بهینه سازی 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)*

دلنیا فرجی[a]، کرامت اله رضایی[b]، مریم کلانتری[c*]، مهناز هاشمی روان[d]، محمد تقی گلمکانی[e]، نسرین فرجی[f]

[a] *دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*

[b] *استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

[c] *دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*

[d] *استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*

[e] *استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران*

[f] *دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۲/۱۸

چکیده

مقدمه: امروزه، استفاده از رنگ‌های طبیعی در مواد غذایی و دارویی اهمیت به سزایی دارد. فایکوسیانین به عنوان یک رنگدانه طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی از جلبک *اسپیرولینا* استخراج می‌گردد. به دلیل اثرات سمی گزارش شده از رنگ‌های سنتزی، دلایل مختلفی برای استفاده از رنگ‌های طبیعی در مصارف دارویی و غذایی وجود دارد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تولید فایکوسیانین در شرایط مختلف دما (°C ۳۰ و ۳۵) ، شدت نور متغیر (۲/۰ و ۳/۵ کیلولوکس)، نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول و اسید استیک) و روش کشت (مداوم و غیر مداوم) برای تولید حداکثر فایکوسیانین مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش‌هایی مطابق با روش فاکتوریل کامل در دو شرایط ثابت و متغیر بر روی نمونه ها انجام گردید.

یافته‌ها: نشان داد در روش غیر مداوم و نیمه مداوم غلظت منبع کربنی ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر و نور ۲/۰ کیلولوکس با افزایش دما از ۳۰ به ۳۵ درجه سلسیوس تولید فایکوسیانین در گلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش پیدا کرد. با استفاده از غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر منبع کربنی و نور ۳/۵ کیلولوکس، هر سه منبع در دمای۳۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی داری بین دو روش غیر مداوم و نیمه مداوم وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: در هر دو روش به دلیل نور بالا مقدار تولید فایکوسیانین بالا بود. البته مقدار تولید با استفاده از گلوکز بیشترین مقدار بود و استفاده از اتانول نیز با اختلاف ناچیز میزان تولید خوبی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *جلبک اسپیرولینا، روش های کشت غیرمداوم، فایکوسیانین، نیمه مداوم*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: kalantari.marya@gmail.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

امروزه روند رو به افزایشی در استفاده از رنگ‌های طبیعی در مصارف غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی وجود دارد. فایکوبیلی پروتئین‌ها[1] به عنوان رنگ‌های پروتئینی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی به‌کار می‌روند (Sousa *et al.*, 2008). *اسپیرولینا*[2] یک جلبک ساده تک سلولی است که در آبهای شیرین قلیایی بخوبی رشد می‌کند و با استفاده از فتوسنتز مواد غذایی ساخته شده را در خود ذخیره می‌کند. نام علمی *اسپیرولینا*، آرتروسپیراپلاتنیس می‌باشد و به دلیل شکل خاص آن *اسپیرولینا* نامیده می‌شود. *اسپیرولینا* به معنی فنر کوچک می‌باشد (Shetty *et al.*, 2008). در استفاده تجاری، نام معمول *اسپیرولینا* به توده سلولی خشک سیانوباکتری آرتروسپیرا پلاتنسیس اطلاق می‌گردد و یک محصول کامل با نام بیولوژی می‌باشد. در استفاده علمی *اسپیرولینا* عنوانی است جهت توضیح دو گونه سیانوباکتری، *اسپیرولینا* پلاتنسیس و *اسپیرولینا* ماکسیما استفاده می شود (Colla & Reinehr, 2007). از جمله فواید *اسپیرولینا* تقویت کننده سیستم ایمنی، کنترل کلسترول، بهبود عملکرد سیستم گوارش و کمک به هضم غذا، کاهش خطر ابتلا به سرطان و فعالیت آنتی اکسیدان و تولید رنگدانه فایکوسیانین، به عنوان ضدویروسی، مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدها، محافظت کننده کبد و ضد التهاب و تعدیل کننده سیستم ایمنی بدن می‌توان نام برد (Herreo & Fores, 2008). پودر *اسپیرولینا* برای تولید انواع مختلف مواد غذایی مانند سوپ‌ها، سس‌ها، پاستا، اسنک‌ها، نوشیدنی‌های فوری، شکلات‌ها و آبنبات‌ها، آدامس‌ها، ویفر، بیسکوئیت، نان، کیک، آرد غنی شده با پروتئین جلبک کاربرد دارد و همچنین در محصولات تخمیری مانند دوغ، پنیر، ماست، توفو و همچنین به شکل قرص و کپسول مورد استفاده قرار می‌گیرد (Renaud *et al.*, 1999).

فایکوسیانین[3] به گروهی از پروتئین‌های گیرنده نور به عنوان فایکوبیلی پروتئین‌ها تعلق دارد. تمامی فایکوبیلی پروتئین‌ها، از چند زنجیره از آپوپروتئین‌ها تشکیل شده است که به طور کووالانسی به فایکوبیلین‌ها متصل‌اند. فایکوبیلی پروتئین‌ها رنگدانه‌های تتراپیرولی با زنجیره‌های باز هستند. سه فایکوبیلی پروتئین معمول فایکواریترین[4] (PE)، فایکوسیانین (PC) و آلوفایکوسیانین[5] (APC) می‌باشند (Maccoll, 1998). فایکوسیانین معمولاً در صنعت غذا به عنوان رنگ خوراکی در امولسیفایر، عامل تغلیظ کننده و عامل ژل‌ساز به منظور جایگزین کردن آن با رنگ‌های سنتزی کاربرد دارد (Vonshak,1977).

همچنین در صمغ خوراکی، محصولات لبنی، شربت یخی، ژلها و مواد آرایشی مثل رژلب و خط چشم 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 آب نبات‌های پوشش‌دار می‌دهد (Jespersen, 2005). همچنین از این رنگدانه به عنوان رنگ‌های آرایشی و مارکرهای درخشان در تحقیقات پزشکی استفاده می‌شود (Vonshak, 1977). چن و زانگ (۱۹۹۷)، امکان استفاده از کشت میکسوتروف با استفاده از سیستم نیمه مداوم جهت به دست آوردن غلظت سلولی بالا و میزان تولید بیشتر فایکوسیانین را مورد بررسی قرار دادند. در روش میکسوتروف و سیستم نیمه مداوم بالاترین غلظت سلولی ۱/۰۲۴ گرم بر لیتر (وزن خشک) و بیشترین مقدار فایکوسیانین ۷۹۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. در روش هتروتروف غیر مداوم تولید فایکوسیانین ۱۳۵ میلی‌گرم بر لیتر و نرخ رشد ثابت بوده است. در مقایسه با این روش، در روش میکسوتروف غیر مداوم محتوای تولید فایکوسیانین ثابت نبوده و از ۵۴ به ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت. در روش میکسوتروف غیرمداوم بیشترین تولید فایکوسیانین در حضور بیشترین غلظت سلولی مشاهده شد. کولا و رینهر(۲۰۰۷) در زمینه تولید *اسپیرولینا* پلاتنسیس، تأثیر دماهای مختلف (۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس) و غلظت نیتروژن بر توده سلولی و تولید پروتئین، لیپید و ترکیبات فنولی بررسی کردند. در دمای ۳۰ درجه سلسیوس مقدار توده سلولی ۰/۹۲ـ۰/۸۲ گرم بر لیتر و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، این مقدار ۰/۶۵ـ۰/۵۹ گرم بر لیتر بدست آمد. در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با کاهش غلظت نیترات سدیم در محیط کشت تاثیر نامناسبی بر میزان بهره دهی بوجود نیامد و غلظت نیترات سدیم در محیط کشت تاثیر معنی‌داری بر تولید پروتئین، لیپید و ترکیبات فنولی داشت.

[1] Phycobiliprotein [2] *Spirulina* [2] Phycocyanin [4] Phycoerytrin [5] Allophycocyanin

jftn.srbiau.ac.ir

با کاهش غلظت نیترات سدیم پروتئین و لیپید سلول کاهش پیدا کرد. در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با افزایش غلظت نیتروژن مقدار ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت. بنابراین به طور خلاصه دمای ۳۵ درجه سلسیوس تاثیر خوبی بر تولید پروتئین، لیپید و ترکیبات فنولی داشت. ولی اثر چندان مناسبی بر تولید توده سلولی مشاهده نشد. بالاترین مقدار این ترکیبات در محیط کشت زاروک حاوی ۱/۸۷ یا ۲/۵ گرم بر لیتر نیترات سدیم به دست آمد. براساس این آزمایش بیشترین توده سلولی و بالاترین میزان بهره‌دهی در دمای۳۰ درجه سلسیوس مشخص گردید.

هدف از این تحقیق بهینه سازی عوامل مختلف (مقدار منبع کربنی، روش کشت، دما و شدت نور) بر تولید فایکوسیانین با بازدهی بالا توسط ریز جلبک *اسپیرولینا* پلاتنسیس بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش جلبک *اسپیرولینا* پلاتنسیس *(Arthrospira platensis)* از کلکسیون میکروبی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (شماره کالچر ATCC 29408) جمع آوری شد. محیط کشت آماده شده بر اساس محیط کشت سچلوسر با کمی تغییرات تهیه شد (Andrade *et al.*, 2007). محیط کشت مذکور شامل دو محلول ۱ و ۲ (محلول اول به دلیل وجود ترکیبات بیکربنات سدیم و کربنات سدیم به شدت قلیایی بوده که منجر به تخریب ترکیبات مغذی موجود در محلول دوم می‌گردند) بود. محلول ۱ که حاوی ۱۳/۶۱ گرم بیکربنات سدیم، ۴/۰۳ گرم کربنات سدیم، ۰/۵۰ گرم فسفات پتاسیم و محلول ۲ شامل ۱/۰۰ گرم سولفات پتاسیم، ۰/۲۰ گرم سولفات منیزیم هفت آبه، ۰/۰۴ کلرید کلسیم دو آبه، ۰/۰۱ گرم 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 ۱ میلی لیتر محلول از قبل آماده شده عناصر معدنی و محلول ویتامین B_{12} اضافه شد. به منظور اعمال متغیرها در محیط کشت، سه نوع منبع کربنی حاوی ۱/۰۰ گرم بر میلی‌لیتر گلوکز، ۰/۷۹گرم بر میلی لیتر اتانول و ۱/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر اسید استیک به محلول اضافه شد. به میزان ۱۵۰ میلی گرم در لیتر جلبک به محیط کشت اضافه شد (Rangel-Yagui *et al.*, 2004). سپس محیط کشت تحت نور و هوادهی کنترل شده قرار گرفت و رشد جلبک آغاز شد. کنترل شدت نور توسط لوکس متر و هوادهی توسط پمپ های هوادهی انجام گردید. در طول مدت کشت دمای محیط توسط دماسنج کنترل و میزان آن بین ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس تنظیم گردید (Soletto *et al.*, 2004).

- افزودن منبع کربنی

خوراک دهی منبع کربنی به دو روش بچ[1] و فدبچ[2] صورت گرفت. در روش بچ منبع کربنی در روز صفر به طور کامل به محیط کشت اضافه گردید. ولی در روش فدبچ خوراک دهی بصورت لگاریتمی در روزهای ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ صورت گرفت. کل دوره کشت ۱۴ روز بوده که خوراک دهی در این روش به فاصله ۲ روز انجام گرفت (Soletto *et al.*, 2004).

- اندازگیری فایکوسیانین

جلبک رشد یافته در محیط کشت پس از رسیدن به فاز سکون به روش پمپ خلاء از محیط کشت جداسازی و در انکوباتور دمای۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. بعد از خشک شدن ۴۰ میلی‌گرم از *اسپیرولینا* با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار و pH=۷/۵) مخلوط و کاملاً یکنواخت گردید (۳). نمونه‌ها در دمای۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید و سپس با دور ۴۰۰۰RPM به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. در آخر فاز رویی را جدا کرده و با دستگاه اسپکتروفتومتری میزان جذب در طول موج ۶۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد فایکوسیانین طبق روش بوسیبا و ریچموند (۱۹۹۷) از رابطه (۱) محاسبه گردید.

$$\%\text{Phycocyanin} = \frac{A615.na.100}{3.36.(mg\ sample).(\%dry\ wt)}$$

رابطه(۱)

na: تعداد رقت‌ها

برای تعیین ماده خشک طبق روش بوسیبا و ریچموند (۱۹۹۷) عمل شد.

[1] Batch [2] Fed Batch

jtn.srbiau.ac.ir

- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها مطابق طرح فاکتوریل کامل، در شرایط ثابت روش کشت میکسوتروف، حجم هوادهی vvm ۵ (حجمی حجمی در دقیقه)، غلظت مایه تلقیح ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و همچنین شرایط متغیر شامل نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول و اسید استیک)، روش افزودن منبع کربنی در دو سطح (غیر مداوم و نیمه مداوم)، نور در دو سطح (۲/۰ و ۳/۵ کیلولوکس) و دما در دو سطح (۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و بر اساس دستورالعمل مدل خطی عمومی (GLM) و با آزمون مقایسه میانگین‌های حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۹۵ درصد اطمینان انجام گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 نسخه ۱۴ ترسیم گردیدند.

یافته‌ها

در جدول ۱ داده‌های مربوط به بررسی تولید فایکوسیانین در شرایط مختلف (دما و روش افزودن منبع کربنی) در شدت نور متغیر (۲/۰ و ۳/۵ کیلولوکس) نشان می دهد. در شکل (۱–a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان داده شده است. در شکل (۱–b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان داده شده است. در شکل(۲– a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان داده شده است. در شکل (۳–b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان می‌دهد. در روش نیمه مداوم شکل (۳–a) با مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان داد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را داشتند.

بحث

- بررسی تولید فایکوسیانین در شرایط مختلف (دما و روش افزودن منبع کربنی) در شدت نور متغیر (۲/۰ و ۳/۵ کیلولوکس)

جدول ۱ داده های مربوط به میزان تولید فایکوسیانین را در شرایط ثابت غلظت مایه تلقیح ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر وغلظت منبع کربنی ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر، هوادهی vvm ۵ و شرایط متغیر روش کشت (مداوم[1] و غیر مداوم[2])، نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول و اسید استیک)، شدت نور (۲/۰ و ۳/۵ کیلولوکس) و دما (۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس) را نشان می دهد.

- اثر منبع کربنی (در شدت نور ۲/۰ کیلولوکس، دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

در شکل (۱–a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان داده شده است. با استفاده از منبع کربنی گلوکز با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش پیدا کرد. در دمای ۳۰ درجه سلسیوس میزان فایکوسیانین ۲۸/۰۵ درصد بود که به مقادیر ۷/۷۲ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کاهش یافت. با استفاده از منبع کربنی اتانول و اسید استیک نیز وضعیت مشابه رخ داد و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش یافت. نتایج نشان داد که در روش غیر مداوم، غلظت منبع کربنی ۱/۰ میلی لیتر و نور ۲/۰ کیلولوکس و هر سه منبع در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیانین را دارا بود و افزایش دما اثر ممانعت کننده بر تولید فایکوسیانین داشت و این آزمون مطالعات دانسی و همکارانش (۲۰۰۲) را تایید کرد که آنان دمای ۳۰ درجه سلسیوس را به عنوان دمای بهینه مشخص کردند. مقایسه سه منبع کربنی در روش غیر مداوم و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان داد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین را داشت و اتانول با اختلاف ناچیز رتبه دوم و اسید استیک رتبه سوم را به خود اختصاص دادند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۲۸/۰۵، ۲۶/۵۲ و ۲۰/۸۷ بدست آمد). مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۵

[1] Batch [2] Fedbatch

jftn.srbiau.ac.ir

درجه سلسیوس نشان می‌دهد که اتانول بیشترین تولید فایکوسیانین و اسید استیک رتبه دوم و گلوکز کمترین تولید

جدول ۱- اثر غلظت منبع کربنی، دما و روش کشت بر میزان تولید فایکوسیانین در شدت نورهای متغیر (۲/۰ و ۳/۵ کیلولوکس)

آزمایش	روش افزودن	نوع منبع کربنی	شدت نور (کیلولوکس)	دما (درجه سلسیوس)	فایکوسیانین (٪) * (انحراف معیار± میانگین)
۱	غیرمداوم	گلوکز	۲/۰	۳۰	۲۸/۰۵ ± ۰/۲۳
۲	غیرمداوم	اتانول	۲/۰	۳۰	۲۶/۵۲ ± ۰/۰۵
۳	غیرمداوم	اسید استیک	۲/۰	۳۰	۲۰/۸۷ ± ۰/۱۶
۴	غیرمداوم	گلوکز	۲/۰	۳۵	۷/۷۲ ± ۰/۲۸
۵	غیرمداوم	اتانول	۲/۰	۳۵	۱۷/۰۷ ± ۰/۷۲
۶	غیرمداوم	اسید استیک	۲/۰	۳۵	۱۲/۹۵ ± ۰/۹۳
۷	نیمه مداوم	گلوکز	۲/۰	۳۰	۲۹/۲۸ ± ۰/۲۸
۸	نیمه مداوم	اتانول	۲/۰	۳۰	۲۰/۸۷ ± ۰/۵۷
۹	نیمه مداوم	اسید استیک	۲/۰	۳۰	۲۲/۰۳ ± ۰/۰۳
۱۰	نیمه مداوم	گلوکز	۲/۰	۳۵	۹/۷۲ ± ۰/۴۴
۱۱	نیمه مداوم	اتانول	۲/۰	۳۵	۱۵/۷۷ ± ۰/۷۹
۱۲	نیمه مداوم	اسید استیک	۲/۰	۳۵	۱۶/۹۵ ± ۰/۳۵
۱۳	غیرمداوم	گلوکز	۳/۵	۳۰	۲۹/۳۳ ± ۰/۰۶
۱۴	غیرمداوم	اتانول	۳/۵	۳۰	۲۷/۰۵ ± ۰/۰۷
۱۵	غیرمداوم	اسید استیک	۳/۵	۳۰	۲۵/۰۵ ± ۰/۶۱
۱۶	غیرمداوم	گلوکز	۳/۵	۳۵	۱۵/۲۰ ± ۰/۵۲
۱۷	غیرمداوم	اتانول	۳/۵	۳۵	۲۳/۴۸ ± ۰/۷۱
۱۸	غیرمداوم	اسید استیک	۳/۵	۳۵	۱۳/۷۵ ± ۰/۷۹
۱۹	نیمه مداوم	گلوکز	۳/۵	۳۰	۳۰/۱۸ ± ۰/۰۳
۲۰	نیمه مداوم	اتانول	۳/۵	۳۰	۲۷/۹۹ ± ۰/۰۹
۲۱	نیمه مداوم	اسید استیک	۳/۵	۳۰	۲۳/۵۳ ± ۰/۸۰
۲۲	نیمه مداوم	گلوکز	۳/۵	۳۵	۲۴/۹۶ ± ۰/۴۵
۲۳	نیمه مداوم	اتانول	۳/۵	۳۵	۲۴/۱۱ ± ۰/۲۲
۲۴	نیمه مداوم	اسید استیک	۳/۵	۳۵	۲۲/۸۶ ± ۰/۳۲

را داشتند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۷/۷۲، ۱۷/۰۷ و ۱۲/۹۵ بود). بنابراین، در روش غیر مداوم غلظت منبع کربنی ۱/۰ میلی‌لیتر بر لیتر و نور ۲/۰ کیلولوکس با افزایش دما از ۳۰ به ۳۵ درجه سلسیوس تولید فایکوسیانین درگلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش پیدا کرد. یعنی در گلوکز اثر بازدارندگی افزایش دما بسیار مشهود بود.

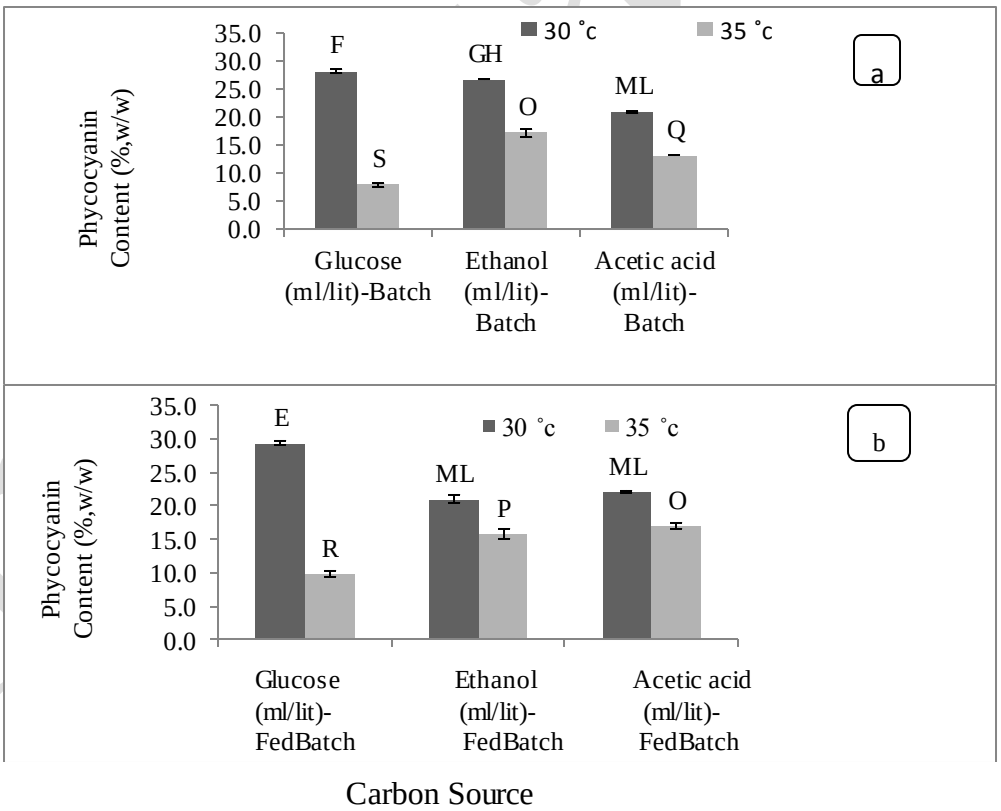
- اثر منبع کربنی (دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش نیمه مداوم) بر میزان تولید فایکوسیانین

در شکل (۱-b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان داده شده است. بررسی ها نشان داد که نتایج آزمون‌های روش فدبچ مشابه روش غیر مداوم بود و با استفاده از هر سه منبع کربنی افزایش دما تاثیر جدی درکاهش رنگدانه فایکوسیانین داشت و هر سه منبع کربنی در روش نیمه مداوم همانند روش غیر مداوم شکل (۱-a) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند و مقایسه سه منبع کربنی در روش غیر مداوم و نیمه مداوم نشان داد که حداکثرتولید فایکوسیانین در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود و این دما به عنوان دمای مناسب جهت تولید مشخص گردید.

مقایسه سه منبع کربنی در روش نیمه مداوم و دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان می‌دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین را داشت و بین اتانول و اسید استیک هم تفاوت معنی داری وجود نداشت. دمای ۳۰ درجه سلسیوس به عنوان فاکتور مهمی در تولید رنگدانه نقش به سزایی داشت (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۲۹/۲۸، ۲۰/۸۷ و ۲۲/۰۳ بود). مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس نشان

jtn.srbiau.ac.ir

داد که اسید استیک بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول رتبه دوم و گلوکز کمترین تولید را داشتند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۹/۷۲، ۱۵/۷۷ و ۱۶/۹۵ بدست آمد). همچنین در روش نیمه مداوم همانند روش غیر مداوم در غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر و نور ۲/۰ کیلولوکس با افزایش دما از ۳۰ به ۳۵ درجه سلسیوس تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش یافت و با استفاده از منبع کربنی گلوکز نسبت به سایر منابع کربنی افزایش دما اثر بازدارندگی بیشتری داشت. مقایسه شکل های (۱–b) و (۱–a) نشان داد که با استفاده از منبع کربنی گلوکز در دو روش کشت میزان تولید فایکوسیانین در روش نیمه مداوم در مقایسه با غیر مداوم بالاتر بود و با توجه به اینکه تغذیه بافت سلولی بطور یکنواخت و مداوم صورت می گیرد، روش نیمه مداوم به عنوان روش مناسب تری جهت تولید مشخص شد. البته این مسئله در خصوص دو منبع کربنی دیگر صدق نمی کند و در منبع کربنی اسید استیک آنالیز آماری نشان داد تفاوت معنی داری بین این دو روش وجود ندارد. میزان تولید فایکوسیانین در روش بچ ۲۰/۸۷ درصد و در روش نیمه مداوم این میزان ۲۰/۰۳ درصد بدست آمد. نتایج نشان داد که در منبع کربنی اتانول در روش نیمه مداوم کاهش پیدا کرد. این مورد استثنا نمی تواند نقص روش نیمه مداوم را نشان دهد. لازم به ذکر است در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با مقایسه شکل های (۱–b) و (۱–a) در هر سه منبع کربنی میزان تولید در روش نیمه مداوم بالاتر از روش غیر مداوم بود. همچنین در دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس گلوکز و اسید استیک بالاترین تولید را در روش نیمه مداوم دارا بودند اما اتانول بالاترین تولید را در روش غیر مداوم داشت. نتایج کلی شکل ۱ نشان داد که دمای ۳۰ درجه سلسیوس و منبع کربنی گلوکز شرایط مناسب جهت تولید فایکوسیانین از جلبک *اسپیرولینا* داشتند.



شکل ۱- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) در حضور غلظت‌های متفاوتی از منابع کربنی مختلف در دو محیط کشت غیر مداوم (a) و نیمه مداوم (b) شرایط عمومی کشت: نور ۲klx، هوادهی vvm ۵، غلظت مایه تلقیح ۱۵۰ mg/lit، غلظت منبع کربنی ml/lit ۱ (۱/۰۰ g/lit گلوکز، ۰/۷۹g/lit اتانول و ۱/۰۵ g/lit اسید استیک)

- اثر منبع کربنی (در شدت نور ۳/۵ کیلولوکس، دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

در شکل (۱- a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان داده شده است. با استفاده از منبع کربنی گلوکز در دمای۳۰ درجه سلسیوس میزان فایکوسیانین ۲۹/۳۳ درصد بود که به مقدار ۱۵/۲ درصد در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کاهش پیدا کرد. 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 غیر مداوم (با استفاده از منبع کربنی با غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر و نور ۳/۵ کیلولوکس) هر سه منبع در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند. مطالعات نشان داد که دمای ۳۰ درجه سلسیوس در نور ۳/۵ کیلولوکس مانند ۲/۰ و ۵/۰ کیلولوکس دمای خوبی جهت تولید رنگدانه فایکوسیانین می‌باشد. در مطالعاتی که توسط کولا و رینهر (۲۰۰۷) و دانسی و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت. به نتایج مشابه آزمایش انجام شده در پژوهش حاضر دست یافتند و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به عنوان دمای مناسب جهت تولید رنگدانه فایکوسیانین مشخص شد. مقایسه سه منبع کربنی در روش غیر مداوم و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان داد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول و اسید استیک با اختلاف ناچیز رتبه دوم وسوم را به خود اختصاص دادند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۲۹/۳۳، ۲۷/۰۵ و ۲۵/۰۵ بود). در شکل‌های ۱ و ۲ نیز نتایج مشابهی حاصل گردید و گلوکز به عنوان منبع کربنی بهینه جهت مکانیسم فتوسنتز و تولید رنگدانه شناخته شد. مقایسه سه منبع کربنی در روش بچ و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس نشان داد که اتانول بیشترین تولید فایکوسیانین و گلوکز رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را دارا بودند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۱۵/۲۳، ۲۳/۴۸ و ۱۳/۷۵ بود). در نهایت نتیجه گرفته شد که در روش غیر مداوم (با استفاده از منبع کربنی در غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر و نور ۳/۵ کیلولوکس) با افزایش دما از ۳۰ به ۳۵ درجه سلسیوس تولید 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.

- اثر منبع کربنی (در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

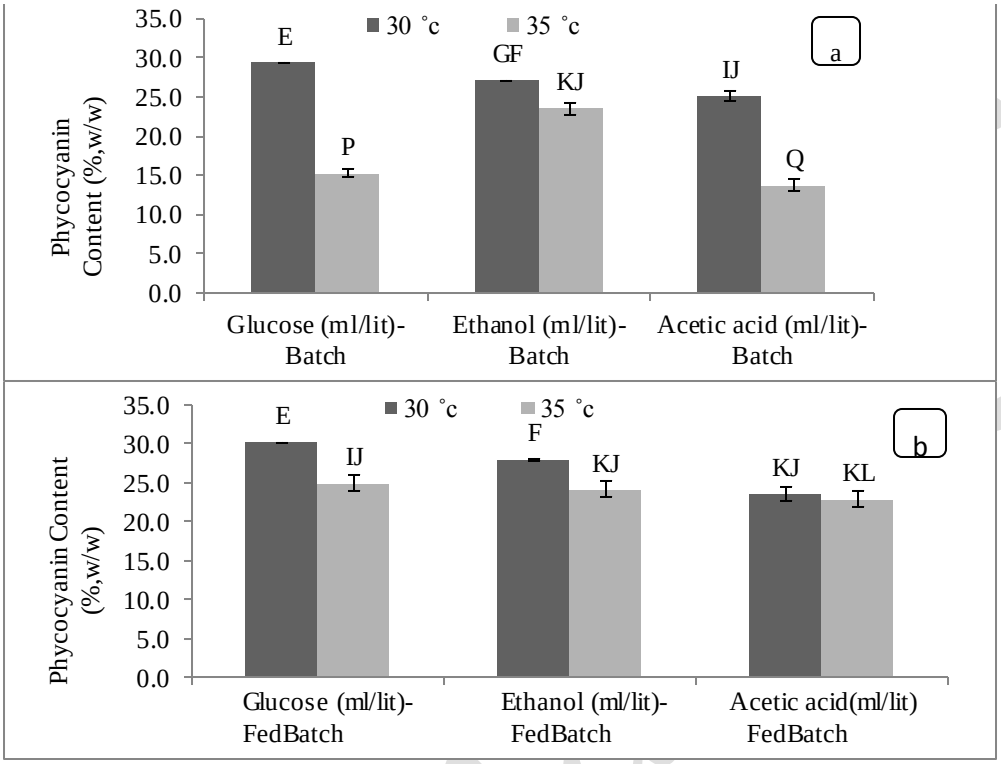
در شکل (۲-b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس و روش غیر مداوم نشان می‌دهد. با استفاده از منبع کربنی گلوکز مشابه روش غیرمداوم با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش پیدا کرد. در دمای ۳۰ درجه سلسیوس میزان فایکوسیانین ۳۰/۱۸ درصد بود که به مقدار ۲۴/۹۶ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کاهش یافت. در منبع کربنی اتانول نیز وضعیت به همین منوال بود. البته در اسید استیک افزایش دما تاثیری در میزان تولید نداشت. با افزایش دما اختلاف معنی‌داری بین مقادیر فایکوسیانین تولید شده مشاهده نشد.

در روش نیمه مداوم شکل (۲-a) با مقایسه سه منبع کربنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان داد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین و اتانول رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را داشتند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۳۰/۱۸، ۲۷/۹۹ و ۲۳/۵۳ بود).

در دمای ۳۵ درجه سلسیوس مقایسه سه منبع کربنی نشان داد که بین هر سه منبع کربنی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و میزان تولید حداکثر بود (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب ۲۴/۹۶، ۲۴/۱۱ و ۲۲/۸۶ بود). نتایج شکل‌های (۲-b) و (۲-a) نشان داد که با استفاده از غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر منبع کربنی و نور ۳/۵ کیلولوکس، هر سه منبع در دمای۳۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی داری بین دو روش غیر مداوم و نیمه مداوم وجود نداشت و در هر دو روش به دلیل نور بالا مقدار تولید فایکوسیانین بالا بود. البته مقدار تولید با استفاده از گلوکز بیشترین مقدار بود و استفاده از اتانول نیز با اختلاف ناچیز میزان تولید خوبی را نشان داد.

jfn.srbiau.ac.ir

مقایسه روش‌های غیر مداوم و نیمه مداوم در دمای ۳۵ درجه سلسیوس نشان داد که با استفاده از منبع کربنی



شکل ۲- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) در حضور غلظت‌های متفاوتی از منابع کربنی مختلف در دو محیط کشت غیر مداوم(a) و نیمه مداوم (b) شرایط عمومی کشت: نور klx ۳/۵، هوادهی vvm ۵، غلظت مایه تلقیح mg/lit ۱۵۰ (a,b,c,d)، غلظت منبع کربنی ۱ ml/lit (۱/۰۰ g/lit گلوکز، ۰/۷۹g/lit اتانول و ۱/۰۵ g/lit اسید استیک)

گلوکز و اسید استیک میزان تولید فایکوسیانین در نیمه مداوم بیشتر از غیر مداوم بوده بود. لازم به ذکر است با استفاده از منبع کربنی اتانول، بین دو روش کشت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج کلی شکل ۲ نشان داد که دمای ۳۰ درجه سلسیوس و استفاده از منبع کربنی گلوکز و اتانول شرایط مناسب جهت تولید فایکوسیانین از جلبک *اسپیرولینا* دارا است و در دمای مذکور تفاوت چندانی بین روش های غیر مداوم و نیمه مداوم وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

در روش غیر مداوم و نیمه مداوم غلظت منبع کربنی ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر و نور ۲/۰ کیلولوکس با افزایش دما از ۳۰ به ۳۵ درجه سلسیوس تولید فایکوسیانین درگلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش پیدا کرد. در روش غیر مداوم (با استفاده از منبع کربنی با غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر و نور ۳/۵ کیلولوکس) هر سه منبع در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیانین را داشتند. با استفاده از غلظت ۱/۰ میلی لیتر بر لیتر منبع کربنی و نور ۳/۵ کیلولوکس، هر سه منبع در دمای۳۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی داری بین دو روش غیر مداوم و نیمه مداوم وجود نداشت و در هر دو روش به دلیل نور بالا مقدار تولید فایکوسیانین بالا بود. البته مقدار تولید با استفاده از گلوکز بیشترین مقدار بود و استفاده از اتانول نیز با اختلاف ناچیز میزان تولید خوبی را نشان داد.

منابع

Andrade, M. R. & Costa, J. A. V. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. Aquaculture, 264, 130-134.

Boussiba, S. & Richmond, A. (1979). Isolation and purification of phycocyanins from the blu–green alga *Spirulina platensis*. Archive of Microbiology, 120, 155-159.

jftn.srbiau.ac.ir

production using a Fed-batch system. Enzyme and Microbial Technology, 20, 221-224.

Colla, M. & Reinehr, C. H. O. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology, 98, 1489-1493.

Danesi, E. D. G., Deo, C ., Rangel-Yagui, J. C., decarvalho, M. & 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.

Herreo, A. & Fores, E. (2008). The cyanobacteria, Moleccular Biology-Gonomics and Evalution (Instead). Caister Academic press. ISBN 978-1.

Jespersen, L., Strqmdahl., L. D, Olsen, K. & Skibsted, L. H. (2005). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. European Food Research and Technology, 220, 261-266.

Maccoll, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. Journal of Structural Biology, 124, 311–334.

Rangel-Yagui, C., Deo, C., E. D. G, Danesi., J. C., de Carvalho, M. & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from Spirulina

Chen, F. & Zhang, Y. (1997). High cell density mixotorphic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin platensis: cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresource Technology, 92, 133-141.

Renaud, S.M., Thinh, L. V. & Parry, D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. Aquaculture., 170, 147–59.

Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A. & Levin, R. E. (2008). Food Biotechnology 2nd ed. Taylor and Francis Group, New York, P1982.

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. Aqualculture, 243, 217-224.

Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A. & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. Food Chemistry Research, 1, 1-37.

Vonshak, A. (1977). *Spriulina platensis* (Arthrospira): physicology, cell biology, and biotechnology. Taylor and Francis, London, 117-130.

jftn.srbiau.ac.ir

jftn.srbiau.ac.ir