

## مقاله علمی - پژوهشی:

## بررسی اثر شدت نور بر میزان تولید چربی در ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* به منظور تولید سوخت زیستی

مرضیه رعیتی<sup>۱</sup>، هومن رجبی اسلامی<sup>\*</sup>، مهدی شمسائی مهرجان<sup>۱</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

### چکیده

گرم شدن تدریجی کره زمین به دلیل استفاده بی‌رویه از سوخت‌های فسیلی، آلودگی‌های زیست محیطی و افزایش گازهای گلخانه‌ای موجب گردیده است تا محققان بر توسعه منابع انرژی تجدیدپذیر مانند خورشید، باد، آب و سوخت‌های زیستی تمرکز کنند. از آنجایی که ریزجلبک‌ها حاوی اسیدهای چرب زیادی می‌باشند، کاندید مناسبی برای تولید سوخت زیستی هستند. این پژوهش بر این اساس طراحی گردید تا اثر شدت‌های مختلف نوری را بر میزان رشد و تجمع چربی در ریزجلبک آب شیرین *Chlamydomonas reinhardtii* بررسی نماید. برای این منظور، ریزجلبک‌ها در پنج شدت نوری ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه برای مدت ۲۰ روز کشت داده شدند. بیشترین محتوای چربی  $45/1 \pm 72/06$  درصد و بازدهی چربی  $105/21 \pm 1/63$  میلی‌گرم در لیتر در روز، طبق منحنی‌های رشد در ریزجلبک‌هایی به‌دست آمد که تحت شرایط نوری ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه کشت داده شده بودند. میزان اسیدهای چرب اشباع با افزایش شدت نور به شکل معنی‌داری افزایش یافت درحالی‌که مقدار اسیدهای چرب تک غیراشباع و چند غیراشباع کاهش یافتند. متیل استر<sup>۱</sup>، اسید پالمیتیک، اسید استئاریک و اسید آلفالینولنیک در میان اسیدهای چرب، بیشترین مقدار را در شدت نوری ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه نشان دادند. همچنین به منظور بررسی کیفیت سوخت زیستی، پارامترهایی مانند میزان صابونی‌شدن (SV)، ارزش یدی (IV)، عدد ستانی (CN)، درجه غیراشباع بودن (DU)، طول زنجیره اشباع (LCSF) و نقطه انسداد فیلتر (CFPP) نیز برآورد شد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که شدت نور می‌تواند بازدهی چربی و خصوصیات سوخت زیستی به‌دست آمده از ریزجلبک *C. reinhardtii* را به عنوان یک ماده اولیه در تولید سوخت زیستی بهبود بخشد.

**کلمات کلیدی:** سوخت زیستی، رشد، چربی، ریزجلبک، شدت نور

<sup>\*</sup> نویسنده مسئول

## مقدمه

در سال‌های اخیر، به سبب کاهش ذخایر سوخت‌های فسیلی، نیاز جهانی برای انرژی افزایش یافته است. همچنین مشکلات آلودگی‌های زیست محیطی، حمل و نقل سوخت‌ها، مواد شیمیایی استخراج شده از نفت، گرم شدن زمین و انتشار گازهای گلخانه‌ای (کربن دی‌اکسید، متان و نیتروژن) نیز گسترش پیدا کرده است (نظریور و همکاران، ۱۳۹۸). به همین دلیل در سال‌های اخیر انرژی حاصل از منابع تجدیدپذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و محققان بر توسعه منابع انرژی جایگزین مانند خورشید، باد، آب و سوخت‌های زیستی تمرکز کرده‌اند (Enamala et al., 2018). سوخت‌های زیستی به‌دست آمده از محصولات خوراکی، با استفاده از تکنولوژی امروز، به دلیل هزینه‌های بالای تولید و استفاده از زمین‌های کشت محصولات خوراکی، جایگزین موثری برای سوخت فسیلی نمی‌باشند. در این میان، ریزجلبک‌ها به علت محتوای بالای چربی و رشد سریع، جایگاه ویژه‌ای را بین منابع مختلف کسب کرده است. انرژی‌های بر پایه ریزجلبک‌ها می‌توانند به کاهش دی‌اکسیدکربن موجود در جو کمک کند و در نتیجه موجب کاهش گرمایش کره زمین می‌شود و بقایای زیست‌توده آنها می‌تواند در تولید کود یا گازهای زیستی نیز به‌کار رود (Mofijur et al., 2018). در شرایط عادی پرورشی، درصد چربی و نوع ترکیبات جلبک‌ها برای سوخت چندان مناسب نیست. لذا، با ایجاد برخی تغییرات تغذیه‌ای و محیطی می‌توان درصد چربی ریزجلبک‌ها را افزایش داد. هنگامی که شرایط محیطی ریزجلبک‌ها پایین‌تر از حد مطلوب باشد، واکنش ریزجلبک‌ها تغییر الگوی متابولیتی است (وزیرزاده و مقدس زاده، ۱۳۹۷). تولید متابولیت‌های ثانویه در ریزجلبک‌ها به ترکیب محیط رشد (نیتروژن، فسفر، آهن و گوگرد) یا شرایط محیط رشد (دما، اسیدیته و شدت نور) بستگی دارد. اساساً نور یکی از مهم‌ترین پارامترهایی است که با تأمین انرژی برای پشتیبانی از متابولیسم جلبک و تبدیل موثر به توده زیستی، رشد آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

در حال حاضر، روش‌های تولید ریزجلبک‌ها کاملاً اقتصادی و مقرون به صرفه نیستند و تولید انبوه آنها

همچنان با چالش‌هایی روبه‌روست (Goh et al., 2019). در همین راستا، تحقیقات متعددی در خصوص بهینه سازی شرایط رشد، سیستم‌های کشت مختلف و محیط‌کشت‌های گوناگون در حال انجام می‌باشد. در تحقیقات مختلف ثابت شده است که ریزجلبک‌ها قادرند در شدت‌های نوری متفاوت رشد کنند و ممکن است تغییرات چشم‌گیری در فعالیت‌های فتوسنتزی، محتوای رنگدانه یا پروفایل اسیدهای چرب آنها اتفاق بیفتد (Onumaegbu et al., 2019). سیستم‌های صنعتی کشت جلبک جهت به حداکثر رساندن بازده تولید توده‌زیستی از نوردهی پیوسته بهره می‌گیرند. اما اگر شدت نور از نقطه اشباع نوری فراتر رود، ممکن است به دلیل عدم توانایی جذب نور به‌وسیله دستگاه فتوسنتزی جلبک، آسیب بازدارندگی نوری رخ دهد که این امر به اختلال در رشد و افت بهره‌وری زیست‌توده می‌انجامد (Singh and Singh, 2015). از دیدگاه اقتصادی، گزینش برای گونه‌های جلبکی مستعد ذخیره روغن، نخستین مرحله کلیدی برای پیشرفت برنامه تولید سوخت زیستی از ریزجلبک‌ها می‌باشد. در میان انواع ریزجلبک‌هایی که در منابع به آنها اشاره شده است، جنس *Chlamydomonas* یکی از ریزجلبک‌های سبز تک سلولی با نرخ رشد سریع، محتوای چربی بالا و قابلیت سازگاری با انواع شرایط محیطی است که آن را به یک گزینه بسیار خوب برای تولید سوخت زیستی تبدیل می‌کند (Shin et al., 2019). همچنین داشتن دانش کافی از رفتار سویه‌های ریزجلبک تحت شرایط زیستی یا غیرزیستی برای بهبود امکان‌سنجی اقتصادی آنها در تولید سوخت‌زیستی امری ضروری محسوب می‌شود. بررسی‌های متعددی بر پاسخ *C. reinhardtii* به تغییرات غلظت عناصر غذایی محیط‌کشت صورت پذیرفته است. ولی تحقیق نظام‌مندی وجود ندارد که کاربرد شدت نور را بر سویه *C. reinhardtii* از نظر تولید سوخت زیستی مورد توجه قرار دهد. بنابراین، تحقیق حاضر ترتیب داده شد تا تأثیر شدت‌های نوری مختلف بر رشد، بازدهی چربی و ترکیب اسید چرب *C. reinhardtii* بررسی گردد. اما از آنجایی‌که پروفایل اسیدهای چرب به‌تنهایی نمی‌تواند تعیین‌کننده کیفیت سوخت باشد، سایر خصوصیات

جولوگیری شود. pH محیط کشت در محدوده  $7/5 \pm 0/1$  نگه‌داشته شد و دما براساس شرایط محیطی محل جداسازی و شرایط نگهداری در تحقیق قبلی بر ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد (Rayati et al., 2020).

### اجرای آزمایش

برای تهیه مایه تلقیح، تعداد ۲۰ عدد ارلن‌مایر یک لیتری (۵ تیمار با ۴ تکرار) حاوی محیط کشت BG11 اتوکلاو شده با دانسیته نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر استفاده شد. برای ارزیابی تأثیر شدت‌های مختلف نوری، هر مجموعه از چهار فلاسک آزمایشی در معرض تابش ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه قرار گرفتند. بدین منظور، محیط‌های کشت در فواصل معینی از منبع نور با توزیع طیفی ۳۸۰-۷۶۰ نانومتر قرار داده شدند (Rayati et al., 2020). اندازه‌گیری میزان تابش‌ها با استفاده از یک نورسنج دیجیتال بر سطح فلاسک‌های آزمایشی اندازه گرفته شد. شدت‌های نوری آزمایشی براساس تحقیقات مشابهی انتخاب شدند که تأثیر تابش‌های مختلف بر رشد ریزجلبک را برای تولید سوخت‌زیستی مطالعه کرده بودند (Huanyang, 2016).

### محاسبه میزان رشد و توده‌زیستی

رشد ریزجلبک به روش اسپکتروفوتومتری ارزیابی گردید. بدین‌منظور، نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری به فواصل زمانی منظم دو روز برداشته شدند با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu Corporation, Japan)  $OD_{750}$  اندازه‌گیری گردیدند. به منظور ارزیابی وزن خشک، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت با استفاده از یک سانتریفوژ با سرعت  $12000 \times g$  (Osterode, Germany) به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. رسوبات نهایی دوبار با آب مقطر شسته شد و در خشک‌کن انجمادی تحت خلأ (Germany, LSC) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت لیوفیلز شدند تا وقتی اندازه وزن خشک‌ها به وزن ثابتی رسید. بازدهی زیست‌توده از طریق معادله ذیل محاسبه شد. در این رابطه DW1 و DW2 به ترتیب وزن خشک جلبک

سوخت‌زیستی چربی استخراج‌شده مانند میزان صابونی‌شدن (SV)، ارزش یدی (IV)، عدد ستانی (CN)، درجه غیراشباع بودن (DU)، طول زنجیره‌اشباع (LCSF) و نقطه انسداد فیلتر (CFPP) نیز برآورد شده و مورد مقایسه قرار گرفتند (Kawasaki et al., 2013).

### مواد و روش کار

#### جداسازی سویه و انتخاب محیط کشت

ریزجلبک آب شیرین *C. reinhardtii* از رودخانه سولقان واقع در منطقه شمیرانات استان تهران جمع‌آوری گردید. این منطقه دارای آب وهوای مرطوب و گرم در تابستان (زمان نمونه‌برداری) و دمای متوسط در زمستان است. خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب در محل نمونه‌برداری دارای اسیدیته کلیایی معادل ۸/۵، متوسط دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن محلول ۸/۷ میلی‌گرم در لیتر و هدایت الکتریکی ۳۷۵/۷۹ میکروزیمنس بر مترمربع بود. محیط کشت انتخابی برای این ریزجلبک بر اساس پیشنهاد مجموعه تحقیقاتی UTEX<sup>۱</sup>، BG11 انتخاب گردید که ترکیبات آن به شرح جدول ۱ می باشد.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت BG-11

Table 1: BG-11 medium

ردیف	ترکیبات	میزان	غلظت نهایی
۱	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Baker 0084)	۲/۸۶ g/L	۴۶ mM
۲	MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O (Baker 2540)	۱/۸۱ g/L	۹ mM
۳	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (Sigma Z 0251)	۰/۲۲ g/L	۰/۷۷ mM
۴	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O (J.T. Baker 3764)	۰/۳۹ g/L	۱/۶ mM
۵	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O (MCIB 3M11)	۰/۰۷۹ g/L	۰/۳ mM
۶	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O (ACROS 10026-22-9)	۲/۸۶ g/L	۴۶ mM

کلیه مواد و محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند تا از رخداد احتمالی هر گونه آلودگی، در طول مدت جداسازی و کشت

<sup>۱</sup> <https://utex.org/products/bg-11-trace-metals-solution>

چربی استخراج شده ترانس استری گردید. پس از انجام واکنش ترانس استریفیکاسیون محلول به دست آمده با اسیدکلریدریک ۵ نرمال اسیدی گردید تا اسیدهای چرب را از نمک‌های پتاسیم مربوطه آزاد کند. زمانی که تفکیک فاز کاملاً اتفاق افتاد، فاز آلی شامل سوخت زیستی برای آنالیز اسیدهای چرب متیل استر (FAME) جمع‌آوری شد. برای تعیین ترکیبات اسیدچرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)، مدل Hewlett-Packard 5890 استفاده گردید. بدین منظور، در ابتدا ۱ میکرولیتر از نمونه FAME به داخل دستگاه تزریق شد که مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) و ستون موئینه مدل Omegawax ۳۲۰ بود. گاز هلیوم به عنوان گاز حامل به کار رفت و با شدت ۳۰ میلی‌لیتر بر دقیقه تزریق شد. دمای اینجکتور و آشکارساز در ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد. دمای اولیه ستون بر ۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و با سرعتی معادل ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا دمای ۱۷۰ درجه افزایش پیدا کرد. به منظور تشخیص پیک‌ها و تفکیک اسیدهای چرب مختلف از یک استاندارد حاوی ۳۷ نوع اسیدچرب ( Bellefonte, PA, USA) استفاده گردید.

#### محاسبه خواص سوخت زیستی

به منظور بررسی کیفیت سوخت زیستی پارامترهایی مانند میزان صابونی‌شدن (SV)، ارزش یدی (IV)، عدد ستانی (CN)، درجه غیراشباع بودن (DU)، طول زنجیره‌اشباع (LCSF) و نقطه انسداد فیلتر (CFPP). به ترتیب طبق روابط ذیل برآورد شدند:

$$IV = \sum (254 \times F \times D) / MW$$

$$SV = \sum (560 \times F) / MW \text{ (Kawasaki et al., 2013)}$$

$$CN = (46.3 + 5458 / SV) - (0.225 \times IV)$$

$$DU = (MUFA, wt\%) + (2 \times PUFA, wt\%)$$

$$LCSF = 0.1 \times C16 + 0.5 \times C18 + 1 \times C20 + 1.5 \times C22 + 2.0 \times C24$$

$$CFPP = 3.1417 \times LCFS - 16.477$$

F = درصد هر اسیدچرب، MW = وزن مولکولی اسیدچرب مربوطه، D = تعداد پیوندهای دوگانه، اسیدهای چرب تک اشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چنداشباع (PUFA)

(میلی‌گرم در لیتر) را نشان می‌دهد که در دو زمان نمونه‌برداری  $t_1$  و  $t_2$  برداشت شدند:

$$BP^1 = (DW_2 - DW_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

#### شیوه استخراج چربی و تجزیه و تحلیل بازدهی آن

چربی کل به روش انجمادی استخراج شد. ۲۰ میلی‌گرم از پودر لیوفیلیز شده جلبک به مدت ۲۴ ساعت در مخلوطی از کلروفرم: متانول (با نسبت ۱:۲ حجمی) غوطه‌ور و در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه با شدت ۷۰ مگا هرتز تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفت تا سلول‌های جلبک بشکند. این فرایند دوبار تکرار شد تا چربی کل کاملاً استخراج گردید. مخلوط به دست آمده سانتریفوژ شد و جهت جداسازی لایه‌ها بی‌حرکت نگه‌داشته شد (Bligh and Dyer, 1959). لایه کلروفرم: متانول به همراه چربی کل دو بار با محلول کلرید پتاسیم شسته شد و با استفاده از خشک‌کن انجمادی تحت خلا در دمای ۹۰- درجه سانتی‌گراد، رطوبت آن گرفته شد. وزن چربی کل ثبت و محتوای چربی (LC, %) به صورت درصدی از وزن چربی در وزن خشک سلولی طبق رابطه ۲ محاسبه گردید (Tao et al., 2013):

$$LC = 100 \times W_{EL} / W_{DA} \quad (2)$$

در این رابطه  $W_{EL}$  و  $W_{DA}$  به ترتیب وزن چربی استخراج شده و زیست‌توده خشک جلبک می‌باشد. بازدهی چربی (LP,  $g L^{-1} d^{-1}$ ) براساس معادله ذیل تعیین شد:

$$LP = BP \times LC \quad (3)$$

BP = بازدهی زیست‌توده ( $g L^{-1} d^{-1}$ )، LC = محتوای چربی (%)

#### آنالیز پروفایل اسیدهای چرب

جهت ارزیابی ترکیب چربی از روش پیشنهادی Kumari و همکاران (۲۰۱۱) با یکسری تغییرات استفاده گردید که به اختصار به شرح ذیل می‌باشد. در دمای اتاق و در طول شب، چربی استخراج شده پس از استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروکسیدپتاسیم متانولی (۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۲ مولار) با افزودن ۱ میلی‌گرم هگزان به هر ۵ میلی‌گرم از

<sup>1</sup> BP برحسب گرم بر لیتر در روز؛  $g L^{-1} d^{-1}$

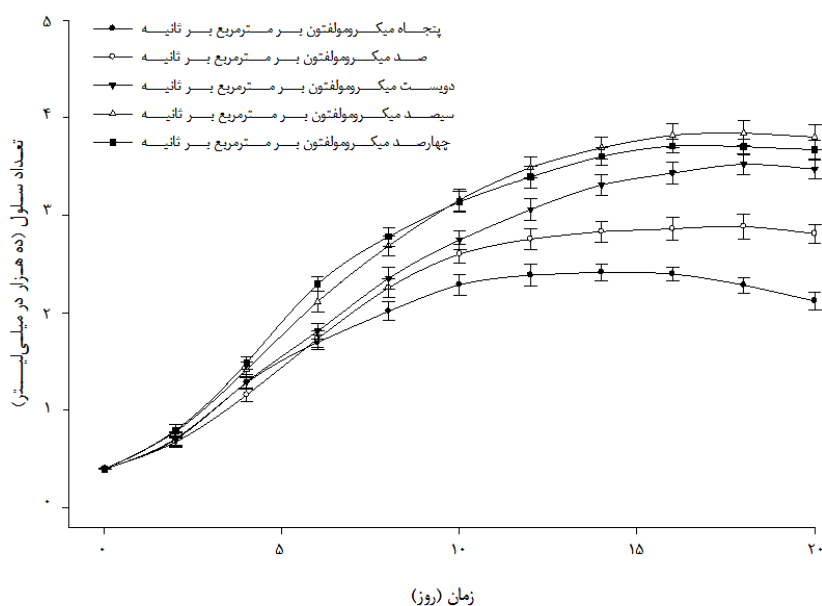
نور تا ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه نرخ رشد سلولی جلبک را طی آزمایش کاهش داد. با این وجود اختلاف معنی‌داری در تراکم نهایی سلولی بین جلبک‌های رشد یافته در شدت‌های نوری ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه مشاهده نگردید. سلول‌های کشت‌شده تحت تابش ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه پس از ۱۳ روز از انکوباسیون به فاز سکون رسیدند درحالی‌که در تابش‌های ۵۰ و ۲۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه به ترتیب پس از ۱۶ و ۱۴ روز از شروع کشت وارد فاز سکون شدند. بین تیمارهای نوری ۴۰۰ و ۲۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه اختلاف معنی‌داری از نظر نرخ رشد ویژه سلولی وجود نداشت (شکل ۱).

### روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج براساس میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) بیان شد. داده‌ها از نظر وجود اختلافات معنی‌دار با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) و متعاقباً آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط پکیج آماری نرم‌افزار SPSS 12.0 برای سیستم عامل ویندوز (SPSS Inc) آنالیز شدند. مقادیر  $p$  کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

مطابق منحنی‌های کشت به دست آمده، سریع‌ترین رشد را جلبک‌هایی داشتند که با ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه نوردهی شده بودند. افزایش بیشتر شدت



شکل ۱: منحنی رشد جلبک *C. reinhardtii* تحت تاثیر شدت‌های مختلف نور (مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند).

Figure 1: Growth curve of *C. reinhardtii* cultured under different light intensities (Error bars represent  $\pm$  SD of four replicates)

به طوری که حداکثر میزان آن  $230/12 \pm 2/84$  میلی‌گرم در لیتر در روز در محیط کشت‌هایی دیده شد که در شدت نوری ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه رشد کرده بودند. ولی در بازدهی زیست‌توده محیط کشت‌های

تأثیر شدت‌های نوری مختلف بر بازدهی چربی و توده‌زیستی *C. reinhardtii* همان طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است، افزایش شدت نور به افزایش بازدهی زیست‌توده انجامید

از این شدت نوری، افت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در محتوای چربی اتفاق افتاد. نتایج مشابهی نیز برای بازدهی چربی یافت گردید به طوری که بازدهی چربی در محیط کشت نوردهی شده با شدت ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه بیشترین بود.

نوردهی شده با ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه تفاوتی وجود نداشت. افزایش بیشتر شدت تابش به ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه منجر به کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) این بازدهی شد. محتوای چربی در شدت نور ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه به حداکثر میزان خود ( $45/72 \pm 1/06$ ) درصد رسید. در فراتر

جدول ۲: حاصلخیزی زی توده، محتوای چربی و حاصلخیزی چربی جلبک *C. reinhardtii* تحت تاثیر شدت‌های مختلف نور  
Table 2: Biomass productivity, extractable lipid content, and lipid productivity of *C. reinhardtii* cultured under different light intensities

شدت نور	حاصلخیزی زی توده (میلی‌گرم در لیتر در روز)	محتوای چربی (درصد)	حاصلخیزی چربی (میلی‌گرم در لیتر در روز)
۵۰	۱۳۹/۴۷±۲/۲۶	۳۰/۱۲±۰/۴۶	۴۲/۰۰±۰/۶۳
۱۰۰	۱۷۷/۶۲±۲/۳۹	۳۴/۲۹±۰/۸۲	۶۰/۹۱±۰/۸۵
۲۰۰	۲۰۰/۸۲±۳/۵۳	۳۸/۳۷±۱/۱۳	۷۷/۰۵±۱/۱۹
۳۰۰	۲۳۰/۱۲±۲/۸۴	۴۵/۷۲±۱/۰۶	۱۰۵/۲۱±۱/۶۳
۵	۲۱۰/۱۷±۲/۵۶	۴۴/۰۳±۰/۹۵	۹۲/۵۴±۰/۷۴

مقادیر به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

با افزایش تابش، نسبت اسیدهای چرب اشباع (SFA) به میزان چشمگیری از  $42/22 \pm 3/69\%$  الی  $74/82 \pm 4/11\%$  افزایش یافت و نسبت اسیدهای چرب تک‌اشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چنداشباع (PUFA) موجود در چربی به ترتیب از  $12/67 \pm 0/93\%$  الی  $7/26 \pm 0/54\%$  و از  $45/11 \pm 3/28\%$  الی  $17/92 \pm 1/26\%$  کاهش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند (جدول ۳).

تأثیر شدت‌های نوری مختلف بر پروفایل اسیدچرب *C. reinhardtii* در جدول ۳ ترکیبات اسید چرب ریزجلبک *C. reinhardtii* رشد یافته در شدت نورهای مختلف آمده است. اسیدهای چرب سوپه جداشده در طیف ۲۲-۱۲ کربنی قرار داشت درحالی‌که FAME های با طول زنجیره ۱۸-۱۶ کربن بیش از ۹۱/۱۷ درصد کل اسیدهای چرب سلول‌های رشد یافته تحت تابش‌های مختلف را تشکیل داد.

جدول ۳: تغییرات اسیدهای چربی متیل استری شده (FAME) جلبک *C. reinhardtii* تحت تاثیر شدت‌های مختلف نور  
Table 3: Fatty acid methyl esters (FAME) profile of *C. reinhardtii* cultured under different light intensities

اسید چرب	شدت نور (میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه)				
	۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰
C12:0 اسید لوریک	۰/۷۲±۰/۰۵	۰/۷۴±۰/۰۴	۰/۶۴±۰/۰۴	۰/۵۶±۰/۰۲	۰/۵۴±۰/۰۳
C14:0 اسید میرستیک	۵/۸۵±۰/۲۶	۴/۳۳±۰/۱۷	۳/۶۳±۰/۱۹	۳/۰۸±۰/۱۴	۲/۹۳±۰/۱۶
C14:1 اسید میریستولئیک	۰/۶۲±۰/۰۲	۰/۹۶±۰/۰۳	۱/۰۵±۰/۰۴	۱/۷۳±۰/۰۹	۲/۶۶±۰/۱۸
C16:0 اسید پالمیتیک	۳۵/۲۳±۱/۹۶	۳۱/۶۸±۱/۲۴	۲۷/۸۵±۱/۱۹	۲۴/۶۹±۱/۱۳	۲۰/۴۱±۱/۲۶
C16:1 اسید پالمیتولئیک	۲/۴۱±۰/۱۲	۲/۸۰±۰/۱۳	۳/۳۷±۰/۱۷	۳/۷۵±۰/۱۸	۴/۷۳±۰/۲۱
C16:2 اسید هگزا دکانویئیک	۰/۵۳±۰/۰۳	۰/۶۰±۰/۰۲	۰/۸۹±۰/۰۹	۱/۰۲±۰/۰۶	۱/۱۶±۰/۱۱

شدت نور (میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه)					اسید چرب
۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	
۲۹/۴۲±۱/۲۱	۲۶/۳۵±۱/۱۶	۲۳/۳۱±۱/۰۸	۲۰/۲۹±۱/۱۳	۱۷/۲۱±۱/۰۹	C18:0 اسید استئاریک
۴/۲۳±۰/۱۰	۴/۱۲±۰/۱۱	۴/۶۶±۰/۱۹	۴/۷۲±۰/۱۴	۵/۲۸±۰/۱۵	C18:1 اسید اولئیک
۳/۱۸±۰/۲۷	۵/۱۹±۰/۳۲	۶/۹۷±۰/۵۸	۷/۴۰±۰/۵۹	۷/۲۴±۰/۶۳	C18:2 اسید لینولئیک
۱۴/۲۱±۱/۲۸	۱۹/۱۵±۱/۵۴	۲۴/۸۱±۱/۶۳	۳۰/۳۳±۱/۹۳	۳۶/۷۱±۲/۱۷	C18:3 اسید آلفالینولئیک
۰/۱۷±۰/۰۱	۰/۶۶±۰/۰۸	۰/۲۳±۰/۰۱	۰/۲۷±۰/۰۲	۰/۲۰±۰/۰۱	C20:0 اسید آراشیدیک
۳/۴۳±۰/۲۵	۳/۴۲±۰/۲۹	۲/۵۹±۰/۲۶	۲/۱۶±۰/۲۳	۰/۹۳±۰/۰۶	C22:0 اسید بهنیک
۷۴/۸۲±۴/۱۱	۶۷/۱۸±۴/۰۱	۵۸/۲۵±۳/۶۲	۵۱/۰۳±۳/۷۵	۴۲/۲۲±۳/۶۹	∑SFAs
۷/۲۶±۰/۵۴	۷/۸۸±۰/۶۴	۹/۰۸±۰/۷۵	۱۰/۲۰±۰/۹۶	۱۲/۶۷±۰/۹۳	∑MUFAs
۱۷/۹۲±۱/۲۶	۲۴/۹۴±۱/۷۶	۳۲/۶۷±۱/۸۱	۳۸/۷۵±۲/۶۶	۴۵/۱۱±۳/۲۸	∑PUFAs

مقادیر به صورت میانگین±انحراف معیار از چهار تکرار بیان شده‌اند. حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.

نوردهی شده با ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه این پارامتر به کمترین میزان ( $22/75 \text{ g I}_2 \text{ 100 g}^{-1}$ ) رسید. SV استخراج شده از ریزجلبک‌های رشد یافته در شدت نورهای مختلف اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. از سویی، LCSF و CFPP همبستگی مثبتی با شدت نور داشتند به طوری که به ترتیب بیشترین مقادیر ۲۳/۵۵ و ۵۷/۵۰ در کشت‌های انجام شده در شدت نور ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه به دست آمد.

تأثیر شدت‌های مختلف نور بر مولفه‌های خصوصیات سوخت‌زیستی تولیدی از *C. reinhardtii* خواص سوخت‌زیستی بر مبنای پروفایل اسیدهای چرب طبق جدول ۴ به دست آمد. متیل استرها CN با افزایش شدت نور از ۴۳/۸۷ در محیط کشت نوردهی شده با ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه تا حداکثر ۶۷/۳۸ در شدت نور ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه روند افزایشی نشان داد. در مقابل، IV با افزایش شدت نور افت چشم‌گیری داشت به طوری که در محیط کشت‌های

جدول ۴: ویژگی‌های سوخت‌زیستی جلبک *C. reinhardtii* تحت تاثیر شدت‌های مختلف نور

Table 4: Biodiesel properties of *C. reinhardtii* cultured under different light intensities

CFPP	LCSF	SV	IV	CN	شدت نور
					(میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه)
۲۱/۹۸	۱۲/۲۴	۲۰۵/۹۱	۱۲۸/۶۳	۴۳/۸۷	۵۰
۳۴/۱۸	۱۶/۱۲	۲۰۶/۶۷	۴۵/۲۰	۶۲/۵۴	۱۰۰
۴۱/۸۲	۱۸/۵۶	۲۰۶/۸۷	۳۸/۴۶	۶۴/۰۳	۲۰۰
۵۳/۰۶	۲۲/۱۳	۲۰۷/۳۰	۳۰/۲۸	۶۵/۸۲	۳۰۰
۵۷/۵۰	۲۳/۵۵	۲۰۸/۳۴	۲۲/۷۵	۶۷/۳۸	۴۰۰

## بحث

تغییر عوامل محیطی به عنوان یک عامل استرس را می‌تواند سبب افزایش محتوای ترکیبات روغنی در ریزجلبک‌ها شود که لازم است برای هر سویه از طریق مطالعه اختصاصی تعیین گردد (Gopinath et al., 2009). اثر میزان و شدت نور با تولید رنگدانه‌های کلروفیل و متابولیت‌های آن‌ها در ریزجلبک‌ها رابطه مستقیم دارد. فتوسنتز فرایندی گرماگیر است که از طریق تثبیت انرژی خورشید قادر است دی‌اکسیدکربن و آب را به ترکیبات پروتئینی، کربوهیدرات و چربی تبدیل کند (Adeniyi et al., 2018). در این مطالعه، محتوای چربی *C. reinhardtii* با افزایش شدت نور به حداکثر میزان  $11.06 \pm 4.45\%$  در محیط نوردهی شده با ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه رسید که بیان‌گر آن است که شارکربن تولیدی از طریق فتوسنتز به تجمع چربی هدایت می‌شود. با قرارگیری در معرض مقادیر بالایی از انرژی نورانی، ریزجلبک انرژی مازاد را به سمت مسیر متابولیک چربی‌های خنثی مانند تری‌اسیل‌گلیسرول سوق می‌دهد (Brennan and Owende, 2010) که از اجزاء اصلی تشکیل‌دهنده چربی‌های خنثی هستند و به عنوان یک منبع انرژی مازاد جذب شده به‌وسیله دستگاه فتوسنتزی عمل می‌کنند (Adams et al., 2013). تجمع کمتر چربی در تابش نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه ممکن است با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد که به‌نوبه خود مسیرهای بیوسنتزی ساخت چربی را از بین می‌برند، در ارتباط باشد. یافته‌های پژوهش حاضر به‌وضوح نشان می‌دهد که برای رشد حداکثر ریزجلبک *C. reinhardtii* تراکم مطلوب شارفوتون فتوسنتزی ضروری است درحالی‌که تابش‌های قوی‌تر از محدوده اشباع نوری عملکرد رشد آن را با کاهش مواجه می‌سازند. شدت‌های نوری بیشتر می‌تواند با آسیب به سیستم گیرنده فتوسنتزی در عرض چند دقیقه موجب القاء بازدارندگی شوند و به علت اکسیداسیون رنگدانه‌های نوری مانند کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها از رشد ریزجلبک‌ها بازدارند کنند (Rajabi and Assareh, 2020). Ho و همکاران (۲۰۱۲) اظهار داشتند که شدت نور قادر است، تثبیت دی‌اکسید کربن، بازدهی زیست‌توده و رشد سلولی را در

*Scenedesmus obliquus* تحریک کند. Wahidin و همکاران (۲۰۱۳) نرخ رشد ویژه حداکثری را برای گونه *Nannochloropsis* در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و چرخه نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی توصیف کردند. برای *Neochloris oleoabundans* سویه UTEX1185 نیز نرخ رشد ویژه حداکثری در شدت تابش ۲۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Kumar et al., 2018). در تحقیق Rayati و همکاران (۲۰۲۰) ریزجلبک آب شیرین *Chlorococcum oleofaciens* بیشترین نرخ رشد ویژه را تحت تابش نوری ۲۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه داشت (Rayati et al., 2020). در این مطالعه نیز بیشترین محتوای چربی در شدت نوری ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه محقق گردید. این یافته‌ها مؤید آن است که تابش نور مرئی فاکتور بسیار مهمی است که رشد ریزجلبک *C. reinhardtii* را بهبود می‌بخشد. در پژوهش پیش‌رو سلول‌های کشت‌شده در ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه بالاترین بازدهی توده زیستی را به میزان  $2.84 \pm 230.12$  میلی‌گرم در لیتر در روز نشان دادند. افزایش بیشتر شدت نور محیط‌کشت تا ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه منجر به کمترین غلظت توده زیستی *C. reinhardtii* گردید که مؤید اثرات بازدارنده نوردهی اضافی بر فتوسنتز این ریزجلبک می‌باشد که می‌تواند به آسانی رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها را تخریب کند و منجر به افت بازدهی زیست‌توده ریزجلبک گردد (Griffiths and Harrison, 2009). شایان ذکر است، ترکیب و ساختار اسیدهای چرب، خصوصیات سوخت زیستی تولیدی از ماده اولیه ریزجلبکی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این مطالعه FAME‌های به‌دست آمده از *C. reinhardtii* عمدتاً شامل اسیدهای چرب با طول زنجیره ۱۶-۱۸ کربنی بودند که برای تولید سوخت‌زیستی صنعتی مناسب‌تر است. همچنین گزارش‌ها حاکی از آن است که شدت نور خصوصیات سوخت‌زیستی مشتق از ریزجلبک را با تغییر در درصد SFA، MUFA و PUFA متأثر می‌سازد و عموماً نسبت آنها (SFA، MUFA و PUFA) یکدیگر را تراز می‌کند. تغییر شدت



CFPP یک شاخص برتر برای کاربرد یک سوخت در دماهای پایین به‌شمار می‌رود و بدین صورت تعریف می‌شود: پایین‌ترین دمایی که در آن یک حجم مشخصی از سوخت خالص از بین یک فیلتر استاندارد در یک زمان مشخص عبور می‌کند (Oromí et al., 2010). این پارامتر غالباً به طول زنجیره کربنی همچنین درجه اشباع متیل استر اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده سوخت زیستی بستگی دارد، به همین دلیل CFPP و LCSF با همدیگر ارتباط دارند. بدین صورت که اسیدهای چرب دارای زنجیره کربنی طولانی‌تر یا دارای میزان اشباع شدن بیشتر نقطه ذوب بالاتر و خصوصیات بهتری در دمای بالا هستند. براساس استاندارد شماره ۱۴۲۱۴ از استانداردهای اروپایی هر کشوری می‌تواند با توجه به شرایط آب و هوایی آن کشور محدوده دمایی مشخصی را برای هر فصل تعیین کند. در این آزمایش سوخت‌زیستی حاصل از *C. reinhardtii* کشت شده در تابش‌های شدیدتر CFPP و LCSF بالاتری در مقایسه با ریزجلبک‌های کشت شده در شدت‌های نوری کمتر نشان دادند. این ویژگی سوخت‌زیستی تولیدی از این ریزجلبک را برای استفاده در مناطق سردتر، کمتر مناسب و کاربردی می‌کند. باین‌حال، در محدوده مقدار بیان شده برای *S. abundans* و گونه *Nostoc carneum* (Bhatia, 2014) و *Chlamydomonas* (Sibi et al., 2016) قرار دارد. توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، تغییرات شدت نوری به عنوان یکی از عوامل محیطی، می‌تواند سبب تغییر میزان ترکیبات روغنی در ریزجلبک گردد. در نتیجه، تنظیم شرایط محیط کشت برای ریزجلبک *C. reinhardtii* می‌تواند در افزایش تولید ترکیبات بیوشیمیایی مختلف از جمله چربی‌ها مؤثر باشد.

### منابع

نظرپور، م.، تقی زاده علی سرایی، ا. و تاتاری، ع. ا.، ۱۳۹۸. اهمیت و کاربرد جلبک در تولید سوخت‌های زیستی. دوازدهمین کنگره ملی مهندسی مکانیک بیوسیستم و مکانیزاسیون، ایران، اهواز، ۱۸-۱۶ بهمن ماه. <https://civilica.com/doc/1005432/>

نور شرایط کشت در بازه ۴۰۰-۵۰ میکرومول فوتون مترمربع در ثانیه در این تحقیق موجب افزایش چشم‌گیر مقدار کلی SFA های به‌دست‌آمده از *C. reinhardtii* گردید درحالی‌که مقادیر MUFA ها و PUFA ها افت معنی‌داری نشان دادند ( $p < 0.05$ ). نتایج مشابهی در معنی‌داری نشان داد که در آن محتوای *Chlorella vulgaris* با قرارگیری در مقابل شدت نور بیشتر کاهش داشته، ولی SFA افزایش داشت (Christou et al., 2018). در ارتباط با ریزجلبک *N. oleoabundans* نیز افزایش اسیدهای چرب اشباع و تک غیراشباع با افزایش شدت نور مشاهده شده است (Huanyang, 2016). در نهایت Kumar و همکاران (۲۰۱۸) ثابت کردند که شدت نور بالا بر غلظت‌های SFA بیشتر در یک ریزجلبک جمع‌آوری شده از پهنه‌های آبی طبیعی اکولوژیک تأثیرگذار است (Tan and Lee, 2016).

مولفه‌های اصلی تعیین‌کننده کیفیت سوخت (IV, CN, DU, LCSF و CFPP) که در این تحقیق محاسبه شدند، مشخص نمود که CN برآورد شده برای سوخت‌زیستی حاصل از *C. reinhardtii* به میزان ۶۷/۳۸-۴۳/۸۷ در شدت‌های مختلف نوری متغیر بود که با حداقل استانداردهای تعیین‌شده آمریکایی (ASTM D6751) و اروپایی (EN 14214) مطابقت دارد. در پژوهش حاضر، دامنه IV به‌دست‌آمده از *C. reinhardtii* در شدت نورهای مختلف در دامنه ۱۲۸/۶۳-۲۲/۷۵ متغیر بود که مطابق با ویژگی‌های استاندارد EN 14214 است (Sun et al., 2014). شاخص مهم دیگر از آنالیز سوخت‌زیستی SV است. SV به طور غیرمستقیم مقیاسی برای ارزیابی وزن مولکولی اسیدهای چرب فراهم می‌کند (Rochaix, 2011). هرچه زنجیره اسید چرب کوتاه‌تر باشد، تعداد گروه‌های عملکردی کربوکسیلی کمتر و SV هم کمتر می‌باشد. SV ریزجلبک *C. reinhardtii* در شدت نورهای مختلف در طیف کوتاه ۲۰۸/۳۴-۲۰۵/۹۱ متغیر بود که نزدیک به مقادیر SV گزارش‌شده برای سایر کاندیدهای ریزجلبکی مانند *Clarothrix brevissima* (۲۲۶/۰۳)، *Chlorella* (۲۱۷/۰۸) و *S. abundans* (۲۰۵/۰۸)، برای تولید سوخت‌زیستی با کیفیت قرار دارد.

- Monti, A., Zegada-Lizarazu, W., Pari, L. and Scarfone, A., 2018. 4 - Giant reed: from production to end use. In: Alexopoulou E (ed) Perennial grasses for bioenergy and bioproducts. Academic press, Cambridge, pp. 107–151. DOI:10.1016/B978-0-12-812900-5.00004-7.
- Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, V.T., Velpuri, J. and Kuppam, C., 2018. A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94: 49–68. DOI:10.1016/j.rser.2018.05.012.
- Goh, B.H.H., Ong, H.C., Cheah, M.Y., Chen, W.H., Yu, K.L. and Mahlia, T.M.L., 2019. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107: 59–74. DOI:10.1016/j.rser.2019.02.012.
- Gopinath, A., Puhan, S. and Nagarajan, G., 2009. Theoretical modeling of iodine value and saponification value of biodiesel fuels from their fatty acid composition. *Renewable Energy*, 34: 1806–1811. DOI:10.1016/j.renene.2008.11.023.
- Griffiths, M.J. and Harrison, S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21: 493–507. DOI:10.1007/s10811-008-9392-7.
- وزیرزاده، ا. و مقدس زاده، ح.، ۱۳۹۷. بهینه سازی رشد و میزان چربی و کلروفیل ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در سطوح مختلف نیتروژن، فسفر و دوره نوری با استفاده از طراحی مرکب مرکزی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۳): ۸۵–۹۵. DOI:10.22092/ISFJ.2018.117018
- Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L. and Bugbee, B., 2013. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content trade off in *oleaginous* green microalgae. *Bioresource Technology*, 131:18. DOI:10.1016/j.biortech.2012.12.143.
- Adeniyi, O. M., Azimov, U. and Burluka, A., 2018. Algae biofuel: Current status and future applications *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90: 316– 335. DOI:10.1016/j.rser.2018.03.0671.
- Bhatia, S.C., 2014. Advanced renewable energy systems. Woodhead publishing India, New Delhi, pp. 573–626. DOI:10.1016/B978-1-78242-269-3.50022-X
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, 37: 911–917. DOI:10.1139/o59-099.
- Brennan, L. and Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557–77. DOI:10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Christou, M., Alexopoulou, E., Cosentino, S.L., Copani, V., Noguees, S., Sanchez, E.,

- Ho, S.H., Chen C.Y. and Chang J.S., 2012.** Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113: 244–252. DOI:10.1016/j.biortech.2011.11.133.
- Huanyang, W., 2016.** Effect of different light qualities on growth, pigment content, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in the red alga *Pyropia haitanensis*. *BioMed Research International*, 2016: 7383918–7383918. DOI:10.1155/2016/7383918.
- Kawasaki, Y., Nakada, T. and Tomita, M., 2013.** Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* and its relatives. *Journal of Phycology*, 51:1000-1016. DOI:10.1111/jpy.12343.
- Kumar, V., Kumar, R., Rawat, D. and Nanda, M., 2018.** Synergistic dynamics of light, photoperiod and chemical stimulants influences biomass and lipid productivity in *Chlorella singularis* (UUIND5) for biodiesel production. *Applied Biological Chemistry*, 61: 7–13. DOI:10.1007/s13765-017-0332-6.
- Kumari, P., Reddy, C.R.K. and Jha, B., 2011.** Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Analytical Biochemistry*, 415: 134–144. DOI:10.1016/j.ab.2011.04.010.
- Mofijur, M., Rasul, M.G., Hassan, N.M.S. and Nabi, M.N., 2018.** Recent development in the production of third generation biodiesel from microalgae. *Energy Procedia*, 156:53–58. DOI:10.1016/j.egypro.2018.11.088.
- Onumaegbu, C., Alaswad, A., Rodriguez, C. and Olabi, A., 2019.** Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pretreatment method and response surface methodology. *Renewable Energy*, 132: 1323–1331. DOI:10.1016/j.renene.2018.09.008.
- Oromí-Farrús, M., Villorbina, G., Eras, J., Gatiús, F., Torres, M. and Canela, R., 2010.** Determination of the iodine value of biodiesel using 1H NMR with 1,4-dioxane as an internal standard. *Fuel*, 89: 3489–3492. DOI:10.1016/j.fuel.2010.06.016.
- Rajabi, H. and Assareh, R., 2020.** Enhancement effects of ferric ion concentrations on growth and lipid characteristics of fresh water microalga *Chlorococcum oleofaciens* KF584224.1 for biodiesel production. *Renewable Energy*, 149: 264–272. DOI:10.1016/j.renene.2019.12.067.
- Rayati, M., Rajabi, H. and Shamsaie, M., 2020.** Light intensity improves growth, lipid productivity and fatty acid profile of *Chlorococcum oleofaciens* for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 13: 1235–1245. DOI:10.1007/s12155-020-10144-5.
- Rochaix, J.D., 2011.** Regulation of photosynthetic electron transport. *BBA-*

- Bioenergetics*, 1807: 375–383.  
DOI:10.1016/j.bbabi.2010.11.010.
- Shin, Y.S., Jeong, J., Nguyen, T.H.T., Kim, J.Y.H., Jin, E. and Sim, S.J., 2019.** Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 271: 368-374.  
DOI:10.1016/j.biortech.2018.09.121.
- Sibi, G., Shetty, V. and Mokashi, K., 2016.** Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – a review. *Journal of the Energy Institute*, 89(3): 330–334.  
DOI:10.1016/j.joei.2015.03.008.
- Singh, S.P. and Singh, P., 2015.** Effect of temperature and light on the growth of algae species. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50: 431–444.  
DOI:10.1016/j.rser.2015.05.024.
- Sun, X., Cao, Y., Xu, H., Liu, Y., Sun, J., Qiao, D. and Cao, Y., 2014.** Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. *Bioresource Technology*, 155: 204–212.  
DOI:10.1016/j.biortech.2013.12.10.
- Tan, K.W.M. and Lee, Y.K., 2016.** The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology for Biofuels*, 9: 255–255.  
DOI:10.1186/s13068-016-0671-2.
- Tao, Li., Linglin, W., Aifen, L. and Chengwu, Z., 2013.** Responses in growth, lipid accumulation, and fatty acid composition of four oleaginous microalgae to different nitrogen sources and concentration. *Chinese Journal of Oceanology Limnology*, 31: 1306–1314.  
DOI:10.1007/s00343-013-2316-7.
- Wahidin, S., Idris, A. and Shaleh S.R.M., 2013.** The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129: 7–11.  
DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.032.

## The effect of light intensity on lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii* to produce biofuels

Rayati M.<sup>1</sup>; Rajabi Islami H.<sup>1\*</sup>; Shamsaie Mehrejan M.<sup>1</sup>

\* rajabi.h@srbiau.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

Global warming due to the excessive use of fossil fuels, environmental pollution, and rising greenhouse gases has led researchers to develop renewable energy sources such as the sun, wind, water, and biofuels. Microalgae, which are high in fatty acids, are suitable candidates for biofuel production. This study was designed to investigate the effect of different light intensities on the growth and accumulation of lipid in freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. For this purpose, microalgae were cultured at five light intensities of 50, 100, 200, 300, and 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 20 days. The highest lipid content was ( $45.72 \pm 1.06\%$ ), and the lipid yield was ( $105.21 \pm 1.63 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), according to the growth curves in microalgae exposed to 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The amount of saturated fatty acids increased significantly with increasing light intensity, while monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decreased. Among the fatty acids, methyl ester, palmitic acid, stearic acid, and alpha-linolenic acid showed the highest values at a light intensity of 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . To evaluate the quality of biofuels, parameters such as saponification rate (SV), iodine value (IV), Cetane number (CN), degree of unsaturation (DU), long chain saturated factors (LCSF), and cold flow plugging properties (CFPP) was also estimated. The findings of this study showed that light intensity could improve the fat efficiency and biofuel properties obtained from the microalgae *C. reinhardtii* as a raw material in biofuel production.

**Keywords:** Biofuel, Growth, Lipid, Microalgae, Light intensity

---

\*Corresponding author