

"مقاله پژوهشی"

تأثیر گلوکز بعنوان منبع کربنی بر رشد توده زیستی و تولید رنگدانه از ریز جلبک *Spirulina maxima*

ندا میرحسینی*^۱، رضا داورنژاد^۱، احمد حلاجی ثانی^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 دانشکده های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

چکیده

امروزه استفاده از رنگدانه های طبیعی به دلیل کاربرد زیاد مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. *Spirulina maxima* منبع غنی از پروتئین و رنگدانه است. بهینه سازی رشد و تولید رنگدانه های 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 غلظت های مختلف (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰، گرم بر لیتر) بر رشد توده زیستی و تولید رنگدانه های فیکوبیلی پروتئینی، 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 24 ± 2 میکرومول بر مترمربع بر ثانیه با نوردهی ۲۴ ساعته انجام گردید. حداکثر ضریب رشد ویژه و زمان دوبرابر شدن مطابق با روش مدل سازی غیرخطی با کمک نرم افزار 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 غلظت های پایین گلوکز باعث افزایش توده زیستی ریزجلبک و رنگیزه های فتوسنتزی آن نمی شود در حالی که غلظت بالا گلوکز (۱/۵ گرم بر لیتر) باعث افزایش توده زیستی و تجمع کلروفیل a و کارتنوئید در ریزجلبک می شود هرچند تأثیر مثبتی بر سنتز فیکوبیلی پروتئینی ندارد. اگرچه بالاترین غلظت گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد بهترین نتایج رشد زیست 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 فیکوبیلی پروتئینی طی روزهای نهایی کشت شد. البته افزودن گلوکز چه بعنوان منبع کربنی مازاد و چه به صورت منبع کربنی جایگزین تأثیرات بسزایی بر تولید رنگدانه فیکوبیلی پروتئینی ندارد.

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

مقدمه

امروزه استفاده از رنگ‌های طبیعی در مصارف مختلف روند رو به افزایشی داشته است. *Spirulina maxima* جلبک سبز-آبی رشته‌ای است که با استفاده از فتوسنتز، مواد غذایی ساخته شده در خود را ذخیره می‌کند 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 گسترده‌ای 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 (معمولاً 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., 1993; Marquez et al., 1995). 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 فایکوبیلی پروتئین، کارتنوئید و کلروفیل را سنتز می‌کند که فیکوسیانین، آلفوفیکوسیانین 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

مکزیک تهیه گردید و همچنین سایر کارهای آزمایشی در این دانشگاه انجام گردید. در این بررسی ریزجلبک *S. maxima* ابتدا بعنوان مایع تلقیح برای آماده سازی تیمارها رشد داده شد (Rodriguez et al., 2012).

شرایط رشد: روش آماده سازی 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 ارلن مایرهای ۱۲۵ میلی لیتری با ۹۰ میلی لیتر محیط کشت زاروک انجام شد. کشت همه تیمارها با ۳۵ میلی لیتر از تلقیح اولیه با شرایط سنی یکسان و دانسیته نوری (OD) تقریبی ۰/۳ آغاز شد. کشت در دمای آزمایشگاه و شدت نور 24 ± 2 میکرومول بر مترمربع بر ثانیه انجام شد. کلیه نمونه ها تحت جریان هوادهی استریل و نور کنترل شده ۲۴ ساعته قرار گرفتند. در طول مدت کشت شدت هوادهی توسط پمپ های آکواریومی (دستگاه Resun، مدل AC-۹۶۰۲) تنظیم گردید و CO₂ مورد نیاز 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 سانتی متر ساخته شد که به منظور رفلاکس نور بیشتر با ورق آلومینیومی پوشش داده شد. کلیه مراحل آزمایش به منظور حفظ محیط استریل در شعاع ۲۰ سانتی متری چراغ بوزن انجام شد.

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

آنتی اکسیدانی است که بطور عمده توسط گیاهان و برخی از میکروارگانیسم ها مانند جلبک ها سنتز می شود. انسان و حیوانات قابلیت سنتز این رنگدانه را ندارد و فقط می توانند از طریق رژیم غذایی خود آن را دریافت کنند (Mohammed & Mohd, 2011). این رنگدانه فتوسنتز کننده از آنجایی که 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، سوستر کربنی و نیتروژنی از مهم ترین عوامل مؤثر بر رشد اسپیرولینا و تولید فایکوسیانین است (Danesi et al., 2004; Cysewski and Lorenz, 2004; El Baky and El Baroty, 2006).

علی رغم نقش اساسی غلظت منبع کربنی بر کمیت و کیفیت توده زیستی *S. maxima*، پژوهش هایی در این راستا انجام نشده است. در پژوهش حاضر با توجه به خواص و کاربرد فراوان این ریزجلبک بدون تغییر سایر شرایط مؤثر بر رشد ریزجلبک به بررسی اثر افزودن گلوکز به محیط کشت به دو صورت مازاد و جایگزین و تأثیر غلظت گلوکز بر رشد توده زیستی و تولید رنگدانه های فیکوبیلی پروتئینی، کارتنوئید و کلروفیل پرداخته شد.

مواد و روش ها

انتخاب گونه ریز جلبک: نمونه خالص ریزجلبک *S. maxima* با کد شناسایی CIB 79 از آزمایشگاه دانشکده فیزیولوژی دانشگاه پلی تکنیک

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 کاملاً مشابه کشت داده شد (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		۰	۵		۰
۲		۰/۵	۶		۰/۵
۳	مازاد	۱	۷	جایگزین	۱
۴		۱/۵	۸		۱/۵

^a: نمونه شاهد

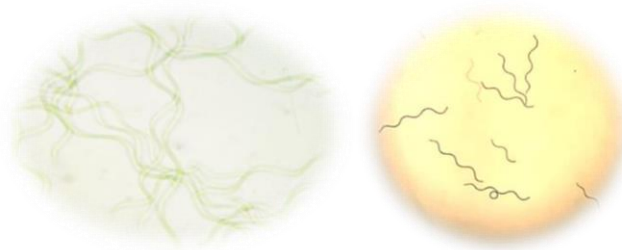
نمونه‌برداری و بررسی رشد: نمونه‌گیری روزانه برای بررسی رشد و میزان تولید رنگدانه انجام شد. آب یونیزه شده استریل به فلاسک‌های کشت پس از نمونه- گیری روزانه اضافه گردید تا حجم کلی محیط کشت ثابت بماند. نمونه‌ها در ریزلوله‌های فالکون یک میلی- لیتری نگهداری شد. میزان رشد با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج 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.

$$\text{Spirulina concentration (g/L)} = \frac{(A_{674} - 0.02010)}{0.58} \quad (1)$$

$$R^2 = 0.9971$$

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



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

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) سانتریفوژ شدند. میزان جذب فاز رویی در طول موج‌های ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری (Multiscan Go مدل Thermo SCIENTIFIC ساخت کشور انگلیس) اندازه‌گیری شد. اعداد قرائت شده به منظور محاسبه رنگدانه فایکوبیلی پروتئینی برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در فرمول‌های (۳) و (۴) قرار گرفت (Bennett & Bogorad, 1973).

$$PC \text{ (gL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{620} - 0.474 A_{652}}{5.34} \quad (3)$$

$$APC \text{ (gL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{652} - 0.208 A_{620}}{5.09} \quad (4)$$

PC: غلظت فیکوسیانین بر حسب گرم بر لیتر، *APC*: غلظت آلفیکوسیانین بر حسب گرم بر لیتر، A_{620} : جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر، A_{652} : جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر. کلیه اعداد در روابط بالا فاکتورهای ثابت معادله هستند.

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 نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۲,۰,۸ ترسیم گردید.

$$x_a = x_0 + \frac{a}{1 + e^{b-ct^n}} \quad (2)$$

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

که در این رابطه x_0 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 فایکوبیلی پروتئین: 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

شد. سپس اعداد قرائت شده در فرمول‌های (۵) تا (۷) قرار گرفت تا میزان کارتوئید، 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.

$$C_a = 11.24 \times A_{662} - 2.04 \times A_{645} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \quad (5)$$

$$C_b = 20.13 \times A_{645} - 4.19 \times A_{662} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \quad (6)$$

$$C_{(x+C)} = (1000 \times A_{470}) - (1.09C_a - 63.14C_b) \quad (7)$$

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

اندازه‌گیری میزان کاهش قند: فعالیت

کربوهیدرات‌ها گاه‌ها بر اساس بررسی میزان کاهش قند^۲ ماده کربنی تعیین می‌شود که در این مطالعه از روش رایج رنگ سنجی با کمک معرف ۳،۵ دی‌نیتروسالیسیلیک (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.

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتوئید: 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^۱ 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 کارتوئید در محلول استون-کلروفرم اختلاط دستی انجام شد. فرآیند استخراج تا زمانی که رنگ قابل ملاحظه‌ای 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 مجدداً با دستگاه سانتریفوژ (LEGEND MICRO 17، مدل Thermo Scientific ساخت کشور آلمان) با سرعت ۱۳۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تغلیظ گردید. نمونه‌های حاوی کلروفیل و کارتوئید (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

² Reducing sugars (RS)

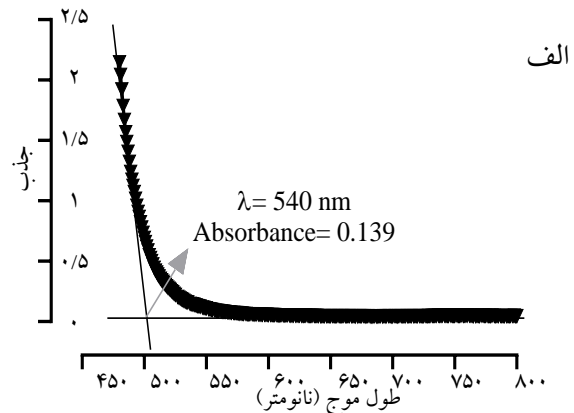
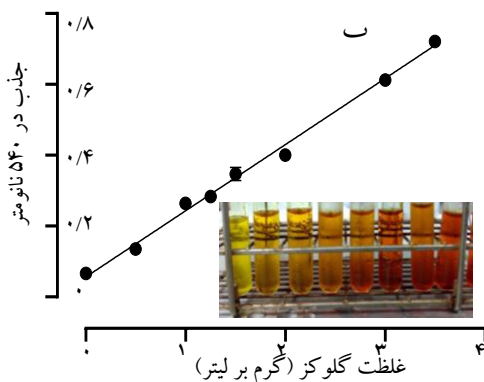
¹ Supernatant

جدول ۲: میزان ترکیبات گلوکز و آب در غلظت‌های مختلف

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

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).

۲- سپس ۱۰۰ میکرو لیتر 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 میلی لیتر آب یونیزه شده اضافه گردید.



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

Abs_{540} : 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

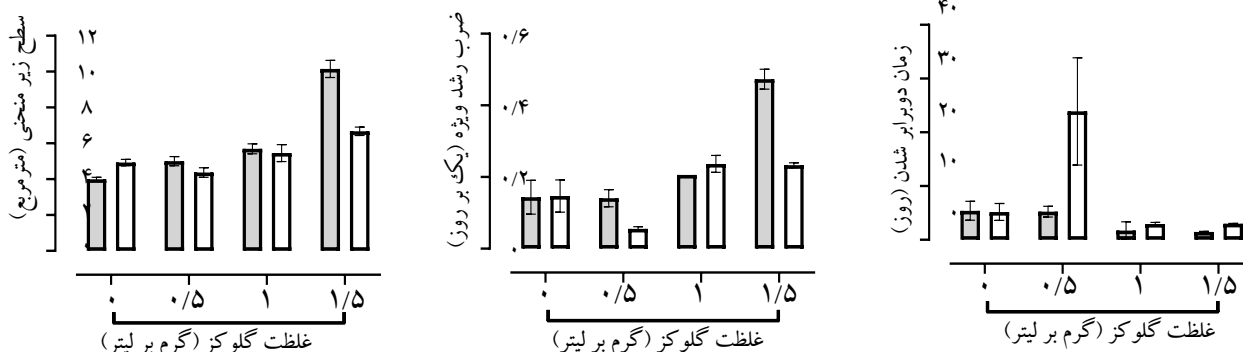
معادله خط با ضریب تعیین ۹۹/۴۶ درصد از منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت گلوکز بدست آمد (شکل ۲- ب).
 (۸) $Abs_{540} = 0.1869C + 0.0563$

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

نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف بر پارامترهای رشد: تا

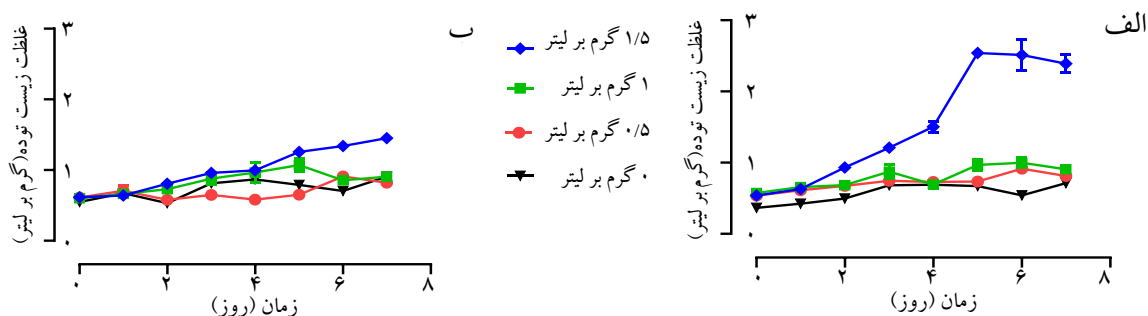
به امروز تأثیر منبع کربن گلوکز و غلظت آن بر میزان رشد ریز جلبک *S. maxima* و تولید رنگدانه مطالعه نشد. شکل ۳ تأثیر غلظت‌های مختلف گلوکز بر حداکثر ضریب رشد ویژه، زمان دو برابر شدن و مساحت سطح زیر منحنی را نشان می‌دهد. افزایش غلظت تیمارهای



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)).

افزوده گردید بسیار ناچیز است. غلظت نهایی متوسط زیست توده (0.186 ± 0.04 گرم بر لیتر) در غلظت‌های کمتر از ۱/۵ گرم بر لیتر هنگامی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین به محیط کشت افزوده گردید تقریباً 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 ($0.2/40$ گرم بر لیتر) اضافه شد تقریباً $1/65$ برابر بیشتر از زمانی است که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین ($1/45$ گرم بر لیتر) اضافه شد.

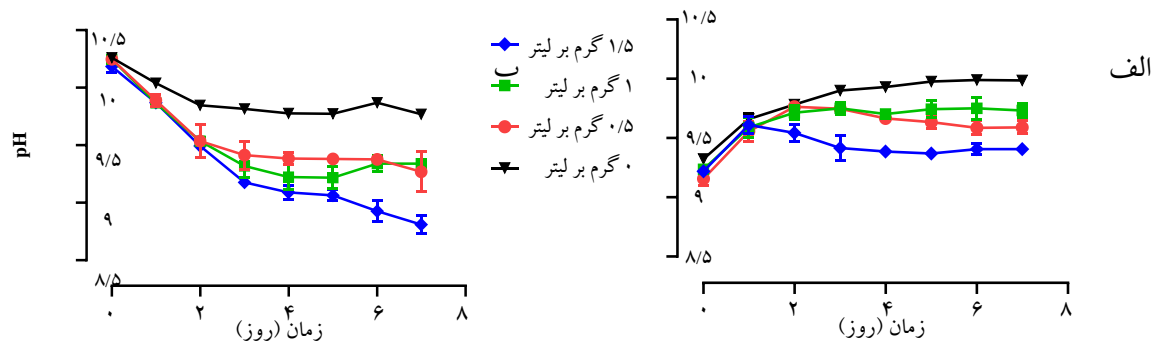
حداکثر ضریب رشد ویژه (0.232 یک بر روز)، کمترین زمان دو برابر شدن ($2/98$ روز) و بالاترین سطح زیر منحنی ($6/67$ مترمربع) در محیط کشت زاروک با منبع کربنی جایگزین در غلظت ۱/۵ گرم بر لیتر مشاهده شد. شکل ۵ تغییرات غلظت زیست توده در طول دوره ۷ روزه کشت با تغییر غلظت گلوکز در محیط کشت را نشان می‌دهد. از شکل ۴ استنباط شد که افزایش غلظت گلوکز چه زمانی بعنوان منبع کربنی مازاد و یا بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد تأثیر مثبتی بر تولید زیست توده داشت ولی این تأثیر زمانی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین



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

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.

روند تغییرات pH در محیط کشت در شکل ۵ مقایسه شد. در این 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

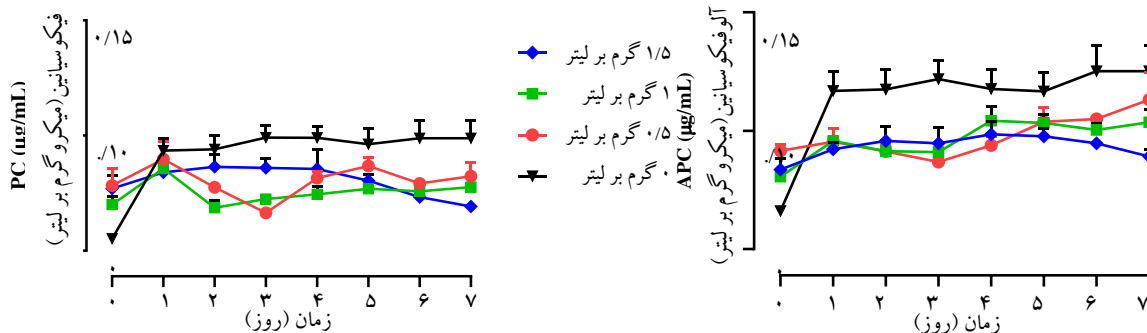


شکل ۵: تغییرات pH محیط کشت با تغییرات غلظت: گلوکز بعنوان منبع کربنی الف) مازاد، ب) جایگزین

غلظت اولیه گلوکز بود که میزان غلظت توده زیستی در این غلظت چه زمانی گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد و چه به صورت منبع کربنی جایگزین افزوده گردید به حداکثر میزان رسید.

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 تأثیر تغییرات چشمگیر با غلظت اولیه گلوکز قرار نگرفت.

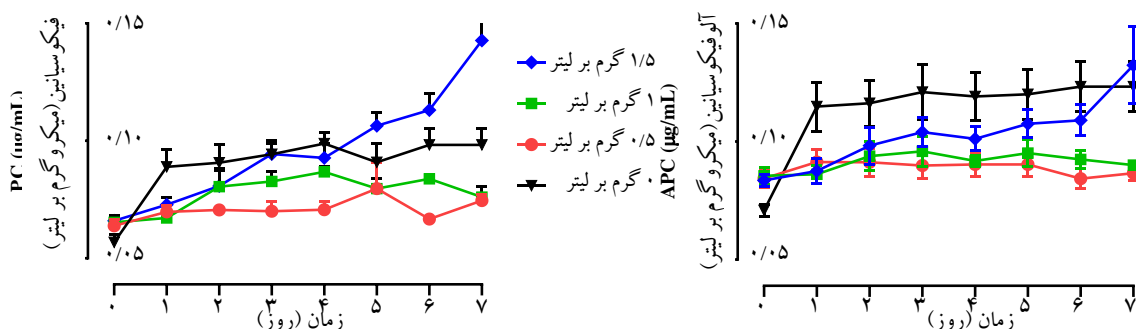
کمترین افت pH در مدت کشت در محیط کشت با منبع کربنی جایگزین در محیط کشت زاروک (غلظت ۰ گرم بر لیتر) مشاهده شد. براساس نتایج این شکل و شکل ۴، حداقل مقدار pH مربوط به تیمارها با بالاترین **تأثیر غلظت‌های مختلف بر تولید رنگدانه-های متابولیتی:** نتایج شکل ۶ نشان داد که محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلفوکوسیانین با گذشت زمان نه تنها در محیط کشت حاوی منبع کربنی مازاد با تغییرات



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

محتوای فیکوسیانین از ۰/۰۶ تا ۰/۱۴ میکروگرم بر میلی-لیتر در طول کشت افزایش یافت. محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین در محیط کشت اتوتروفیک (بدون در نظر گرفتن منبع کربنی) نسبت به محیط کشت میکسوتروفیک در بیشینه غلظت اولیه در طول دوره کشت نسبتاً ثابت ماند.

شکل ۷ تغییرات محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین با تغییرات غلظت در محیط کشت حاوی منبع کربنی جایگزین را نشان می‌دهد. در بالاترین غلظت گلوکز، میزان محتوای آلفوفیکوسیانین از ۰/۱۳ تا ۰/۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر و همچنین مقدار



شکل ۷: تغییر محتوای رنگدانه فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین با غلظت در محیط کشت حاوی منبع کربنی جایگزین

روند صعودی داشته است که این میزان اختلاف بین روزهای ابتدایی و نهایی در بالاترین غلظت بیشترین مقدار بود.

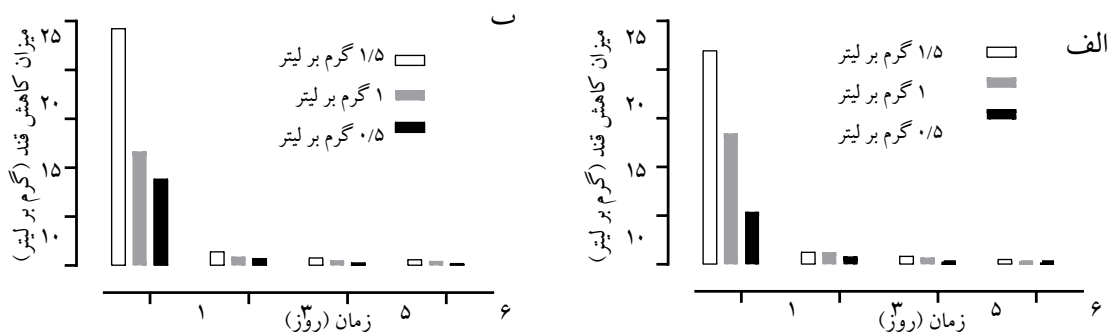
جدول ۳ محتوای کل کارتنوئید و کلروفیل استخراج شده در ابتدا و انتها دوره کشت را نشان می‌دهد. در این تحقیق میزان محتوای کلروفیل با افزایش غلظت گلوکز

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

شماره	کلروفیل a (میکروگرم بر میلی لیتر)		کلروفیل b (میکروگرم بر میلی لیتر)		کارتنوئید (میکروگرم بر میلی لیتر)	
	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

طول دوره کشت با بازه یک روز در میان اندازه گیری 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 تقریباً در روزهای دیگر ثابت باقی ماند.

تأثیر 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



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

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. درحالی که 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 تقریباً 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 قرار دادند 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 تناقض 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). درحالی که در کشت هتروتروفیک جلبک *Dictyosphaerium sp* طی ۴۸ ساعت اول فاز تاخیری گزارش شده است هر چند 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 آنجایی که 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. همان‌طور که 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 تقریباً ثابت بوده است. بنابراین تولید حجم بالای توده زیستی از ریزجلبک *S. maxima* به

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 ریز جلبک *S. platensis* را بررسی کردند. همچنین آنان این واقیعت را تأیید می-کنند که گلوکز می تواند 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 نمی باشد 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 ریز جلبک *S. arthrospira* بررسی کردند 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 غلظت های بالاتر از یک گرم بر لیتر تاثیر چندانی ندارد (Golmakani et al., 2012). آزمون های مطالعه ما نیز در استفاده از منبع کربنی گلوکز 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 می توان با pH محیط کشت تغییر داد. Chen و Zhang (۱۹۹۷) در مطالعات خود pH اولیه رشد ریز جلبک 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 آلفوفیکوسیانین 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 رنگدانه ها نیست حتی سبب کاهش رنگدانه در طول دوره کشت خواهد شد و در غلظت ۱/۵ گرم بر لیتر محتوای منبع کربنی جایگزین میزان رنگدانه فیکوسیانین و آلفوفیکوسیانین 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 سانتی گراد 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 می رسد که با افزایش دوره کشت و یا افزایش نوردهی تولید فیکوسیانین افزایش خواهد یافت. نور نقش مهمی در پرورش جلبک و تولید رنگدانه ایفا می کند میکروارگانیسم های فتوسنتزی وقتی میزان روشنایی خیلی کم یا زیاد است با کاهش رشد و تولید رنگدانه مواجه می شوند 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

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 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. غلظت-های پایین گلوکز (پایین‌تر از ۱/۵ گرم بر لیتر) باعث افزایش توده زیستی ریزجلبک و رنگیزه‌های فتوسنتزی آن نمی‌شود در حالی که غلظت‌های بالاتر گلوکز باعث افزایش توده زیستی و تجمع کلروفیل 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. fusciformis* 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

عامل‌های ضروری رشد نیست (Chojnacka & Noworyta, 2004). در حالی که 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 آلفوفیکوسانین در حداکثر غلظت اولیه گلوکز هنگامی که بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد اتفاق افتاد در حالی که 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. Zhang و Chen 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 فیکوسیانین از

ولی از آنجا که ضریب رشد ویژه و محتوای رنگدانه در چنین کشت هایی پایین است تولید آن با استفاده از چنین روشی مناسب نمی باشد. تولید بیش تر توده زیستی هنگامی که گلوکز بعنوان منبع کربنی جایگزین افزوده شد باعث تولید بیش تر رنگدانه گردید هر چند این اختلاف بسیار ناچیز است. مطالعه حاضر نشان داد که *S. maxima* برای تولید توده زیستی 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 گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد به محیط کشت افزوده گردید میزان تولید توده زیستی بیش تر 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 می شود اما برای تولید رنگدانه فیکوبیلی پروتئین دست یابی به حداکثر توده زیستی به تنهایی کافی نیست بلکه شاید باید مدت زمان کشت و یا میزان نوردی را افزایش داد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه پلی تکنیک مکزیک جهت ساپورت مالی پروژه ها به شماره ۲۰۱۹۵۵۸۴، ۲۰۱۹۵۳۲۰ و ۲۰۱۹۶۳۰۴ تشکر و قدردانی می کنند.

منابع

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

در نظر گرفته می شود می توان اقدام به فراهم سازی شرایط رشد بهینه برای ریزجلبک *S. maxima* نمود. کاهش گلوکز و یا قند در غلظت های 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 شاخص های ضروری رشد ریزجلبک است. از آنجایی که ریزجلبک از منبع کربن آلی همچون گلوکز و بی کربنات سدیم بعنوان منبع کربن استفاده می کنند تا انرژی شیمیایی مورد نیاز فتوسنتز را فراهم کنند ولی همان طور 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 غیر آلی خود مانند دی-اکسید کربن تولید شده در اثر فرآیند فتوسنتز و بعد از انحلال در محیط کشت برای سلول های در حال رشد استفاده می کند. بنابراین ریزجلبک در هنگام رشد طی روزهای اولیه از کربن آلی و هم لزوما کربن غیر آلی استفاده می کند اما بعد از مصرف کربن آلی تنها عامل موثر بر رشد ریزجلبک کربن غیر آلی و نور است. البته قابل ذکر است که برخی از ریزجلبک ها همواره برای مصرف کربن آلی بعنوان منبع کربنی به نور بعنوان منبع انرژی نیازمندند (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

از آنجایی که هدف اولیه این پژوهش بررسی تاثیر افزودن گلوکز بر تولید توده زیستی *S. maxima* است بنابراین رشد و تولید توده زیستی در چهار غلظت مختلف، با افزودن منبع کربنی گلوکز بعنوان منبع کربنی مازاد و جایگزین بررسی شد و در انتها میزان رنگدانه های تولید شده درون سلولی مورد بررسی قرار گرفت. این ریزجلبک قادر به رشد در شرایط هتروتروف می باشند

- 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-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 فدیج منابع دو کربنی جدید (اتانول و اسید استیک) در تولید فایکوسیانین بوسیله ریزجلبک اسپیرولینا. *نشریه نوآوری در علوم و فناوری 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

27. Mohammed, M.K. and Mohd, M.K., 2011. Production of carotenoids (antioxidants/colourant) 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 HgCl₂-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 C₂ 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 fuffiformis* 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. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, 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.