بررسی تاثیر دوره نوردهی بر خصوصیات سینتیک رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگدانه‌های طبیعی در فتوبیوراکتور همزن‌دار

سجاد ترابی[a]، مهشید جهادی[b و c*]، نفیسه قاسمی سپرو[d]، مریم اعرج شیروان[d]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

[b] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

[c] دانشیار مرکز تحقیقات و تولید بذر، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[d] کارشناس ارشد آزمایشگاه گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1401.19.4.2.9 DOI: 10.30495/jftn.2022.66259.11195

چکیده

مقدمه: امروزه، *اسپیرولینا پلاتنسیس* یکی از محبوب‌ترین ریزجلبک‌هاست که حاوی مقادیر قابل‌توجهی از مولکول‌های فعال‌زیستی و منبع غنی از رنگدانه‌هایی مانند فیکوسیانین است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تاثیر دوره نوردهی بر کشت جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگدانه‌های (کلروفیل، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و کاروتنوئید) در شرایط دمای ۲۸ درجه سلسیوس، شدت نور ۱۵۰ ($\mu mol/m^{-2}/s^{-1}$)، در محیط کشت زاروک، pH برابر ۹، در کشت غوطه وری در فرمانتور همزن دار مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد افزایش زمان نوردهی به‌عنوان یک محرک رشد در *اسپیرولینا* می‌باشد و با افزایش زمان نوردهی غلظت زیست‌توده، کلروفیل، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و کاروتنوئید به صورت معناداری افزایش می‌یابد ($p\leq ۰/۰۵$). در روزهای پایانی افزایش تراکم سلولی اثر سایه‌زنی سطح بر عمق را افزایش داد و نفوذ نور به عمق کشت کاهش یافت و بر میزان کلروفیل تاثیر منفی گذاشت. دوره نوردهی ۲۴ ساعته بیشترین غلظت زیست‌توده، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین به ترتیب ۱/۴۶ گرم در لیتر، ۱۴۵ و ۳۹/۵۷ میلی گرم در لیتر را نشان داد این درحالی بود که دوره نوردهی ۱۶ ساعته بیشترین غلظت کلروفیل و کاروتنوئید به ترتیب ۸/۶۲ و ۳/۰۵ میلی گرم در لیتر بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی استفاده از دوره نوردهی ۲۴ ساعته، تولید رنگدانه‌ها و زیست‌توده را افزایش می‌دهد اما تولید رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید در اواخر دوره کشت به دلیل افزایش غلظت زیست‌توده و کاهش نفوذ نور در تیمار ۲۴ ساعت روشنایی کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: *اسپیرولینا پلاتنسیس، دوره نوردهی، فتوبیوراکتور، فیکوسیانین*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: m.jahadi@khuisf.ac.ir

مقدمه

اسپیرولینا پلاتنسیس (Spirulina platensis) یکی از محبوب‌ترین ریزجلبک‌هاست که به عنوان یک ماده غذایی سالم و مواد افزودنی مورد استفاده قرارگرفته است. *اسپیرولینا پلاتنسیس* یک سیانوباکتریوم رشته‌ای فتوسنتز کننده‌ی پلانکتونی است که دارای مقادیر بالای کربنات و بی‌کربنات و pH قلیایی تا ۱۱ هستند (Colla *et al.*, 2007). نام علمی *اسپیرولینا*، *Arthrospira platensis* می‌باشد. *اسپیرولینا* حاوی مقادیر قابل توجهی از مولکول‌های فعال، پروتئین‌های دارای اسیدآمینه‌های ضروری، اسیدهای چرب اشباع نشده مانند لینولئیک اسید، ویتامین‌ها، پلی‌ساکاریدها، املاح معدنی رنگدانه‌ها (فیکوسیانین، کلروفیل‌ها، آلوفیکوسیانین، بتا-کاروتن[1]، لوتئین[2] و زانتین[3] می‌باشد (Sánchez *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010). پارامترهای زیادی ازجمله: نور، دما، غلظت نمک، غلظت CO_2، ترکیب مواد مغذی، اندازه تلقیح، سکون یا به هم خوردن محیط کشت و pH بر رشد و میزان پروتئین ریزجلبک‌ها تأثیر می‌گذارد (Ravelonandro *et al.*, 2011). یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در بیوسنتز کلروفیل شدت نور است (Ajayan *et al.*, 2012) شدت نور نقش مهمی در کشت جلبک دارد، از نظر تئوری حداکثر کارایی فتوسنتز ۹ درصد است (Wang *et al.*, 2007).

اسپیرولینا منبع غنی رنگدانه‌ی فیکوسیانین است که یک رنگدانه‌ی طبیعی آبی است و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، حفاظت از کبد و مهار رادیکال آزاد است و ممکن است تا ۲۰ درصد از وزن خشک *اسپیرولینا* را تشکیل دهد (Doke *et al.*, 2005). گونه‌های موجود در جنس *آرتروسپیرا*، علاوه بر فیکوسیانین، دارای رنگدانه‌های دیگری مانند کلروفیل a (به‌طور متوسط ۰/۵ درصد تا ۱ درصد توده خشک) و کاروتنوئیدها (به‌طور متوسط ۰/۱ درصد تا ۰/۲ درصد توده خشک) هستند (Lima *et al.*, 2018). سیستم‌های که برای تولید گسترده *اسپیرولینا* مورداستفاده قرار می‌گیرد، حوضچه‌های باز است که چنین سیستم‌هایی منجر به غلظت بالای زیست‌توده نمی‌شوند. دلایل اصلی کاهش زیست‌توده، تغییرپذیری دما، حساسیت به آلودگی و راندمان پایین نفوذ نور به دلیل نسبت سطح / حجم کم است. به همین دلیل استفاده از سیستم بسته می‌تواند این معایب را کاهش دهد (Wang *et al.*, 2007).

یکی از روش‌های کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* استفاده از انواع فتوبیوراکتورها شامل ستون حباب، راکتور هوایی، لوله‌ای، پانل و کیسه‌های پلاستیکی است (Zhang *et al.*, 2015). کشت *اسپیرولینا* در بیوراکتورهای زیستی‌نوری[4] انجام می‌شود و مانند سایر سیانوباکتری‌ها نیاز به همزدن دارد تا سلول‌ها به حالت معلق باقی بمانند. این شرایط برای میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده که به جذب نور نیاز دارند، اهمیت بیش‌تری دارد (Pegallapati *et al.*, 2011)؛ اما از طرفی همزدن با تنش و استرس هیدرودینامیکی بر سلول‌ها همراه است و بر تولید زیست‌توده تاثیر منفی دارد (Mirón *et al.*, 2003). هوادهی محیط رشد را تحریک می‌کند و تولید پروتئین توسط ارگانیسم را افزایش می‌دهد (Ogbonda *et al.*, 2007). Shi و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر نور را بر میزان رشد *اسپیرولینا* را مورد بررسی قراردادند. از *اسپیرولینا* که در معرض نور فلورسنت قرار گرفت به عنوان کنترل استفاده شد. آن‌ها تأثیر منبع نور ترکیبی بر میزان رشد *اسپیرولینا* را مورد مطالعه قراردادند و دریافتند که میزان رشد *اسپیرولینا* در معرض نور ترکیبی به طور قابل‌توجهی بالاتر از گروه کنترل است. Ravelonandro و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که در مقادیر کم زیست‌توده افزایش اختلاط باعث بهبود بهره‌وری نمی‌شود. Zeng و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه خود اعلام نمودند که در حضور هوادهی کشت، غلظت زیست‌توده افزایش پیدا کرد. تولید تجاری *اسپیرولینا پلاتنسیس* به عنوان غذای سالم و یکی از افزودنی‌های با ارزش، سودآور است. در حال حاضر به منظور استفاده از *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقیاس وسیع انتخاب یک فناوری کشت کارآمد برای دستیابی به هزینه کمتر تولید مسأله‌ای مهم است، امروزه تولید تجاری *اسپیرولینا پلاتنسیس* تقریباً به طور انحصاری در استخرهای روباز انجام می‌شود. با این حال اشکال این سیستم‌ها بهره‌وری کم زیست‌توده، کمتر از ۱۵ گرم بر متر مربع در سهولت در آلودگی و تبخیر جدی

[1] β-Carotene [2] Lutein [3] Xanthine [4] Photobioreactors

آب بین استخر و محیط اطراف است (Zhang *et al*., 2015).

این تحقیق با هدف بررسی تاثیر دوره نوردهی بر سینتیک رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگدانه‌های فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلوفیل و کاروتنوئید با کشت غوطه‌وری در فرمانتور همزن دار با استفاده از طرح فاکتوریل انجام شد. متغیرها در دو سطح شامل: دوره نوردهی ۱۶ ساعته (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و دوره نوردهی ۲۴ ساعت روشنایی در مدت کشت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- سویه ریزجلبک و محیط‌کشت

سویه *S. platensis* مورد استفاده در این مطالعه از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه مشهد، ایران خریداری شد. محیط رشد مورد استفاده برای کشت محیط زاروک بود. محیط ابتدا در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و سپس در محیط زاروک تلقیح شد (Zeng *et al*., 2012). کشت ریز جلبک در یک ارلن مخروطی ۲ لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط به

Figure 1- Stired tank photobioreactor for cultivation *Spirulina platensis*

شکل ۱- فتوبیوراکتور همزن‌دار جهت کشت *اسپیرولینا پیلاتنسیس*

مدت ۱۴ روز انجام شد. از محیط اولیه برای تلقیح محیط کشت اصلی در فتوبیوراکتور استفاده شد تا غلظت اولیه با جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۶۰ نانومتر به ۰/۴ برسد (Banayan *et al*., 2020). چرخه کشت به کار رفته ۱۶ ساعت دوره روشنایی و ۸ ساعت دوره تاریکی شدت نور ۱۵۰ ($\mu mol/m^{-2}/s^{-1}$) بود. دمای کشت ۲۸±۰/۵ درجه سانتی‌گراد بود (Torabi *et al*., 2021).

- کشت در فتوبیوراکتور

در این تحقیق از یک فتوبیوراکتور (شرکت رایمند زیست فناور البرز- ایران) استفاده شد (شکل ۱). ظرف بیوراکتور، با قطر داخلی ۳۰ سانتی‌متر و طول ۵۰ سانتی‌متر، از شیشه با ضخامت ۰/۱۲ سانتی‌متر ساخته‌شده است. یک درپوش فلزی در بالای ظرف شیشه‌ای برای آب‌بندی ثابت‌شده نمونه‌برداری، تلقیح محیط کشت، پاشش هوا وجود دارد. دما روی ۲۸±۰/۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. فتوبیوراکتور در معرض ۲ لامپ LED سفید ۹ وات و ۱ لامپ LED قرمز ۹ وات که بر روی دیواره‌های داخلی فتوبیوراکتور نصب شده بودند قرار گرفت فاصله بین لامپ‌ها و فتوبیوراکتور ۲۰ سانتی‌متر بود. هوادهی از طریق یک پمپ متصل به فتوبیوراکتور تغذیه شد. کشت *اسپیرولینا* در فتوبیوراکتور تحت شرایط همزدن با دور ۲۰ دور در دقیقه و با هوادهی انجام گرفت. *S. platensis* در دو نوع رژیم نوردهی کشت شد: (۱) کشت اسپیرولینا با ۱۶ ساعت روشنایی (۲) کشت اسپیرولینا با ۲۴ ساعت روشنایی شرایط کشت، به جز دو نوع رژیم نوردهی برای هر دور آزمایش ثابت بود.

- غلظت زیست‌توده

غلظت توده زیستی به کمک روش خشک کردن توسط کاغذ صافی (اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر) و در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد (ساخت شرکت memmert، مدل ۱۰۰-۸۰۰، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد (Zhang *et al*., 2015).

- تعیین غلظت فیکوبیلی پروتئین‌ها

۵ میلی‌لیتری از زیست‌توده سانتریفیوژ (ساخت شرکت

پل ایده‌آل تجهیز، مدل universal 320R، ایران) شد (g ×۱۰۰۰۰، ۱۵ دقیقه) و با ۵ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، pH=۶/۸ همگن‌سازی شدند. خوانش‌های جذب محلول استخراجی توسط اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت unico، مدل ۲۱۰۰) در طول موج‌های ۶۱۵ و ۶۵۲ نانومتر به دست آمد (Chen *et al*., 2010; Rodrigues *et al*., 2019; Torabi *et al*., 2021)

- **تعیین غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها**

۵ میلی‌لیتری از نمونه سانتریفیوژ و جمع‌آوری و با ۵ میلی‌لیتر متانول ۹۰٪ همگن شد. جذب محلول استخراج‌شده در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۵، ۶۵۰ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Lima *et al*., 2018; Torabi *et al*., 2021)

- **نرخ رشد خاص و زمان دو برابر شدن**

نرخ رشد ویژه (μ) *اسپیرولینا* در شرایط رشد طبیعی با استفاده از رابطهٔ (۱) به دست آمد (Soni *et al*., 2019):

$$\mu = \frac{lnx2-lnx1}{t2-t1} \quad (۱)$$

در رابطه (۱)، x_1 و x_2 غلظت‌های زیست‌توده و یا رنگدانه در فاصله زمانی t_1 و t_2 هستند.

به کمک رابطه ۲ می توان زمان دوبرابر شدن زیست توده ($t(h)$) را به شرح زیر محاسبه کرد:

$$t\ (h) = \frac{ln2}{\mu} == \frac{0.693}{\mu} \quad (۲)$$

بهره‌وری (Productivity) تولید زیست‌توده، رنگدانه‌های کلروفیل، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و کاروتنوئیدها توسط رابطه (۳) محاسبه شد (Soni *et al*., 2019):

$$P(\text{mg l}^{-1}\text{day}^{-1}) = \frac{X_{Max_t} - X_{t_0}}{(t-t_0)} \quad (۳)$$

در رابطه (۳)، x_{maxt} و x_{t0} غلظت‌های زیست‌توده و یا رنگدانه در فاصله زمانی t و t_0 هستند.

- **تجزیه و تحلیل آماری**

جهت بررسی تاثیر نوردهی بر رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگدانه‌های فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید از روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنادار (LSD) در سطح اطمینان ۹۵٪ توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ استفاده شد و نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ رسم گردیدند. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

یافته‌ها

- **تاثیر زمان نوردهی بر رشد اسپیرولینا پلاتنسیس**

این آزمایش به جهت بررسی تاثیر زمان نوردهی بر میزان رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* در یک فتوبیوراکتور همزن دار انجام گرفت. با توجه به شکل ۲ افزایش زمان نوردهی باعث افزایش تولید زیست‌توده شد. علاوه بر آن از روز پنجم به بعد، بین دو تیمار اختلاف آماری معناداری ایجاد شد و در روز چهاردهم، تیمار ۲۴ ساعت روشنایی (۱/۴۶ گرم بر لیتر) نسبت به تیمار ۱۶ ساعت روشنایی (۱/۳۹ گرم بر لیتر) به طور معناداری زیست‌توده بیشتری تولید کرد (p <۰/۰۵). تیمار ۱۶ ساعت روشنایی تا روز سوم در فاز تاخیر قرار دارد، در حالی که تیمار ۲۴ ساعت روشنایی فاز تاخیر کوتاه‌تری داشت و سریعتر وارد فاز لگاریتمی شد.

- **تاثیر زمان نوردهی بر تغییرات فیکوسیانین**

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود افزایش زمان نوردهی به صورت معناداری بر روی فیکوسیانین تاثیر مثبت داشت و باعث افزایش آن شد (p<۰/۰۵). مشاهده شد که از روز سوم تا روز یازدهم بین دو تیمار اختلاف معناداری ایجاد شد، اما در روز چهاردهم

بین تیمار ۲۴ ساعت روشنایی با غلظت فیکوسیانین ۱۴۵ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار ۱۶ ساعت روشنایی با غلظت فیکوسیانین ۱۳۶/۵ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معناداری مشاهده نشد.

- **تاثیر زمان نوردهی بر تغییرات آلوفیکوسیانین**

مشاهدات شکل ۴ نشان داد افزایش زمان نوردهی به صورت معناداری غلظت آلوفیکوسیانین را افزایش داد (p <۰/۰۵). از روز پنجم تا روز نهم بین دو تیمار اختلاف معناداری ایجاد شد این در حالی بود که از روز نهم تا چهاردهم بین دو تیمار اختلاف معناداری مشاهده نشد و در روز چهاردهم غلظت آلوفیکوسیانین به بیشترین مقدار خود

با غلظت ۳۹/۵۷ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار ۲۴ ساعت روشنایی و ۳۸ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار ۱۶ ساعت روشنایی رسید. تولید رنگدانه آلوفیکوسیانین رفتاری مشابه فیکوسیانین داشت و از روز سوم کشت به بعد میزان تولید آلوفیکوسیانین در دوره نوردهی ۲۴ ساعته، رشد بیشتری داشت.

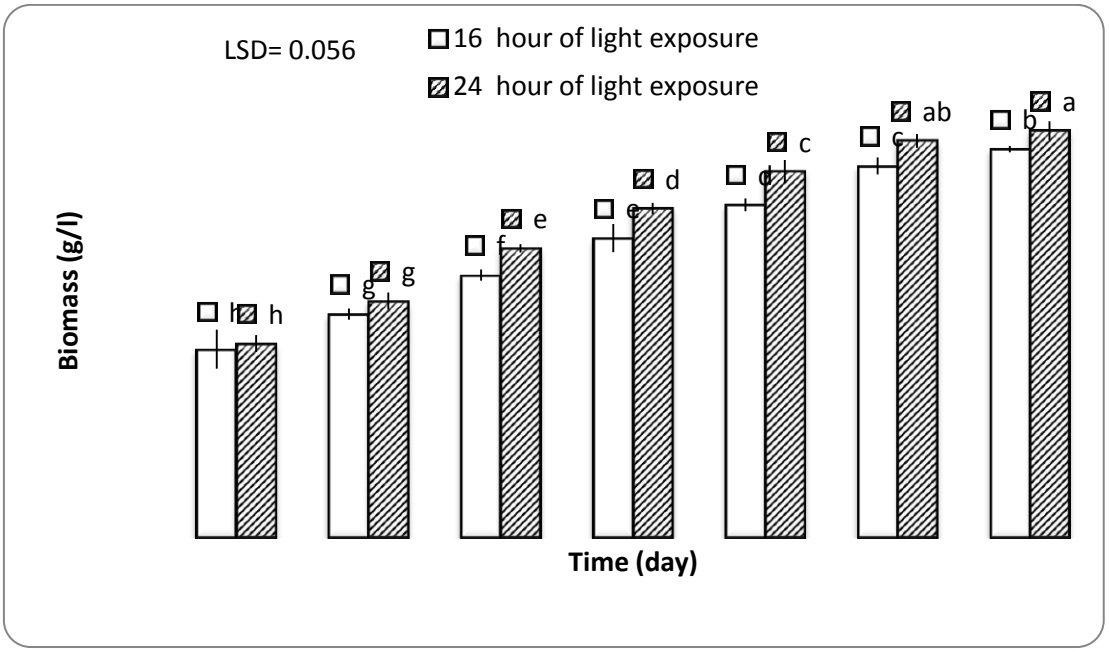

Figure 2 - Comparison of the mean of the interaction of time and light on the amount of biomass.
The means with different letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different.

شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و روشنایی بر مقدار زیست‌توده
میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنادار دارند.

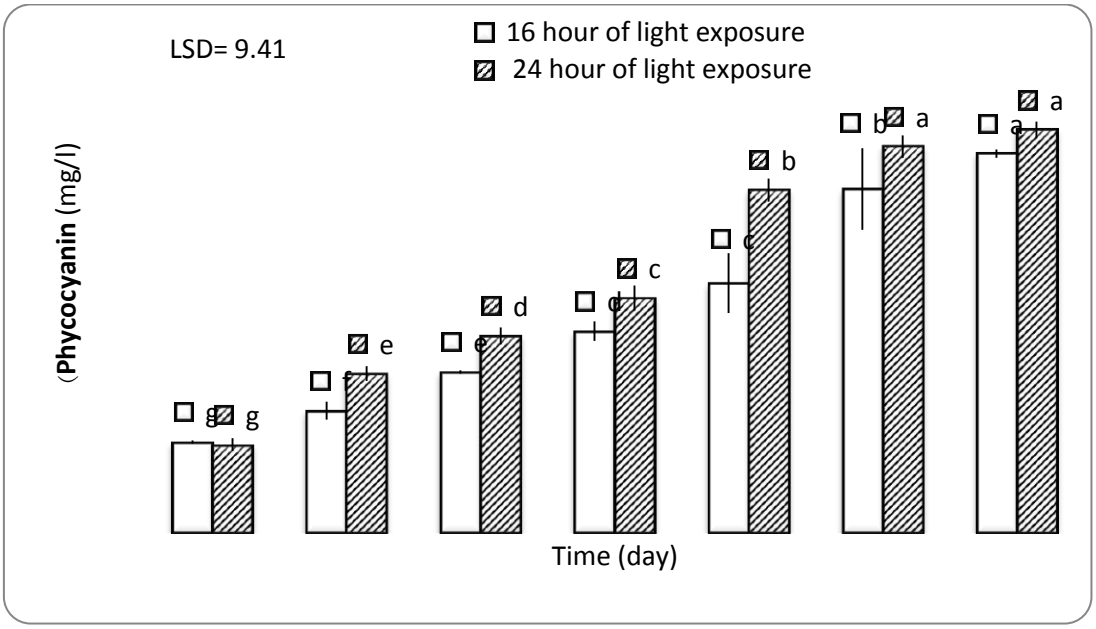

Figure 3 - Comparison of the mean of the interaction of time and light on the amount of phycocyanin.
The means with different letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different.

شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و روشنایی بر مقدار فیکوسیانین
میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنادار دارند.

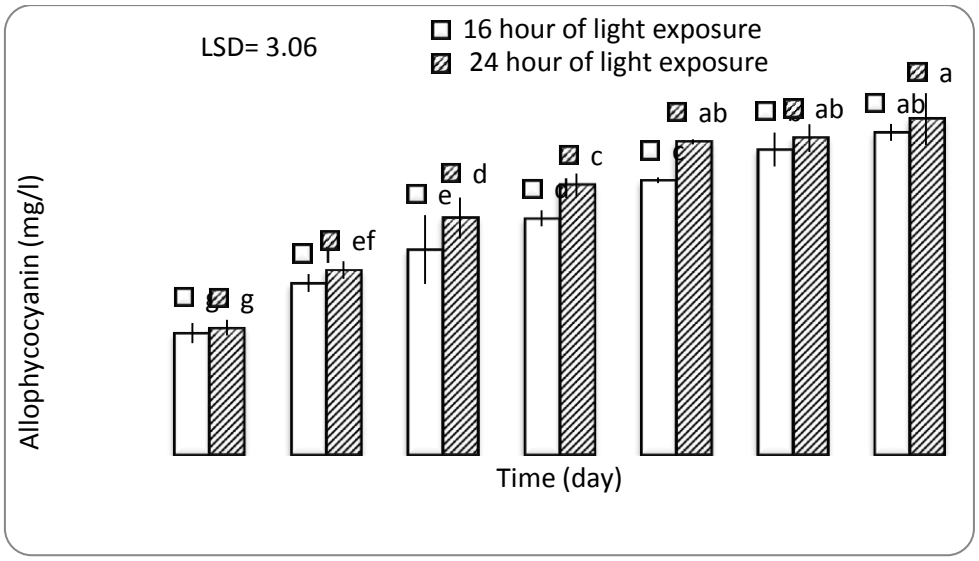

Figure 4 - Comparison of the mean interaction of time and light on the amount of allophycocyanin.
The means with different letters at the level of 5% of LSD test are significantly different.

شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و روشنایی بر مقدار آلوفیکوسیانی.
میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنادار دارند.

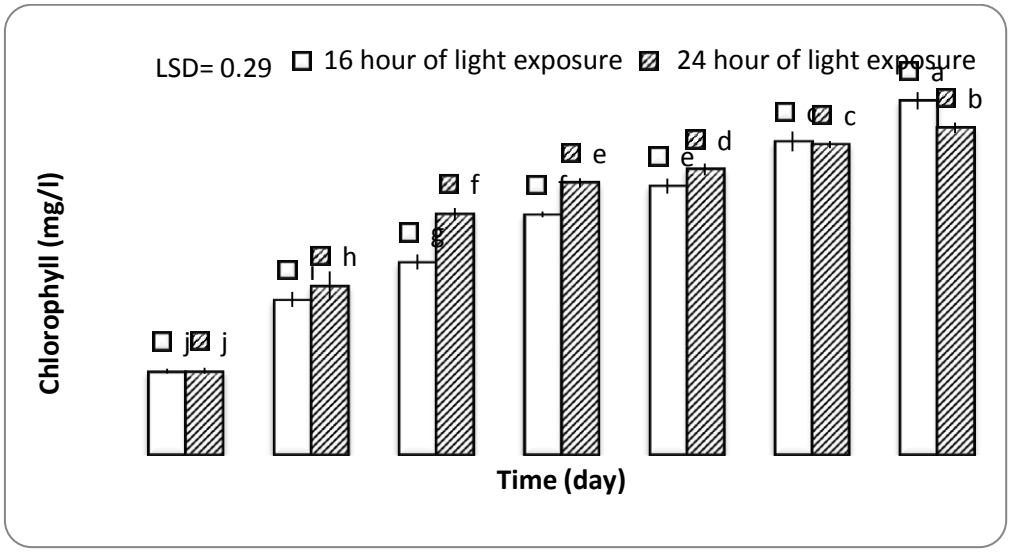

Figure 5 - Comparison of the mean of the interaction of time and light on the amount of chlorophyll.
The means with different letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different.

شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و روشنایی بر مقدار کلروفیل
میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنادار دارند.

- **تاثیر زمان نوردهی بر تغییرات کلروفیل**

با توجه به مشاهدات شکل ۵ مشخص شد افزایش زمان نوردهی به صورت معناداری تولید کلروفیل را افزایش داد (p <۰/۰۵). از روز پنجم تا روز نهم بین دو تیمار اختلاف معناداری ایجاد شد. این در حالی بود که تا روز نهم مقدار کلروفیل در تیمار ۲۴ ساعت روشنایی بیشتر از تیمار ۱۶ ساعت روشنایی بود و از روز یازدهم به بعد غلظت کلروفیل در تیمار ۱۶ ساعت روشنایی بیشتر از تیمار ۲۴ ساعت روشنایی مشاهده شد و در روز چهاردهم غلظت کلروفیل در تیمار ۱۶ ساعت روشنایی به ۸/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر رسید که به صورت معناداری بیشتر از تیمار ۲۴ ساعت روشنایی بود (p <۰/۰۵). از روز سوم تولید کلروفیل در

دوره‌ی نوردهی ۲۴ ساعته افزایش معناداری داشت اما در روزهای پایانی و از روز یازدهم به بعد با افزایش زیست‌توده در دوره‌ی نوردهی ۲۴ ساعته، کاهش کلروفیل مشاهده شد.

- تاثیر زمان نوردهی بر تغییرات کاروتنوئید

نتایج به‌دست‌آمده از شکل ۶ حاکی از آن است که افزایش دوره نوردهی به‌صورت معناداری بر روی کاروتنوئید تاثیر مثبت داشت (p <۰/۰۵). مشاهده شد که تولید رنگدانه کاروتنوئید رفتاری مشابه کلروفیل دارد. میزان کاروتنوئید در دوره نوردهی ۲۴ ساعته از روز سوم به بعد افزایش بیشتری نسبت به دوره ۱۶ ساعت روشنایی داشت؛ اما از لحاظ محتوای کاروتنوئید غلظت کاروتنوئید در پایان کشت در دوره نوردهی ۱۶ ساعته بیشتر بود. از روز پنجم تا روز هفتم بین دو تیمار اختلاف معناداری وجود دارد و بیشترین غلظت کاروتنوئید مربوط به تیمار ۲۴ ساعت روشنایی در روز هفتم بود. در حالی که در روز یازدهم به بعد بین دو تیمار اختلاف معنادار وجود داشت و بیشترین غلظت کاروتنوئید مربوط به تیمار ۱۶ ساعت روشنایی با غلظت ۳/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر در روز چهاردهم بود.

- تاثیر نوردهی بر پارامترهای سینتیکی رشد اسپیرولینا پلاتنسیس و تولید متابولیت‌ها

نتایج حاصل از جدول ۱ نشان داد که تیمار ۲۴ ساعت روشنایی، دارای بیش‌ترین نرخ رشد ویژه و بهره‌وری تولید، فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین و کم‌ترین زمان دو برابر شدن است و تیمار ۱۶ ساعت روشنایی بیش‌ترین بهره‌وری کاروتنوئید و کلروفیل را نسبت به تیمار دیگر نشان داد.

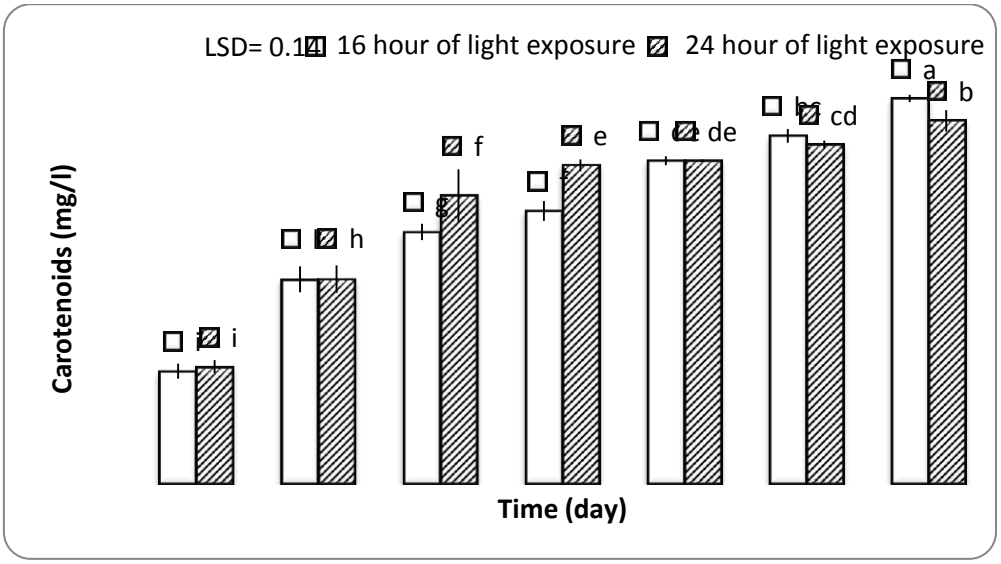

Figure 6 - Comparison of the mean of the interaction of time and brightness on the amount of carotenoids.
The means with the same letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different.

شکل ٦ – مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و روشنایی بر مقدار کارتنویید

میانگین‌ها با حروف یکسان در سطح ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنادار دارند.

جدول ۱- نتایج تاثیر دوره نوردهی بر پارامترهای سینتیکی رشد

Table 1- Results of the effect of exposure period on growth kinetic parameters

Parameter	unit	16-hour exposure period	24-hour exposure period
Special growth rate	h^{-1}	0.002208	0.00223
Double time	h	313.858	310.762
Production efficiency	$g.l^{-1}.day^{-1}$	0.0507	0.055
Productivity of phycocyanin	$mg.l^{-1}.day^{-1}$	7.44	80.119
Carotenoid productivity	$mg.l^{-1}.day^{-1}$	0.154	0.14
Chlorophyll productivity	$mg.l^{-1}.day^{-1}$	0.471	0.424
Productivity of allophycocyanin	$mg.l^{-1}.day^{-1}$	1.693	1.76

بحث

در مورد تاثیر نوردهی بر میزان تولید زیست‌توده مشاهده شد با افزایش شدت نور به دلیل افزایش فتوسنتز، تولید زیست‌توده افزایش یافت (Markou *et al*., 2012). مشاهدات نشان داده افزایش زمان نوردهی به عنوان یک محرک رشد در *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌باشد و زمان نوردهی تاثیر بسزایی بر رشد زیست‌توده دارد (Banayan *et al*., 2020). این نشان دهنده‌ی این است که شدت نور بالاتر، موجب تولید زیست‌توده بیشتری می‌شود (Markou *et al*., 2012). علاوه بر این مشاهده شد افزایش زمان نوردهی باعث افزایش تولید رنگدانه‌های فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین می‌شود که نشان دهنده‌ی این موضوع است که محتوای فیکوبیلی‌پروتئین در *اسپیرولینا* تحت تأثیر شدت و کیفیت نور قرار دارد (Ho *et al*., 2018)، به طوری که با افزایش شدت نور بهره‌وری کلی زیست‌توده، میزان مصرف CO_2 و حداکثر بهره‌وری فیکوسیانین افزایش یافت (Chen *et al*., 2013). این در حالی بود که در برخی پژوهش‌ها با افزایش شدت نور، مقدار پروتئین کاهش یافت (Markou *et al*., 2012). مشاهده شد میزان آلوفیکوسیانین در سیانوباکتریوم *Nostoc sphaeroides* با افزایش شدت نور افزایش یافت (Ma *et al*., 2015). فیکوبیلی‌پروتئین‌ها پروتئین‌هایی هستند که انرژی نور را می‌گیرند و به‌عنوان رنگدانه‌های فتوسنتزی جانبی در سیانوباکتری‌ها، جلبک‌های قرمز، کریپتوفیت‌ها و گلیکوفیت‌ها عمل می‌کنند (Rodrigues *et al*., 2019). نتایج تحقیقات آجایان و همکاران نشان داد شدت نور موجب افزایش فتوسنتز و درنتیجه افزایش تولید سریع‌تر ATP و NADPH و درنتیجه افزایش رشد سلولی شد (Ajayan *et al*., 2012) این نشان‌دهنده‌ی این است که افزایش شدت و زمان روشنایی بر تولید آلوفیکوسیانین تاثیر مثبت داشت. اختلافاتی در پژوهش‌ها مشاهده می‌شود که نشان دهنده‌ی آن است که شدت نور ابتدا تقسیم سلول را بیشتر می‌کند و بعد از رسیدن نور به شدت مطلوب، افزایش بیشتر در شدت نور، تقسیم سلول را مهار می‌کند (Ajayan *et al*., 2012).

افزایش زمان نوردهی بر تولید کلروفیل وکاروتنوئید تاثیر مثبت داشت. افزایش زمان نوردهی و همراه با آن افزایش زیست‌توده منجر به افزایش کلروفیل می‌شود؛ بنابراین بازده فتوسنتز جلبک بهبود می‌یابد (Markou *et al*., 2012)، به طوری که زیست‌توده بیشتری با استفاده از شدت نور بیشتر از همان منبع نوری تولید می شود (Chen *et al*., 2010). مشاهدات این نتیجه با این واقعیت مطابقت دارد که *اسپیرولینا پلاتنسیس* یک میکروارگانیسم فتوسنتزی است که به طور موثری نور را جذب می‌کند و توسط فتوسنتز، این انرژی نور را به شکل شیمیایی به شکل ATP برای رشد سلول تبدیل می کند (Ferreira *et al*., 2012). این در صورتی بود که در روزهای پایانی در دوره‌ی نوردهی ۲۴ ساعته، کلروفیل و کاروتنوئید کاهش یافت. به نظر می‌رسد که شدت نوری که برای رشد سلول‌های جوان‌تر مناسب است، می‌تواند در مراحل بعدی رشد به ویژه در مرحله تقسیم، به سلول‌ها آسیب برساند (Lee *et al*., 2016). مشاهدات پیشین نشان داد افزایش دوره نوردهی میزان کاروتنوئید را کاهش می‌دهد (Banayan *et al*., 2020). فرض بر این است که تولید کلروفیل و کاروتنوئید با ترکیبی از شدت نور، غلظت سلول و سن کشت تنظیم می‌شود. این به نوبه خود نشان می‌دهد که کلروفیل بیشتری می‌تواند حتی در شدت نور بالاتر به دلیل تولید زیست‌توده بالاتر تولید شود (Markou *et al*., 2012). نتایج نشان می‌دهد که برای کشت *اسپیرولینا* به منظور تولید کلروفیل، استفاده از روشنایی ۱۶ ساعته محتوای کلروفیل بیشتری را در پی خواهد داشت. می‌توان نتیجه گرفت که برای تولید حداکثری کلروفیل و کاروتنوئید، ایجاد یک شرایط بهینه در ارتباط با دیگر پارامترهای تاثیرگذار بر رشد *اسپیرولینا* لازم است تا بیش‌ترین محتوای کاروتنوئید بدست آید.

نتیجه‌گیری

در حال حاضر استفاده روزافزون از جلبک *اسپیرولینا* در صنایع غذایی و دارویی، شناسایی و بهینه‌سازی عوامل تاثیرگذار بر رشد این جلبک یک امر مهم است. این پژوهش نشان می‌دهد که با افزایش دوره نوردهی میزان زیست‌توده و رنگدانه‌ها به طور معناداری ($p < ۰/۰۵$) افزایش می‌یابد. از طرفی هم مشاهده شد تولید رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید در اواخر دوره کشت به دلیل افزایش غلظت زیست‌توده و کاهش نفوذ نور در تیمار ۲۴ ساعت روشنایی کاهش یافت. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد

که برای تولید حداکثر میزان کلروفیل و کاروتنوئید، ایجاد یک شرایط بهینه در ارتباط با دیگر پارامترهای تأثیرگذار بر رشد *اسپیرولینا* لازم است تا بیشترین محتوای کلروفیل و کاروتنوئید بدست آید. علاوه بر این هنوز پژوهش‌های کمی بر روی مدت زمان نوردهی انجام گرفته است که امید است این پژوهش نتایج قابل قبولی را ارائه داده باشد.

سپاسگزاری

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

منابع

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.

Banayan, S., Jahadi, M. & Fazel, M. (2020). Investigation of factors affecting the production of chlorophyll and carotenoid pigments from Spirulina platensis using Berman platelet design. Journal of Food Microbiology, 7(2), 70-81. [In Persian].

Chen, C.Y., Kao, P.C., Tsai, C.J., Lee, D.J. & Chang, J.S. (2013). Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO2 fixation with Spirulina platensis. Bioresource Technology, 145, 307-312.

Chen, H.B., Wu, J.Y., Wang, C.F., Fu, C.C., Shieh, C.J., Chen, C.I., Wang, C.Y. & Liu, Y.C. (2010). Modeling on chlorophyll and phycocyanin production by Spirulina platensis under various light-emitting diodes. Biochemical Engineering Journal, 53(1), 52-56.

Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C. & Costa, J.A.V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology, 98(7), 1489-1493.

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

Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., Converti, A., Sato, S. & Carvalho, J.C. (2012). Kinetic and growth parameters of Arthrospira (Spirulina) platensis cultivated in tubular photobioreactor under different cell circulation systems. Biotechnology and Bioengineering, 109(2), 444-450.

Ho, S. H., Liao, J. F., Chen, C. Y. & Chang, J. S. (2018). Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with Spirulina platensis. Bioresource Technology, 247,669-675.

Lee, S. H., Lee, J. E., Kim, Y. & Lee, S. Y. (2016). The production of high purity phycocyanin by Spirulina platensis using light-emitting diodes based two-stage cultivation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 178(2), 382-395.

Lima, G. M., Teixeira, P. C., Teixeira, C. M., Filócomo, D. & Lage, C. L. (2018). Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of Arthrospira platensis. Algal Research, 31, 157-166.

Ma, R., Lu, F., Bi, Y. & Hu, Z. (2015). Effects of light intensity and quality on phycobiliprotein accumulation in the cyanobacterium Nostoc sphaeroides Kützing. Biotechnology Letters, 37(8), 1663-1669.

Markou, G., Chatzipavlidis, I. & Georgakakis, D. (2012). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of Arthrospira (Spirulina) platensis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(8), 2661-2670.

Mirón, A.S., Garcıa, M.C.C., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M. & Chisti, Y. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterization of Phaeodactylum tricornutum in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochemical Engineering Journal, 16(3), 287-297.

Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E. & Abu, G.O. (2007). Influence of aeration and lighting on biomass production and protein biosynthesis in a Spirulina sp. isolated from an oil-polluted brackish water marsh in the Niger Delta, Nigeria. African Journal of Biotechnology, 6(22).

Pegallapati, A.K. & Nirmalakhandan, N. (2011). Energetic evaluation of an internally illuminated photobioreactor for algal cultivation. Biotechnology letters, 33(11), 2161.

Ravelonandro, P.H., Ratianarivo, D.H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A. & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of Arthrospira (Spirulina) platensis from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO_2 addition. Food and Bioproducts Processing, 89(3), 209-216.

Rodrigues, R. D. P., de Lima, P. F., de Santiago-Aguiar, R. S. & Rocha, M. V. P. (2019). Evaluation of protic ionic liquids as potential solvents for the heating extraction of phycobiliproteins from Spirulina (Arthrospira) platensis. Algal Research, 38, 101391.

Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C. & Rodríguez, I. (2003). Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism: a review. Universitas Scientiarum, 8(1), 7-24.

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.

Soni, R.A., Sudhakar, K. & Rana, R.S. (2019). Comparative study on the growth performance of Spirulina platensis on modifying culture media. Energy Reports, 5, 327-336.

Torabi, S., Jahadi, M. & Ghasemisepro, N. (2021). Effects of Agitation and Aeration on Growth Kinetics of Spirulina platensis and Production of Natural Pigments in Stirred Photobioreactor. Research and Innovation in Food Science and Technology, 10(3), 261-272. [In Persian].

Wang, C.Y., Fu, C.C. & Liu, Y.C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of Spirulina platensis. Biochemical Engineering Journal, 37(1), 21-25.

Zeng, X., Danquah, M.K., Zhang, S., Zhang, X., Wu, M., Chen, X.D., Ng, I.S., Jing, K. & Lu, Y. (2012). Autotrophic cultivation of Spirulina platensis for CO_2 fixation and phycocyanin production. Chemical Engineering Journal, 183, 192-197.

Zhang, L., Chen, L., Wang, J., Chen, Y., Gao, X., Zhang, Z. & Liu, T. (2015). Attached cultivation for improving the biomass productivity of Spirulina platensis. Bioresource Technology, 181, 136-142.

Investigating the Effect of Light Exposure on Growth Kinetic and Natural Pigments Production by *Spirulina platensis* Using Stirred Photobioreactor

S. Torabi[a], M. Jahadi [b,c*], N.Ghasemisepro[d], M. Araj-Sgirvani[d]

[a] MSc. Student of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[b] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[c] Associate Professor of the Seed Research and Production Center, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[d] Laboratory expert of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Received: 23 February 2022 Accepted: 11 April 2022

Abstract

Introduction: Nowadays, *Spirulina platensis* is one of the most popular microalgae, containing significant amounts of active molecules and a rich source of pigments such as phycocyanin.

Materials and Methods: In this study, the effect of exposure period of light emission on culture of *Spirulina platensis* and production of pigments (chlorophyll, phycocyanin, allophycocyanin and carotenoids) at 28 ° C, pH of 9, in submerged culture in a stirred tank photobioreactor was studied.

Results: The results showed that increasing the exposure time is a growth stimulant in spirulina and by increasing the exposure time, the concentrations of biomass, chlorophyll, phycocyanin, allofycocyanin and carotenoids are increased significantly ($p < 0.05$). In the end days of cultivation, cell density increased the effect of surface shading on depth and the penetration of light into the depth of cultivation was reduced that affected the chlorophyll content. The 24-hour exposure period showed the highest concentrations of biomass, phycocyanin, allofycocyanin at 1.46 g/l, 145 and 39.57 mg/l, respectively, while the 16-hour exposure period had the highest concentrations of chlorophyll and carotenoids at 8.62 and 3.55 mg/l, respectively.

Conclusion: Generally, using of a 24-hour exposure period increases the production of pigments and biomass. However, the production of chlorophyll and carotenoid pigments decreased at the end of the cultivation period due to the increase in biomass concentration and the reduction of light penetration in the 24-hour light treatment.

Keywords: *Light exposure, Photobioreactor, Phycocyanin, Spirulina platensis.*

* Corresponding Author: m.jahadi@khuisf.ac.ir