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

سپیده بنایان[1]، مهشید جهادی[2و3*]، محمد فاضل[2]

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

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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۶

چکیده

اسپیرولینا پلاتنسیس به دلیل اهمیت به عنوان غذای انسان و دارا بودن رنگدانه‌های طبیعی با ویژگی‌های عملکردی خاص، توجه ویژه‌ایی را به خود جلب کرده است. در این مطالعه، ۷ فاکتور محیطی موثر بر تولید رنگدانه‌های کلروفیلa و کاروتنوئید از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* شامل: دوره نوردهی (۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی)، مدت کشت (۱۱روز و ۱۴ روز)، ترکیب نوری (LED) (۶ آبی/ ۳ قرمز/ ۴ سفید و ۳ آبی/ ۶ قرمز/ ۴ سفید)، منبع نیتروژن (۶۵ میلی‌گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی بچ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی فدبچ)، منبع کربن (۱ گرم در لیتر، شیره‌ی خرما، به روش خوراک دهی بچ و فدبچ)، حجم تلقیح اولیه (کدورت: ۰/۴ و ۰/۶) و کلرید سدیم (۰ و ۲ گرم در لیتر) در طرح غربالگری پلاکت برمن به منظور انتخاب متغیرهای تاثیرگذار استفاده گردید. نتایج نشان داد، از بین فاکتورهای مورد بررسی، متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری، دوره نوردهی ($p<۰/۰۱$) و حجم تلقیح اولیه، تاثیر معناداری ($p<۰/۰۵$) بر میزان تولید رنگدانه کلروفیلa و متغیرهای منبع نیتروژن، منبع کربن وکلرید سدیم تاثیر معناداری ($p<۰/۰۱$) بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئیدکل داشتند. همچنین بالاترین میزان تولید رنگدانه کلروفیل a و کاروتنوئید کل به ترتیب ۰/۹±۱۳/۴۶ و۰/۱۷±۸/۲۱ (µg/ml) به دست آمد.

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

مقدمه

رنگ‌های زیستی از منابع بیولوژیک مانند گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها به عنوان منبع رنگدانه-های طبیعی به دست می‌آیند. این رنگ‌ها دارای خواص مفیدی مانند خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌بیوتیکی، زیست‌تجزیه‌پذیری بوده و کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، چاپ، صنایع نساجی و دارویی دارند. میکروارگانیسم‌ها منبع اصلی رنگدانه‌های طبیعی هستند (Heer & Sharma, 2017). قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها انواع رنگدانه‌های میکروبی را تولید می‌کنند. تولید صنعتی رنگ‌های غذایی طبیعی توسط تخمیر-های میکروبی دارای مزایای متعددی از قبیل: تولید ارزان‌تر، استخراج آسان‌تر، بازده بالاتر از طریق اصلاح سویه، عدم وابستگی به تغییرات فصلی و شرایط آب‌و هوایی می‌باشد. همچنین آنها می‌توانند تحت شرایط کنترل‌شده و در زمان بسیار کمی تولید شوند (Heer & Sharma, 2017; Malik et al, 2012.). رنگدانه های جلبکی علاوه بر مزایای سلامت‌بخش، دارای ارزش تجاری گسترده‌ای به عنوان رنگ‌های طبیعی در مواد غذایی، مواد آرایشی و دارویی هستند. در حال حاضر، افزایش آگاهی در مورد اثرات مضر ترکیبات و رنگ‌های مصنوعی و تمایل جامعه به سمت استفاده از محصولات طبیعی باعث استفاده و بهره‌برداری از ریزجلبک‌ها به عنوان منبع رنگدانه‌های طبیعی شده است (Kuddus et al, 2013). *آرتروسپیرا پلاتنسیس* یک *سیانوباکتری*

www.SID.ir

Archive of SID

پروکاریوتیک چندسلولی و رشته‌ایِ غیرسمی است که معمولا به عنوان *اسپیرولینا* شناخته می‌شود. (Pan-utai et al, 2017) گونه‌های اسپیرولینا قرن‌ها به عنوان مواد غذایی توسط جمعیت‌های مختلف استفاده شده است ولی در سال‌های اخیر مجددا مورد توجه خاصی قرار گرفته اند (Saranraj & Sivasakthi, 2014). ریزجلبک *اسپیرولینا*، حاوی مقادیر قابل توجهی از ریز مغذی و درشت مغذی‌ها، اسیدهای آمینه‌ی ضروری، پروتئین، لیپید، ویتامین‌ها، مواد معدنی ،آنتی‌اکسیدان‌ها و رنگدانه‌های زیادی از جمله کلروفیلa، کاروتنوئید و فایکوبیلی‌پروتئین‌ها شامل فایکوسیانین و آلوفایکوسیانین است (Soni et al , 2017 Usharani et al, 2012;). کاروتنوئیدها معمولاً رنگدانه‌های قرمز، نارنجی یا زرد هستند که از دو حلقه شش کربنه‌ی کوچک تشکیل شده و توسط زنجیره‌ای از اتم‌های کربن به هم متصل می‌شوند. بر اساس ساختار آنها، کاروتنوئیدها به کاروتن ها و زانتوفیل ها تقسیم می‌شوند. کاروتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی هستند که به عنوان رنگدانه‌های جانبی فتوسنتز در نظر گرفته می‌شوند (Rowan, 1989). کلروفیل‌ها رنگدانه‌های مایل به سبز هستند که شامل یک حلقه پورفیرین با یک یون منیزیم مرکزی بوده و معمولا یک زنجیره آبگریز طولانی هستند. کلروفیل‌ها رنگدانه‌های اصلی فتوسنتزی و محلول در چربی هستند. انواع مختلفی از کلروفیل وجود دارد: کلروفیل a ، b، c و d.فراوانترین نوع کلروفیل‌ها، کلروفیل‌های a و b هستند (Rowan, 1989). *اسپیرولینا پلاتنسیس* در ترکیبات خود تنها دارای کلروفیل a می‌باشد. این ریزجلبک یکی از بالاترین میزان کلروفیل موجود در طبیعت را داراست که در حدود ۱/۱۵درصد از زیست توده آن را شامل می شود (Danesi et al, 2004). بر اساس این واقعیت‌ها، استفاده از *اسپیرولینا پلاتنسیس* برای تولید کلروفیل می تواند یک جایگزین جالب برای مطالعه در نظر گرفته شود. در پژوهش‌های مختلف پارامترهای محیطی متفاوتی شامل: تاثیر استفاده از دیودهای نوری تک رنگ (LED ها)، (Lima et al, 2018) شدت نور، دما، غلظت دی اکسید کربن، pH، سطح NaCl (Kumar et al, 2013Sharma et al, ; 2014)، افزودن منبع نیتروژنی (Ajayan et al , 2012)، افزودن منبع کربن (Kandasamy & Nagarajan, 2013; Manjunath & Geeta, 2005)، دوره نوردهی (Bouterfas et al, 2006)، حجم تلقیح اولیه (Pelizer et al, 2003) بررسی گردیده است. این تحقیق با هدف انتخاب عوامل تاثیرگذار بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل a و کاروتنوئید از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* با استفاده از طرح پلاکت برمن انجام شد. متغیرها هر یک در دو سطح شامل: دوره نوردهی (۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی)، مدت کشت (۱۱روز و ۱۴ روز)، ترکیب نوری (LED) (۶ آبی/ ۳ قرمز/ ۴ سفید و ۳ آبی/ ۶ قرمز/ ۴ سفید)، منبع نیتروژن (۶۵ میلی‌گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی بچ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر اوره به روش خوراک‌دهی فدبچ)، منبع کربن (۱ گرم در لیتر، شیره‌ی خرما، به روش خوراک دهی بچ و فدبچ)، حجم تلقیح اولیه (۰/۴ و ۰/۶ :OD) و کلرید سدیم (۰ و ۲ گرم در لیتر) بررسی گردید.

روش کار

سویه ریزجلبک و کشت اولیه

این تحقیق در مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) انجام شد. سویه ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس APP1* از بانک سلولی دانشگاه تربیت مدرس تهران خریداری شد. کشت تلقیح سویه در محیط کشت زاروک با کمی تغییرات شامل (گرم در لیتر): $NaHCO_3$: ۱۶/۸، $NaNO_3$: ۲/۵، KH_2PO_4 : ۰/۵، K_2SO_4 : ۱، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: ۰/۲، $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: ۰/۰۴،

www.SID.ir

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$:۰/۰۱، Na_2EDTA : ۰/۰۸ انجام شد و ۱ میلی لیتر از هر یک از محلول‌های ریزمغذیِ A و B به هر لیتر از محیط کشت افزوده شد. محلول Aشامل (گرم در لیتر): H_3BO_3 : ۲/۸۶، $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: ۱/۸۰، MoO_3 : ۰/۰۱، $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: ۰/۲۲، $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: ۰/۰۸ و محلول B (گرم در لیتر): NH_4VO_3 : ۲۲/۹۰، $NiSO_3 \cdot 7H_2O$: ۴۷/۸۰، $NaWO_4$: ۱۷/۹۰، $Ti_2(SO_4)_3$: ۴۰، $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$: ۴/۴۰ بود (Shi et al., 2016). محیط کشت در pH = ۹/۸ تنظیم گردید. از سویه ریزجلبک خریداری شده در شرایط کاملا استریل به میزان مناسب در محیط کشت تلقیح گردید تا جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری (UNICO2100، آمریکا) در طول موج ۵۶۰ نانومتر به ۰/۴ برسد. سپس نمونه به مدت ۱۱ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تحت نوردهی مناسب و هم‌زدن قرارگرفت.

تلقیح و شرایط کشت

از نمونه رشد یافته، برای تلقیح آزمون‌های اصلی استفاده گردید. آزمایش در ظروف ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت زاروک استریل با pH= ۹/۸ انجام شد. پس از خنک شدن محیط کشت، تلقیح مطابق با آرایه‌های طرح پلاکت برمن[1] جدول۲، انجام گردید و متغیرهای مربوط به هر آزمایش بر روی آن نمونه اعمال شد. شدت نور به میزان $\mu mol/m^{-2}/s^{-}$ ۱۵۰ و دمای محیط بر روی ۲±۳۰ درجه سلسیوس تنظیم شد و نمونه ها بر روی شیکر با دور rpm ۱۰۰قرار گرفتند. متغیرهای منبع نیتروژن (اوره) و کربن (شیره خرما) در مقادیر و زمان مورد نظر در دو سطح بچ و فدبچ به محیط کشت اضافه شدند.

روش افزودن منبع کربنی

یکی از متغیرهای مورد مطالعه در این آزمون افزودن شیره خرما به عنوان منبع کربنی به میزان g/l ۱ قند در دو سطح بچ و فدبچ به محیط کشت بود. در کشت-هایی که روش افزودن به صورت بچ بود معادل g/l ۱ قند از شیره خرمای تهیه شده، تنها در روز صفر و لحظه قبل از تلقیح به محیط کشت اضافه گردید و درکشت هایی که روش خوراک دهی به روش فدبچ بود در روزهای صفر ،۳ و ۷ از کشت ، هر بار به میزان معادل g/l۱ قند از شیره خرمای تهیه شده به محیط کشت اضافه گردید (فرجی و همکاران، ۱۳۹۴).

روش افزودن منبع نیتروژن

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

اندازه گیری کلروفیلa و کاروتنوئید کل

استخراج این رنگدانه ها با متانول ۹۹/۸ درصد v/vانجام گرفت. ابتدا ۲میلی لیتر از کشت، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی حذف گردید و ۱میلی‌لیتر متانول به رسوب اضافه و به خوبی مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای۴ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شد (Deamici et al, 2018). پس از آن، جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. اجرای این مرحله و خواندن در اسپکتروفتومتر در محیط تاریک انجام گرفت تا از تخریب رنگدانه ها توسط

1_ Placket-Burman

www.SID.ir

Archive of SID

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

معادله (۱)

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

که در این رابطه $OD_{665.2}$ جذب نوری خوانده شده در۶۶۵/۲ nm و $OD_{652.4}$ جذب نوری خوانده شده در۶۵۲/۴ nm می‌باشد.

معادله (۲)

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

که در این رابطه OD_{470} جذب نوری خوانده شده در ۴۷۰nm است.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق ۷ عامل به عنوان عواملی که در پژوهش‌های مختلف بر اثرگذاری آنها تاکید شده بود مورد بررسی قرار گرفت (Lima et al, 2018 ;Soletto et al , 2005 ;Sharma et al, 2014) و سطوح انتخابی آنها طبق نتایج بهینه به دست آمده در مطالعات دیگر محققان مشخص گردید، تا به کمک طرح غربالگری پلاکت برمن میزان اثرگذاری عوامل در تولید رنگدانه های کلروفیل و کاروتنوئید از اسپیرولینا پلاتنسیس مشخص گردد. ۱۲ آرایه متعامد (جدول ۱) مورد بررسی در دو تکرار ساخته و متغیرهای پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار MINITAB 17 در سطح معناداری در ۰/۰۵ p >مورد بررسی قرار گرفت. تمام مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است.

نتایج

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

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

حرف نمایشی	متغیرها	واحد	سطح کم (۱-)	سطح زیاد(۱)
A	حجم تلقیح (کدورت)[1]		۰/٤	۰/٦
B	منبع نیتروژنی (اوره)	mg/L	روش خوراک دهی بچ	روش خوراک دهی فدبچ
C	منبع کربنی (شیره خرما)	g/L	روش خوراک دهی بچ	روش خوراک دهی فدبچ
D	مدت زمان کشت	روز	۱۱	١٤
E	ترکیب نوری	LED	(۶ آبی، ۳ قرمز ،۴ سفید)	(۳ آبی، ۶ قرمز ،۴ سفید)
F	دوره نوردهی	ساعت	۱۲ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی	۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی
G	کلرید سدیم (NaCl)	g/l	۰	۲

1_ OD: Optical Density

www.SID.ir

جدول ۲- نمایش۱۲ آرایه متعامد بر میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید تولید شده و پیش بینی شده

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

کلروفیل a

با توجه به داده‌های جدول ۲، بیشترین میزان رنگدانه کلروفیلa مربوط به تیمار ۱۰ (حجم تلقیح اولیه کدورت= ۰/۶، منبع نیتروژن : بچ، منبع کربن: بچ، مدت کشت: ۱۱روز، ترکیب نوری: آبی۳/ قرمز۶/ سفید۴، دوره نوردهی: ۱۶ساعت وکلرید سدیم= ۲ گرم در لیتر) عدد ۱۳/۴۶±۰/۹ µg/ml است و کمترین میزان رنگدانه کلروفیلa مربوط به تیمار۱۲(حجم تلقیح اولیه ، کدورت= ۰/۴ منبع نیتروژن : بچ، منبع کربن: بچ، مدت کشت: ۱۱ روز، ترکیب نوری: آبی۶/ قرمز۳/ سفید۴، دوره نوردهی:۱۲ ساعت و کلرید سدیم= ۰ گرم در لیتر) عدد ۷/۴۰±۰/۱۴ µg/ml است. مطابق جدول ۳ نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل واریانس رنگدانه کلروفیل a پس از حذف عوامل غیرمعنی‌دار نشان داد، مدل در سطح احتمال ۱درصد معنادار است وخطا در عدم برازش معنادار نمی‌باشد (p=۰/۹۲۸). همچنین با توجه به نتایج حاصل، ضریب تبیین داده ها برابر با ۸۲/۲۰ درصد بود که بیانگر همبستگی نسبتا خوبی بوده و این مقدار هرچه به عدد۱۰۰نزدیک تر باشد تطبیق داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون بیش‌تر بوده و مدل دقت بالاتری دارد. طبق داده‌ها متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری، دوره نوردهی در سطح آماری ۱ درصد و متغیر حجم تلقیح (کدورت) در سطح آماری ۵ درصد، تاثیر معناداری بر میزان تولید رنگدانه کلروفیلa داشت. درحالیکه متغیرهای منبع نیتروژن و مدت کشت در این صفت معنی‌دار نیست.

جدول۳- نتایج آنالیز واریانس نهایی تاثیر متغیرهای مستقل معنادار بر تولید رنگدانه کلروفیلa

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

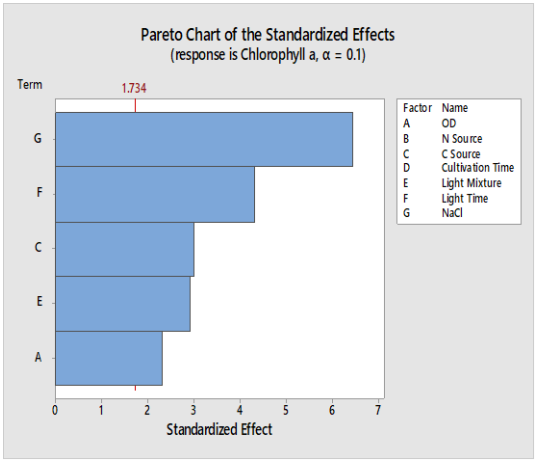
www.SID.ir

Archive of SID

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

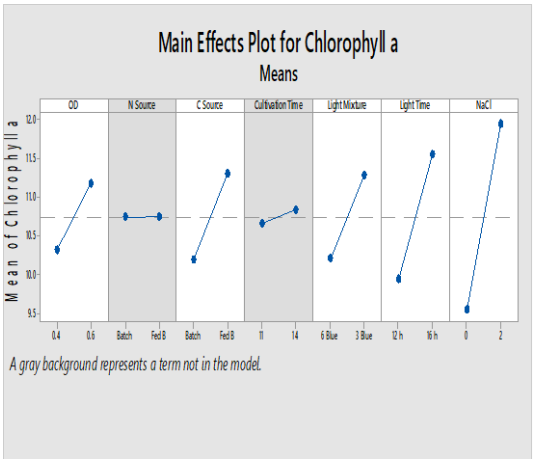
R-sq = ۸۲/۲۰٪

نمودار پارتو در شکل۱ ضمن تایید نتایج تجزیه واریانس، ترتیب اثرگذاری فاکتورهای معنادار بر میزان تولید کلروفیل a را نشان می‌دهد، که از بین عوامل معنی‌دار، کلرید سدیم با ضریب تاثیرگذاری ۲/۴۰۵ بیشترین تاثیرگذاری را داشته و در بالاترین حد قرار



شکل۱- تاثیرمتغیرهای معنادار بر میزان تولید کلروفیل aتوسط نمودار پارتو

گرفته‌است. پس از آن دوره نوردهی، منبع کربن، ترکیب نوری و حجم تلقیح (کدورت) به ترتیب با ضرایب اثرگذاری ۱/۶۱۰، ۱/۱۱۶، ۱/۰۸۸ و۰/۸۶۲ اثرگذار بودند.



شکل۲- تاثیرگذاری متغیرهای مستقل بر میزان تولید کلروفیلa با بررسی نقش اثرات اصلی

بررسی نقش اثرات اصلی بر میزان تولید رنگدانه کلروفیلa در شکل۲ نشان داده شده است، فاکتور حجم تلقیح (کدورت) با تاثیر معنی دار (p<۰/۰۵) بر این صفت، از میزان ۰/۴ به ۰/۶ در طول موج ۵۶۰ نانومتر، روند صعودی را نشان داد. علاوه بر این، دو فاکتور، ترکیب نوری و دوره نوردهی نیز به ترتیب از سطح آبی۶/ قرمز۳/ سفید۴ به سطح آبی۳/ قرمز۶/ سفید۴ و دوره نوردهی از سطح ۱۲ساعته به سطح۱۶ ساعته دارای روند افزایشی بودند و تاثیری مثبت بر میزان تولید کلروفیل داشتند. براساس نتایج همچنین مشخص شد که کلرید سدیم از سطح ۰ به سطح ۲ گرم در لیتر باعث افزایش تولید کلروفیل شده است. درحالیکه فاکتور، مدت کشت علی‌رغم تاثیرمثبت بر تولید این صفت از سطح ۱۱ به ۱۴ روز، بر اساس نتایج تجزیه واریانس معنادار نگردیده است.

کاروتنوئید کل

بر اساس داده‌های جدول۲، بیشترین و کمترین میزان تولید کاروتنوئید کل ۸/۲۱±۰/۱۷ و۶/۹۵±۰/۱۲ µg/ml به ترتیب مربوط به تیمارهای ۱۰ و ۳ (تیمار۱۰: کدورت= ۰/۶، منبع نیتروژن: بچ، منبع کربن: بچ، مدت کشت: ۱۱روز، ترکیب نوری: آبی۳/ قرمز۶/ سفید۴، دوره نوردهی: ۱۶ساعت و کلرید سدیم= ۲ گرم در لیتر ، تیمار ۳: حجم تلقیح اولیه کدورت= ۰/۴، منبع نیتروژن: فدبچ، منبع کربن: فدبچ، مدت کشت:۱۱ روز، ترکیب نوری: آبی۳/ قرمز۶/ سفید۴، دوره نوردهی:۱۲ ساعت و کلرید سدیم= ۰ گرم در لیتر) به دست آمد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس رنگدانه کاروتنوئیدکل در جدول۴، نشان داد که پس از حذف شدن عوامل غیر-معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹درصد، مدل معنادار بود

www.SID.ir

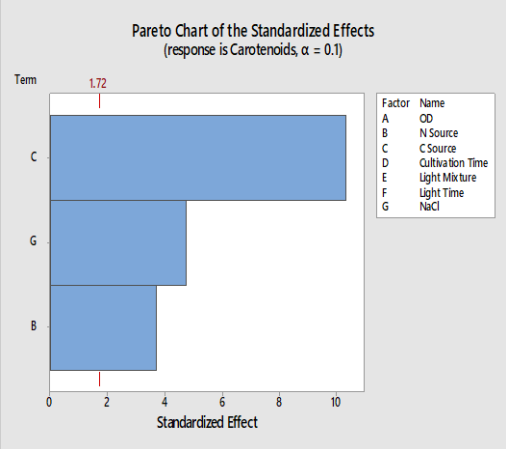
(p<۰/۰۱) و خطا درعدم برازش معنادار نگردید (p= ۰/۵۶۵). همچنین با توجه به نتایج حاصل، ضریب همبستگی داده ها برابر با ۸۸/۹۵ درصد بود که بیانگر تطبیق مناسب داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون می‌باشد. طبق داده‌ها متغیرهای منبع نیتروژن، منبع کربن و کلرید سدیم تاثیر معناداری (p<۰/۰۱) بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید داشت. درحالیکه متغیرهای حجم تلقیح (کدورت)، ترکیب نوری، دوره نوردهی و مدت کشت بر این صفت معنی-دار نیست.

نمودار پارتو در شکل۳ ضمن تایید نتایج تجزیه واریانس، ترتیب اثرگذاری فاکتورهای معنادار بر میزان تولید کاروتنوئید کل را نشان می‌دهد. مطابق با نمودار پارتو در شکل از بین عوامل معنی‌دار، منبع کربن با ضریب اثرگذاری ۰/۵۸۷۵- بیشترین تاثیرگذاری را دارا بوده پس از آن به ترتیب کلرید سدیم(۰/۲۸۲۶-) و منبع نیتروژن (۰/۲۲۵۹-) اثرگذار بود. بر اساس نتایج تجزیه واریانس و بررسی نقش اثرات اصلی بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید کل در شکل ۴، منبع کربن و منبع نیتروژن با تاثیر معنی دار (p<۰/۰۱) بر این صفت، از سطح بچ به فدبچ روندی کاهشی را بر میزان تولید این رنگدانه نشان داد.

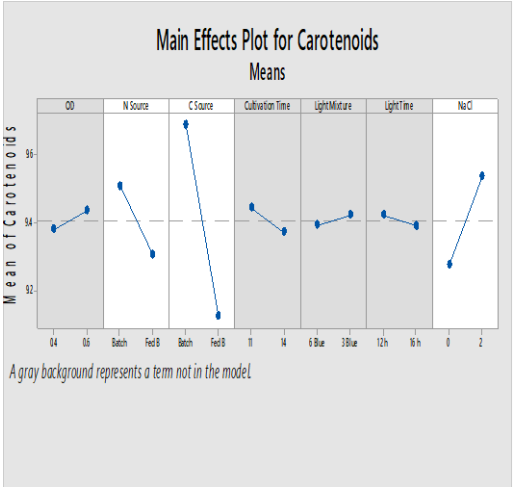
جدول۴- نتایج آنالیز واریانس نهایی تاثیر متغیرهای مستقل معنادار بر تولید رنگدانه کاروتنوئید کل

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

۸۸/۹۵ ٪R-sq =



شکل۳- تاثیرمتغیرهای معنادار بر میزان تولید کاروتنوئید کل توسط نمودار پارتو



شکل۴- تاثیرگذاری متغیرهای مستقل بر میزان تولید کاروتنوئید کل با بررسی نقش اثرات اصلی

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

بحث

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

www.SID.ir

Archive of SID

میزان تولید رنگدانه کلروفیلa داشت. در این بین، کلرید سدیم بیشترین تاثیرگذاری را بر تولید این رنگدانه داشته است که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از دیگر پژوهش‌ها هم‌خوانی دارد (Kumar et al., 2013 ;Sharma et al, 2014) طبق مطالعه کومار و همکاران (۲۰۱۳) شناسایی سویه‌های کارآمد *اسپیرولینا* از نظر سنتز رنگدانه و بهینه سازی افزایش تولید آن، با پارامترهای محیطی خاص (شدت نور، دما، غلظت دی اکسید کربن، pH ، سطحNaCl) استاندارد گردید و نتایج نشان داد که رشد و تولید رنگدانه در شرایط بهینه شده NaCl ۲ g/l بیشترین بهره وری را دارا بود. در حالیکه افزایش غلظت نمک موجب کاهش رشد شده و اثر مهارکنندگی بر روی کلروفیل دارد(Kumar et al., 2013) بر اساس پژوهش شارما و همکاران(۲۰۱۴) نیز، اثر غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ مولار NaCl بر تولید رنگدانه‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* نشان داد که بالاترین میزان تولید کلروفیل در غلظت ۰/۲ مولار NaCl بود. مشاهده شد که افزایش غلظت کلرید سدیم باعث کاهش رشد و مهار کلی بیوسنتز کلروفیلa از *اسپیرولینا پلاتنسیس* می شود. این امر به دلیل افت سطح انرژی ناشی از پمپاژ یون های سدیم ورودی است. همچنین در تحقیقی دیگر، اثرات غلظت NaCl بر تولید زیست توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* توسط سلکلی و یاووزاتماک (۲۰۰۹) بررسی شد. بیشترین میزان بازدهی زیست توده و کلروفیل a در غلظت ۱/۵ g/l نمک به ترتیب ۳/۴۵۹ g/l و۲۹/۹۲ mg/l مشاهده شد (Çelekli & Yavuzatmaca, 2009). با توجه به شکل ۲ و بررسی نقش اثرات اصلی بر میزان تولید کلروفیلa ، ترکیب نوری از سطح آبی۶/ قرمز۳/ سفید۴ به سطح آبی۳/ قرمز۶/ سفید۴ دارای روند افزایشی بود و تاثیری مثبت بر میزان تولید کلروفیل داشت، به طوریکه افزایش نور قرمز باعث تجمع این رنگدانه شد. لیما و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی، ترکیب LEDهای قرمز و آبی را، در ۱۰شرایط مختلف نورپردازی بر روی میزان زیست-توده‌ی تولیدی و رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید مورد بررسی قرار دادند. بهترین ترکیب نوری با استفاده ازLEDهایی که دارای ترکیب ۷۰ درصد نورقرمز و۳۰درصد نور آبی و شدت نور $\mu E/m^{-2}/s^{-1}$ ۱۰۰بود، به دست آمد. در این حالت بهره‌وری زیست توده ۰/۱۴۸ گرم در لیتر در روز بود و غلظت کلروفیل، کاروتنوئید کل و فایکوسیانین به ترتیب ۲۱/۳۵ ، ۵/۴۵ و µg/ml۱۶۷/۹۸ بود. در این مطالعه نور قرمز با ترکیب۷۰ درصد، سبب افزایش تولید رنگدانه های کلروفیل و کاروتنوئید شد ولی تفاوت معناداری نشان نداد. در آخر افزایش تولید این رنگدانه ها را مربوط به افزایش تولیدزیست توده در این ترکیب نوری عنوان کردند. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت در کیفیت نورطیفیِ کشت‌ها، اثر قابل‌توجهی در رابطه با تولید کاروتنوئید نداشت (Lima et al., 2018). بر اساس نتایج تجزیه واریانس در تولید رنگدانه کلروفیل مشخص گردید که منبع نیتروژن اثر معناداری بر تولید این رنگدانه نداشت. در مطالعه‌ایی توسط دانسی و همکاران (۲۰۰۲) ، نتایج نشان داد افزودن اوره بر رشد *اسپرولینا* دارای تاثیر مثبتی بوده در حالیکه هیچ تاثیری بر محتوای کلروفیل کشت ها نداشت (Danesi et al, 2002). همچنین یافته ها نشان داد که افزایش حجم تلقیح اولیه و غلظت سلولی بر تولید رنگدانه معنادار است ($p<0/05$) به طوریکه افزایش میزان کدورت از سطح ۰/۴ به ۰/۶، روند صعودی را در تولید رنگدانه نشان داد. دوره نوردهی نیز، از سطح ۱۲ساعت به سطح۱۶ ساعته‌ی روشنایی دارای روند افزایشی بود و تاثیری مثبت بر میزان تولید کلروفیل داشت. افزایش مدت زمان روشنایی از ۸:۱۶ به ۱۶:۸ساعت اثر مطلوبی بر تولید زیست توده دارد. در واقع، یک دوره روشنایی/ تاریکی امکان افزایش غلظت نهایی زیست توده را فراهم می‌کند (Bouterfas et al, 2006).

www.SID.ir

مطابق با یافته‌های دامیچی و همکاران (۲۰۱۸) غلظت کلروفیل می‌تواند به عنوان یک سنجش غیرمستقیم از غلظت زیست‌توده، استفاده شود به طوریکه غلظت کلروفیل با افزایش غلظت زیست توده افزایش می‌یابد، از این رو به نظر می رسد افزایش میزان رنگدانه تولیدی در این آزمون به دلیل افزایش در غلظت زیست توده تولید شده، تحت تاثیر فاکتورهای حجم تلقیح و دوره نوردهی بوده است (Deamici et al, 2018). در مطالعه‌ایی سوجاتا و ناگراجان (۲۰۱۳)، اثر افزودن غلظت‌های مختلف منبع کربنی ($NaHCO_3$) را به محیط کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* بررسی نمودند. نتایج نشان داد افزایش غلظت کربن در محیط باعث افزایش زیست‌توده و ترکیبات سلولی از جمله رنگدانه‌ها و لیپیدها در *اسپیرولینا* شد. میزان رنگدانه کلروفیل در غظت ۰/۴ مولار $NaHCO_3$ به میزان ۱۰/۷ میکروگرم بر میلی‌گرم رسید. این یافته ها نشان می‌دهد که با افزایش منبع کربنی در سیستم‌های تولید تجاری، می-توان بازده تولید ترکیبات با ارزش نظیر چربی و رنگدانه را افزایش داد (Sujatha & Nagarajan, 2013). مطالعات در مورد تأثیر منبع کربنی بر محتوای رنگدانه اندک است. بیشتر گزارشهای موجود نشان می‌دهد که کشت‌های میکسوتروفیک (به طور همزمان در نور و بر روی منبع کربن آلی) در مقایسه با کشت‌های فتواوتروفیک (تنها با منبع نور) نسبت رشد و محتوای کلروفیل بالاتری دارند (Ceron Garcia et al, 2006). مارکز و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که *اسپیرولینا پلاتنسیس* در شرایط رشد میکسوتروف در مقایسه با فتواتوتروف ، ۱/۵ برابر زیست توده و دو برابر رنگدانه-های وابسته به نور بیشتری تولید می‌کند (Marquez et al, 1995). همچنین استفاده از بیکربنات پتاسیم به عنوان منبع کربن به میزان ۲۰ گرم در لیتر در محیط کشت *اسپیرولینا* سبب افزایش تولید زیست‌توده، پروتئین و رنگدانه هایی نظیر کاروتنوئید در این ریزجلبک شد (Manjunath & Geeta, 2005). این نتایج ، تاثیر منبع کربنی بر محتوای کاروتنوئیدی *اسپیرولینا پلاتنسیس* را تایید می کند. علاوه بر منبع کربنی، منبع نیتروژن با تاثیر معنی دار ($p<۰/۰۱$) بر تولید کاروتنوئید، از سطح بچ به فدبچ روندی کاهشی را بر میزان تولید این رنگدانه نشان داد. همچنین براساس نتایج مشخص شد که کلرید سدیم از سطح ۰ به سطح ۲ گرم در لیتر باعث افزایش تولید کاروتنوئید شده است. داده های تحقیق شارما و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تولید کاروتنوئید در کشت *اسپیرولینا* حاکی از آن بود که بیشترین و کمترین مقدار این صفت با بکارگیری فاکتورهای مستقل کربن ($NaHCO_3$) و کلرید سدیم به ترتیب با مقادیر (۱۸ گرم در لیتر کربن و۰/۲ مولار کلرید سدیم) و (۴/۵ گرم در لیتر کربن و ۰/۸ مولار کلرید سدیم) بدست آمد (Sharma et al., 2014). همچنین در مطالعه دیگر، تأثیر شدت نور بر زیست توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* ، رنگدانه‌ها و اسیدهای آمینه با استفاده ازKNO_3 و اوره به عنوان یک منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت. محتوای کاروتنوئید *اسپیرولینا* تحت شرایط رشد با استفاده از اوره به عنوان منبع نیتروژن و شدت نور پایین به طور قابل ملاحظه ایی افزایش یافت (۰/۰۱ ± ۳/۱۲ میلی-گرم در گرم) (Ajayan et al , 2012).

نتیجه گیری کلی

در حال حاضر، افزایش آگاهی در مورد اثرات مضر ترکیبات و رنگ‌های مصنوعی و تمایل جامعه به سمت استفاده از محصولات طبیعی باعث استفاده و بهره-برداری از ریزجلبک‌ها به عنوان منبع رنگدانه‌های طبیعی شده است. ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* علاوه بر محتوای قابل توجهی از ریز مغذی و درشت مغذی‌ها که سبب محبوبیت آن در بخش سلامت و صنایع غذایی گردیده‌است، حاوی رنگدانه‌های زیادی از جمله کلروفیلa، کاروتنوئید و فایکوبیلی‌پروتئین‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

است. نتایج مربوط به این پژوهش نشان می‌دهد از بین ۷ عامل مورد بررسی ، متغیرهای کلرید سدیم، منبع کربن، ترکیب نوری و دوره نوردهی در سطح آماری ۱ درصد و متغیر حجم تلقیح اولیه در سطح آماری ۵ درصد، تاثیر معناداری بر میزان تولید رنگدانه کلروفیلa داشت. در حالیکه متغیرهای منبع نیتروژن، منبع کربن وکلرید سدیم تاثیر معناداری($p<۰/۰۱$) بر میزان تولید رنگدانه کاروتنوئید داشتند. طبق نتایج حاصل، با تغییر فاکتورهای محیطی موثر در تولید رنگدانه توسط *اسپیرولینا پلاتنسیس* می‌توان بازده بیشتری از ترکیبات با ارزش و رنگدانه‌های زیستی در مقیاس تجاری، از این ریزجلبک به دست آورد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱. فرجی د، رضایی ک، هاشمی روان م، کلانتری م ، شریفی ا ، گلمکانی م، فرجی س .۱۳۹۴.بهینه سازی کشت فدبچ منابع دوکربنی جدید (اتانول و اسید استیک) در تولید فایکوسیانین بوسیله ریزجلبک *اسپیرولینا*.نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی.۷(۲):۸۷-۷۷

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

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

4. Çelekli, A., & Yavuzatmaca, M. 2009. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. Bioresour Technol, 100(5): 1847–1851.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

www.SID.ir

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

Banayan S [1], Jahadi M[2,3*], Fazel M[2]

1. M. Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3. Plant Improvement and Seed Production Research Centre, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

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

Received: 28 August 2019 Accepted: 27 November 2019

Abstract

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

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

www.SID.ir