

بهینه سازی کشت فدبچ منابع دو کربنی جدید (اتانول و اسید استیک) در تولید فایکوسیائین بوسیله ریز جلبک اسپیرولینا

دنیای فرجی¹، کرامت اله رضایی²، مهناز هاشمی روان¹، مریم کلانتری^{3*}، اکرم شریفی⁴، محمد تقی گلمکانی⁵، سهیلا فرجی¹

¹گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

²گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^{3*}باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

⁴گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

⁵استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: 1393/4/27

تاریخ دریافت: 1392/7/11

چکیده

در این مطالعه اثر نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول و اسید استیک)، شدت نور (2/0، 3/5، 5/0 کیلو لوکس)، روش کشت (بچ و فدبچ) و دما بر میزان تولید رنگدانه فایکوسیائین از اسپیرولینا بررسی شد. آزمایش‌هایی مطابق با روش فاکتوریل کامل در دو شرایط ثابت و متغیر بر روی 36 نمونه انجام گردید. نتیجه حاصل این بود که افزایش نور باعث افزایش تولید رنگدانه، درحالی که افزایش دما موجب کاهش تولید آن گردید. روش فدبچ نسبت به روش بچ مناسب تر بود و همچنین منبع کربنی گلوکز نیز نسبت به منابع اتانول و اسید استیک تأثیر بهتری بر تولید رنگدانه داشت. نتایج بدست آمده نشان داد که بهینه شرایط رشد جهت تولید این رنگدانه شامل روش کشت فدبچ، دما 30°C درجه سلسیوس و شدت نور 5 کیلو لوکس و منبع کربنی گلوکز (میلی لیتر بر لیتر) است که به حداکثر تولید فایکوسیائین (43/94) منجر شد. همچنین نور به عنوان مهمترین فاکتور موثر بر تولید رنگدانه پروتئینی مد نظر قرار گرفت. دما، روش کشت و نوع منبع کربنی به ترتیب در درجه های بعدی اهمیت قرار داشتند.

واژه های کلیدی: اسپیرولینا پلاتنسیس (*Arthrospira platensis*)، فایکوسیائین، روش کشت بچ و فدبچ

1- مقدمه

اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) به عنوان یک سیانوباکتریوم پلانکتونیک به طور گسترده در مناطق استوایی و غیر استوایی، در سطح بالای کرنات و بی کرنات و شرایط قلیایی (11 به بالا) رشد می کند. این جلبک به عنوان مکمل غذایی دارای خواص تغذیه ای گسترده ای می باشد با و حاوی 3-7% آب، 53-63% پروتئین، 4-6% لیپید، 17-25% کربوهیدرات، 8-13% خاکستر، 8-10% فیبر، 1-1/5% کلروفیل a و محدوده وسیعی ویتامین ها می باشد (1). نام علمی اسپیرولینا، آرتروسپیراپلاتینس می باشد و به دلیل شکل خاص آن اسپیرولینا نامیده می شود. اسپیرولینا به معنی فتر کوچک می باشد (14). آنالیز بیوشیمیایی سویه های اسپیرولینا نشان می دهد که این جلبک پتانسیل قابل توجهی در غذاهای عملگر و تغذیه انسان دارد. اسپیرولینا منبع غنی از پروتئین، ویتامین، اسیدهای آمینه ضروری، مواد معدنی، اسید چرب ضروری (اسید گامالیونولیک)، گلیکولیپید، سولفولیپیدها و نیز فیکوبیلین هایی مثل فایکوسیانین و دیگر ترکیبات فیتوشیمیایی می باشد (8). پودر اسپیرولینا برای تولید انواع مختلف مواد غذایی مانند سوپ ها، سس ها، پاستا، اسنک ها، نوشیدنی های فوری، شکلات ها و آبنبات ها، آدامس ها، ویفر، بیسکویت، نان، کیک، آرد غنی شده با پروتئین جلبک کاربرد دارد (13).

اسپیرولینا حاوی فایکوسیانین می باشد که یک پیگمان آبی رنگ ضروری برای فتوسنتز و از خانواده فایکوبیلی پروتئین هاست. فایکوبیلی پروتئین ها گروهی از پروتئین های رنگی آبدوست، دارای تابش مقاوم و به شدت رنگی و درخشان می باشند (8). فایکوسیانین اسپیرولینا توسط یک شرکت ژاپنی تحت نام Blue Lina تجاری شده است. فایکوسیانین یک پودر آبی رنگ غیرسمی بدون بو و به لحاظ مزه کمی شیرین می باشد این رنگدانه هنگامی که در آب حل می شود تابش درخشان مایل به قرمز ضعیفی دارد و در محدوده pH 4/5 الی 8 و تا دمای 60 درجه سلسیوس پایدار است ولی در برابر نور چندان پایدار نمی باشد (16). فایکوسیانین معمولاً در صنایع غذایی و داروسازی به عنوان رنگ خوراکی، عامل تغلیظ کننده و عامل ژل ساز به منظور جایگزین کردن آن با رنگ های سنتزی کاربرد دارد (16). فایکوسیانین به تصفیه خون، غلبه بر آنمی (کم خونی)، یبوست، ترمیم زخم ها، تنظیم سوخت و ساز بدن و سم زدایی کمک

می کند. این ماده حاوی گلیکوژن است که قادر به تولید سریع انرژی می باشد بدون اینکه موجب کاهش قند خون گردد (9 و 17). جوجینیکا و همکاران (2004) تأثیر شدت نور و غلظت گلوکز بر سرعت رشد اسپیرولینا در شرایط فتواتوتروف، هتروتروف و میکسوتروف را بررسی کردند. سرعت رشد ویژه جلبک در 2/5 گرم بر لیتر گلوکز، به طور مشخصی با افزایش شدت نور تا 30 وات بر متر مربع افزایش یافت. در کشت های فتواتوتروف در نور بالاتر از 50 وات بر متر مربع رشد جلبک کاهش یافت. مطالعات نشان داد که شدت نور مورد نیاز برای کشت اتوتروف 30-50 وات بر متر مربع و برای میکسوتروف بیشتر از 30 وات بر متر مربع و همچنین غلظت گلوکز برای کشت هتروتروف و میکسوتروف بیشتر از 0/5 گرم بر لیتر بوده است (5). مدهایستیا و همکاران (2007) بررسی در اسپیرولینا فوزی فورمیس¹ بر منابع نوری مختلف و در رنگدانه های مهم آن انجام دادند. در این آزمون سامانه کشت مداوم در بیوراکتور به کار گرفته شد. کشت با مایه تلقیح اولیه 0/2 گرم بر لیتر در محیط کشت زاروک تحت منابع نوری مختلف انجام شد. حداکثر بهره وری بایومس روزانه به ترتیب برای نور سفید، نور آبی و نور سبز به ترتیب 0/8، 0/75 و 0/69 گرم بر لیتر به دست آمد. تحت نور سفید حداکثر مقدار کلروفیل 5/5 میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. در حالیکه دیگر رنگدانه ها تغییر چشم گیری نشان ندادند (11).

هدف از این تحقیق بررسی اثر عوامل مختلف (نوع منبع کربنی، روش کشت، دما و شدت نور) بر تولید فایکوسیانین و بهینه سازی عوامل مذکور در کشت برای تولید حداکثر فایکوسیانین توسط ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بود.

2 - مواد و روش ها

در این پژوهش جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از کلکسیون میکروبی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران مطابق کشت سچلوسر با کمی تغییرات تهیه گردید. (2). تمام ترکیبات مورد استفاده برای محیط کشت ها فود گرید و از برندهای مرک (Darmstadt, Germany)، سیگما آلدریج (St. Louis, MO, USA) و مجللی (Tehran, Iran) تهیه شد.

¹ S. Fussiformis

به مدت 30 دقیقه در دمای 10 درجه سلسیوس سانتریفوژ (مدل Gerhardt ساخت کشورسویس) شد. در آخر فاز رویی را جدا کرده و با دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Secomam ساخت کشور فرانسه) میزان جذب در طول موج 615 نانومتر اندازه گیری شد. درصد فایکوسیانیین طبق روش بوسییا و ریچموند (1997) از رابطه (1) محاسبه گردید (3).

$$\% \text{Phycocyanin} = \frac{A_{615} \cdot na \cdot 100}{3.36 \cdot (\text{mg sample}) \cdot (\% \text{dry wt})} \quad (1)$$

na: تعداد رقت‌ها

برای تعیین ماده خشک طبق روش بوسییا و ریچموند (1997) عمل شد.

2-3- آنالیز داده‌ها

آزمایش‌ها مطابق طرح فاکتوریل کامل، در شرایط ثابت روش کشت میکسوتروف، حجم هوادهی 2 vvm (حجمی حجمی در دقیقه)، غلظت مایه تلقیح 150 میلی گرم بر لیتر، غلظت منبع کربنی 1 میلی لیتر بر لیتر و دور همزن 100 rpm و همچنین شرایط متغیر شامل نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول و اسید استیک)، روش افزودن منبع کربنی در دو سطح (بیچ و فدیح)، نور در سه سطح (2/0، 3/5 و 5/0 کیلوکس) و دما در دو سطح (30 و 35 درجه سلسیوس) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه 9/1 و بر اساس دستورالعمل مدل خطی عمومی (GLM) و با آزمون مقایسه میانگین‌های حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح 95 درصد اطمینان انجام گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 نسخه 14 ترسیم گردیدند.

3- نتایج و بحث

3-1- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی گلوکز و

روش بیچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانیین
شکل (1a) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیچ بر میزان تولید فایکوسیانیین نشان می‌دهد. در دمای 30 درجه سلسیوس نور 2/0 کیلوکس، میزان تولید فایکوسیانیین 28/05 درصد بوده که با افزایش شدت نور به 3/5 و 5/0 کیلوکس، تولید این رنگدانه افزایش می‌یابد. در دمای 35 درجه سلسیوس نیز نتیجه مشابه دمای 30 درجه سلسیوس بدست

تمام ترکیبات محیط کشت مذکور شامل دو محلول 1 و 2 بود. محلول 1 که حاوی 13/61 گرم بیکربنات سدیم، 4/03 گرم کربنات سدیم، 0/50 گرم فسفات پتاسیم و محلول 2 شامل 1/00 گرم سولفات پتاسیم، 0/20 گرم سولفات منیزیم هفت آبه، 0/04 کلرید کلسیم دو آبه، 0/01 گرم EDTA بود که پس از ساخت در حجم 500 میلی لیتر دو محلول با هم مخلوط شده و محلول نهایی به دست آمد. به هر لیتر از محیط کشت 1 میلی لیتر محلول از قبل آماده شده عناصر معدنی و محلول ویتامین B₁₂ اضافه شد. به منظور اعمال متغیرها در محیط کشت، سه نوع منبع کربنی حاوی 1/00 گرم بر میلی لیتر گلوکز، 0/79 گرم بر میلی لیتر اتانول و 1/05 گرم بر میلی لیتر اسید استیک به محلول اضافه شد. به میزان 150 میلی گرم در لیتر جلبک به محیط کشت اضافه شد (12). سپس محیط کشت تحت نور و هوادهی کنترل شده قرار گرفت و رشد جلبک آغاز شد. کنترل شدت نور توسط لوکس متر (مدل Testo 540 ساخت کشور آلمان) و هوادهی توسط پمپ‌های هوادهی (مدل MEMERT ساخت کشور آلمان) انجام گردید. در طول مدت کشت دمای محیط توسط دماسنج (مدل O1A، ساخت کشور آلمان) کنترل و میزان آن بین 30 تا 35 درجه سلسیوس تنظیم گردید (15).

2-1- افزودن منبع کربنی

خوراک دهی منبع کربنی به دو روش بیچ و فدیح صورت گرفت. در روش بیچ منبع کربنی در روز صفر به طور کامل به محیط کشت اضافه گردید. ولی در روش فدیح خوراک دهی بصورت لگاریتمی در روزهای 0، 2، 4، 6، 8، 10 و 12 صورت گرفت. کل دوره کشت 14 روز بوده که خوراک دهی در این روش به فاصله 2 روز انجام گرفت (15).

2-2- اندازه گیری فایکوسیانیین

جلبک رشد یافته در محیط کشت پس از رسیدن به فاز سکون به روش پمپ خلاء از محیط کشت جداسازی و در انکوباتور (مدل 864، ساخت کشور آلمان) دمای 40 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت خشک شد. بعد از خشک شدن 40 میلی گرم از اسپیرولینا با 10 میلی لیتر بافر فسفات (100 میلی مولار و pH=7/5) مخلوط و کاملاً یکنواخت گردید (3). نمونه‌ها در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت نگهداری گردید و سپس با دور 4000RPM

مقدار فایکوسیانین در شدت نور 4/0 کیلولوکس به دست آمد (4).

3-1-1- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی گلوکز و

روش فدبج) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

شکل (1b) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و

روش فدبج بر میزان تولید فایکوسیانین نشان می دهد. در روش

فدبج مشابه روش بچ با افزایش شدت نور درصد تولید

فایکوسیانین افزایش می یابد.

در دمای 35 درجه سلسیوس نیز روند به همین منوال است با این

تفاوت که کلیه مقادیر فایکوسیانین تولید شده در دمای 35 نسبت

به 30 درجه سلسیوس کاهش چشمگیری دارند. نتایج شکل 1

نشان داد که استفاده از گلوکز به میزان 1/0 میلی لیتر بر لیتر به

عنوان منبع کربنی (در دمای 30 درجه سلسیوس، نور 5/0

کیلولوکس و روش فدبج) موجب تولید 43/94 درصد

فایکوسیانین شد که این میزان به عنوان حداکثر تولید رنگدانه

مشخص گردید.

آمد و با افزایش شدت نور از 2/0 به 3/5 و 5/0 مقادیر تولید از

7/72 به 15/20 و 24/80 درصد افزایش یافت. این مسئله نشان داد

که نور به عنوان فاکتور اصلی در فرآیند فتوسنتز موثر می باشد و

نسبت به سایر فاکتورها غالب است. از آنجا که فایکوسیانین

پیگمان فرعی فتوسنتز است. بنابراین حضور نور به عنوان فاکتوری

تاثیر گذار، منطقی به نظر می رسد. رنگل و همکاران (2004) به

نتایج مشابهی دست یافتند. آنان اثر نور 2/0 و 5/0 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

مهم ترین عامل تاثیر گذار بر رشد سلولی و میزان تولید

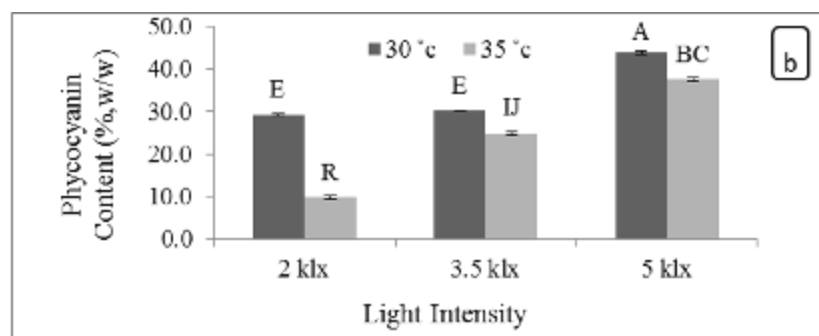
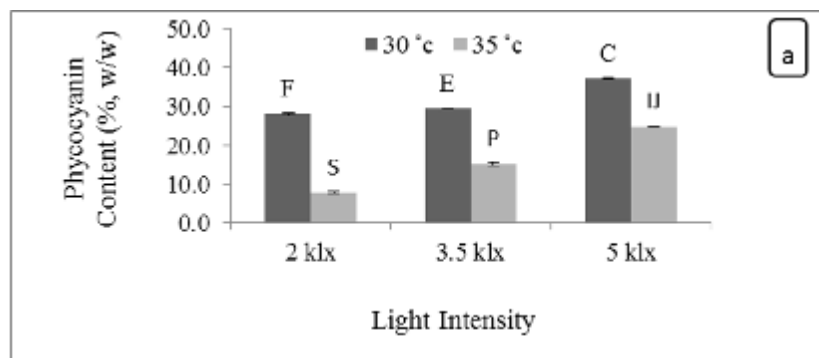
فایکوسیانین مشخص شد (12). چن و همکاران (1996) با مطالعه

ای که بر روی جلبک اسپیرولینا داشتند به این نتیجه رسیدند که

در کشت با روش فتوتروف با افزایش نور از 2/0 به 4/0

کیلولوکس مقدار تولید فایکوسیانین افزایش یافت. زمانی که

شدت نور به 2/0 کیلولوکس یا کمتر تقلیل پیدا کرد. بیشترین



شکل 1- مقادیر تولید فایکوسیانین (% w/w) با استفاده از گلوکز در شدت نورهای مختلف و دو محیط کشت بچ (a) و فدبج (b) شرایط

عمومی کشت: هوادهی 5 vvm، غلظت مایه تلقیح 150 mg/lit، غلظت گلوکز 1/00 g/lit

داده های موجود نشان می دهد با تغییر روش افزودن منبع کربنی همچنان شدت نور تاثیر مستقیم بر تولید رنگدانه دارد و این روند افزایشی در اتانول مشابه گلوکز در هر دو روش بیج و فدیج قابل توجه می باشد. لازم به ذکر است فاکتور دما اثر قابل توجهی بر تولید فایکوسیانین دارد. مقایسه شکل های 2 نشان دادند که با افزایش دما (از 30 به 35 درجه سلسیوس) با استفاده از منبع کربنی گلوکز و اتانول درصد تولید فایکوسیانین کاهش یافته و این روند در هر دو روش بیج و فدیج مشابه می باشد. بیشترین تولید فایکوسیانین در شکل 2 در شدت نور 5/0 کیلو لوکس، دمای 30 درجه سلسیوس و روش فدیج بدست آمد.

3-1-2- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی اتانول و

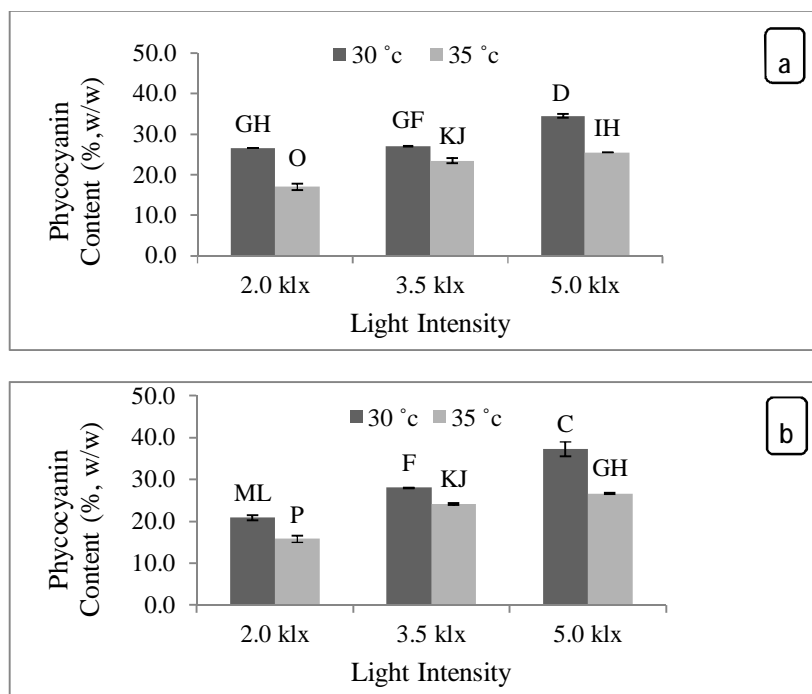
روش بیج) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

شکل (2a) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج بر روی میزان تولید فایکوسیانین را نشان می دهد. با استفاده از منبع اتانول (به میزان 1/0 میلی لیتر بر لیتر) در دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و افزایش شدت نور از 2/0 به 3/5 و 5/0 کیلو لوکس روند افزایشی در تولید مشاهده شد. البته قابل توجه است کلیه مقادیر فایکوسیانین در دمای 35 درجه سلسیوس کمتر از 30 درجه سلسیوس بود.

3-1-3- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی اتانول و

روش فدیج) بر تولید فایکوسیانین

شکل (2b) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش فدیج بر روی میزان تولید فایکوسیانین نمایش داده است.

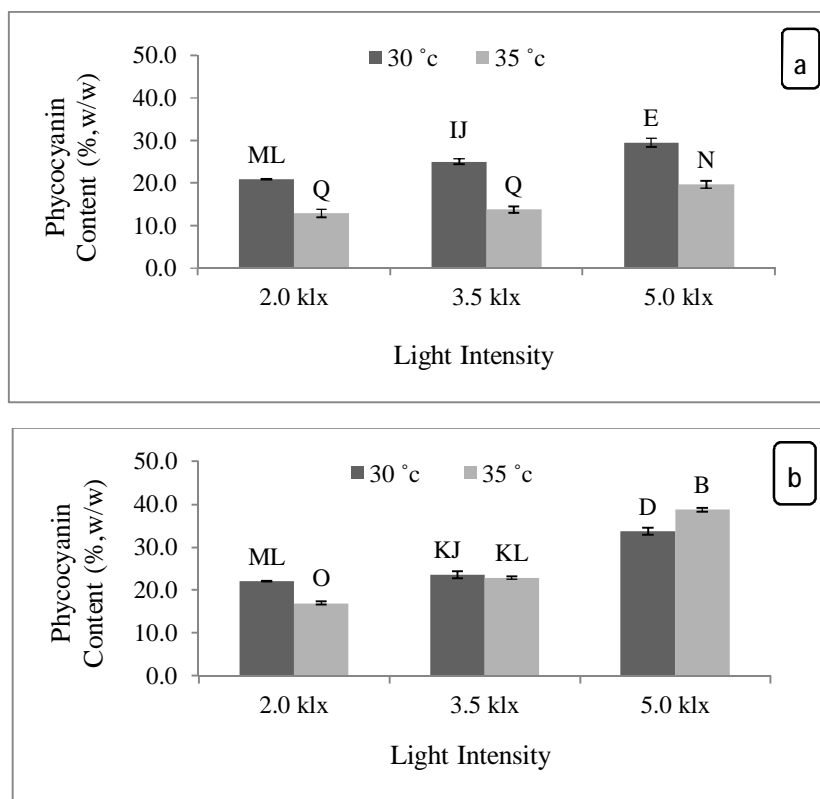


شکل 2- مقادیر تولید فایکوسیانین (% w/w) با استفاده از گلوکز در شدت نورهای مختلف و دو محیط کشت بیج (a) و فدیج (b) شرایط عمومی کشت: ،، هوادهی 5 vvm، غلظت مایه تلقیح 150 mg/lit، غلظت اتانول 0/79 g/lit

درجه سلسیوس کمتر از 30 درجه سلسیوس بوده است و در روش بیج، افزایش دما اثر عکس در میزان تولید فایکوسیانین داشت.

3-1-5- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی اسیداستیک و روش فدیج) بر میزان تولید فایکوسیانین
 شکل (3b) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج بر روی میزان تولید فایکوسیانین را نشان می دهد. با استفاده از اسید استیک هم (مانند گلوکز و اتانول) فاکتور نور به عنوان متغیر تاثیر گذار بر تولید فایکوسیانین مشخص گردید و در روش فدیج نیز افزایش نور اثر مستقیم بر تولید رنگدانه داشت.

3-1-4- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی اسیداستیک و روش بیج) بر میزان تولید فایکوسیانین
 شکل (3a) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج بر روی میزان تولید فایکوسیانین را نشان می دهد. استفاده از اسید استیک در دمای 30 و 35 درجه سلسیوس نشان داد که همانند دو منبع کربنی دیگر با افزایش شدت نور از 2/0 به 3/5 و 5/0 کیلوکس مقدار تولید افزایش می یابد و با استفاده از منبع کربنی اتانول همانند گلوکز با افزایش شدت نور مقدار تولید افزایش یافت. شکل (3a) مشابه شکل های 1 و 2 با استفاده از این منبع کربنی کلیه مقادیر فایکوسیانین بدست آمده در دمای 35



شکل 3- مقادیر تولید فایکوسیانین (% w/w) با استفاده از اسید استیک در شدت نورهای مختلف و دو محیط کشت بیج (a) و فدیج (b) شرایط عمومی کشت: هوادهی 5 vvm، غلظت مابه تلقیح 150 mg/lit، غلظت اسید استیک 1 ml/lit (1/05 g/lit)

3-2 اثر منبع کربنی (دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و

روش فدیج) بر میزان تولید فایکوسیائین

در شکل (4b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیائین در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج نشان داده شده است.

بررسی ها نشان می دهد که نتایج آزمون های روش فدیج مشابه روش بیج بوده و با استفاده از هر سه منبع کربنی افزایش دما تاثیر جدی در کاهش رنگدانه فایکوسیائین خواهد داشت و هر سه منبع کربنی در روش فدیج همانند روش بیج (نمودار 4-2-a) در دمای 30 درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیائین را دارند و مقایسه سه منبع کربنی در روش بیج و فدیج نشان می دهد که حداکثر تولید فایکوسیائین در دمای 30 درجه سلسیوس بوده و این دما به عنوان دمای مناسب جهت تولید مشخص گردید.

مقایسه سه منبع کربنی در روش فدیج و دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و بین اتانول و اسید استیک هم تفاوت معنی داری وجود ندارد و دمای 30 درجه سلسیوس به عنوان فاکتور مهمی در تولید رنگدانه نقش به سزایی داشت (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 29/28، 20/87 و 22/03 بوده است).

مقایسه سه منبع کربنی در دمای 35 درجه سلسیوس نشان می دهد که اسید استیک بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و اتانول رتبه دوم و گلوکز کمترین تولید را داشته است (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 15/77، 9/72 و 16/95 بدست آمد).

مشاهده شد که در روش فدیج همانند روش بیج در غلظت 1/0 میلی لیتر بر لیتر و نور 2/0 کیلو لوکس با افزایش دما از 30 به 35 درجه سلسیوس تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش یافته و با استفاده از منبع کربنی گلوکز نسبت به سایر منابع کربنی افزایش دما اثر بازدارندگی بیشتری دارد.

مقایسه دو شکل 4b و 4a نشان می دهد که با استفاده از منبع کربنی گلوکز در دو روش کشت میزان تولید فایکوسیائین در روش فدیج در مقایسه با بیج بالاتر بوده و با توجه به اینکه تغذیه بافت سلولی بطور یکنواخت و مداوم صورت می گیرد. روش فدیج به عنوان روش مناسب تری جهت تولید مشخص شد.

3-2 اثر منبع کربنی (در شدت نور 2/0 کیلو لوکس) بر روی

میزان تولید فایکوسیائین

3-2-1 اثر منبع کربنی (دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و

روش بیج) بر روی میزان تولید فایکوسیائین

در شکل (4a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیائین در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج نشان داده شده است.

با استفاده از منبع کربنی گلوکز با افزایش دما درصد تولید فایکوسیائین کاهش می یابد. در دمای 30 درجه سلسیوس میزان فایکوسیائین 28/05 درصد بوده که به مقادیر 7/72 در دمای 35 درجه سلسیوس کاهش یافته است.

با استفاده از منبع کربنی اتانول و اسید استیک نیز وضعیت مشابه رخ می دهد و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیائین کاهش می یابد.

نتایج نشان می دهد که در روش بیج، غلظت منبع کربنی 1/0 میلی لیتر و نور 2/0 کیلو لوکس، هر سه منبع در دمای 30 درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیائین را دارند و افزایش دما اثر ممانعت کننده بر تولید فایکوسیائین داشته و این آزمون مطالعات دانسی و همکارانش در سال 2002 را تایید کرد، که آنان دمای 30 درجه سلسیوس را به عنوان دمای بهینه مشخص کردند (7).

مقایسه سه منبع کربنی در روش بیج و در دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و اتانول با اختلاف ناچیز رتبه دوم و اسید استیک رتبه سوم را به خود اختصاص دادند (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 28/05، 26/52 و 20/87 بدست آمد).

مقایسه سه منبع کربنی در دمای 35 درجه سلسیوس نشان می دهد که اتانول بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و اسید استیک رتبه دوم و گلوکز کمترین تولید را دارد (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 7/72، 17/07 و 12/95 بود).

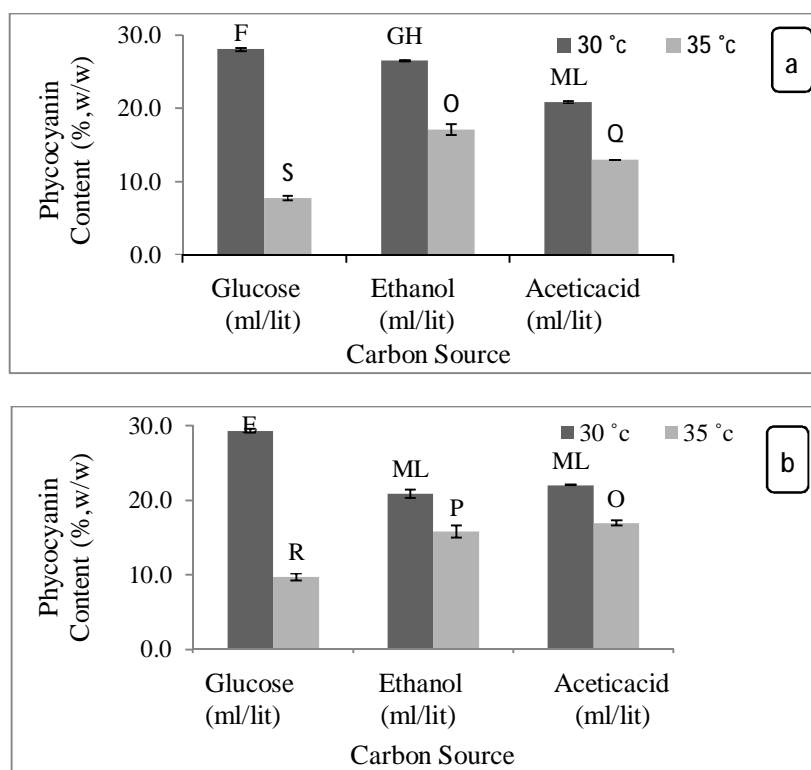
بنابراین، در روش بیج غلظت منبع کربنی 1/0 میلی لیتر بر لیتر و نور 2/0 کیلو لوکس با افزایش دما از 30 به 35 درجه سلسیوس تولید فایکوسیائین در گلوکز نسبت به دو منبع کربنی دیگر با سرعت بیشتری کاهش می یابد. یعنی در گلوکز اثر بازدارندگی افزایش دما بسیار مشهود است.

داده ها نشان می دهد در دماهای 30 و 35 درجه سلسیوس گلوکز و اسید استیک بالاترین تولید را در روش فدیج دارند. ولی اتانول بالاترین تولید را در روش بیج داشته و عکس این دو عمل می کند.

نتایج کلی شکل (4) نشان داد که دمای 30 درجه سلسیوس و منبع کربنی گلوکز شرایط مناسب جهت تولید فایکوسیانین از جلبک اسپیرولینا می باشد و منبع کربنی اتانول و اسید استیک هم با اختلاف ناچیز میزان تولید خوبی دارند.

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 بیج 20/87 درصد و در روش فدیج این میزان 20/03 درصد بدست آمد.

نتایج نشان می دهد که در منبع کربنی اتانول در روش فدیج کاهش تولید مشاهده شد. این مورد استثنا نمی تواند نقص روش فدیج را نشان دهد. لازم به ذکر است در دمای 35 درجه سلسیوس با مقایسه دو نمودار در هر سه منبع کربنی میزان تولید در روش فدیج بالاتر از روش بیج اعلام شد.



شکل 4- مقادیر تولید فایکوسیانین (% w/w) در حضور غلظتهای متفاوتی از منابع کربنی مختلف در دو محیط کشت بیج (a) و فدیج (b) شرایط عمومی کشت: نور 2klx، هوادهی 5 vvm، غلظت مایه تلقیح 150 mg/lit، غلظت منبع کربنی 1 ml/lit (1/00 g/lit گلوکز، 0/79 g/lit اتانول و 1/05 g/lit اسید استیک)

3-3 اثر منبع کربنی (در شدت نور 3/5 کیلولوکس) بر روی

میزان تولید فایکوسیائین

3-3-1 اثر منبع کربنی (دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و

روش بیج) بر روی میزان تولید فایکوسیائین

در شکل (5a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیائین در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج نشان داده شده است. با استفاده از منبع کربنی گلوکز در دمای 30 درجه سلسیوس میزان فایکوسیائین 29/33 درصد بوده که به مقدار 15/2 درصد در دمای 35 درجه سلسیوس کاهش می یابد. استفاده از منبع کربنی اتانول و اسید استیک نیز وضعیت به همین منوال است و با افزایش دما درصد تولید فایکوسیائین کاهش می یابد.

در روش بیج (با استفاده از منبع کربنی با غلظت 1/0 میلی لیتر بر لیتر و نور 3/5 کیلولوکس) هر سه منبع در دمای 30 درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیائین را دارند. مطالعات نشان می دهد که دمای 30 درجه سلسیوس در نور 3/5 کیلولوکس مانند 2/0 و 5/0 کیلولوکس دمای خوبی جهت تولید رنگدانه فایکوسیائین می باشد. در مطالعاتی که توسط کولا در سال 2007 و دانسی در سال 2002 انجام گرفت. به نتایج مشابه آزمایش انجام شده در پژوهش حاضر دست یافتند و 30 درجه سلسیوس به عنوان دمای مناسب جهت تولید رنگدانه فایکوسیائین مشخص شد (7 و 11).

مقایسه سه منبع کربنی در روش بیج و در دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و اتانول و اسید استیک با اختلاف ناچیز رتبه دوم و سوم را به خود اختصاص داده اند (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 29/33، 27/05 و 25/05 می باشد) در نمودارهای (1-4) و (2-4) 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 بیج و در دمای 35 درجه سلسیوس نشان می دهد که اتانول بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و گلوکز رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را دارد (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 15/23، 23/48 و 13/75 می باشد).

در نهایت نتیجه گرفته شد که در روش بیج (با استفاده از منبع کربنی در غلظت 1/0 میلی لیتر بر لیتر و نور 3/5 کیلولوکس) با

افزایش دما از 30 به 35 درجه سلسیوس تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز و اسید استیک نسبت به اتانول با سرعت بیشتری کاهش می یابد. با استفاده از گلوکز افزایش دما اثر ممانعت کننده بیشتری نسبت به سایر منابع کربنی دارد.

3-3-2 اثر منبع کربنی (در دمای 30 و 35 درجه

سلسیوس و روش فدیج) بر روی میزان تولید فایکوسیائین

در نمودار (5b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیائین در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بیج نشان می دهد. با استفاده از منبع کربنی گلوکز مشابه روش بیج با افزایش دما درصد تولید فایکوسیائین کاهش می یابد. در دمای 30 درجه سلسیوس میزان فایکوسیائین 30/18 درصد بوده که به مقدار 24/96 در دمای 35 درجه سلسیوس کاهش می یابد. در منبع کربنی اتانول نیز وضعیت به همین منوال است. البته در اسید استیک افزایش دما تاثیری در میزان تولید ندارد. با افزایش دما اختلاف معنی داری بین مقادیر فایکوسیائین تولید شده ملاحظه نمی شود.

در روش فدیج با مقایسه سه منبع کربنی در دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیائین را داشته و اتانول رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را دارد (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 30/18، 27/99 و 23/53 می باشد). در دمای 35 درجه سلسیوس مقایسه سه منبع کربنی نشان می دهد که بین هر سه منبع کربنی اختلاف معنی داری وجود ندارد و میزان تولید حداکثر می باشد (میزان تولید فایکوسیائین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 24/96، 24/11 و 22/86 بود).

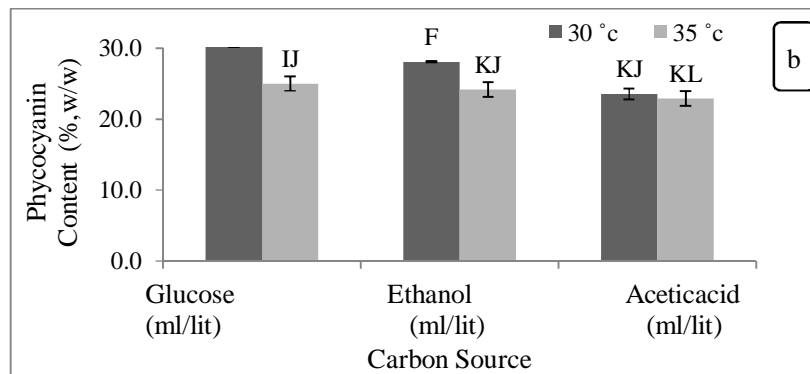
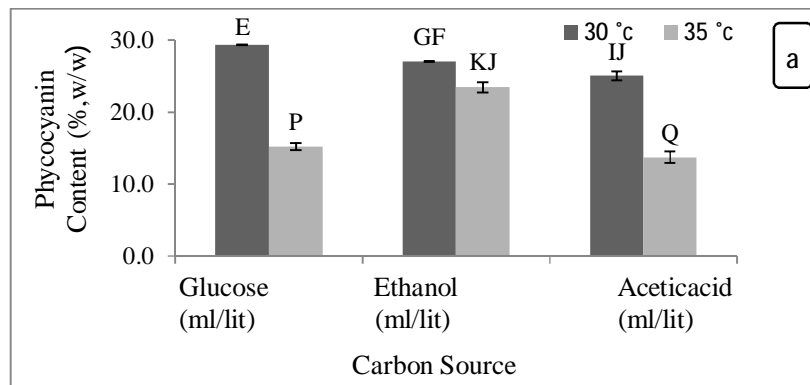
نتایج دو نمودار (5a) و (5b) نشان می دهد که با استفاده از غلظت 1/0 میلی لیتر بر لیتر منبع کربنی و نور 3/5 کیلولوکس، هر سه منبع در دمای 30 درجه سلسیوس تفاوت معنی داری بین دو روش بیج و فدیج وجود ندارد و در هر دو روش به دلیل نور بالا مقدار تولید فایکوسیائین بالاست. البته با استفاده از گلوکز مقدار تولید بیشترین مقدار بوده و استفاده از اتانول نیز با اختلاف ناچیز میزان تولید خوبی را نشان می دهد.

نتایج کلی نمودار (3-4) نشان داد که دمای 30 درجه سلسیوس استفاده از منبع کربنی گلوکز و اتانول شرایط مناسب جهت تولید فایکوسیائین از جلبک اسپیرولینا می باشد و در دمای مذکور تفاوت چندانی بین روش بیج و فدبیج وجود ندارد.

مقایسه روش بیج و فدبیج در دمای 35 درجه سلسیوس نشان می دهد که با استفاده از منبع کربنی گلوکز و اسید استیک میزان تولید فایکوسیائین در فدبیج بیشتر از بیج بوده است. لازم به ذکر است با استفاده از منبع کربنی اتانول، بین دو روش افزودن منبع کربنی اختلاف معنی داری وجود ندارد.

جدول 1- نتایج آنالیز آماری مدل خطی اثر متغیرهای مختلف (a) منبع کربنی، b نور، c دما و d روش افزودن منبع کربنی) بر میزان تولید فایکوسیائین (%)

p-value	f-value	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع
0/0284	3/76	65/32	130/65	2	نوع منبع کربنی (گلوکز، اتانول و اسید استیک)
0/0003	14/77	256/28	256/28	1	روش کشت (بج و فدبیج)
0/0001	71/53	1241/51	1241/51	1	دما (30 و 35 درجه سلسیوس)
0/0001	63/90	1109/12	2218/24	2	نور (2/0، 3/5 و 5/0 کیلو لوکس)



شکل 5- مقادیر تولید فایکوسیائین (% w/w) در حضور غلظتهای متفاوتی از منابع کربنی مختلف در دو محیط کشت بیج (a) و فدبیج (b) شرایط عمومی کشت: نور 3/5 klx، هوادهی 5 vvm، غلظت مایه تلقیح 150 mg/lit (a,b,c,d)، غلظت منبع کربنی 1 ml/lit (1/00 g/lit) گلوکز، اتانول و 1/05 g/lit اسید استیک

7. Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. de O, M, de Carvalho J. C. and 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.
8. Gershwin, M.E. and Bely, A. 2008. *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Taylor and Francis Group-New York, P312.
9. Herreo, A. and Fores, E. 2008. *The cyanobacteria, Molecular Biology-Gonomics and Evaluation (Instead)*. Caister Academic press. ISBN 978-1.
10. Khosravi-darani, K., Vasheghani-Farahani, E. and Shojaosadati, S.A. 2004. Application of the taguchi design for production of polyhydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 23, 131-136.
11. Madhyastha, H. and Vatsala, T. 2007. Pigment production in *Spirulina fussiformis* in different photophysical conditions. *Biomolecular Engineering*, 24, 301-305.
12. Rangel-Yagui, C.de O., Danesi., E. D. G, de Carvalho J. C. M. and Sato, S. 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92, 133-141
13. 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.
14. Shetty, K., Paliyath., G., Pometto, A. and Levin. R.E. 2008. *Food Biotechnology* 2nd ed. Taylor and Francis Group, New York, P1982.
15. Soletto, D., Binaghi., L, Lodi., A, Carvalho, J.C.M. and Converti, A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217-224.
16. Vonshak, A. 1977. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell biology, and biotechnology. Taylor and Francis, London, 117-130.
17. Vyssoulis, G.P., Karpanou, E.A, Papavassiliou, M.V. Belegirinos D.A. and Giannakopoulou, A. 2001. Side effects of antihypertensive treatment with ACE inhibitors. *American Journal of Hypertension*, 14(4), 114-125

4- نتیجه گیری

در این مطالعه اثر نوع منبع کربنی، نور، دما و روش کشت در میزان تولید فایکوسیانین مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون متغیرها تأثیر معنی داری بر تولید فایکوسیانین داشتند. نتایج آنالیز آماری نشان دادند که بین سه منبع کربنی گلوکز، اتانول و اسید استیک از جهت تولید فایکوسیانین اختلاف معنی داری وجود داشت. منبع کربنی گلوکز نیز نسبت به منابع اتانول و اسید استیک تأثیر بهتری بر تولید رنگدانه داشت. مقایسه شدت نورهای مختلف نشان داد که بین سه شدت نور اختلاف معنی داری وجود داشت و با افزایش شدت نور میزان تولید رنگدانه افزایش پیدا کرد. مقایسه دماهای مختلف (30 و 35 درجه سلسیوس) نشان داد که بین دو دما اختلاف معنی داری وجود داشته و دمای 30 درجه سلسیوس به عنوان دمای مناسب مشخص گردید. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد نور به عنوان مهمترین فاکتور تولید رنگدانه پروتئینی مد نظر قرار گرفت. دما، روش کشت و نوع منبع کربنی به ترتیب در درجه های بعدی اهمیت قرار داشتند.

5- منابع

1. Alessadra, L., Binaghi., L, De faveri., D, Carvalho., J.C.M, Converti., A. and Delborghi. M. 2005. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. *Annals of Microbiology*. 55(3), 181-185.
2. Andrade, M.R. and Costa, J.A.V. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264, 130-134.
3. Boussiba, S. and Richmond, A. 1979. Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archive of Microbiology*, 120, 155-159.
4. Chen, F., Zhang. Y. and Gvo, S.1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters*, 18, 603-608.
5. Chojnacka., K. and Noworyta, A. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and microbial Technology*, 34, 461-465.
6. Colla, M. and 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.