



University of Tehran



College of  
Engineering

Faculty of Chemical  
Engineering

# Effects of media and photo bioreactor operating parameters in microalgae *Dunaliella Salina*, increase in beta-carotene content

A thesis submitted to the Graduate Studies Office

In partial fulfillment of the requirements for

The degree of Master of Science in

Pharmaceutical Engineering

By:

**Mahsa Yazdani**

Supervisor:

**Dr. Omid Tavakoli**

Co-supervisor:

**Dr. Mohammad Ali Faramarzi**

## **Abstract**

Dunaliella Salina is one of the interesting microalgae producing carotenoids, especially beta-carotene. The amount of beta-carotene produced from Dunaliella Salina is 14% by weight of algae and is much higher compared with carrots and other fruits and vegetables containing this pigment, with considerable disparities. Owing to the importance of the environmental conditions which affect the growth and pigment production of this micro-alga, various studies have been done.

In this study, environmental factors affecting the Dunaliella Salina such as light intensity, temperature, pH, culture medium, NaCl salt content, and bioreactor volume were investigated, and not only the effect of each of these factors but also their interaction effects were studied. Extraction of different materials was carried out with solvent. Optimization of the growth process and obtaining the optimum level of each environmental factor for the growth of various pigments were performed by Minitab software and the Response Surface Method (central composite design). 33 conditions were randomly selected and grown in each of the designated points. The highest biomass production was observed at the light intensity of 12,000 lux, the temperature of 25 ° C, the pH of 8.75, the NaCl concentration of 0.5 molars, and the volume of 1000 ml of bioreactor. These numbers for the optimized production of beta-carotene were respectively 7636 lux, the approximate temperature of 30 ° C, the pH equal to 11.7, the NaCl content of 0.5 M and the volume of the bioreactor was approximately 600 ml. The levels of chlorophyll a, chlorophyll b, and total carotenoids were also evaluated. Three replications were done for each experiment to increase the accuracy. Then, using the analysis of variance and considering regression and p-value, experimental relationships were obtained for extracting carotenoids from each microalga. Furthermore, the effects of NaCl shocks, as one of the exacerbated environmental factors, have been studied on growth, beta-carotene, chlorophyll a, and chlorophyll b production.

**Keywords:** Dunaliella saline microorganism, beta-carotene, carotenoids, NaCl salt shock

## چکیده

ریز جلبک دونالیا سالیئا از مهم‌ترین ریز جلبک‌های تولید کننده‌ی کاروتنوئیدها و به‌ویژه بتاکاروتن است. میزان تولید بتاکاروتن از دونالیا سالیئا ۱۴ درصد وزن خشک جلبک بوده و در مقایسه با هویج و دیگر میوه و سبزیجات حاوی این رنگدانه، بسیار بیش‌تر بوده و دارای اختلاف قابل ملاحظه‌ای است. از این رو، شرایط محیطی موثر در رشد این میکرو جلبک بسیار حائز اهمیت بوده و مطالعات مختلفی در این حوزه صورت گرفته است.

در این مطالعه، عوامل محیطی موثر بر رشد مانند شدت نور، دما، pH محیط کشت، مقدار نمک NaCl و حجم بیوراکتور مورد بررسی قرار گرفته و نه تنها اثر هر یک از این عوامل به تنهایی، بلکه اثر تداخلی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج مواد مختلف به منظور سهولت با حلال انجام گرفت. بهینه‌سازی فرآیند رشد و به‌دست آوردن میزان بهینه‌ی هر یک از عوامل محیطی برای رشد رنگدانه‌های مختلف توسط نرم‌افزار Minitab و روش پاسخ سطحی (طرح ترکیب مرکزی) انجام گردید و ۳۳ آزمایش به صورت تصادفی انتخاب و رشد در هر یک از نقاط تعیین شده انجام شد. بیش‌ترین میزان تولید توده‌ی زیستی در شدت نور ۱۲۰۰۰ لوکس، دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد، pH برابر با ۸/۷۵، مقدار نمک NaCl ۰/۵ مولار و حجم بیوراکتور ۱۰۰۰ میلی‌لیتر مشاهده شد. این اعداد در مورد تولید بتاکاروتن به ترتیب برابر با شدت نور تقریبی 7636 لوکس، دمای تقریبی ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد، pH برابر با ۷/۱۱، مقدار نمک NaCl ۰/۵ مولار و حجم بیوراکتور تقریبی ۶۰۰ میلی‌لیتر بود. همچنین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و میزان کل کاروتنوئیدها هم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور افزایش دقت هر آزمایش سه بار تکرار شد. سپس با استفاده از آنالیز واریانس و با توجه به مقدار رگرسیون و مقدار p، روابط تجربی برای استخراج کاروتنوئیدها از هر کدام از ریز جلبک‌ها به‌دست آمد. علاوه بر موارد فوق، اثر شوک نمکی NaCl، به عنوان یکی از عوامل محیطی تشدید شده، بر میزان رشد ریز جلبک، تولید بتاکاروتن، کلروفیل a و کلروفیل b نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

**کلمات کلیدی:** ریز جلبک دونالیا سالیئا، بتاکاروتن، کاروتنوئیدها، شوک نمکی NaCl

## فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه	11
۱-۱- مقدمه	11
۱-۱-۱- اهمیت موضوع	11
۱-۱-۲- اهداف پروژه	12
۱-۱-۳- خلاصه فصل‌ها	12
۲-۱- ریز جلبک‌ها	12
۱-۲-۱- مقدمه	12
۲-۲-۱- جلبک‌های سبزآبی	13
۳-۲-۱- <i>دونالیا سالینا</i>	14
۳-۱- کاروتنوئیدها	18
۱-۳-۱- مصارف کاروتنوئیدها	22
۲-۳-۱- فیزیولوژی تشکیل کاروتنوئیدها	22
۳-۳-۱- مزایای درمانی کاروتنوئیدها	26
۴-۱- بتاکاروتن	27
۵-۱- فتوبیوراکتور	30
۶-۱- طراحی آزمایش	33
فصل 2: مروری بر منابع	36
فصل 3: روش تحقیق	41
۱-۳- تجهیزات آزمایشگاهی	41
۱-۱-۳- مواد و تجهیزات	41
۲-۳- کشت جلبک <i>دونالیا سالینا</i>	42
۱-۲-۳- خالص‌سازی نمونه	42
۲-۲-۳- شناسایی ریز جلبک‌ها به کمک آنالیز مولکولی 18 S rDNA	42
۳-۲-۳- انجام عملیات BLAST جهت شناسایی سویه ریز جلبک	43
۴-۲-۳- ساخت محیط کشت اصلاح‌شده‌ی جانسون	43
۳-۳- روش شمارش جلبک <i>دونالیا سالینا</i>	45

- ۳-۳-۱- شمارش تعداد سلول‌ها به کمک هموسایتومتر..... 45
- ۳-۳-۲- شمارش تعداد سلول‌ها به روش کدورت‌سنجی..... 46
- ۳-۳-۳- شمارش تعداد سلول‌ها به روش اندازه‌گیری وزن توده زیستی..... 47
- ۳-۴-۴- روش محاسبه‌ی ضریب رشد ویژه..... 47
- ۳-۵-۵- اندازه‌گیری سایر ویژگی‌های ریزجلبک‌ها..... 48
- ۳-۵-۱- محاسبه‌ی میزان کلروفیل a ، b و میزان کل کاروتنوئیدها..... 48
- ۳-۵-۲- محاسبه‌ی میزان بتاکاروتن..... 48
- ۳-۶- بررسی اثر شوک نمکی NaCl در میزان تولید توده‌ی سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل a و کلروفیل b در شرایط بهینه‌ی رشد..... 49
- ۳-۷- تغییر ژئومتریک فتوبیوراکتور ایرلیفت..... 49
- ۳-۸- طراحی آزمایش..... 49
- فصل 4: نتایج و تحلیل داده‌ها..... 54
- ۴-۱- شناسایی ریزجلبک‌ها به کمک آنالیز مولکولی 18 S rDNA..... 54
- ۴-۲- انجام عملیات BLAST جهت شناسایی سویه ریزجلبک *دونالیلا سالینا*..... 55
- ۴-۳- شمارش جلبک *دونالیلا سالینا*..... 55
- ۴-۳-۱- شمارش تعداد سلول‌ها به کمک هموسایتومتر..... 55
- ۴-۳-۲- شمارش تعداد سلول‌ها به روش اندازه‌گیری وزن توده‌ی زیستی..... 55
- ۴-۴- محاسبه‌ی ضریب رشد ویژه..... 56
- ۴-۵- طراحی آزمایش..... 56
- ۴-۵-۱- بررسی بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید توده‌ی زیستی ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با استفاده از مدل RSM..... 58
- ۴-۵-۲- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید بتاکاروتن از ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با استفاده از مدل RSM..... 61
- ۴-۵-۳- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید کلروفیل a از ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با استفاده از مدل RSM..... 63
- ۴-۵-۴- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید کلروفیل b از ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با استفاده از مدل RSM..... 66
- ۴-۵-۵- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای محاسبه‌ی کل کاروتنوئید تولید شده از ریزجلبک *دونالیلا سالینا* با استفاده از مدل RSM..... 69
- ۴-۶- بررسی اثر شوک نمکی NaCl در میزان تولید توده‌ی سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل a و کلروفیل b در شرایط بهینه‌ی رشد..... 72

72	۱-۶-۴- بررسی اثر شوک نمکی در میزان توده‌ی سلولی.....
72	۲-۶-۴- بررسی اثر شوک نمکی در میزان تولید بتاکاروتن.....
73	۳-۶-۴- بررسی اثر شوک نمکی در میزان تولید کلروفیل a.....
74	۴-۶-۴- بررسی اثر شوک نمکی در میزان تولید کلروفیل b.....
76	فصل 5: نتیجه‌گیری.....
76	۱-۵- نتیجه‌گیری.....
78	۲-۵- نوآوری پژوهش.....
78	۳-۵- پیشنهادات.....
79	مراجع.....

## فهرست شکل‌ها

- شکل (1-1) عکس میکروسکوپی گونه *دونالیلا سالینا* ..... 15
- شکل (2-1) ساختار شیمیایی انواع کاروتنوئیدها و زانتوفیل [25] ..... 20
- شکل (3-1) مسیر بیوسنتز انواع کاروتنوئیدها [30] ..... 21
- شکل (4-1) مشخصه رنگ انواع کاروتن‌ها [35] ..... 23
- شکل (5-1) خط سیر سنتز تولید GGPP در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* [36] ..... 24
- شکل (6-1) خط سیر فرضی تولید کاروتن‌ها در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* [36] ..... 26
- شکل (7-1) انواع ایزومرهای بتاکاروتن ..... 28
- شکل (8-1) رابطه‌ی میان سه هدف اصلی طراحی آزمایش [51] ..... 34
- شکل (2-3) لام هموسایتومتر (نئوبار) ..... 45
- شکل (3-3) تقسیم‌بندی زیر میکروسکوپی لام هموسایتومتر ..... 46
- شکل (1-4) نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمر بالادست و پایین‌دست ریزجلبک *دونالیلا سالینا* ..... 54
- شکل (2-4) نتیجه‌ی حاصل از انجام BLAST جهت شناسایی گونه‌ی ریزجلبک ..... 55
- شکل (3-4) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید توده‌ی زیستی ..... 60
- شکل (4-4) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها ..... 60
- شکل (5-4) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید بتاکاروتن ..... 62
- شکل (6-4) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها ..... 63
- شکل (7-4) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید کلروفیل a ..... 65
- شکل (8-4) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها ..... 66
- شکل (9-4) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید کلروفیل b ..... 68
- شکل (10-4) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها ..... 68
- شکل (11-4) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید کل کاروتنوئیدها ..... 70
- شکل (12-4) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها ..... 71
- شکل (13-4) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید توده‌ی سلولی ..... 72
- شکل (14-4) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید بتاکاروتن ..... 73
- شکل (15-4) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید کلروفیل a ..... 74
- شکل (16-4) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید کلروفیل b ..... 75

## فهرست جدول‌ها

- جدول (1-1) مقایسه‌ی محتویات جلبک *دونالیلا سالیئا* با مواد غذایی و جلبک‌های دیگر [17]..... 16
- جدول (2-1) مقادیر متفاوت از انواع بتاکاروتن‌های موجود در دونالیلا سالیئا [13]..... 17
- جدول (3-1) خلاصه‌ای از تأثیر پارامترهای محیطی مختلف بر تولید زیست توده و محتوای بتاکاروتن دونالیلا سالیئا کشت شده [38] (+ : اثر تحریک کننده، - : اثر بازدارنده، 0: بدون تأثیر)..... 29
- جدول (4-1) مزایا و معایب برخی از فتوبیوراکتورها در کشت ریزجلبک [46]..... 31
- جدول (1-2) بررسی بهینه‌ی پارامترهای مختلف و شرایط عملیاتی کشت در تحقیقات قبلی در مورد دونالیلا سالیئا..... 38
- جدول (1-3) مواد استفاده شده در فرآیند کشت میکروجلبک دونالیلا سالیئا و استخراج بتاکاروتن از آن..... 41
- جدول (2-3) تجهیزات استفاده شده در روند کشت میکروجلبک دونالیلا سالیئا و استخراج بتاکاروتن از آن..... 41
- جدول (3-3) نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن 18s rDNA ریزجلبک‌ها [68]..... 43
- جدول (4-3) مواد اصلی تشکیل‌دهنده‌ی محیط کشت اصلاح‌شده‌ی جانسون..... 43
- جدول (5-3) محلول آهن..... 44
- جدول (6-3) عناصر کمیاب موجود در محیط کشت اصلاح‌شده‌ی جانسون..... 44
- جدول (7-3) مقایسه‌ی رنگ‌سنجی با به‌کارگیری حلال‌های مختلف..... 48
- جدول (8-3) ویژگی‌های سه راکتور ایرلیفت با نسبت سطح به حجم متفاوت به‌کار برده شده در آزمایش..... 49
- جدول (9-3) طراحی آزمایش براساس روش پاسخ سطحی در نرم‌افزار Minitab..... 50
- جدول (1-4) نتایج به‌دست آمده از انجام آزمایش‌های مختلف پیش‌بینی شده با طراحی آزمایش..... 56
- جدول (2-4) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲..... 58
- جدول (3-4) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید توده‌ی زیستی و مقدار ضرایب آن‌ها..... 59
- جدول (4-4) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی توده‌ی زیستی..... 61
- جدول (5-4) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲..... 61
- جدول (6-4) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید بتاکاروتن و مقدار ضرایب آن‌ها..... 62
- جدول (7-4) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی بتاکاروتن..... 63
- جدول (8-4) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲..... 64
- جدول (9-4) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید کلروفیل a و مقدار ضرایب آن‌ها..... 64
- جدول (10-4) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی کلروفیل a..... 66

- جدول (4-11) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲ ..... 67
- جدول (4-12) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید کلروفیل b و مقدار ضرایب آن‌ها ..... 67
- جدول (4-13) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی کلروفیل b ..... 69
- جدول (4-14) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲ ..... 69
- جدول (4-15) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید کل کاروتنوئیدها و مقدار ضرایب آن‌ها ..... 70
- جدول (4-16) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی کل کاروتنوئیدها ..... 71
- جدول (5-1) خلاصه‌ای از بهینه‌ی پارامترهای مختلف محیطی و شناسایی اثر آن‌ها بر مقدار تولیدی کاروتنوئیدها و کلروفیل ..... 76
- جدول (5-2) بیش‌ترین میزان تولیدی هر یک از مواد در مولاریته‌های مختلف شوک نمکی NaCl ..... 78

## فهرست علائم اختصاري

علامت اختصاری	نام
RNA	اسید ریبونوکلیک
DNA	اسید دزوکسی ریبونوکلیک
pH	لگاریتم منفی غلظت یون هیدروژن
°C	درجه سانتی‌گراد
RSM (Response Surface Method)	روش پاسخ سطحی
CCD (Central Composite Design)	طرح ترکیب مرکزی

# فصل ۱ : مقدمه

## ۱-۱- مقدمه

### ۱-۱-۱- اهمیت موضوع

رویکرد جهانی امروز در راستای توجه به محصولات زیستی با در نظر گرفتن اثرات زیست‌محیطی کمتر بوده و همواره کمبود آب، دلیل تعیین کننده در استفاده از این محصولات است. یکی از محصولات استراتژیک که در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد کاروتنوئیدها و به‌ویژه بتاکاروتن است که به‌طور طبیعی در ارگانسیم‌های فتوسنتزی تولید می‌شوند [1]. از کاربردهای آن می‌توان به پیش‌ساز ویتامین A، آنتی‌اکسیدان قوی، نقش در حفظ سلامت پوست و قلب و عروق اشاره کرد. به‌علت توجه به تولید کاروتنوئیدها از روش‌های بیوسنتزی، توجه به منابع طبیعی آن‌ها افزایش یافته است [2]. از جمله منابع مهم تولیدکننده‌ی این ترکیبات گونه‌های مختلف ریزجلبک می‌باشند که مورد توجه محققین و صنایع قرار گرفته است. در مورد بتاکاروتن، جلبک‌های سبز *نکسلولی* به‌ویژه *دونالیلا سالینا*<sup>1</sup> و *دونالیلا باردویل*<sup>2</sup> به‌عنوان منبع تولید محسوب می‌شوند که ایجاد کاروتنوئید در کلروپلاست و تحت شرایط استرس صورت گرفته و بیش از ۱۲ درصد وزن خشک این ریزجلبک‌ها را بتاکاروتن تشکیل داده است [3]. از دیگر منابع طبیعی بتاکاروتن می‌توان به باکتری *اسفینگوموناس*<sup>3</sup> و قارچ‌های *تریسپورا بلاکسا*<sup>4</sup> و *رودوترولا گوتینیس*<sup>5</sup> اشاره کرد [4].

از بین مواد مغذی، فسفات، نیترات و کربن از اهمیت بیشتری در رشد این ریزجلبک برخوردارند و با تغییر مقادیر آن‌ها احتمالاً می‌توان شاهد تغییرات چشمگیری بود [5]. از روش‌های استخراج بتاکاروتن هم می‌توان به استخراج با حلال (هگزان، متانول، ...) و استخراج فوق بحرانی با دی‌اکسید کربن اشاره کرد که استخراج با حلال به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین روش‌های جداسازی شناخته شده است. استخراج فوق بحرانی با دی‌اکسیدکربن فناوری پیشرفته‌ای

<sup>1</sup> Dunaliella Salina

<sup>2</sup> Dunaliella Bardawil

<sup>3</sup> Spingomonas

<sup>4</sup> Blakeslea Trispora

<sup>5</sup> Rhodotorula Glutinis

است که با توجه به مزایای استفاده از دی‌اکسیدکربن به عنوان حلال، از جمله سمیت کم، کم‌هزینه بودن و جداسازی آسان عصاره و تاثیر بسیار کم بر محیطزیست، قابل توجه بوده است [4, 6]. در اینجا استفاده از حلال به‌دلیل ساده‌تر بودن مطرح بوده و هدف ما صرفاً اطلاع از میزان بتاکاروتن تولیدی در اثر تغییرات ایجاد شده است.

### ۱-۱-۲- اهداف پروژه

در این پروژه سعی بر این است که پارامترهای محیطی موثر بر رشد، محیط‌کشت و پارامترهای عملیاتی فتوبیوراکتور در مورد ریزجلبک *دونالیا سالینا* برداشت شده از خلیج فارس مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آن با آنچه که انتظار می‌رفت مقایسه شود. بدین منظور ابتدا در مورد ریزجلبک *دونالیا سالینا* به عنوان مهم‌ترین ریزجلبک تولیدکننده بتاکاروتن توضیحاتی ارائه شده و سپس فیزیولوژی تشکیل شدن کاروتنوئیدها و به‌ویژه بتاکاروتن و روش‌های استخراج بتاکاروتن به‌صورت کلی مورد بحث قرار می‌گیرد. در پایان به بررسی اثر موارد مختلف محیطی و پارامترهای عملیاتی فتوبیوراکتور که بر رشد و استخراج بتاکاروتن تاثیر دارند، پرداخته می‌شود.

### ۱-۱-۳- خلاصه فصل‌ها

در ادامه به پیش‌زمینه‌ای در مورد ریزجلبک‌ها به‌ویژه ریزجلبک *دونالیا سالینا*، ساختار کاروتنوئیدها و متابولیسم تولید آن‌ها و توضیحاتی در مورد کاربرد آن‌ها در صنایع مختلف و بررسی جزئیاتی در مورد بتاکاروتن و همچنین انواع فتوبیوراکتور مورد استفاده برای رشد میکروجلبک‌ها می‌پردازیم.

در فصل دوم، برخی از پژوهش‌های گذشته در زمینه‌ی ریزجلبک‌ها و بهینه‌سازی رشد و استخراج بتاکاروتن از آن‌ها را به‌طور اجمالی و در غالب جدول بررسی می‌کنیم. فصل سوم شامل مواد مورد استفاده، روش آماده‌سازی آن‌ها و تکنیک‌های مورد استفاده در راستای آنالیز داده‌ها می‌باشد.

در فصل چهارم نتایج و تحلیل آزمون‌ها به‌طور مفصل مورد بحث قرار خواهد گرفت. همچنین در انتهای آن پیشنهادهایی برای پیشرفت در این زمینه ارائه خواهد شد.

### ۱-۲-۱- ریزجلبک‌ها

#### ۱-۲-۱- مقدمه

بیش از ۷۰٪ کره زمین با آب پوشیده شده است که گروه غالب موجودات زنده در آن ریزجلبک‌ها می‌باشند. از این بابت می‌توان آن‌ها را منبع قابل‌توجهی در نظر گرفت. واژه‌ی

ریزجلبک از سطوح طبقه‌بندی محسوب نمی‌گردد بلکه اصطلاحی است که برای نامیدن کلیه جلبک‌های میکروسکوپی اعم از پروکاریوتی و یوکاریوتی به‌کار می‌رود و آن‌ها را از جلبک‌های ماکروسکوپی متمایز می‌سازد. ریزجلبک‌ها ساده‌ترین موجودات حاوی کلروفیل هستند و با گیاهان عالی تفاوت‌هایی دارند: ریزجلبک‌ها فاقد ریشه، ساقه و برگ هستند و در اطراف اندام‌ها یا ساختارهای زایشی آن‌ها محافظ وجود ندارد.

ریزجلبک‌ها را می‌توان در اکوسیستم‌های آبی و زمینی و حتی مکان‌هایی که محصولات دیگر نمی‌توانند رشد کنند، مانند کویر و ساحل دریا مشاهده کرد [7]. ریزجلبک شامل لیبید، پروتیین، کاروتنوئید، رنگدانه، ویتامین، استرول و پلی‌ساکارید است که می‌تواند برای کاربردهای غذایی، دارویی، سوختی و آرایشی بهداشتی کاربرد داشته باشد [3]. علاوه بر قابلیت کشت در زمین‌های غیرزراعی و استفاده از میزان آب کم جهت کشت تامین مواد غذایی زیستی، ریزجلبک‌ها دارای سرعت رشد زیادند. همچنین با تولید بیودیزل از میکروجلبک، کربن طبیعی به‌دست می‌آید و این کربن برای تولید توده‌ی زیستی بوده و در طی فتوسنتز گازهای گلخانه‌ای را مصرف می‌کند [8, 9].

#### ۱-۲-۲- جلبک‌های سبزآبی

جلبک‌های سبزآبی (سیانوفیتا یا سیانوباکتری‌ها) و پروکلروفیت‌ها، پروکاریوت‌هایی با ساختار دیواره‌ی سلولی از نوع گرم منفی هستند که در طبیعت به فرم‌های تک سلولی، کولونی شکل و رشته‌ای دیده می‌شوند. وجود کلروفیل a، مهم‌ترین مشخصه‌ای است که این ارگانسیم‌ها را از سایر باکتری‌ها متمایز می‌سازد. پروکلروفیت‌ها علاوه بر کلروفیل a، کلروفیل b هم تولید می‌کنند. دو رنگدانه‌ی فیکوسیانین<sup>1</sup> و فیکواریترین<sup>2</sup> که اطلاق نام سبزآبی به دلیل حضور آن‌ها بوده است، در جلبک‌های قرمز نیز یافت می‌شوند و از این‌رو احتمال می‌رود جلبک‌های قرمز از سیانوباکتری‌ها مشتق شده باشند [10].

جلبک‌های سبزآبی در آب‌های شور و برخی دریاچه‌های بزرگ آب شیرین وجود دارند. به‌طور معمول در آب‌های مناطق استوایی و نیمه استوایی که دارای محتوای بالای نمک می‌باشند یافت می‌شوند. رنگ طبیعی این جلبک‌ها می‌تواند رنگ سبز تیره به آب بدهد. ارتفاع، دما و قرار گرفتن در معرض خورشید، گونه‌های جلبکی و ترکیبات آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد [11].

<sup>1</sup> Phycocyanin

<sup>2</sup> Phycoerythrin

در میان ریز جلبک‌های مختلف که از نقطه نظر تجاری مناسب می‌باشند، گونه‌ی *دونالیلا* یکی از گونه‌هایی است که برای غلظت بالایی از ترکیبات با ارزش مانند چربی، پروتئین و رنگدانه‌ها با موفقیت استفاده شده است. در ادامه خصوصیات ریز جلبک *دونالیلا سالینا* شرح داده می‌شود.

### ۱-۲-۳- *دونالیلا سالینا*

ریز جلبک *دونالیلا* از شاخه‌ی جلبک‌های سبز یا کلروفیتا، راسته بی‌پرگ‌ها و خانواده‌ی پلی‌بلفاریداسی<sup>۱</sup> بوده و این جلبک‌ها علاوه بر کلروفیل a و b دارای کاروتنوئیدهای مختلفی می‌باشند که در شرایط نامطلوب محیطی ممکن است در خارج از کلروپلاست‌ها ذخیره شده و سبب تغییر رنگ جلبک به نارنجی یا قرمز شوند. در *دونالیلا سالینا* و *دونالیلا پاروا* این موضوع مشخصاً دیده می‌شود. گونه‌های شناخته شده *دونالیلا* شامل *دونالیلا سالینا*، *دونالیلا ترتیولکتا*<sup>۲</sup>، *دونالیلا پریمولکتا*<sup>۳</sup>، *دونالیلا ویریدیس*<sup>۴</sup>، *دونالیلا بیوگلاتا*<sup>۵</sup>، *دونالیلا اسیدوفیلا*<sup>۶</sup>، *دونالیلا پاروا*<sup>۷</sup>، *دونالیلا آنتارکتیکا*<sup>۸</sup> و *دونالیلا مدیا*<sup>۹</sup> می‌باشند [1].

*دونالیلا سالینا* اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط ماسیوک<sup>۱۰</sup> به عنوان منبع تجاری بتاکاروتن معرفی شد [12]. سلول‌های *دونالیلا* کروی، گلابی شکل، مخروطی یا بیضی شکل با اندازه‌های مختلف از ۵ تا ۲۵ میکرومتر طول، و از ۳ تا ۱۳ میکرومتر عرض می‌باشند. این سلول‌ها همچنین حاوی یک کلروپلاست فنجانی شکل، که عمدتاً دارای هسته مرکزی احاطه شده توسط گرانول‌های نشاسته است، می‌باشد. سلول‌های هرگونه ممکن است با تغییر شرایط تغییر کرده و در شرایط نامطلوب به صورت کروی در می‌آیند [1, 13]. سلول‌های *دونالیلا* ارگان‌های سلولی متمایزی از جلبک سبز (مانند غشاء متصل به هسته، میتوکندری، واکوئول، دستگاه گلژی و لک‌های شبیه چشم) دارند. سلول فقط توسط یک غشای پلاسمایی الاستیک که توسط مخاط سطحی تحت پوشش قرار گرفته، محصور شده است و در زمانی که در شرایط شوری بالا<sup>۱۱</sup> و شوری

<sup>1</sup> Polyblepharidaceae

<sup>2</sup> *Dunaliella tertiolecta*

<sup>3</sup> *Dunaliella primolecta*

<sup>4</sup> *Dunaliella viridis*

<sup>5</sup> *Dunaliella bioculata*

<sup>6</sup> *Dunaliella acidophila*

<sup>7</sup> *Dunaliella parva*

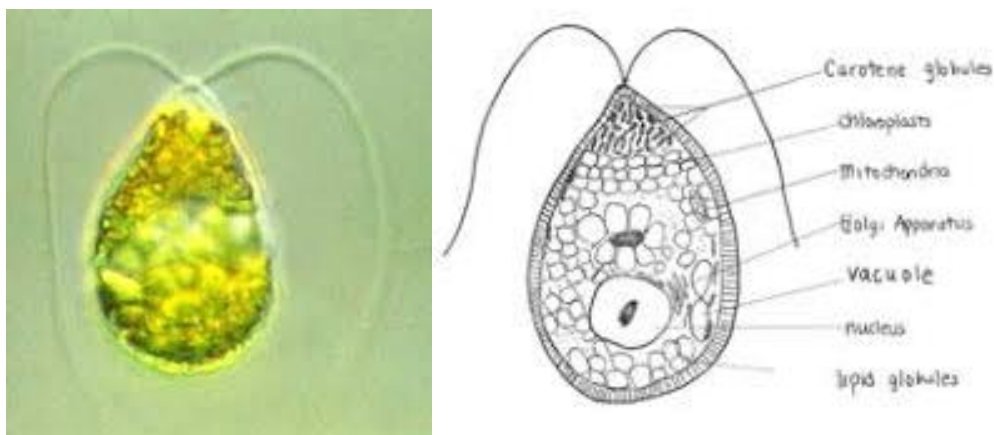
<sup>8</sup> *Dunaliella antarctica*

<sup>9</sup> *Dunaliella media*

<sup>10</sup> Massyuk

<sup>11</sup> Hypertonic

پایین<sup>1</sup> قرار می‌گیرد به سرعت جمع یا متورم می‌شود. *دونالیلا* به وسیله تقسیم طولی زیاد می‌شود، اما تولیدمثل جنسی به ندرت توسط فرآیندی متوالی با سلول‌های هم ساختار رخ می‌دهد [1].



شکل (1-1) عکس میکروسکوپی گونه *دونالیلا سالینا*

گونه‌های مختلف این ریز جلبک در دریاها و دریاچه‌های نمکی با طیف گسترده‌ای از غلظت نمک در محدوده ۰/۵ درصد تا مقدار اشباع (حدود ۳۵ درصد) زندگی می‌کنند که این جلبک را هالوتولورانت‌ترین<sup>2</sup> یوکاریوت شناخته شده نشان می‌دهد. سلول‌های *دونالیلا* از طریق تغییرات در غلظت داخل سلولی گلیسرول توانایی زنده ماندن در غلظت بالای نمک را پیدا می‌کنند. هنگامی که *دونالیلا* در شوری بالا رشد می‌کند، محتوای گلیسرول داخل سلولی بیش از ۵۰ درصد می‌شود، که برای اغلب فشارهای اسمزی مورد نیاز کافی می‌باشد. اطلاعات تازه نشان می‌دهد که *دونالیلا* توانایی استثنایی برای حذف یون سدیم در محیط اشباع از نمک را با استفاده از یک پمپ جدید اکسیداسیونی سدیم دارد. نتایج رویکردهای پروتئومیکسی<sup>3</sup> نیز نشان داده است که علاوه بر موارد بالا، *دونالیلا* در پاسخ به انتقال به محیط با شوری بالا فرایند فتوسنتز دی-اکسیدکربن را افزایش می‌دهد [1]. با افزایش مقدار نمک در محیط کشت جلبک میزان بتاکاروتن افزایش ولی میزان کل کاروتنوئیدها تا غلظتی افزایش و بعد از آن ثابت می‌شود [14].

*دونالیلا* در دامنه pH گسترده‌ای رشد کرده و توانایی رشد دارد که شامل pH های ۱ تا ۱۱ می‌شود. علاوه بر اینکه گونه‌های *دونالیلا* در محیط‌های بسیار شور رشد می‌کنند، گونه اسیدوفیلا در محیط‌های بسیار اسیدی (pH = ۰-۱) نیز رشد می‌کنند. رنج دمایی رشد آن شامل دماهای زیر صفر تا بالای ۳۸ درجه سانتیگراد می‌شود. گونه *دونالیلا آنتارکتیکا* در دماهای زیر صفر رشد می‌کند. همچنین برخی از گونه‌های *دونالیلا سالینا* شدت نور بسیار زیاد را تحمل

<sup>1</sup> Hypotonic

<sup>2</sup> Halotolerant

<sup>3</sup> Proteomics

می‌کنند. علاوه بر این، *دونالیلا* در مقایسه با دیگر جلبک‌های پلانکتونی به آلودگی روغن سوختی مقاوم‌تر می‌باشد [1].

در کنار کلروفیل a و کلروفیل b، *دونالیلا* حاوی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی ارزشمند مانند آلفاکاروتن<sup>1</sup> و بتاکاروتن، وایولاگزانتین، نئوگزانتین<sup>2</sup>، لوتئین و زاگزانتین می‌باشد. جلبک تک سلولی متحرک *دونالیلا سالیئا* غنی‌ترین منبع بتاکاروتن می‌باشد. این جلبک زمانی که در شرایط کاشت نور زیاد، درجه حرارت بالا، شوری بالا و کمبود مواد مغذی است، مقادیر زیادی بتاکاروتن را به صورت قطراتی در کلروپلاست جمع می‌کند. مقدار بتاکاروتن برای *دونالیلا سالیئا* تا ۱۳/۸ درصد وزن خشک گزارش شده است [15].

ریزجلبک *دونالیلا سالیئا* همچنین به عنوان غذای انسان هم کاربرد داشته و به میزان ۵۷ درصد وزن خشک پروتئین، ۳۲ درصد کربوهیدرات و ۶ درصد چربی دارد [16]. در زیر مقایسه‌ای در مورد محتویات این ریزجلبک با مواد غذایی و چند ریزجلبک دیگر آمده است [17]:

جدول (1-1) مقایسه‌ی محتویات جلبک *دونالیلا سالیئا* با مواد غذایی و جلبک‌های دیگر [17]

منبع	درصد وزن خشک		
	پروتئین	کربوهیدرات	لیپید
گوشت	۴۳	۱	۳۴
شیر	۲۶	۳۸	۲۸
برنج	۸	۷۷	۲
دانه سویا	۳۷	۳۰	۲۰
کلرلا ولگاریس	۵۸-۵۱	۱۷-۱۲	۲۲-۱۴
<i>دونالیلا سالیئا</i>	۵۷	۳۲	۶
سدموس آپلیکوس	۵۶-۵۰	۱۷-۱۰	۱۴-۱۲
اسپیرولیئا ماکسیما	۷۱-۶۰	۱۶-۱۳	۷-۶

تولید بتاکاروتن از *دونالیلا* در برخی از کشورها از جمله امریکا و استرالیا در ابعاد تجاری و در برخی دیگر از کشورها در مقیاس آزمایشگاهی صورت می‌گیرد. ترکیب معمول بتاکاروتن موجود در ریزجلبک *دونالیلا* در جدول زیر نشان داده شده است [13]:

<sup>1</sup>  $\alpha$ -Carotene

<sup>2</sup> Neoxanthin

جدول (1-2) مقادیر متفاوت از انواع بتاکاروتن‌های موجود در دونالیلا سالیئا [13]

درصد وزنی (%)	نوع ایزومر
۱۰	۱۵-سیس-بتاکاروتن
۴۱	۹-سیس-بتاکاروتن
۴۲	همه ایزومرهای ترانس-بتاکاروتن
۶	دیگر ایزومرهای بتاکاروتن

در این جلبک بتاکاروتن به صورت محافظ کلروفیل و DNA سلولی در برابر تابش شدید نور خورشید عمل می‌کند. همچنین بوروویتزکا مطرح کرد که بتاکاروتن به صورت مخزن کربن برای ذخیره‌سازی کربن مازاد تولیدی هنگام فتوسنتز، در مواقعی که رشد گیاه محدود می‌باشد اما تثبیت کربن فتوسنتزی باید جریان داشته باشد، عمل می‌کند [13].

برداشت و استخراج، قسمت عمده مخارج را در فرایندهای جلبکی تشکیل می‌دهد. برداشت *دونالیلا سالیئا* نسبت به دیگر جلبک‌های تجاری سخت‌تر و هزینه‌بردارتر می‌باشد. سختی برداشت *دونالیلا سالیئا* به دلیل این است که ریزجلبکی تک سلولی بوده و دیواره سلولی محافظ ندارد و به همین دلیل سانتریفیوژ و فیلتراسیون خسارت برشی به سلول‌ها وارد می‌کند که باعث از دست رفتن بتاکاروتن به دلیل اکسیداسیون می‌شود. همچنین سلول‌ها از شکل طبیعی خود خارج می‌شوند و از فیلترهایی با اندازه منافذ کمتر از ۱۰ میکرومتر هم عبور می‌کنند. خوردگی وسایل فلزی به خاطر محلول نمک نیز مشکلی اساسی است. به سبب مشکلات بیان شده روش‌های بیولوژیکی و شیمیایی متفاوتی برای برداشت *دونالیلا* به کار گرفته می‌شود که شامل فیلتراسیون در فشار بالا با استفاده از فیلتر رسوبی، استفاده از خواص شناوری<sup>1</sup> وابسته به شوری در سطوح متحرک و ثابت شیب‌دار، بهره‌برداری از پاسخ‌های ژیروتاسیک<sup>2</sup> و فتودیاتیکی<sup>3</sup> (فعالیت در پاسخ به نور)، خواص چسبندگی آب‌گریزی وابسته به شوری سلول‌های *دونالیلا* و لخته‌سازی می‌باشد [13].

نیازهای تغذیه‌ای *دونالیلا سالیئا* شامل عناصر مختلف است که در زیر به چند نوع آن می‌پردازیم. منبع کربن: از آنجایی که تمامی گونه‌های این جلبک که تاکنون شناخته شده است فتواتوتروف بوده‌اند توانایی گرفتن  $CO_2$  و  $HCO_3$  را داشته و فتوسنتز می‌کنند لذا نیاز به منبع کربن در آن‌ها احساس می‌شود. فراهم کردن کربن غیرآلی برای محیط کشت *دونالیلا سالیئا* بحث مهمی است و آنچه مشخص است در درصد نمک خیلی بالا که این جلبک رشد خوبی دارد، انحلال کربن غیرآلی در آن کم است. به‌طورمثال در حضور ۲۵٪ نمک، انحلال‌پذیری کربن غیرآلی در آن

<sup>1</sup> Bouyancy

<sup>2</sup> Gyrotactic

<sup>3</sup> Photodiatic

کمتر از ۵۰٪ زمانی است که با محیط کشتی با غلظت نمکی آب دریا (۳٪) سروکار داریم. بنابراین در دمای بالا و pH معمولی یافت شده برای رشد *دونالیا*، توده‌ی کربن غیرآلی به شکل  $\text{CO}_3^{-2}$  بوده و به‌گونه‌ای نیست که برای مصرف جلبک مناسب باشد. حضور کربن بدون آب خارج سلولی، فرآیند تبدیل  $\text{HCO}_3^-$  به  $\text{CO}_2$  را کاتالیز کرده و جلبک تحت این شرایط می‌تواند از کربن غیرآلی بهره‌برد [18].

منبع نیتروژن: بهترین منبع نیتروژن برای *دونالیا* نیترات است. نمک‌های آمونیوم مانند آمونیوم استات، آمونیوم نیترات و آمونیوم کلراید اثر کمتری به عنوان منبع نیتروژن داشته و در دما و غلظت بالا دارای اثر کشندگی هستند. به‌طور مثال نشان داده شده که آمونیوم نیترات باعث جلوگیری از تولید بتاکاروتن در جلبک می‌شود، علاوه بر این در محیط‌های رشد اکتیو، جذب آمونیوم باعث اسیدی شدن محیط شده و سرانجام مرگ جلبک را نتیجه می‌دهد. اوره نیز می‌تواند به‌عنوان منبع نیتروژن به‌خصوص در محلول بافر استفاده شود. به‌رحال در محیط کشت در مقیاس بزرگ اوره می‌تواند منجر به مرگ دسته‌جمعی شده و این به علت غلظت زیاد آمونیوم ایجاد شده به سبب متابولیسم اوره است [19-21].

منبع فسفر: فسفات بهترین منبع فسفر و غلظت بهینه‌ی آن به میزان ۰/۰۲ تا ۰/۰۲۵ گرم از  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  بوده و غلظت بیشتر آن مانع از رشد جلبک می‌شود [22]. منبع منیزیم و کلسیم: هر دوی آن‌ها برای رشد *دونالیا* نیاز بوده و در محدوده‌ی وسیعی بین ۰/۸ تا ۲۰ قابل استفاده‌اند [23].

منبع سدیم: همه‌ی گونه‌های دریایی و نمک‌دوست *دونالیا* به سدیم نیاز دارند. منبع کلرید و سولفات: بهینه نسبت کلر به سولفات جهت رشد *دونالیا* در حدود ۳/۲ است در حالی که بهینه‌ی نسبت آنها برای تشکیل بتاکاروتن ۸/۶ است. همچنین به نظر می‌رسد برخی تعاملات بین کاتیون‌ها و آنیون‌ها و اثر آنها روی جلبک وجود دارد و به‌رحال قابل درک است [24].

منبع آهن: غلظت کم آهن در یک شکلی که می‌تواند تخمین زده شود برای رشد *دونالیا* مورد نیاز است. در برخی گونه‌های هایپرسالین، آهن ممکن است رشد *دونالیا* را محدود کند. بهینه غلظت آن در مورد *دونالیا سالینا* بین ۱/۲۵ تا ۳/۷۵ میلی‌گرم است. باید شکل‌های چلاته‌کننده‌ای از آن مانند سیترات آهن و Fe-EDTA فراهم شود. غلظت زیاد از آن باعث مهار رشد می‌شود [19, 21].

عناصر کم‌یاب و ویتامین‌ها: روی، کبالت، مس، موبیدیوم و منیزیم از جمله عناصری هستند که به محیط‌کشت *دونالیا* اضافه می‌شوند. *دونالیا* به ویتامین‌های بیرونی جهت رشد نیاز ندارد.

### ۱-۳- کاروتنوئیدها

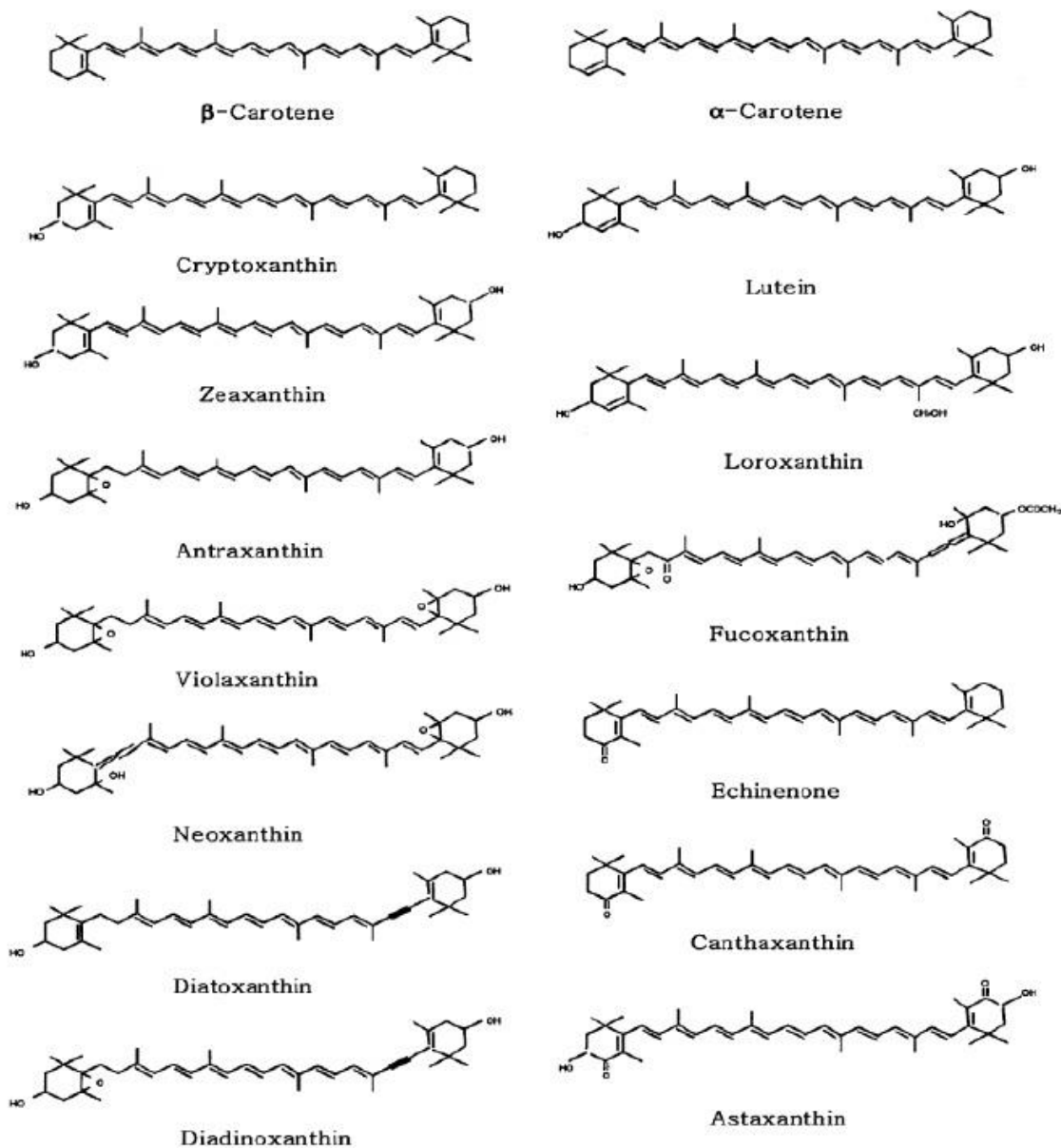
کاروتنوئیدها ترکیباتی شامل هشت واحد ایزوپرن می‌باشند که به صورت اتصال سر به دم به یکدیگر متصل شده‌اند و اغلب دارای حداقل ۴۰ اتم کربن می‌باشند. بر اساس ساختارشان، اگر تنها شامل کربن و هیدروژن باشند در دسته‌ی کاروتن‌ها<sup>1</sup> (به عنوان مثال بتاکاروتن، لیکوپن<sup>2</sup>) و اگر شامل کربن و هیدروژن و اکسیژن در ساختار خود باشند در دسته زانتوفیل‌ها<sup>3</sup> (به عنوان مثال، لوتئین، زاکزانترین) طبقه‌بندی می‌شوند [25]. اکسیژن موجود در روی حلقه ممکن است به فرم هیدروکسیل باشد (لوتئین) و یا به صورت اُکسو باشد (کانتاگزانتین) و یا مثل آستاگزانتین به هر دو فرم مشاهده گردد. تعداد کاروتنوئیدهای طبیعی شناخته شده در سال ۱۹۶۰ در حدود ۸۰ نوع، در سال ۱۹۸۰ چیزی در حدود ۵۰۰ نوع [26] و در حال حاضر بیش از ۷۵۰ کاروتنوئید در طبیعت در گیاهان خشکی، قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها یافت شده است که حدود ۲۵۰ عدد از آن‌ها منشأ دریایی دارند [27]. همهی ویژگی‌های شیمیایی این ترکیبات و همچنین قدرت جذب نور آن‌ها از همین اسکلت کربنی نشأت می‌گیرد. علاوه بر گیاهان عالی و جلبک‌ها، دسته‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز قادر به تولید کاروتنوئیدهای محلول در چربی هستند. کاروتنوئیدها به واسطه داشتن ساختار مزدوج قادر به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثر مخرب آن‌ها هستند؛ به همین دلیل نه تنها به عنوان یک ماده‌ی رنگی بلکه به صورت یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی، آرایشی-بهداشتی و داروسازی به‌کار می‌روند [28]. کاروتنوئیدها همچنین به عنوان ترکیبات نگهدارنده در صنایع غذایی استفاده می‌شود [29].

---

<sup>1</sup> Carotene

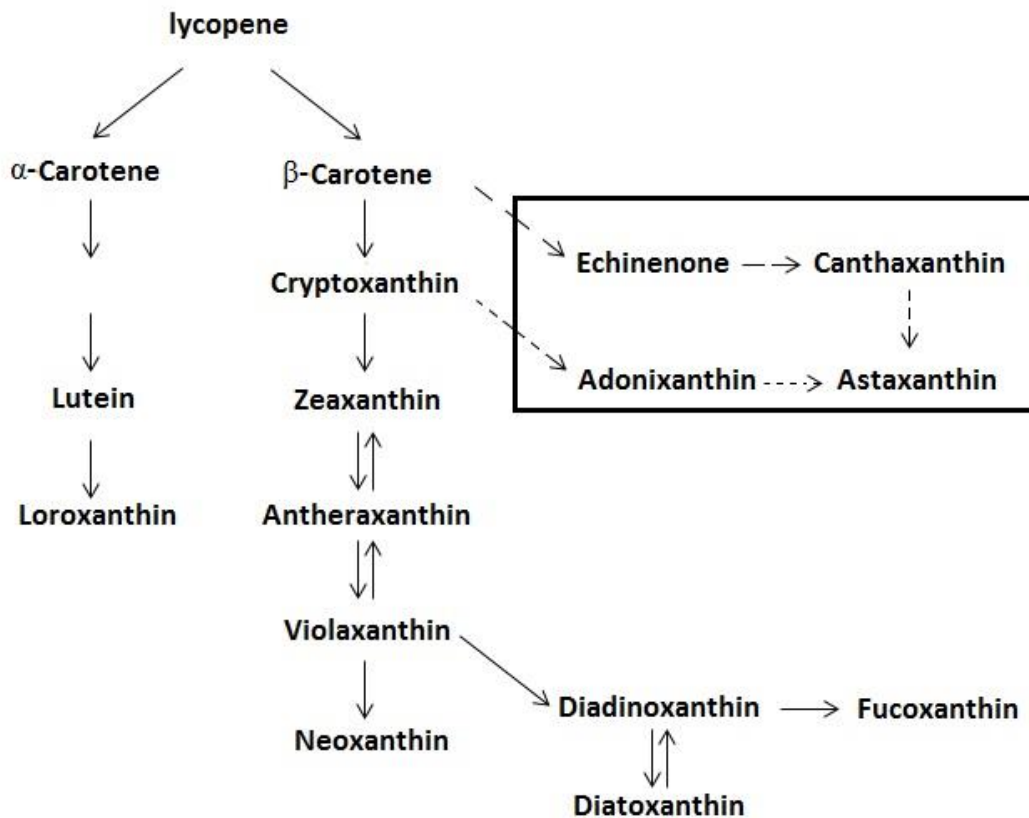
<sup>2</sup> Lycopene

<sup>3</sup> Xanthophyll



شکل (1-2) ساختار شیمیایی انواع کاروتنوئیدها و زانتوفیل [25]

کاروتنوئیدها مسئول رنگ زرد، نارنجی و قهوه‌ای گلبرگ‌ها، میوه‌ها و گل‌ها می‌باشند. علاوه بر این، رنگ پوست ماهی‌ها و پوسته‌های صدفی نیز به این ترکیبات نسبت داده می‌شود. شکل زیر مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها را نشان می‌دهد.



شکل (1-3) مسیر بیوسنتز انواع کاروتنوئیدها [30]

در گیاهان بزرگ، کاروتنوئیدها عمدتاً در برگ، گل و بافت میوه یافت می‌شود. مطالعات اخیر نیز حضور مقادیر زیادی از کاروتنوئیدها در جلبک‌ها و ریزجلبک‌ها را تایید کرده است [30]. علاوه بر این، باکتری‌های فتوسنتزی شامل کاروتنوئیدهای با گروه‌های عاملی مختلف مانند سولفات‌ها و یا حلقه‌های آروماتیک می‌باشند. قارچ‌ها عمدتاً حاوی کاروتنوئیدهای یک و دو حلقه‌ای مانند کانتاگزانتین می‌باشند، و بعضی از کاروتنوئیدهای موجود در حیوانات مانند پرندگان زرد یا قرمز، ماهی (به عنوان مثال ماهی قزل آلا)، و بی‌مهرگان دریایی به طور عمده شامل آستاگزانتین و کاروتنوئیدهای مشابه آن هستند. با این حال، حیوانات قادر به سنتز مجدد کاروتنوئیدها نمی‌باشند و این ترکیبات را از رژیم غذایی خود به دست می‌آورند.

در فرایند فتوسنتز، کاروتنوئیدها برای تشکیل کمپلکس ضروری پروتئین-رنگدانه در غشای تیلاکوئیدی به پپتیدها متصل می‌شوند، در حالی‌که در سیانوباکتری‌ها کاروتنوئیدها برای حفاظت از نور زیاد، در غشای سیتوپلاسمی یافت می‌شوند. در ریزجلبک‌ها، به نظر می‌رسد کاروتنوئیدها در مرحله نوری فتوسنتز به عنوان رنگدانه جذب‌کننده نور عمل کند و در تابش بیش از حد نور با مهار گونه‌های اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد عامل حفاظتی دستگاه فتوسنتز در برابر نور باشد [31].

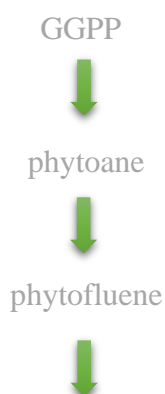
دو نوع از کاروتنوئیدها که به علت اثر مفید بر سلامت انسان بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند لیکوپن و بتاکاروتن بوده، که دارای فعالیت قوی آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک، نقش ویژه لیکوپن (رنگدانه طبیعی قرمز) به عنوان یک محافظ در برابر سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی را نشان داده‌اند [32, 33].

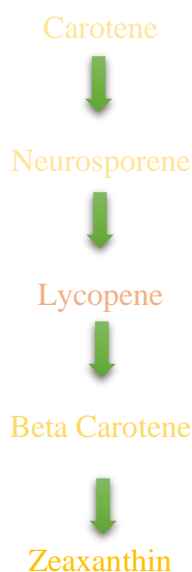
### ۱-۳-۱- مصارف کاروتنوئیدها

به صورت تجاری، کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگ مواد غذایی و مکمل‌های تغذیه‌ای، با برآورد بازار جهانی ۹۳۵ میلیون دلار آمریکا در سال ۲۰۰۵، مورد استفاده می‌باشند [33]. با وجود منشاء مصنوعی بسیاری از رنگدانه‌ها، میزان استفاده از این رنگ‌ها در صنایع غذایی تعجب‌آور است و باعث ایجاد نگرانی‌های زیادی شده است. در مقابل آوازه‌ی بد رنگدانه‌های مصنوعی که معمولاً تنها ارزش تزئینی داشته و با خطرات سلامتی مرتبط می‌باشد، در حال حاضر بازار مواد غذایی به سمت استفاده از افزودنی‌های طبیعی گرایش پیدا کرده است که یک محصول نهایی سالم را ارائه می‌کند. روند فعلی، که در آن به طور فزاینده‌ای بسیاری از محدودیت‌ها در استفاده از رنگ غذا تحمیل شده است، به شدت مخالف استفاده از مواد شیمیایی مضر به عنوان رنگ غذا می‌باشد.

از سوی دیگر، توسعه عناوینی مانند «دارویی»، و «تغذیه سالم» برای توصیف محصولات غذایی، مزایای استفاده از رنگ‌های طبیعی را تقویت کرده است. با این حال، اگر چه روند بازار مواد غذایی در حال حرکت به سمت افزایش استفاده از افزودنی‌های طبیعی می‌باشد، تنها چند رنگ طبیعی برای استفاده در سراسر جهان تایید شده است [34].

### ۱-۳-۲- فیزیولوژی تشکیل کاروتنوئیدها





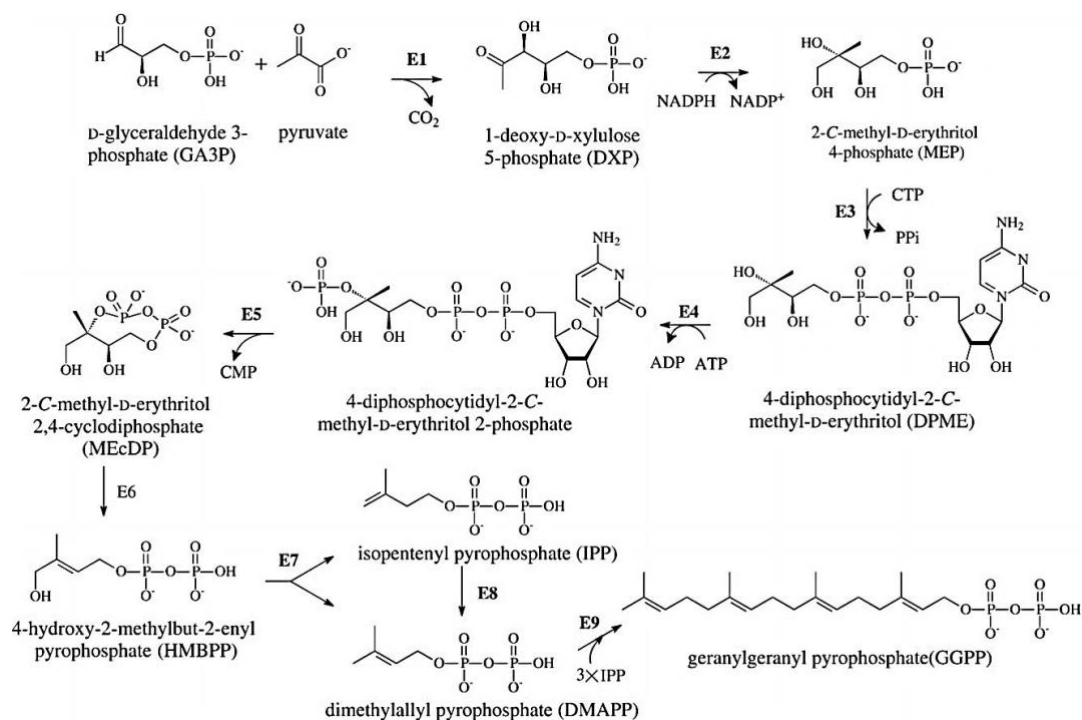
شکل (1-4) مشخصه رنگ انواع کاروتن‌ها [35]

همان‌طور که در شکل فوق نشان داده شده است، فیتون<sup>1</sup>، فیتوفلوئن<sup>2</sup> و GGPP<sup>3</sup> بدون رنگ بوده و به تدریج رنگ آن‌ها پر رنگ می‌شود، گاماکاروتن زرد کم رنگ و زاگزانتین زرد پر رنگ می‌باشد [35]. مسیر متابولیک در اغلب گیاهان از GGPP شروع می‌شود و به زاگزانتین می‌رسد [36]. مسیر سنتز GGPP در شکل زیر در ریزجلبک *دونالیلا سالیئا* آورده شده است. GGPP در ابتدای زنجیره تولید دیگر کاروتنوئیدها می‌باشد.

1 Phytoene

2 Phytofluene

3 Geranylgeranyl pyrophosphate



شکل (1-5) خط سیر سنتز تولید GGPP در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* [36]

در شکل فوق E1 تا E9 آنزیم‌های واکنش می‌باشند [36]:

E1: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS

E2: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR

E3: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol (DPME) synthase, CMT

E4: DPME kinase, CMK

E5: 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MEcPS

E6: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate synthase

E7: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate reductase

E8: isopentenyl pyrophosphate (IPP) isomerase, Ipi

E9: geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS

مسیر سنتز کاروتنوئیدها از ترکیب GGPP در شکل زیر نشان داده شده است.

آنزیم‌های واکنش در شکل زیر [36]:

PSY: phytoene synthase

PDS: phytoene desaturase

ZDS:  $\zeta$ -carotene desaturase

LYC-E: lycopene  $\epsilon$ -cyclase

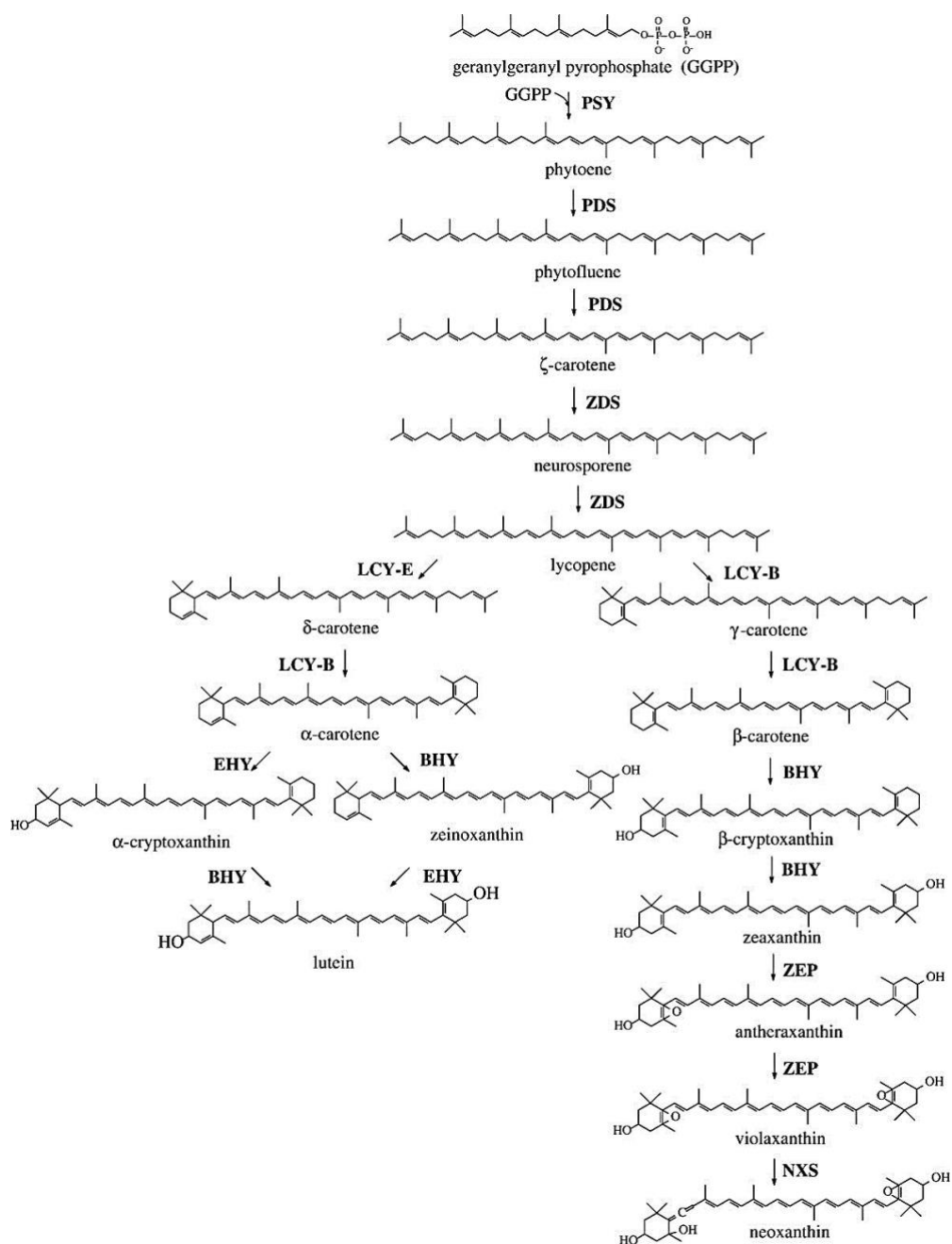
LYC-B: lycopene  $\beta$ -cyclase

EHY:  $\epsilon$ -carotene hydroxylase

BHY:  $\beta$ -carotene hydroxylase

ZEP: zeaxanthin epoxidase

NXS: neoxanthin synthase



شکل (1-6) خط سیر فرضی تولید کاروتن‌ها در ریزجلبک *دونالیلا سالینا* [36]

### ۱-۳-۳- مزایای درمانی کاروتنوئیدها

استرس اکسایشی<sup>1</sup> از علل عمده بیماری‌های التهابی و تعداد زیادی از بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های عصبی و قلبی-عروقی یا دیابت می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی کاروتنوئیدهای ریزجلبک به طور گسترده‌ای در محیط‌های آزمایشگاهی و در داخل بدن موجود زنده در از بین بردن رادیکال آزاد اثبات شده است. کاروتنوئیدها (مانند زاگزانتین، آستاگزانتین)

1 Oxidative

و اپوکسی کاروتنوئیدها (مانند نئوگزانتین) دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی در شرایط آزمایشگاهی و در موجود زنده در مدل‌های حیوانی می‌باشند. به خصوص، آستاگزانتین دارای پتانسیل بسیار زیادی برای جلوگیری از سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد. حضور عامل هیدروکسیل و کتو در انتهای هر حلقه یونونی در آستاگزانتین، ویژگی‌های منحصر به فردی را از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر و پیکربندی قطبی بیشتر نسبت به کاروتنوئیدهای دیگر سبب شده است. مطالعات همه‌گیر شناختی یک رابطه معکوس بین شیوع سرطان و مصرف کاروتنوئید در رژیم غذایی (و یا سطوح کاروتنوئید در خون) را نشان می‌دهد. در آزمایشات تداخلی با استفاده از دوز بالایی از مکمل‌های کاروتن اثرات محافظتی در برابر سرطان و یا بیماری‌های قلبی-عروقی را نشان نمی‌دهد.

در عوض، در مورد جمعیت در معرض خطر (افراد سیگاری و مرتبط با آبست) افزایش موارد سرطان را در این آزمایش‌ها نشان داد. فیکوسیانین-1<sup>1</sup> و فیکواریترین نیز فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی از خود نشان می‌دهند [28].

لوتئین یکی از زانتوفیل‌های عمده موجود در ریزجلبک سبز می‌باشد. این کاروتنوئید که به صورت انتخابی در ماکولای شبکیه چشم انسان تجمع می‌یابد، در برابر استرس‌های اکسایشی از چشم محافظت کرده و به عنوان یک فیلتر نور آبی که در انحطاط ماکولای شبکیه و آب مروارید وابسته به سن درگیر می‌باشد، عمل می‌کند [28].

اثر ضد حساسیتی فوکوگزانتین به تازگی و با استفاده از یک مدل سلول‌های جوندگان ثابت شده است. همچنین فوکوگزانتین می‌تواند خطر ابتلا به چاقی را محدود کند [28]. در زیر به شناخت بیشتر بتاکاروتن به عنوان یک کاروتنوئید مهم و مورد بحث در این پروژه می‌پردازیم.

## ۱-۴- بتاکاروتن

یکی از رایج‌ترین و فراوان‌ترین کاروتنوئیدهایی که اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد بتاکاروتن است. این ترکیب علاوه بر خصوصیات رنگی بسیار عالی، پیش‌ساز رتینول و رتینوئیک اسید می‌باشد و در نتیجه نقش مهمی در ارتقای سلامت انسان به عنوان پیش‌ساز ویتامین A و به عنوان یک سیگنال نظارتی سلولی دارد. شکل زیر ایزومرهای ساختاری مختلف این ترکیب را نشان می‌دهد [25].



می‌باشد [38]. جدول صفحه‌ی بعد اطلاعاتی در مورد تأثیر پارامترهای مختلف محیطی بر رشد جلبک و تشکیل کاروتنوئید را به‌طور خلاصه نشان داده است.

جدول (1-3) خلاصه ای از تأثیر پارامترهای محیطی مختلف بر تولید زیست توده و محتوای بتاکاروتن دونالیلا سالیانی کشت شده [38] (+ : اثر تحریک کننده، - : اثر بازدارنده، 0: بدون تأثیر)

عامل	تولید زیست توده	تولید بتاکاروتن	علت
افزایش شوری	--	++++	میزان شوری بهینه برای رشد دونالیلا بین ۱۸% تا ۲۲% می باشد، در حالی که برای تولید کاروتنوئید میزان شوری باید بیشتر از ۲۷% باشد [38].
کاهش شوری	+	-	
کاهش نیتروژن	--	+++	با کاهش نیتروژن، راندمان جذب نور توسط بایومس افزایش می‌یابد و سبب تجمع بتاکاروتن می‌شود [39].
کاهش فسفر	--	+	
افزایش کربن غیر آلی	+++	0	فقدان کربن غیر آلی سبب توقف رشد سلول‌های دونالیلا می‌شود [1]
افزایش شدت نور	+	+++	تجمع بتاکاروتن در سلول دونالیلا به دلیل محافظت در برابر اثرات زیان‌بار تابش شدید می‌باشد [1].
کاهش شدت نور	-	---	
افزایش دما	+	++	دمای پایین سبب توقف رشد سلولی و تولید بتاکاروتن می‌شود، اما دمای بالا (حدود ۴۰ °C) سبب القاء تولید بتاکاروتن و کم کردن جزئی رشد سلولی می‌شود [1].
کاهش دما	-	-	
افزایش اکسیژن مولکولی	-	-	

نور پارامتر مهمی در تشکیل کاروتنوئید می‌باشد، اما بیشینه‌ی تولید کاروتنوئید در سلول به شوری محیط بستگی دارد. به عنوان مثال هنگامی که شوری محیط کشت از ۱۵% به ۲۵% افزایش داده می‌شود، در بازه ۴ تا ۵ روز میزان کل کاروتنوئید از کمتر از ۱۰ به ۲۶۰ میلی‌گرم بر گرم سلول می‌رسد. نسبت مقدار بتاکاروتن نیز از ۵۰٪ به ۹۰٪ می‌رسد در حالی که مقدار کاروتنوئیدهای دیگر (آلفاکاروتن، لوتئین، زاگزانتین) ثابت می‌مانند [38].

بتاکاروتن محصولی است که در چربی و روغن قابل حل می‌باشد. در شکل سوسپانسیون و یا محلول در روغن گیاهی در رنگ دادن به مارگارین، پخت خوب، و برخی غذاهای آماده

کاربرد دارد. با تبدیل آن به فرمولاسیون محلول در آب و یا متفرق شده در آب<sup>1</sup>، با تشکیل امولسیون یا پوشش‌دهی<sup>2</sup> به بتاکاروتن، در صنایع غذایی و نوشیدنی‌ها از جمله نوشیدنی‌های پرتقالی، غذاهای آماده و در شیرینی‌پزی کاربرد پیدا می‌کند.

هر کیلوگرم بتاکاروتن سنتزی حداقل ۳۰۰ دلار ارزش فروش دارد و هرچه روش تولید طبیعی‌تر باشد (از مواد شیمیایی کمتر استفاده شده باشد) قیمت بالاتر می‌رود. اگر محدوده قیمت برای فرمولاسیون بتاکاروتن ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ دلار آمریکا در نظر گرفته شود، و بتاکاروتن ۱۰٪ از زیست توده دونالدیلا سالینا را تشکیل داده باشد، هزینه‌های تولید ریزجلبک نباید از ۵۰ تا ۱۰۰ دلار آمریکا به ازاء هر کیلوگرم تجاوز کند. در حقیقت، با احتساب اتلاف تولید در هر مرحله و همچنین در نظر گرفتن هزینه سرمایه، بازاریابی، بسته بندی و توزیع، هزینه‌ها باید، بطور چشم‌گیری، پایین‌تر باشند [38].

بتاکاروتن در بدن انسان تولید نمی‌شود و انسان نیازمند دریافت آن است که میزان مصرف پیشنهادی روزانه و مشخص آن برای زنان ۴/۸ میلی‌گرم و برای مردان ۶ میلی‌گرم است [40]. در این فصل به شرح مختصری بر اهمیت و انگیزه انجام این پروژه همراه با تعریف مبانی پرداخته شد و در ادامه به آنچه که تاکنون در راستای بهینه‌سازی موارد موثر در رشد و استخراج بیشتر بتاکاروتن انجام شده بیان شده می‌پردازیم و به تفصیل مورد بحث قرار می‌دهیم.

## ۱-۵- فتوبیوراکتور

عملیات کشت جلبک به‌صورت پیوسته به‌دلیل اتوماتیک بودن تمام فرآیند تولید، کمیت و کیفیت بیشتر و بالاتر توده سلولی به‌دلیل کنترل بهتر شرایط رشد و همچنین کاهش هزینه‌ها نسبت به عملیات ناپیوسته برتری دارد. اگرچه در این حالت نیز، نیاز به شناخت کامل گونه جلبکی موردنظر و شرایط مناسب رشد و تولید محصولات در آن و همچنین نیاز به تجهیزات مناسب و خاص بیوراکتور داریم [41, 42].

بیوراکتورهای مناسب رشد جلبک، نور را از خود عبور می‌دهند و به همین دلیل فتوبیوراکتور نامیده می‌شوند. طراحی بهینه فتوبیوراکتور به ویژگی‌های گونه جلبکی وابسته است. تاکنون فتوبیوراکتورهای متفاوتی از جمله فتوبیوراکتورهای CSTR، ستون حبابی، هواگرد<sup>3</sup>(ایرلیفت)، لوله‌ای، TIP (متشکل از 17 فتوبیوراکتور پلاستیکی درون انکوباتور) و... برای رشد جلبک به‌کار رفته‌اند [43].

1 Water-Disperable

2 Encapsulation

3 Air-Lift

در فتوبیوراکتورهای لوله‌ای جهت هوادهی از اسپارژر<sup>1</sup> استفاده می‌شود. میزان اکسیژن در طول رشد افزایش می‌یابد، افزایش اکسیژن احتمالاً در اثر افزایش غلظت میکروجلبک و در نتیجه آزادسازی اکسیژن در محیط رشد به عنوان قسمتی از فرآیند فتوسنتز است. این عامل سبب محدودیت طول لوله (حداکثر تا ۸۰ متر) در فتوبیوراکتورهای لوله‌ای شده است که یکی از اصلی‌ترین مشکلات این نوع فتوبیوراکتور به حساب می‌آید [44].

یکی دیگر از انواع فتوبیوراکتورها، فتوبیوراکتور صفحه صاف<sup>2</sup> است که شامل یک کیسه پلاستیکی قابل تعویض است. در این فتوبیوراکتور یک پخش‌کننده گازی در کف قرار دارد و نیم متر بالای آن یک مبدل حرارتی قرار داده شده است [45]. ولی از معایب این فتوبیوراکتورها می‌توان به خرابی سلول در اثر تنش بالای هوادهی، تمایل میکروجلبک برای چسبیدن به دیواره فتوبیوراکتور و سخت بودن کنترل دما و توزیع CO<sub>2</sub> در مقیاس‌های بزرگ اشاره کرد. فتوبیوراکتورهای همزن‌دار نیز دارای دو سیستم اختلاط می‌باشند، که از یک طرف از یک همزن (با دور متناسب با شدت تنش برشی قابل تحمل میکروجلبک) جهت اختلاط استفاده می‌شود و از طرف دیگر از یک اسپارژر با دبی کم برای هوادهی تکمیلی استفاده می‌شود. در این راکتورها نیز در نرخ‌های هوادهی بالا و سرعت‌های بالای همزن که جهت اختلاط و تأمین مواد تغذیه‌ای در سراسر راکتور صورت می‌گیرد، امکان تخریب سلولی وجود دارد. مزایا و معایب برخی از فتوبیوراکتورها در کشت جلبک‌ها در جدول زیر آورده شده است [46]:

جدول (1-4) مزایا و معایب برخی از فتوبیوراکتورها در کشت ریزجلبک [46]

معایب	مزایا	فتوبیوراکتور
کنترل عملیاتی پایین، مشکلات در کشت طولانی مدت، محصول‌دهی پایین، اشغال فضای زیاد، تنوع کم در بکارگیری گونه‌های جلبکی، امکان بالای آلودگی محیط کشت	نسبتاً اقتصادی، نظافت و تمیزکاری آسان بعد از کشت، مناسب برای کشت انبوه جلبک	استخرهای روباز

1 Sparger

2 Flat plate

کاهش سطح تابش با افزایش مقیاس، ساخت آن نیازمند مواد و تجهیزات پیچیده است.	انتقال جرم بالا و اختلاط خوب با تنش برشی پایین، مصرف انرژی پایین، پتانسیل بالا در افزایش مقیاس، سترون سازی آسان، خوگیری آسان، مناسب جهت تثبیت جلبک‌ها، کاهش ممانعت و اکسیداسیون نوری	ستونی (حبابی و ایرلیفت)
افزایش مقیاس بسیار دشوار و نیازمند مواد و تجهیزات پیچیده، کنترل دما دشوار، امکان تنش هیدرودینامیکی برای برخی از گونه-های جلبکی، رشد در دیواره فتوبیوراکتور	سطح قرارگیری در معرض تابش بالا، مناسب برای محیطکشت‌های روباز، مناسب برای تثبیت، تولید بیومس بالا، نسبتاً ارزان، تمیزکاری آسان، کاهش تجمع اکسیژن	صفحه صاف
اختلاف pH، اکسیژن محلول، CO <sub>2</sub> ، در طول لوله، گرفتگی، اشغال فضای زیاد، رشد در دیواره فتوبیوراکتور	سطح قرارگیری در معرض تابش بالا، مناسب برای محیطکشت‌های روباز، تولید بیومس نسبتاً بالا، نسبتاً ارزان	لوله‌ای

با توجه به مزایا و معایب فتوبیوراکتورهای ذکرشده در فوق، فتوبیوراکتورهای ستونی ایرلیفت، سامانه‌ی هواده‌ی با گردش داخلی و در اصل یک ستون حبابدار است که در داخل آن تیغه یا لوله‌ای قرار داده شده است. راکتورهای ایرلیفت از پتانسیل بالایی در فرایندهای زیستی برخوردار هستند و دلیل آن توزیع همگن و مقدار کمتر تنش هیدرودینامیک می‌باشد. فتوبیوراکتورهای ایرلیفت از سه بخش اصلی بالارونده، ناودان، جداکننده گاز تشکیل شده‌اند. در بخش بالارونده تزریق گاز باعث ایجاد منطقه آشفته و نگهداشت شدید گاز می‌شود. در ناودان، مایع پس از جدا شدن حباب‌های گاز در جداکننده به کف باز می‌گردد. بسته به شکل هندسی ایرلیفت و شرایط عملیاتی بخشی از گاز در نهایت در ناودان گرفتار می‌شود. با این حال نگهداشت ناودان نسبت به بالابر کمتر بوده و اختلاف نگهداشت بین این دو منطقه باعث ایجاد اختلاف دانسیته سیال می‌شود که در نهایت باعث گردش مایع می‌شود [47].

در مقایسه‌ی این راکتور با راکتور ستون حباب معمولی، مقدار pH در این راکتور کمتر از فتوبیوراکتور ستونی حبابی است که این به علت اختلاط بهتر و در نتیجه جذب بهتر CO<sub>2</sub> در این نوع فتوبیوراکتور است. در این نوع فتوبیوراکتور از بین رفتن سلول‌ها در سطح کمتر اتفاق می‌افتد. اختلاط در این نوع فتوبیوراکتور بهتر و بنابراین میزان دریافت نور بیشتر است. علاوه بر این، حرکت آرام سلول‌ها در مسیر پایین‌رونده سبب دریافت نور بیشتری می‌شود.

چرخه تاریکی-روشنایی در فتوبیوراکتور ایرلیفت با قاعده‌تر از ستون حبابی معمولی است. در فتوبیوراکتور ستونی قسمتی از سلول‌ها ممکن است در منطقه‌ی تیره برای مدت طولانی پایین بمانند و بقیه مدت زمان بیشتری در منطقه نورانی قرار گیرند، که این پدیده

می‌تواند سبب ایجاد تنش در سلول و تغییرات مورفولوژیکی شود. همچنین قطر سلول در فتوبیوراکتور ستونی حبابی بیشتر است [48].

یکی دیگر از فاکتورهای اساسی در رشد جلبک غلظت  $CO_2$  و  $CO$  در محیط‌کشت است. در اصل، انتقال جرم در فتوبیوراکتور فاکتور مهمی است که باید به آن توجه شود. انتقال جرم در راکتور ستونی حبابی یکی از فاکتورهای محدودکننده‌ی اصلی در رشد نمایی است. مقاومت در مقابل انتقال جرم در قسمت‌های مختلف فتوبیوراکتور وجود دارد [49]. یکی از بهترین راه‌ها برای افزایش انتقال جرم، افزایش سطح تماس گاز-مایع یا کاهش سایز ذرات پخش‌شده گاز در داخل فتوبیوراکتور است که برای انجام این کار از یک صفحه توزیع‌کننده هوا (اسپارژر) با طراحی خاصی استفاده می‌شود که در برخی موارد اکسیژن به فاز مایع منتقل می‌شود و در موارد دیگر محصولات واکنش از طریق تبادل با فاز گازی جدا می‌گردند. راکتورهای ایرلیفت در مقایسه با راکتور ستونی حبابی با جریان گاز کمتر، نگهداشت گاز بیشتری دارند.

در مورد مزایای بیوراکتور ایرلیفت می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- (1) ترکیب ساختمان ساده
  - (2) هزینه عملیاتی پایین
  - (3) امکان انجام فرآیندهای سه‌فازی، شامل ذرات جامد غوطه‌ور در مایع که کاربرد زیادی در صنایع بیوتکنولوژی دارند.
  - (4) تنش برشی پایین برای سلول‌های حساس به تنش، سلول‌های گیاهی، حیوانی
  - (5) اختلاط خوب و مؤثر
  - (6) محدود شدن خطر آلودگی محیط‌کشت به دلیل عدم وجود همزن و تجهیزات داخلی
  - (7) انتقال جرم و انتقال اکسیژن مؤثر
- همان‌طور که بیان شد، بیوراکتورهای ایرلیفت از جمله بیوراکتورهای مناسب برای فرآیندهای مختلف زیستی است که دارای مزایای کاربردهای روزافزون می‌باشند. به همین سبب در این مطالعه نیز مورد استفاده قرار گرفت.

## ۱-۶- طراحی آزمایش

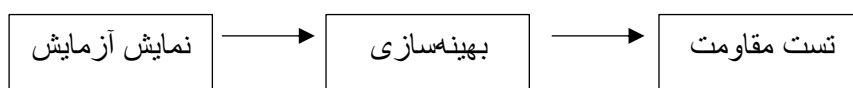
به طور کلی، سه دسته‌ی کلی از مسائل با به‌کارگیری طراحی آزمایش قابل حل هستند. هدف اولین دسته، نمایش آزمایش<sup>1</sup> است. این آزمایش‌ها به منظور مشخص شدن پارامترهای

<sup>1</sup> Screening

موردتوجه و محدوده اثر آن‌ها انجام می‌گیرد. پیدا کردن این موارد معمولاً چندان پیچیده نیست و با تعداد زیادی فاکتور ورودی وجود دارد.

در دسته‌ی دوم مسائل به جهت بهینه‌سازی<sup>1</sup> استفاده می‌شوند و هدف، یافتن مقادیری از پارامترهای مهم است که مقدار بهینه‌ی پاسخ را نتیجه می‌دهد. از آنجایی که یافتن جواب گروه دوم پیچیده‌تر از گروه اول است، طراحی‌ای با تعداد آزمایش بیشتر می‌طلبد.

سومین دسته آزمایش‌ها، تست مقاومت است، که نشان می‌دهند روند سامانه‌ی مورد نظر تا چه اندازه به تغییرات کوچک پارامترها حساس می‌باشد. شکل زیر روابط بین این دسته‌ها را نمایش داده است. دنبال کردن هر کدام از این اهداف بدون استفاده از طراحی آزمایش بسیار مشکل و چه بسا غیرممکن است [50].



شکل (1-8) رابطه‌ی میان سه هدف اصلی طراحی آزمایش [51]

در طراحی آزمایش با دو دسته متغیر کار می‌کنیم: متغیرهای قابل تنظیم یا فاکتور و متغیر پاسخ. فاکتورها بسته به نوع دیدگاه به سه گروه تقسیم می‌شوند.

✓ فاکتور قابل کنترل و غیرقابل کنترل: فاکتورهای معمول فرآیند که به راحتی قابل مشاهده، بررسی و تنظیم هستند، فاکتورهای قابل کنترل نام دارند. در مقابل فاکتورهایی که با اثری خارجی پدید می‌آیند یا در حقیقت اغتشاش سامانه می‌باشند، غیرقابل کنترل هستند.

✓ فاکتور کمی و کیفی: فاکتورهای کمی یک بازه‌ی پیوسته دارند، اما فاکتورهای کیفی با مقادیر مجزا تعریف می‌شوند.

✓ فاکتورهای مستقل و وابسته: فاکتورهای مستقل را می‌توان بدون این‌که بر یکدیگر تاثیر گذارند تغییر داد. این در حالی است که فاکتورهای وابسته نمی‌توانند به طور جداگانه تغییر داده شوند، بنابراین طراحی پیچیده‌تری برای آن‌ها مورد نیاز است [52].

پس از آن‌که فاکتورها مشخص و پاسخ‌ها اندازه‌گیری شدند، یافتن رابطه‌ای بین آن‌ها مطلوب است. رابطه‌ای که در آن با فراهم آوردن اطلاعات فاکتورها بتوانیم به پاسخ‌ها دست یابیم. این امر معمولاً با یک مدل ریاضی انجام می‌گیرد که در اکثر مواقع چندجمله‌ای هستند.

<sup>1</sup> Optimization

مهمترین ویژگی این مدل‌ها امکان استخراج جواب‌ها و سرنخ‌های خاص می‌باشد. به طور مثال دست یافتن به فاکتورهایی که در آن یک پاسخ بیشینه و دیگری کمینه باشد. پاسخ‌ها بر سه نوع هستند: معمولی<sup>1</sup>، مشتق<sup>2</sup> و مرتبط<sup>3</sup>. پاسخ‌های معمولی، پاسخ‌هایی استاندارد هستند که در تحقیقات رایج به کار می‌روند. پاسخ مشتق، پاسخی مجازی است که از طریق عملیاتی بر روی فاکتورها و پاسخ‌های معمولی یا مرتبط حاصل می‌شود. پاسخ مرتبط، پاسخی است که در کاربرد مورد نظر مورد نیاز است در حالی که در پروژه‌های دیگر تعریف شده است. در این شرایط می‌توان مدل‌های جداگانه را برای این پاسخ‌ها مطرح کرد و آن‌ها را با هم بهینه‌سازی کرد.

---

<sup>1</sup> Regular

<sup>2</sup> Derived

<sup>3</sup> Linked

## فصل 2: مروری بر منابع

در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی در این حیطه انجام شده است. در سال ۲۰۰۳ بررسی اثر مقدار نمک بر رشد و تولید بتاکاروتن در *دونالیلا سالیئا* و *دونالیلا بارداولیل* انجام شده و نشان داد با افزایش میزان نمک تا حدود سه مولار در محیط کشت، میزان کاروتنوئید تولیدی افزایش می‌یابد [53]. در سال ۲۰۰۷ مطالعه جامعی در مورد روش‌ها و کاربردهای بیوتکنولوژی *دونالیلا* در دانشگاه اصفهان صورت گرفته و در آن برخی پارامترها و همچنین مراحل تولید بیولوژیکی بتاکاروتن مورد بررسی قرار گرفت [1]. در همان سال مطالعه‌ای در مورد کشت پیوسته در فتوبیوراکتور با لوله‌های پیچیده انجام شده و در آن برخی پارامترهای مربوط به طراحی فتوبیوراکتور مورد بررسی قرار گرفته و اپتیمم تولید محصول روزانه‌ی جلبک در نتیجه‌ی کشت *دونالیلا سالیئا* در این بیوراکتور ۵/۱ لیتر در روز تخمین زده شد [54]. در سال ۲۰۱۰ در برزیل، مدل‌سازی رشد *دونالیلا* تحت شرایط غذایی مختلف صورت گرفته و مقایسه‌ی رشد در آب دریا (۰/۵ مولار) و محیط کشت ساختگی (۰/۲ مولار) در دمای اتاق انجام شد و نشان داد جلبک تحت شرایط استرس بتاکاروتن بیشتری تولید می‌کند. همچنین مشاهده شد که در نمونه‌ی حاوی آب دریا، رشد سلول کمتر بوده ولی غلظت بتاکاروتن تولیدی بیشتر است [55]. در ادامه مطالعات در سال ۲۰۱۰ در تحقیق دیگری که در کشور کویت صورت گرفت، شرایط اپتیمم که برای رشد این میکروجلبک موردنیاز است به‌صورت داشتن pH ماکسیمم برابر ۹/۱۸ و شوری ۴۵psu، دمای حداقل ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و غلظت فسفات  $30\text{ gm}^{-3}\text{d}^{-3}$  معرفی شد [56]. در ادامه‌ی این مطالعات در سال ۲۰۱۳ در کشور تایلند، محیط کشت اصلاح شده برای رشد *دونالیلا* با تغییر غلظت  $\text{MgSO}_4$ ،  $\text{NaHCO}_3$ ، اضافه کردن  $\text{NaVO}_3$  و حذف  $\text{MgCl}_2$  به محیط کشت با نام محیط کشت راماراج<sup>1</sup> معرفی شد. علاوه بر این در این مطالعه مقایسه‌ای بین دو محیط کشت جانسون و راماراج صورت گرفته و طی آن مشخص شد گونه‌های مختلف *دونالیلا* رشد به مراتب سریع‌تر و بهتری در محیط کشت راماراج نسبت به غلظت‌های مختلف نمک در محیط کشت جانسون داشته و نهایتاً محیط کشت راماراج را به‌عنوان بهترین محیط کشت معرفی می‌کند [57]. در سال ۲۰۱۴ نیز در انگلستان، اثر  $\text{CO}_2$  و pH بر رشد *دونالیلا سالیئا* بررسی شد و کشت‌هایی با غلظت‌های مختلف گاز کربن دی‌اکسید و مقدار معین بی‌کربنات صورت گرفت. نهایتاً pH حدود ۷ به‌عنوان بهترین pH برای محیط کشت *دونالیلا* شناسایی شد [58]. یک‌سال پس از آن هم در مطالعه‌ای جامع‌تر که با همکاری دو کشور چین و تایلند صورت گرفت، اثر نور، دما و مواد مغذی موجود در محیط کشت بر روی رشد بیومس بررسی شده و نتایج به صورت بهینه رشد جلبک در دمای حدود ۲۲ درجه‌ی سانتیگراد

<sup>1</sup> Ramaraj medium

و نور  $135/3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$  در صورتی اعلام شد که بهینه‌ی تولید بتاکاروتن در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتیگراد و نور  $245/6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$  است. همچنین کمترین میزان تولید بتاکاروتن در دمای ۱۵ اتفاق افتاد [59].

در جدول ۱-۲، خلاصه‌ای از مطالعات پیشینیان ذکر شده است.

جدول (2-1) بررسی بهینه‌ی پارامترهای مختلف و شرایط عملیاتی کشت در مورد دونالیلا سالینا

منبع	DOE	نوع راکتور	دما	pH	مقدار نمک	نور	بهینه‌سازی مواد محیط کشت	شرایط کشت	سال انتشار
[60]	-	هم‌زدن در ۱۰۰ rpm	۲۵	۷/۵	۰/۵ مولار	در $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ بیشترین فتوسنتز و سرعت رشد را دارند و بیشتر از آن آسیب نوری می‌بینند. (۸۰۰۰ لوکس) در حالت عادی $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (۴۰۰۰ لوکس)	-	میکسوتروف (جانسون اصلاح شده)	۲۰۱۶
[59]	Orthogonal	ستونی	۲۲	۷/۵	۲ مولار	$135/3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ برای رشد (۱۰۸۲۴ لوکس) $245/6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ برای تولید بتاکاروتن (۱۹۶۴۸ لوکس)	غلظت بهینه برای رشد: ۰/۵ = KNO <sub>3</sub> = CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ۰/۳۶ ۱/۵ = NaHCO <sub>3</sub>  غلظت بهینه برای تولید بتاکاروتن: ۰ = KNO <sub>3</sub> = CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ۰/۱۲ ۱/۵ = NaHCO <sub>3</sub>	اتوتروف (جانسون اصلاح شده)	۲۰۱۶
[5]	RSM	هم‌زدن در ۱۳۰ rpm	۲۵ ± ۲	۷/۵	۰/۵ مولار	$60 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (۴۸۰۰ لوکس)	گلوکز = ۱۵ گرم بر لیتر نیترات = ۱/۸ گرم بر لیتر فسفات = ۰/۰۱۳ گرم بر لیتر	میکسوتروف (جانسون)	۲۰۱۶
[58]	-	Airlift	۲۲	۷	-	$90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	CO <sub>2</sub>	اتوتروف	۲۰۱۴

						(۷۲۰۰ لوکس)			
[61]	شبییه‌سازی با متلب	Flat-Plate	۲۴	۷/۵	۱/۵ مولار	$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} 130$ (۲۴۰۰ لوکس) سیکل ۱۶ ساعت/۸ ساعت	۹۷٪ هوا ۳٪ کربن دی اکسید بررسی: + کاهش جذب نور در راکتور + سرعت جذب نیپتروژن + سرعت فتوسنتز + سرعت هوادهی + نرخ رشد	اتوتروف	۲۰۱۴
[57]	-	هم زدن در ۱۱۰ rpm	۲۵ ± ۲	۷/۵	۰/۵ مولار	$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} 52/84$ فلورسانس سفید (۴۲۲۷ لوکس)	-	اتوتروف (محیط کشت راماراج)	۲۰۱۳
[62]	-	هم زدن در ۱۵ rpm در فتوبیوراکتور Airlift	در محیط باز و در فتوبیوراکتور بسته	۸ با تزریق کربن دی اکسید	۱۲/۵٪	-	-	اتوتروف (F2)	۲۰۱۱
[63]	RSM	Tubular	۲۳-۲۹	۸	۱ مولار	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1} 100$ (۸۰۰۰ لوکس) سیکل ۱۲ ساعته	نیترات: ۳/۷ میلی مولار فسفات: ۰/۱۷ میلی مولار ۳٪ کربن دی اکسید	میکسوتروف (محیط کشت D)	۲۰۱۱
[55]		هم زدن در ۱۵۰ rpm	۲۵ ± ۲	۷/۶ با تزریق کربن دی اکسید	۰/۵ مولار	$\text{mmols.m}^{-2}.\text{s}^{-1} 160$ (۴۸۰۰ لوکس)	-	اتوتروف (جانسون اصلاح شده)	۲۰۱۰

[56]	-	-	۲۰	۹/۱۸ بنون تزیق کربن دی اکسید	۴۵ Psu	۱۸۰۰۰ لوکس	غلظت فسفات: ۳۰ g m -3 d -3	اتوتروف (AFMED)	۲۰۱۰
[64]	-	Airlift	۲۵	۷/۵	۱/۵ مولار	-	یون Fe2+ منابع کربن ارگانیک (استات و مالونات)	هتروتروف	۲۰۰۸
[54]	-	Helix tube	۳۵	۷/۵	۱/۵ مولار	۸۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ لوکس	OD شروع ۰/۱۵ تا ۰/۲ میزان چرخش جریان : ۶۵۰ میلی لیتر بر ساعت	میکسوتروف (جانسون اصلاح شده)	۲۰۰۷
[65]	-	-	۲۵	۹	٪۱۵	۴۸ kerg cm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> (۱۷۷۶۰ لوکس)	۵ = NaNO3 میلی مولار	اتوتروف (جانسون اصلاح شده)	۲۰۰۶
[66]	-	Closed Tubular	۲۵	۰/۵ ± ۷/۵	۲ مولار	mol photon m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ۱۲۰۰ (۱۶۰۰۰)	مقدار ۹ سیس بتاکاروتن	اتوتروف (محیط کشت F2)	۲۰۰۵
[53]	-	همزدن دو بار در روز	۲۵	-	۲ مولار	۴۰ μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> (۳۲۰۰ لوکس)	مقایسه دو محیط کشت PES و ART	اتوتروف	۲۰۰۳
[67]	-	Two phase	۱ ± ۲۶	۷/۵	۱ مولار	۴/۵ mmol s <sup>1</sup> per cell بررسی در شدت های مختلف	-	اتوتروف	۲۰۰۳

با توجه به آن چه که در بالا دیده می شود محدوده ایده آل برای هر پارامتر را شناسایی کرده و بعد از انجام محاسبات مربوط به طراحی آزمایش، تست های مختلف انجام شده است.

## فصل 3 : روش تحقیق

### ۱-۳- تجهیزات آزمایشگاهی

#### ۱-۱-۳- مواد و تجهیزات

در این پژوهش از ریزجلبک دونالیلا سالیینای ایزوله شده در دانشگاه خلیج فارس شهرستان بوشهر استفاده شد. گونه‌ی اولیه‌ی آن از سواحل خلیج فارس واقع در استان بوشهر برداشت شده است. سپس در محیط کشت جامد آگار و با روش کشت سریالی خالص‌سازی شده و نهایتاً به صورت کشت داده شده در محیط کشت مایع مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات مواد و تجهیزات مورد استفاده در جداول زیر آورده شده است.

جدول (3-1) مواد استفاده شده در فرآیند کشت میکروجلبک دونالیلا سالیینا و استخراج بتاکاروتن از آن

تولیدکننده	فرمول شیمیایی	مواد
مرک آلمان	NaCl	سدیم کلرید
مرک آلمان	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	منیزیم کلرید ۶ آبه
مرک آلمان	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	منیزیم سولفات ۷ آبه
مرک آلمان	KCl	پتاسیم کلرید
مرک آلمان	CaCl <sub>2</sub>	کلسیم کلرید
مرک آلمان	KNO <sub>3</sub>	پتاسیم نیترات
مرک آلمان	NaHCO <sub>3</sub>	سدیم بی کربنات
مرک آلمان	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	مونو پتاسیم فسفات
مرک آلمان	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	آهن کلرید ۶ آبه
سیگما آلد ریچ	Na <sub>2</sub> EDTA	اتیلن دی آمین تترا استیک اسید فوق خالص
مرک آلمان	ZnCl <sub>2</sub>	روی کلرید
مرک آلمان	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	بوریک اسید
مرک آلمان	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	کیالت کلرید ۶ آبه
مرک آلمان	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	مس کلرید ۲ آبه
مرک آلمان	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	منگنز کلرید ۴ آبه
مرک آلمان	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	آمونیم هپتامولیبیدیت ۴ آبه
مرک آلمان	Acetone	استون
شرکت تیتراچم	Beta-Carotene	بتاکاروتن

جدول (3-2) تجهیزات استفاده شده در روند کشت میکروجلبک دونالیلا سالیینا و استخراج بتاکاروتن از آن

مدل	تجهیزات
Citizen (CX265)	ترازو
Shimadzu (UV-1800)	اسپکتروفتومتری
-	ور تکس

Pro Ultrasonic model 1911  
Nikon (YS100)  
WiseShake

اولتراسونیک  
میکروسکوپ الکترونی  
شیکر انکوباتور

## ۲-۳- کشت جلبک دونالیا سالیئا

### ۱-۲-۳- خالص سازی نمونه

مرحله‌ی اصلی و مهم در غربالگری ایجاد یک کشت خالص است. به عبارت دیگر در این مرحله تلاش می‌شود نمونه‌ی مشخصی از ریزجلبک که فاقد هر نوع ارگانسیم دیگری از جمله باکتری، قارچ، پروتوزوا و غیره باشد، مورد کشت قرار می‌گیرد. از جمله‌ی این روش‌ها می‌توان به استفاده از جهت تابش نور (به دلیل تجمع ریزجلبک در مکانی که بیشترین نور را دارد)، شستشوی سلول (با استفاده از وازد کردن آن به محیط استریل)، رقیق‌سازی سریالی، سانتریفوژ شیب چگالی (جداسازی با استفاده از اختلاف وزن باکتری و ریزجلبک)، تابش نور ماورابنفش (و در ادامه‌ی آن رقت‌سازی و کشت بر روی محیط کشت آگار)، فیلتراسیون، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و کشت در محیط کشت جامد اشاره کرد.

در این تحقیق، کشت این جلبک در ابتدا در محیط جامد آگار و به منظور خالص‌سازی با روش کشت سریالی انجام شد و پس از آن کشت در محیط کشت اصلاح شده‌ی جانسون صورت گرفت.

### ۲-۲-۳- شناسایی ریزجلبک‌ها به کمک آنالیز مولکولی 18 S rDNA

از آنجا که به دلیل تنوع بسیار زیاد گونه‌های ریزجلبکی ممکن است روش‌های معمول مانند مشاهده میکروسکوپی و مطالعات مورفولوژی در شناسایی آن‌ها کافی نباشد و از طرفی با توجه به پیشرفت روزافزون روش‌های بیولوژی مولکولی و سرعت بالا و همچنین اطمینان و راحتی شناسایی آن‌ها از طریق مقایسه ژن‌های محافظت‌شده<sup>1</sup> در سطح جنس و گونه ریزجلبک‌ها، رویکرد استفاده از آنالیز مولکولی 18 S rDNA روشی مناسب است.

در دهه‌های اخیر روش‌های آنالیز مولکولی در شناسایی میکروارگانسیم‌های مختلف بر اساس بررسی توالی ژن کدکننده زیرواحدهای سازنده RNA‌های ریبوزومی گسترش قابل توجهی یافته است. ناحیه کدکننده ژن 16S rDNA باکتری‌ها به شدت حفاظت شده است و می‌توان توالی ژن کدکننده این بخش از ژنوم باکتری را پس از تکثیر به کمک تکنیک<sup>2</sup> PCR توالی‌یابی کرد. با

<sup>1</sup> Conserved genes

<sup>2</sup> Polymerase Chain Reaction

وارد کردن این توالی در بانک‌های جهانی ژن<sup>1</sup> می‌توان ارگانیزم دارای آن توالی را شناسایی نمود. اخیراً همین روش در خصوص ریزجلبک‌های با یافتن پرایمرهای<sup>2</sup> مناسب جهت تکثیر ژن کدکننده‌ی 18S rDNA توسعه‌یافته است.

با توجه به نکات توضیح داده شده در مقالات و با توجه به توضیحات فوق، پس از طی مراحل اولیه و به دنبال تکثیر ژن هدف، تعیین توالی و در نهایت شناسایی گونه موردنظر انجام می‌گیرد. معمولاً سه نوع پرایمر شامل دو پرایمر بالادست (p45, p73) و یک پرایمر پایین‌دست (p47) طراحی و پیشنهاد می‌شود [68].

جدول (3-3) نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن 18s rDNA ریزجلبک‌ها [68]

نام پرایمر	توالی 5' → 3'	نوع پرایمر
P45	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT	پرایمر بالادست
P73	AATCAGTTATAGTTTATTTGRTGGTACC	پرایمر بالادست
P47	TCTCAGGCTCCCTCTCCGGA	پرایمر پایین‌دست

### ۳-۲-۳- انجام عملیات BLAST<sup>3</sup> جهت شناسایی سویه ریزجلبک

به منظور مقایسه میزان شباهت توالی ژن 18S rDNA حاصل از مراحل قبل با توالی ژن‌های موجود در بانک‌های جهانی ژن و شناسایی ارگانیزم مورد آزمایش عملیات BLAST انجام می‌گیرد. یکی از معتبرترین آن‌ها NCBI<sup>4</sup> است. در فصل ۴، نتایج حاصل از آن در مورد ریزجلبک برداشتی ما ارائه می‌شود.

### ۳-۲-۴- ساخت محیط کشت اصلاح‌شده‌ی جانسون

مواد تشکیل‌دهنده‌ی محیط کشت جانسون در جدول فوق آمده و روش ساختن آن را در زیر بیان می‌کنیم. مقادیر نمک‌های اصلی محیط کشت در زیر آمده است:

جدول (3-4) مواد اصلی تشکیل‌دهنده‌ی محیط کشت اصلاح‌شده‌ی جانسون

مقدار (گرم)	مواد
به مقدار مطلوب	سدیم کلرید

<sup>1</sup> Gene Bank

<sup>2</sup> Primers

<sup>3</sup> Basic Local Alignment Search Tool

<sup>4</sup> National Center for Biotechnology Information

۱/۵	منیزیم کلرید ۶ آبه
۰/۵	منیزیم سولفات ۷ آبه
۰/۲	پتاسیم کلرید
۰/۲	کلسیم کلرید
۱	پتاسیم نیترات
۰/۰۴۳	سدیم بی کربنات
۰/۰۳۵	مونو پتاسیم فسفات

مقادیر فوق را در ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو می‌کنیم. سپس محلول آهن حاوی مواد زیر را درست می‌کنیم:

جدول (3-5) محلول آهن

مقدار (گرم)	مواد
۲/۴۴	آهن کلرید ۶ آبه
۱/۸۹	اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید فوق خالص

مواد فوق را در یک میلی لیتر آب مخلوط کرده و سپس اتوکلاو می‌کنیم. علاوه بر آن، محلولی حاوی نمک‌های ذیل تحت عنوان محلول عناصر کمیاب<sup>1</sup> درست می‌کنیم:

جدول (3-6) عناصر کمیاب موجود در محیط کشت اصلاح شده‌ی جانسون

مقدار (میلی‌گرم)	مواد
۴/۱	روی کلرید
۶۱	بوریک اسید
۵/۱	کبالت کلرید ۶ آبه
۴/۱	مس کلرید ۲ آبه
۴/۱	منگنز کلرید ۴ آبه
۳۸	آمونیم هپتامولیدیت ۴ آبه

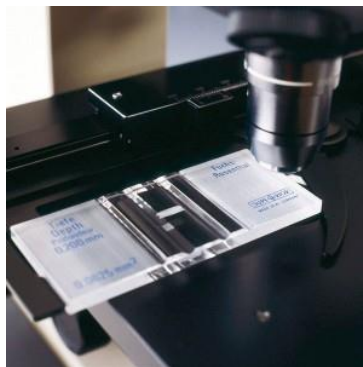
عناصر فوق را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل کرده و سپس اتوکلاو می‌کنیم. در ادامه، ۱۰ میلی لیتر از این محلول و ۱۰ میلی لیتر از محلول آهن را به ۹۸۰ میلی لیتر محلول نمک‌های اصلی اضافه کرده و بدین وسیله محلول محیط کشت اصلاح شده‌ی جانسون فراهم می‌شود. پس از آن با افزودن اسید کلریدریک و بی‌کربنات به آن، pH را روی ۷/۵ تنظیم می‌کنیم.

<sup>1</sup> Trace elements

تلقیح به میزان ۲۰ درصد میزان محیط کشت و در محیط استریل زیر هود استریل شده با UV و الکل انجام شده و کشت در ارلن صورت می‌گیرد. سپس در شیکر انکوباتور و در دمای موردنظر قرار می‌دهیم.

### ۳-۳- روش شمارش جلبک *دونالیا سالینا*

۳-۳-۱- شمارش تعداد سلول‌ها به کمک هموسایتومتر<sup>۱</sup>  
این وسیله که به لام نئوبار معروف است (شکل ۱-۳) عمدتاً برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون کاربرد دارد و در شمارش سلول‌های ریزجلبک‌های تک‌سلولی نیز به‌کار می‌رود. این لام در واقع حاوی یک محفظه‌ی میکروسکوپی به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر است که نمونه‌ی مورد نظر در آن محفظه قرار داده می‌شود. انواعی از تقسیم‌بندی‌های بسیار ریز، سطح این محفظه را به خانه‌هایی با گنجایش بسیار ریز تبدیل کرده است.



شکل (۲-۳) لام هموسایتومتر (نئوبار)

شمارش ریزجلبک‌ها بسته به نوع سلول و زمان تقسیم شدن آن به صورت روزانه و یا هر ۱۲ ساعت یک‌بار انجام می‌گیرد. برای شمارش تعداد سلول‌ها به ترتیب زیر عمل می‌شود.  
الف) پس از یکنواخت کردن کشت مایع حاوی ریزجلبک مورد نظر، یک قطره از آن را در محفظه مخصوص این لام قرار می‌دهند تا براساس خاصیت موئینگی به داخل محفظه نفوذ کند. در این مرحله می‌توان برای جلوگیری از حرکت بیش از حد سلول‌ها که ممکن است در عمل شمارش آن‌ها خطا ایجاد کند قبلاً به نمونه، محلول لوگل اضافه شود. لوگل با بی‌حرکت کردن سلول‌ها عمل شمارش را آسان‌تر خواهد کرد.

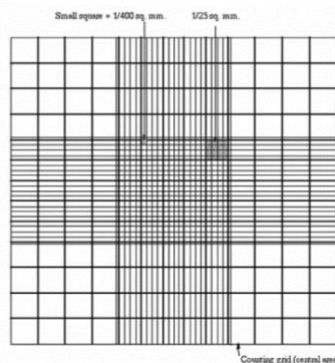
<sup>1</sup> Hemacytometer

ب) لام نئوبار را زیر میکروسکوپ قرار می‌دهند و شمارش ریزجلبک‌ها در بزرگنمایی مناسب انجام می‌گیرد.

پ) تمام سلول‌های داخل شبکه را از بالاترین مربع گوشه سمت راست شمارش می‌کنند. باید در نظر گرفت که سلول‌های روی خطوط در صورتی که در بالای خط قرار گیرند باید جزء سلول‌های آن مربع شمارش شوند و در غیر این صورت جزء مربع پایین در نظر گرفته می‌شوند تا از شمارش‌های تکراری اجتناب شود. برای راحتی کار توصیه می‌شود مربع مرکزی و ۴ مربع کناری مورد شمارش قرار گیرند و سپس میانگین تعداد موجود در آن‌ها گزارش شود.

ت) پس از شمارش، با در نظر گرفتن ضریب رقت و این‌که حجم محفظه ۰/۱ میلی‌لیتر بوده، تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر نمونه از فرمول زیر محاسبه می‌شود.  
ضریب رقت  $\times 10^2 \times$  میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده = تعداد سلول در یک میلی‌لیتر از نمونه

اگر نمونه برداشت‌شده از محیط کشت مستقیماً زیر میکروسکوپ شمارش شده باشد نیازی به ضریب رقت نیست ولی اگر به دلیل تعداد زیاد ناگزیر به رقیق‌سازی آن باشیم (مثلاً ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شود)، ضریب رقت نیز باید در محاسبات در نظر گرفته شود.



شکل (3-3) تقسیم‌بندی زیر میکروسکوپی لام هموسایتومتر

### ۳-۳-۲- شمارش تعداد سلول‌ها به روش کدورت‌سنجی

روش کدورت‌سنجی، راه دیگری جهت رسم منحنی رشد ریزجلبک‌ها است. به این منظور کدورت نمونه در طول موجی بین ۵۸۰ تا ۶۰۰ نانومتر قرائت می‌شود. در صورتی که منحنی استاندارد براساس میزان کدورت در مقابل تعداد سلول‌ها داشته باشیم می‌توان از روی کدورت حاصله به تعداد سلول‌ها پی برد.

منحنی استاندارد به این ترتیب رسم می‌شود که نمونه‌های مختلف را با رقیق‌سازی و شمارش تعداد سلول‌ها و سپس قرائت جذب در طول موجی بین ۵۸۰ تا ۶۰۰ نانومتر به عنوان دو متغیر  $x$  و  $y$  در نظر می‌گیریم. با رسم میزان کدورت هر نمونه در مقابل تعداد سلول‌ها و پیدا کردن محدوده خطی بودن این تابع، می‌توان به نوعی به منحنی استاندارد دست یافت. سپس با وارد کردن کدورت نمونه مورد آزمایش در معادله خط می‌توان تعداد سلول را به صورت تقریبی به دست آورد. همان‌طور که اشاره شد این روش نیز مشابه شمارش سلول‌ها تا حدی دارای خطا است ولی با این حال یکی از روش‌های مورد استفاده در رسم منحنی رشد ریز جلبک‌ها محسوب می‌شود. در استفاده از این روش، قادر به تشخیص سلول زنده از غیرزنده نیستیم.

۳-۳-۳- شمارش تعداد سلول‌ها به روش اندازه‌گیری وزن توده زیستی  
وزن توده زیستی تولیدشده در روزهای مختلف یکی دیگر از معیارهایی است که برای رسم منحنی رشد ریز جلبک به کار برده می‌شود. وزن توده‌ی زیستی به دو صورت مرطوب و خشک قابل اندازه‌گیری است. ابتدا سلول‌ها به کمک سانتریفوژ و یا صافی از محیط کشت جدا می‌شود. دقت کنید در صورت استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) ابتدا وزن کاغذ صافی را یادداشت نمایید. سپس سلول‌ها به کمک بافر شستشو (PBS)<sup>1</sup> و یا آب مقطر استریل شستشو داده می‌شوند. در مورد جلبک‌های دریایی محلول ایزوتونیکی مثل فرمات آمونیوم یا بی‌کربنات آمونیوم استفاده می‌شود که بی‌کربنات آمونیوم به دلیل قیمت کمتر و تبخیر در دمای پایین‌تر (۶۰ درجه سانتی‌گراد) بیشتر مورد استفاده است. وزن توده‌ی زیستی مرطوب عبارت است از تفاوت وزن کاغذ صافی دارای توده زیستی با کاغذ صافی قبل از صاف کردن که بلافاصله بعد از شستشو توزین شده باشد. وزن خشک توده‌ی زیستی با حذف آب توده زیستی حاصل از مرحله‌ی قبل با استفاده از حرارت در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید. امروزه بهترین روش خشک توده‌ی زیستی سلول‌ها، استفاده از روش لیوفیلیزاسیون است که در آن بدون ایجاد هرگونه استرسی، ابتدا توده‌ی زیستی در ازت مایع فریز شده و سپس با استفاده از دستگاه فریزدرایر<sup>2</sup> آب آن بیرون کشیده می‌شود. این روش امکان پاره شدن دیواره سلولی را کم می‌کند و از رها شدن ترکیبات داخل سلولی جلوگیری می‌شود.

### ۳-۴- روش محاسبه‌ی ضریب رشد ویژه<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Phosphate Buffer Saline

<sup>2</sup> Freeze-dryer

<sup>3</sup> Specific Growth Rate

پس از شمارش تعداد سلول‌ها، ضریب رشد ویژه و نرخ رشد را با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه می‌کنیم: برای محاسبه‌ی سرعت رشد (SGR) در روزهای مختلف از رابطه‌ی روبه‌رو استفاده می‌شود:

$$SGR = (\ln w_2 - \ln w_1) / (t_2 - t_1)$$

در این رابطه،  $w_2$  برابر با تعداد سلول در آخرین روز،  $w_1$  تعداد سلول در اولین روز،  $t_1$  اولین روز و  $t_2$  آخرین روز می‌باشد.

### ۳-۵- انداز‌گیری سایر ویژگی‌های ریز جلبک‌ها

۳-۵-۱- محاسبه‌ی میزان کلروفیل  $a$ ،  $b$  و میزان کل کاروتنوئیدها طی مطالعات مختلف انجام شده، در مورد هر حلال به صورت خالص و یا در حالت ناخالص و در مخلوط با کمک حلال، فرمول‌های استاندارد برای به دست آوردن میزان کلروفیل‌ها و کل کاروتنوئیدها گزارش شده که در این‌جا اعداد مربوط به حلال استون است [69-71]:

$$C_a (\mu g/ml) = 11.24 A_{661.6} - 2.04 A_{644.8}$$

$$C_b (\mu g/ml) = 20.13 A_{644.8} - 4.19 A_{661.6}$$

$$C_{(x+c)} (\mu g/ml) = (1000 A_{470} - 1.90 C_a - 63.14 C_b) / 214$$

همچنین مقایسه رنگ‌سنجی با به‌کارگیری حلال‌های مختلف در زیر آمده است [72]:

جدول (3-7) مقایسه‌ی رنگ‌سنجی با به‌کارگیری حلال‌های مختلف

استون	متانول ۹۰ درصد	دی‌اتیل‌اتر	نوع کلروفیل
$12.7(*A_{663}) - (2.69A_{645})$	$(16.5A_{665}) - (8.3A_{650})$	$(9.92A_{660}) - (0.77A_{642})$	کلروفیل A
$(22.9A_{645}) - (4.64A_{663})$	$(33.8A_{650}) - (12.5A_{665})$	$(17.6A_{642}) - (2.81A_{660})$	کلروفیل B
$(98.02A_{663} + 20.2A_{645})$	$(4A_{665} + 25.5A_{650})$	$(97.12A_{660}) + (16.8A_{642})$	کلروفیل A+B

### ۳-۵-۲- محاسبه‌ی میزان بتاکاروتن

در مورد محاسبه‌ی میزان بتاکاروتن، غلظت‌های متفاوتی از بتاکاروتن در حلال استون را آماده کرده (به‌طوری که کاملاً حل شده باشد) و با روش اسپکتوفتومتری میزان جذب آن را اندازه‌گیری کرده و معادله‌ی زیر به‌دست می‌آید.

$$BC (\mu\text{g/ml}) = 0.0267 A_{453} - 0.1846$$

۳-۶- بررسی اثر شوک نمکی NaCl در میزان تولید توده‌ی سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل a و کلروفیل b در شرایط بهینه‌ی رشد

بعد از به‌دست آوردن شرایط ایده‌آل رشد هر یک از فرآورده‌های حاصل از *دونالیلا سالینا*، ۵ نمونه در شرایط ایده‌آل رشد هر یک قرار دادیم و پس از اتمام فاز لگاریتمی و در ابتدای فاز مرگ به آن‌ها شوک نمکی در ۵ غلظت مختلف وارد شد. سپس با در نظر گرفتن تمام شرایط به صورت روزانه میزان بتاکاروتن تولیدی و میزان رشد آن‌ها بعد از شوک نمکی را تا ۹ روز اندازه گرفتیم که در فصل ۴ نتایج آن به طور کامل آورده شده است.

### ۳-۷- تغییر ژئومتریکی فتوبیوراکتور ایرلیفت<sup>۱</sup>

در این مطالعه می‌خواهیم بدانیم که با تغییر ابعاد فتوبیوراکتور چه آثاری را در رشد و تولید بتاکاروتن شاهد هستیم. به همین منظور، سه راکتور ایرلیفت با مشخصات زیر ساخته و ریزجلبک *دونالیلا سالینا* را در آن‌ها در شرایط بهینه کشت دادیم.

جدول (3-8) ویژگی‌های سه راکتور ایرلیفت با نسبت سطح به حجم متفاوت به‌کار برده شده در آزمایش

ارتفاع	شعاع مقطع	سطح جانبی	حجم	نسبت سطح به حجم (درصد)
50	۱/۲	120	2۲۵	53/3
50	2	200	6۲۵	32
50	2/5	250	980	25/5

### ۳-۸- طراحی آزمایش

برای تعیین اثر پارامترهای موردنظر و در نهایت یافتن شرایط بهینه‌ی رشد باید درک صحیحی از عوامل کنترل‌کننده‌ی رشد و استخراج بتاکاروتن داشت. با توجه به کارهای صورت گرفته بر روی رشد میکروجلبک و استخراج بتاکاروتن، پارامترهای عملیاتی موثر بر فرایند رشد را می‌توان به صورت زیر نام برد:

<sup>1</sup> Air-lift Photobioreactor

- ✓ مقدار نمک NaCl
- ✓ pH
- ✓ محیط کشت (وجود یا عدم گلوکز و سیکل نوری)
- ✓ شدت نور
- ✓ راکتور
- ✓ دما

شدت هوادهی و میزان تلقیح اولیهی ریزجلبک ثابت در نظر گرفته شد. برای انجام آزمایش‌های موثر و قابل تحلیل از نرم‌افزار Minitab کمک گرفته شد. به‌منظور تاثیرگذاری پارامترها و انجام آزمایش‌های موثر از روش پاسخ سطحی<sup>1</sup> طراحی ترکیب مرکزی<sup>2</sup> برای بدست آوردن نقاط مطلوب استفاده شد. ارتباط بین متغیرهای قابل کنترل و مشخصه‌های کیفی موردنظر و اینکه مقادیر متغیرهای قابل کنترل در سطوحی انتخاب شوند که مجموعه‌ی پاسخ‌ها بهینه شود، توسط این روش سنجیده می‌شود. به‌طور کلی از این روش می‌توان در بهینه‌سازی پاسخ یا پاسخ‌های حاصل از متغیرهای تاثیرگذار، با وجود کمترین منابع و داده‌های کمی استفاده کرد.

به منظور شناسایی احتمال وجود انحنای (معنا دار بودن اثر توان دو پارامترها) در محدوده عملیاتی پارامترها، سه نقطه میانی نیز در آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. در نتیجه نرم‌افزار تعداد ۳۳ آزمایش را بر اساس تعداد پارامترهای داده شده و سطوح در نظر گرفته شده ارائه کرده است. (شکل ۹-۳)

جدول (9-3) طراحی آزمایش براساس روش پاسخ سطحی در نرم‌افزار Minitab

ترتیب استاندارد	ترتیب انجام آزمایش	نمک (مولار)	pH	محیط کشت	شدت نور (لوکس)	حجم راکتور	دما (°C)
۲۷	۱	۱/۵	۸/۵	۲	۳۰۰۰	۶۰۰	۲۵
۲۵	۲	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۱۵
۳۳	۳	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
۲۴	۴	۲/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
۳۱	۵	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۲۰۰	۲۵
۲۹	۶	۱/۵	۶	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵

<sup>1</sup> Response surface method (RSM)

<sup>2</sup> Central composite design (CCD)

۲۳	۷	۰/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
۳۰	۸	۱/۵	۱۱	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
۳۲	۹	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۱۰۰۰	۲۵
28	۱۰	۱/۵	۸/۵	۲	۱۲۰۰۰	۶۰۰	۲۵
26	۱۱	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۳۵
14	۱۲	۲/۵	11	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۱۵
11	۱۳	۰/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵
6	۱۴	۲/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۱۵
12	۱۵	۲/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۳۵
18	۱۶	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
8	۱۷	۲/۵	۶	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۳۵
2	۱۸	۲/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۱۵
22	۱۹	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
9	۲۰	۰/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۱۵
19	۲۱	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
15	۲۲	۰/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۳۵
7	۲۳	۰/۵	۶	۱	۱۲۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵
10	۲۴	۲/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵
20	۲۵	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
21	۲۶	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
5	27	۰/۵	۶	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۱۵
4	28	۲/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵
1	29	۰/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵
3	30	۰/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۳۵
17	31	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵
16	32	۲/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵
13	33	۰/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵

پس از انجام آزمایش‌های مشخص شده توسط نرم‌افزار، مدل‌های مختلف برای بهینه‌سازی رشد و تولید بتاکاروتن از ریزجلبک‌ها بررسی شده‌اند و برای بررسی صحت مدل‌ها از دو پارامتر رگرسیون و مقدار  $p^1$  استفاده شده است.

یکی از مهم‌ترین پارامترها برای سنجش همپوشانی معادلات و داده‌های تجربی رگرسیون می‌باشد. سه نوع رگرسیون برای معادلات تعریف شده است. نوع اول رگرسیون معمول گفته می‌شود که بیانگر هماهنگی میان عددهای آزمایشگاهی با معادله‌ی ارائه شده است. مدل‌هایی مورد پذیرش هستند که تا 95% رگرسیون داشته باشند به این معنا که اختلاف داده‌های تجربی با میزان تئوری کمتر از 5% باشد. نوع دوم، رگرسیون تنظیم شده<sup>2</sup> است و به عبارت‌های معادله بستگی دارد و نشان‌دهنده‌ی این است که آیا با افزایش عبارت‌های مختلف به معادله، دقت معادله افزایش می‌یابد و یا عبارت اضافه شده تاثیر موردنظر را ندارد. نوع سوم، که رگرسیون پیش‌بینی شده<sup>3</sup> نامیده می‌شود، بیانگر این است که مدل انتخابی برای نقاطی غیر از داده‌های آزمایشگاهی تا چه حد قدرت پیش‌بینی دارد.

پارامتر دیگر مقدار  $p$  است. این مقدار برای مدل انتخابی و ضریب هر پارامتر در رابطه ارائه شده بیان می‌شود. عدد  $p$  معنی‌دار بودن ضریب هر پارامتر را در معادله‌ی ارائه شده نشان می‌دهد. چنانچه مقدار  $p$  برای پارامتری بیشتر از 0/05 باشد، احتمال وجود ضریبی به غیر از ضریب ارائه شده در معادله بیشتر از 5% است لذا ضریب ارائه شده برای پارامتر معنی‌دار نخواهد بود.

زمانی که اثر دو پارامتر بر روی پاسخ یک فرآیند مشاهده و بهینه می‌شود، می‌توان از نمودارهای سه‌بعدی پاسخ سطحی یا کانتور استفاده کرد. هر کانتور معمولاً مربوط به سطح ویژه‌ای از پاسخ سطحی است.

زمانی که پاسخ تحت‌تاثیر بیش از دو متغیر باشد، نمی‌توان از روش‌های ترسیمی استفاده کرد و باید از روش‌های عددی برای بهینه‌سازی پاسخ استفاده کرد.

---

<sup>1</sup> P-value

<sup>2</sup> Adjusted R-squared

<sup>3</sup> Predicted R-squared

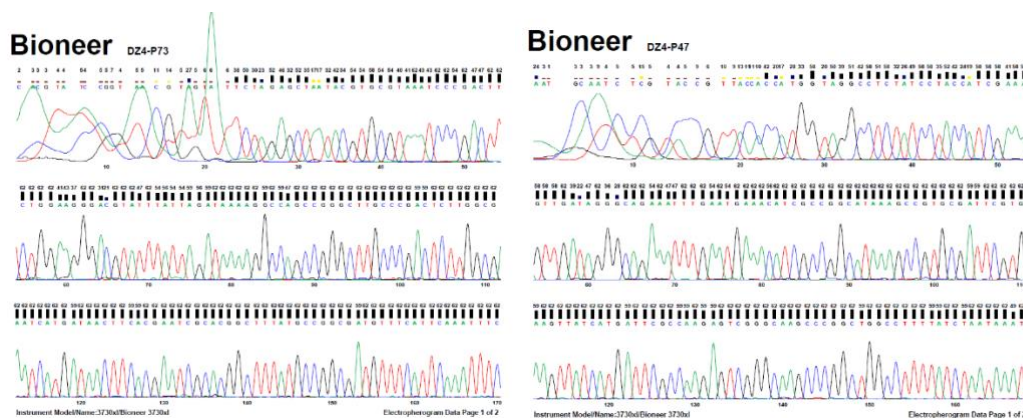


## فصل 4 : نتایج و تحلیل داده‌ها

در این بخش از پژوهش نتایج آزمایش‌ها و آنالیزهای آزمایشگاهی آورده شده است. در این تحقیق تاثیرگذاری هر کدام از پارامترهای مورد نظر مانند دما، مقدار نمک NaCl، pH، شدت نوردهی، ابعاد فتوبیوراکتور و نوع محیط کشت اتوتروف و میکسوتروف طبق روش پاسخ سطحی بررسی شده‌اند و میزان رشد دونالیلا سالیئا و میزان استخراج کل کاروتنوئیدها و بتاکاروتن از ریزجلبک دونالیلا سالیئا به صورت مدل تجربی ارائه شده است. برای بررسی صحت مدل‌ها از دو پارامتر رگرسیون و مقدار p استفاده شده است. چنانچه مقدار رگرسیون معادله‌ای نزدیک به یک باشد و مقدار p برای پارامترها کمتر از 0/05 باشد، رابطه‌ی پیش‌بینی شده از دقت بالایی برخوردار می‌باشد.

### ۴-۱- شناسایی ریزجلبک‌ها به کمک آنالیز مولکولی 18 S rDNA

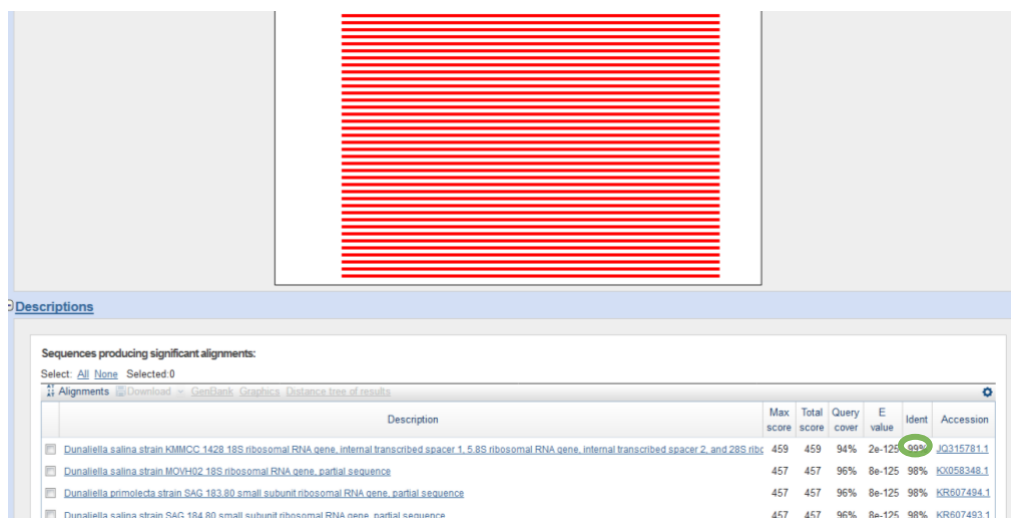
در مورد ریزجلبک برداشت شده‌ی ما تعیین توالی‌های زیر برای پرایمر بالادست p73 و پایین دست p45 انجام شد.



شکل (4-1) نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمر بالادست و پایین‌دست ریزجلبک دونالیلا سالیئا

## ۴-۲- انجام عملیات BLAST جهت شناسایی سویه ریزجلبک *دونالیلا سالینا*

در مورد ریزجلبک برداشت شده‌ی ما از خلیج فارس، توالی ژن با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شده و ارگانیزم هدف مورد شناسایی قرار گرفت. در زیر تصویری از BLAST انجام شده در ncbi آورده شده و بر اساس نتایج، نزدیک‌ترین سویه به سویه‌ی ما *Dunaliella Salina* شاخه‌ی KMMCC 1428 با درصد شباهت ۹۹ درصد به *Dunaliella Salina* مورد بررسی ما است.



شکل (4-2) نتیجه‌ی حاصل از انجام BLAST جهت شناسایی گونه‌ی ریزجلبک

## ۴-۳- شمارش جلبک *دونالیلا سالینا*

۴-۳-۱- شمارش تعداد سلول‌ها به کمک هموسایتومتر  
 بر طبق این روش و با در نظر گرفتن اعداد حاصل، فرمول  $y = 191.1x - 26.746$  با  $R^2 = 0.9968$  به عنوان فرمول منحنی استاندارد به دست آمد که بر اساس آن  $x$  میزان  $OD^{1}$  را نشان داده و  $y$  نشان‌دهنده‌ی چگالی سلول  $(\times 10^5 \text{ ml}^{-1})^2$  است.

۴-۳-۲- شمارش تعداد سلول‌ها به روش اندازه‌گیری وزن توده‌ی زیستی

<sup>1</sup> Optical Density

<sup>2</sup> Cell Density

حاصل مرتب کردن داده‌ها در این روش، فرمول  $y = 71.542x - 26.18$  با  $R^2 = 0.9896$  است که در آن  $x$  میزان OD و  $y$  نشان‌دهنده‌ی توده‌ی زیستی تولید شده ( $\text{mg.ml}^{-1}$ ) است.<sup>(1)</sup>

#### ۴-۴- محاسبه‌ی ضریب رشد ویژه

پس از مشاهده‌ی رشد اولیه و رشد نهایی آن پس از گذشت ۲۵ روز، نرخ رشد را در کمترین و بیش‌ترین حالت داریم؛  
در بهینه‌ترین شرایط در مورد تیمار با ترتیب استاندارد ۱۳؛

$$\frac{(\ln(828/2) - \ln(11/4))}{24} = 0.17$$

در حداقلی‌ترین شرایط در مورد تیمار با ترتیب استاندارد ۲؛

$$\frac{(\ln(582/2) - \ln(11/4))}{24} = 0.16$$

#### ۴-۵- طراحی آزمایش

اندازه‌گیری سایر ویژگی‌های ریزجلبک‌ها مانند میزان توده‌ی سلولی تولید شده و میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها پس از انجام آزمایشات پی در پی در طراحی آزمایش انجام شده، به صورت زیر گزارش شد.

جدول (4-1) نتایج به‌دست آمده از انجام آزمایش‌های مختلف پیش‌بینی شده با طراحی آزمایش

میزان کل کاروتنوئیدها	میزان کلروفیل b	میزان کلروفیل a	میزان بتاکاروتن	میزان توده زیستی	دما (°C)	حجم راکتور	شدت نور (لوکس)	محیط کشت	pH	نمک (مولار)	ترتیب انجام آزمایش	ترتیب استاندارد
۱۰۵/۱۲	۸/۷۴	۳۵/۴۰	۹۵/۲۴	۷۱۲/۶	۲۵	۶۰۰	۳۰۰۰	۲	۸/۵	۱/۵	۱	۲۷
۱۰۴/۰۱	۸/۵۱	۳۵/۲۴	۹۴/۳۱	۶۱۹/۴	۱۵	۶۰۰	۷۵۰۰	۲	۸/۵	۱/۵	۲	۲۵
۱۱۰/۴۷	۱۰/۴۷	۳۹/۷۸	۱۰۶/۸۹	۷۳۹/۱	۲۵	۶۰۰	۷۵۰۰	۲	۸/۵	۱/۵	۳	۳۳
۱۰۹/۳۱	۱۳/۰۱	۳۷/۲۹	۱۰۴/۹۵	۷۱۹/۸	۲۵	۶۰۰	۷۵۰۰	۲	۸/۵	۲/۵	۴	۲۴
۱۰۳/۸۹	۸/۶۲	۳۵/۷۴	۹۳/۵۶	۷۱۰/۴	۲۵	۲۰۰	۷۵۰۰	۲	۸/۵	۱/۵	۵	۳۱
۱۰۹/۱۲	۸/۴۱	۳۵/۶۱	۱۰۴/۳۱	۶۳۶/۴	۲۵	۶۰۰	۷۵۰۰	۲	۶	۱/۵	۶	۲۹

۲۳	۷	۰/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۸۱۱/۷	۱۱۱/۲۸	۳۵/۰۱	۱۰/۲۸	۱۱۳/۲۲
۳۰	۸	۱/۵	۱۱	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۶۶۰/۳	۹۴/۸۷	۳۵/۸۹	۸/۵۳	۱۰۴/۳۹
۳۲	۹	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۱۰۰۰	۲۵	۷۹۹/۴	۹۵/۶۳	۳۵/۶۴	۸/۵۹	۱۰۵/۰۱
28	۱۰	۱/۵	۸/۵	۲	۱۲۰۰۰	۶۰۰	۲۵	۸۰۴/۳	۹۴/۵۱	۳۵/۳۱	۸/۳۱	۱۰۴/۲۱
26	۱۱	۱/۵	۸/۵	۲	۷۵۰۰	۶۰۰	۳۵	۶۲۰/۱	۱۰۵/۲۰	۳۵/۰۹	۸/۲۴	۱۰۹/۸۱
14	۱۲	۲/۵	11	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۱۵	۷۲۵/۱	۶۵/۲۷	۱۶/۷۰	۵/۲۴	۹۰/۱۰
11	۱۳	۰/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵	۷۱۶/۴	۸۵/۲۷	۱۵/۸۹	۳/۱۷	۹۹/۶۱
6	۱۴	۲/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۱۵	۷۰۴/۶	۷۴/۸۲	۱۶/۵۹	۵/۴۷	۹۵/۲۶
12	۱۵	۲/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۳۵	۵۸۹/۷	۷۵/۲۰	۱۶/۸۴	۵/۲۹	۹۵/۳۸
18	۱۶	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۷۱۹/۷	۱۰۶/۲۷	۳۹/۶۴	۱۰/۴۹	۱۱۰/۷۴
8	۱۷	۲/۵	۶	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۳۵	۶۱۱/۸	۸۳/۷۱	۱۵/۲۳	۵/۴۱	۹۸/۲۹
2	۱۸	۲/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۱۵	۵۸۲/۲	۷۶/۱۱	۱۴/۹۶	۵/۲۱	۹۶/۶۲
22	۱۹	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۷۲۲/۴	۱۰۶/۰۱	۳۸/۵۹	۱۰/۴۵	۱۱۰/۱۹
9	۲۰	۰/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۱۵	۶۲۸/۹	۷۷/۱۲	۱۵/۱۱	۳/۰۱	۹۶/۹۹
19	۲۱	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۷۲۵/۱	۱۰۷/۰۱	۳۹/۷۸	۱۰/۵۲	۱۱۱/۴۱
15	۲۲	۰/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۳۵	۷۴۰/۱	۸۷/۳۹	۱۶/۰۹	۳/۶۴	۱۰۰/۳۷
7	۲۳	۰/۵	۶	۱	۱۲۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵	۸۱۳/۲	۹۷/۲۴	۱۶/۲۵	۳/۴۸	۱۰۵/۲۹
10	۲۴	۲/۵	۱۱	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵	۶۰۳/۴	۶۷/۹۱	۱۵/۰۷	۵/۳۸	۹۱/۰۲
20	۲۵	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۷۲۱/۶	۱۰۶/۲۱	۳۹/۶۷	۱۰/۵۹	۱۱۱/۲۷
21	۲۶	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۷۲۴/۹	۱۰۶/۳۲	۳۹/۸۱	۱۰/۵۲	۱۱۱/۳۹
5	27	۰/۵	۶	۱	۱۲۰۰۰	۲۰۰	۱۵	۷۳۷/۴	۸۸/۲۴	۲۲/۰۱	۳/۲۰	۱۰۱/۱۲
4	28	۲/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵	۶۰۳/۹	۸۵/۰۴	۱۵/۲۱	۵/۵۸	۹۹/۳۱
1	29	۰/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵	۷۲۸/۷	۸۷/۰۰	۱۶/۵۴	۳/۱۸	۱۰۰/۰۹
3	30	۰/۵	۶	۱	۳۰۰۰	۲۰۰	۳۵	۶۳۳/۵	۹۶/۷۵	۱۶/۲۳	۳/۳۷	۱۰۴/۷۱
17	31	۱/۵	۸/۵	۱	۷۵۰۰	۶۰۰	۲۵	۷۲۳/۸	۱۰۴/۸۹	۳۹/۵۹	۱۰/۶۱	۱۱۰/۰۶
16	32	۲/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۱۰۰۰	۳۵	۷۱۱/۹	۷۶/۰۵	۱۵/۵۴	۵/۷۹	۹۵/۷۰
13	33	۰/۵	۱۱	۱	۱۲۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵	۸۲۸/۲	۷۷/۶۹	۱۵/۴۱	۳/۵۲	۹۵/۹۹

حال با توجه به نتایج فوق و آنچه از آنالیز اطلاعات فوق به دست آمده است، به تحلیل هر یک از نتایج فوق می‌پردازیم.

#### ۴-۵-۱- بررسی بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید توده‌ی زیستی ریز جلبک

##### دونالیلا سالیئا با استفاده از مدل RSM

به منظور بررسی دقت مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار Minitab برای تولید توده‌ی زیستی، دو پارامتر رگرسیون و مقدار  $p$  در نظر گرفته شده است. علاوه بر این پارامتر کمبود تناسب<sup>1</sup> هم در راستای بررسی مناسب بودن مدل استفاده شده برای طراحی آزمایش، در نظر گرفته می‌شود و در شرایطی که مقدار آن بالاتر از  $0/05$  باشد به معنای عدم تاثیرگذاری آن و مناسب بودن مدل برای داده‌هاست.

جدول (2-4) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲

نوع پارامتر	درصد رگرسیون
رگرسیون معمول	۹۹/۳۱
رگرسیون تنظیم شده	۹۷/۹۸
رگرسیون پیش‌بینی شده	۶۱/۵۰

رگرسیون معادله‌ای که ارائه می‌شود  $99\%$  است که این عدد صحت رابطه‌ی ارائه شده را تایید می‌کند. همچنین پارامتر کمبود تناسب هم با مقدار  $p$  برابر با  $0/06$ ، تاثیرگذار بوده و در نظر گرفته نمی‌شود. از این رو می‌توان در نظر داشت که مدل انتخاب شده برای طراحی آزمایش درست است. پس از حذف پارامترهای با مقدار  $p$  بالاتر از  $0/05$ ، پارامترهای معنی‌دار را در (جدول ۳-۴) داریم.

<sup>1</sup> Lack of Fit

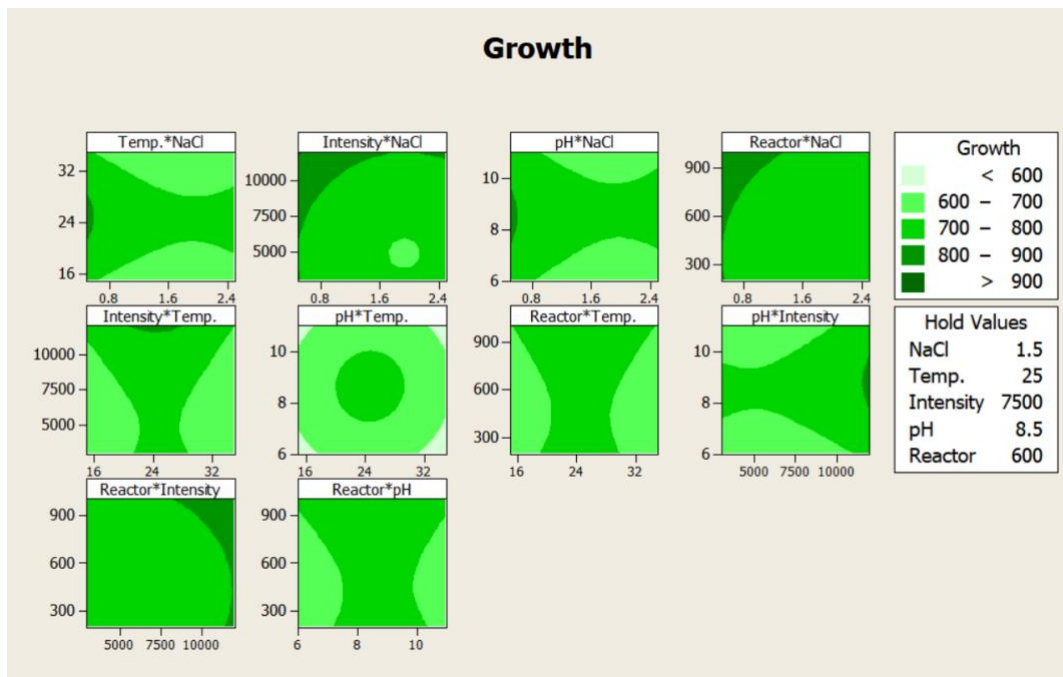
جدول (3-4) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید توده‌ی زیستی و مقدار ضرایب آنها

عبارت	نماد	مقدار p	ضریب
ثابت رابطه	-	۰	-۴۲۳/۰۶۲
نمک NaCl	S	0	-۱۷۸/۴۱۵
دما	T	۰/۰۱۷	۴۷/۹۶۹
شدت نور	I	0	-۰/۰۲۲
pH	P	۰/۰۰۴	۱۷۹/۹۴۱
راکتور	R	0	-۰/۱۳۱
(نمک) <sup>۲</sup>	S <sup>2</sup>	0	۴۸/۵۳۱
(دما) <sup>۲</sup>	T <sup>2</sup>	0	-۰/۹۷۴
(شدت نور) <sup>۲</sup>	I <sup>2</sup>	0	۱۰ <sup>-۶</sup>
			۲/۰۳۶x
(pH) <sup>۲</sup>	P <sup>2</sup>	0	-۱۱/۰۱۸
(راکتور) <sup>۲</sup>	R <sup>2</sup>	0	۰/۰۰۰۲
(نمک)*(pH)	S*P	۰/۰۰۸	۳/۱۷۰
(نمک)*(راکتور)	S*R	0	-۰/۰۳۶
(دما)*(شدت نور)	T*I	۰/۰۱۲	-۴
			۱/۶۴۷x۱۰
(شدت نور)*(pH)	P*I	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۸
(pH)*(راکتور)	P*R	۰/۰۱۸	-۰/۰۰۶

معادله حاصل به صورت زیر است:

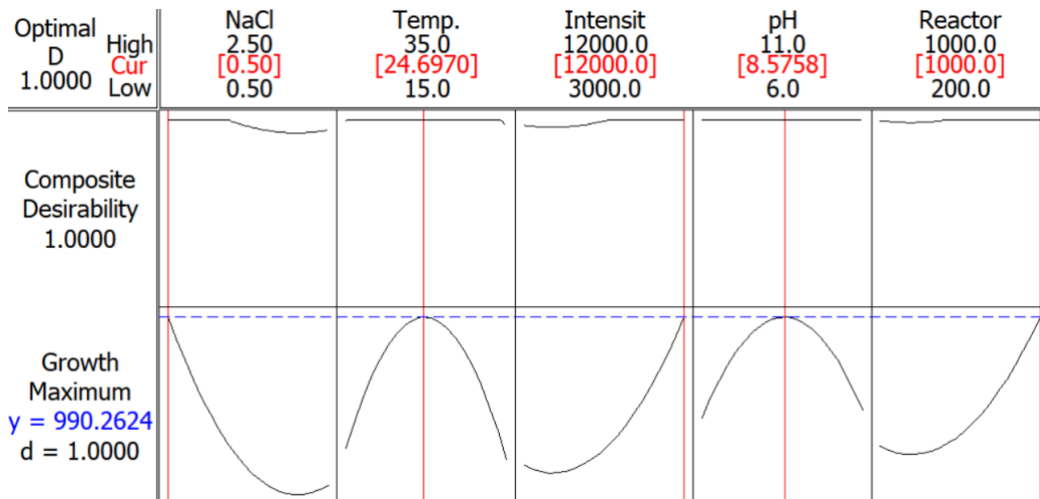
$$Y = -423.062 - 178.415 S + 47.969 T - 0.022 I + 179.941 P - 0.131 R + 48.531 S^2 - 0.974 T^2 + 2.036 \times 10^{-6} I^2 - 11.018 P^2 + 0.0002 R^2 + 3.17 SP - 0.036 SR + 1.647 \times 10^{-4} TI + 0.0008 PI - 0.006 PR$$

بر اساس نمودارهای کانتور که در ادامه آمده است، رابطه‌ی معنادار بین جفت پارامترها وجود دارد که در مورد نمک NaCl و اثر راکتور بهترین مشاهده در مقدار نمک کمتر از ۱ مولار و راکتور با حجم بالاتر از ۶۰۰ میلی‌لیتر، در مورد نمک و pH، بهترین رشد در نمک ۰/۵ مولار و pH بین ۷/۵ تا ۹ است. در جفت پارامتر شدت نور و pH، شدت نور بالای ۷۰۰۰ لوکس و pH حدود ۸/۵ بهترین محدوده‌ی رشد است. در دما و شدت نور، دمای حدود ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور بالای ۱۰۰۰ لوکس بهترین میزان رشد را نشان می‌دهد. در مورد راکتور و pH، حجم حدود ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و pH معادل با محدوده‌ی ۹ بهترین اعداد رشد را فراهم کرده است.



شکل (3-4) مجموعه نمودارهای کانطور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید توده‌ی زیستی

نمودارهای بهینه‌سازی شرایط آزمایش و میزان مطلوبیت<sup>1</sup> از داده‌های به‌دست آمده نیز به صورت زیر است که با توجه به مدل به‌دست آمده از طراحی آزمایش و تطبیق مناسب آن با داده‌های تجربی، می‌توان میزان بهینه‌ی پارامترها را در بازه‌ی معنی‌دار آن‌ها به‌دست آورد.



شکل (4-4) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها

از آنجایی‌که هدف اصلی ما افزایش تولید توده‌ی سلولی است، یافتن بیشینه‌ی رشد مطلوب است

<sup>1</sup> Desirability

و با توجه به معادله، بهینه‌ی پارامترها حاصل می‌شود. همچنین در 4-4 نشان داده شده است.

جدول (4-4) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی توده‌ی زیستی

پارامتر	اندازه بهینه
نمک NaCl	۰/۵
دما	۲۵
شدت نور	۱۲۰۰۰
pH	۸/۵۷
حجم راکتور	۱۰۰۰

بنابراین نمونه بهینه در شرایط فوق به دست می‌آید.

#### ۲-۵-۴ بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید بتاکاروتن از ریزجلبک دونالیلا سالینا با استفاده از مدل RSM

در مورد تولید بتاکاروتن و شناسایی شرایط بهینه‌ی کشت، با توجه به داده‌های حاصل، رگرسیون به صورت زیر است:

جدول (4-5) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲

نوع پارامتر	درصد رگرسیون
رگرسیون معمول	۹۹/۵۶
رگرسیون تنظیم شده	۹۸/۷۲
رگرسیون پیش‌بینی شده	۷۱/۹۷

با توجه به رگرسیون ۹۹٪ ای معادله‌ای که ارائه می‌شود، می‌توان به رابطه‌ای که در ادامه داریم استناد کرد. همچنین پارامتر کمبود تناسب هم با مقدار p برابر با ۰/۰۶۲، تاثیرگذار بوده و در نظر گرفته نمی‌شود. از این رو می‌توان در نظر داشت که مدل انتخاب شده برای طراحی آزمایش درست است.

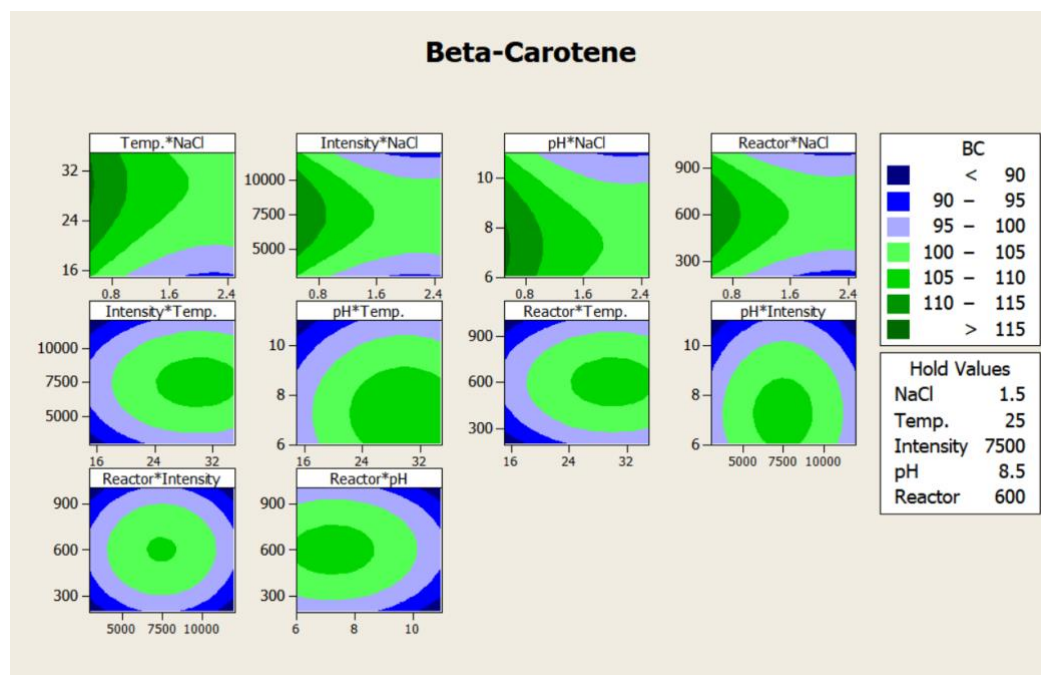
پس از حذف پارامترهای با مقدار p بالاتر از ۰/۰۵، پارامترهای معنی‌دار را در جدول ۴-۶ داریم؛

جدول (4-6) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید بتاکاروتن و مقدار ضرایب آن‌ها

ضریب	مقدار p	نماد	عبارت
-2/137	۰	-	ثابت رابطه
۰/۷۹۷	۰/۰۳۵	M	محیط کشت
-۱۷/۶۲۸	0	S	نمک NaCl
۲/۷۴۸	۰	T	دما
۱۰/۷۰۴	۰	P	pH
۳/۷۴۴	۰/۰۰۲	S <sup>2</sup>	(نمک) <sup>۲</sup>
-۰/۰۴۶	0	T <sup>2</sup>	(دما) <sup>۲</sup>
$\times 10^{-7}$	0	I <sup>2</sup>	(شدت نور) <sup>۲</sup>
-۴/۶۸۹			
-۰/۷۶۴	0	P <sup>2</sup>	(pH) <sup>۲</sup>
$\times 10^{-5}$	0	R <sup>2</sup>	(راکتور) <sup>۲</sup>
-۶/۱۰۹			

معادله‌ی حاصل به صورت زیر است:

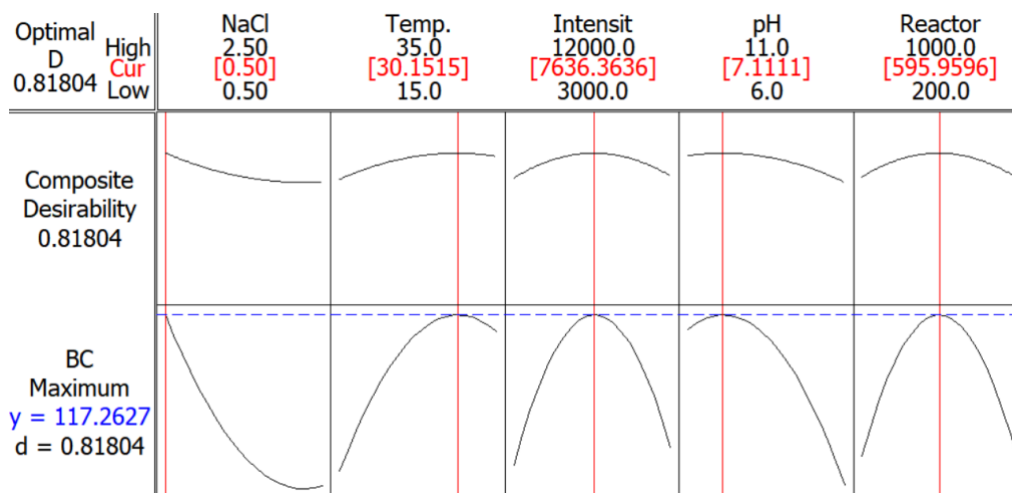
$$Y = -2.137 + 0.797 M - 17.628 S + 2.748 T + 10.704 P + 3.744 S^2 - 0.046 T^2 - 4.689 \times 10^{-7} I^2 - 0.764 P^2 - 6.109 \times 10^{-5} R^2$$



شکل (4-5) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید بتاکاروتن

بر اساس نمودارهای کانتور که در بالا آمده است، رابطه‌ی معنادار بین هیچ‌یک از جفت پارامترها وجود ندارد و روابط کلی آن‌ها نشان داده شده است.

نمودارهای بهینه‌سازی شرایط آزمایش و میزان مطلوبیت از داده‌های به‌دست آمده نیز به صورت زیر است که با توجه به مدل به‌دست آمده از طراحی آزمایش و تطبیق مناسب آن با داده‌های تجربی، می‌توان میزان بهینه‌ی پارامترها را در بازه‌ی معنی‌دار آن‌ها به‌دست آورد.



شکل (4-6) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها

از آنجایی‌که هدف اصلی ما افزایش تولید بتاکاروتن است، یافتن بیشینه‌ی تولید مطلوب است و با توجه به معادله، بهینه‌ی پارامترها حاصل می‌شود. همچنین در جدول ۴-۷ نشان داده شده است.

جدول (4-7) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی بتاکاروتن

اندازه بهینه	پارامتر
۰/۵	نمک NaCl
۳۰/۱۵	دما
۷۶۳۶/۳۶	شدت نور
۷/۱۱	pH
۵۹۵/۹۵	حجم راکتور

بنابراین نمونه بهینه در شرایط فوق به‌دست آمده است.

۴-۵-۳- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید کلروفیل a از ریز جلبک دونالیلا سالینا با استفاده از مدل RSM

در مورد تولید کلروفیل a و شناسایی شرایط بهینه‌ی کشت، با توجه به داده‌های حاصل، رگرسیون به صورت زیر است:

جدول (4-8) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲

نوع پارامتر	درصد رگرسیون
رگرسیون معمول	۹۹/۸۱
رگرسیون تنظیم شده	۹۹/۴۴
رگرسیون پیش‌بینی شده	۸۴/۷۵

با توجه به رگرسیون ۹۹٪ ای معادله‌ای که ارائه می‌شود، می‌توان به رابطه‌ای که در ادامه داریم استناد کرد. همچنین پارامتر کمبود تناسب هم با مقدار p برابر با ۰/۰۵۲، با تقریب تاثیرگذار بوده و در نظر گرفته نمی‌شود. از این رو می‌توان در نظر داشت که مدل انتخاب شده برای طراحی آزمایش مناسب است. پس از حذف پارامترهای با مقدار p بالاتر از ۰/۰۵، پارامترهای معنی‌دار زیر را داریم؛

جدول (4-9) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید کلروفیل a و مقدار ضرایب آن‌ها

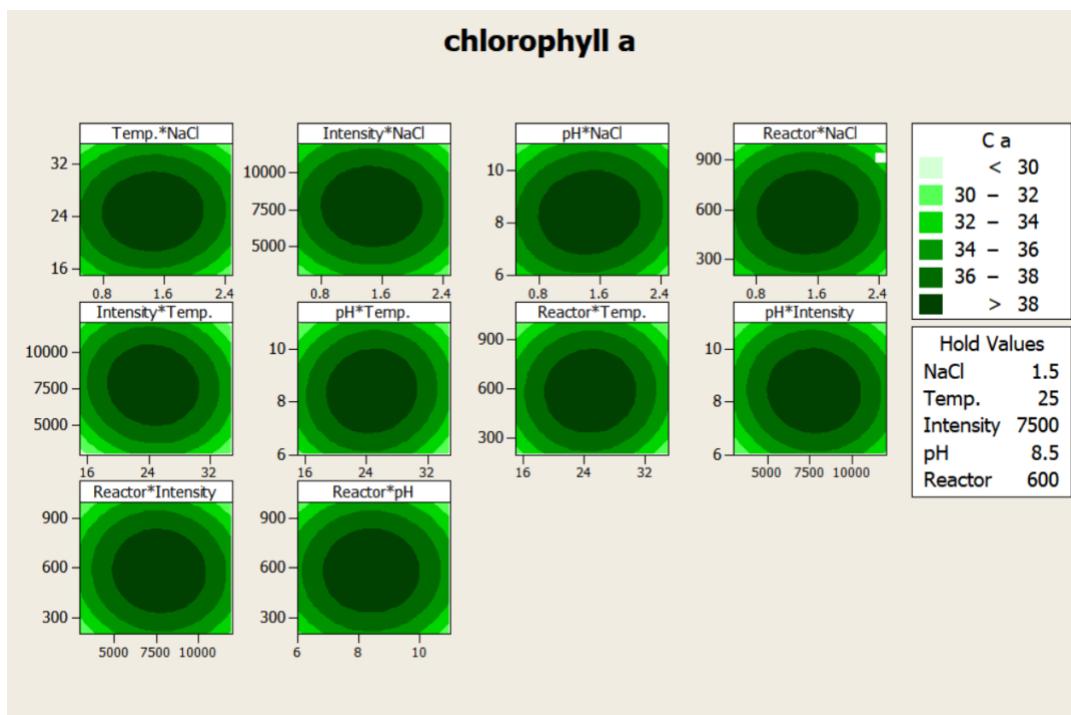
عبارت	نماد	مقدار p	ضریب
ثابت رابطه	-	۰	-۷۰/۸۶۰
شدت نور	I	۰/۰۴۳	۰/۰۰۴
(نمک) <sup>۲</sup>	S <sup>2</sup>	۰	-۴/۱۲۴
(دما) <sup>۲</sup>	T <sup>2</sup>	0	-۰/۰۵۱
(شدت نور) <sup>۲</sup>	I <sup>2</sup>	0	-۲/۴۲۹
(pH) <sup>۲</sup>	P <sup>2</sup>	0	-۰/۷۲۳
(راکتور) <sup>۲</sup>	R <sup>2</sup>	0	-۲/۸۶۵
(نمک)*(pH)	S*P	۰/۰۰۷	۰/۲۶۷
(دما)*(شدت نور)	T*I	۰/۰۱۰	× ۱۰ <sup>-۵</sup>
(دما)*(pH)	T*P	0/016	-۱/۴۰۱
			۰/۰۲۳

معادله‌ی حاصل به صورت زیر است:

$$Y = -70.860 + 0.004 I - 4.124 S^2 - 0.051 T^2 - 2.429 I^2 - 0.723 P^2 - 2.865 R^2 + 0.267 SP - 1.401 \times 10^{-5} IT + 0.023 PT$$

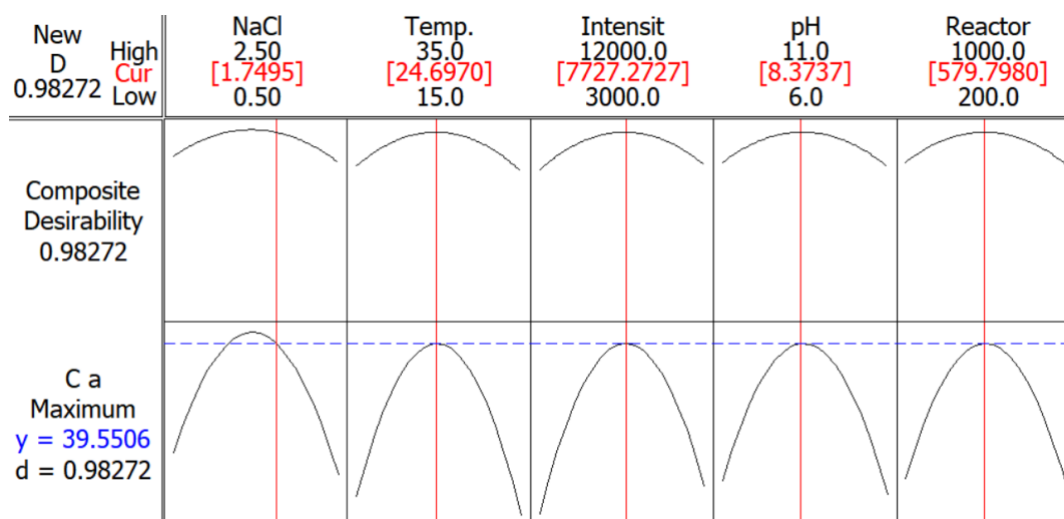
بر اساس نمودارهای کانتور که در ادامه آمده است، رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف نشان داده شده است که در این میان رابطه‌ی جفت پارامتر نمک و pH، به صورت محدودی

۸/۵ برای pH و ۱/۵ مولار برای نمک برای تولید بیشترین میزان کلروفیل a، معنادار است. از دیگر روابط بین جفت پارامترهای معنادار می‌توان به رابطه‌ی دما و شدت نور با محدوده دمایی حدود ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور ۷۵۰۰ لوکس اشاره کرد. جفت پارامتر دیگری که دارای اثر متقابل روی یکدیگر است جفت پارامتر دما و pH است که بهترین میزان دما حدود ۲۵ و اپتیمم pH حدود ۸/۵ برای دستیابی به بیشترین میزان کلروفیل a است.



شکل (4-7) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید کلروفیل a

نمودارهای بهینه‌سازی شرایط آزمایش و میزان مطلوبیت از داده‌های به‌دست آمده نیز به صورت زیر است و با توجه به مدل به‌دست آمده از طراحی آزمایش و تطبیق مناسب آن با داده‌های تجربی، می‌توان میزان بهینه‌ی پارامترها را در بازه‌ی معنی‌دار آن‌ها به‌دست آورد.



شکل (4-8) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها

از آنجایی که هدف اصلی ما افزایش تولید کلروفیل a است، یافتن بیشینه‌ی تولید کلروفیل a مطلوب است و با توجه به معادله، بهینه‌ی پارامترها حاصل می‌شود که در جدول ۴-۱۰ نشان داده شده است.

جدول (4-10) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی کلروفیل a

اندازه بهینه	پارامتر
۱/۷۴	نمک NaCl
۲۴/۶۹	دما
۷۶۲۷/۲۷	شدت نور
۸/۳۷	pH
۵۷۹/۷۹	حجم راکتور

بنابراین نمونه بهینه در شرایط فوق به دست آمده است.

#### ۴-۵-۴- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید کلروفیل b از ریز جلبک دونالیا سالیئا با استفاده از مدل RSM

در مورد تولید کلروفیل b و شناسایی شرایط بهینه‌ی کشت، با توجه به داده‌های حاصل، رگرسیون به صورت زیر است:

جدول (4-11) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲

نوع پارامتر	درصد رگرسیون
رگرسیون معمول	۹۹/۸۲
رگرسیون تنظیم شده	۹۹/۴۹
رگرسیون پیش‌بینی شده	۸۴/۱۵

با توجه به رگرسیون ۹۹٪ ای معادله‌ای که ارائه می‌شود، می‌توان به رابطه‌ای که در ادامه داریم استناد کرد. همچنین پارامتر کمبود تناسب هم با مقدار p برابر با ۰/۰۷۲، با تقریب تاثیرگذار بوده و در نظر گرفته نمی‌شود. از این رو می‌توان در نظر داشت که مدل انتخاب شده برای طراحی آزمایش درست است.

پس از حذف پارامترهای با مقدار p بالاتر از ۰/۰۵، پارامترهای معنی‌دار زیر را داریم؛

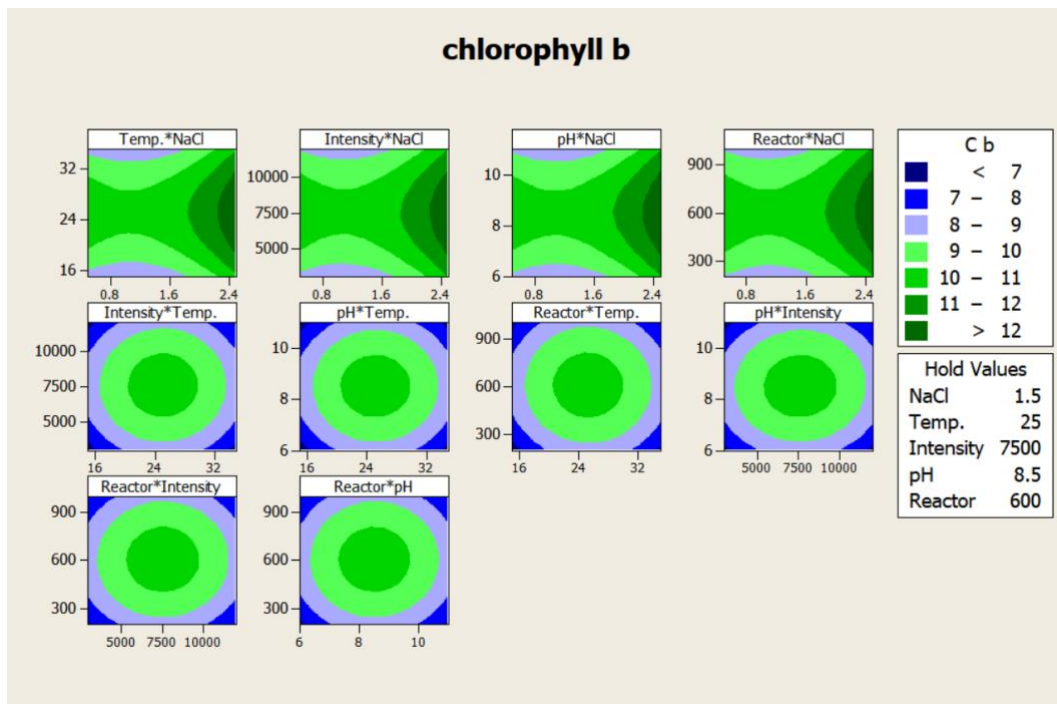
جدول (4-12) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید کلروفیل b و مقدار ضرایب آن‌ها

عبارت	نماد	مقدار p	ضریب
ثابت رابطه	-	۰	-۳۱/۵۰۹
نمک	S	۰	-۲/۷۸۵
(نمک) <sup>۲</sup>	S <sup>2</sup>	۰	۱/۲۸۸
(دما) <sup>۲</sup>	T <sup>2</sup>	۰	-۰/۰۱۹
(شدت نور) <sup>۲</sup>	I <sup>2</sup>	0	$\times 10^{-8}$
			-۹/۰۴۵
(pH) <sup>۲</sup>	P <sup>2</sup>	0	-۰/۳۰۱
(راکتور) <sup>۲</sup>	R <sup>2</sup>	0	$-1/0.94 \times 10^{-5}$

معادله‌ی حاصل به صورت زیر است:

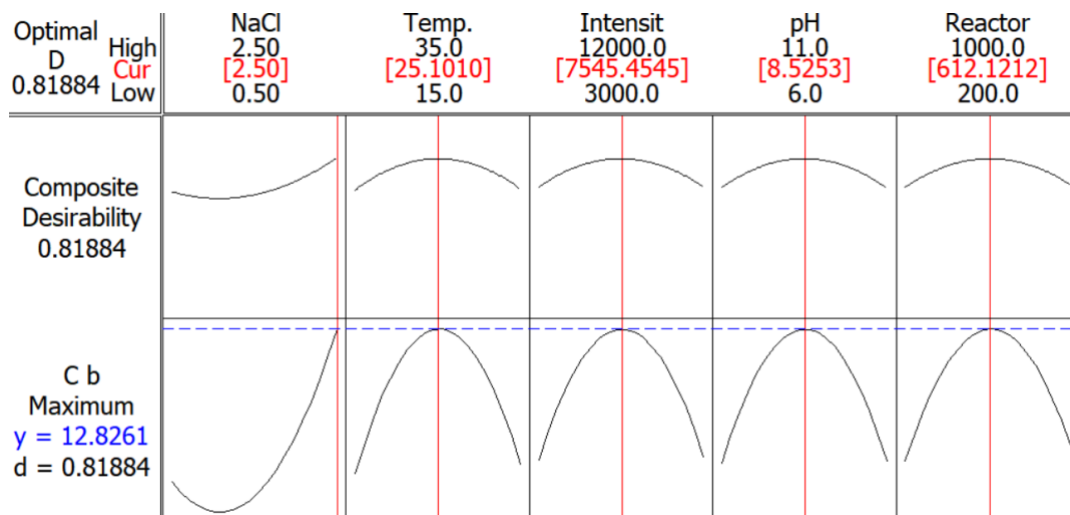
$$Y = -31.509 - 2.785 S + 1.288 S^2 - 0.019 T^2 - 9.045 \times 10^{-8} I^2 - 0.301 P^2 - 1.094 \times 10^{-5} R^2$$

در بین جفت پارامترهای متفاوت رابطه‌ی معناداری وجود ندارد و نمودارهای کانتور آن در زیر نشان داده شده است.



شکل (4-9) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید کلروفیل b

نمودارهای بهینه‌سازی شرایط آزمایش و میزان مطلوبیت از داده‌های به‌دست آمده به صورت زیر است و با توجه به مدل به‌دست آمده از طراحی آزمایش و تطبیق مناسب آن با داده‌های تجربی، می‌توان میزان بهینه‌ی پارامترها را در بازه‌ی معنی‌دار آن‌ها به‌دست آورد.



شکل (4-10) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها

از آنجایی که هدف اصلی ما افزایش تولید کلروفیل b است، یافتن بیشینه‌ی رشد مطلوب است و با توجه به معادله، بهینه‌ی پارامترها حاصل می‌شود. همچنین در جدول ۱۳-۴ نشان داده شده است.

جدول (4-13) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی کلروفیل b

پارامتر	اندازه بهینه
نمک NaCl	۲/۵
دما	۲۵/۱۰
شدت نور	۷۵۴۵/۴۵
pH	۸/۵۲
حجم راکتور	۶۱۲/۱۲

بنابراین نمونه بهینه در شرایط فوق به دست آمده است.

#### ۴-۵-۵- بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای محاسبه‌ی کل کاروتنوئید تولید شده از ریزجلبک دوتالیا سالیئا با استفاده از مدل RSM

در مورد تولید کل کاروتنوئید و شناسایی شرایط بهینه‌ی کشت، با توجه به داده‌های حاصل، رگرسیون به صورت زیر است:

جدول (4-14) مقدار رگرسیون‌های مختلف برای حالت درجه ۲

نوع پارامتر	درصد رگرسیون
رگرسیون معمول	۹۹/۵۳
رگرسیون تنظیم شده	۹۸/۶۴
رگرسیون پیش‌بینی شده	۷۵/۲۸

با توجه به رگرسیون ۹۹٪ ای معادله‌ای که ارائه می‌شود، می‌توان به رابطه‌ای که در ادامه داریم استناد کرد. همچنین پارامتر کمبود تناسب هم با مقدار p برابر با ۰/۲۳۳، با تقریب تاثیرگذار بوده و در نظر گرفته نمی‌شود. از این رو می‌توان در نظر داشت که مدل انتخاب شده برای طراحی آزمایش مناسب است.

پس از حذف پارامترهای با مقدار p بالاتر از ۰/۰۵، پارامترهای معنی‌دار زیر را داریم؛

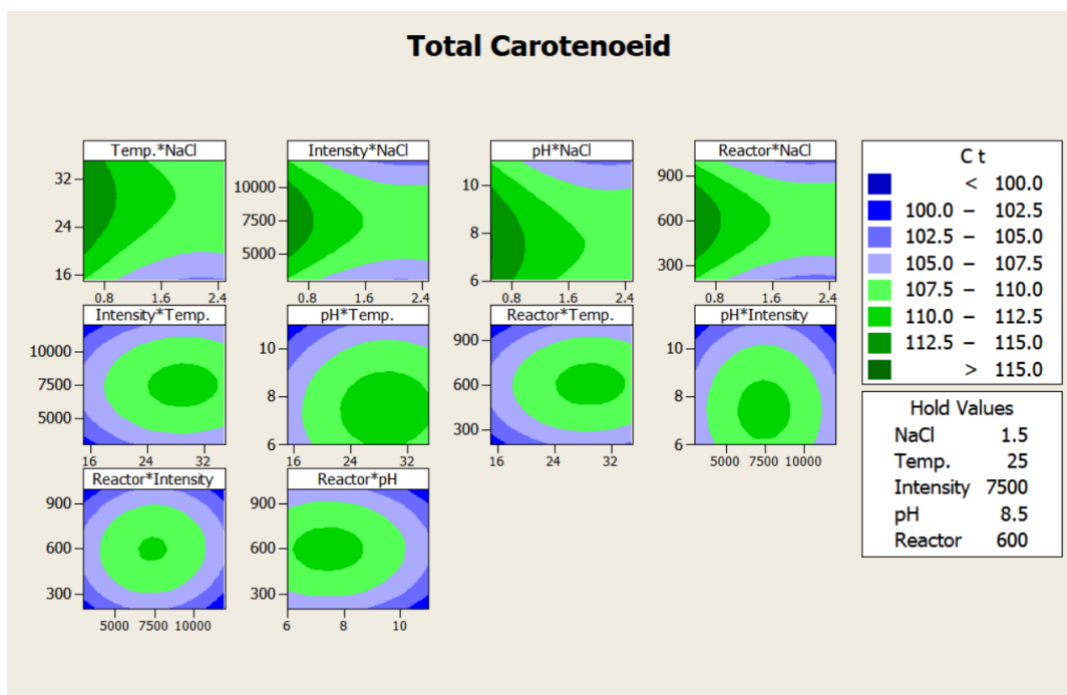
جدول (4-15) پارامترهای معادله‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید کل کاروتنوئیدها و مقدار ضرایب آنها

عبارت	نماد	مقدار p	ضریب
ثابت رابطه	-	۰	54/118
محیط کشت	M	۰/۰۰۲	0/682
نمک	S	۰	-۸/160
دما	T	۰	۱/۳۴۳
pH	P	۰	۶/۱۳۹
(نمک) <sup>۲</sup>	S <sup>2</sup>	۰/۰۰۳	۱/۸۵۱
(دما) <sup>۲</sup>	T <sup>2</sup>	۰	-۰/۰۲۵
(شدت نور) <sup>۲</sup>	I <sup>2</sup>	0	-۲/۳۴۴×۱۰ <sup>-۷</sup>
(pH) <sup>۲</sup>	P <sup>2</sup>	0	-۰/۴۲۵
(راکتور) <sup>۲</sup>	R <sup>2</sup>	0	-۳/۱۰۲×۱۰ <sup>-۵</sup>

معادله‌ی حاصل به صورت زیر است:

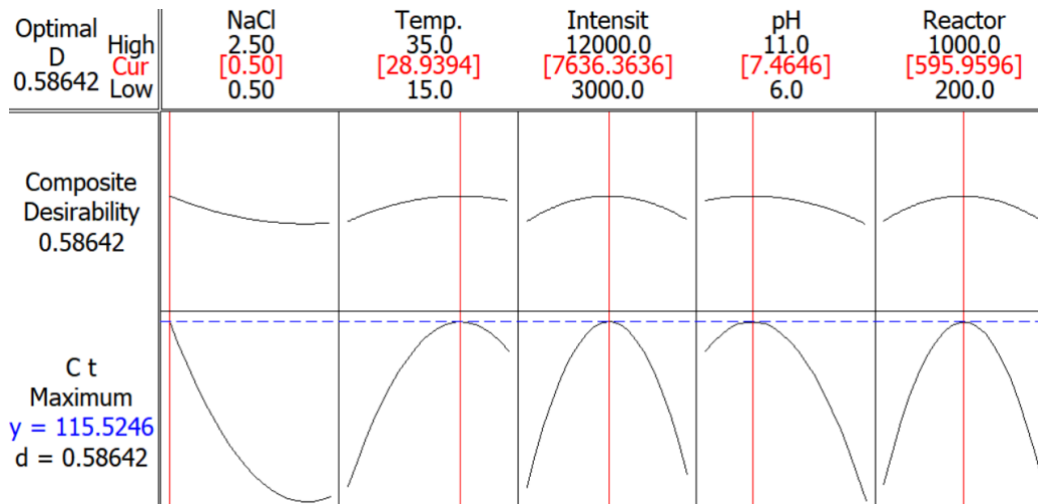
$$Y = 54.118 + 0.682 M - 8.160 S + 1.343 T + 6.139 P + 1.851 S^2 - 0.025 T^2 - 2.344 \times 10^{-7} I^2 - 0.425 P^2 - 3.102 \times 10^{-5} R^2$$

در بین جفت پارامترهای متفاوت رابطه‌ی معناداری وجود ندارد و نمودارهای کانتور آن در زیر نشان داده شده است.



شکل (4-11) مجموعه نمودارهای کانتور جهت بررسی رابطه‌ی بین جفت پارامترهای مختلف درگیر در میزان تولید کل کاروتنوئیدها

نمودارهای بهینه‌سازی شرایط آزمایش و میزان مطلوبیت از داده‌های به‌دست آمده به صورت زیر است. با توجه به مدل به‌دست آمده از طراحی آزمایش و تطبیق مناسب آن با داده‌های تجربی، می‌توان میزان بهینه‌ی پارامترها را در بازه‌ی معنی‌دار آن‌ها به‌دست آورد.



شکل (4-12) تغییرات پاسخ در محدوده مقدار بهینه‌ی پارامترها

از آنجایی‌که هدف اصلی ما افزایش تولید کل کاروتنوئیدها است، یافتن بیشینه‌ی رشد مطلوب است و با توجه به معادله، بهینه‌ی پارامترها حاصل می‌شود. همچنین در جدول 4-16 نشان داده شده است.

جدول (4-16) میزان بهینه‌ی هر یک از پارامترهای دخیل در مقدار تولیدی کل کاروتنوئیدها

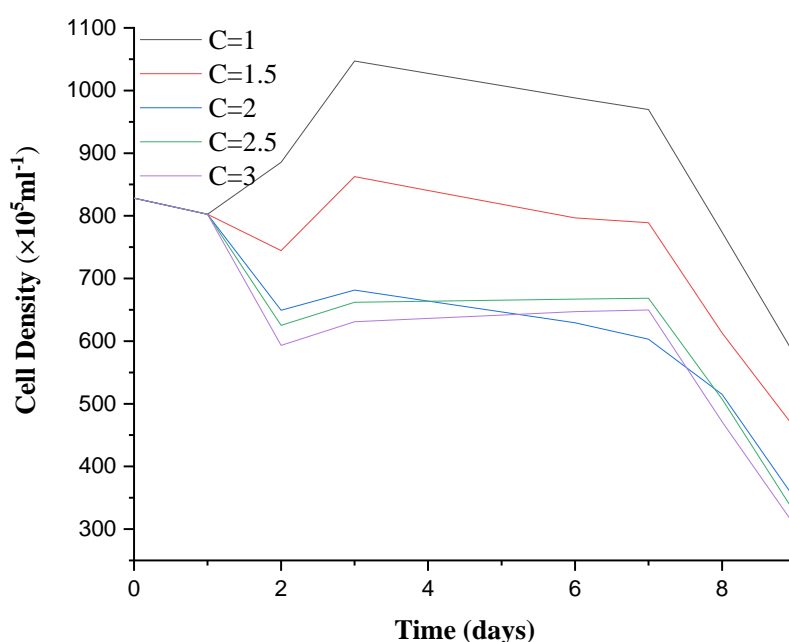
اندازه بهینه	پارامتر
۰/۵	نمک NaCl
۲۸/۹۳	دما
۷۶۳۶/۳۶	شدت نور
۷/۴۶	pH
۶۹۵/۹۵	حجم راکتور

بنابراین نمونه بهینه در شرایط فوق به‌دست آمده است.

#### ۴-۶- بررسی اثر شوک نمکی NaCl در میزان تولید توده‌ی سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل a و کلروفیل b در شرایط بهینه‌ی رشد

##### ۴-۶-۱- بررسی اثر شوک نمکی در میزان توده‌ی سلولی

شوک نمکی در ۵ غلظت ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ مولار در روز آخر فاز لگاریتمی انجام شده و پس از گذشت هر روز، میزان توده‌ی سلولی در هر یک از ۵ غلظت اندازه‌گیری شده و به صورت زیر گزارش شد [73].

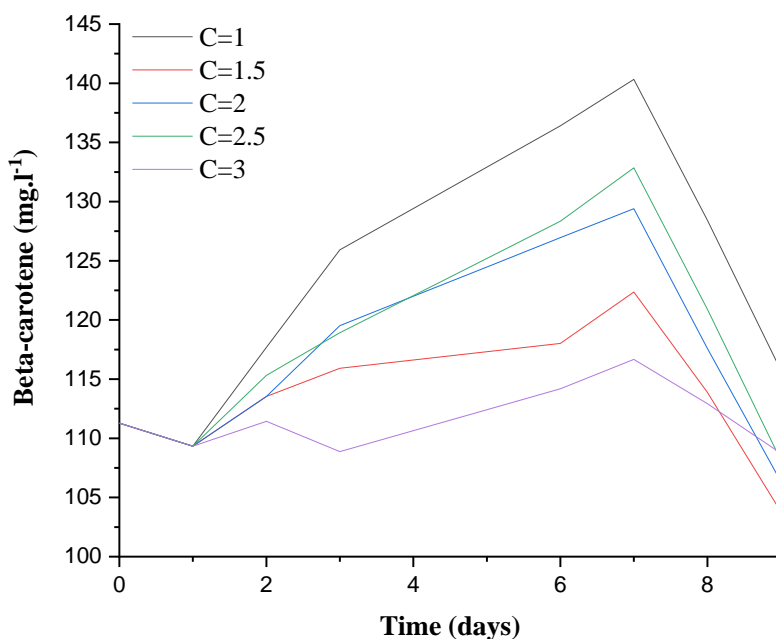


شکل (13-4) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید توده‌ی سلولی

همان‌طور که در نمودار فوق مشخص است، در غلظت شوک نمکی ۱ مولار بیش‌ترین سلول در روز ۵ام تولید شده است. با افزایش غلظت نمکی که در شوک نمکی اضافه شده است، میزان تولید سلول کاهش یافته و از یک الگوی نسبتاً منظم پیروی می‌کند.

##### ۴-۶-۲- بررسی اثر شوک نمکی در میزان تولید بتاکاروتن

شوک نمکی در ۵ غلظت ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ مولار در روز آخر فاز لگاریتمی انجام شده و پس از گذشت هر روز، میزان تولید بتاکاروتن در هر یک از ۵ غلظت اندازه‌گیری شده و به صورت زیر گزارش شد.

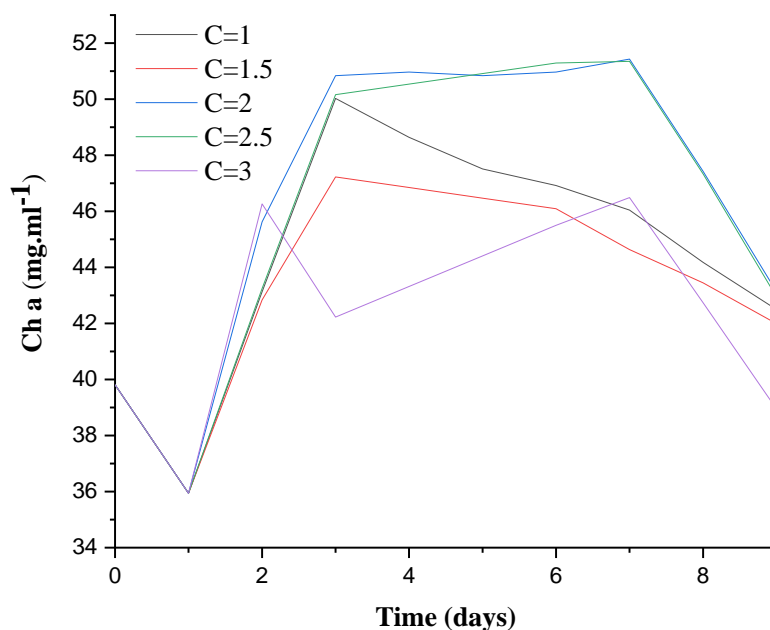


شکل (4-14) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید بتاکاروتن

همان‌طور که در نمودار فوق مشخص است، مانند تولید توده‌ی سلولی، تولید بتاکاروتن هم با غلظت شوک نمکی ۱ مولار بیش‌ترین افزایش را داشته است. برخلاف نظم مشاهده شده در کاهش تولید توده‌ی سلولی با افزایش غلظت نمک، در مورد تولید بتاکاروتن هیچ نظمی وجود ندارد.

#### ۴-۶-۳- بررسی اثر شوک نمکی در میزان تولید کلروفیل a

شوک نمکی در ۵ غلظت ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ مولار در روز آخر فاز لگاریتمی انجام شده و پس از گذشت هر روز، میزان تولید کلروفیل a در هر یک از ۵ غلظت اندازه‌گیری شده و به صورت زیر گزارش شد.

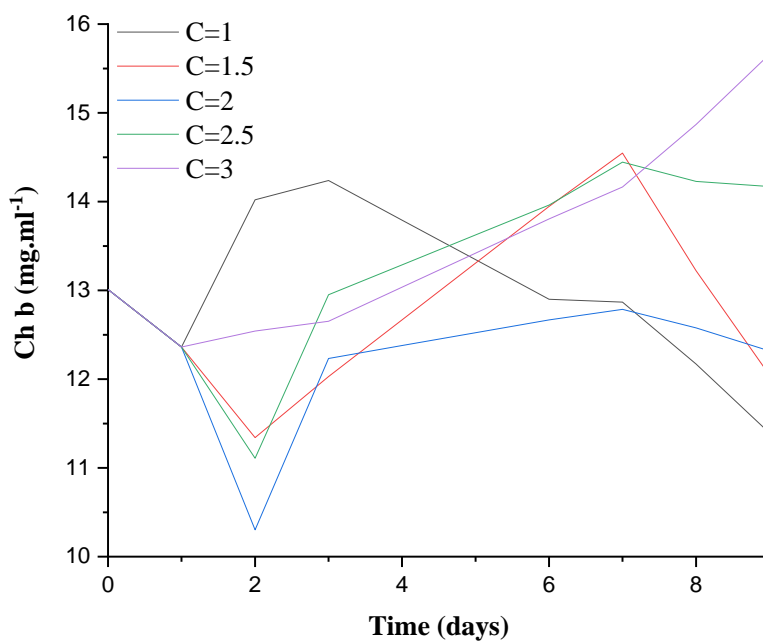


شکل (4-15) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید کلروفیل a

بر اساس آنچه در نمودار فوق مشخص است، شوک نمکی در غلظت ۲ مولار بیشترین میزان کلروفیل a را تولید می‌کند. این میزان تولید در رقابت نزدیک با غلظت نمک NaCl برابر با ۲ مولار است. بعد از آن نظمی در میزان غلظت و نسبت کلروفیل a تولیدی دیده نشده است.

#### ۴-۶-۴- بررسی اثر شوک نمکی در میزان تولید کلروفیل b

شوک نمکی در ۵ غلظت ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ مولار در روز آخر فاز لگاریتمی انجام شده و پس از گذشت هر روز، میزان تولید کلروفیل b در هر یک از ۵ غلظت اندازه‌گیری شده و به صورت زیر گزارش شد.



شکل (4-16) بررسی اثر شوک نمکی NaCl در روز اول تا نهم بعد از اعمال شوک بر میزان تولید کلروفیل b

میزان اثر شوک نمکی بر روی تولید کلروفیل b از بی‌نظم‌ترین الگوی ممکن پیروی کرده و بعد از شوک نمکی ۳ مولار NaCl، پس از گذشت ۹ روز به بیش‌ترین میزان تولید کلروفیل b می‌رسد. روند تولید کلروفیل b طبق آنچه مشخص است در غلظت شوک ۳ مولار افزایشی است.

## فصل 5 : نتیجه‌گیری

### ۵-۱- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، بهینه‌سازی رشد و استخراج بتاکاروتن، کلروفیل a و کلروفیل b از ریز جلبک *نونالیلا سالیئا* بررسی شده و نتایج برای هر یک به صورت جدا گزارش شد. بعد از این در مورد گونه‌ی مورد نظر ما، مقدار بهینه‌ی مربوط به هر کدام از پارامترها با تقریب مشخص شده و می‌توان با توجه به هدف، شرایط آزمایش را مشخص کرد. هر یک از پارامترها وابسته به هدف متغیر بوده و این تغییرات و بهترین نسبت هر پارامتر به صورت زیر گزارش می‌شود.

جدول (5-1) خلاصه‌ای از بهینه‌ی پارامترهای مختلف محیطی و شناسایی اثر آن‌ها بر مقدار تولیدی کاروتنوئیدها و کلروفیل

پارامتر	مقدار بهینه				
	کل کاروتنوئیدها	کلروفیل b	کلروفیل a	بتاکاروتن	توده‌ی زیستی
نمک NaCl (مولار)	۰/۵	۲/۵	۱/۷۴	۰/۵	۰/۵
دما (°C)	۲۸/۹۳	۲۵/۱۰	۲۴/۶۹	۳۰/۱۵	۲۵
شدت نور (لوکس)	۷۶۳۶/۳۶	۷۵۴۵/۴۵	۷۶۲۷/۲۷	۷۶۳۶/۳۶	۱۲۰۰۰
pH	۷/۴۶	۸/۵۲	۸/۳۷	۷/۱۱	۸/۵۷
حجم راکتور (میلی‌لیتر)	۶۹۵/۹۵	۶۱۲/۱۲	۵۷۹/۷۹	۵۹۵/۹۵	۱۰۰۰

با کمک نرم‌افزار Minitab، رابطه‌های به‌دست آمده با رگرسیون بالا برای رشد و استخراج مواد مختلف نیز به صورت زیر به دست آمد که به صورت خلاصه در زیر آمده است.

رابطه‌ی بهینه‌ی شرایط برای رشد توده‌ی زیستی

$$Y = -423.062 - 178.415 S + 47.969 T - 0.022 I + 179.941 P - 0.131 R \\ + 48.531 S^2 - 0.974 T^2 + 2.036 \times 10^{-6} I^2 - 11.018 P^2 \\ + 0.0002 R^2 + 3.17 SP - 0.036 SR + 1.647 \times 10^{-4} TI \\ + 0.0008 PI - 0.006 PR$$

رابطه‌ی بهینه‌ی شرایط رشد برای تولید بتاکاروتن

$$Y = -2.137 + 0.797 M - 17.628 S + 2.748 T + 10.704 P + 3.744 S^2 \\ - 0.046 T^2 - 4.689 \times 10^{-7} I^2 - 0.764 P^2 \\ - 6.109 \times 10^{-5} R^2$$

رابطه‌ی بهینه‌ی شرایط رشد برای تولید کلروفیل a

$$Y = -70.860 + 0.004 I - 4.124 S^2 - 0.051 T^2 - 2.429 I^2 - 0.723 P^2 \\ - 2.865 R^2 + 0.267 SP - 1.401 \times 10^{-5} IT + 0.023 PT$$

رابطه‌ی بهینه‌ی شرایط رشد برای تولید کلروفیل b

$$Y = -31.509 - 2.785 S + 1.288 S^2 - 0.019 T^2 - 9.045 \times 10^{-8} I^2 \\ - 0.301 P^2 - 1.094 \times 10^{-5} R^2$$

رابطه‌ی بهینه‌ی شرایط رشد برای تولید کل کاروتنوئیدها

$$Y = 54.118 + 0.682 M - 8.160 S + 1.343 T + 6.139 P + 1.851 S^2 \\ - 0.025 T^2 - 2.344 \times 10^{-7} I^2 - 0.425 P^2 \\ - 3.102 \times 10^{-5} R^2$$

در جدول فوق، S نماد میزان نمک NaCl، T نماد دما، I نماد شدت نور، P نماد pH و R نماد حجم راکتور است.

ریز جلبک دونالیا سالینا قادر به رشد و تولید بتاکاروتن در شرایط محیطی شدیدتر بوده و بر اساس آن، پارامتر میزان نمک NaCl بر این میزان رشد و تولید مواد مختلف اثرگذارترین پارامتر بوده است. بر این اساس، طی اعمال شوک نمکی این میزان تغییرپذیری را بررسی کرده و به صورت زیر خلاصه‌ی بیشترین میزان تولیدی هر یک از مواد آورده شده است.

جدول (5-2) بیش‌ترین میزان تولیدی هر یک از مواد در مولاریته‌های مختلف شوک نمکی NaCl

مقادیر بهینه				مولاریته شوک نمکی NaCl
کلروفیل b (mg/ml)	کلروفیل a (mg/ml)	بتاکاروتن (mg/l)	توده‌ی زیستی ( $\times 10^5/ml$ )	
14/23	50/02	140/33	1047/۲	۱ مولار
14/54	47/22	122/36	862/56	۱/۵ مولار
12/78	51/43	129/40	828/16	۲ مولار
14/44	51/34	132/85	828/16	۲/۵ مولار
15/66	46/48	116/67	828/16	۳ مولار

### ۵-۲- نوآوری پژوهش

- ✓ استفاده از گونه‌ی بومی خلیج فارس
- ✓ بررسی تولید کلروفیل‌ها در مقایسه با بتاکاروتن و کل کاروتنوئیدها
- ✓ شوک نمک NaCl اعمال شده بر روی ریزجلبک دونالیلا سالبنا و بررسی اثر آن بر میزان تولید کاروتنوئیدهای مختلف

### ۵-۳- پیشنهادات

- زمینه‌های پیشنهادی برای ادامه‌ی کار در راستای این پروژه به شرح زیر است:
- ✓ بررسی استخراج بتاکاروتن و سایر کاروتنوئیدها با استفاده از حلال فوق بحرانی
  - ✓ استفاده از آنالیز دقیق HPLC به جای UV
  - ✓ بررسی محدوده‌ی وسیع‌تری از پارامترهای محیطی
  - ✓ بررسی اثر شوک حرارتی
  - ✓ بررسی اثر شوک سایر مواد موجود در محیط کشت
  - ✓ استفاده از دیگر گونه‌هایی ریزجلبک و سیانوباکتری‌ها

1. Hosseini Tafreshi, A. and M. Shariati, *Dunaliella biotechnology: methods and applications*. Journal of applied microbiology, 2009. **107**(1): p. 14-35.
2. Menkes, M.S., et al., *Serum beta-carotene, vitamins A and E, selenium, and the risk of lung cancer*. New England Journal of Medicine, 1986. **315**(20): p. 1250-1254.
3. Becker, E., *Micro-algae as a source of protein*. Biotechnology advances, 2007. **25**(2): p. 207-210.
4. Hejazi, M., et al., *Selective extraction of carotenoids from the microalga Dunaliella salina with retention of viability*. Biotechnology and bioengineering, 2002. **79**(1): p. 29-36.
5. Morowvat, M.H. and Y. Ghasemi, *Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by Dunaliella salina in mixotrophic culture*. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 2016. **7**: p. 217-223.
6. Hejazi, M., E. Holwerda, and R. Wijffels, *Milking microalga Dunaliella salina for  $\beta$ -carotene production in two-phase bioreactors*. Biotechnology and bioengineering, 2004. **85**(5): p. 475-481.
7. Mimouni, V., et al., *The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest*. Current pharmaceutical biotechnology, 2012. **13**(15): p. 2733-2750.
8. Mercer, P. and R.E. Armenta, *Developments in oil extraction from microalgae*. European journal of lipid science and technology, 2011. **113**(5): p. 539-547.
9. Gouveia, L. and A.C. Oliveira, *Microalgae as a raw material for biofuels production*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2009. **36**(2): p. 269-274.
10. Benemann, J.R., D.M. Tillett, and J.C. Weissman, *Microalgae biotechnology*. Trends in biotechnology, 1987. **5**(2): p. 47-53.
11. El-Baky, H.A., F.K. El-Baz, and G.S. El-Baroty, *Production of antioxidant by the green alga Dunaliella salina*. Int. J. Agric. Biol, 2004. **6**(1) :p. 1560-8530.
12. Borowitzka, L. and M. Borowitzka,  *$\beta$ -carotene (provitamin A) production with algae*, in *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. 1989, Springer. p. 15-26.
13. Borowitzka, M.A. *The mass culture of Dunaliella salina*. in *Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds, Cebu City (Philippines), 27-31 Aug 1990*. 1990.
14. Rad, F.A., N. Aksoz, and M.A. Hejazi, *Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in Dunaliella sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran*. African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(12): p. 2282-2289.
15. Aasen, A., K. Eimhjellen, and S. Liaaen-Jensen, *An extreme source of beta-carotene*. Acta chemica scandinavica, 1969. **23**(7): p. 2544.
16. Spolaore, P., et al., *Commercial applications of microalgae*. Journal of bioscience and bioengineering, 2006. **101**(2): p. 87-96.
17. Chan, J., *Extracting Lipid and Carotenoids from Microalgae with Lecithin-linker Microemulsions*. 2012.

18. Aizawa, K. and S. Miyachi, *Carbonic anhydrase located on cell surface increases the affinity for inorganic carbon in photosynthesis of Dunaliella tertiolecta*. FEBS letters, 1984. **173**(1): p. 41-44.
19. Frol'kis, V., K. Kul'chitskii, and V. Mil'ko, *The Coronary Circulation and Experimental Myocardial Infarction*. 1962, Kiev.
20. Pugmire, R.J. and D.M. Grant, *Carbon-13 magnetic resonance. X. Six-membered nitrogen heterocycles and their cations*. Journal of the American Chemical Society, 1968. **90**(3): p. 697-706.
21. Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka, *Micro-algal biotechnology*. 1988: Cambridge University Press.
22. McLachlan, A., *Self-consistent field theory of the electron spin distribution in  $\pi$ -electron radicals*. Molecular Physics, 1960. **3**(3): p. 233-252.
23. McLachlan, J., *The culture of Dunaliella tertiolecta Butcher—a euryhaline organism*. Canadian Journal of Microbiology, 1960. **6**(3): p. 367-379.
24. Massyuk, N., *Effect of Na, Mg, Cl and SO<sub>4</sub> ions on growth, reproduction and carotene production in Dunaliella salina Teod*. Ukr Bot, 1965. **22**.
25. Riggi, E., *Recent Patents on the Extraction of Carotenoids*. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 2010. **2**: p. 75-82.
26. Feltl, L., et al., *Reliability of Carotenoid Analyses: A Review*. Current Analytical Chemistry, 2005. **1**(1): p. 93-102.
27. Christaki, E., et al., *Functional properties of carotenoids originating from algae*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013. **93**(1): p. 5-11.
28. Faramarzi, M., H. Forotanfar, and M. Shakibaii, *Microalgae Biotechnology*. 2010, Tehran: Tehran University.
29. Herrero, M., et al., *Optimization of the Extraction of Antioxidants from Dunaliella salina Microalga by Pressurized Liquids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 5597-5603.
30. Riggi, E., *Recent patents on the extraction of carotenoids*. Recent patents on food, nutrition & agriculture, 2010. **2**(1): p. 75-82.
31. Christaki, E., et al., *Functional properties of carotenoids originating from algae*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013. **93**(1): p. 5-11.
32. Giovannucci, E., *A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer*. Exp. Biol. Med. (Maywood), 2002. **227**: p. 852-859.
33. Fraser, P. and P. Bramley, *The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids*. Prog Lipid Res, 2004. **43**: p. 228-265.
34. Mattea, F., Á. Martín, and M.J. Cocero, *Carotenoid processing with supercritical fluids, A Review*. Journal of Food Engineering, 2009. **93**: p. 255-265.
35. Ye, Z.-W., J.-G. Jiang, and G.-H. Wu, *Biosynthesis and regulation of carotenoids in Dunaliella: progresses and prospects*. Biotechnology advances, 2008. **26**(4): p. 352-360.
36. Ye, Z.-W., J.-G. Jiang, and G.-H. Wu, *Biosynthesis and regulation of carotenoids in Dunaliella: Progresses and prospects*. Biotechnology Advances, 2008. **26**(4): p. 352-360.
37. Hejazi, M.A., E. Holwerda, and R.H. Wijffels, *Milking microalga Dunaliella salina for  $\beta$ -carotene production in two-phase bioreactors*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. **85**(5): p. 475-481.

38. Borowitzka, M., *The Mass Culture of Dunaliella salina*. 1990, Algal Biotechnology Laboratory: School of Biological and Environmental Sciences, Murdoch University, Murdoch, W.A. 6150, AUSTRALIA.
39. Lamers, P.P., et al., *Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved Dunaliella salina, a unicellular green microalga*. Journal of Biotechnology, 2012. **162**(1): p. 21-27.
40. Grune, T., *Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology*. 2004: IOS.
41. Loubière, K., et al., *A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop airlift and swirling flow*. Biotechnology and bioengineering, 2009. **102**(1): p. 132-147.
42. Bougaran, G., et al., *Transient initial phase in continuous culture of Isochrysis galbana affinis Tahiti*. Aquatic Living Resources, 2003. **16**(4): p. 389-394.
43. Marchetti, J., et al., *Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of Isochrysis sp.(T-iso)*. Journal of Applied Phycology, 2013. **25**(1): p. 109-119.
44. Soletto, D., et al., *Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of Spirulina platensis in helical photobioreactor*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **39**(2): p. 369-375.
45. Sierra, E., et al., *Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae*. Chemical Engineering Journal, 2008. **138**(1-3): p. 136-147.
46. Ugwu, C.U. and H. Aoyagi, *Designs, Operation and Applications*. Biotechnology, 2012. **11**(3): p. 127-132.
47. Vunjak-Novakovic, G., et al., *Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2005. **44**(16): p. 6154-6163.
48. Ranjbar, R., et al., *High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of Haematococcus pluvialis in a bubble column photobioreactor*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **39**(3): p. 575-580.
49. Contreras, A., et al., *Interaction between CO<sub>2</sub>-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of Phaeodactylum tricorutum in a concentric tube airlift photobioreactor*. Biotechnology and Bioengineering, 1998. **60**(3): p. 317-325.
50. Eriksson, L., et al., *Design of experiments. Principles and Applications*, Learn ways AB, Stockholm, 2000.
51. Luo, X., et al., *Promoted antitumor activities of acid-labile electrospun fibers loaded with hydroxycamptothecin via intratumoral implantation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. **82**(3): p. 545-553.
52. Wu, C.J. and M. Hamada, *Experiments planning analysis and parameter design optimization*. Jhon Wiley and Sons. Inc., Singapore MATH Google Scholar, 2000.
53. Gomez, P.I., et al., *Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by Dunaliella salina (strain CONC-007) and Dunaliella bardawil (strain ATCC 30861) Chlorophyta*. Biological Research, 2003. **36**(2): p. 185-192.
54. Zhu, Y.-H. and J.-G. Jiang, *Continuous cultivation of Dunaliella salina in photobioreactor for the production of  $\beta$ -carotene*. European Food Research and Technology, 2008. **227**(3): p. 953-959.

55. de Jesus, S. and R. Maciel Filho, *Modeling growth of microalgae Dunaliella salina under different nutritional conditions*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2010. **6**(4): p. 279-283.
56. Abu-Rezq, T.S., S. Al-Hooti, and D.A. Jacob, *Optimum culture conditions required for the locally isolated Dunaliella salina*. J. Algal Biomass Utln, 2010. **1**(2): p. 12-19.
57. Sathasivam, R. and N. Juntawong, *Modified medium for enhanced growth of Dunaliella strains*. Int J Curr Sci, 2013. **5**: p. 67-73.
58. Ying, K., W. Zimmerman, and D. Gilmour, *Effects of CO and pH on growth of the microalga Dunaliella salina*. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 2014. **6**(3): p. 167-173.
59. Wu, Z., et al., *The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three Dunaliella salina strains isolated from saline soil*. Jundishapur journal of microbiology, 2016. **9**(1).
60. Xu, Y., I.M. Ibrahim, and P.J. Harvey, *The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of Dunaliella salina (chlorophyta) CCAP 19/30*. Plant Physiology and Biochemistry, 2016. **106**: p. 305-315.
61. Facht, M., et al., *A dynamic growth model of Dunaliella salina: Parameter identification and profile likelihood analysis*. Bioresource technology, 2014. **173**: p. 21-31.
62. Prieto, A., J.P. Canavate, and M. García-González, *Assessment of carotenoid production by Dunaliella salina in different culture systems and operation regimes*. Journal of biotechnology, 2011. **151**(2): p. 180-185.
63. Kim, W., et al., *Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae*. Bioprocess and biosystems engineering, 2012. **35**(1-2): p. 19-27.
64. Mojaat, M., et al., *Effect of organic carbon sources and Fe<sup>2+</sup> ions on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by Dunaliella salina*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **39**(1): p. 177-184.
65. Celekli, A. and G. Dönmez, *Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by a new isolate of Dunaliella sp.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006. **22**(2): p. 183.
66. García-González, M., et al., *Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor*. Journal of biotechnology, 2005. **115**(1): p. 81-90.
67. Hejazi, M. and R. Wijffels, *Effect of light intensity on  $\beta$ -carotene production and extraction by Dunaliella salina in two-phase bioreactors*. Biomolecular Engineering, 2003. **20**(4-6): p. 171-175.
68. Bérard, A., et al., *Microalgae community structure analysis based on 18S rDNA amplification from DNA extracted directly from soil as a potential soil bioindicator*. Agronomy for sustainable development, 2005. **25**(2): p. 285-291.
69. Lichtenthaler, H., *Synthesis of prenyllipids in vascular plants (including chlorophylls, carotenoids, and prenylquinones)*. CRC handbook of biosolar resources, 1982.
70. Lichtenthaler, H.K., [34] *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*, in *Methods in enzymology*. 1987, Elsevier. p. 350-382.

71. Lichtenthaler, H.K. and C. Buschmann, *Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy*. Current protocols in food analytical chemistry, 2001.
72. Lee ,Y.-K. and H. Shen, *Basic culturing techniques*. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, 2004: p. 40.
73. Yazdani, M. and Tavakoli, O., 2019. The Effect of Salt Shock on Growth and Pigment Accumulation of *Dunaliella Salina*. *arXiv preprint arXiv:1911.11840*.