(مقاله پژوهشی)

بهینه‌سازی تولید فایکوسیانین توسط ریز جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در شرایط‌های مختلف دما، شدت نور، روش‌های کشت و نوع منبع کربنی

زهرا لطیفی[۱]، حبیب الله شهریاری[۲]، محمد حسین مرحمتی‌زاده[۳]، عاطفه ارجمندیان[۴]، مریم مدامیان فرشبافی[۵]، لیلا روزبه نصیرایی[۶*]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران.

۳-دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۴-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۵-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۶-استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۲/۱۳

DOI: 10.30495/jfst.2022.1944465.1765

چکیده

در حال حاضرتولید تجاری بسیاری از رنگدانه‌ها از منابع غیرطبیعی است. به دلیل اثرات سمی‌گزارش شده از این رنگ‌های مصنوعی استفاده از رنگ‌های طبیعی در مصارف دارویی و غذایی ضروری است. فایکوسیانین به عنوان یک رنگدانه طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی از ریز جلبک اسپیرولینا استخراج می‌گردد. این ریزجلبک دارای محتوای مواد مغذی منحصر به فرد و اثرات تغذیه‌ای و درمانی متعددی می‌باشدکه در غنی‌سازی فرآورده‌های غذایی مختلف به‌کارگرفته می‌شود. در این تحقیق شرایط بهینه تولید و استخراج رنگدانه فایکوسیانین از ریزجلبک *اسپیرولینا* مورد بررسی قرارگرفت. در این پژوهش اثرمنبع کربنی (گلوکز، اتانول، اسید استیک)، روش کشت (مداوم و غیر مداوم)، دما (۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و شدت نور (۲ و ۳/۵ کیلو لوکس) بر میزان تولید رنگدانه فایکوسیانین از ریز جلبک سبز آبی بررسی شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات مطابق با طرح فاکتوریل با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS در سطح احتمال P< ۰/۰۵ انجام شد. نتایج آزمون‌های روش مداوم مشابه روش غیر مداوم بود. افزایش دما از ۲۸ به ۳۸ درجه سانتی‌گراد تأثیر جدی در کاهش تولید رنگدانه فایکوسیانین داشت و هر سه منبع کربنی در روش مداوم همانند روش غیر مداوم در شدت نور ۳/۵ کیلولوکس و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد باعث تولید حداکثر مقدار فایکوسیانین شدند. منبع کربنی‌گلوکز در روش مداوم و با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳/۵ کیلولوکس باعث تولید ۳۳/۴۱ درصد رنگدانه فایکوسیانین شد که به عنوان روش مناسب‌تری مشخص شد. در هر دو روش مداوم و غیر مداوم به علت شدت نور بالا مقدار تولید فایکوسیانین زیاد بود و این مقادیر با افزودن منبع کربنی گلوکز افزایش پیدا می‌کرد.

واژه‌های کلیدی: رنگدانه پروتئینی، ریز جلبک سبز- آبی، روش‌های کشت، *اسپیرولینا پلاتنسیس*.

* مسئول مکاتبات: dr.rozbeh_l@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه تلاش‌های زیادی صورت می‌گیرد تا با راهکارهای درک بهتر این رابطه بتوانند با تغذیه‌ای مناسب علاوه بر تأمین نیازمندی‌های اولیه بدن، سلامت و افزایش طول عمر مصرف‌کننده را تضمین نمایند. ریزجلبک‌ها منابع مغذی جایگزین و جدید از مواد طبیعی هستند که می‌توانند در توسعه موادغذایی جدید مورد استفاده قرار بگیرند. ترکیبات فعال بیولوژیکی به طورطبیعی درون سلول ریزجلبک‌ها محصور شده‌اند و قادر به مقاومت در برابر شرایط سخت تکنولوژیکی در فرآیندهای غذایی‌می‌باشند (۱۹). تأثیر زیست توده ریزجلبک‌ها در سیستم‌های غذایی وابسته به شرایط عملیاتی نوع و شدت فرآیند (حرارتی، مکانیکی) و برهم‌کنش با سایر ترکیبات مواد غذایی (پروتئین، پلی-ساکارید، لیپید، نمک و قند) است که مطالعه در این زمینه موجب بهبود روند طراحی و توسعه فرآورده‌های غنی شده با ریز جلبک‌ها می‌گردد (۲۵).

شکل۱- ریز جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*

رشته‌های *اسپیرولینا* متحرک بوده و در طول محور تریکوم به طریق سریدن حرکت می‌کند. رشته‌های اسپیرولینا قادرند در محیط‌هایی که برای اکثر موجودات نامناسب می‌باشد کلونیزه شوند و در آب‌های شیرین، دریاچه‌های شور، اکثر محیط‌های دریایی قلیایی جمعیت‌هایی تشکیل دهند (۲۶). دما وpH، فاکتورهای کلیدی در کشت *اسپیرولینا* در مقیاس وسیع می‌باشند. دمای بهینه برای *اسپیرولینا* در گستره ۳۵-۳۸ درجه سانتی‌گراد بوده وpH مناسب آن بین ۹/۵-۹/۸ میباشد (۱۶). ترکیب پودرهای زیست توده *اسپیرولینا* عمدتاً متشکل از ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین، ۲۰ درصدکربوهیدرات، ۵ درصد چربی، ۷ درصد مواد معدنی و ۳ تا ۶ درصد رطوبت است که باعث می‌گردد به‌عنوان ماده غذایی‌کم‌کالری با میزان چربی‌کم‌ومنبع‌خوب پروتئین محسوب گردد. ریز جلبکهایی همچون *اسپیرولینا پلاتنسیس*و*کلرلا ولگاریس* (*Chlorella vulgaris*) از سوی سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا به عنوان مواد غذایی شناخته شده‌اند(۲۲). پودر اسپیرولینا برای تولید انواع مختلف مواد غذایی مانند سوپها، سس‌ها، پاستاها، اسنک‌ها، نوشیدنی‌های فوری، شکلات‌ها وآبنبات‌ها، آدامس‌ها، ویفر، بیسکوئیت، نان، کیک، آرد غنی‌شده‌باپروتئین‌جلبک‌کاربرددارد‌وهم‌چنین‌در محصولات تخمیری مانند دوغ، پنیر، ماست، توفر و هم‌چنین به شکل قرص‌ها وکپسول‌ها مورد استفاده قرارمی‌گیرد(۲۱). همچنین در محصولات لبنی، شربت یخی، ژل‌ها و مواد آرایشی در ژاپن، تایلند و چین استفاده می‌شود و علی‌رغم استقامت پایین آن به دما و نور سازگاری بیشتری نسبت به *گاردینا و ایندیگو* دارد و رنگ درخشانی به پاستیل و آب‌نبات‌های پوشش‌دار می‌دهد(۶). اسپیرولینا سه نوع رنگدانه دارد کلروفیل که ۱/۷ درصد از ترکیبات آلی سلولی وزن دارد، کاروتنوئید و زانتوفیل‌ها که ۰/۵ درصد وزن مواد آلی را تشکیل می‌دهند و دو نوع فیکوبیلوپروتئین: c فیکوسیانین و آلوفایکوسیانین که ۲۹درصد پروتئین‌های سلولی وچربی‌های غالب در *اسپیرولینا* را شامل می‌شود که ۱/۲ و گالاکتوسیل – دی‌گلیسیریدو فسفاتیدیل – گلیسرول هستند(۸). *اسپیرولینا* دارای مقدار زیادی پروتئین با کیفیت بالا، شامل اسیدهای آمینه ضروری با ضریب هضم بالا، رنگدانه‌هایی از قبیل کاروتنوئیدها و فایکوسیانین، ویتامین‌ها و مواد معدنی از قبیل‌کلسیم و آهن می‌باشد. از خواص سلامت‌بخشی آن، خواص ضد سرطانی، ضد باکتریایی و موثر درآلرژی‌ها، زخم معده، آنمی، مسمومیت فلزات سنگین و مسمومیت ناشی از تشعشعات رادیواکتیو می‌توان نام برد (۱۴). تاکنون تأثیرات درمانی و سلامتی بخش *اسپیرولینا* نظیرکاهش میزان کلسترول‌خون، محافظت در برابر برخی از سرطان‌ها، تقویت سیستم‌ایمنی‌بدن،افزایش *لاکتوباسیلوس*‌های روده، محافظت در برابر تشعشعات و کاهش میزان چربی‌گزارش شده است (۲۳). در مطالعه‌ای تأثیر سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا*

پلاتنسیس (*Platensis Spirulina*) و هیدروکلوئیدهای آگار وگوار روی فعالیت آب، بافت، پارامترهای رنگی و پذیرش کلی پاستیل‌میوه‌ای بر پایه پوره کیوی بررسی گردید و نتایج نشان داد آگار، گوار و *اسپیرولینا* روی پارامترهای رنگی کیوی اثر معنی‌دار و منفی دارند. با افزایش آگار و *اسپیرولینا* در فرمولاسیون، پارامتر صمغی بودن بافت نمونه‌ها به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد. در ارتباط با آنالیز رنگ نمونه‌ها، نتایج حاکی از آن بود که تنها اثر *اسپیرولینا* روی رنگ‌نمونه‌هامعنی‌داربوده‌و افزایش *اسپیرولینا* در فرمولاسیون نمونه‌ها، منجر به‌کاهش پارامتررنگی‌می‌گردد (۱۸). قنبرپور و همکاران (۱۳۹۲) استخراج فایکوسیانین از سیانوباکتری *اسپیرولینا* را مورد مطالعه قرار دادند، روش به کارگرفته شده بر پایه جذب ناخالصی‌ها با استفاده از زغال فعال شده و رزین‌تبادل‌گریونی بود. رنگدانه فایکوسیانین از پودر خشک (بیومس) ریز جلبک‌ها اسپیرولینا با استفاده از حلال سدیم فسفات بافر استخراج شد و خلوص و غلظت فایکوسیانین بررسی شد. فایکوسیانین استخراج شده بیشترین خلوص را دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد از خود نشان داد. با استفاده از نسبت بیومس- حلال ml: ۲g ۵۰ کیفیت و خلوص رنگدانه فایکوسیانین به خوبی نسبت بیومس- حلال ml: ۲g ۷۵ شد. همچنین تأثیر حلال‌های مختلف بر روی استخراج این ماده نشان داد که سدیم فسفات بافر بهترین حلال مورد استفاده است (۲). فرجی و همکاران (۱۳۹۳) در تحقیقی با عنوان بهینه‌سازی کشت فدبچ منابع دو کربنی جدید (اتانول و اسید استیک) در تولید فایکوسیانین بوسیله ریزجلبک *اسپیرولینا* نشان دادند که بهینه شرایط رشد جهت تولید این رنگدانه شامل روش کشت فد بچ، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نور۵ کیلولوکس و منبع کربنی‌گلوکز (میلی‌لیتر بر لیتر) است که به حداکثر تولید فایکوسیانین (۴۳/۹۴) منجرشد. همچنین نور به عنوان مهمترین فاکتور مؤثر بر تولید رنگدانه پروتئینی مد نظر قرار گرفت. دما، روش کشت و نوع منبع کربنی به ترتیب‌دردرجه‌های‌بعدی‌اهمیت قرار داشتند(۱). مدهایستیها وهمکاران (۲۰۰۷) بررسی در *اسپیرولینا فوزی فورمیس* بر منابع نوری مختلف و در رنگدانه‌های مهم‌آن انجام دادند. در این آزمون سامانه کشت مداوم در بیوراکتور به‌کارگرفته شد. کشت با مایه تلقیح اولیه ۰/۲گرم بر لیتر در محیط کشت زاروک تحت منابع نوری مختلف انجام شد. حداکثر بهره‌وری بایومس روزانه برای نور سفید، نور آبی و نور سبز به‌ترتیب ۰/۸، ۰/۷۵ و ۰/۶۹گرم بر لیتر به دست آمد. تحت نور سفید حداکثر مقدار کلروفیل ۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. در حالی‌که دیگر رنگدانه‌ها تغییر چشم‌گیری نشان ندادند (۲۰). همچنین گوویا و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادندکه‌قابلیت‌ترکیب‌توده زیستی ریزجلبک‌ها با سامانه‌های غذایی مشروط به نوع فرآیند به کار برده شده و شدت آن (مثل فرآیندهای حرارتی و مکانیکی) و طبیعت غذا (مثل امولسیون، ژل، سامانه‌های خمیری هوادهی شده) و همچنین واکنش‌های بین ترکیبات غذایی(پروتئین، پلی‌ساکارید، لیپیدها، قندها و نمک‌ها) می‌باشد. در کنار خواص رنگ-زایی و اهداف تغذیه‌ای، ترکیب ریزجلبک‌ها با غذاها ممکن است تغییرات معنی‌داری در خواص ریز ساختاری و رئولوژیکی غذاها ایجاد نماید (۱۳). هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی عوامل مختلف (مقدار، منبع کربنی، روش کشت، دما و شدت نور) بر تولید فایکوسیانین با بازدهی بالا توسط ریز جلبک *اسپیرولینا* پلاتنیس بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه محیط کشت

برای‌جلبک‌سبز-آبی تهیه شده قبل از هر مرحله از آزمایش، تجهیزات استریل‌سازی شامل آون و دستگاه اتوکلاو برای جلوگیری از بروز آلودگی آماده شد. محیط کشت آماده شده بر اساس محیط‌کشت سچلوسر با کمی تغییرات تهیه شد(۳). محیط کشت‌مذکور شامل دو محلول ۱ و ۲ (محلول اول به دلیل وجود ترکیبات بی‌کربنات سدیم وکربنات سدیم به شدت قلیایی بوده که منجر به تخریب ترکیبات مغذی موجود در محلول دوم می‌گردند) بود. محلول ۱که حاوی ۱۳/۶۱گرم‌بی‌کربنات‌سدیم، ۴/۰۳ گرم کربنات سدیم، ۰/۵گرم‌فسفات پتاسیم و محلول ۲ شامل ۱/۰۰ گرم سولفات پتاسیم، ۰/۲۰گرم سولفات منیزیم هفت‌آبه، ۰/۰۴ گرم کلرید کلسیم دو آبه، ۰/۰۱گرم EDTA بود که پس از ساخت در

حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر دو محلول با هم مخلوط شده و محلول نهایی به دست آمد. به هر لیتر از محیط کشت ۱میلی لیتر محلول از قبل آماده شده عناصر معدنی و محلول ویتامین B_{12} اضافه شد. به منظور اعمال متغیرها در محیط کشت، سه نوع‌منبع کربنی‌حاوی۱/۰۰گرم بر میلی‌لیتر گلوکز، ۰/۷۹گرم بر میلی لیتر اتانول و ۱/۰۵گرم بر میلی‌لیتر اسید استیک به محلول اضافه شد. به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر جلبک به محیط کشت اضافه شد (۲۵).

۲-۲- بررسی تأثیر شدت نور

رشد جلبک‌ها تحت تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط مانند شدت و دوره نور است. بنابراین جهت کشت بهینه جلبک‌ها، تنظیم فاکتورهای محیطی ضروری است. کمیت و کیفیت نور بر روند رشد و متابولیسم جلبک‌ها تأثیر دارد. تغییر در کمیت نور به واسطه تغییر در ترکیب رنگدانه‌های سلولی می‌تواند در روند رشد مؤثر باشد (۱۱). نور به عنوان یک عامل محدودکننده رشد باید به‌طور مناسب تنظیم شود. برای رشدگونه‌های مختلف دامنه نوری خاصی مورد نیاز است. هرگاه میزان نور دریافتی توسط جلبک کمتر از دامنه تحمل‌آن باشد، جلبک قادر به کسب انرژی لازم و عمل فتوسنتز نخواهد بود و در شدت نور بالاتر از این آستانه ترکیبات سلولی به ویژه رنگدانه‌های جمع‌کننده نور دچار آسیب و فتوسنتز متوقف می‌شود (۵). در این پژوهش محیط کشت آماده شده تحت نور و هوادهی کنترل شده در شدت نور ۲ و ۳/۵ کیلولوکس قرارگرفت و رشد جلبک آغاز شد. کنترل شدت نور توسط لوکس‌متر و هوادهی توسط پمپهای هوادهی‌انجام‌گردید. درطول‌مدت کشت دمای محیط توسط دماسنج کنترل و میزان آن بین ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید (۲۴).

۲-۳- بررسی تأثیر دما

در این پژوهش شرایط نگهداری محیط کشت در دو دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

۲-٤- بررسی تاثیر افزودن منبع کربنی

خوراک دهی منبع‌کربنی به دو روش بچ (Batch) و فیدبچ (Fed Batch) صورت گرفت. در روش بچ، منبع‌کربنی در روز صفر به‌طورکامل به محیط کشت اضافه گردید. ولی در روش فدبچ، خوراک‌دهی به صورت لگاریتمی در روزهای صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ صورت گرفت. کل دوره کشت ۱۴ روز بوده که خوراک‌دهی در این روش با فاصله ۲ روز انجام گرفت (۲۴).

۲-۵- اندازه‌گیری فایکوسیانین

جلبک‌رشدیافته‌در محیط کشت پس از رسیدن به فاز سکون به‌روش‌پمپ خلاء از محیط کشت جداسازی و در انکوباتور دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. بعد از خشک شدن ۴۰ میلی‌گرم از اسپیرولینا با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات(۱۰۰میلی‌مولار و pH=۳ مخلوط و کاملاً یکنواخت گردید (۲۶). نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۴ ساعت نگهداری گردید و سپس با دور RPM ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در آخر فاز رویی را جدا کرده و با دستگاه اسپکتروفتومتری میزان جذب در طول موج ۶۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد فایکوسیانین از رابطه (۱) محاسبه گردید (۱۲).

رابطه (۱)

$$\text{Phycocyanin (\%)} = \frac{A615 \cdot ma \cdot 100}{3.36(mg\,sample)\,(\%\,dry\,wt)}$$

Na= تعداد رقت‌ها

۲-٦- تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل اطلاعات مطابق با طرح فاکتوریل با استفاده از نرم‌افزارآماریspss نسخه۲۲بر اساس آنالیز خطی عمومی (GLM) در سطح احتمال P< ۰/۰۵ و مقایسه میانگین ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفته است. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزارExcel نسخه ۲۰۱۶ رسم گردیدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی اثر منبع کربنی، روش کشت، دما و شدت نور بر میزان تولید رنگدانه فایکوسیانین از جلبک سبز

جدول۱، نتایج مربوط به میزان تولید فایکوتوکسین ازجلبک سبزآبی را در شرایط روش کشت (مداوم و غیرمداوم)، نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول، اسید استیک)، شدت نور(۲ و ۳/۵ کیلولوکس) و دما (۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) را نشان می‌دهد.

جدول۱- تیمارهای مورد استفاده در آزمایش بر حسب روش آزمون، نوع منبع کربنی، شدت نور و دما

آزمایش	روش افزودن	نوع منبع کربنی	شدت نور (کیلولوکس)	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱	غیر مداوم	گلوکز	۲	۲۸
۲	غیر مداوم	اتانول	۲	۲۸
۳	غیر مداوم	اسید استیک	۲	۲۸
٤	غیر مداوم	گلوکز	۲	۳۸
٥	غیر مداوم	اتانول	۲	۳۸
٦	غیر مداوم	اسید استیک	۲	۳۸
۷	غیر مداوم	گلوکز	۳/٥	۲۸
۸	غیر مداوم	اتانول	۳/٥	۲۸
۹	غیر مداوم	اسید استیک	۳/٥	۲۸
۱۰	غیر مداوم	گلوکز	۳/٥	۳۸
۱۱	غیر مداوم	اتانول	۳/٥	۳۸
۱۲	غیر مداوم	اسید استیک	۳/٥	۳۸
۱۳	مداوم	گلوکز	۲	۲۸
۱٤	مداوم	اتانول	۲	۲۸
۱٥	مداوم	اسید استیک	۲	۲۸
۱٦	مداوم	گلوکز	۲	۳۸
۱۷	مداوم	اتانول	۲	۳۸
۱۸	مداوم	اسید استیک	۲	۳۸
۱۹	مداوم	گلوکز	۳/٥	۲۸
۲۰	مداوم	اتانول	۳/٥	۲۸
۲۱	مداوم	اسید استیک	۳/٥	۲۸
۲۲	مداوم	گلوکز	۳/٥	۳۸
۲۳	مداوم	اتانول	۳/٥	۳۸
۲٤	مداوم	اسید استیک	۳/٥	۳۸

۳-۲-بررسی‌اثرمنبع کربنی(در شدت نور ۲ کیلولوکس، دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش غیرمداوم) بر میزان تولید فایکوسیانین

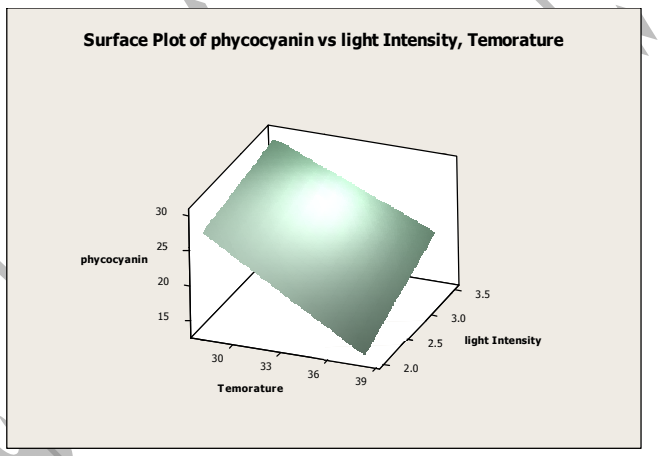
در جدول (۲) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش غیر مداوم نشان داده شده است. با استفاده از منبع کربنی‌گلوکز با افزایش دما از ۲۸ درجه سانتی‌گراد به ۳۸ درجه سانتی‌گراد میزان تولیدفایکوسیانین کاهش‌پیداکرد.دردمای۲۸ درجه‌سانتی‌گراد میزان فایکوسیانین ۳۲/۱۴ درصد بود که در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد مقدار آن به ۹/۴۸ درصد رسید. با استفاده از منبع کربنی اتانول و اسید استیک نیز وضعیت مشابه رخ داد و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش یافت. نتایج نشان‌دادکه هرسه منبع‌دردمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر تولید فایکوسیانین را دارا بود و افزایش دما اثر ممانعت کننده بر تولید فایکوسیانین داشت، زیرا که دما با تأثیر بر

غلظت نیترات سدیم و کاهش آن در محیط کشت بر تولید فایکوسیانین تأثیرگذار بوده است. غلظت نیترات سدیم در محیط کشت تأثیرمعنی‌داری بر تولید پروتئین، لیپید و ترکیبات فنولی دارد. زیرا که با کاهش غلظت نیترات سدیم پروتئین و لیپید سلول کاهش می‌یابد. در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با افزایش غلظت نیتروژن مقدار ترکیبات فنولی نیز افزایش می‌یابد، بنابراین به‌طور خلاصه دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد تأثیر خوبی بر تولید پروتئین، لیپید و ترکیبات فنولی داشت. ولی اثر چندان مناسبی بر تولید توده سلولی نخواهد داشت (۹).

جدول۲- مقایسه فایکوسیانین در شدت نور۲ کیلولوکس، دماهای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش غیر مداوم

منبع کربن	۲ کیلولوکس	
	۲۸ درجه سانتی‌گراد	۳۸ درجه سانتی‌گراد
گلوکز	۳۲/۱٤ ± ۱/۰٤ [a]	۹/٤۸ ± ۱/۰۲ [c]
اتانول	۲۹/۱۱ ± ۰/۷۸ [b]	۱۵/۷۹ ± ۰/۸۷ [a]
اسید استیک	۲۳/۷۲ ± ۰/٦۳ [c]	۱۳/۹۳ ± ۰/۳٤ [b]

* اعداد (انحراف معیار ± میانگین) دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (P<۰/۰۵).



شکل۲- بررسی متقابل اثرات درجه حرارت و شد نور در روش غیر مداوم بر درصد فایکوسیانین

مقایسه سه منبع کربنی در روش غیر مداوم و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که گلوکز (۳۲/۱۴) بیشترین تولید فایکوسیانین را داشت و اتانول (۲۹/۱۱) رتبه دوم و اسید استیک (۲۳/۷۲) رتبه سوم را به خود اختصاص داد. مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهدکه اتانول (۱۵/۷۹) بیشترین تولید فایکوسیانین و اسید استیک (۱۳/۹۳) رتبه دوم وگلوکز (۹/۴۸) کمترین تولید را داشتند. مطابق با نتایج مندرج در شکل (۳) افزایش دما تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شدت ۳/۵ کیلولوکس حداکثرتولیدفایکوسیانین‌مشاهده گردید. بهرامی و همکاران (۲۰۲۰) با بهینه‌سازی تولید و استخراج فایکوسیانین از توده زیستی مرطوب آنابنا دولیولوم، نتیجه گرفتند که میزان رشد، میزان تولید رنگدانه و همچنین شرایط بهینه استخراج در هر گونه وابسته به عوامل مختلفی از جمله زمان، دما، حلال انتخابی و نسبت بیومس به حلال است (۴). بنابراین در روش غیر مداوم در شدت نور ۲ کیلولوکس با افزایش دما از ۲۸ به ۳۸ درجه سلسیوس تولید فایکوسیانین در گلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش پیدا کرد.

یعنی درگلوکز اثر بازدارندگی افزایش دما بسیار مشهود بود که این‌موضوع با نتایج تحقیقات قنبرپور و همکاران (۱۳۹۲) مطابقت دارد (۲). در همین راستا رنگل و همکاران (۲۰۰۴) به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها اثر نور ۲ و ۵ کیلولوکس در میزان رشد و تولید فایکوسیانین از جلبک اسپیرولینا را مورد بررسی قرار دادند. با توجه به نتایج به دست آمده نور به عنوان مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر رشد سلولی و میزان تولید فایکوسیانین‌مشخص‌شد (۱۰). چن و همکاران (۱۹۹۶) با مطالعه‌ای که بر روی جلبک *اسپیرولینا* داشتند به این نتیجه رسیدند که درکشت با روش فتوتروف با افزایش نور از ۲ به ۴ کیلولوکس مقدار تولید فایکوسیانین افزایش یافت. زمانی که شدت نور به ۲کیلولوکس یا کمتر تقلیل پیدا کرد. بیشترین‌مقدارفایکوسیانین‌در شدت نور۴کیلولوکس بهدست آمد (۷).

۳-۳-بررسی‌اثرمنبع‌کربنی(در شدت نور ۲ کیلولوکس، دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش مداوم) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

در جدول (۳) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۲۸ و۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش مداوم نشان داده شده‌است. با استفاده‌ازمنبع‌گلوکزدردمای۲۸ درجه سانتیگراد میزان فایکوسیانین ۳۲/۹۱ درصد بود که در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گرادمقدارآن به۱۰/۴۱ درصدکاهش یافت. در استفاده از منبع‌کربنی اتانول و اسید استیک، نیز وضعیت به همین منوال بود و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش یافت. در روش مداوم در شدت نور ۲ کیلولوکس هر سه منبع‌دردمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند. مقایسه سه منبع کربنی در روش مداوم و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که گلوکز (۳۲/۹۱) بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول (۲۴/۸۲) و اسید استیک (۲۱/۲۱) رتبه دوم و سوم را به خود اختصاص دادند. لذا می‌توان گفت که منبع اسیداستیک باکاهش pH سبب کاهش تولید فایکوسیانین خواهد شد (۱۵, ۱۷).

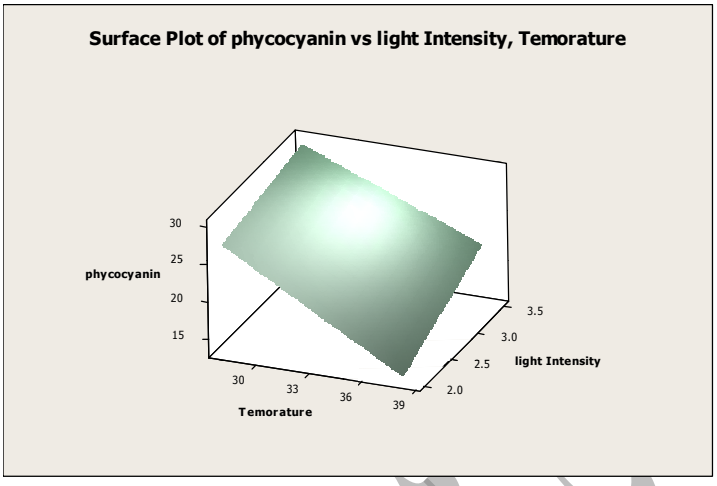
جدول۳- مقایسه فایکوسیانین در شدت نور ۲ کیلولوکس، دماهای ۲۸ و ۳۸ درجه سلسیوس و روش مداوم

منبع کربن	۲ کیلولوکس	
	۲۸ درجه سانتی‌گراد	۳۸ درجه سانتی‌گراد
گلوکز	۳۲/۹۱ ± ۱/۳۱ [a]	۱۰/٤۱ ± ۰/۸۲ [c]
اتانول	۲٤/۸۲ ± ۰/۸۲ [b]	۱٤/۹۰ ± ۰/۷۱ [a]
اسید استیک	۲۱/۲۱ ± ۰/٦۱ [c]	۱۷/۳۱ ± ۰/٤۳ [b]

* اعداد (انحراف معیار ± میانگین) دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (P<۰/۰۵).

مقایسه سه منبع کربنی در روش مداوم و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که اسید استیک (۱۷/۳۱) بیشترین تولید فایکوسیانین،اتانول(۱۴/۹۰)رتبه‌دوم‌وگلوکز(۱۰/۴۱) کمترین تولید را دارا بودند. در نهایت نتیجه گرفته شد که در روش مداوم با افزایش دما از ۲۸ درجه سانتی‌گراد به ۳۸ درجه سانتی‌گراد تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز و اتانول نسبت به اسید استیک با سرعت بیشتری کاهش یافت و استفاده از گلوکز، افزایش دما اثر ممانعت‌کننده بیشتری نسبت به سایر منابع کربنی داشت. بررسی‌های مختلف در خصوص رشد *اسپیرولینا* و و تولید فایکوسیانین نشان می‌دهد که عوامل مؤثر بر رشد و تولید فایکوسیانین در *اسپیرولینا* پلاتنسیس عبارتند از نور، سوبسترای کربنی و نیتروژن. البته pH، هوادهی، نمک‌مهم‌ترین عوامل مؤثر بر رشد *اسپیرولینا* و تولید فایکوسیانین نور و سوبستراهای کربنی و نیتروژنی است. گلوکز و ملاس از سوبستراهای‌کربنی هستند که می‌توانند برای رشد *اسپیرولینا* مورداستفاده قرارگیرند. مطابق با نتایج مندرج در شکل (۳) با افزایش هم‌زمان دما تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نور تا ۳/۵ کیلولوکس حداکثر

تولید فایکوسیانین مشاهده گردید. بررسی‌ها نشان داد که نتایج آزمون‌های روش مداوم مشابه روش غیرمداوم بود و با استفاده از هرسه‌منبع کربنی‌افزایش دما تأثیر جدی در کاهش رنگدانه فایکوسیانین داشت و هر سه منبع کربنی در روش مداوم همانند روش غیرمداوم در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر تولید فایکوتوکسین را داشتند و مقایسه سه منبع کربنی در روش غیرمداوم و مداوم نشان داد که حداکثر تولید فایکوتوکسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود و این دما به‌عنوان دمای مناسب جهت تولید مشخص گردید.

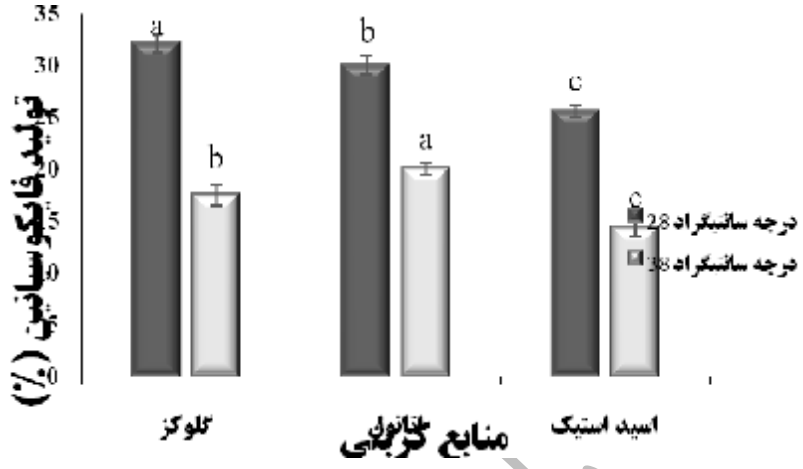


شکل۳- بررسی متقابل اثرات درجه حرارت و شد نور در روش مداوم بر درصد فایکوسیانین

مقایسه نتایج با استفاده از منبع کربنی‌گلوکز در دو روش کشت نشان داد که میزان تولید فایکوتوکسین در روش مداوم در مقایسه با غیرمداوم بالاتر بود و با توجه به این که تغذیه بافت سلولی به طور یکنواخت و مداوم صورت می‌گیرد (۲)، روش مداوم به عنوان روش مناسب‌تری جهت تولید مشخص شد. همچنین نتایج کلی شکل(۲) نشان داد که دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و منبع کربنی گلوکز شرایط مناسب جهت تولید فایکوتوکسین از جلبک *اسپیرولینا* داشتند.

۳-٤-بررسی‌اثرمنبع کربنی(درشدت‌نور۳/۵ کیلولوکس، دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش غیرمداوم) بر میزان تولید فایکوسیانین

در شکل (۴) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش غیر مداوم نشان داده شده است. با استفاده از منبع گلوکز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد میزان فایکوسیانین ۳۳/۱۹ درصد بود که در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد مقدار آن به ۱۷/۵۱ درصد رسید. استفاده از منبع کربنی اتانول و اسید استیک، نیز وضعیت به همین منوال بود و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش‌یافت. در روش‌غیرمداوم‌درشدت‌نور ۳/۵ کیلولوکس هر سه منبع در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند.

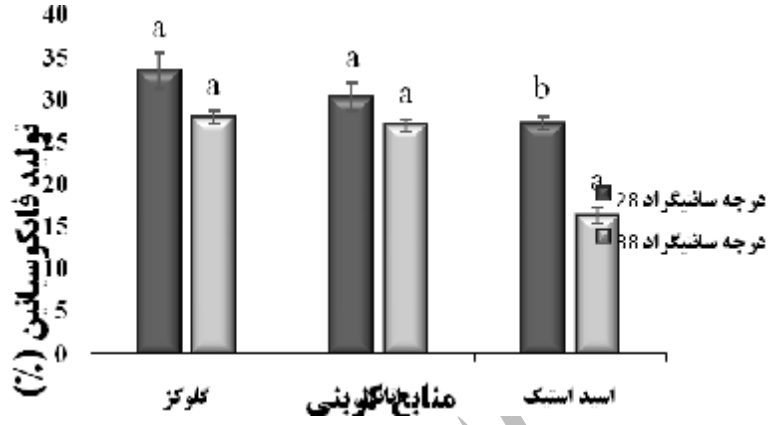


شکل٤- مقادیر تولید فایکوسیانین(٪) در حضور منابع کربنی مختلف و در محیط کشت غیرمداوم

فرجی و همکاران در سال ۱۳۹۳ گزارش کردند که دمای ۳۰درجه‌سانتی‌گراددرنور۳/۵کیلولوکس مانند ۲ کیلولوکس دمای خوبی جهت تولید رنگدانه فایکوسیانین می‌باشد (۱). در مطالعه‌ای که توسط کولا و رینهر (۲۰۰۷) انجام گرفت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای مناسب جهت تولید رنگدانه فایکوسیانین مشخص شد که به نتایج آزمایش انجام شده در پژوهش حاضر نزدیک است و همخوانی دارد (۹). مقایسه سه منبع کربنی در روش غیرمداوم و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که گلوکز (۳۳/۱۹) بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول (۳۰/۱۵) و اسید استیک (۲۵/۶۴) رتبه دوم و سوم را به خود اختصاص دادند. مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که اتانول (۲۰/۰۹) بیشترین تولید فایکوسیانین، گلوکز (۱۷/۵۱) رتبه دوم و اسید استیک (۱۴/۳۲) کمترین تولید را دارا بودند. در نهایت نتیجه گرفته شد که در روش غیرمداوم با افزایش دما از۲۸درجه‌سانتی‌گرادبه۳۸درجه‌سانتی‌گرادتولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز و اسید استیک نسبت به اتانول با سرعت بیشتری کاهش یافت و استفاده از گلوکز، افزایش دما اثر ممانعت کننده بیشتری نسبت به سایر منابع کربنی داشت.

۳-۵- بررسی اثر منبع کربنی (در شدت نور ۳/۵ کیلولوکس، دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش مداوم) بر میزان تولید فایکوسیانین

در شکل (۵) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد و روش مداوم نشان داده شده است. با استفاده از منبع گلوکز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد میزان فایکوسیانین ۳۳/۴۱ درصد بود که در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد مقدار آن به ۲۷/۹۲درصدکاهش یافت. استفاده از منبع کربنی اتانول و اسید استیک نیز وضعیت به همین منوال بود و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش یافت. در روش مداوم در شدت نور ۳/۵ کیلولوکس هر سه منبع در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند. مقایسه سه منبع کربنی در روش مداوم و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که گلوکز (۳۳/۴۱) بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول (۳۰/۸۳) و اسید استیک (۲۷/۱۹) رتبه دوم و سوم را به خود اختصاص دادند. مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که گلوکز(۲۷/۹۲) بیشترین تولید فایکوسیانین، اتانول (۲۷/۷۰) رتبه دوم و اسید استیک (۱۶/۳۴) کمترین تولید را دارا بودند. اختلاف معنی‌داری بین مقدار تولید فایکوسیانین از منبع کربنی گلوکز و اتانول وجود نداشت. در نهایت نتیجه گرفته شد که در روش مداوم با افزایش دما از۲۸درجه‌سانتی‌گرادبه۳۸درجه‌سانتی‌گرادتولید فایکوسیانین با استفاده از اسید استیک نسبت به گلوکز و اتانول با سرعت بیشتری کاهش یافت.



شکل۵- مقادیر تولید فایکوسیانین(٪) در حضور منابع کربنی مختلف و در محیط کشت مداوم

چن وهمکاران در سال ۱۹۹۶ تأثیر سوبسترای کربنی و شدت نوررابر رشد و تولید فایکوسیانین توسط *اسپیرولینا پلاتنسیس* درکشت‌فتوهتروتروف‌بررسی کردند.غلظت گلوکز و استات در محیط به ترتیب از ۰ تا ۱۰گرم بر لیتر و ۰ تا ۵ گرم بر لیتر متغیربود. در حالی‌که غلظت بی‌کربنات ۱۶/۸گرم بر لیتر که به عنوان کنترل استفاده شد (۷). نتایج حاصل از این بررسی نشان‌دادکه‌گلوکز و استات رشد سلولی و تولید فایکوسیانین را تقویت می‌کند. اما گلوکز نسبت به استات برتری داشت. رشد ویژه جلبک با سوبسترای‌گلوکز ۲/۵ گرم‌برلیتر وبه طور ویژه‌ای با افزایش نورتا ۲ کیلولوکس افزایش پیدا کرد. افزایش بیشتر نور تا ۴ کیلولوکس تنها باعث افزایش اندکی درسرعت‌ویژه‌رشد شد. در شدت نور بیشتر از ۴ کیلولوکس مهار نوری در رشد بوجود آمد. نتایج این تحقیق با تحقیقات چن مطابقت دارد از آن‌جایی‌که گلوکز تولید فایکوسیانین راتقویت‌می‌کند.درپژوهش چن، بیشترین مقدار فایکوسیانین در شدت نور ۴ کیلولوکس به‌دست آمد. زمانی که شدت نور به ۲ کیلولوکس یا کمتر تقلیل می‌یابد، غلظت گلوکز بهینه برای تولید بیومس از ۲/۵ گرم بر لیتر به ۵ گرم بر لیتر افزایش می‌یابد. شدت نور بالاتر برای تولید فایکوسیانین و فایکواریتین در اسپیرولینا بهتر است (۲۰).

٤- نتیجه‌گیری

ریزجلبک‌ها به دلیل تعادل ترکیبات شیمیایی، منابع زیستی مهمی برای تولید محصولات وکاربردهای جدید بوده و می‌توانند به عنوان بهبود دهنده ارزش تغذیه‌ای غذاها و خوراک دام مورد استفاده قرارگیرند. آن‌ها حاوی مواد ارزشمند مانند اسیدهای چرب غیراشباع، رنگدانه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات دارویی و دیگر ترکیبات فعال زیستی هستند. از میان بسیاری از ترکیبات مغذی حاصل از ریزجلبک‌ها، رنگدانه‌ها به دلیل کاربرد زیاد و استخراج آسان، اهمیت تجاری رو به رشدی یافته‌اند. در حال حاضر تولید تجاری بسیاری از رنگدانه‌ها از منابع غیرطبیعی است. به دلیل اثرات سمی‌گزارش شده از رنگ‌های سنتتیک، دلایل مختلفی برای استفاده از رنگ‌های طبیعی در مصارف دارویی و غذایی وجود دارد. لذا افزایش قابل توجهی در تمایل به جایگزینی رنگدانه‌های سنتزی با رنگ‌های طبیعی وجود دارد. *اسپیرولینا پلاتنسیس* به دلیل محتوای پروتئین و رنگدانه‌های فایکوسیانین و فایکواریترین زیاد، برای غنی-سازی مواد غذایی قابل استفاده است. مرور مقالات گزارش شده در خصوص رشد *اسپیرولینا* و تولید فایکوسیانین نشان می‌دهد که عوامل موثر بر رشد و تولید فایکوسیانین در *اسپیرولینا* پلاتنسیس عبارتند از نور و سوبسترای کربنی و نیتروژن. البتهpH، هوادهی، نمک مهم‌ترین عوامل مؤثر بر رشد *اسپیرولینا* و تولید فایکوسیانین نور و سوبستراهای کربنی و نیتروژنی است. گلوکز و ملاس از سوبستراهای کربنی هستند که می‌توانند برای رشد اسپیرولینا مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه سوبسترای نیتروژنی تأثیر بیش‌تری بر رشد *اسپیرولینا* دارد. اوره از سوبستراهای نیتروژنی ارزان

قیمتی است که غلظت مشخصی از آن باعث بهبود رشد و نیز تولید رنگدانه در *اسپیرولینا* پلاتنسیس می‌شود. در این پژوهش به بررسی اثر منبع کربنی(گلوکز، اتانول، اسید استیک)، روش کشت (مداوم و غیر مداوم)، دما (۲۸ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و شدت نور (۲ و ۳/۵ کیلولوکس) بر میزان تولید رنگدانه فایکوسیانین از جلبک سبز آبی پرداخته شد. بررسی‌ها نشان داد که نتایج آزمون‌های روش مداوم مشابه روش غیر مداوم بود و با استفاده از هر سه منبع کربنی، افزایش‌دما تأثیر جدی درکاهش رنگدانه فایکوسیانین داشت و هر سه منبع کربنی در روش مداوم همانند روش غیر مداوم درشدت نور۳/۵ کیلولوکس و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند. منبع کربنی‌گلوکز و روش‌مداوم‌به‌عنوان‌روش‌مناسب‌تری‌جهت تولید فایکوسیانین مشخص شد.

۵- منابع

۱. فرجی د، رضایی ک ا، کلانتری م، هاشمی روان م، گل مکانی م، فرجی ن. بهینه‌سازی شرایط مختلف (دما، تغییر شدت نور، روش‌های کشت (غیرمداوم و نیمه مداوم) و نوع منبع کربنی) برای تولید حداکثر فایکوسیانین توسط ریز جلبک *اسپیرولینا* پلاتنسیس (*Arthrospira platensis*). *علوم‌غذایی و تغذیه*. ۱۳۹۳;۱۲(۱): ۹۱-۹۹.

۲. قنبرپور ف. بهینه‌سازی شرایط کشت ریزجلبکها و روش استخراج انتخابی برای تولید رنگدانه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. ۱۳۹۲; وزارت علوم، تحقیقات و فناوری - دانشگاه خلیج فارس - دانشکده مهندسی.

3. Andrade MR, Costa JA. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*. 2007; 264 (1-4):130-4.
4. Bahrami A, Zolghadri S, Deilami E. Optimization of the production and extraction of phycocyanin from the Anabaena doliolum wet biomass. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):209-15.
5. Bercel TL, Kranz SA. Effects of spectral light quality on the growth, productivity, and elemental ratios in differently pigmented marine phytoplankton species. bioRxiv. 2020.
6. Cerreti M, Liburdi K, Del Franco F, Esti M. Heat and light stability of natural yellow colourants in model beverage systems. Food Additives & Contaminants: Part A. 2020; 37(6): 905-15.
7. Chen F, Zhang Y, Guo S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. Biotechnology letters. 1996;18(5):603-8.
8. Choonawala BB. *Spirulina* production in brine effluent from cooling towers 2007.
9. Colla LM, Reinehr CO, Reichert C, Costa JAV. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource technology. 2007;98(7):1489-93.
10. De Oliveira Rangel-Yagui C, Danesi EDG, de Carvalho JCM, Sato S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresource technology. 2004; 92(2): 133-41.
11. Del Pilar Sánchez-Saavedra M, Maeda-Martínez AN, Acosta-Galindo S. Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. Journal of applied phycology. 2016; 28(2): 839-847.
12. Fayyad RJ, Ali A, Dwaish AS, Abboodi A. Anti cancer activity of *Spirulina platensis* methanolic extracts against L20B and MCF7 human cancer cell lines. Plant Arch. 2019; 19(1):1419-26.
13. Gouveia L, Raymundo A, Batista AP, Sousa I, Empis J. Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. European Food Research and Technology. 2006;222(3):362-7.
14. Gupta M, Dwivedi UN, Khandelwal S. C- Phycocyanin: an effective

protective agent against thymic atrophy by tributyltin. Toxicology Letters. 2011; 204(1):2-11.
15. Han F, Huang J, Li Y, Wang W, Wan M, Shen G, et al. Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO2. Bioresource technology. 2013;136:418-24.
16. Helmi-Seresht M ,Saadatmand S, Khavari-Nejad R. Effects of light intensity and pH on the growth rate, lipid and protein content in *Spirulina platensis*. Applied Biology. 2015; 28(1): 37-50.
17. Juneja A, Ceballos RM, Murthy GS. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. Energies. 2013;6(9):4607-38.
18. Khazai Pool E, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebi M. The effect of different levels of *Spirulina Platensis* micro-algae and agar and guar hydrocolloids on water activity, texture, color parameters and Overall acceptability of kiwi puree-based fruit pastille. Food Science and Technology. 2015; 12(48):47-59.
19. Lewis M. Natural product screening: anti-oxidant screen for extracts. Journal of agricultural and Food Chemistry. 2012;15:3-11.
20. Madhyastha H, Vatsala T. Pigment production in *Spirulina fussiformis* in different photophysical conditions. Biomolecular engineering. 2007; 24(3):301-5.
21. Ohse S, Derner RB, Ozório RÁ, Corrêa RG, Furlong EB, Cunha PCR. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. Idesia. 2015, 33(1): 93-101.
22. Rashmi B. A review on *spirulina* (*Arthrospira Platensis*) for its antioxidant and neuroprotective effect. IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology. 2020; 4(4):116-9.
23. Shizhong Liang XL, Chen F, Chen Z, editors. Current microalgal health food R & D activities in China. Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges: Proceeding of The Second Asian Pacific Phycological Forum, held in Hong Kong, China, 21–25 June 1999; 2012: Springer Science & Business Media.
24. Soletto D, Binaghi L, Lodi A, Carvalho J, Converti A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. Aquaculture. 2005;243(1-4):217-24.
25. Xie Y, Jin Y, Zeng X, Chen J, Lu Y, Jing K. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under phototrophic cultivation. Bioresource technology. 2015; 180: 281-7.
26. Zhu L. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. Biofuels, *Bioproducts and Biorefining* 2015; 9(6): 801-14.

(Original Research Paper)

Optimization of Phycocyanin Production by *Spirulina platensis* Microalgae in Different Conditions of Temperature, Light Intensity, Culture Methods and Type of Carbon Source

Zahra Latifi[1], Habibollah Shahryari[2], Mohammad Hosein Marhamati Zadeh [3],Atefeh Arjmandian [4], Maryam Modamiyan Farshbafi[5], Leila Roozbeh Nasiraie[6*]

1-Young Researchers and elite Club ,Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
2- MS.c. Graduated of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran.
3- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
4- MS.c. Graduated of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
5- MS.c. Graduated of Food Science and Technology, varamin – Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
6- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran.

Received:08/11/2021 Accepted:04/03/2022

Abstract

Nowadays many pigments are commercially produced from unnatural sources. Due to the toxic effects of synthetic colors, there are various reasons for the use of natural colors in pharmaceutical and food applications. Phycocyanin is extracted from the algae of *Spirulina* as a natural pigment with strong antioxidant properties. This microalgae contains unique nutrients and nutritional and therapeutic effects that have been used to enrichment various food products. In this study, the optimal conditions for the production and extraction of phycocyanin pigment from spirulina microalgae were investigated. In this study, the effect of carbon source (glucose, ethanol, acetic acid), culture method (continuous and non-continuous), temperature (28 and 38°C) and light intensity (2 and 3.8 Klux) on the production of phycocyanin pigment from Blue-green algae were examined. Data analysis was performed according to the factorial design using SPSS statistical software at a probability level of 0.05. The results of the continuous method tests were similar to the non-continuous method. Increasing the temperature from 28 to 38°C had a serious effect on reducing the production of phycocyanin pigment and all three carbon sources in the continuous method as the non-continuous method in the light intensity of 3.5 Klux and the temperature of 28°C produced the maximum amount of phycocyanin. The carbon source of glucose in a continuous method with a temperature of 28°C and a light intensity of 3.5 Klux produced 33.41% of the phycocyanin pigment, which was identified as a more appropriate method. In both continuous and non-continuous methods, due to high light intensity, the amount of phycocyanin production was high and these values increased with the addition of glucose carbon source.

Keywords: Protein Pigment, Green-blue Microalgae, Culture Methods, *Spirulina platensis*.

*Corresponding Author: dr.rozbeh_l@yahoo.com