ترکیب شیمیایی پودر ریز جلبک اسپیرولینا

- **منصوره قائنی** *: دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، صندوق پستی: 1915
- **محمد متین فر**: دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ، خیابان شهید فلاحی، پلاک 14، کدپستی: 1987974635
- **لاله رومیانی**: واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: 4933-14155
- **نسرین چوبکار**: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، صندوق پستی: 6718997551

تاریخ دریافت: شهریور 1388 تاریخ پذیرش: دی 1388

لغات کلیدی: جلبک اسپیرولینا، ترکیب شیمیایی، رنگدانه

اسپیرولینا سیانوباکتر رشته ای میکروسکوپی است و اسم این جلبک از شکل مارپیچی و رشته‌ای آن مشتق شده است (شکل 1) (3). دو جنس *Arthrospira* و *Spirulina* اسپیرولیناهای‌های مهم خوراکی هستند. این دو جنس از نظر ریخت‌شناسی با هم متفاوت بوده و در نوع چرخش، توزیع منافذ در دیواره سلولی، قطر و نوع قطعات تریکوم نیز با هم اختلاف دارند (14).

از اسپیرولینا بعنوان «غذایی برای آینده» یاد شده است زیرا قابلیت تولید مواد غذایی متراکم با کیفیت بالا و در مقایسه با سایر جلبکها کارآیی بیشتری دارد (4).

مسئله قابل توجه در اسپیرولینا وجود 65 تا 71 درصد وزن خشک پروتئین است در حالیکه گوشت گوساله 22 درصد پروتئین دارد (14)..

جلبک اسپیرولینا حاوی مواد مغذی بسیار، مواد معدنی احاطه شده، رنگدانه‌ها، قند رامنوز (ترکیبات قندی طبیعی از گیاهان)، عناصر کمیاب و آنزیم‌های قابل جذب، می‌باشد (3).

ارزش غذایی اسپیرولینا در مقایسه با برخی از انواع باکتری‌ها بدلیل درصد نسبتاً کم نوکلئیتک اسیدهای موجود در آن است (4 درصد). اسپیرولینا حاوی ویتامین B_{12} نیز بوده و برخلاف دیواره سلولزی سایر جلبکهای تغذیه‌ای، دیواره‌های سلولی موکوپروتئینی اسپیرولینا براحتی هضم می‌شوند. اسپیرولینا غیرسمی است و چربی‌های آن بصورت اسید چرب غیراشباع است که کلسترول ندارد به همین سبب می‌تواند برای درمان بیماری‌های تصلب شرائین و چاقی بکار رود (4)..

پودر اسپیرولینا بدلیل میزان قابل توجه اسید لینولنیک (18:3 w3) نقش مهمی در رشد لارو ماهی و لارو میگو دارد (2 و 7).

مکمل اسپیرولینا باعث افزایش کیفیت مولدین میگو (هچ مولدین، تعداد ناپلی به مولد، قابلیت زیستی ناپلی) و شاخص‌های کیفی لارو میگو می‌شود (12). همچنین از این جلبک در درمان PDS[1] (سندروم کمبود رنگدانه) به میزان 30 گرم در کیلوگرم در رژیم غذایی بعد از ظهور علایم PDS استفاده شد و بعد از یک دوره 4 هفته‌ای، درمان صورت گرفت (12).

Rahman و همکاران (2006) توانستند با بهره‌گیری از این جلبک درصد مرگ و میر حاصل از ویروس سندروم لکه سفید (WSSV[2]) را در میگوی جوان *Litopeneus vannamei* کاهش داده و ظهور علایم کلینیکی را به مدت 12 ساعت به تاخیر اندازند.

1- Pigment Deficiency Syndrome
2-White spot syndrome virus

* پست الکترونیلی نویسندهٔ مسئول: mansoreh.ghaeni@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

شکل 1: ریز جلبک اسپیرولینا (100 میکرون)

کشت نیمه انبوه گونه *Arthrospira platensis* در وانهای 100 لیتری و به منظور کنترل دما در محیط گلخانه‌ای انجام شد برای تامین آب شور از نمک دریا به میزان 15 گرم در لیتر و برای غنی‌سازی از محیط کشت جردن استفاده گردید (9). برای کشت از بذر گونهٔ *Arthrospira platensis* به میزان 1/5 لیتر در هر وان بعنوان بذر اولیه با تراکم اولیه 17500 سلول در میلی‌لیتر استفاده شد.

زمانی که رنگ آب در وانها کاملاً سبز و اندازه سلولها به مقدار کافی بزرگ شد و قبل از رسیدن به حداکثر تراکم سلولی و تقسیم سلولها، محیط کشت از الک‌هایی با مش‌های 5، 10، 15 و 50 میکرون عبور داده شده و اسپیرولینا روی الک 15 و مقدار کمتری روی الک 10 میکرون باقی ماند. اسپیرولینایی که روی توری مانده بودند جمع و توزین شدند. روش کشت پیوسته و بکارگیری مجدد از آب فیلتر شده در وانها بود. در زمان تبخیر زیاد از آب شور برای جبران آب از دست رفته استفاده گردید (6).

اسپیرولینای جمع شده روی توری پس از فیلتر کردن آب حاوی آن، در سینی‌هایی که با نایلون پوشیده شده بودند به منظور تسریع در خشک کردن، پخش شدند که به این طریق سطح را گسترش داده تا سریعتر خشک شود و در دمای 30 درجه به مدت 24 ساعت در سایه خشک گردیدند. محصول ورقه‌ای خشک پس از جمع‌آوری، توزین و آسیاب شد و پس از الک کردن با مش 20 میکرون مورد آنالیزهای شیمیایی قرار گرفت.

- یک گرم از پودر اسپیرولینا را در آون 105 درجه سانتیگراد گذاشته و اختلاف وزن در مدت 3 ساعت محاسبه گردید.
- یک گرم از پودر اسپیرولینا را در کوره کروزه 625 درجه سانتیگراد گذاشته وقتی رنگ آن سفید شد اختلاف وزن محاسبه گردید.
- 0/3گرم پودر اسپیرولینا با سولفوریک اسید غلیظ و قرص کلدال داخل دستگاه هضم گذاشته شد و پس از قرار دادن در دستگاه تقطیر نیتروژن اوریک اسید با اسید کلریدریک 0/5 نرمال تیتر شدند و درصد پروتئین تعیین شد.
- 0/1 گرم از پودر اسپیرولینا را در اسید کلریدریک 6 نرمال به مدت 24 ساعت در آون 110 درجه سانتیگراد هضم و سپس در آب رقیق کرده و 0/5 میلی‌لیتر از محلول برداشته شد و به آن 0/5 میلی‌لیتر بافر و 0/4 میلی لیتر محلول OPA (مشتق ساز) افزوده گردید. بدلیل آنکه با روش فلورسانس کار شد از مشتق ساز استفاده گردید. سپس 10 میکرولیتر از نمونه نهایی را به دستگاه HPLCتزریق شد (16).

میزان آب نمونه جلبک اسپیرولینا با دستگاه کارل فیشر Karl Fischer Moisture Titrator MKS-500 اندازه‌گیری و برحسب درصد وزنی گزارش شد.

استخراج چربی با روش سوکسله انجام گرفت. در این روش یک گرم نمونه داخل تیمبل گذاشته و پس ار قرار دادن در داخل دستگاه سوکسله چندین بار شستشو با هگزان چربی موجود در نمونه استخراج گردید. سپس هگزان در دمای 45 درجه سانتیگراد توسط روتاری خارج شد.

Archive of SID
www.SID.ir

به 0/2 گرم از نمونه چربی استخراج شده مقدار 2 میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکسید متانولی 0/5 نرمال و 10 میلی‌لیتر متانول افزوده شد و به منظور تولید متیل استر 30 دقیقه رفلاکس شد تا تولید گردید. پس ازخنک شدن،محصول را با هگزان استخراج کرده و لایه هگزان به دستگاه GC مدل HP Hewlett Packard 5890 تزریق شد (10).

برای اندازه‌گیری میزان رنگدانه کلروفیل ابتدا 10 میلی‌لیتر از جلبک اسپیرولینا زنده را از محیط کشت برداشته و تراکم سلولی در هر میلی‌لیتر بدست آورده شد. جلبک برداشته شده با سانتریفیوژ 5000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه تغلیظ شد. (مدل دستگاه سانتریفیوژ Kokusan Ensiniki, H-11N). سپس مایع اضافی خارج و 10 میلی‌لیتر محلول آستون 90 درصد اشباع به مواد باقیمانده افزوده شد. جهت آسیاب کردن سلولها، لوله آزمایش به مدت 15 دقیقه داخل دستگاه اولتراسوند گذاشته شد که بافت کاملاً هموژن شود. مجدداً مرحله سانتریفیوژ تکرار شد .نمونه دارای آاستون خالص در اسپکتروفتومتر قرار گرفت و میزان جذب دستگاه برای نمونه شفاف صفر (تنظیم) گردید. (مدل اسپکتروفتومتر UV-Visible Varian, Cary 50 scan).

در نهایت نمونه خالی برداشته شد و نمونه حاوی کلروفیل را در اسپکتروفتومتر گذاشته و میزان جذب (A) آن در سه طول موج 630،647 و 664 قرائت و توسط فرمول زیر میزان کلروفیل محاسبه گردید (1)

$$\mu g\ chl\ a/mL = 11.85\ XA_{664}-1.54XA_{647}-0.08XA_{630}$$

یک گرم از نمونه اسپیرولینا با 10 میلی‌لیتر BHT و 30 میلی‌لیتر متیلن کلراید به مدت 15 دقیقه سونیکه شدند و سپس با محلول رقیق کننده به حجم رسانده شد. محلول رقیق کننده شامل 600 میلی‌لیتر استونیتریل، 150 میلی‌لیتر دی کلرومتان و 100 میلی‌لیتر هگزان می‌باشد. محلول BHT با افزودن 2/5 گرم در 500 میلی‌لیتر دی کلرومتان تهیه شد. سپس 0/5 میلی‌لیتر BHT به محلول رقیق کننده اضافه کرده و به آنها 0/05 درصد تری اتیل آمین اضافه شد. محلول استخراج شده به میزان 100 میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید (مدل دستگاه HP Hewlett Packard 1046A) (15).

شرایط دستگاه HPLC شامل: ستون C8، فلوریت 0/7 میلی‌لیتر در دقیقه، طول موج 472 نانومتر، فاز متحرک شامل ترکیبات استونیتریل 800، میلی‌لیتر متانول 100 میلی‌لیتر، هگزان 25 میلی‌لیتر و دی‌کلرومتان 25 میلی‌لیتر به اضافه 0/05 درصد تری اتیل آمین بود.

میزان پروتئین اسپیرولینا از 70-50 درصد وزن خشک آن متغییر می‌باشد که در مقایسه با سایر منابع پروتئینی گیاهی میزان بالایی پروتئین دارد در حالی که پروتئین خام در آرد سویا 35 درصد می‌باشد. میزان پروتئین اسپیرولینا براساس زمان برداشت و تغییرات نور روزانه حدود 15-10 درصد تغییر می‌کند (6). در این تحقیق میزان پروتئین 50/93 درصد وزن خشک بدست آمد که نسبت به میزان گزارش شده توسط سایر محققین کمتر بوده است که احتمالاً بدلیل برداشت نمونه در اواخر روز بود در حالیکه بیشترین پروتئین در اول صبح است زیرا در مدت زمان تاریکی بجای فتوسنتز عملیات تنفس صورت گرفته و پروتئین ساخته می‌شود.

میزان چربی اسپیرولینا در دو گونه *S. platensis* و *S. maxima* حدود 7-5/6 درصد وزن خشک بود در حالیکه برخی محققین ادعا می‌کنند در صورت استفاده از سیستمهای استخراج بهتر، میزان چربی به 11 درصد نیز می‌رسد (6). در این تحقیق میزان اسیدهای چرب گونه *A. platensis* با دو گونه دیگر اسپیرولینا مقایسه شده است. اسید لینولنیک (18:3) و اسید لینولئیک (18:2) گوۀ *S. platensis* بیش از دو گونه دیگر است (جدول 3).

Colla و همکاران (2004) میزان اسیدهای چرب *Spirulina platensis* را در شرایط گلخانه و درون فتوبیوراکتورها در دمای 30 درجه سانتیگراد و با استفاده از محیط کشت زاروک به همراه 2/5 گرم بر لیتر نیترات سدیم طبق جدول 2 بدست آوردند. در این تحقیق ترکیبات شیمیایی اسپیرولینای رشد یافته در محیط کشت جردن با استفاده از دستگاه کلدال، سوکسله و فیبر مشخص شد (جدول 1) و پس از آن میزان اسید آمینه های آن با استفاده از HPLC و پروفیل اسید چرب آن با دستگاه GC اندازه‌گیری شدند (جدول 2و 3).

در جدول 4 اسیدهای آمینه اسپیرولینا پس از کشت در محیط کشت Paoletti در آب شور و اسپیرولینای کشت یافته در محیط کشت Paoletti در آب خروجی از دستگاههای نمک‌زدایی به منظور مقایسه آورده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1: ترکیبات شیمیایی اسپیرولینا

رطوبت	خاکستر	پروتئین	چربی	آستاگزانتین
9/46 درصد	0/7 درصد	50/93 درصد	0/1 درصد	0/21 (میلی‌گرم در کیلوگرم)

جدول 2: پروفیل اسیدهای آمینه اسپیرولینا برحسب درصد

اسید آمینه	درصد	اسید آمینه	درصد
اسپارتیک اسید (Asp)	5	ایزولوسین (Ile)	2/3
گلوتامیک اسید (Glu)	5/99	لوسین (Leu)	3/66
آسپارژین (Asn)	0/48	لیزین (Lys)	---
سرین (Ser)	1/9	سیستئین (Cys)	---
ترئونین (Thr)	2/47	پرولین (Pro)	---
تایروزین +آلانین (Tyr+Ala)	3	متیونین(Met)	6/5
والین (Val)	2/56	تریپتوفان (Trp)	8/8
فنیل آلانین (Phe)	1/9	گلایسین (Gly)	2/98
آرژنین (Arg)	2/95	گلوتامین+هیستیدین (Gln+His)	0/44

جدول3: پروفیل اسیدهای چرب *A. platensis* برحسب درصد در مقایسه با دو جنس از *Spirulina*

اسید چرب	درصد		
	A. platensis	*S. platensis* *	*S. maxima* *
اکتانوئیک اسید (8:0)	56/7	3/65 **	4 **
پالمیتیک اسید (16:0)	16/4	25/8	63
پالمیتولئیک اسید (16:1)	2/7	3/8	2
استئاریک اسید (18:0)	2/26	1/7	1
اولئیک اسید (18:1)	1/3	16/6	4
لینولئیک اسید (18:2)	5/6	12	9
لینولنیک اسید (18:3)	10/36	40/1	13

*** درصدهای دو گونه اسپیرولینا براساس منبع (Falquet,1999) آورده شده است.**

****اسید اکتانوئیک طبق منبع (Otles & Pire,2001) آورده شده است.**

Archive of SID
www.SID.ir

جدول4: آنالیز اسیدهای آمینه در اسپیرولینا (Volkmann *et al.*, 2008)

آمینو اسید	پروتئیین (گرم در 100 گرم)			آمینو اسید	پروتئیین (گرم در 100 گرم)		
	Richmond 2004	Volkmann* 2008	Volkmann** 2008		Richmond 2004	Volkmann 2008	Volkmann 2008
ایزولوسین	6/70	5/71	6/49	سیستئین	0/90	0/59	0/57
لوسین	9/80	9/26	10/17	ترئونین	6/20	4/65	5/31
لیزین	4/80	4/42	4/99	هیستیدین	2/20	9/17	10/41
متیونین	2/50	2/05	2/16	آلانین	9/50	8/51	9/27
فنیل آلانین	5/30	4/45	5/16	آرژنین	7/30	7/09	8
تیروزین	5/30	5/26	5/69	آسپارژین	11/80	9/86	3/90
تریپتوفان	0/30	0/06	0/08	گلایسین	5/70	1/10	2/98
والین	7/10	6/45	6/54	پرولین	4/20	3/33	3/75
گلوتامیک اسید	10/30	13/40	9/47	سرین	5/10	4/59	5

*** اسپیرولینا در محیط کشت Paoletti در آب شور**

**** اسپیرولینا در محیط کشت Paoletti در آب خروجی از دستگاههای نمک‌زدایی**

در این تحقیق میزان رنگدانه کلروفیل a اسپیرولینا 2/097 میکروگرم در میلی‌لیتر و میزان آستاگزانتین در اسپیرولینا با استفاده از استاندارد آستاگزانتین طی روش HPLC، 0/21 میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد. در حالیکه Jimenez و همکاران (2003) میزان کاروتنوئید پودر اسپیرولینا *Spirulina platensis* را 6-5/9 گرم در کیلوگرم و میزان کلروفیل آن را 9/2-6/6 گرم در کیلوگرم اندازه گرفتند.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که با تغییر نوع محیط کشت، دما، زمان برداشت و شرایط کشت اسپیرولینا میزان ترکیبات شیمیایی آن خصوصاً پروتئین، اسیدهای چرب و کاروتنوئیدها تغییر خواهد کرد. در صورت کشت اسپیرولینا به منظور تولید پروتئین بهترین زمان برداشت صبح می‌باشد زیرا در زمان تاریکی اسپیرولینا عمل تنفس انجام داده و در اثر متابولیسم پروتئین تولید شده است.

منابع

1 – **هوف، ق. و اسنل، ت.، 1387**. تکثیر و پرورش غذای زنده، دستورالعمل تکثیر و پرورش پلانکتون‌ها. ترجمه: قباد آذری تاکامی و م. امینی چرمهینی. موسسه انتشارات دانشگاه تهران، 342 صفحه.

2-Aslianti Y., 1988. Experiment on the mass production of dried of spirulina for fish and shrimp larvae food. Journal Penelitian Budidaya Pantai Maros, Indonesia. 4(2):40.

3-Belay, A., 2002. The potential application of *Spirulina* (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management, JANA, Vol. 5, No. 2.

4-Choonawala, B., 2007. *Spirulina* production in brine effluent from cooling towers. Durban University of Technology. 421P.

5-Colla, L.M., Bertolin, T.E. and Viera Costa, J.A., 2004. Fatty acid profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentration. Zeitschrift fur Naturforschung. Journal of Biosciences, 59(1-2):46.

6-Falquet, J. 1999. A teaching module for the production of *Spirulina*, Antenna Technology, Geneve. 16P.

Archive of SID
www.SID.ir

7-Ingthamjitr, S., 1989. Use of *Spirulina* in the culture of *Penaeus monodon* larvae. Asian Inst. of Technology, Thailand. 86P.

8-Jimenez, C., Cossio, B.R., Labella, D. and Xavier Niell, F., 2003. The feasibility of industrial production of *spirulina* in southern Spain. Aquaculture, 217:179-190.

9-Jourdan, P., 2001. Manual of small scale *Spirulina* culture, Antenna Technologies,16P.

10-Otles, S. and Prire, R., 2001. Fatty acid composition of chlorella and *spirulina* microalgae species. Journal of AOAC International, Vol. 84, No. 6.

11-Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, W.M., Alday Sanz, V., Audoorn, L., Neyts, J., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. and Nauwynck, H.J., 2006. Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture, 255:600-605.

12-Regunathan, C. and Wesley, S.G., 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. Aquaculture Nutrition, 12:425-432.

13-Sanchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., Rodriguez, I., 2002. *Spirulina*: An edible microgranism: A review, Colombia. 8P.

14-Todd, L., 2000. A review of *spirulina* as a carotenoid and vitamin source for cultured shrimp. *Spirulina* Pacifica Technical Bulletin #050, 8P.

15-Volkmann, H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L.B. and Sant Anna, E.S., 2008. Cultivation of *Arthrospira platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: Protein content and amino acid profile. Brazilian Journal of Microbiology, 39:1-4.

Archive of SID

www.SID.ir

Chemical composition of *Spirulina* powder

- **Mansoreh Ghaeni*:** Islamic Azad University, Ahwaz Branch, P.O.Box: 1915 Ahwaz, Iran
- **Mohammad Matinfar:** Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, # 14, Shahid Falahi Ave., Zip cod: 1987974635, Tehran, Iran
- **Laleh Roomiani:** Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 14155-4933 Tehran, Iran
- **Nasrin Choobkar:** Islamic Azad University, Kermanshah Branch, P.O.Box: 6718997551 Kermanshah, Iran

Received: September 2009 Accepted: January 2010

Keywords*:* *Spirulina*, Chemical composition, Pigments

Abstract

In this study, *Spirulina* has been cultured in semi mass scale in greenhouse in order to control light and temperature. Since, maximum growth of *Spirulina* had been observed; they harvested and dried to produce *Spirulina* powder. Its chemical composition had been analyzed by common methods, then fatty acid and aminoacid profile had been taken by gass chromatography and HPLC device. Also the amount of chlorophil and astaxantine as an important pigments had been measured by spectrophotometry and HPLC. The results showed, protein and fat of *Spirulina* was 46.6 and 0.1 percent, respectively. Chlorophil was 2.097µg/ml and astaxantin by using astaxantin standard was 0.21mg/kg.

Archive of SID

* Corresponding author's email: mansoreh.ghaeni@gmail.com

www.SID.ir