

## بررسی عوامل تاثیرگذار بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید از اسپیرولینا پلاتنسیس با استفاده از طرح پلاکت برمن

سپیده بنایان<sup>۱</sup>، مهشید جهادی<sup>۲\*</sup>، محمد فاضل<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان) دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

\* نویسنده مسئول: [m.jahadi@khuisf.ac.ir](mailto:m.jahadi@khuisf.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۶

### چکیده

اسپیرولینا پلاتنسیس به دلیل اهمیت به عنوان غذای انسان و دارا بودن رنگدانه‌های طبیعی با ویژگی‌های عملکردی خاص، توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است. در این مطالعه، ۷ فاکتور محیطی موثر بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل a و کاروتنوئید از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس شامل: دوره نوردی (۱۲ ساعت روشنائی / ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنائی / ۸ ساعت تاریکی)، مدت کشت (۱۱ روز و ۱۴ روز)، ترکیب نوری (LED) (۶ آبی / ۳ قرمز / ۴ سفید و ۳ آبی / ۶ قرمز / ۴ سفید)، منبع نیتروژن (۶۵ میلی‌گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی بچ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی فدیج)، منبع کربن (۱ گرم در لیتر، شیرهی خرما، به روش خوراک‌دهی بچ و فدیج)، حجم تلقیح اولیه (کدورت: ۰/۴ و ۰/۶) و کلرید سدیم (۰ و ۲ گرم در لیتر) در طرح غربالگری پلاکت برمن به منظور انتخاب متغیرهای تاثیرگذار استفاده گردید. نتایج نشان داد، از بین فاکتورهای مورد بررسی، متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری، دوره نوردی ( $p < 0/01$ ) و حجم تلقیح اولیه، تاثیر معناداری ( $p < 0/05$ ) بر میزان تولید رنگدانه کلروفیل a و متغیرهای منبع نیتروژن، منبع کربن و کلرید سدیم تاثیر معناداری ( $p < 0/01$ ) بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید کل داشتند. همچنین بالاترین میزان تولید رنگدانه کلروفیل a و کاروتنوئید کل به ترتیب  $13/46 \pm 0/9$  و  $8/21 \pm 0/17$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) به دست آمد.

**کلید واژه‌ها:** اسپیرولینا پلاتنسیس، رنگدانه، کلروفیل، کاروتنوئید، طرح پلاکت برمن.

### مقدمه

سویه، عدم وابستگی به تغییرات فصلی و شرایط آب و هوایی می‌باشد. همچنین آنها می‌توانند تحت شرایط کنترل‌شده و در زمان بسیار کمی تولید شوند (Heer & Sharma, 2017; Malik et al, 2012). رنگدانه‌های جلبکی علاوه بر مزایای سلامت‌بخش، دارای ارزش تجاری گسترده‌ای به عنوان رنگ‌های طبیعی در مواد غذایی، مواد آرایشی و دارویی هستند. در حال حاضر، افزایش آگاهی در مورد اثرات مضر ترکیبات و رنگ‌های مصنوعی و تمایل جامعه به سمت استفاده از محصولات طبیعی باعث استفاده و بهره‌برداری از ریزجلبک‌ها به عنوان منبع رنگدانه‌های طبیعی شده است (Kuddus et al, 2013). آرتروسپیرا پلاتنسیس یک سیانوباکتری

رنگ‌های زیستی از منابع بیولوژیک مانند گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها به عنوان منبع رنگدانه‌های طبیعی به دست می‌آیند. این رنگ‌ها دارای خواص مفیدی مانند خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌بیوتیکی، زیست‌تجزیه‌پذیری بوده و کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، چاپ، صنایع نساجی و دارویی دارند. میکروارگانیسم‌ها منبع اصلی رنگدانه‌های طبیعی هستند (Heer & Sharma, 2017). قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها انواع رنگدانه‌های میکروبی را تولید می‌کنند. تولید صنعتی رنگ‌های غذایی طبیعی توسط تخمیر - های میکروبی دارای مزایای متعددی از قبیل: تولید ارزان‌تر، استخراج آسان‌تر، بازده بالاتر از طریق اصلاح

پارامترهای محیطی متفاوتی شامل: تاثیر استفاده از دیودهای نوری تک رنگ (LED ها)، (Lima et al, 2018) شدت نور، دما، غلظت دی اکسید کربن، pH، سطح NaCl (Kumar et al, 2013; Sharma et al, 2014)، افزودن منبع نیتروژنی (Ajayan et al, 2012)، افزودن منبع کربن (Kandasamy & Nagarajan, 2013; Manjunath & Geeta, 2005)، دوره نوردهی (Bouterfas et al, 2006)، حجم تلقیح اولیه (Pelizer et al, 2003) بررسی گردیده است. این تحقیق با هدف انتخاب عوامل تاثیرگذار بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل a و کاروتنوئید از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با استفاده از طرح پلاکت برمن انجام شد. متغیرها هر یک در دو سطح شامل: دوره نوردهی (۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی / ۸ ساعت تاریکی)، مدت کشت (۱۱ روز و ۱۴ روز)، ترکیب نوری (LED) (۶ آبی / ۳ قرمز / ۴ سفید و ۳ آبی / ۶ قرمز / ۴ سفید)، منبع نیتروژن (۶۵ میلی گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی بچ و ۴۰ میلی گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی فدیج)، منبع کربن (۱ گرم در لیتر، شیرهای خرما، به روش خوراک‌دهی بچ و فدیج)، حجم تلقیح اولیه (۰/۴ و ۰/۶ OD) و کلرید سدیم (۰ و ۲ گرم در لیتر) بررسی گردید.

### روش کار

سویه ریزجلبک و کشت اولیه این تحقیق در مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) انجام شد. سویه ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس *APPI* از بانک سلولی دانشگاه تربیت مدرس تهران خریداری شد. کشت تلقیح سویه در محیط کشت زاروک با کمی تغییرات شامل (گرم در لیتر):  $\text{NaHCO}_3$  : ۱۶/۸،  $\text{K}_2\text{SO}_4$  : ۱،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : ۲/۵،  $\text{NaNO}_3$  : ۰/۵،  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : ۰/۲،  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : ۰/۰۴

پروکاریوتیک چندسلولی و رشته‌ای غیرسمی است که معمولاً به عنوان اسپیرولینا شناخته می‌شود. (Pan-utai et al, 2017) گونه‌های اسپیرولینا قرن‌ها به عنوان مواد غذایی توسط جمعیت‌های مختلف استفاده شده است ولی در سال‌های اخیر مجدداً مورد توجه خاصی قرار گرفته اند (Saranraj & Sivasakthi, 2014). ریزجلبک اسپیرولینا، حاوی مقادیر قابل توجهی از ریز مغذی و درشت مغذی‌ها، اسیدهای آمینه‌ی ضروری، پروتئین، لیپید، ویتامین‌ها، مواد معدنی، آنتی‌اکسیدان‌ها و رنگدانه‌های زیادی از جمله کلروفیل a، کاروتنوئید و فایکوبیلی پروتئین‌ها شامل فایکوسیانین و آلوفاکوسیانین است (Soni et al, 2012; Usharani et al, 2017). کاروتنوئیدها معمولاً رنگدانه‌های قرمز، نارنجی یا زرد هستند که از دو حلقه شش کربنه‌ی کوچک تشکیل شده و توسط زنجیره‌ای از اتم‌های کربن به هم متصل می‌شوند. بر اساس ساختار آنها، کاروتنوئیدها به کاروتن‌ها و زانتوفیل‌ها تقسیم می‌شوند. کاروتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی هستند که به عنوان رنگدانه‌های جانبی فتوسنتز در نظر گرفته می‌شوند (Rowan, 1989). کلروفیل‌ها رنگدانه‌های مایل به سبز هستند که شامل یک حلقه پورفیرین با یک یون منیزیم مرکزی بوده و معمولاً یک زنجیره آبگریز طولانی هستند. کلروفیل‌ها رنگدانه‌های اصلی فتوسنتزی و محلول در چربی هستند. انواع مختلفی از کلروفیل وجود دارد: کلروفیل a، b، c و d. فراوانترین نوع کلروفیل‌ها، کلروفیل‌های a و b هستند (Rowan, 1989). اسپیرولینا پلاتنسیس در ترکیبات خود تنها دارای کلروفیل a می‌باشد. این ریزجلبک یکی از بالاترین میزان کلروفیل موجود در طبیعت را داراست که در حدود ۱/۱۵ درصد از زیست توده آن را شامل می‌شود (Danesi et al, 2004). بر اساس این واقعیت‌ها، استفاده از اسپیرولینا پلاتنسیس برای تولید کلروفیل می‌تواند یک جایگزین جالب برای مطالعه در نظر گرفته شود. در پژوهش‌های مختلف

روش افزودن منبع کربنی

یکی از متغیرهای مورد مطالعه در این آزمون افزودن شیر خرمای به عنوان منبع کربنی به میزان ۱ g/l قند در دو سطح بچ و فدبچ به محیط کشت بود. در کشت-هایی که روش افزودن به صورت بچ بود معادل ۱ g/l قند از شیر خرمای تهیه شده، تنها در روز صفر و لحظه قبل از تلقیح به محیط کشت اضافه گردید و در کشت‌هایی که روش خوراک دهی به روش فدبچ بود در روزهای صفر، ۳ و ۷ از کشت، هر بار به میزان معادل ۱ g/l قند از شیر خرمای تهیه شده به محیط کشت اضافه گردید (فرجی و همکاران، ۱۳۹۴).

روش افزودن منبع نیتروژن

در این تحقیق، از اوره به عنوان منبع نیتروژن استفاده گردید که جهت افزودن آن، استوکی از اوره تهیه و استریل گردید. پس از محاسبات بر اساس حجم مورد نظر، اوره در دو سطح بچ و فدبچ به محیط کشت اضافه شد. در این آزمون میزان اوره در حالت بچ معادل ۶۵ mg/l در نظر گرفته شد که تنها در روز صفر و لحظه قبل از تلقیح به محیط کشت اضافه گردید. در حالیکه در روش خوراک دهی به روش فدبچ میزان افزودن اوره معادل ۴۰ mg/l بود که در روزهای صفر، ۳ و ۷ از کشت اضافه گردید (Soletto et al, 2005).

اندازه گیری کلروفیل a و کاروتنوئید کل

استخراج این رنگدانه ها با متانول ۹۹/۸ درصد ۷/۷ انجام گرفت. ابتدا ۲ میلی لیتر از کشت، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی حذف گردید و ۱ میلی لیتر متانول به رسوب اضافه و به خوبی مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شد (Deamici et al, 2018). پس از آن، جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. اجرای این مرحله و خواندن در اسپکتروفتومتر در محیط تاریک انجام گرفت تا از تخریب رنگدانه ها توسط

Na<sub>2</sub>EDTA : ۰/۰۸ : ۰/۰۱ : FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O انجام شد و ۱ میلی لیتر از هر یک از محلول‌های ریزمغذی A و B به هر لیتر از محیط کشت افزوده شد. محلول A شامل (گرم در لیتر): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : ۲/۸۶، MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O : ۱/۸۰، MoO<sub>3</sub> : ۰/۰۱، ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : ۰/۲۲، CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O : ۰/۰۸ و محلول B (گرم در لیتر): NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> : ۲۲/۹۰، NiSO<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O : ۴۷/۸۰، NaWO<sub>4</sub> : ۱۷/۹۰، Ti<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> : ۴۰، Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O : ۴/۴۰ بود (Shi et al., 2016). محیط کشت در pH = ۹/۸ تنظیم گردید. از سویه ریزجلبک خریداری شده در شرایط کاملا استریل به میزان مناسب در محیط کشت تلقیح گردید تا جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری (UNICO2100، آمریکا) در طول موج ۵۶۰ نانومتر به ۰/۴ برسد. سپس نمونه به مدت ۱۱ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تحت نوردهی مناسب و هم‌زدن قرار گرفت.

تلقیح و شرایط کشت

از نمونه رشد یافته، برای تلقیح آزمون‌های اصلی استفاده گردید. آزمایش در ظروف ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۵۰ میلی لیتر محیط کشت زاروک استریل با pH = ۹/۸ انجام شد. پس از خنک شدن محیط کشت، تلقیح مطابق با آرایه‌های طرح پلاکت بر من<sup>۱</sup> جدول ۲، انجام گردید و متغیرهای مربوط به هر آزمایش بر روی آن نمونه اعمال شد. شدت نور به میزان ۱ μmol/m<sup>2</sup>/s<sup>-1</sup> و دمای محیط بر روی ۳۰±۲ درجه سلسیوس تنظیم شد و نمونه ها بر روی شیکر با دور ۱۰۰ rpm قرار گرفتند. متغیرهای منبع نیتروژن (اوره) و کربن (شیره خرما) در مقادیر و زمان مورد نظر در دو سطح بچ و فدبچ به محیط کشت اضافه شدند.

اکسیداسیون جلوگیری شود. جذب عصاره‌ها در طول موج‌های خاص و غلظت رنگدانه با استفاده از معادلات توصیف شده توسط لیچنتنالر تعیین شد (Lichtenthaler, 1987). این معادلات با توجه به عدم وجود کلروفیل b در اسپیرولینا پلاتنسیس ساده شده و به معادلات (۱) و (۲)، کاهش یافت (Lima et al, 2018):

معادله (۱)

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ml}) = 16.72 \times \text{OD}_{665.2} - 9.16 \times \text{OD}_{652.4}$$

که در این رابطه  $\text{OD}_{665.2}$  جذب نوری خوانده شده در  $665.2 \text{ nm}$  و  $665/2$  و  $\text{OD}_{652.4}$  جذب نوری خوانده شده در  $652/4 \text{ nm}$  می‌باشد.

معادله (۲)

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/ml}) = (1000 \times \text{OD}_{470} - 1.63 \times \text{Chlorophyll a}) / 221$$

که در این رابطه  $\text{OD}_{470}$  جذب نوری خوانده شده در  $470 \text{ nm}$  است.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق ۷ عامل به عنوان عواملی که در پژوهش‌های مختلف بر اثرگذاری آنها تاکید شده بود مورد بررسی قرار گرفت (Lima et al, 2018)

### نتایج

عوامل تاثیرگذار بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با استفاده از طرح پلاکت برمن بررسی و غربالگری شدند. ۱۲ فرمولاسیون با دو تکرار و از ترکیب ۷ عامل بر میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید بررسی شد و نتایج در جدول ۲ نمایش داده شده‌است.

جدول ۱ - متغیرهای مورد بررسی در روش پلاکت برمن و سطوح آنها

حرف نمایشی	متغیرها	واحد	سطح کم (-۱)	سطح زیاد (۱)
A	حجم تلقیح (کدورت)		۰/۴	۰/۶
B	منبع نیتروژنی (اوره)	mg/L	روش خوراک دهی بیج	روش خوراک دهی فدیج
C	منبع کربنی (شیره خرما)	g/L	روش خوراک دهی بیج	روش خوراک دهی فدیج
D	مدت زمان کشت	روز	۱۱	۱۴
E	ترکیب نوری	LED	(۶ آبی، ۳ قرمز، ۴ سفید)	(۳ آبی، ۶ قرمز، ۴ سفید)
F	دوره نوردهی	ساعت	۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی	۱۶ ساعت روشنایی / ۸ ساعت تاریکی
G	کلرید سدیم (NaCl)	g/l	۰	۲

l\_ OD: Optical Density

جدول ۲- نمایش ۱۲ آرایه متعامد بر میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید تولید شده و پیش بینی شده

شماره	A	B	C	D	E	F	G	کلروفیل µg/ml	پیش‌بینی شده	کاروتنوئید µg/ml	پیش بینی شده
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۱/۲۰±۰/۷	۱۱/۴۸	۷/۶۱±۰/۱۴	۷/۶۲
۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۸/۳۳±۱/۵	۸/۱۵	۷/۷۲±۰/۱۹	۷/۶۵
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۹/۲۳±۱/۶	۹/۳۱	۶/۹۵±۰/۱۲	۷/۰۴
۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۰/۶±۰/۱۷	۱۰/۸۷	۷/۲۰±۰/۰۶	۷/۲۶
۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۱/۴۶±۰/۸	۱۱/۶۴	۷/۸۶±۰/۱۴	۷/۹۴
۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۱/۸۶±۱/۹	۱۱/۷۸	۷/۱۹±۰/۱۵	۷/۱۱
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۲/۸۳±۰/۲	۱۲/۴۲	۷/۲۷±۰/۲۲	۷/۲۶
۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۱/۹۵±۱/۲	۱۱/۸۹	۷/۵۸±۰/۰۳	۷/۵۰
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۹/۷۰±۰/۵۵	۹/۹۸	۷/۷۸±۰/۱۶	۷/۸۰
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۳/۴۶±۰/۹	۱۳/۰۷	۸/۲۱±۰/۱۷	۸/۲۱
۱۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۰/۷۱±۰/۵	۱۱/۱۲	۷/۸۸±۰	۷/۹۰
۱۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۷/۴۰±۰/۱۴	۷/۱۰	۷/۸۶±۰/۰۶	۷/۸۵

مدل در سطح احتمال ۱ درصد معنادار است و خطا در عدم برازش معنادار نمی‌باشد ( $p=0/928$ ). همچنین با توجه به نتایج حاصل، ضریب تبیین داده‌ها برابر با ۸۲/۲۰ درصد بود که بیانگر همبستگی نسبتاً خوبی بوده و این مقدار هرچه به عدد ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد تطبیق داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون بیش‌تر بوده و مدل دقت بالاتری دارد. طبق داده‌ها متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری، دوره نوردی در سطح آماری ۱ درصد و متغیر حجم تلقیح (کدورت) در سطح آماری ۵ درصد، تاثیر معناداری بر میزان تولید رنگدانه کلروفیل a داشت. درحالی‌که متغیرهای منبع نیتروژن و مدت کشت در این صفت معنی‌دار نیست.

کلروفیل a با توجه به داده‌های جدول ۲، بیشترین میزان رنگدانه کلروفیل a مربوط به تیمار ۱۰ (حجم تلقیح اولیه کدورت = ۰/۶، منبع نیتروژن: بیج، منبع کربن: بیج، مدت کشت: ۱۱ روز، ترکیب نوری: آبی ۳/۳ قرمز ۱/۶ سفید ۴، دوره نوردی: ۱۶ ساعت و کلرید سدیم = ۲ گرم در لیتر) عدد ۱۳/۴۶±۰/۹ µg/ml است و کمترین میزان رنگدانه کلروفیل a مربوط به تیمار ۱۲ (حجم تلقیح اولیه کدورت = ۰/۴، منبع نیتروژن: بیج، منبع کربن: بیج، مدت کشت: ۱۱ روز، ترکیب نوری: آبی ۱/۶ قرمز ۳/۳ سفید ۴، دوره نوردی: ۱۲ ساعت و کلرید سدیم = ۰ گرم در لیتر) عدد ۷/۴۰±۰/۱۴ µg/ml است. مطابق جدول ۳ نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل واریانس رنگدانه کلروفیل a پس از حذف عوامل غیرمعنی‌دار نشان داد.

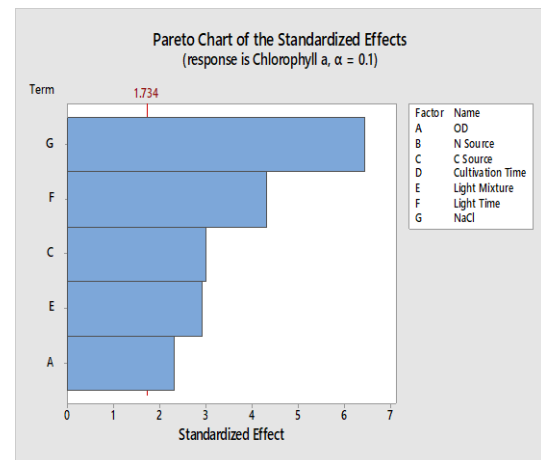
جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس نهایی تاثیر متغیرهای مستقل معنادار بر تولید رنگدانه کلروفیل a

P-Value	میانگین مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۰/۰۰۰	۱۳/۸۵	۵	مدل
۰/۰۰۰	۱۳/۸۵	۵	تیمار
۰/۰۳۳	۴/۴۵	۱	کدورت (OD)
۰/۰۰۸	۷/۴۷	۱	منبع کربن
۰/۰۰۹	۷/۰۹	۱	ترکیب نوری
۰/۰۰۰	۱۵/۵۴	۱	دوره نوردی
۰/۰۰۰	۳۴/۶۸	۱	کلرید سدیم

	۰/۸۳	۱۸	خطا
۰/۹۲۸	۰/۳۲	۶	عدم برازش
	۱/۰۸	۱۲	خطای خالص
		۲۳	کل

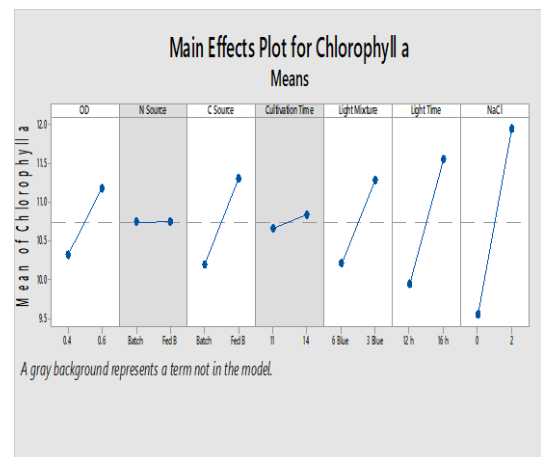
$$R-sq = 82/20\%$$

نمودار پارتو در شکل ۱ ضمن تایید نتایج تجزیه واریانس، ترتیب اثرگذاری فاکتورهای معنادار بر میزان تولید کلروفیل a را نشان می‌دهد، که از بین عوامل معنی‌دار، کلرید سدیم با ضریب تاثیرگذاری ۲/۴۰۵ بیشترین تاثیرگذاری را داشته و در بالاترین حد قرار



شکل ۱- تاثیر متغیرهای معنادار بر میزان تولید کلروفیل a توسط نمودار پارتو

گرفته‌است. پس از آن دوره نوردی، منبع کربن، ترکیب نوری و حجم تلقیح (کدورت) به ترتیب با ضرایب اثرگذاری ۱/۶۱۰، ۱/۱۱۶، ۱/۰۸۸ و ۰/۸۶۲ اثرگذار بودند.



شکل ۲- تاثیرگذاری متغیرهای مستقل بر میزان تولید کلروفیل a با بررسی نقش اثرات اصلی

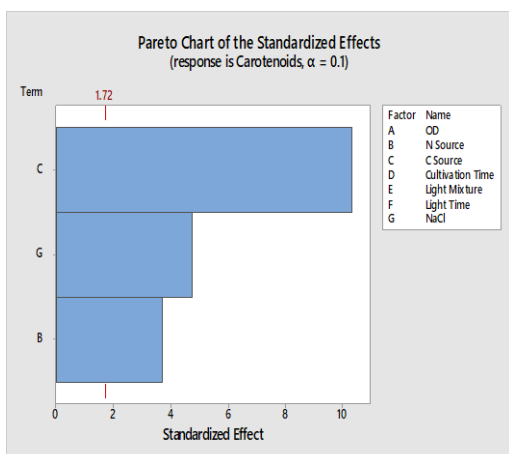
بررسی نقش اثرات اصلی بر میزان تولید رنگدانه کلروفیل a در شکل ۲ نشان داده شده است، فاکتور حجم تلقیح (کدورت) با تاثیر معنی دار ( $p < 0.05$ ) بر این صفت، از میزان ۰/۴ به ۰/۶ در طول موج ۵۶۰ نانومتر، روند صعودی را نشان داد. علاوه بر این، دو فاکتور، ترکیب نوری و دوره نوردی نیز به ترتیب از سطح آبی ۱۶ قرمز ۱۳ به سطح آبی ۱۳ قرمز ۱۶ سفید ۴ و دوره نوردی از سطح ۱۲ ساعته به سطح ۱۶ ساعته دارای روند افزایشی بودند و تاثیر مثبت بر میزان تولید کلروفیل داشتند. براساس نتایج همچنین مشخص شد که کلرید سدیم از سطح ۰ به سطح ۲ گرم در لیتر باعث افزایش تولید کلروفیل شده است. درحالیکه فاکتور، مدت کشت علی‌رغم تاثیر مثبت بر تولید این صفت از سطح ۱۱ به ۱۴ روز، بر اساس نتایج تجزیه واریانس معنادار نگردیده است.

#### کاروتنوئید کل

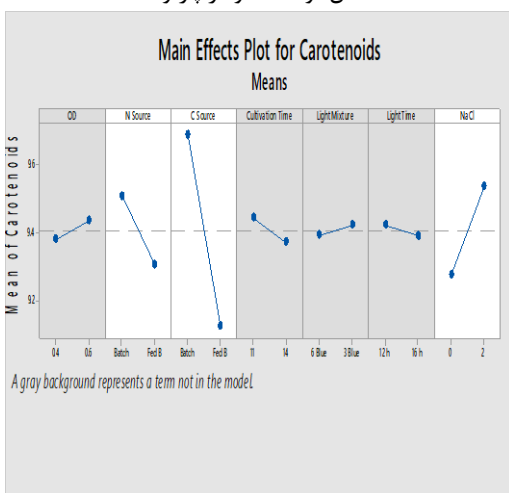
بر اساس داده‌های جدول ۲، بیشترین و کمترین میزان تولید کاروتنوئید کل  $8/21 \pm 0/17$  و  $6/95 \pm 0/12$   $\mu\text{g/ml}$  به ترتیب مربوط به تیمارهای ۱۰ و ۳ ( تیمار ۱۰: کدورت = ۰/۶، منبع نیتروژن: بچ، منبع کربن: بچ، مدت کشت: ۱۱ روز، ترکیب نوری: آبی ۱۳ قرمز ۱۶ سفید ۴، دوره نوردی: ۱۶ ساعت و کلرید سدیم = ۲ گرم در لیتر، تیمار ۳: حجم تلقیح اولیه کدورت = ۰/۴، منبع نیتروژن: فدبچ، منبع کربن: فدبچ، مدت کشت: ۱۱ روز، ترکیب نوری: آبی ۱۳ قرمز ۱۶ سفید ۴، دوره نوردی: ۱۲ ساعت و کلرید سدیم = ۰ گرم در لیتر) به دست آمد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس رنگدانه کاروتنوئید کل در جدول ۴، نشان داد که پس از حذف شدن عوامل غیر- معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد، مدل معنادار بود

$R-sq = 88/95\%$



شکل ۳- تاثیر متغیرهای معنادار بر میزان تولید کاروتنوئید کل توسط نمودار پارتو



شکل ۴- تاثیر گذاری متغیرهای مستقل بر میزان تولید کاروتنوئید کل با بررسی نقش اثرات اصلی

همچنین براساس نتایج مشخص شد که کلرید سدیم از سطح ۰ به سطح ۲ گرم در لیتر باعث افزایش تولید کاروتنوئید شده است. درحالیکه فاکتور، حجم تلقیح (کدورت) علی‌رغم تاثیر مثبت بر تولید این صفت از سطح ۰/۴ به ۰/۶، بر اساس نتایج تجزیه واریانس معنادار نگردیده است.

### بحث

با توجه به داده‌های جدول ۳ نتایج نشان داد که متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری، دوره نوردی در سطح آماری ۱ درصد و متغیر کدورت (OD) در سطح آماری ۵ درصد، تاثیر معناداری بر

( $p < 0/01$ ) و خطا در عدم برازش معنادار نگردید ( $p = 0/565$ ). همچنین با توجه به نتایج حاصل، ضریب همبستگی داده‌ها برابر با ۸۸/۹۵ درصد بود که بیانگر تطبیق مناسب داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون می‌باشد. طبق داده‌ها متغیرهای منبع نیتروژن، منبع کربن و کلرید سدیم تاثیر معناداری ( $p < 0/01$ ) بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید داشت. درحالیکه متغیرهای حجم تلقیح (کدورت)، ترکیب نوری، دوره نوردی و مدت کشت بر این صفت معنی‌دار نیست.

نمودار پارتو در شکل ۳ ضمن تایید نتایج تجزیه واریانس، ترتیب اثرگذاری فاکتورهای معنادار بر میزان تولید کاروتنوئید کل را نشان می‌دهد. مطابق با نمودار پارتو در شکل از بین عوامل معنی‌دار، منبع کربن با ضریب اثرگذاری ۰/۵۸۷۵- بیشترین تاثیرگذاری را دارا بوده پس از آن به ترتیب کلرید سدیم (۰/۲۸۲۶-) و منبع نیتروژن (۰/۲۲۵۹-) اثرگذار بود. بر اساس نتایج تجزیه واریانس و بررسی نقش اثرات اصلی بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید کل در شکل ۴، منبع کربن و منبع نیتروژن با تاثیر معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) بر این صفت، از سطح بیج به فدیج روندی کاهشی را بر میزان تولید این رنگدانه نشان دادند.

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس نهایی تاثیر متغیرهای مستقل معنادار بر تولید رنگدانه کاروتنوئید کل

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	P-Value
مدل	۳	۰/۹۵	۰/۰۰۰
تیمار	۳	۰/۹۵	۰/۰۰۰
منبع نیتروژن	۱	۰/۳۱	۰/۰۰۰
منبع کربن	۱	۲/۰۷	۰/۰۰۰
کلرید سدیم	۱	۰/۴۷	۰/۰۰۰
خطا	۲۰	۰/۰۱۷	
عدم برازش	۸	۰/۰۱۶	۰/۵۶۵
خطای خالص	۱۲	۰/۰۱۸	
کل	۲۳		

در ۱۰ شرایط مختلف نورپردازی بر روی میزان زیست-توده‌ی تولیدی و رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید مورد بررسی قرار دادند. بهترین ترکیب نوری با استفاده از LEDهایی که دارای ترکیب ۷۰ درصد نور قرمز و ۳۰ درصد نور آبی و شدت نور  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$  بود، به دست آمد. در این حالت بهره‌وری زیست توده ۰/۱۴۸ گرم در لیتر در روز بود و غلظت کلروفیل، کاروتنوئید کل و فایکوسیانین به ترتیب ۲۱/۳۵، ۵/۴۵ و  $167/98 \mu\text{g}/\text{ml}$  بود. در این مطالعه نور قرمز با ترکیب ۷۰ درصد، سبب افزایش تولید رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید شد ولی تفاوت معناداری نشان نداد. در آخر افزایش تولید این رنگدانه‌ها را مربوط به افزایش تولید زیست توده در این ترکیب نوری عنوان کردند. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت در کیفیت نورطیفی کشت‌ها، اثر قابل توجهی در رابطه با تولید کاروتنوئید نداشت (Lima et al., 2018). بر اساس نتایج تجزیه واریانس در تولید رنگدانه کلروفیل مشخص گردید که منبع نیتروژن اثر معناداری بر تولید این رنگدانه نداشت. در مطالعه‌ای توسط دانسی و همکاران (۲۰۰۲)، نتایج نشان داد افزودن اوره بر رشد اسپروولینا دارای تاثیر مثبتی بوده در حالیکه هیچ تاثیری بر محتوای کلروفیل کشت‌ها نداشت (Danesi et al, 2002). همچنین یافته‌ها نشان داد که افزایش حجم تلقیح اولیه و غلظت سلولی بر تولید رنگدانه معنادار است ( $p < 0.05$ ) به طوریکه افزایش میزان کدورت از سطح ۰/۴ به ۰/۶، روند صعودی را در تولید رنگدانه نشان داد. دوره نوردهی نیز، از سطح ۱۲ ساعت به سطح ۱۶ ساعته‌ی روشنایی دارای روند افزایشی بود و تاثیری مثبت بر میزان تولید کلروفیل داشت. افزایش مدت زمان روشنایی از ۸:۱۶ به ۸:۱۶ ساعت اثر مطلوبی بر تولید زیست توده دارد. در واقع، یک دوره روشنایی/ تاریکی امکان افزایش غلظت نهایی زیست توده را فراهم می‌کند (Bouterfas et al, 2006).

میزان تولید رنگدانه کلروفیل a داشت. در این بین، کلرید سدیم بیشترین تاثیرگذاری را بر تولید این رنگدانه داشته است که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از دیگر پژوهش‌ها همخوانی دارد (Kumar et al, 2014; Sharma et al., 2013). شناسایی سویه‌های کارآمد اسپروولینا از نظر سنتز رنگدانه و بهینه سازی افزایش تولید آن، با پارامترهای محیطی خاص (شدت نور، دما، غلظت دی اکسید کربن، pH، سطح NaCl) استاندارد گردید و نتایج نشان داد که رشد و تولید رنگدانه در شرایط بهینه شده  $2 \text{ g}/\text{l}$  NaCl بیشترین بهره‌وری را دارا بود. در حالیکه افزایش غلظت نمک موجب کاهش رشد شده و اثر مهارکنندگی بر روی کلروفیل دارد (Kumar et al., 2013). بر اساس پژوهش شارما و همکاران (۲۰۱۴) نیز، اثر غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ مولار NaCl بر تولید رنگدانه‌های اسپروولینا پلاتنسیس نشان داد که بالاترین میزان تولید کلروفیل در غلظت ۰/۲ مولار NaCl بود. مشاهده شد که افزایش غلظت کلرید سدیم باعث کاهش رشد و مهار کلی بیوسنتز کلروفیل a از اسپروولینا پلاتنسیس می‌شود. این امر به دلیل افت سطح انرژی ناشی از پمپاژ یون‌های سدیم ورودی است. همچنین در تحقیقی دیگر، اثرات غلظت NaCl بر تولید زیست توده اسپروولینا پلاتنسیس توسط سلکلی و یاووزاتماک (۲۰۰۹) بررسی شد. بیشترین میزان بازدهی زیست توده و کلروفیل a در غلظت  $1/5 \text{ g}/\text{l}$  نمک به ترتیب  $3/459 \text{ g}/\text{l}$  و  $29/92 \text{ mg}/\text{l}$  مشاهده شد (Çelekli & Yavuzatmaca, 2009). با توجه به شکل ۲ و بررسی نقش اثرات اصلی بر میزان تولید کلروفیل a، ترکیب نوری از سطح آبی ۶/۳ قرمز ۳/۳ سفید ۴ به سطح آبی ۳/۳ قرمز ۶/۳ سفید ۴ دارای روند افزایشی بود و تاثیری مثبت بر میزان تولید کلروفیل داشت، به طوریکه افزایش نور قرمز باعث تجمع این رنگدانه شد. لیما و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی، ترکیب LEDهای قرمز و آبی را،



ریزجلبک شد (Manjunath & Geeta, 2005). این نتایج، تاثیر منبع کربنی بر محتوای کاروتنوئیدی اسپیرولینا پلاتنسیس را تایید می کند. علاوه بر منبع کربنی، منبع نیتروژن با تاثیر معنی دار ( $P < 0.01$ ) بر تولید کاروتنوئید، از سطح بچ به فدیج روندی کاهشی را بر میزان تولید این رنگدانه نشان داد. همچنین براساس نتایج مشخص شد که کلرید سدیم از سطح ۰ به سطح ۲ گرم در لیتر باعث افزایش تولید کاروتنوئید شده است. داده های تحقیق شارما و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تولید کاروتنوئید در کشت اسپیرولینا حاکی از آن بود که بیشترین و کمترین مقدار این صفت با بکارگیری فاکتورهای مستقل کربن ( $\text{NaHCO}_3$ ) و کلرید سدیم به ترتیب با مقادیر ۱۸ گرم در لیتر کربن و ۰/۲ مولار کلرید سدیم ( و ۴/۵ گرم در لیتر کربن و ۰/۸ مولار کلرید سدیم) بدست آمد (Sharma et al., 2014). همچنین در مطالعه دیگر، تاثیر شدت نور بر زیست توده اسپیرولینا پلاتنسیس، رنگدانه ها و اسیدهای آمینه با استفاده از  $\text{KNO}_3$  و اوره به عنوان یک منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت. محتوای کاروتنوئید اسپیرولینا تحت شرایط رشد با استفاده از اوره به عنوان منبع نیتروژن و شدت نور پایین به طور قابل ملاحظه ایی افزایش یافت ( $0.01 \pm 3/12$  میلی-گرم در گرم) (Ajayan et al, 2012).

### نتیجه گیری کلی

در حال حاضر، افزایش آگاهی در مورد اثرات مضر ترکیبات و رنگ های مصنوعی و تمایل جامعه به سمت استفاده از محصولات طبیعی باعث استفاده و بهره برداری از ریزجلبک ها به عنوان منبع رنگدانه های طبیعی شده است. ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس علاوه بر محتوای قابل توجهی از ریز مغذی و درشت مغذی ها که سبب محبوبیت آن در بخش سلامت و صنایع غذایی گردیده است، حاوی رنگدانه های زیادی از جمله کلروفیل a، کاروتنوئید و فایکوبیلی پروتئین ها

مطابق با یافته های دامیچی و همکاران (۲۰۱۸) غلظت کلروفیل می تواند به عنوان یک سنجش غیرمستقیم از غلظت زیست توده، استفاده شود به طوریکه غلظت کلروفیل با افزایش غلظت زیست توده افزایش می یابد، از این رو به نظر می رسد افزایش میزان رنگدانه تولیدی در این آزمون به دلیل افزایش در غلظت زیست توده تولید شده، تحت تاثیر فاکتورهای حجم تلقیح و دوره نوردی بوده است (Deamici et al, 2018). در مطالعه ایی سوجاتا و ناگراجان (۲۰۱۳)، اثر افزودن غلظت های مختلف منبع کربنی ( $\text{NaHCO}_3$ ) را به محیط کشت اسپیرولینا پلاتنسیس بررسی نمودند. نتایج نشان داد افزایش غلظت کربن در محیط باعث افزایش زیست توده و ترکیبات سلولی از جمله رنگدانه ها و لیپیدها در اسپیرولینا شد. میزان رنگدانه کلروفیل در غلظت ۰/۴ مولار  $\text{NaHCO}_3$  به میزان ۱۰/۷ میکروگرم بر میلی گرم رسید. این یافته ها نشان می دهد که با افزایش منبع کربنی در سیستم های تولید تجاری، می توان بازده تولید ترکیبات با ارزش نظیر چربی و رنگدانه را افزایش داد (Sujatha & Nagarajan, 2013). مطالعات در مورد تاثیر منبع کربنی بر محتوای رنگدانه اندک است. بیشتر گزارش های موجود نشان می دهد که کشت های میکسوتروفیک (به طور همزمان در نور و بر روی منبع کربن آلی) در مقایسه با کشت های فتواتروفیک (تنها با منبع نور) نسبت رشد و محتوای کلروفیل بالاتری دارند (Ceron Garcia et al, 2006). مارکز و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که اسپیرولینا پلاتنسیس در شرایط رشد میکسوتروف در مقایسه با فتواتروف، ۱/۵ برابر زیست توده و دو برابر رنگدانه های وابسته به نور بیشتری تولید می کند (Marquez et al, 1995). همچنین استفاده از بیکربنات پتاسیم به عنوان منبع کربن به میزان ۲۰ گرم در لیتر در محیط کشت اسپیرولینا سبب افزایش تولید زیست توده، پروتئین و رنگدانه های نظیر کاروتنوئید در این

Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresour Technol*, 100(5): 1847–1851.

5. Ceron Garcia, M. ., Garcia Camacho, F., Sanchez Miron, A., Fernandez Sevilla, J. ., Chisti, Y., & Molina Grima, E. 2006. *Phaeodactylum tricornutum*. *J Microbiol Biotechnol*, 16(5): 689–694.

6. Danesi, E. D. G., Carvalho, J. C. M. De, & Sato, S. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy* , 23: 261–269.

7. Danesi, E. D. G., Carvalho, J. C. M., & Sato, S. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy* , 26: 329–335.

8. Deamici, K. M., Santos, L. O., & Costa, J. A. V. 2018. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. *Bioresour Technol*, 249(July 2017): 168–174

9. Heer, K., & Sharma, S. 2017. Microbial Pigments As a Natural Color: a Review. *Int J Pharm Sci Res*, 8(5): 1913–1922.

10. Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. 2013. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed Res Int*, 2013: 1–9.

11. Kumar, D., Kumar, N., Pabbi, S., Walia, S., & Dhar, D. W. 2013. Protocol optimization for enhanced production of pigments in *Spirulina*. *Indian J Plant Physiol*, 18(3): 308–312.

12. Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol*, 148(C): 350–382.

13. Lima, G. M., Teixeira, P. C. N., Teixeira, C. M. L. L., Filócomo, D., & Lage, C. L. S. 2018. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira*

است. نتایج مربوط به این پژوهش نشان می‌دهد از بین ۷ عامل مورد بررسی ، متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری و دوره نوردهی در سطح آماری ۱ درصد و متغیر حجم تلقیح اولیه در سطح آماری ۵ درصد، تاثیر معناداری بر میزان تولید رنگدانه کلروفیل a داشت. در حالیکه متغیرهای منبع نیتروژن، منبع کربن و کلرید سدیم تاثیر معناداری ( $p < 0/01$ ) بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید داشتند. طبق نتایج حاصل، با تغییر فاکتورهای محیطی موثر در تولید رنگدانه توسط اسپیرولینا پلاتنسیس می‌توان بازده بیشتری از ترکیبات با ارزش و رنگدانه‌های زیستی در مقیاس تجاری، از این ریزجلبک به دست آورد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر بدینوسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان اعلام می‌دارند.

### منابع

۱. فرجی د، رضایی ک، هاشمی روان م، کلانتری م ، شریفی ا ، گلمکانی م، فرجی س ۱۳۹۴. بهینه سازی کشت فدیج منابع دوکربنی جدید (اتانول و اسید استیک ) در تولید فایکوسیانین بوسیله ریزجلبک اسپیرولینا. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی. ۷۷(۲): ۸۷-۷۷

2. Ajayan, K. V., Selvaraju, M., & Thirugnanamoorthy, K. 2012. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. *Biomass and Bioenergy*, 47:436–441.

3. Bouterfas, R., Belkoura, M., & Dauta, A. 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica*, 25(3): 674–656.

4. Çelekli, A., & Yavuzatmaca, M. 2009.

- Content, Salinity and pH on *Spirulina platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. J Microb Biochem Technol, 06(04): 202–206.
21. Shi, W. Q., Li, S. D., Li, G. R., Wang, W. H., Chen, Q. X., Li, Y. Q., & Ling, X. W. 2016. Investigation of main factors affecting the growth rate of *Spirulina*. Optik, 127(16): 6688–6694.
22. Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., & Converti, A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. Aquaculture, 243(1–4), 217–224.
23. Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. 2017. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. Trends Food Sci Technol, 69:157–171.
24. Sujatha, K., & Nagarajan, P. 2013. Influence of different carbon concentrations on growth and biochemical constituents of *Spirulina platensis* ( Geitler ). J Ecotoxicol Environ Monit, 21(4): 249–252.
25. Usharani, G., Saranraj, P., & Kanchana, D. 2012. *Spirulina* Cultivation: A Review. Int J Pharm Biol Arch, 3(6): 1327–1341.
- platensis*. Algal Res, 31(February): 157–166.
14. Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. 2012. Microbial Pigments: A review. Int J Microb Resour Technol Accept, 41(4): 361–365.
15. Manjunath, R., & Geeta, G. S. 2005. Optimization of Carbon and Manganese Source and their Effect on Growth and Cell Constituents of Strains of *Spirulina platensis*. Agri.Sci, 18(4):1007–1012.
16. Marquez, F. J., Nishio, N., Nagai, S., & Sasaki, K. 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. J Chem Technol Biotechnol, 62(2), 159–164.
17. Pan-utai, W., Kahapana, W., & Iamtham, S. 2017. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira (Spirulina)* and its thermal stability with citric acid. J Appl Phycol, 30(1), 231–242.
18. Pelizer, L. H., Danesi, E. D. G., Rangel, C. de O., Sassano, C. E. N., Carvalho, J. C. M., Sato, S., & Moraes, I. O. (2003). Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. J Food Eng, 56(4), 371–375.
19. Saranraj, P., & Sivasakthi, S. 2014. *Spirulina Platensis* – Food For Future: A Review. Asian J Pharma Sci Technol, 4(1):26–33.
20. Sharma, G., Kumar, M., Ali, M. I., & Dut Jasuja, N. 2014. Effect of Carbon

# Investigation of Influencing Factors on Production of Chlorophyll and Carotenoid Pigments from *Spirulina Platensis* Using Plackett-Burman Design

Banayan S<sup>1</sup>, Jahadi M<sup>2,3\*</sup>, Fazel M<sup>2</sup>

1. M. Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. Plant Improvement and Seed Production Research Centre, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

\*Corresponding author: [m.jahadi@khuisf.ac.ir](mailto:m.jahadi@khuisf.ac.ir)

Received: 28 August 2019

Accepted: 27 November 2019

## Abstract

*Spirulina platensis* has attracted particular attention because of its importance as food, feed and natural pigments with specific functional properties. The purpose of this study is determination and screening of the most important factors including: light-dark cycles (12h light/12h dark and 16h light/8h dark), cultivation period (11 and 14 days), light-emitting diodes (LED) composition (6 blue/ 3 red/ 4 white and 3 blue/6 red/4 white), nitrogen source (65 mg/l urea in fed batch mode and 40 mg/l urea in batch mode), carbon source (1 g/l date syrup in batch and fed batch mode), inoculation size (OD: 0.4 and 0.6) and sodium chloride content (0 and 2 g/l) on the chlorophyll a and carotenoids pigments production in *Spirulina Platensis* using the Plackett-Burman design. The results showed that among the investigated factors, sodium chloride, carbon source, light-emitting diodes composition, Cultivation period ( $p < 0.01$ ) and inoculation size ( $p < 0.05$ ) had significant effect on chlorophyll-a production and nitrogen source, carbon source and sodium chloride had significant effect ( $p < 0.01$ ) on carotenoids production. The highest production of these pigments was obtained  $13.46 \pm 0.9$  and  $8.21 \pm 0.17$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) for chlorophyll-a and carotenoids, respectively.

**Keywords:** *Spirulina platensis*, Pigment, Plackett-Burman design, Chlorophyll, Carotenoid.