"مقاله پژوهشی"

تاثیر گلوکز بعنوان منبع کربنی بر رشد توده زیستی و تولید رنگدانه از ریزجلبک *Spirulina maxima*

ندا میرحسینی*[۱]، رضا داورنژاد[۱]، احمد حلاجی‌ثانی[۲]، ادگار کنویورپا[۳]، امید توکلی[۴]

۱. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲.دانشکده فنی کاسپین، پردیس دانشکده های فنی، دانشگاه تهران، رضوانشهر، ایران
۳. آزمایشگاه متابولیسم، گروه فیزیولوژی، انستیتو پلی تکنیک ملی، مکزیکو سیتی، مکزیک
۴.دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۶

چکیده

امروزه استفاده از رنگدانه‌های طبیعی به دلیل کاربرد زیاد مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. *Spirulina maxima* منبع غنی از پروتئین و رنگدانه است. بهینه‌سازی رشد و تولید رنگدانه‌های متابولیتی با تغییر غلظت و انتخاب روش مناسب افزودن گلوکز به محیط کشت امر مهمی است. در پژوهش حاضر تأثیر گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد و جایگزین محیط کشت زاروک در غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰ گرم بر لیتر) بر رشد توده زیستی و تولید رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی، کارتنوئید و کلروفیل طی ۷ روز کشت مورد بررسی قرار گرفت. کشت در قالب ۸ تیمار (۴ تیمار حاوی منبع کربنی مازاد و ۴ تیمار حاوی منبع کربنی جایگزین) با ۳ تکرار در دمای آزمایشگاه، شدت نوردهی ۲±۲۴ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه با نوردهی ۲۴ ساعته انجام گردید. حداکثر ضریب رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن مطابق با روش مدل‌سازی غیرخطی با کمک نرم‌افزار Wolfram Mathematic محاسبه گردید. بالاترین غلظت سلولی ریزجلبک (۲/۴۰ گرم بر لیتر) و ضریب رشد ویژه آن (۰/۴۷ یک بر روز) از محیط کشت با منبع گلوکز مازاد در بالاترین غلظت اولیه بدست آمد که این میزان ۱/۶۵ برابر بیشتر از زمانی بوده که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده گردید و ۳/۳ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. نتایج حاکی از آن است که غلظت‌های پایین گلوکز باعث افزایش توده زیستی ریزجلبک و رنگیزه‌های فتوسنتزی آن نمی‌شود در حالی‌که غلظت بالا گلوکز (۱/۵ گرم بر لیتر) باعث افزایش توده زیستی و تجمع کلرفیل a و کارتنوئید در ریزجلبک می‌شود هرچند تاثیر مثبتی بر سنتز فیکوبیلی‌پروتئینی ندارد. اگرچه بالاترین غلظت گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد بهترین نتایج رشدزیست توده، استخراج رنگدانه کلروفیل a و کارتنوئید را نسبت به منبع کربنی جایگزین به ثمر داشت اما تجمع بیش از حد زیست توده سبب کاهش نفوذ نور به داخل محیط کشت و تولید رنگدانه فیکوبیلی‌پروتئینی طی روزهای نهایی کشت شد. البته افزودن گلوکز چه بعنوان منبع کربنی مازاد و چه به صورت منبع کربنی جایگزین تاثیرات بسزایی بر تولید رنگدانه فیکوبیلی‌پروتئینی ندارد.

کلمات کلیدی: گلوکز، جایگزین، مازاد، توده زیستی، فیکوبیلی‌پروتئینی، *Spirulina maxima*

* عهده‌دار مکاتبات (✉). n.mir89@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

مقدمه

امروزه استفاده از رنگ‌های طبیعی در مصارف مختلف روند رو به افزایشی داشته است. *Spirulina maxima* جلبک سبز-آبی رشته‌ایی است که با استفاده از فتوسنتز، موادغذایی ساخته شده در خود را ذخیره می-کند و به واسطه ارزش غذایی بالا به سبب وجود ترکیبات پروتئین، ویتامین، مواد معدنی و اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع قرن‌هاست که از آن استفاده می‌شود (Khatun *et al*., 2006). ترکیب توده‌ی زیستی ریزجلبک با سامانه‌های نوع و میزان مواد مغذی و محیط کشت (Rodrigues *et al*., 2010)، شرایط نوردهی و شدت آن (Carvalho *et al*., 2004)، دما (Vonshak & Tomaselli, 2004)، pH (Ogbonda *et al*., 2007) و هوادهی تغییر می‌کند (De Morais & Costa, 2007). محیط کشت‌های مختلفی برای کشت اسپیرولینا به کار گرفته می‌شود که زاروک بعنوان محیط کشت استاندارد معرفی شده است هرچند تا به امروز تحقیقات گسترده‌ایی برای جایگزینی منبع نیتروژن محیط کشت زاروک انجام شده است (Costa *et al*., 1995; Avila-Leon *et al*., 2012; Cruz-Martínez *et al*., 2015).

بهره‌وری پایین کشت (معمولا کمتر از یک گرم بر لیتر) در روش اتوتروفیک یک مانع بزرگ برای موفقیت تجاری ریزجلبک *S. platensis* گزارش شد درحالی‌که اسپیرولینا می‌تواند به روش‌های اتوتروفیک، هتروتروفیک و میکسوتروفیک رشد کند (Marquez *et al*., 1995; Marquez *et al*., 1993). در حال حاضر گلوکز و ملاس از سوبستراهای کربنی رایجی هستند که برای رشد ریزجلبک *S. platensis* موثر است (سهیلی و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین محققان گلوکز را یک منبع کربن موثر برای کشت هتروتروفیک و میکسوتروفیک *S. platensis* معرفی کرده‌اند (Cohen & Ratledge, 2005; Golmakani *et al*., 2012). اگرچه منابع کربنی آلی ارزان قیمت مانند اتانول و اسید استیک در کشت هتروتروفیک و میکسوتروفیک کارآیی دارد اما در غلظت‌های بالا می‌تواند برای کشت ریزجلبک *S. platensis* و حتی سایر ریزجلبک‌ها سمی باشد (Moon, 1983; Sestakova, 1979; Chen *et al*., 1996; Marquez *et al*., 1993). با این حال محققین اثبات کردند که رشد هتروتروفیک ریزجلبک *Spirulina platensis* دارای یک مرحله تاخیر بسیار طولانی (حدود ۲۰۰ ساعت) و ضریب رشد ویژه پایین (۰/۰۰۸۳ یک بر ساعت) است (Marquez *et al*., 1995) اما در کشت میکسوتروفیک هیچ فاز تاخیری گزارش نشده است (Chen *et al*., 1996). بنابراین رشد ریزجلبک در شرایط هتروتروفیک به دلیل داشتن فاز تاخیری بسیار طولانی و ضریب رشد ویژه پایین در تولید فیکوسیانین مناسب نیست (Bogoarad, 1975).

اسپیرولینا سه نوع رنگدانه اصلی فایکوبیلی‌پروتئین، کارتنوئید و کلروفیل را سنتز می‌کند که فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و فیکواریترین سه فایکوبیلی پروتئین معمول این جلبک می‌باشند و فیکوسیانین معمولاً به عنوان رنگ خوراکی ژل‌ساز به منظور جایگزین کردن آن با رنگ‌های سنتزی در تولید مواد غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد دارد (Jespersen *et al*., 2005). کارتنوئیدها از دیگر رنگدانه‌های مهم طبیعی با خاصیت

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

آنتی‌اکسیدانی است که بطور عمده توسط گیاهان و برخی از میکروارگانیسم‌ها مانند جلبک‌ها سنتز می‌شود. انسان و حیوانات قابلیت سنتز این رنگدانه را ندارد و فقط می‌توانند از طریق رژیم غذایی خود آن را دریافت کنند (Mohammed & Mohd, 2011). این رنگدانه فتوسنتز کننده از آنجایی‌که نقش مهمی در تشکیل ویتامین A دارد و به دلیل خاصیت ضدسرطانی در صنایع دارویی و پزشکی بسیار کاربرد دارد (Del Campo *et al*., 2007). اسپیرولینا شامل ترکیبات کارتنوئیدی به ویژه بتاکاروتن (پیش نیاز ویتامین A) است (Saleh *et al*., 2011). نور، سوبسترا کربنی و نیتروژنی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر رشد اسپیرولینا و تولید فایکوسیانین است (Danesi *et al*., 2004; Cysewski and Lorenz, 2004; El Baky and El Baroty, 2006).

علی‌رغم نقش اساسی غلظت منبع کربنی بر کمیت و کیفیت توده زیستی *S. maxima*، پژوهش‌هایی در این راستا انجام نشده است. در پژوهش حاضر با توجه به خواص و کاربرد فراوان این ریزجلبک بدون تغییر سایر شرایط موثر بر رشد ریزجلبک به بررسی اثر افزودن گلوکز به محیط کشت به دو صورت مازاد و جایگزین و تاثیر غلظت گلوگز بر رشد توده‌زیستی و تولید رنگدانه‌های فیکوبیلی‌پروتئینی، کارتنوئید و کلروفیل پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب گونه ریز جلبک: نمونه خالص ریزجلبک *S. maxima* با کد شناسایی CIB 79 از آزمایشگاه دانشکده فیزیولوژی دانشگاه پلی‌تکنیک مکزیک تهیه گردید و همچنین سایر کارهای آزمایشی در این دانشگاه انجام گردید. در این بررسی ریزجلبک *S. maxima* ابتدا بعنوان مایع تلقیح برای آماده‌سازی تیمارها رشد داده شد (Rodriguez *et al*., 2012).

شرایط رشد: روش آماده‌سازی براساس محیط کشت زاروک با کمی تغییرات تهیه شده است (Memije-Lazaro *et al*., 2018). کلیه ظروف در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. کشت ریزجلبک در ارلن‌مایرهای ۱۲۵ میلی‌لیتری با ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت زاروک انجام شد. کشت همه تیمارها با ۳۵ میلی‌لیتر از تلقیح اولیه با شرایط سنی یکسان و دانسیته نوری (OD) تقریبی ۰/۳ آغاز شد. کشت در دمای آزمایشگاه و شدت نور ۲±۲۴ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه انجام شد. کلیه نمونه‌ها تحت جریان هوادهی استریل و نور کنترل‌شده ۲۴ ساعته قرار گرفتند. در طول مدت کشت شدت هوادهی توسط پمپ‌های آکواریومی (دستگاه Resun، مدل ۹۶۰۲ -AC) تنظیم گردید و CO_2 موردنیاز از طریق هوادهی و شلنگ هوا متصل به ارلن حاوی آب استریل تزریق شد. همچنین دو اتاقک تجهیز شده با لامپ LED سفید رنگ به ابعاد ۳۶×۳۵×۵۰ سانتی‌متر ساخته شد که به منظور رفلاکس نور بیشتر با ورق آلومنیومی پوشش داده شد. کلیه مراحل آزمایش به منظور حفظ محیط استریل در شعاع ۲۰ سانتی‌متری چراغ بونزن انجام شد.

افزودن منبع کربنی: گلوکز به دو صورت منبع کربنی جایگزین و مازاد به محیط کشت زاروک افزوده

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

شد. بدین صورت که یکبار بجای منبع کربنی (بی-کربنات سدیم) محیط کشت زاروک بعنوان منبع کربنی جایگزین و یکبار هم بهمراه منبع کربنی محیط کشت زاروک به محیط کشت افزوده شد. گلوکز در غلظت-های مختلف در شرایط استریل در روز صفر به صورت کامل به محیط کشت افزوده گردید. زمان ۷ روزه کشت براساس آزمایش‌های صورت گرفته و بعد از قرارگیری جلبک‌ها در فاز نمایی رشد انتخاب شد. جهت این بررسی ۸ تیمار مختلف با سه تکرار در شرایط محیطی کاملا مشابه کشت داده‌شد (جدول ۱).

جدول ۱: غلظت منبع کربنی در تیمارهای مختلف محیط کشت

تیمار	روش افزودن گلوکز	غلظت منبع کربنی (گرم بر لیتر)	تیمار	روش افزودن گلوکز	غلظت منبع کربنی (گرم بر لیتر)
۱	مازاد	۰[a]	۵	جایگزین	۰
۲		۰/۵	۶		۰/۵
۳		۱	۷		۱
۴		۱/۵	۸		۱/۵

[a]: نمونه شاهد

نمونه‌برداری و بررسی رشد: نمونه‌گیری روزانه برای بررسی رشد و میزان تولید رنگدانه انجام شد. آب یونیزه‌شده استریل به فلاسک‌های کشت پس از نمونه-گیری روزانه اضافه گردید تا حجم کلی محیط کشت ثابت بماند. نمونه‌ها در ریزلوله‌های فالکون یک میلی-لیتری نگهداری شد. میزان رشد با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج بهینه ۶۷۴ نانومتر محاسبه شد. طول موج بهینه بر اساس آزمایش و زمانی که جذب در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر به حداکثر میزان خود رسید انتخاب گردید. سپس اعداد قرائت شده در رابطه استاندارد به دست آمده از منحنی کالیبراسیون (فرمول (۱)) برای اندازه‌گیری میزان رشد براساس وزن خشک *S. maxima* قرار گرفت. برای رسم منحنی کالیبراسیون میزان جذب و وزن خشک زیست توده، ابتدا *S. maxima* جامد در غلظت‌های مختلف تهیه شد و برای بررسی صحت نتایج خوانده شده میزان جذب هر غلظت در سه تکرار اندازه‌گیری شد.

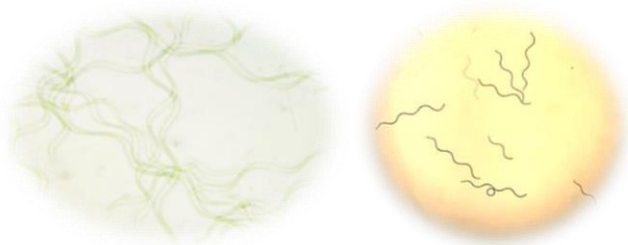
$$\text{Spirulina concentration } (gL^{-1}) = (A_{674} - 0.02010)/0.58 \quad (۱)$$
$$R^2=0.9971$$

در حین بررسی میکروسکوپی (Carl Zeiss ساخت کشور مکزیک) تیمارها، آلودگی با ریزجلبک‌های دیگر مشاهده نشد (شکل ۱).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]



شکل ۱: تصویر *Spirulina maxima* فنری با حداکثر ۶ قوس در محیط کشت

تغییرات pH در مدت کشت روزانه تعیین شد و برای اندازه‌گیری pH از دستگاه HANNA مدل pH21 pH/mV meter ساخت کشور آمریکا استفاده شد. حداکثر ضریب رشد ویژه، زمان دو برابر شدن مطابق با روش مدل‌سازی غیرخطی با کمک نرم‌افزار Wolfram Mathematic نسخه ۱۱/۳ با سطح اطمینان ۹۹ درصد محاسبه گردید (فرمول ۲). سطح زیر منحنی و دیگر نمودارها با کمک نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۲٫۰٫۸ ترسیم گردید.

$$xa = xo + \frac{a}{1 + e^{b-ct^n}} \qquad (۲)$$

xnlm= NonlinearModelFit [datax,xa,{a,b,c},t], xt=Normal [xnlm]

که در این رابطه xo غلظت در روز صفر می‌باشد همچنین a، b و c پارامترهای مدل است که از طریق مدل‌سازی به طور جداگانه برای هر یک از تیمارها برآورد شده است. n در این معادله برابر با ۱ فرض شد.

اندازه‌گیری فایکوبیلی‌پروتئین: شکستن دیواره توده زیستی خشک نشده با استفاده از روش سیکل انجماد در داخل فریزر با درجه حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد و پس از انجماد در آوردن آن در اتاق تاریک و دمای محیط در بازه‌های یک ساعته روش انتخابی این کار مطالعاتی بوده است. بدین منظور چرخه انجماد و انجمادزدایی پنج بار تکرار شده است. سپس به منظور استخراج رنگدانه کلیه ریزلوله‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت چهار درجه سانتیگراد (The Velocity 14/14 R Refrigerated centrifuge ساخت کشور چین) سانتریفوژ شدند. میزان جذب فاز رویی در طول موج‌های ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری (Multiscan Go مدل Thermo SCIENTITIC ساخت کشور انگلیس) اندازه‌گیری شد. اعداد قرائت شده به منظور محاسبه رنگدانه فایکوبیلی‌پروتئینی برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در فرمول‌های (۳) و (۴) قرار گرفت (Bennett & Bogorad, 1973).

$$PC\ (gL^{-1}) = \frac{A_{620} - 0.474\ A_{652}}{5.34} \qquad (۳)$$

$$APC\ (gL^{-1}) = \frac{A_{652} - 0.208\ A_{620}}{5.09} \qquad (۴)$$

PC: غلظت فیکوسیانین بر حسب گرم بر لیتر، *APC*: غلظت آلوفیکوسیانین بر حسب گرم بر لیتر، $A_{۶۲۰}$: جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر، $A_{۶۵۲}$: جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر. کلیه اعداد در روابط بالا فاکتورهای ثابت معادله هستند.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید: ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه با کمک دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. سپس مایع رویی[1] خارج و ماده باقیمانده یا ته نشین شده در ته ریز لوله در بیشینه دمای ۱۸ درجه سانتیگراد در داخل آون برای سه ساعت قرار گرفت تا آب باقیمانده خشک شد. بعد از این مرحله محلول استون- کلروفرم ۹۰ درصد اشباع به نسبت حجمی ۷ به ۳ به ماده باقیمانده افزوده شد. بدین ترتیب محلول به مدت ۳ الی ۷ روز در داخل فریزر با درجه حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا فرآیند استخراج تکمیل گردد. روزانه سه بار به منظور انحلال کلروفیل و کارتنوئید در محلول استون-کلروفرم اختلاط دستی انجام شد. فرآیند استخراج تا زمانی که رنگ قابل ملاحظه‌ایی در داخل ماده باقیمانده حاوی *S. maxima* مشاهده نشد ادامه یافت. سپس ریزلوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه التراسوند سونیکه شد تا سلول‌ها براحتی در حلال استون و کلروفرم هضم شود و مجددا با دستگاه سانتریفوژ (LEGEND MICRO 17، مدلThermo Scientific ساخت کشور آلمان) با سرعت ۱۳۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تغلیظ گردید. نمونه‌های حاوی کلروفیل و کارتنوئید (مجموع گزانتوفیل و کاروتن) در اسپکتروفتومتر (مدل VE-5100UV، ساخت کشور مکزیک) قرار گرفت و میزان جذب در سه طول موج ۶۶۲، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. سپس اعداد قرائت شده در فرمول‌های (۵) تا (۷) قرار گرفت تا میزان کارتنوئید، کلروفیل بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردد (Wellburn, 1994; Strickland & Parsons 1989). همه مراحل استخراج رنگدانه در اتاق تاریک برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از نور انجام شد.

$$C_a = 11.24 \times A_{662} - 2.04 \times A_{645} \left(\frac{\mu g}{mL}\right) \quad (۵)$$

$$C_b = 20.13 \times A_{645} - 4.19 \times A_{662} \left(\frac{\mu g}{mL}\right) \quad (۶)$$

$$C_{(x+C)} = (1000 \times A_{470}) - (1.09C_a - 63.14C_b \quad (۷)$$

C_a و C_b بترتیب بیانگر کلرفیل a و b بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر، $C_{(x+C)}$: بیانگر مجموع کارتنوئید بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است. A بیانگر میزان جذب در طول موج مشخص شده می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان کاهش قند: فعالیت کربوهیدرات‌ها گاهاً بر اساس بررسی میزان کاهش قند[2] ماده کربنی تعیین می‌شود که در این مطالعه از روش رایج رنگ سنجی با کمک معرف ۳،۵ دی‌نیتروسالسیالیک (DNS)استفاده شد (Summer & Graham, 1925). برای تعیین نمودار استاندارد میزان کاهش قند به منظور تعیین غلظت گلوکز مراحل زیر به ترتیب انجام شد:

۱- ابتدا محلولی با غلظت ۳/۵ گرم بر لیتر از محلول گلوکز آماده‌سازی شد و سپس برای غلظت‌های مختلف گلوکز از ۰ تا ۳/۵ حجم-های مختلفی از آب و محلول اولیه بر اساس جدول ۲ برداشته شد.

[1] Supernatant

[2] Reducing sugars (RS)

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

جدول ۲: میزان ترکیبات گلوکز و آب در غلظت‌های مختلف

غلظت گلوگز (گرم بر لیتر)	۰	۰/۵	۱	۱/۲۵	۱/۵	۲	۳	۳/۵
حجم محلول گلوگز تهیه شده (میکرولیتر)	۰	۱۴	۲۸	۳۵	۴۲	۵۶	۸۴	۱۰۰
حجم آب یونیزه‌شده (میکرولیتر)	۱۰۰	۸۶	۷۲	۶۵	۵۸	۴۴	۱۶	۰

۲- سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DNS به کلیه لوله‌ها اضافه گردید.

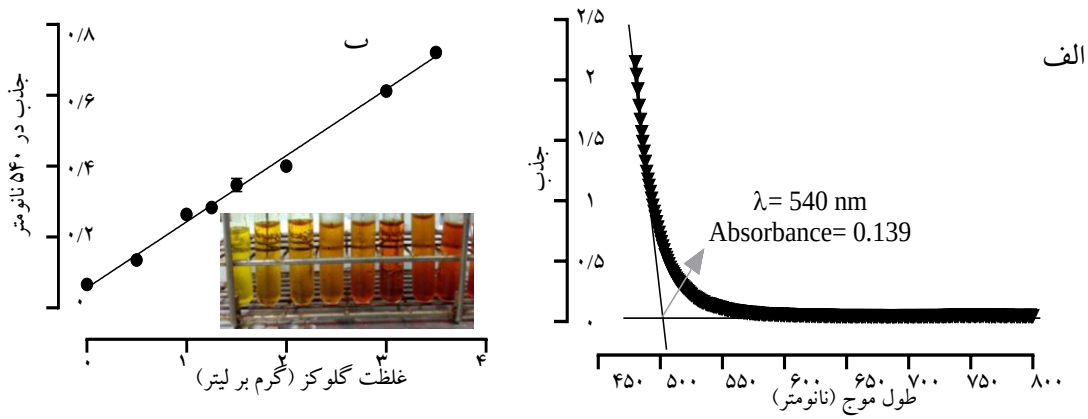
۳- کلیه لوله‌ها همزمان برای مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شد.

۴- سپس به یکباره در آب سرد قرار گرفت تا به دمای محیط برسد.

۵- حال به همه لوله‌ها یک میلی‌لیتر آب یونیزه شده اضافه گردید.

۶- در نهایت جذب کلیه نمونه‌ها با سه تکرار در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.

جذب گلوکز محلول در غلظت یک گرم بر لیتر در طول موج ۴۸۰ نانومتر تا ۸۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس طول موج بهینه از تقاطع خطوط افقی و عمودی تعیین گردید که این طول موج (۵۴۰ نانومتر) در توافق با میزان جذب محاسبه شده با مطالعه Miller بوده است (شکل ۲- الف) (Miller, 1959).



شکل ۲: الف) نمودار اعتبار سنجی طول موج، ب) نمودار استاندارد تعیین قند احیاکننده به روش DNS (داده‌های نمودارها میانگین ۳ تکرار را نشان می‌دهد.)

معادله خط با ضریب تعیین ۹۹/۴۶ درصد از منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت گلوکز بدست آمد (شکل ۲ - ب).

$$Abs_{۵۴۰}= ۰/۱۸۶۹C+۰/۰۵۶۳ \quad (۸)$$

$Abs_{۵۴۰}$: جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر، C: غلظت گلوکز بر حسب گرم بر لیتر.

سپس مشابه با الگو بالا میزان کاهش قند تیمارها در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۶ اندازه‌گیری شد و مقدار گلوکز موجود در تیمارها از رابطه (۸) محاسبه شد. نقاط تجربی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]

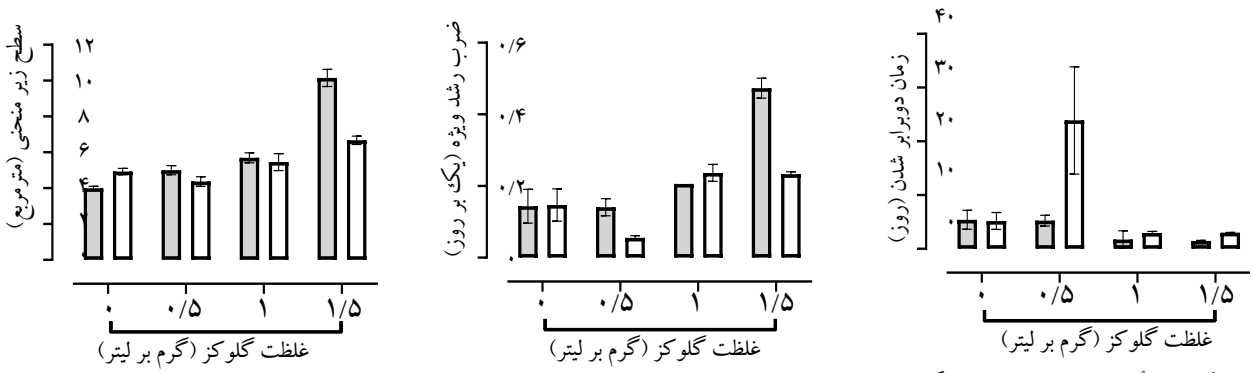
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

در تمام نمودارها و جداول نشان دهنده میانگین نتایج سه تکرار است.

نتایج

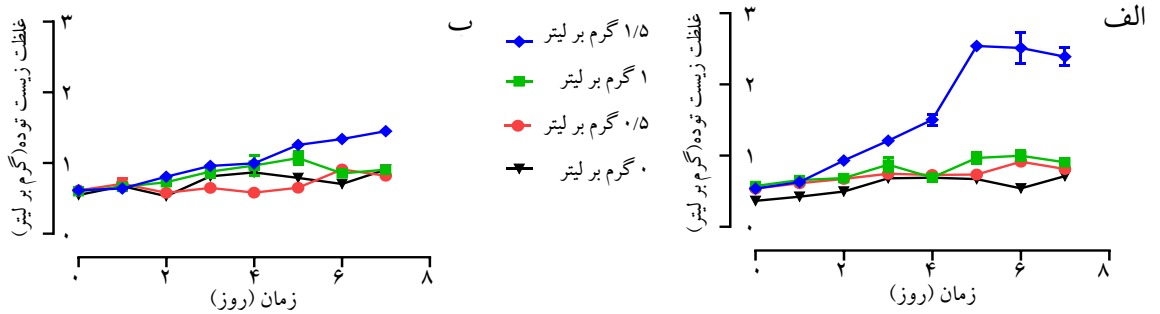
تاثیر غلظت‌های مختلف بر پارامترهای رشد: تا به امروز تأثیر منبع کربن گلوکز و غلظت آن بر میزان رشد ریزجلبک *S. maxima* و تولید رنگدانه مطالعه نشد. شکل ۳ تأثیر غلظت‌های مختلف گلوکز بر حداکثر ضریب رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و مساحت سطح زیر منحنی را نشان می‌دهد. افزایش غلظت تیمارهای حاوی منبع کربنی مازاد از ۰/۵ گرم بر لیتر تا ۱/۵ گرم بر لیتر منجر به افزایش سطح زیر منحنی می‌شود که تقریبا این میزان ۳/۳ برابر بیشتر از سطح نمونه شاهد است. علاوه بر این، حداکثر ضریب رشد ویژه (۰/۴۷ یک بر ساعت) در غلظت ۱/۵ گرم بر لیتر در محیط کشت زاروک با منبع کربنی مازاد رخ داد که سطح زیر منحنی (۱۰/۱۵ مترمربع) بالاتری را نسبت به بقیه غلظت‌ها نشان داد. همانطور که انتظار می‌رفت، کمترین زمان دوبرابر شدن (۱/۴۷ روز) در واقع در حداکثر ضریب رشد ویژه مشاهده شد.



شکل ۳: تأثیر غلظت‌های مختلف گلوکز بر ضریب رشد ویژه ، زمان دو برابر شدن و مساحت زیر منحنی (گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد (خاکستری)، جایگزین (سفید))

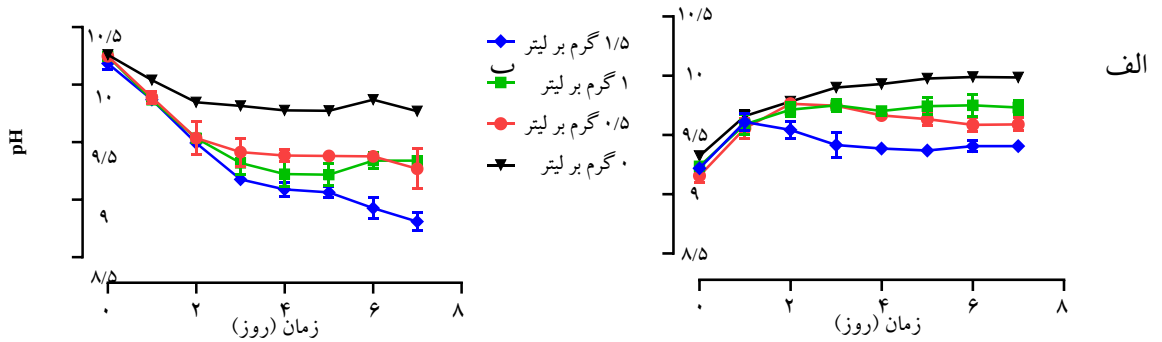
حداکثر ضریب رشد ویژه (۰/۲۳۲ یک بر روز)، کمترین زمان دوبرابر شدن (۲/۹۸ روز) و بالاترین سطح زیر منحنی (۶/۶۷ متر مربع) در محیط کشت زاروک با منبع کربنی جایگزین در غلظت ۱/۵ گرم بر لیتر مشاهده شد. شکل ۵ تغییرات غلظت زیست توده در طول دوره ۷ روزه کشت با تغییر غلظت گلوکز در محیط کشت را نشان می‌دهد. از شکل ۴ استنباط شد که افزایش غلظت گلوکز چه زمانی بعنوان منبع کربنی مازاد و یا بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد تاثیر مثبتی بر تولید زیست توده داشت ولی این تاثیر زمانی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده گردید بسیار ناچیز است. غلظت نهایی متوسط زیست توده (۴±۰/۸۶ گرم بر لیتر) در غلظت‌های کمتر از ۱/۵ گرم بر لیتر هنگامی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین به محیط کشت افزوده گردید تقریبا ثابت باقی ماند. غلظت ۱/۵ گرم بر لیتر در هر دو روش افزودن گلوکز (جایگزین و مازاد) بالاترین میزان رشد توده زیستی را نشان داد که این میزان زمانی که گلوکز به عنوان منبع مازاد (۲/۴۰ گرم بر لیتر) اضافه شد تقریبا ۱/۶۵ برابر بیشتر از زمانی است که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین (۱/۴۵ گرم بر لیتر) اضافه شد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]



شکل ۴: تغییرات غلظت زیست‌توده در طول کشت: گلوکز بعنوان منبع کربنی الف) مازاد، ب) جایگزین

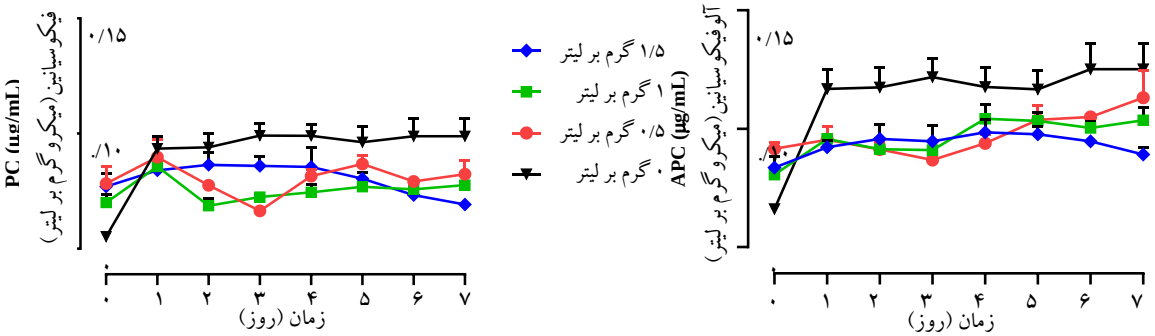
روند تغییرات pH در محیط کشت در شکل ۵ مقایسه شد. دراین پژوهش، روند تغییرات pH محیط کشت‌ها با افزودن گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد و جایگزین بسیار متفاوت است. pHهای محیط‌های کشت زمانی که گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد افزوده گردید بطور تدریجی و مداوم تا روز ۵ افزایش یافت و از روز پنجم بدون تغییر باقی ماند اما در حالتی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد، pH بطور تدریجی و مداوم تا پایان مدت کشت کاهش یافت.



شکل ۵: تغییرات pH محیط کشت با تغییرات غلظت: گلوکز بعنوان منبع کربنی الف) مازاد، ب) جایگزین

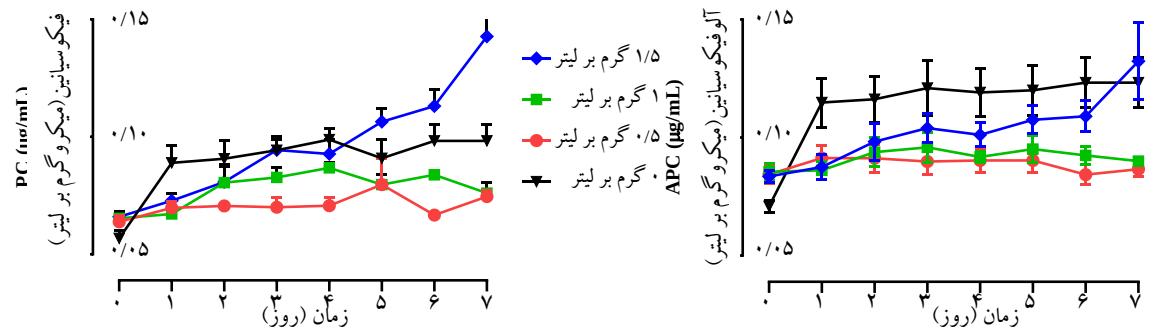
کمترین افت pH در مدت کشت در محیط کشت با منبع کربنی جایگزین در محیط کشت زاروک (غلظت ۰ گرم بر لیتر) مشاهده شد. براساس نتایج این شکل و شکل ۴، حداقل مقدار pH مربوط به تیمارها با بالاترین غلظت اولیه گلوکز بود که میزان غلظت توده زیستی در این غلظت چه زمانی گلوگز بعنوان منبع کربنی مازاد و چه به صورت منبع کربنی جایگزین افزوده گردید به حداکثر میزان رسید.

تاثیر غلظت‌های مختلف بر تولید رنگدانه-های متابولیتی: نتایج شکل ۶ نشان داد که محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین با گذشت زمان نه تنها در محیط کشت حاوی منبع کربنی مازاد با تغییرات غلظت سیر صعودی نداشته است بلکه در روزهای نهایی کاهش میزان رنگدانه مشاهده شد. همچنین میزان این دو رنگدانه با نادیده گرفتن برخی از نوسانات تحت تاثیر تغییرات چشمگیر با غلظت اولیه گلوکز قرار نگرفت.



شکل ۶: تغییر محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین با تغییرات غلظت در محیط کشت حاوی منبع کربنی مازاد

شکل ۷ تغییرات محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین با تغییرات غلظت در محیط کشت حاوی منبع کربنی گلوکز جایگزین را نشان می‌دهد. در بالاترین غلظت گلوکز، میزان محتوای آلوفیکوسیانین از ۰/۱۳ تا ۰/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر و همچنین مقدار محتوای فیکوسیانین از ۰/۰۶ تا ۰/۱۴ میکروگرم بر میلی-لیتر در طول کشت افزایش یافت. محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین در محیط کشت اتوتروفیک (بدون در نظرگرفتن منبع کربنی) نسبت به محیط کشت میکسوتروفیک در بیشینه غلظت اولیه در طول دوره کشت نسبتاً ثابت ماند.



شکل۷: تغییر محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین با غلظت در محیط کشت حاوی منبع کربنی جایگزین

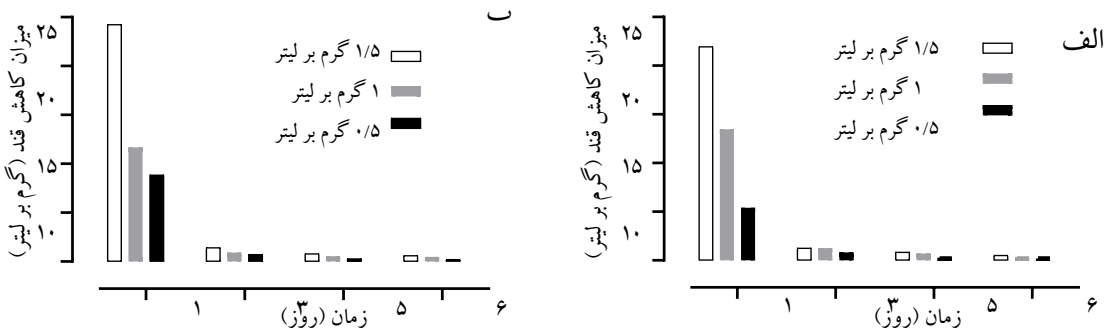
جدول ۳ محتوای کل کارتنوئید و کلروفیل استخراج شده در ابتدا و انتها دوره کشت را نشان می‌دهد. در این تحقیق میزان محتوای کلروفیل با افزایش غلظت گلوکز روند صعودی داشته است که این میزان اختلاف بین روزهای ابتدایی و نهایی در بالاترین غلظت بیشترین مقدار بود.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

جدول ۳: محتوای کارتنوئید و کلروفیل استخراج شده از *Spirulina maxima*

تیمار	کلروفیل a (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		کلروفیل b (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		کارتنوئید(میکروگرم بر میلی‌لیتر)	
	روز اول	روز نهایی	روز اول	روز نهایی	روز اول	روز نهایی
۱	۲۴/۷۱	۲۷/۸۲	۶/۹۷	۸/۶	۲۳۰۱/۳	۲۷۰۳/۱
۲	۲۶/۰۱	۳۰/۵۵	۶/۰۹	۹/۰۳	۲۲۰۷/۲	۴۰۲۴/۲
۳	۲۲/۴۷	۲۶/۰۲	۶/۱۱	۶/۰۷	۱۹۳۵/۳	۴۰۶۶/۸
۴	۲۶/۲۹	۳۷/۲۸	۵/۲۹	۷/۱۵	۲۱۵۹/۸	۴۳۳۹/۱
۵	۲۶/۷۹	۲۸/۵۹	۲/۵	۹/۶۷	۲۱۷۵/۲	۲۶۴۸
۶	۳۰/۱۳	۳۵/۲۷	۵/۷۸	۶/۷۳	۲۵۷۹/۴	۴۰۹۸/۲
۷	۲۴/۶۳	۲۶/۰۲	۱۳/۸۶	۸/۸۷	۲۱۶۴/۳	۳۵۲۶/۷
۸	۲۸/۵۹	۳۷/۲۸	۹/۷۳	۱۶/۶۷	۲۵۱۵/۶	۳۲۰۳/۸

تاثیر غلظت‌های مختلف بر میزان کاهش سطح گلوکز: شکل ۸ میزان کاهش قند در محیط کشت را نشان می‌دهد. کاهش میزان غلظت گلوکز در محیط کشت بدین معنی است که اثر یک عامل (منبع کربنی گلوکز) با تغییر سطوح (تغییر غلظت) عامل دیگر تغییر می‌کند. ارتباط بین گلوکز محیط کشت و احیا قند در طول دوره کشت با بازه یک روز درمیان اندازه‌گیری شد. مقایسه سطح کاهش قند بعد از افزودن گلوکز به ریزجلبک نشان داد که سطح گلوکز محیط کشت از روز اول تا روز سوم بسیار کاهش یافت که این میزان تقریبا در روزهای دیگر ثابت باقی‌ماند.



شکل ۸: میزان کاهش قند در طول زمان با غلظت الف) گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد، ب) گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

بحث

غلظت خشک توده سلولی، موجودی کارتنوئید، کلروفیل a و b در کلیه تیمارها روند صعودی داشته است که این میزان تغییرات زمانی که گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد و جایگزین افزوده شد متغیر بود. حداکثر رشد ویژه در بالاترین غلظت گلوکز در حدود ۳/۳ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. درحالی‌که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین به محیط کشت افزوده گردید یک کاهش ناچیزی در سطح زیر منحنی و همچنین کاهش در حداکثر رشد ویژه با غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر قابل مشاهده است که دوباره با افزایش غلظت گلوکز سیر صعودی دارد که این مورد استثناء نمی‌تواند نقص تاثیر افزودن گلوکز جایگزین را نشان دهد. در محیط کشت حاوی منبع کربنی جایگزین در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ گرم بر لیتر اختلاف چندانی در ضریب رشد ویژه مشاهده نشد (شکل ۳) که این میزان ضریب رشد ویژه تقریبا ۱/۶۰ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. محققین تأثیر شدت نور و غلظت گلوکز بر سرعت رشد سیانوباکتری *S. platensis* در هر سه شرایط فتوتوتروف، هتروتروف و میکسوتروف را مورد بررسی قراردادند و بدین نتیجه رسیدند که سرعت رشد ویژه جلبک در غلظت ۲/۵ گرم بر لیتر گلوکز با افزایش شدت نور افزایش خواهد یافت. همچنین مطالعات آنها نشان داد که در کشت‌های میکسوتروفیک به شدت نوردهی بیش از ۳۰ وات برمترمربع برای کشت نیاز است و اثبات کردند که در کشت میکسوتروفیک و هتروتروف برای دستیابی به راندمان بالا باید گلوکز در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ گرم بر لیتر به محیط کشت افزوده گردد (Chojnacka & Noworyta, 2004) که نتایج این پژوهش در تناقص با نتایج حاصل از مطالعات ما نبوده است. همانطور که اثبات کردند در کشت میکسوتروفیک فاز تاخیری وجود ندارد و نمودار رسم شده شکل ۴ در توافق با ادعا محققین است (Maria *et al*., 2019). درحالی‌که در کشت هتروتروفیک جلبک Dictyos-phaerium sp طی ۴۸ ساعت اول فاز تاخیری گزارش شده است هرچند این جلبک در محیط کشت BG-11 حاوی منبع کربنی جایگزین گلوکز و گلیسرول توانایی رشد هتروتروفیکی و میکسوتروفیکی داشته است که این میزان رشد از شرایط اتوتروفیک بیشتر بود (Ogbonna & Ogbonna, 2018). در محیط کشت حاوی منبع کربنی مازاد، غلظت نهایی زیست توده (۰/۹۰، ۰/۸۱ و ۰/۷۱ گرم بر لیتر) و حداکثر ضریب رشد ویژه (۰/۲۰، ۰/۱۴ و ۰/۱۴ یک بر روز) به ترتیب از چپ به راست با افزایش غلظت گلوکز از صفر تا یک گرم بر لیتر در طول کشت افزایش یافت. از آنجایی‌که کشت میکسوتروفیک یک فرآیند محدودکننده دوگانه است به این معنی که شدت نور کم و یا غلظت سوبسترا آلی پایین ممکن است رشد سلول را محدود کند (Chen *et al*., 1996). این امکان وجود دارد که با افزایش دوره کشت و یا شدت نوردهی به غلظت‌های بالاتر توده‌زیستی دست یافت. همان طورکه شکل ۴ نشان داد تغییرات غلظت و همچنین نوع افزودن منبع کربنی اثر بسیار زیادی بر تولید توده زیستی دارد. گلوکز در بالاترین غلظت و زمانی که به صورت منبع کربنی مازاد به محیط کشت افزوده شد تولید توده زیستی بیشتری را نسبت به زمانی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد، نشان داد که این میزان رشد در غلظت‌های پایین‌تر از ۱/۵ گرم بر لیتر در هر دو حالت افزودن منبع کربنی تقریبا ثابت بوده است. بنابراین تولید حجم بالای توده زیستی از ریزجلبک *S. maxima* به

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

افزایش غلظت گلوکز در محیط کشت پایه حاوی بی-کربنات سدیم نیاز دارد. محققین دیگر امکان استفاده از منبع کربنی گلوکز در محیط کشت زاروک جهت بدست آوردن حداکثر رشد از ریزجلبک *S. platensis* را بررسی‌کردند. همچنین آنان این واقعیت را تأیید می-کنند که گلوکز می‌تواند به عنوان یک منبع کربن مازاد برای بهبود رشد مورد استفاده قرار گیرد اما به عنوان یک منبع کربنی جایگزین بویژه در غلظت برابر با کربنات محیط کشت چندان مناسب نمی‌باشد که با نتایج کار ما در تطابق بوده است (Chen & Zhang, 1997). محققین امکان استفاده از کشت میکسوتروفیک با استفاده از سیستم ناپیوسته و نیمه پیوسته جهت غلظت سلولی بالا، میزان تولید لیپید و GLnA را از ریزجلبک *S. arthrospira* بررسی‌کردند و گزارش کردند که در سیستم ناپیوسته با افزایش غلظت منبع کربنی از ۰/۱ تا یک گرم بر لیتر میزان رشد سلولی، تولید لیپید و GLnA افزایش یافت اما در سیستم نیمه پیوسته در غلظت‌های بالاتر از یگ گرم بر لیتر تاثیر چندانی ندارد (Golmakani *et al*., 2012). آزمون‌های مطالعه ما نیز در استفاده از منبع کربنی گلوگز با استفاده از سیستم ناپیوسته به نتایج مشابه با آزمایش انجام شده در پژوهش حاضر دست یافتند و غلظت ۱/۵ گرم بر لیتر به عنوان غلظت مناسب جهت تولید توده زیستی مشخص شد. بر اساس نتایج استنباط شده رشد زیست توده را می‌توان با pHمحیط کشت تغییر داد. Chen و Zhang (۱۹۹۷) در مطالعات خود pH اولیه رشد ریزجلبک در کشت میکسوتروفیک با کمک منبع کربنی گلوکز را ۹/۵ تنظیم نمود که در طول دوره کشت (۳۰۰ ساعت) این میزان تا ۱۰/۵ افزایش یافت (Chen & Zhang, 1997). همان-طور که در شکل ۶ مشاهده شد میزان افت رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین ولو ناچیز با افزایش غلظت بیشتر بوده است که این امر حاکی از آن است که افزودن غلظت منبع کربنی به تنهایی موثر بر تولید این رنگدانه‌ها نیست حتی سبب کاهش رنگدانه در طول دوره کشت خواهد شد و در غلظت ۱/۵گرم بر لیتر محتوای منبع کربنی جایگزین میزان رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین بعد از روز سوم رو به افزایش بوده است ولی این میزان چندان چشمگیر نبوده است. فرجی و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که استفاده از گلوکز نسبت به سایر منابع کربنی (اتانول و اسید استیک) در محیط کشت سچلوسر طی دوره ۱۴ روزه کشت تاثیر بسزایی در تولید فیکوسیانین از نمونه *S. platensis* دارد در این تحقیق گلوکز با غلظت یک گرم بر لیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نوردهی ۵۰۰۰ لوکس (۹۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) به روش نیمه پیوسته بیشترین تاثیر را در تولید میزان فیکوسیانین (۴۳/۹۴ درصد) داشته است که این میزان با افزایش دما کاهش یافت و میزان تولید فیکوسیانین در شدت نوردهی ۲۰۰۰ و ۳۵۰۰ لوکس (۳۶ و ۶۳ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) ثابت بود (فرجی و همکاران، ۱۳۹۴). بر اساس تحقیقات این محققین به نظر می‌رسد که با افزایش دوره کشت و یا افزایش نوردهی تولید فیکوسیانین افزایش خواهد یافت. نور نقش مهمی در پرورش جلبک و تولید رنگدانه ایفا می‌کند میکروارگانیسم‌های فتوسنتزی وقتی میزان روشنایی خیلی کم یا زیاد است با کاهش رشد و تولید رنگدانه مواجه می‌شوند اما در محدوده اشباعیت فتوسنتزی حداکثر ضریب رشد ویژه مستقل از نور است و همچنین در کشت میکسوتروفیک سیانوباکتری *S. platensis* با وجود بستر آلی (مانند گلوکز) رشد سلول به شدت وابسته به فتوسنتز نیست بنابراین وجود نور از

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

عامل‌های ضروری رشد نیست (Chojnacka & Noworyta, 2004). در حالی‌که در کشت اتوتروفیک تثبیت کربن وابسته به نور است ولی در کشت هتروتروفیک وابسته به وجود منبع کربن آلی است (Zhang *et al*., 1999). همچنین محققین اثبات کردند که شدت و زمان نوردهی بر فعالیت‌های آنزیمی و سنتز ماکرو و میکرومولکول‌های جلبک تاثیر دارد (Belkoura *et al*., 2006). همچنین این رنگدانه‌ها با استفاده از نور آفتاب یا هوای خشک، به راحتی در طی فرآیند تولید انبوه قابل تخریب هستند (Park *et al*., 2018). شکل ۴ نشان داده است که کشت اتوتروفیک تاثیر چندانی بر رشد زیست توده ندارد. حداکثر غلظت زیست توده نهایی (۱/۴۵ گرم بر لیتر)، ضریب رشد ویژه (۰/۱۸ یک بر روز)، همچنین کمترین زمان دو برابر شدن (۳/۷۷ روز) با بالاترین میزان تولید رنگدانه فیکوسیانین و آلوفیکوسانین در حداکثر غلظت اولیه گلوکز هنگامی که بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد اتفاق افتاد در حالی‌که میزان غلظت زیست توده نهایی (۰/۹۰ گرم بر لیتر)، ضریب رشد ویژه (۰/۱۴ یک بر روز)، همچنین کمترین زمان دو برابر شدن (۵/۱۷ روز) زمانی که هیچ منبع کربنی در محیط کشت وجود نداشته است پایین‌تر بود. Chen و Zhang به منظور دستیابی به غلظت سلولی بالا و میزان تولید بیشتر فیکوسیانین از *S. platensis* در کشت میکسوتروفیک با کمک منبع کربنی گلوکز در غلظت‌های یک و دو گرم بر لیتر با استفاده از سیستم نیمه‌پیوسته طی دوره ۳۰۰ ساعته کشت را مورد بررسی قرار دادند. در این روش بالاترین غلظت سلولی ۱۰/۲۴ گرم بر لیتر بر اساس وزن خشک بدست آمد و در روش هتروتروف تولید فیکوسیانین و ضریب رشد ثابت بود اما در روش میکسوتروف محتوای تولید فایکوسیانین از ۵۴ به ۱۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک سلولی افزایش یافت. همچنین در روش میکسوتروفیک بیشترین تولید غلظت سلولی منجر به تولید بیشترین میزان فیکوسیانین شد و نشان دادند که با افزایش شدت نوردهی (۱۶۰-۸۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) میزان تولید فیکوسیانین و توده زیستی به حداکثر میزان خواهد رسید (Chen & Zhang, 1997). این میزان نوردهی بسیار بیشتر از شدت نوری مورد مطالعه ما بوده است. بنابراین نور به عنوان مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر رشد سلولی و میزان تولید فیکوسیانین مشخص شد (Rangel -Yagui *et al*., 2004). نتایج حاکی از آن است که میزان روند رشد محتوای کلروفیل a در طول دوره کشت صعودی است ولی میزان محتوای کلروفیل b دارای نوساناتی در طول دوره کشت بود که در بالاترین غلظت گلوکز تغییرات محتوای رنگدانه کلروفیل b بیشترین میزان بود. غلظت‌های پایین گلوکز (پایین‌تر از ۱/۵ گرم بر لیتر) باعث افزایش توده زیستی ریزجلبک و رنگیزه‌های فتوسنتزی آن نمی‌شود در حالی‌که غلظت‌های بالاتر گلوکز باعث افزایش توده زیستی و تجمع کلرفیل a و کارتنوئید در ریزجلبک می‌شود ولی سنتز کلروفیل b چندان موفقیت آمیز نبوده است. Arunakumara و همکاران (۲۰۰۷) محتوای کلروفیل a ریزجلبک *S. platensis* را ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تخمین زدند که نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان کلروفیل a ریزجلبک *S. maxima* بسیار بیشتر از رنگدانه هم نوع *S. platensis* است. محققین دیگر میزان کلروفیل ریزجلبک *S. fussiformis* را ۵/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آوردند (Madhyastha & Vatsala, 2007) که در مقایسه با تحقیق ما میزان کلروفیل بسیار کمتری داشته است. در نتیجه، با توجه به هدفی که برای کشت جلبک

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

در نظر گرفته می‌شود می‌توان اقدام به فراهم‌سازی شرایط رشد بهینه برای ریزجلبک *S. maxima* نمود. کاهش گلوکز و یا قند در غلظت‌های بالاتر بسیار زیاد بوده است. با توجه با شکل ۸ و نتایج استنباط شده از تولید توده زیستی مشخص شد که بیشترین میزان رشد توده زیستی طی پنج روز اول اتفاق افتاد و منبع کربنی یکی از شاخص‌های ضروری رشد ریزجلبک است. از آنجایی‌که ریزجلبک از منبع کربن آلی همچون گلوکز و بی‌کربنات سدیم بعنوان منبع کربن استفاده می‌کنند تا انرژی شیمیایی مورد نیاز فتوسنتز را فراهم کنند ولی همان‌طور که از شکل ۸ مشخص است، از روز پنج به بعد میزان منبع کربنی آلی در محیط بسیار کاهش یافت و از این پس ریزجلبک از منبع کربنی غیرآلی خود مانند دی-اکسیدکربن تولید شده در اثر فرآیند فتوسنتز و بعد از انحلال در محیط کشت برای سلول‌های در حال رشد استفاده می‌کند. بنابراین ریزجلبک در هنگام رشد طی روزهای اولیه از کربن آلی و هم لزوما کربن غیرآلی استفاده می‌کند اما بعد از مصرف کربن آلی تنها عامل موثر بر رشد ریزجلبک کربن غیرآلی و نور است. البته قابل ذکر است که برخی از ریزجلبک‌ها همواره برای مصرف کربن آلی بعنوان منبع کربنی به نور بعنوان منبع انرژی نیازمندند (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

از آنجایی‌که هدف اولیه این پژوهش بررسی تاثیر افزودن گلوکز بر تولید توده‌زیستی *S. maxima* است بنابراین رشد و تولید توده‌زیستی در چهار غلظت مختلف، با افزودن منبع کربنی گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد و جایگزین بررسی شد و در انتها میزان رنگدانه‌های تولید شده درون سلولی مورد بررسی قرار گرفت. این ریزجلبک قادر به رشد در شرایط هتروتروف می‌باشند ولی از آنجا که ضریب رشد ویژه و محتوای رنگدانه در چنین کشت‌هایی پایین است تولید آن با استفاده از چنین روشی مناسب نمی‌باشد. تولید بیش‌تر توده‌زیستی هنگامی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد باعث تولید بیش‌تر رنگدانه گردید هرچند این اختلاف بسیار ناچیز است. مطالعه حاضر نشان داد که *S. maxima* برای تولید توده‌زیستی بیشتر به قند بیشتری نیاز دارد و نشان داد که میزان رشد نسبت به تغییرات غلظت گلوکز بسیار حساس است و به همین سبب هنگامی که گلوگز بعنوان منبع کربنی مازاد به محیط کشت افزوده گردید میزان تولید توده‌زیستی بیش‌تر از حالتی است که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد. بر اساس نتایج این مطالعه، کشت میکسوتروفیک نه تنها غلظت توده زیستی نهایی بالاتر را به دنبال دارد، بلکه منجر به افزایش کارتنوئید و کلروفیل می‌شود اما برای تولید رنگدانه فیکوبیلی‌پروتئین دست-یابی به حداکثر توده‌زیستی به تنهایی کافی نیست بلکه شاید باید مدت زمان کشت و یا میزان نوردهی را افزایش داد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه پلی تکنیک مکزیک جهت ساپورت مالی پروژه‌ها به شماره ۲۰۱۹۵۵۸۴، ۲۰۱۹۵۳۲۰ و ۲۰۱۹۶۳۰۴ تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

۱. سهیلی، م.، رضایی، ک.ا.، مرتضوی، ع.، خسروی دارانی، ک.، هاشمی، م.، کمیلی، ر. و احمدی، ن.، ۱۳۹۱. تولید فایکوسیانین توسط جلبک

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

اسپیرولینا پلاتنسیس. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۷(۵)، ۷۹۷-۷۸۷.

۲. فرجی، د.، رضایی، ک. ا.، هاشمی‌روان، م.، کلانتری، م.، شریفی، ا.، گلمکانی، م. ت. و فرجی، س.، ۱۳۹۴. بهینه سازی کشت فدبچ منابع دو کربنی جدید (اتانول و اسید استیک) در تولید فایکوسیانین بوسیله ریزجلبک اسپیرولینا. نشریه نوآوری در علوم و فنّاوری غذایی. ۷(۲)، ۸۷-۷۸.

3. Arunakumara, K.K. I. U., Xuecheng, Z. and Yijing, Z., 2007. Growth and Pigment biosynthesis of *Spirulina platensis* as affected by Pb^{2+} concentrations. Bangladesh Journal of Botany. 36, 177-179.
4. Avila-Leon, I., Matsudo, M.C., Sato, S., and Carvalho, J.C.M., 2012. Arthrospira platensis biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. Journal of Applied Microbiology, 112(6), 1086-1094.
5. Bennett, A. and Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. Journal of Cell Biology, 58, 419–435.
6. Carvalho, J.C.M., Francisco, F.R., Almeida, K.A., Sato, S., Converti, A., 2004. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. Journal of Phycology, 40, 589-597.
7. Chen, F., Zhang, Y., Guo, S. 1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. Biotechnology Letters, 18, 603-608.
8. Chen, F. and Zhang, Y.M., 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. Enzyme and Microbial Technology, 20, 221-224.
9. Cohen, Z., Ratledge, C., 2005. Single Cell Oil. AOCS Press, Champaign, IL, USA. pp. 107-123.
10. Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F. J., 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology journal, 3, 21–34.
11. Chojnacka, K. and Noworyta, A., 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. Enzyme and Microbial Technology, 34, 461–465.
12. Costa, J.A.V., Cozza, K.L., Oliveira, L., Magagnin, G., 1995. Different tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga Dunaliella tertiolecta. Applied Microbiology and Biotechnology, 44, 287-292.
13. Cruz-Martínez, L.C., Jesus, C.K.C., Matsudo, M.C., Danesi, E.D.G., Sato, S and Carvalho, J.C.M., 2015. Growth and composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in a tubular photobioreactor using ammonium nitrate as the nitrogen source in a fed-batch process. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 32, 347-356.
14. Cysewski, G.R., Lorenz, R.T., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-species of high potential: Haematococcus In: Richmond A, ed Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied phycology. Blackwell Publishing Ltd. pp 281–8.
15. Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., 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.
16. De Morais, M.G., Costa, J.A., 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and Scenedesmus obliquus cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Biotechnology, 129, 439-445.
17. Del Campo, J. A., García-González, M. and Guerrero M. G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Applied Microbiology Biotechnology, 74, 1163–1174.
18. El Baky, H.H.A and El Baroty, G.S., 2016. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]

27. Mohammed, M.K. and Mohd, M.K., 2011. Production of carotenoids (antioxidants/colournt) in *Spirulina* in response to indole acetic acid (IAA). International Journal of Environmental Science and Technology, 3, 4973-4979.
28. Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate, and their synergistic mixtures. Journal of Applied Bacteriology, 55, 453-460.
29. Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O., 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. Bioresource Technology, 98, 2207-2211.
30. Ogbonna, I.O. and Ogbonna, J.C., 2018. Effects of Carbon Source on Growth Characteristics and Lipid Accumulation by Microalga Dictyosphaerium sp. with Potential for Biodiesel Production. European Power Electronics and Drives Journal, 10, 29-42.
31. Park, W.S., Kim, H.J., Li, M., Lim, D.H., Kim, J., Kwak, S.S., Chang-Min Kang, C.M., Ferruzzi, M.G. and Ahn, M.J., 2018. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in *Spirulina* Powder & Their Antioxidant Activities. Molecules, 23, 1-11.
32. Rangel-Yagui, C.de.O. Danesi. E.D., de Carvalho J.C.M. and Sato, S., 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresour Technol, 92, 133-141.
33. Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2010. Fed-batch cultivation of Arthrospira (*Spirulina*) platensis: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. Bioresource Technology, 101, 4491-4498.
34. Rodriguez-Sánchez, R., Ortiz-Butrón, R., Blas-Valdivia, V., Hernández-García, A. and Cano- Europa, E., 2012. Phycobiliproteins or C-phycocyanin of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* protect against $HgCl_2$-caused oxidative stress and renal damage. Food Chemistry, 135, 2359–2365.
35. Saleh, A.M., Dhar, D.W. and P. Singh, K., 2011. Comparative pigment profiles of Asparaginase by *Spirulina maxima*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016. 1-7.
19. Golmakani, M.T, Rezaei, K., Mazidi, S. and Razavi, S.H. 2012. Effect of Alternative C_2 Carbon Sources on the Growth, Lipid, and γ-Linolenic Acid Production of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). Food Science and Biotechnology, 21, 355-363.
20. Jespersen, L., Strqmdahl, L. D, Olsen, K. and Skibsted, L. H., 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. European Food Research and Technology, 220, 261-266.
21. Khatun, R., Noor, P., Akhter, N., Jahan, M. A. A., Hossain, M. and Munshi, J. L. 2006. *Spirulina* Culture in Bangladesh XI Selection of a Culture Medium, Suitable for Culturing a Local Strain of *Spirulina*. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 41, 227-234.
22. Madhyastha, H.K. and Vatsala, T.M., 2007. Pigment production in *Spirulina* fussiformis indifferent photophysical conditions. Biomolecular Engineering, Vol. 24, 301–305.
23. Marquez, F.J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering, 76, 408-410.
24. Marquez, F.J., Nishio, N., Nagai, S., 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 62, 159-164.
25. Memije-Lazaro, I.N., Blas-Valdivia, V., Franco-Colín, M., and Cano-Europa, E., 2018. *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. Journal of Functional Foods, 43, 37–43.
26. Miller, G., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.

different *Spirulina* strains. Research Journal Biotechnology, 2, 67-74.
36. Sestakova, M., 1979. Growth of Candida utilis on a mixture of monosaccharides, acetic acid, and ethanol as a model of waste sulphite liquor. Folia Microbiologica, 24, 318-327.
37. Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R., 1989. Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. Journal of Marine Research, 21, 155–163.
38. Summer, J. and Graham, V., 1925. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. Journal of Biological Chemistry, 62, pp 393.
39. Vonshak, A., Tomaselli, L.. 2004. *Arthrospira* (*Spirulina*): Systematics and ecophysiology biochemistry. In: Vonshak A (ed). *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Abingdon: Taylor and Francis.
40. Vonshak, A., 1977. Spriulina platensis (Arthrospira): physicology, cell biology, and biotechnology. Taylor & Francis publication, London. pp 117-130.
41. Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, 144, 307–313.
42. Zhang, X.W., Zhang, Y.M. and Chen, F., 1999. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. Process Biochemistry, 34,477–481.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.6.1]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.107]