبی و به مقدار ۳۰ درصد به‌دست آمد. همچنین در پژوهشی دیگر حداکثر مقدار لیپید در یک فتوبیوراکتور ستون حبابی نوردهی شده با استفاده از مواد اصلاح طیف تولید کننده طیف آبی ۳۶ درصد به‌دست آمد. این پژوهشگران گزارش دادند که کمترین محتوای لیپید در فتوبیوراکتورهایی که در آن‌ها از مواد اصلاح طیف تولید کننده طیف‌های قرمز و نارنجی استفاده شده بود به‌دست آمد. به نظر می رسد که نور آبی بیش از سایر رنگ‌ها بر انباشت لیپید در میکروجلبک‌ها موثر است (Mohsenpour and Willoughby, 2016; Seo *et al*., 2014).

به‌عنوان جمع‌بندی می‌توان بیان داشت که استفاده از تکنیک اصلاح طیفی توسط یک رنگدانه طبیعی استخراج شده از سیانوباکتری سبز-آبی *اسپیرولینا* تاثیر قابل توجهی دربر میزان رشد میکروجلبک سبز *کلرلا* داشته است؛ به‌طوری‌که استفاده از محلول فیکوسیانین در لایه پشتی در یک فتوبیوراکتور دولایه نرخ تولید زیست توده را ۲۶ درصد افزایش داده است. به‌علاوه این‌که استفاده از این رنگدانه باعث افزایش محتوی کلروفیل سلولی نیز شده است. اما به هر حال محتوای لیپید علی‌رغم افزایش تولید بیومس کاهش یافته است. با توجه به اینکه فیکوسیانین از خانواده پروتئین‌ها می‌باشد و در مجاورت نور با شدت بالا و درجه حرارت زیاد ناپایدار می باشد، طبق نتایج در پژوهش های محققان قبلی نتیجه‌گیری شد که شدت نور استفاده شده در این پژوهش، همچنین دمای محیط حداقل به‌مدت یک هفته تاثیر نامطلوبی بر کیفیت فیکوسیانین ندارد. به همین جهت پس از گذشت یک هفته از کشت محفظه فیکوسیانین تخلیه و با محلول فیکوسیانین تازه پر شد.

تقدیر و تشکر

از پشتیبانی و حمایت صمیمانه جناب آقای دکتر سبحانی مدیر عامل شرکت حوراطب تهران قدردانی می شود. همچنین از همکاری کارشناسان آزمایشگاه محیط زیست و انرژی واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه بجنورد کمال تشکر را داریم.

منابع

Achara N. 2012. Biofuel from algae. *Journal of American Science* 8(1), 240-244.

Delavari Amrei H., Nasernejad B., Ranjbar R., Rastegar S. 2014. Spectral shifting of UV-A wavelengths to blue light for enhancing growth rate of cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 26(3), 1493-1500.

Delavari Amrei H., Ranjbar R. 2018. Influence of fluorescent coating at rear and front side of a flat panel photobioreactor on algal growth. *Journal of Applied Phycology* 30(2), 901-907.

Delavari Amrei H., Ranjbar R., Rastegar S., Nasernejad B., Nejadebrahim A. 2015. Using fluorescent material for enhancing microalgae growth rate in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 67-74.

Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8), 911-917.

Chaiklahan R., Chirasuwan N., Bunnag B. 2012. Stability of phycocyanin extracted from Spirulina sp.: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry* 47(4), 659-664.

Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3), 294-306.

Delavari Amrei H., Nasernejad B., Ranjbar R., Rastegar S. 2014. An integrated wavelength-shifting strategy for enhancement of microalgal growth rate in PMMA-and polycarbonate-based photobioreactors. *European Journal of Phycology* 49(3), 324-331.

Doke J.M. 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from Spirulina sp. *International Journal of Food Engineering 1*(5).

Jenkins G.I. 2009. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 407-431.

Jespersen L., Strømdahl L.D., Olsen K., Skibsted L.H. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology* 220(3-4), 261-266.

Klampaftis E., Ross D., McIntosh K.R., Richards B.S. 2009. Enhancing the performance of solar cells via luminescent down-shifting of the incident spectrum: A review. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 93(8), 1182-1194.

Matthijs H.C., Balke H., Van Hes U.M., Kroon, B.M., Mur L.R., Binot R.A. 1996. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (Chlorella pyrenoidosa). *Biotechnology and Bioengineering* 50(1), 98-107.

Mohsenpour S.F., Richards B., Willoughby N. 2012. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology* 125, 75-81.

Mohsenpour S.F., Willoughby N. 2016. Effect of CO2 aeration on cultivation of microalgae in luminescent photobioreactors. *Biomass and Bioenergy* 85, 168-177.

Seo Y.H., Cho C., Lee J.-Y., Han J.-I. 2014. Enhancement of growth and lipid production from microalgae using fluorescent paint under the solar radiation. *Bioresource Technology* 173, 193-197.

Wang C.-Y., Fu C.-C., Liu Y.-C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of

Spirulina platensis. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21-25.

Wondraczek L., Batentschuk M., Schmidt M.A., Borchardt R., Scheiner S., Seemann B. 2013. Solar spectral conversion for improving the photosynthetic activity in algae reactors. *Nature Communications* 4, 20-47.

Enhancing growth of microalgae *Chlorella* sp. in a double layer photobioreactor using phycocyanin solution

Zahra Khoobkar[1], Hossein Delavari Amrei*[2]

[1]Department of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Bojnord, Bojnord, Iran.
*Corresponding author: h.delavari@ub.ac.ir

Received: 2018/7/12 Accepted: 2018/12/7

Abstract

The focus of study is the investigation of growth rate, chlorophyll *a* content and lipid accumulation of microalgae *chlorella* sp. under the white light spectral conversion by a natural pigments, phycocyanin. For this purpose, in front side layer of a two-layer photobioreactor microalgae *chlorella* sp. was cultivated and rear layer was filled with phycocyanin solution (main sample). The results were compared with control reactor that its front side layer was filled with deionized water instead of phycocyanin. The photobioreactors were placed under 490 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$ at 27 ± 1°C for 14 days. Results showed that, phycocyanin solution increased biomass productivity rate and maximum specific growth rate 28% and 40%, respectively. Also, chlorophyll a content has increased up to 34% at the end of the cultivation. But lipid content is decreased due to the spectral conversion by phycocyanin. Generally, spectral conversion using phycocyanin caused increasing in biomass productivity rate and chlorophyll content of microalgae *Chlorella* sp..

Keywords: Microalgae, Photobioreactor, Phycocyanin, *Chlorella*, Spectral conversion.