JRIFST
مقالهٔ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1400، جلد 10، شماره 3، صفحات 272-261
DOI:10.22101/JRIFST.2021.288715.1251

اثر هم‌زدن و هوادهی بر خصوصیات سینتیک رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگ‌دانه‌های طبیعی در فتوبیوراکتور همزن‌دار

سجاد ترابی[1]، مهشید جهادی[2و3*]، نفیسه قاسمی‌سپرو[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
2- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
3- دانشیار، مرکز تحقیقات و تولید بذر، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
* نویسندهٔ مسئول (m.jahadi@khuisf.ac.ir)
4- دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 1400/03/30
تاریخ بازنگری: 1400/07/11
تاریخ پذیرش: 1400/07/13
تاریخ انتشار برخط: 1400/08/04

واژه‌های کلیدی
اسپیرولینا پلاتنسیس
فتوبیوراکتور
فیکوسیانین
هم‌زدن
هوادهی

چکیده

اسپیرولینا پلاتنسیس یک سیانوباکتریوم رشته‌ای فتوسنتزکنندهٔ پلانکتونی است که حاوی مولکول‌های فعال‌زیستی و منبع غنی از رنگ‌دانه‌هایی مانند فیکوسیانین است. در این پژوهش تأثیر دو عامل مهم هم‌زدن (20 و 50 دور در دقیقه) و هوادهی (با هوادهی و بدون هوادهی) بر کشت ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگ‌دانه‌های طبیعی (فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید) در شرایط دمای 28 درجهٔ سانتی‌گراد، pH=9، در کشت غوطه‌وری در فرمانتور همزن‌دار موردمطالعه قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد هوادهی در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 20 دور در دقیقه باعث افزایش معنی‌دار غلظت رنگ‌دانه‌ها (فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید) و زیست‌توده شد، درحالی‌که هوادهی در تیمارهای با سرعت 50 دور در دقیقه باعث مهار تولید این ترکیبات گردید. بیشترین غلظت زیست‌توده، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید به‌ترتیب 1/39 گرم در لیتر، 136/5، 38، 8/62 و 3/05 میلی‌گرم در لیتر مربوط به تیمار 20 دور در دقیقه با هوادهی بود. باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده، هوادهی محیط کشت به‌صورت معنی‌داری غلظت آلوفیکوسیانین را افزایش داد ($P\leq0/05$). در شرایط بدون هوادهی، افزایش سرعت هم‌زدن، غلظت زیست‌توده را افزایش داد. در سرعت هم‌زدن 20 دور در دقیقه همراه با هوادهی بیشترین غلظت زیست‌توده، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید به‌دست‌آمد.

مقدمه

اسپیرولینا پلاتنسیس[1] یک سیانوباکتریوم رشته‌ای فتوسنتزکنندهٔ پلانکتونی است و از محبوب‌ترین ریزجلبک‌هاست که از دههٔ 1970 به عنوان یک مادهٔ غذایی سالم، علوفه و مواد افزودنی مورد استفاده قرارگرفته است (Colla, Reinehr, Reichert, & Costa, 2007). نام علمی *اسپیرولینا*، *آرتروسپیرا پلاتنسیس*[2] می‌باشد. ازآنجایی‌که زیست‌تودهٔ *اسپیرولینا* حاوی مقادیر قابل‌توجهی از پروتئین‌های دارای اسیدآمینه‌های ضروری، اسیدهای چرب اشباع‌نشده، ویتامین‌ها (B_{12} و E)، پلی‌ساکاریدها، املاح

[1] *Spirulina platensis*

[2] *Arthrospira platensis*

معدنی (سدیم، کلسیم، پتاسیم، آهن، منیزیم و سلنیوم) و رنگ‌دانه‌ها (فیکوسیانین[1]، کلروفیل‌ها[2]، آلوفیکوسیانین[3]، بتا-کاروتن[4]، لوتئین[5] و گزانتین[6]) است، در چند دهۀ گذشته موردتوجه پژوهشگران و صنعتگران حوزۀ مواد غذایی، داروسازی و آرایشی و بهداشتی قرارگرفته است (Sánchez, Bernal-Castillo, Rozo, & Rodríguez, 2003) به‌طورکلی ریزجلبک‌ها نسبت به گیاهان دارای رشد و بازده تثبیت دی‌اکسیدکربن بیشتر و مقادیر بیشتری از محصولات باارزش، مانند مکمل‌های غذایی برای انسان، حیوانات و آبزیان هستند. عوامل زیادی بر رشد یا میزان پروتئین ریزجلبک‌ها تأثیر می‌گذارند ازجمله می‌توان به نور، دما، غلظت نمک، غلظت دی‌اکسدکربن، ترکیب مواد مغذی، اندازۀ تلقیح، سکون یا به‌هم‌خوردن محیط کشت و pH اشاره کرد (Ravelonandro, Ratianarivo, Joannis-Cassan, Isambert, & Raherimandimby, 2011).

اسپیرولینا منبع غنی و ارزان رنگ‌دانه‌ای مانند فیکوسیانین است. فیکوسیانین یک رنگ‌دانۀ طبیعی به رنگ آبی است و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، حفاظت از کبد و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد است (Doke, 2005) فیکوسیانین مهم‌ترین فیکوبیلی‌پروتئین[7] در *اسپیرولیناست* و ممکن است تا 20 درصد از وزن خشک آن را تشکیل دهد (Chaiklahan, Chirasuwan, Loha, Tia, & Bunnag, 2011).

ازجمله روش‌های کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس*، استفاده از انواع فتوبیوراکتورها شامل ستون حباب، رآکتور هوایی، لوله‌ای، صفحه‌ای[8] و کیسه‌های پلاستیکی است (Zhang *et al*., 2015). کشت *اسپیرولینا* در فتوبیوراکتور انجام می‌شود و مانند سایر سیانوباکتری‌ها نیاز به هم‌زدن دارد تا سلول‌ها به حالت معلق باقی بمانند و از ته‌نشینی آنها جلوگیری شود. این شرایط برای میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده که به جذب نور نیاز دارند، دارای اهمیّت بیشتری است (Pegallapati & Nirmalakhandan, 2011).

[1] Phycocyanin
[2] Chlorophyll
[3] Allophicocyanin
[4] β-Carotene
[5] Lutein
[6] Xanthine
[7] Phycobiliprotein
[8] Panel

اما ازطرفی هم‌زدن با تنش و استرس هیدرودینامیکی بر سلول‌ها همراه است و بر تولید زیست‌توده تأثیر منفی دارد (Mirón *et al*., 2003). یکی از مهم‌ترین روش‌ها در کاهش تنش، به‌کارگیری روش‌های مناسب‌تر در هم‌زدن محیط کشت است (Jain & Singh, 2012; Ronda, Bokka, Ketineni, Rijal, & Allu, 2012).

هوادهی برای رشد رشته‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* ضروری است، زیرا تولید پروتئین توسط ارگانیسم را افزایش می‌دهد. هوادهی محیط، رشد را تحریک می‌کند و برای جلوگیری از غرق‌شدن سلول‌ها و یکنواختی دما، حفظ توزیع مواد مغذی و مخلوط‌کردن مداوم محیط کشت موردنیاز است. عدم هوادهی کافی موجب کاهش کارایی مصرف انرژی و ازاین‌رو تولید زیست‌توده کم می‌شود. اگر محیط رشد هوادهی نشده باشد، سلول روی سطح محیط (سلول‌های *اسپیرولینا* به‌طور معمول به‌دلیل وجود واکوئل‌های[9] پر از اکسیژن روی سطح شناور می‌شوند) از مهار عکس[10] رنج می‌برد، یعنی در معرض روشنایی ثابت (یا زیاد) قرار می‌گیرد که باعث مرگ آنها می‌شود و درنتیجه رشد و تولید زیست‌توده کم می‌شود (Ogbonda, Aminigo, & Abu, 2007).

در بیشتر کشت‌های *آرتروسپیرا*[11] که در راکتورهای بسته[12] انجام می‌شود، دی‌اکسیدکربن فقط به‌عنوان تنظیم‌کنندۀ pH برای جلوگیری از شرایط بیش‌ازحد قلیایی (pH باید کمتر از 11 باشد) اضافه می‌شود؛ بنابراین، افزودن دی‌اکسیدکربن می‌تواند سرعت رشد را بهبود بخشد (Ravelonandro *et al*., 2011).

Ravelonandro و همکاران (2011) دریافتند که افزایش اختلاط باعث بهبود بهره‌وری در مقادیر کم زیست‌توده نمی‌شود. در مقادیر زیست‌تودۀ بیشتر، اختلاط بیش‌ازحد به‌دلیل نیروهای برشی می‌تواند ضدتولید باشد.

رشد *اسپیرولینا* که با اکسیژن خالص هوادهی شده است، به‌طور جزئی کاهش می‌یابد اما هم‌زدن که خود منجربه‌افزایش سطح اکسیژن محلول در محیط کشت می‌شود، تأثیر معنی‌داری بر بهره‌وری نداشت (Zhu *et al*., 2018). هوادهی باعث افزایش محتوای کلروفیل در

[9] Vacuoles
[10] Photo-inhibition
[11] *Arthrospira*
[12] Closed reactors

گونه‌های *اسپیرولینا* می‌شود. هوادهی محیط کشت را تحریک‌کرده و باعث توزیع همگن رشته‌های *اسپیرولینا* در سیستم کشت برای قرارگرفتن در معرض نور کافی می‌شود (Soni, Sudhakar, & Rana, 2019).

اگرچه تولید تجاری *اسپیرولینا پلاتنسیس* به‌عنوان غذایی سالم و یکی از افزودنی‌های باارزش، سودآور است. به‌ویژه درحال‌حاضر به‌منظور استفاده از *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقیاس بزرگ وجود یک فناوری کشت کارآمد برای دستیابی به هزینهٔ کمتر نیز مسئله‌ای مهم است، امروزه تولید تجاری *اسپیرولینا پلاتنسیس* تقریباً در استخرهای روباز انجام می‌شود که ساخت آن آسان است و نیازی به کنترل ویژهٔ برخی شاخص‌ها مانند روشنایی و دما ندارد. بااین‌حال، نقص این سیستم‌ها، کمبود بهره‌وری زیست‌توده است (کمتر از 15 گرم بر مترمربع در روز). علاوه‌بر این، در حوضچه‌های باز نقص‌های دیگری نیز وجود دارد، که ازجمله می‌توان به غلظت بسیار زیاد زیست‌توده به‌دلیل مشکل‌بودن حفظ شاخص‌های کشت مناسب، سهولت در آلودگی و تبخیر جدی آب بین استخر و محیط اطراف اشاره نمود (Zhang *et al.*, 2015).

پژوهش حاضر با هدف بررسی دو عامل مهم و تأثیرگذار (هم‌زدن و هوادهی) بر سینتیک رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگ‌دانه‌های طبیعی موجود در آن (فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید) با استفاده از یک فتوبیوراکتور خودکار که هوادهی، هم‌زدن، تنظیم حرارت و تنظیم pH را به‌صورت خودکار انجام می‌دهد تا بهره‌وری تولید افزایش و هزینه‌ها کاهش یابد، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویهٔ ریزجلبک و محیط کشت

سویهٔ *اسپیرولینا پلاتنسیس* مورد استفاده در این مطالعه در محیط کشت زاروک[1] استریل فعال شد. ابتدا محیط کشت (3 لیتر) موجود در فتوبیوراکتور (شرکت رایمند زیست فناور البرز، ساخت ایران) در اتوکلاو (121 درجهٔ سانتی‌گراد، 15 دقیقه) استریل شد. سپس سویهٔ فعال‌شده (0/7 گرم بیومس خشک در لیتر) به محیط کشت استریل تلقیح شد (Zeng *et al.*, 2012). فرایند رشد در 16 ساعت روشنایی، 8 ساعت تاریکی و دمای کشت 28±0/5 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 14 روز انجام شد (بنایان، جهادی و فاضل، 1399).

کشت در فتوبیوراکتور

در این پژوهش از یک فتوبیوراکتور استفاده شد (شکل 1). روش کشت در این سیستم به‌صورت بچ بود. مخزن بیوراکتور، با قطر داخلی 30 سانتی‌متر و ارتفاع 50 سانتی‌متر، از شیشه‌ای با ضخامت 0/12 سانتی‌متر ساخته‌شده است. یک درپوش فلزی در بالای مخزن شیشه‌ای برای آب‌بندی ثابت‌شده بود. نمونه‌برداری، تلقیح محیط کشت و پاشش اکسیژن ازطریق منافذ موجود در درپوش صورت می‌گرفت. فتوبیوراکتور در معرض 2 لامپ LED سفید 9 وات و 1 لامپ LED قرمز 9 وات قرار گرفت. لامپ‌ها در اطراف مخزن فتوبیوراکتور در فاصلهٔ 20 سانتی‌متر از مخزن فتوبیوراکتور و زاویهٔ 60 درجه نسبت به یکدیگر نصب‌شده بودند. هوادهی ازطریق یک پمپ متصل به فتوبیوراکتور تغذیه شد. هم‌زدن در فتوبیوراکتور توسط یک همزن پره‌دار انجام گرفت. 4 تیمار مختلف از کشت در فتوبیوراکتور موردبررسی قرار گرفت. *اسپیرولینا پلاتنسیس* در 4 نوع وضعیت هوادهی و هم‌زدن کشت شد: (1) هم‌زدن با سرعت 20 دور در دقیقه+بدون هوادهی، (2) هم‌زدن با سرعت 20 دور در دقیقه+هوادهی، (3) هم‌زدن با سرعت 50 دور در دقیقه+بدون هوادهی و (4) هم‌زدن با سرعت 50 دور در دقیقه+با هوادهی. سایر شرایط کشت، به‌جز 4 نوع وضعیت هوادهی و هم‌زدن، برای هر دور آزمایش ثابت بود.

شکل 1- فتوبیوراکتور همزن‌دار

[1] Zarrouk

روش‌های تحلیلی

غلظت زیست‌توده

50 میلی‌لیتر از نمونه جمع‌آوری شد. غلظت زیست‌توده به کمک روش خشک‌کردن توسط کاغذ صافی (اندازهٔ حفره‌ها 0/45 میکرومتر) و در آون با دمای 60 درجهٔ سانتی‌گراد (شرکت Memmert، مدل 100-800، ساخت آلمان) به مدت 24 ساعت اندازه‌گیری شد (Zhang *et al.*, 2015).

تعیین غلظت فیکوبیلی‌پروتئین‌ها

5 میلی‌لیتر از زیست‌توده در شرایط 10000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد (شرکت پل ایده‌آل تجهیز، مدل Universal 320R، ساخت ایران) و با 5 میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات 0/05 مولار، pH=6/8 همگن‌سازی شد. قرائت میزان جذب محلول استخراجی توسط اسپکتروفتومتر (شرکت Unico، مدل 2100، ساخت ایران) در 615 و 652 نانومتر به‌دست‌آمد و محتوای فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین به‌ترتیب توسط رابطه‌های (1) و (2) مورد محاسبه قرار گرفت (Chen *et al.*, 2010).

رابطهٔ (1)

$$\text{فیکوسیانین (گرم بر لیتر)} = (OD_{615} - 0.474 \times OD_{652})/5.34$$

رابطهٔ (2)

$$\text{آلوفیکوسیانین (گرم بر لیتر)} = (OD_{652} - 0.208 \times OD_{615})/5.09$$

در رابطه‌های (1) و (2)، OD_{615} جذب نوری در 615 نانومتر و OD_{652} جذب نوری در 652 نانومتر می‌باشد.

تعیین غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها

5 میلی‌لیتر از نمونهٔ درحال‌کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* سانتریفیوژ و جمع‌آوری شد و با 5 میلی‌لیتر متانول 90 درصد همگن شد. محلول استخراج‌شده در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های 665، 650 و 470 نانومتر اندازه‌گیری و میزان کلروفیل و کاروتنوئید باتوجه‌به رابطه‌های (3) و (4) برآورد شد (Lima, Teixeira, Teixeira, Filócomo, & Lage, 2018).

رابطهٔ (3)

$$\text{محتوای کلروفیل (گرم بر لیتر)} = 16.5 \times OD_{665} - 8.3 \times OD_{650}$$

در رابطه‌های (3)، OD_{665} جذب نوری در 665 نانومتر و OD_{650} جذب نوری در 650 نانومتر می‌باشد.

رابطهٔ (4)

$$\text{کاروتنوئید (گرم بر لیتر)} = (1000 \times OD_{470} - 1.63 \times Chla)/221$$

در رابطهٔ (4)، OD_{470} جذب نوری در 470 نانومتر و Chla محتوای کلروفیل می‌باشد.

نرخ رشد خاص و زمان دوبرابرشدن

نرخ رشد ویژهٔ (μ) *اسپیرولینا* در شرایط رشد طبیعی با استفاده از رابطهٔ (5) به‌دست‌آمد (Soni *et al.*, 2019):

رابطهٔ (5)

$$\mu = \frac{lnx2 - lnx1}{t2 - t1}$$

در رابطهٔ (5)، x_1 و x_2 غلظت‌های زیست‌توده و یا رنگ‌دانه در فاصلهٔ زمانی t_1 و t_2 هستند.

به کمک رابطهٔ (6) می‌توان زمان دوبرابرشدن زیست‌توده (t(h)) را به شرح زیر محاسبه کرد:

رابطهٔ (6)

$$t(h) = \frac{ln2}{\mu} == \frac{0.693}{\mu}$$

بهره‌وری[1] تولید زیست‌توده، رنگ‌دانه‌های کلروفیل، فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و کاروتنوئیدها توسط رابطهٔ (7) محاسبه شد (Soni *et al.*, 2019).

رابطهٔ (7)

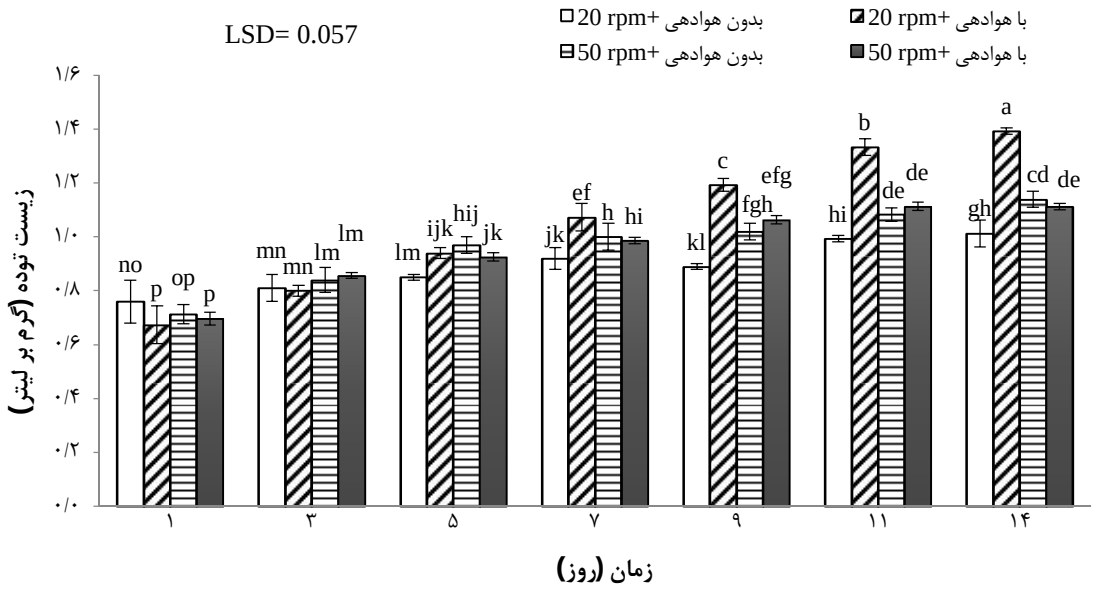
$$\text{بهره‌وری (میلی‌گرم بر لیتر در روز)} = \frac{X_{Max_t} - X_{t_0}}{(t - t_0)}$$

در رابطهٔ (7)، x_{max} و x_{t0} غلظت‌های زیست‌توده و یا رنگ‌دانه در فاصلهٔ زمانی t و t_0 هستند.

تحلیل آماری

جهت بررسی تأثیر هوادهی و هم‌زدن بر میزان رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگ‌دانه‌های فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسهٔ میانگین حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD[2]) در سطح اطمینان 95 درصد توسط نرم‌افزار SAS نسخهٔ 9.1 استفاده شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ 2016 رسم گردیدند. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

[1] Productivity
[2] Least Significant Differences



شکل 2- مقایسهٔ میانگین اثر متقابل زمان، سرعت هم‌زدن و هوادهی بر مقدار زیست‌توده

میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح 5 درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند.

نتایج و بحث

تأثیر هوادهی و هم‌زدن بر رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس*

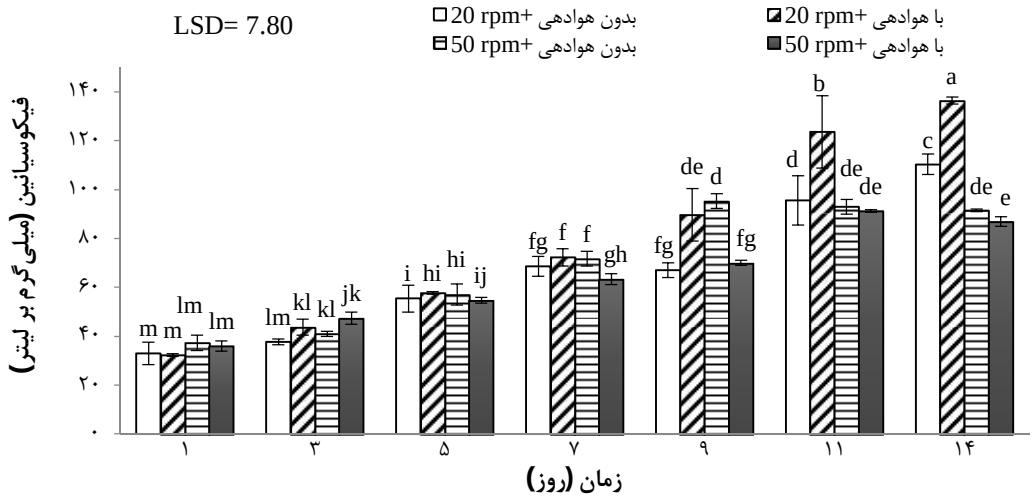
شکل (2) تأثیر هوادهی و هم‌زدن بر رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* را نشان می‌دهد. همان‌طورکه در شکل (2) مشاهده می‌شود با افزایش زمان، میزان زیست‌توده در تمام تیمارها افزایش یافت. مقدار زیست‌توده از روز 7 به بعد در تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی به‌طور معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود و در روز 14 مقدار زیست‌توده به 1/39 گرم بر لیتر رسید ($P\leq0/05$). هوادهی و هم‌زدن، یک محیط همگن و یکنواخت را ایجاد می‌کند که باعث می‌شود نفوذ نور و اکسیژن به‌صورت یکنواخت به سلول‌ها انجام شود و با مخلوط‌شدن محیط و تغییر غلظت مواد مغذی، رشد افزایش یابد (Soni *et al.*, 2019). ورود هم‌زمان دی‌اکسیدکربن و اکسیژن رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* را افزایش می‌دهد. با ورود حباب‌های گازی منبع کربن نیز به‌صورت دی‌اکسیدکربن وارد محیط کشت می‌شود درنتیجه تولید زیست‌توده افزایش می‌یابد (Zeng *et al.*, 2012).

مشاهده‌ها نشان داد که در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 20 دور در دقیقه، از روز 7 به بعد هوادهی باعث افزایش تولید زیست‌توده شد، این در حالی بود که هوادهی در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 50 دور در دقیقه تأثیری بر زیست‌توده نداشت. ازآنجایی‌که هوادهی باعث اختلاط در محیط کشت می‌شود هنگامی که با هم‌زدن 50 دور در دقیقه همراه می‌شود، باعث افزایش تنش برشی شده و می‌تواند تولید زیست‌توده را به‌دلیل آسیب سلول کاهش دهد و تأثیر معکوس داشته باشد (Khazi, Demirel, & Conk, 2018). البته تأثیر هوادهی و هم‌زدن از اواسط دورهٔ کشت، زمانی که مقدار زیست‌توده افزایش می‌یابد قابل‌مقایسه است. اگر هوادهی کافی نباشد، تولید زیست‌توده و کارایی مصرف انرژی کم می‌شود (Soni *et al.*, 2019).

تأثیر هوادهی و هم‌زدن بر تولید رنگ‌دانهٔ فیکوسیانین

مطابق شکل (3)، غلظت فیکوسیانین با افزایش زمان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P\leq0/05$). مشاهده‌ها نشان داد که غلظت فیکوسیانین در روز 14 در تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی با غلظت 136/5 میلی‌گرم بر لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. از روز 9 به بعد در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 20 دور در دقیقه با افزودن هوادهی اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار وجود داشت ($P\leq0/05$).

مطابق با گزارش Ogbonda و همکاران (2007)، هنگامی که محیط رشد هوادهی نشود، مقدار پروتئین و اسیدهای آمینهٔ سنتزشده کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که *اسپیرولینا پلاتنسیس* در محیط قلیایی با گاز متناوب و اکسیژن فشرده مداوم با دبی خاص دارای تولید فیکوسیانین بالاتر می‌باشد (Zhang *et al.*, 2015).



شکل 3- مقایسهٔ میانگین اثر متقابل زمان، سرعت هم‌زدن و هوادهی بر تغییرات فیکوسیانین

میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح 5 درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند.

نتایج Zeng و همکاران (2012) نشان داد هنگامی که 20 میلی‌مولار بر لیتر در روز دی‌اکسیدکربن متناوب با 0/1 لیتر در دقیقه اکسیژن مداوم ترکیب شد، بالاترین غلظت زیست‌توده و غلظت فیکوسیانین به‌دست‌آمد.

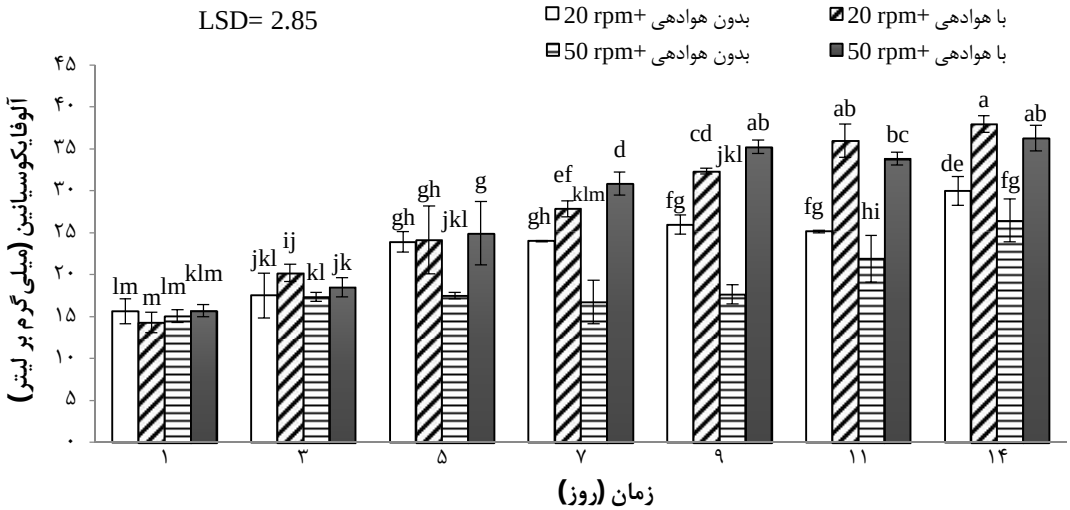
درصورتی‌که در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 50 دور در دقیقه با افزودن هوادهی از روز 11 به بعد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ممکن است، هوادهی باعث ایجاد اختلاط بیشتر شود و اختلاط زیاد نیز باعث ایجاد تنش برشی می‌شود. نتایج Khazi و همکاران (2018) نشان داد که حداکثر محتوای زیست‌توده و فیکوسیانین در سرعت‌های هم‌زدن 20 دور در دقیقه به‌دست‌می‌آید.

نتیجه این پژوهش نشان می‌دهد که که هوادهی و هم‌زدن باید به‌صورت بهینه دربارهٔ یکدیگر تنظیم شود تا بهره‌وری تولید افزایش یابد. هوادهی محیط کشت را تحریک می‌کند و به رشته‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* برای قرارگرفتن در معرض نور کافی سیستم کشت، توزیع همگنی می‌دهد (Soni *et al.*, 2019).

تأثیر هوادهی و هم‌زدن بر تولید رنگ‌دانهٔ آلوفیکوسیانین

شکل (4) تأثیر هوادهی و هم‌زدن بر تولید آلوفیکوسیانین را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود غلظت آلوفیکوسیانین با افزایش زمان افزایش یافت ($P\leq0/05$). علاوه‌بر این، غلظت آلوفیکوسیانین در روز 14 در تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی با غلظت 38 میلی‌گرم بر لیتر بیشترین مقدار مشاهده‌شده بود و با تیمارهای 20 دور در دقیقه+بدون هوادهی و 50 دور در دقیقه+بدون هوادهی اختلاف معنی‌داری داشت ($P\leq0/05$). در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 20 و 50 دور در دقیقه، هوادهی باعث افزایش تولید آلوفیکوسیانین شد و علاوه‌برآن در تیمارهای با سرعت هم‌زدن 50 دور در دقیقه با افزودن هوادهی اختلاف بیشتری در غلظت آلوفیکوسیانین نسبت به تیمارهای با سرعت هم‌زدن 20 دور در دقیقه مشاهده شد ($P\leq0/05$).

Ogbonda و همکاران (2007) نشان دادند که ممکن است وقتی هوادهی کافی نباشد، کارایی استفاده از انرژی و درنتیجه تولید زیست‌توده، مقدار پروتئین و اسیدهای آمینهٔ سنتزشده کاهش یابد. در روز 5 و بعد از آن، در تیمار 50 دور در دقیقه با هوادهی تولید آلوفیکوسیانین افزایش بیشتری نسبت به دیگر تیمارها داشت، اما در انتهای کشت بیشترین مقدار آلوفیکوسیانین مربوط به تیمار 20 دور در دقیقه با هوادهی بود. ازآنجایی‌که هوادهی باعث اختلاط در محیط کشت می‌شود هنگامی که با هم‌زدن با دور 50 همراه می‌شود باعث افزایش تنش برشی‌شده و همچنین آسیب سلول می‌شود (Khazi *et al.*, 2018).



شکل 4- مقایسهٔ میانگین اثر متقابل زمان، سرعت همزدن و هوادهی بر تغییرات آلوفیکوسیانین

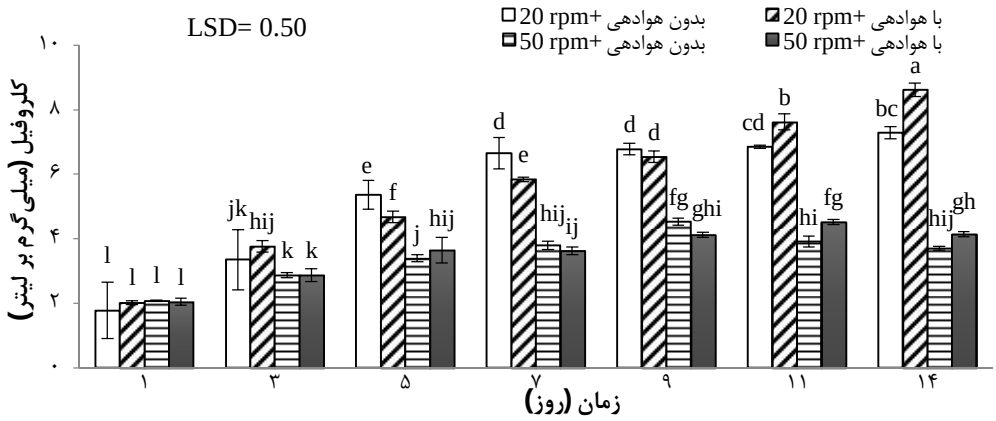
میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح 5 درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند.

تأثیر هوادهی و همزدن بر تولید رنگدانهٔ کلروفیل

باتوجه‌به شکل (5) که تأثیر هوادهی و همزدن بر تولید رنگدانهٔ کلروفیل را نشان می‌دهد، با گذر زمان، غلظت کلروفیل افزایش یافت ($P\leq0/05$). غلظت کلروفیل در دو تیمار با سرعت همزدن 20 دور در دقیقه به‌طور معنی‌داری نسبت به دو تیمار با سرعت همزدن 50 دور در دقیقه بیشتر بود ($P\leq0/05$). محتوای کلروفیل در پاسخ به عوامل فیزیکی مانند شدت نور، تحرک، درجه‌حرارت و عوامل شیمیایی مانند دردسترس‌بودن مواد مغذی متفاوت است (Deamici, Santos, & Costa, 2018). علاوه‌برآن غلظت کلروفیل در روز 14 در تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی با غلظت 8/62 میلی‌گرم بر لیتر در بیشترین میزان خود بود و با تیمارهای 20 دور در دقیقه+بدون هوادهی با غلظت 7/29 میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری داشت ($P\leq0/05$).

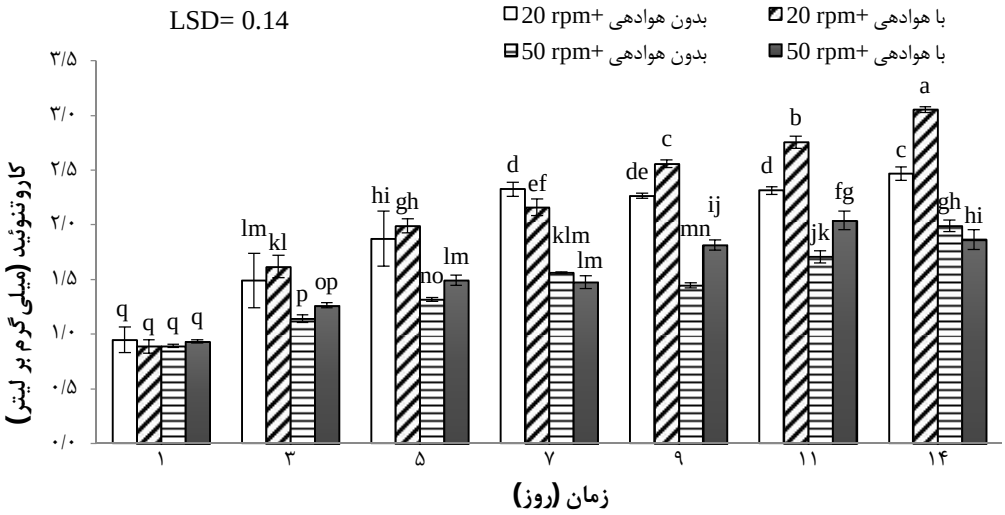
بررسی وضعیت تیمارهای با سرعت همزدن 20 دور در دقیقه نشان داد که هوادهی در روزهای پایانی کشت باعث افزایش تولید کلروفیل می‌شود. بنابراین، هوادهی یک ضرورت اساسی برای کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* است و باعث افزایش محتوای کلروفیل می‌شود (Soni *et al.*, 2019).

در تیمارهای 50 دور در دقیقه اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار با وجود و عدم وجود هوادهی ملاحظه نشد. زمانی که هوادهی با همزدن با دور 50 دور در دقیقه همراه می‌شود، ممکن است باعث آسیب سلول شود (Khazi *et al.*, 2018). نتایج مطالعه‌های Deamici و همکاران (2018) نشان داد می‌توان از غلظت کلروفیل به‌عنوان اندازه‌گیری غیرمستقیم غلظت زیست‌توده استفاده کرد، ممکن است هرگونه آسیب سلولی منجربه‌کاهش غلظت کلروفیل گردد.



شکل 5- مقایسهٔ میانگین اثر متقابل زمان، سرعت همزدن و هوادهی بر تغییرات کلروفیل

میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح 5 درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند.



شکل 6- مقایسهٔ میانگین اثر متقابل زمان، سرعت همزدن و هوادهی بر تغییرات کاروتنوئید

میانگین‌ها با حروف متفاوت در سطح 5 درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌دار دارند.

تأثیر هوادهی و همزدن بر تولید رنگ‌دانهٔ کاروتنوئید

همان‌طورکه در شکل (6) مشخص است، که با افزایش زمان، غلظت کاروتنوئید به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P\leq0/05$). گزارش‌های بسیاری وجود دارد که همانند نتایج حاضر نشان دادند تولید رنگ‌دانه‌ها به‌عنوان متابولیت‌های میکروبی، با افزایش رشد و تولید زیست‌توده افزایش می‌یابند (Sánchez *et al.*, 2003). علاوه‌بر این، نتایج نشان داد که هوادهی در تیمارهای با سرعت همزدن 20 دور در دقیقه باعث افزایش تولید کاروتنوئید می‌شود و از روز 3 به بعد غلظت کاروتنوئید در تیمارهای با سرعت همزدن 20 دور در دقیقه به‌طور معنی‌داری از تیمارهای با سرعت همزدن 50 دور در دقیقه بیشتر بود ($P\leq0/05$). بیشترین مقدار کاروتنوئید در تیمار 20 دور در دقیقه هنگامی بود که هوادهی صورت گرفت. نتایج قبادیان، گنجی‌دوست، آیتی و سلطانی (1397) با نتایج پوهش حاضر مطابقت داشت که نشان دادند چرخهٔ هوادهی روی کلروفیل و کاروتنوئید اثر مثبت داشت و چرخهٔ هوادهی موجب افزایش قابل‌توجه و همزمان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید شد. کاروتنوئید بیشترین غلظت را در روز 14 در تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی با غلظت 3/05 میلی‌گرم بر لیتر نشان داد که به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها اختلاف داشت ($P\leq0/05$).

تأثیر هوادهی و همزدن بر پارامترهای سینتیکی رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید متابولیت‌ها

باتوجه‌به جدول (1)، تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی بیشترین میزان رشد ویژه و بهره‌وری تولید، بهره‌وری رنگ‌دانه‌ها و کمترین زمان دوبرابرشدن را نشان داد که نشان‌دهندهٔ این است، هنگامی که محیط کشت هوادهی می‌شود نسبت به زمانی که محیط هوادهی نمی‌شود بهره‌وری تولید و رنگ‌دانه‌ها افزایش می‌یابند (Ogbonda *et al.*, 2007).

بعد از تیمار 20 دور در دقیقه+هوادهی به‌ترتیب تیمار 50 دور در دقیقه+بدون هوادهی بیشترین تولید، تیمار 20 دور در دقیقه+ بدون هوادهی بیشترین بهره‌وری فیکوسیانین، کاروتنوئید، کلروفیل و تیمار 50 دور در دقیقه+هوادهی بیشترین بهره‌وری آلوفیکوسیانین را داشت.

در تیمارهای با سرعت همزدن 50 دور در دقیقه با افزودن هوادهی بهره‌وری کاهش یافت، زیرا هوادهی و همزدن با سرعت بالاتر باعث ایجاد تنش برشی بر سلول شده و بهره‌وری را کاهش می‌دهد (Khazi *et al.*, 2018). در تیمارهای بدون هوادهی با افزایش سرعت همزدن، بهره‌وری تولید و نرخ رشد ویژه افزایش یافت.

جدول 1- نتایج تأثیر هوادهی و همزدن بر پارامترهای سینتیکی رشد

پارامتر	واحد	50 دور در دقیقه		20 دور در دقیقه	
		با هوادهی	بدون هوادهی	با هوادهی	بدون هوادهی
نرخ رشد ویژه	بر روز	0/00125	0/00083	0/00226	0/0008
زمان دوبرابرشدن	ساعت	554/4	834/939	306/637	866/25
بهره‌وری تولید زیست‌توده	بر گرم در لیتر×بر روز	0/0292	0/0307	0/051	0/017
بهره‌وری فیکوسیانین	بر میلی‌گرم در لیتر×بر روز	3/642	3/869	7/44	5/521
بهره‌وری کاروتنوئید	بر میلی‌گرم در لیتر×بر روز	0/067	0/078	0/154	0/108
بهره‌وری کلروفیل	بر میلی‌گرم در لیتر×بر روز	0/149	0/115	0/471	0/394
بهره‌وری آلوفیکوسیانین	بر میلی‌گرم در لیتر×بر روز	1/471	0/817	1/692	1/026

نتیجه‌گیری

باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر هوادهی و همزدن بر رشد *اسپیرولینا پلاتنسیس* و تولید رنگدانه‌های فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید می‌توان نتیجه گرفت که هوادهی محیط کشت در فتوبیوراکتور همزن‌دار با سرعت همزدن 20 دور در دقیقه بیشترین غلظت زیست‌توده، فیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید را ایجاد می‌کند. هوادهی محیط کشت به‌صورت معنی‌داری غلظت آلوفیکوسیانین و افزایش سرعت همزدن غلظت زیست‌توده را افزایش می‌دهد. علاوه‌برآن نتایج نشان داد که غلظت رنگدانه‌های فیکوسیانین، کلروفیل و کاروتنوئید در سرعت همزدن 20 دور در دقیقه با هوادهی و بدون هوادهی نسبت به تیمارهای با سرعت همزدن 50 دور در دقیقه بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

بنایان، س.، جهادی، م.، و فاضل، م. (1399). بررسی عوامل تاثیرگذار بر تولید رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید از اسپیرولینا پلاتنسیس با استفاده از طرح پلاکت برمن. *میکروب شناسی مواد غذائی*، 7(2)، 70-81.

قبادیان، س.، گنجی‌دوست، ح.، آیتی، ب.، و سلطانی، ن. (1397). بهینه‌سازی رشد و کیفیت بیومس ریزجلبک اسپیرولینا با تغییر رقت محیط کشت و استفاده از سیکل هوادهی. *زیست‌فناوری*، 9(3)، 385-393.

Banayan, S., Jahadi, M., & Fazel, M. (2020). Investigation of Influencing Factors on Production of Chlorophyll and Carotenoid Pigments from Spirulina Platensis Using Platelet-Burman Design. *Journal of Food Microbiology*, *7*(2), 70-81 . (in Persian)

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from Spirulina sp. using a membrane process. *Bioresource technology*, *102*(14), 7159-7164. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.067

Chen, H.-B., Wu, J.-Y ,.Wang, C.-F., Fu, C.-C., Shieh, C.-J., Chen, C.-I., . . . Liu, Y.-C. (2010). Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by Spirulina platensis under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, *53*(1), 52-56. doi:https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.004

Colla, L. M., Reinehr, C. O., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource technology*, *98*(7), 1489-1493. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.030

Deamici, K. M., Santos, L. O., & Costa, J. A. V. (2018). Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of Spirulina: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. *Bioresource technology*, *249*, 168-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.185

Doke, J. M. (2005). An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from Spirulina sp. *International Journal of Food Engineering*, *1*(5). doi:https://doi.org/10.2202/1556-3758.1037

Ghobadian, S., Ganjidoust, H., Ayati, B., & Soltani, N. (2018). The Growth and Quality Optimization of Spirulina Biomass by Changing the Dilution of Medium and Using the Aeration Cycle. *Modares Journal of Biotechnology*, *9*(3), 385-393. (in Persian)

Jain, S., & Singh, S. G. (2012). Optimization of biomass yield of Spirulina platensis grown in petha (Benincasa hispida Thunb.) waste in different culture conditions. *Indian Journal of Biotechnology*, *11*, 498-501 .

Khazi, M., Demirel, Z., & Conk, D. M. (2018). Enhancement of biomass and phycocyanin content of Spirulina platensis. *Frontiers In Bioscience*, *10*, 276-286 .

Lima, G. M., Teixeira, P. C., Teixeira, C. M., Filócomo, D., & Lage, C. L. (2018). Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of Arthrospira platensis. *Algal Research*, *31*, 157-166. doi:https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.012

Mirón, A. S., Garcıa, M. C. C., Gómez, A. C., Camacho, F. G., Grima, E. M., & Chisti, Y. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterization of Phaeodactylum tricornutum in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, *16*(3), 287-297. doi:https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00072-X

Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E., & Abu, G. O. (2007). Influence of aeration and lighting on biomass production and protein biosynthesis in a Spirulina sp. isolated from an oil-polluted brackish water marsh in the Niger Delta, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, *6*(22), 2596-2600. doi:https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2414

Pegallapati, A. K., & Nirmalakhandan, N. (2011). Energetic evaluation of an internally illuminated photobioreactor for algal cultivation. *Biotechnology letters*, *33*(11), 2161-2167. doi:https://doi.org/10.1007/s10529-011-0691-8

Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of Arthrospira (Spirulina) platensis from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO2 addition. *Food and bioproducts Processing*, *89*(3), 209-216. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.009

Ronda, S. R., Bokka, C. S., Ketineni, C., Rijal, B., & Allu, P. R. (2012). Aeration effect on Spirulina platensis growth and γ-linolenic acid production. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(1), 12-20. doi:https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100002

Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, *8*(1), 7-24 .

Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. (2019). Comparative study on the growth performance of Spirulina platensis on modifying culture media. *Energy Reports*, *5*, 327-336. doi:https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.02.009

Zeng, X., Danquah, M. K., Zhang, S., Zhang, X., Wu, M., Chen, X. D., . . . Lu, Y. (2012). Autotrophic cultivation of Spirulina platensis for CO2 fixation and phycocyanin production. *Chemical Engineering Journal*, *183*, 192-197. doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.062

Zhang, L., Chen, L., Wang, J., Chen, Y., Gao, X., Zhang, Z., & Liu, T. (2015). Attached cultivation for improving the biomass productivity of Spirulina platensis. *Bioresource technology*, *181*, 136-142. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.025

Zhu, C., Zhai, X., Wang, J., Han, D., Li, Y., Xi, Y., . . . Chi, Z. (2018). Large-scale cultivation of Spirulina in a floating horizontal photobioreactor without aeration or an agitation device. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*, 8979-8987. doi:https://doi.org/10.1007/s00253-018-9258-0

Effects of Agitation and Aeration on Growth Kinetics of *Spirulina platensis* and Production of Natural Pigments in Stirred Photobioreactor

Sajjad Torabi[1], Mahshid Jahadi[2,3*], Nafiseh Ghasemisepro[4]

1- MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Associate professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3- Associate professor, Seed Research and Production Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
* Corresponding author (m.jahadi@khuisf.ac.ir)
4- MSc. Graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

Spirulina platensis is a planktonic, photosynthetic filamentous cyanobacterium with bioactive molecules, which is a rich source of pigments such as phycocyanin.In this study, effects of two important factors of agitation and aeration on biomass production of *S. platensis* and its production of chlorophyll, phycocyanin, allofycocyanin and carotenoids at 28 °C, pH 9 and with agitation rates of 20 and 50 rpm with and without aeration were studied in immersion culture using stirring reactor. Results showed that aeration in treatments with agitation rates of 20 rpm significantly increased concentrations of the pigments (phycocyanin, allofycocyanin, chlorophyll and carotenoids) and biomass. In contrast, aeration in treatments with agitation rates of 50 rpm inhibited pigment production ($P<0.05$). The highest quantity of biomass and concentrations of phycocyanin, allofycocyanin, chlorophyll and carotenoids respectively were 1.39 $g.l^{-1}$ and 136.5, 38, 8.62 and 3.05 $mg.l^{-1}$, which were linked to treatment with aerationat 20 rpm. Based on the current results, aeration of the culture media significantly increased concentrations of allofycocyanin. Under conditions without aeration, increases in agitation rates increased biomass quantities. The highest quantity of biomass and concentrations of phycocyanin, allofycocyanin, chlorophyll and carotenoids were achieved using aeration at an agitation speed of 20 rpm.

Keywords: Aeration, Agitation, Photobioreactor, Phycocyanin, *Spirulina platensis*