بهینه سازی کشت فدبچ منابع دو کربنی جدید (اتانول و اسید استیک) در تولید فایکوسیانین بوسیله ریزجلبک اسپیرولینا

دلنیا فرجی [1]، کرامت اله رضایی [2]، مهناز هاشمی روان [1]، مریم کلانتری [3*]، اکرم شریفی [4]، محمد تقی گلمکانی [5]، سهیلا فرجی [1]

[1] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[2] گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[3*] باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[4] گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران
[5] استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: 1392/7/11 تاریخ پذیرش: 1393/4/27

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 فایکوسیانین 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، درحالی‌که 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 فد بچ، دما 30°C درجه سلسیوس و شدت نور 5 کیلولوکس و منبع کربنی گلوکز (میلی لیتر بر لیتر) است که به حداکثر تولید فایکوسیانین(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: اسپیرولیناپلاتنسیس(*Arthrospira platensis*) ، فایکوسیانین، روش کشت بچ و فدبچ

*نویسنده مسوول: kalantari_m99@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

1-مقدمه

اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) به عنوان یک سیانوباکتریوم پلانکتونیک به طور گسترده در مناطق استوایی و غیر استوایی، در سطح بالای کربنات و بی کربنات 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، آرتروسپیراپلاتنیس می‌باشد و به دلیل شکل خاص آن اسپیرولینا نامیده می‌شود. اسپیرولینا به معنی فنر کوچک می‌باشد (14). آنالیز بیوشیمیایی سویه‌های اسپیرولینا نشان می‌دهد 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 گامالینولنیک)، گلیکولیپید، سولفولیپیدها و نیز فیکوبیلین‌هایی مثل فایکوسیانین و دیگر ترکیبات فیتوشیمیایی می باشد (8). 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 (13).

اسپیرولینا حاوی فایکوسیانین می باشد که یک پیگمان آبی رنگ ضروری برای فتوسنتز و از خانواده فایکوبیلی پروتئین‌هاست. فایکوبیلی پروتئین‌ها گروهی از پروتئین‌های 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 می‌شود 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 ژل‌ساز به منظور جایگزین کردن آن با رنگ‌های سنتزی کاربرد دارد (16). فایکوسیانین به تصفیه خون، غلبه بر آنمی (کم خونی)، یبوست، ترمیم زخم‌ها، تنظیم سوخت و ساز بدن و سم‌زدایی کمک می‌کند. 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، به‌طور مشخصی با افزایش شدت نور تا 30 وات بر متر مربع افزایش یافت. در کشت‌های 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 50-30 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 0/5گرم بر لیتر بوده است (5). مدهایستیها وهمکاران (2007) بررسی در اسپیرولینا فوزی فورمیس[1] 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 آلدریچ (St. Louis, MO, USA) و مجللی(Tehran, Iran) تهیه شد.

[1] S. Fussiformis

Archive of SID

www.SID.ir

تمام ترکیبات محیط کشت 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 B_{12} اضافه شد. به منظور اعمال متغیرها در محیط کشت، سه نوع منبع کربنی حاوی 1/00 گرم بر میلی لیتر گلوکز ، 0/79گرم 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 ۵۴۰ ساخت کشور آلمان) و هوادهی توسط پمپ های هوادهی(مدل MEMERT ساخت کشور آلمان) انجام گردید. در طول مدت کشت دمای محیط توسط دماسنج (مدل 01A، 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 بچ و فدبچ 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 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-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 (مدل 864 ، ساخت کشور آلمان) دمای40 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت خشک شد. بعد از خشک شدن 40 میلی گرم از اسپیرولینا با 10 میلی‌لیتر بافر فسفات (100 میلی مولار و pH=7/5) مخلوط و کاملاً یکنواخت گردید (3). نمونه‌ها در دمای4 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت نگهداری گردید و سپس با دور 4000RPM 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 اندازه‌گیری شد. درصد فایکوسیانین طبق روش بوسیبا و ریچموند (1997) از رابطه (1) محاسبه گردید (3).

رابطه (1) $$\%\text{Phycocyanin} = \frac{A615.na.100}{3.36.(\text{mg sample}).(\%\text{dry wt})}$$

na: تعداد رقت‌ها

برای تعیین ماده خشک طبق روش بوسیبا 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 (بچ و فدبچ)، نور در سه سطح (2/0، 3/5 و5/0 کیلولوکس) 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 نرم‌افزارExcel 2007 نسخه 14 ترسیم گردیدند.

3-نتایج و بحث

3-1-اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی گلوکز و روش بچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

شکل (1a) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ بر میزان تولید فایکوسیانین نشان می دهد. در دمای 30 درجه سلسیوس نور 2/0 کیلولوکس، میزان تولید فایکوسیانین 28/05 درصد بوده که با افزایش شدت نور به 3/5 و5/0 کیلولوکس، تولید این رنگدانه افزایش می یابد. در دمای 35 درجه سلسیوس نیز نتیجه مشابه دمای 30 درجه سلسیوس بدست

Archive of SID

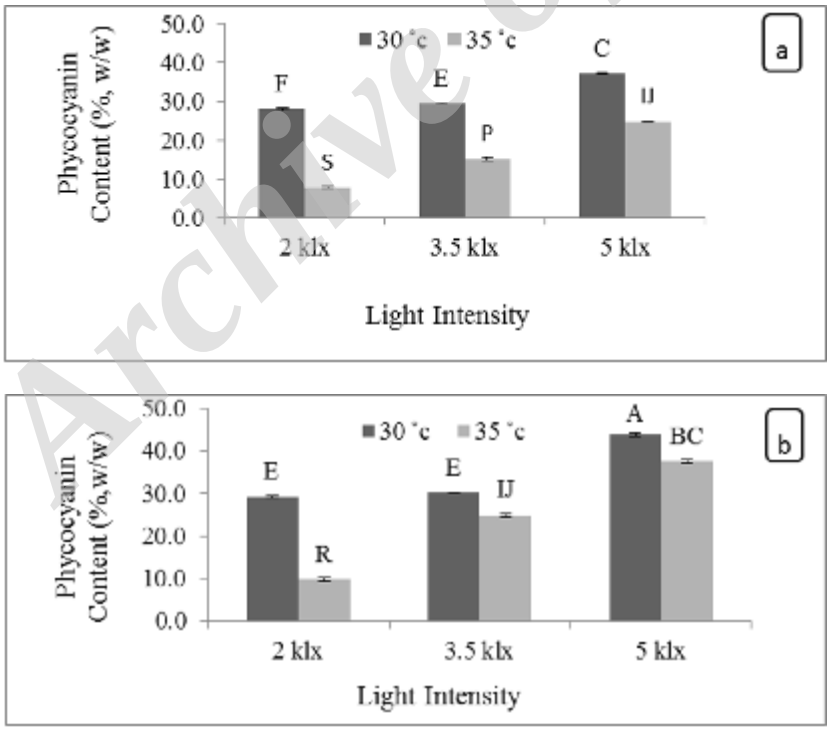
www.SID.ir

آمد و با افزایش شدت نور از 2/0 به 3/5 و 5/0 مقادیر تولید از 7/72 به 15/20و 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 تاثیرگذار، 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 به2/0 کیلولوکس یا کمتر تقلیل پیدا کرد، بیشترین 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 فدبچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

شکل (1b) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش فدبچ بر میزان تولید فایکوسیانین نشان می دهد. در روش فدبچ 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 فدبچ) موجب تولید 43/94 درصد فایکوسیانین شد که این میزان به عنوان حداکثر تولید رنگدانه مشخص گردید.



شکل1- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) با استفاده از گلوکز در شدت نورهای مختلف و دو محیط کشت بچ (a) و فدبچ (b) شرایط عمومی کشت: هوادهی vvm 5، غلظت مایه تلقیح mg/lit 150، غلظت گلوکز g/lit 1/00

Archive of SID

www.SID.ir

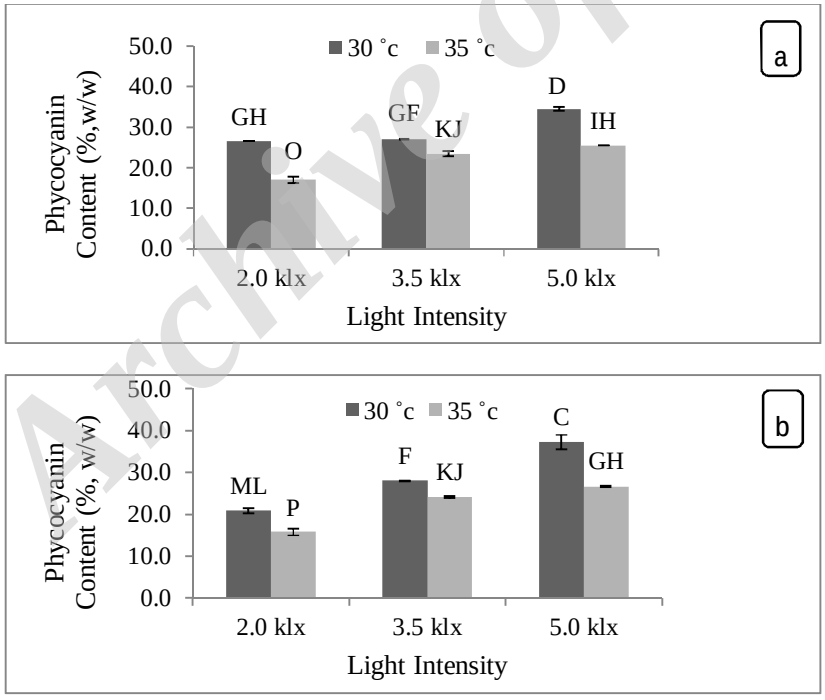
3-1-2- اثر شدت نور (با استفاده ازمنبع کربنی اتانول و روش بچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

شکل (2a) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ 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 کیلولوکس 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 ازمنبع کربنی اتانول و روش فدبچ) بر تولید فایکوسیانین

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

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 بچ و فدبچ قابل توجه می باشد. لازم به ذکر است فاکتور دما اثر قابل توجهی بر تولید فایکوسیانین دارد. مقایسه شکل های 1و2 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 بچ و فدبچ مشابه می باشد. بیشترین تولید فایکوسیانین در شکل 2 در شدت نور 5/0 کیلولوکس، دمای 30 درجه سلسیوس و روش فدبچ بدست آمد.



شکل2- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) با استفاده از گلوکز در شدت نورهای مختلف و دو محیط کشت بچ (a) و فدبچ (b) شرایط عمومی کشت: ، ،هوادهی vvm 5، غلظت مایه تلقیح mg/lit 150، غلظت اتانول 0/79 g/lit

Archive of SID

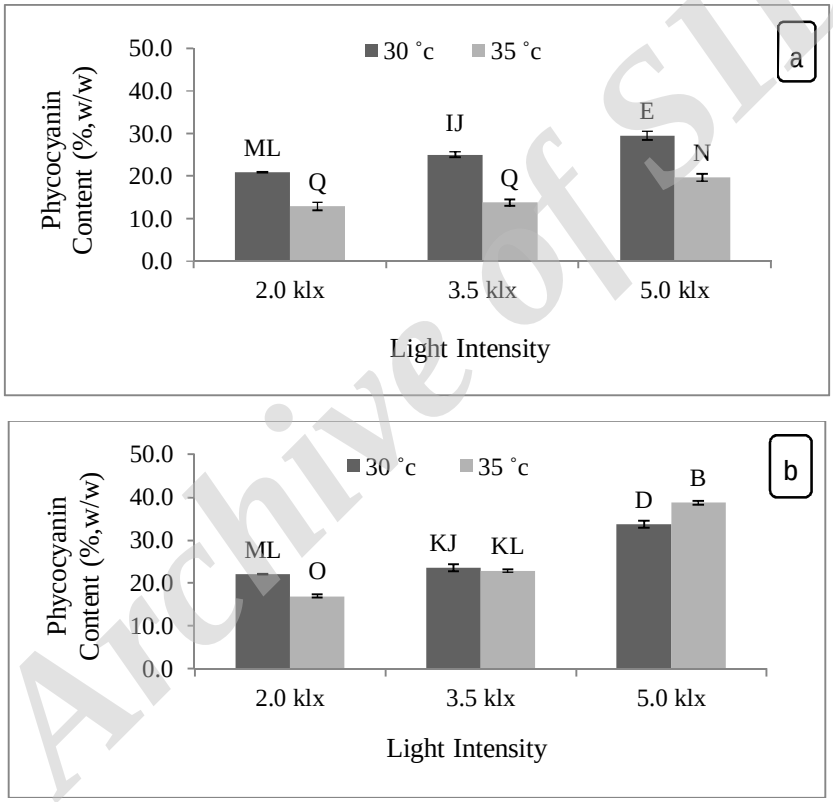
www.SID.ir

3-1-4- اثر شدت نور (با استفاده ازمنبع کربنی اسیداستیک و روش بچ) بر میزان تولید فایکوسیانین

شکل (3a) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ 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 کیلولوکس 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 1و 2 با استفاده از این منبع کربنی کلیه مقادیر فایکوسیانین بدست آمده در دمای 35 درجه سلسیوس کمتر از 30 درجه سلسیوس بوده است و در روش بچ، افزایش دما اثر عکس در میزان تولید فایکوسیانین داشت.

3-1-5- اثر شدت نور (با استفاده از منبع کربنی اسیداستیک و روش فدبچ) بر میزان تولید فایکوسیانین

شکل (3b) اثر شدت نور در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ 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 فدبچ نیز افزایش نور اثر مستقیم بر تولید رنگدانه داشت.



شکل3- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) با استفاده از اسید استیک در شدت نورهای مختلف و دو محیط کشت بچ (a) و فدبچ (b)
شرایط عمومی کشت: هوادهی vvm 5، غلظت مایه تلقیح mg/lit 150، غلظت اسید استیک 1 ml/lit، (1/05 g/lit)

Archive of SID

www.SID.ir

2-3 اثر منبع کربنی (در شدت نور 2/0 کیلولوکس) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

3-2-1 اثر منبع کربنی (دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

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

با استفاده از منبع کربنی گلوکز با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش می یابد. در دمای 30 درجه سلسیوس میزان فایکوسیانین 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 فایکوسیانین کاهش می یابد.

نتایج نشان می دهد که در روش بچ، غلظت منبع کربنی 1/0 میلی لیتر و نور 2/0 کیلولوکس، هر سه منبع در دمای 30 درجه سلسیوس حداکثر تولید فایکوسیانین را دارند و افزایش دما اثر ممانعت کننده بر تولید فایکوسیانین 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 بچ و در دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین را داشته 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 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 فایکوسیانین را داشته و اسید استیک رتبه دوم و گلوکز کمترین تولید را دارد (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 7/72، 17/07 و 12/95 بود).

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

3-2-2 اثر منبع کربنی (دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش فدبچ) بر میزان تولید فایکوسیانین

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

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

مقایسه سه منبع کربنی در روش فدبچ و دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین 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 فایکوسیانین 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 فایکوسیانین را داشته و اتانول رتبه دوم و گلوکز کمترین تولید را داشته است (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 9/72، 15/77 و 16/95 بدست آمد).

مشاهده شد که در روش فدبچ همانند روش بچ در غلظت 1/0 میلی لیتر بر لیتر و نور 2/0 کیلولوکس با افزایش دما از 30 به 35 درجه سلسیوس تولید فایکوسیانین 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 فایکوسیانین در روش فدبچ در مقایسه با بچ بالاتر بوده و با توجه به اینکه تغذیه بافت سلولی بطور یکنواخت و مداوم صورت می گیرد. روش فدبچ به عنوان روش مناسب تری جهت تولید مشخص شد.

Archive of SID

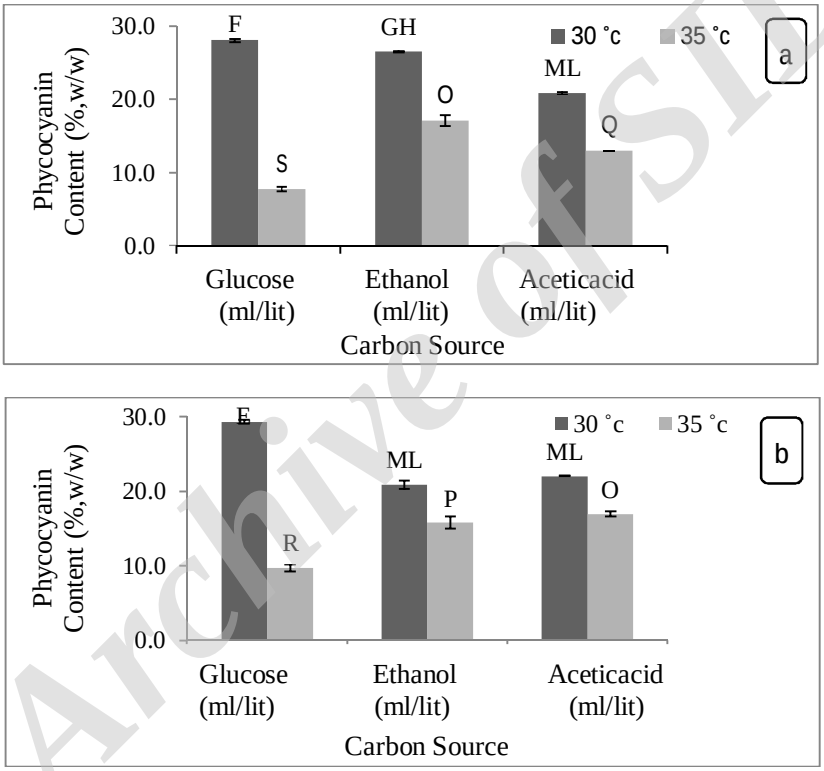
www.SID.ir

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

نتایج نشان می دهد که در منبع کربنی اتانول در روش فدبچ کاهش تولید مشاهده شد. این مورد استثنا نمی تواند نقص روش فدبچ 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 فدبچ بالاتر از روش بچ اعلام شد.

داده ها نشان می دهد در دماهای 30 و 35 درجه سلسیوس گلوکز و اسید استیک بالاترین تولید را در روش فدبچ دارند. ولی اتانول بالاترین تولید را در روش بچ 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.



شکل4- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) در حضور غلظتهای متفاوتی از منابع کربنی مختلف در دو محیط کشت بچ (a) و فدبچ (b) شرایط عمومی کشت: نور klx2، هوادهی vvm 5، غلظت مایه تلقیح mg/lit 150، غلظت منبع کربنی ml/lit 1 (g/lit 1/00 گلوکز، g/lit 0/79 اتانول و g/lit 1/05 اسید استیک)

Archive of SID

www.SID.ir

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

3-3-1 اثر منبع کربنی (دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

در شکل(5a) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ نشان داده شده است.

با استفاده از منبع کربنی گلوکز در دمای30 درجه سلسیوس میزان فایکوسیانین 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 فایکوسیانین کاهش می یابد.

در روش بچ (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 فایکوسیانین 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 فایکوسیانین 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 فایکوسیانین مشخص شد (11و7).

مقایسه سه منبع کربنی در روش بچ و در دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین را داشته و اتانول و اسید استیک با اختلاف ناچیز رتبه دوم وسوم را به خود اختصاص داده اند (میزان تولید فایکوسیانین با استفاده از گلوکز، اتانول و اسید استیک به ترتیب 29/33، 27/05 و 25/05 می باشد) در نمودارهای (4-1) و (4-2) 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 35 درجه سلسیوس نشان می دهد که اتانول بیشترین تولید فایکوسیانین را داشته و گلوکز رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را دارد (میزان تولید فایکوسیانین 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 بچ (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 فایکوسیانین 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 فدبچ) بر روی میزان تولید فایکوسیانین

در نمودار (5b) اثر منبع کربنی بر میزان تولید فایکوسیانین در دو دمای 30 و 35 درجه سلسیوس و روش بچ نشان می دهد.

با استفاده از منبع کربنی گلوکز مشابه روش بچ با افزایش دما درصد تولید فایکوسیانین کاهش می یابد. در دمای 30 درجه سلسیوس میزان فایکوسیانین 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 فایکوسیانین تولید شده ملاحظه نمی شود.

در روش فدبچ با مقایسه سه منبع کربنی در دمای 30 درجه سلسیوس نشان می دهد که گلوکز بیشترین تولید فایکوسیانین را داشته و اتانول رتبه دوم و اسید استیک کمترین تولید را دارد (میزان تولید فایکوسیانین 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 فایکوسیانین 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 دمای30 درجه سلسیوس تفاوت معنی داری بین دو روش بچ و فدبچ وجود ندارد و در هر دو روش به دلیل نور بالا مقدار تولید فایکوسیانین 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.

Archive of SID

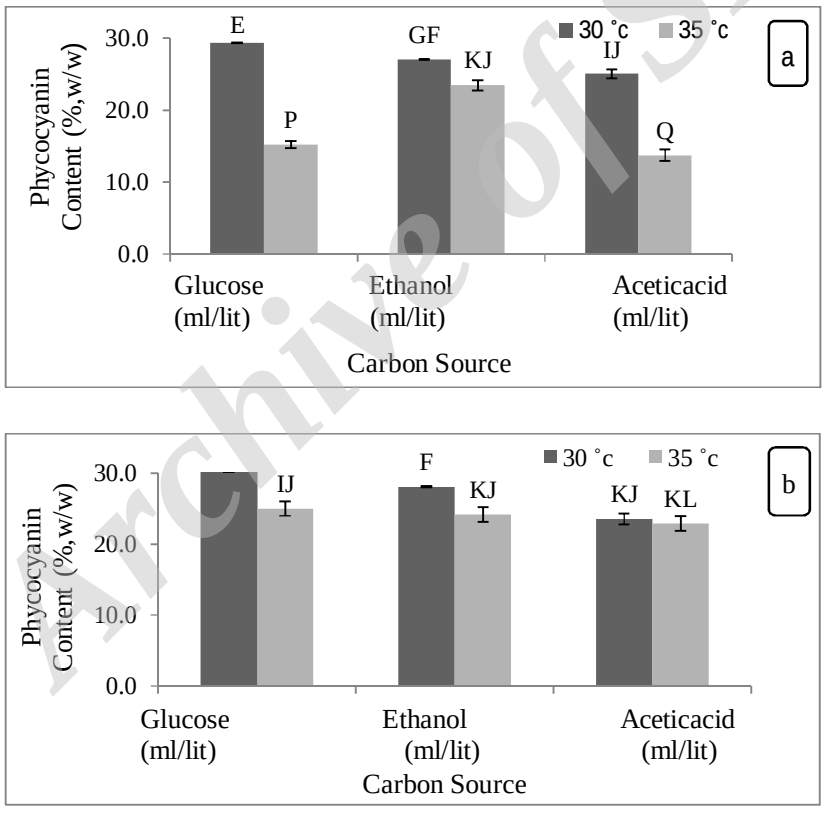
www.SID.ir

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

نتایج کلی نمودار (4-3) نشان داد که دمای 30 درجه سلسیوس واستفاده از منبع کربنی گلوکز و اتانول شرایط مناسب جهت تولید فایکوسیانین از جلبک اسپیرولینا می باشد و در دمای مذکور تفاوت چندانی بین روش بچ و فدبچ 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 فایکوسیانین (%)

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



شکل5- مقادیر تولید فایکوسیانین (w/w ,%) در حضور غلظتهای متفاوتی از منابع کربنی مختلف در دو محیط کشت بچ (a) و فدبچ (b) شرایط عمومی کشت: نور klx 3/5، هوادهی vvm 5، غلظت مایه تلقیح mg/lit 150 (a,b,c,d)، غلظت منبع کربنی 1 ml/lit (1/00 g/lit گلوکز، 0/79 g/lit اتانول و 1/05 g/lit اسید استیک)

Archive of SID

www.SID.ir

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 معنی‌داری 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. Alesssadra, L., Binaghi., L, De faveri., D, Caravalho., J.C.M, Converti., A. and Delborghi. M. 2005. Fed-batch mixotrophic cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis (Cyanophycea) 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 blu-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.
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, Moleccular Biology-Gonomics and Evalution (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. *Aqualculture*, 243, 217-224.
16. Vonshak, A. 1977. Spriulina platensis (Arthrospira): physicology, cell biology, and biotechnology. Taylor and Francis, London, 117-130.
17. Vyssoulis, G.P., Karpanou, E.A, Papavassiliou, M.V. Belegrinos D.A. and Giannakopoulou, A. 2001. Side effects of antihypertensive treatment with ACE inhibitors. *American Journal of Hypertension*, 14(4), 114-125

Archive of SID

www.SID.ir