فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۱، شماره ۴۸، خرداد و تیرماه ۱۴۰۱ صفحه : ۷۹-۹۵

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط نوری با تأثیر بر رشد و تولید فایکوسیانین در ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*

فرزانه فکرت[۱]، مریم شهبازی*[۲،۱]، محمدامین حجازی[۳]، بهنام نامی[۱]

[۱] بخش فیزیولوژی مولکولی گیاهی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

[۲] گروه محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

[۳] پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۹/۰۴)

چکیده

ریزجلبک *اسپیرولینا* منبعی غنی از پروتئین و ترکیبات زیستی با ارزش است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها رنگدانه فایکوسیانین است. فایکوسیانین به عنوان رنگ آبی طبیعی و یک آنتی‌اکسیدان قوی در صنایع مختلف کاربردهای گسترده‌ای دارد. افزایش همزمان تولید رنگدانه فایکوسیانین و زیست‌توده *اسپیرولینا* در شرایط کشت اتوتروفی بطور مشخص به نوع منبع نور با طول‌موج‌ها و شدت‌های مختلف و همچنین میزان دسترسی به منابع غذایی محیط کشت بستگی دارد. با توجه به آنکه فایکوسیانین یک رنگدانه فتوسنتزی و از اجزای آنتن‌های جمع‌آوری‌کننده نور است، بنابراین میزان و کارایی فعالیت‌های فتوسنتزی نیز در تولید فایکوسیانین تأثیرگذار است. در این تحقیق آنالیز مولکولی ***16srRNA*** برای شناسایی سویه‌های *اسپیرولینا* انجام شد. بهترین سویه (*اسپیرولینا پلاتنسیس* **NIES-39**) از نظر تولید زیست‌توده و فایکوسیانین از بین پنج سویه *اسپیرولینا* انتخاب شد و تأثیر طول‌موج‌های مختلف نور سوپر الای‌دی سفید، قرمز و آبی از نظر تولید زیست-توده و فایکوسیانین در ریزجلبک *اسپیرولینا* مقایسه شد. نتایج نشان داد نور سوپر الای‌دی سفید در مقایسه با سایر نورها به‌صورت معنی‌داری موجب بیشترین تولید زیست‌توده (۴/۷۱ گرم بر لیتر) و بالاترین غلظت فایکوسیانین (۰/۳۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شد. خلوص فایکوسیانین تولیدشده توسط نور سوپر الای‌دی آبی (۱/۰۴) بیشتر از از نور سفید (۰/۷۷) و سایر نورها بود. همچنین استفاده از طول‌موج‌های ترکیبی نور سوپر الای‌دی سفید و قرمز در مقایسه با استفاده تنها از هر نور موجب افزایش سرعت رشد *اسپیرولینا* و کوتاه‌شدن زمان سه روزه دوره رشد برای رسیدن به بیشینه زیست‌توده (۴/۶۷ گرم بر لیتر) شد. درنتیجه کلی می‌توان بیان کرد استفاده از نورهای سوپر الای‌دی می‌تواند در تولید اقتصادی این ریزجلبک موجب افزایش زیست‌توده، خلوص و میزان فایکوسیانین تولیدی شود.

واژه‌های کلیدی: *اسپیرولینا*، ریزجلبک، زیست‌توده، فایکوسیانین، نورهای سوپر الای‌دی

مقدمه

طراحی سیستم‌های کشت میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده در جهان از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و در سی سال اخیر کشت تجاری ریزجلبک‌ها به‌عنوان تکنولوژی سبز (Green technology) بویژه اسپیرولینا برای غذای سالم، در کشورهای مختلف جهان انجام می‌شود و تولید محصولات با ارزش فراوان و متنوع از ریزجلبک‌ها به‌سرعت در حال افزایش است (Manirafasha *et al*., 2018). از جمله مزایای استفاده از

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: maryam.shahbazi@gau.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

جلبک‌ها در تولید محصول می‌توان به مواردی چون قدرت تکثیر زیاد، بازده تولید محصول بالا در فضای کوچک دستگاه رشد، کشت آسان و عدم وابستگی به فصل و شرایط آب و هوایی و همچنین توانایی آنها در استفاده از منابع آلی یا منابع کربنی مختلف حتی ضایعات کشاورزی و صنعتی اشاره کرد که دامنه استفاده و کاربرد آنها را افزایش می‌دهد. این خصوصیات بهره‌وری و بازدهی سیستم‌های کشت و تولید ریزجلبک‌ها را در مقایسه با سایر فرآیندهای تولید در بخش کشاورزی را، به مراتب بالاتر می‌برد. امروزه ریزجلبک‌ها در بخش بزرگی از صنایع غذایی و در بسیاری از فرمول‌های غذایی به‌عنوان مکمل‌های افزودنی رنگی استفاده می‌شوند (Lafarga *et al*., 2020). در این میان ریزجلبک *اسپیرولینا* با برخورداری از پتانسیل‌های بسیار بالقوه‌ای که دارد یکی از سویه‌های ریزجلبکی بسیار مورد توجه است. *اسپیرولینا* یک جلبک سبز آبی از شاخه سیانوباکترها است که در آب‌شور رشد می‌کند. این گروه از جلبک‌های سبزآبی از حدود ۳۰۰ میلیون سال قبل برروی زمین می‌زیسته‌اند و از ده‌ها هزار سال قبل توسط مردم بومی اطراف دریاچه‌های شور مکزیک و آفریقا به‌عنوان یک ماده غذایی و منبع پروتئین مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند (Larrosa *et al*., 2018). در پی افزایش بی‌رویه جمعیت جهان و کمبود مواد غذایی سازمان ملل در بیانیه‌ای در سال ۱۹۸۰ ریزجلبک *اسپیرولینا* را به‌عنوان غذای آینده معرفی نمود (Enzing *et al*., 2014). در حال حاضر شرکت‌های بزرگی در سراسر دنیا روی تولید زیست‌توده و رنگدانه فایکوسیانین از این ریزجلبک کار می‌کنند و در همین راستا نیز بازار جهانی *اسپیرولینا* در سال ۲۰۱۸ بیش از ۳۴۶ میلیون دلار درآمدزایی داشته و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۶ به ۷۷۹ میلیون دلار برسد (www.reportbuyer.com). همچنین پیش‌بینی می‌شود حجم بازار فروش برای رنگدانه فایکوسیانین نیز از ۹۴/۴ میلیون دلار در سال ۲۰۱۶ به ۲۴۵/۵ میلیون دلار در ۲۰۲۷ برسد (www.businesswire.com). رنگ تیره این ریزجلبک به خاطر وجود مقادیر بالا انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدان و رنگدانه‌های نظیر فایکوسیانین (۱۴-۷ درصد ماده خشک)، بتاکاروتن، لوتئین و زئاگزانتین است (Salla *et al*., 2016). رنگدانه فایکوسیانین با رنگ آبی درخشان با خواص فلورسنت و آنتی‌اکسیدانی بالا، در سطح وسیعی از کشورهای مختلف به‌عنوان رنگ آبی طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. رنگ آبی با توجه به محدودبودن منابع گیاهی آن به دو تیره روناسیان (Gardenia) و وسمه (Indigo) کاربرد کمتری در صنایع غذایی داشته و بیشتر از رنگ‌های مصنوعی چون بریلینت‌بلو (Brilliant Blue) استفاده می‌شود. در حال حاضر آگاهی از اثرات مضر رنگ‌های صنعتی و اقبال عمومی در استفاده از فرآورده‌های طبیعی موجب شده استفاده از سایر منابع طبیعی مانند ریزجلبک‌ها به‌عنوان منبع مهمی برای رنگ‌ها و رنگدانه‌های طبیعی مورد توجه قرار گیرد (Mogany, 2014). فایکوسیانین یک رنگدانه آبی و رنگدانه‌های اصلی سیانوباکتری‌ها از جمله ریزجلبک *اسپیرولینا* متعلق به خانواده فیکوبیلی پروتئین‌ها و جزیی از آنتن جمع‌کننده نور در غشای تیلاکوئیدی کلروپلاست است. فایکوسیانین از دو جز پروتئین و کروموفور تشکیل شده که بخش پروتئینی آن شامل دو زیر واحد α و β بوده که دارای وزن مولکولی بین ۱۸ تا ۲۰ کیلودالتون هستند (Gaese, 2012). فایکوسیانین دارای کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف غذایی، دارویی و پزشکی، آرایشی و بهداشتی و الکترونیک است. براساس درصد خلوص این رنگدانه، فرآورده‌ها یا زیست‌توده این ریزجلبک کاربردهای متعددی به‌عنوان مکمل غذایی و دارویی پیدا می‌کند.

با توجه به آنکه مهمترین اصل در توسعه فرآیند تولید تجاری ریزجلبک‌ها در مقیاس وسیع، افزایش تولید زیست توده و ماده خام است و به‌دلیل آنکه شرایط متعددی بر میزان تولید فایکوسیانین تأثیرگذار است انتخاب صحیح استراتژی کشت و طراحی صحیح سیستم تولید از اهمیت زیادی برخوردار است. رشد *اسپیرولینا* و تولید فایکوسیانین علاوه بر خصوصیات ژنتیکی سویه‌ها و پارامترهایی چون سن تلقیح تحت‌تأثیر فاکتورهای فیزیکی مانند درجه حرارت، شدت نور، میزان UV، pH و فاکتورهای شیمیایی مانند مقدار بهینه مواد مغذی و عناصر موجود در محیط‌کشت قرار دارد (Wan *et al*.,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

2016; Klanchui *et al.*, 2012). در میان این پارامترها، منبع نوری از مهم‌ترین عوامل مؤثر در تولید محتوای بیوشیمیایی جلبک‌ها محسوب می‌شوند. سه فاکتور مهم کیفیت نور (طول‌موج نور)، شدت نور و طول مدت روشنایی (دوره نوری یا فتوپریود) مستقیماً روی سیستم فتوسنتزی و به‌تبع آن روی رشد جلبک و تولید رنگدانه‌ها تأثیرگذار است. براساس تغییرات شدت و کیفیت نور به‌منظور سازگاری سیستم فتوسنتزکننده، تغییراتی در رنگدانه‌ها بوجود می‌آید و این تغییرات در سنتز و میزان فایکوبیلی پروتئین‌ها تأثیرگذار است. این تنظیم برای ایجاد توازن بین جذب و کاربرد نور برای به حداقل رساندن صدمات فتواکسیداتیو انجام می‌شود (Bercea *et al.*, 2012). افزایش روشنایی موجب افزایش فتوسیستم‌های I و II در غشاهای تیلاکوییید کلروپلاستی (PS I/PS II) و تعداد و اندازه آنتن‌های گیرنده الکترون وفیکوبیلی پروتئین‌ها از جمله فایکوسیانین در جلبک سبز–آبی می‌شود (Poza-Carrion *et al.*, 2001). در عین حال نور شدید می‌تواند موجب تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) شود (Kumar *et al.*, 2010). تغییر فتوپریود نیز می‌تواند موجب تغییر میزان رنگدانه‌ها و ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها شود (Dautania and Singh, 2012). فرایند فتوسنتز در فتواتروف‌ها و میکسوتروف ها بوسیله نور خورشید یا نور مصنوعی رخ می‌دهد. استفاده از نور مصنوعی همچنین موجب فراهم‌آوری و تنظیم بهتر شدت تابش فوتون‌های مؤثر بر فتوسنتز بر واحد سطح در واحد زمان (Photosyynthetic photon flux density) می‌شود. در سیانوباکتری‌ها که اغلب فاقد کلروفیل b هستند، در کمپلکس رنگدانه- پروتئین جمع‌کننده نور رنگدانه‌های اصلی شامل کلروفیل a و a≈430 (λ680) و فایکوبیلی پروتئین‌ها مثل فیکواریترین (λa≈550) و فایکوسیانین (λa≈620) است. برای رشد جلبک‌های سبز و گیاهان نور قرمز مورد نیاز است. این موجودات می‌توانند به نحو بهتر و بازده بیشتری نسبت به سیانوباکتری‌ها از نور آبی استفاده کنند. امروزه یکی از مهم‌ترین منابع نوری در دنیا نورهای الای‌دی است (Schulze *et al.*, 2014). از جمله مزایای لامپ‌های سوپر الای‌دی مورد استفاده می‌توان به تنظیم و فراهم‌آوری بهتر چگالی شار فوتون فتوسنتز (Photosynthetic photon flux density)، تنظیم شدت نور، تنظیم زاویه تابش نور (به‌دلیل وجود لنزهایی با زوایای دلخواه نوری)، بازده نوری بالا (در حد ۷۴ تا ۱۲۰ لومن بر وات (lum/watt) این بازده در لامپ‌های رشته‌ای ۱۰ تا ۱۵ لومن بر وات است)، سرعت پاسخ بالا (Response Time) (در مقیاس نانو ثانیه)، فاقد جیوه و طول عمر زیاد (بین ۵۰ تا ۶۰ هزار ساعت) و عدم کاهش شدت نور با گذشت زمان اشاره کرد.

اگر چه نور خورشید یکی از منابع هزینه‌ای مؤثر انرژی برای تولیدات ریز جلبک است استفاده از نور مصنوعی نیز زمانی که برای تولید ترکیبات با ارزش از ریزجلبک باشد از نظر اقتصادی مناسب و مقرون به صرفه است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه بهینه‌سازی سیستم‌های جدید نوری سوپر الای‌دی در جهت ارتقای کمیت و کیفیت زیست‌توده و فایکوسیانین تولیدی با استفاده از لامپ‌های مختلف با طول موج و شدت متفاوت و ارزیابی نحوه تغییرات و پاسخ‌های فیزیکوشیمیایی ریزجلبک *اسپیرولینا* بوده که درنهایت موجب افزایش بهره‌وری تولید و کاهش منابع مصرفی انرژی شود. این مطالعه با استفاده از لامپ‌های سوپر الای‌دی و ترکیب طول موج‌های مختلف برای اولین بار در کشور انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزجلبک *اسپیرولینا*: مجموعه‌ای از پنج سویه در تحقیق حاضر استفاده شد که یک سویه بومی به نام ABR38 از خلیج‌فارس جداسازی شد. دو سویه (Baz97, Sar67) از کلکسیون‌های میکروبی در داخل کشور (پژوهشکده صنایع غذایی تبریز و پژوهشکده محیط‌زیست کرج)، یک سویه از کلکسیون میکروبی National Institute of Environmental Studies Collection در ژاپن با نام تجاری NIES-39 *Arthrospira platensis* و سویه دیگر Chin63 با نام تجاری *Arthrospira platensis* FACHB439 از چین تهیه شد.

استخراج DNA ژنومی سویه‌ها به جهت شناسایی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

مولکولی ژنوتیپ‌های مختلف *اسپیرولینا* و آنالیز فیلوژنی: استخراج DNA ژنومی از سویه‌های اسپیرولینا براساس روش ارتقایافته جداسازی و خالص‌سازی DNA ژنومی از سیانوباکتری‌های رشته‌ای صورت گرفت. این روش مبتنی بر استخراج با فنل است و DNA استخراجی از این روش از خلوص بالایی برخوردار است. در این روش در ابتدا از ۱۰ میلی‌لیتر از هر کدام از کشت‌های تازه ریزجلبک *اسپیرولینا*، بوسیله سانتریفیوژ ۸۰۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه جدا شد. پلیت سلولی به فالکون‌های عاری از نوکلئاز انتقال یافت. یک میکرولیتر از بافر TE شامل (تریس اسیدکلریدریک ۵۰ میلی-مولار و ۲۰EDTA میلی‌مولار با pH= ۸) اضافه شد. سپس همه نمونه‌ها در نیتروژن مایع مورد انجماد و یخ‌زدایی قرار گرفتند (سه بار تکرار). پس از آن نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰٪ از حداکثر آمپلیتود سونیکت شدند. در ادامه مراحل استخراج، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول یک شامل (۲ میلی‌لیتر از بافر TE، ۰/۵ میلی‌لیتر از ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم لیزوزیم) به نمونه‌ها اضافه کرده و به‌مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۰/۹۲ میلی‌لیتر از محلول دو شامل (۴۵۰ میکرولیتر از سارکوزیل ۱۰ درصد، ۴۵۰ میکرولیتر از سدیم دو دسیل سولفونات ۱۰ درصد، ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر هم از پروتیناز k) اضافه کرده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. به‌دنبال آن ۴ میلی‌لیتر فنل اشباع اضافه شد. ادامه فرآیند استخراج براساس روش مناسب برای نمونه-های ریزجلبکی تا رسیدن به پلت DNA ریزجلبک ادامه پیدا کرد و در انتها نمونه DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (Kaczynska *et al.*, 2013).

تعیین خلوص DNA استخراجی از نمونه‌ها: برای اندازه‌گیری خلوص نمونه DNA از اندازه‌گیری جذب $A_{۲۸۰}$ /$A_{۲۶۰}$ و $A_{۲۳۰}$ /$A_{۲۶۰}$ توسط دستگاه نانودراپ ND-1000 اسپکتوفتومتر استفاده شد. طول‌موج جذبی ۲۶۰ نانومتر میزان غلظت DNA را نشان می‌دهد (یک O.D در ۲۶۰ نانومتر برابر با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از DNA دو رشته‌ای است) (Singh *et al.*, 2011). با نانودراپ میزان خلوص DNA استخراجی و آلودگی پروتئینی، آلودگی کربوهیدرات، فنل و یا سایر ترکیبات آروماتیک تعیین شد. همچنین کیفیت DNA استخراجی نیز با بردن بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد (Kaczynska *et al.*, 2013).

تکثیر و توالی‌یابی ژن *16SrRNA*: تکثیر قطعات DNA در دو ژن توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد. توالی پرایمر برای ژن *16srRNA* از دو پرایمر جهانی با توالی پرایمر فوروارد 27F: 5′-AGAGTTTGATCMTGCTGGCTCAG-3′ و پرایمر ریورس 1512R: 5′-GGYTACCTTGTTACGACTT-3′ استفاده شد (Choi *et al.*, 2012). مخلوط واکنش برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۳/۷۵ میکرولیتر از نمونه DNA، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم تگ پلی‌مراز، ۱/۵ میکرولیتر از استوک ۲ میلی‌مولار مخلوط dNTPs و یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۲ میکرولیتر از استوک ۲۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، بافر پی‌سی‌ار ۲/۵ میکرولیتر و آب دیونیزه ۱۳/۰۵ میکرولیتر اضافه شد. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مطابق برنامه جدول ۱ انجام شد. بعد از اتمام برنامه تکثیر، محصول حاصل بر روی ژل یک و نیم درصد آگارز در شرایط بافری TAE و با ولتاژ ۸۰ ولت به‌مدت یک ساعت الکتروفورز شد. درنهایت قطعات تکثیری با کیفیت خوب خالص‌سازی شد و توسط خوانش دوطرفه بیونر توالی‌یابی شدند.

تهیه محیط‌کشت زاروک برای کشت ریزجلبک *اسپیرولینا*: در این بررسی محیط‌کشت عمومی زاروک مطابق روش Xie و همکاران (۲۰۱۵) مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی کشت مادری و تلقیح و رشد نمونه‌ها: برای تهیه کشت ریزجلبک *اسپیرولینا* از کشت‌های آماده که در شرایط شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۰-۶۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه قرار داشتند مایه تلقیح اولیه برداشت شده و به محیط‌کشت جدید زاروک به حجم ۸۰۰ میلی‌لیتر در شیشه اضافه شده و پس از آن به‌مدت سه روز در شرایط نوری ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه نور سوپر الای‌دی نگهداری شده و درنهایت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

جدول ۱- برنامه واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای پرایمرهای فوروارد و ریورس

سیکل	زمان	دما (سلسیوس)	مرحله
۱	S۵	۹۵	P_1
۳۰	S۳۰	۹۵	P_2
	S۳۰	۵۵	
	۲ دقیقه	۷۲	
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	P_3
نگه داری	∞	۴	Hold

کشت مادری آماده است (Ooms *et al.*, 2016).

همه کشت‌ها با مقدار مساوی جلبک اولیه به مقدار ۰/۳۵میلی‌گرم در لیتر تلقیح شدند. سپس همه تیمارهای کشت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و تحت شرایط هوادهی با نرخ هوادهی (Volume of air per Volume medium per Minute) ۰/۲ vvm قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها در نور پیوسته و شدت نورهای مختلف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر بر ثانیه) برحسب هر آزمایش و همچنین طول‌موج‌های مختلف نور لامپ‌های سوپر الای‌دی قرار گرفتند. شدت نور نیز برای هر آزمایش توسط دستگاه لوکس‌متر تستو ۵۴۰ ساخت کشور آلمان اندازه‌گیری و مشخص شد. به‌منظور انجام آزمایشات مربوط به نور در ابتدا در بین پنج سویه اسپیرولینای موجود آزمایش مقایسه از نظر تولید میزان زیست‌توده و فایکوسیانین انجام شد و سپس سایر آزمایشات نور بطور مشخص بر روی سویه منتخب انجام شد. در طراحی آزمایشات نور نیز در ابتدا به بررسی تأثیر شدت‌های مختلف (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) از نور سوپر الای‌دی سفید و نور فلوروسنت (با شدت ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) بر دو شاخص میزان چگالی نوری و غلظت فایکوسیانین تولیدی پرداخته شد. در ادامه آزمایشات دیگر نیز به مقایسه تأثیر نورهای مختلف سوپر ال ای دی سفید، قرمز و آبی به‌صورت اثر مجزا و ترکیبی آنها بر شاخص‌های تولید زیست‌توده، غلظت و خلوص فایکوسیانین در *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 پرداخته شد.

مشخصات لامپ‌های سوپر الای‌دی مورد استفاده: لامپ‌های سوپر الای‌دی براساس مشخصات ذکرشده در جدول ۲ در ساختار منبع نوری مورد استفاده قرار گرفت. برای آزمایشات تک طول‌موج نوری از یک نوع لامپ در ردیف‌های شش تایی با طول‌موج مشخص آن استفاده و مطابق شکل ۱ به نمونه‌ها تابیده شد. برای آزمایش‌های ترکیبی نورهای سفید - آبی، سفید - قرمز و قرمز - آبی از طول‌موج‌های مورد نظر با شدت برابر و به‌صورت همزمان استفاده شد. برای این منظور در ردیف‌های شش تایی لامپ‌ها هر منبع نور رنگی به‌صورت یکی در میان قرار گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: نمونه‌هایی از محیط‌کشت مایع هر ۴۸ ساعت یک بار برداشت شده و آنالیزها انجام شد. شاخص رشد سلولی یا چگالی نوری زیست‌توده در طول‌موج ۶۸۰ نانومتر و با دستگاه اسپکتوفتومتر کری ۳۰۰ اندازه‌گیری شد و مطابق رابطه ۱ مقدار زیست‌توده برحسب گرم محاسبه شد (Xie *et al.*, 2015).

رابطه ۱

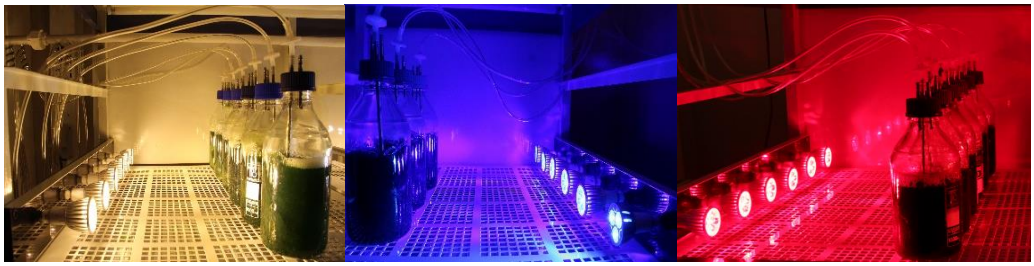
$$\text{میزان زیست‌توده} = OD_{680} \times 0.64 - 0.047 \qquad (R^2 = 0.988)$$

استخراج و اندازه‌گیری فایکوسیانین و درجه خلوص آن: به‌منظور اندازه‌گیری فایکوسیانین از نمونه‌های ریز جلبک *اسپیرولینا* تحت تیمارهای مقایسه شدت‌های مختلف نور الای‌دی و نور فلوروسنت در یک دوره رشدی ۲۰ روزه با فواصل چهار روزه نمونه‌برداری انجام شد در آزمایش مقایسه نورهای ساده و ترکیبی الای‌دی مقایسه در دوره ۱۵ روزه انجام شد. در هر بار نمونه‌برداری به میزان ۵ میلی‌لیتر از محیط‌کشت برداشت شده و در دور ۱۲۰۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

جدول ۲- خصوصیات لامپ‌های سوپر ال‌ای‌دی مورد استفاده در تیمارهای نوری

نور	طول موج h (λ)	شدت نور (میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه)
آبی	۴۵۰-۴۹۵	۳۶۰-۲۳۰۰
سفید	۴۰۰-۷۰۰	۸۵-۲۲۰۰
قرمز	۶۲۰-۷۰۰	۳۱۰-۲۴۰۰



شکل ۱- لامپ‌های سوپر ال‌ای‌دی مورد استفاده شامل نورهای سفید، آبی و قرمز

در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ انجام شده و پس از شستشو با آب‌مقطر استریل زیست‌توده در چند مرحله، به هر نمونه یک میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با PH = ۶/۸ اضافه شد. نمونه‌ها بعد از مخلوط‌شدن کامل به‌مدت یک شبانه‌روز در فریز ۷۰- درجه سلسیوس فریز و مجدد در ۴ درجه سلسیوس دفراست شده و به آنها ۴ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه شد. سپس به‌مدت ۴ ساعت در دمای محیط در ۴۰۰ دور در دقیقه عمل همزدن انجام شد و نمونه‌ها در ۱۸۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول آبی رنگ حاوی فایکوسیانین استخراج شد. سپس جذب محلول در طول‌موج‌های ۶۱۸ و ۶۵۰ نانومتر خوانده و مقدار فایکوسیانین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برحسب رابطه شماره ۲ محاسبه گردید. خلوص فایکوسیانین طبق رابطه ۳ محاسبه شد که از نسبت جذب در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر (بیشینه جذب فیکوسیانین) به جذب در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به کل پروتئین‌ها، بدست می‌آید (Fekrat *et al.*, 2018).

رابطه ۲

$$\text{غلظت فایکوسیانین} = [A_{618}\text{-}0.474\ (A_{650})]/5.34$$

رابطه ۳

$$\text{خلوص فایکوسیانین} = A_{620}/A_{280}$$

درنهایت در پایان دوره رشد برداشت زیست‌توده نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ در شرایط ۱۸۰۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰ درجه سلسیوس انجام شد و پلت سلولی زیست‌توده‌ها دو بار با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند و پس از آن زیست‌توده‌ها توسط دستگاه لیوفیلیزاتور در دمای ۶۰- درجه سلسیوس خشک شد.

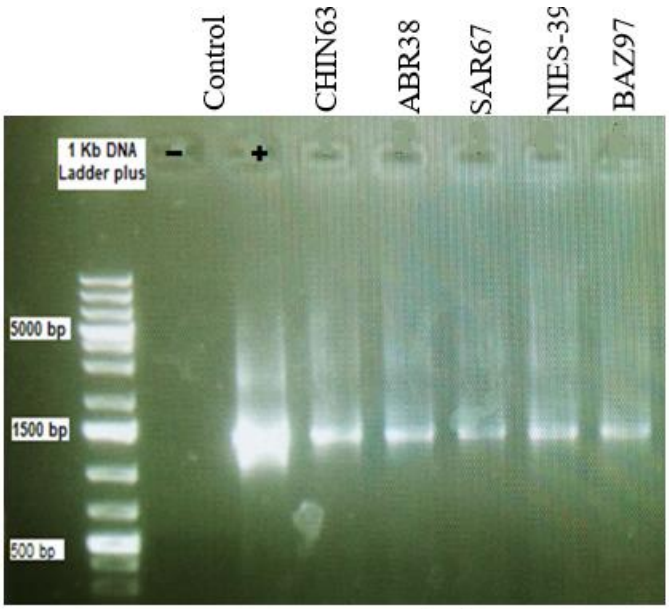
نتایج

انتخاب سویه *اسپیرولینا* با کارایی بالا، شناسایی مولکولی سویه‌های *اسپیرولینا* و آنالیز فیلوژنی: آنالیز مولکولی پنج سویه مورد استفاده در تحقیق توسط ژن *16SrRNA* انجام شد. پس از انجام‌شدن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصول تکثیر-شده ژن *16SrRNA* بر روی ژل آگارز برده شدند و نتایج عکس ژل آن در شکل ۲ نشان داده شده است. طول تکثیری قطعه ژن *16SrRNA*، ۱۵۰۰ جفت باز بود.

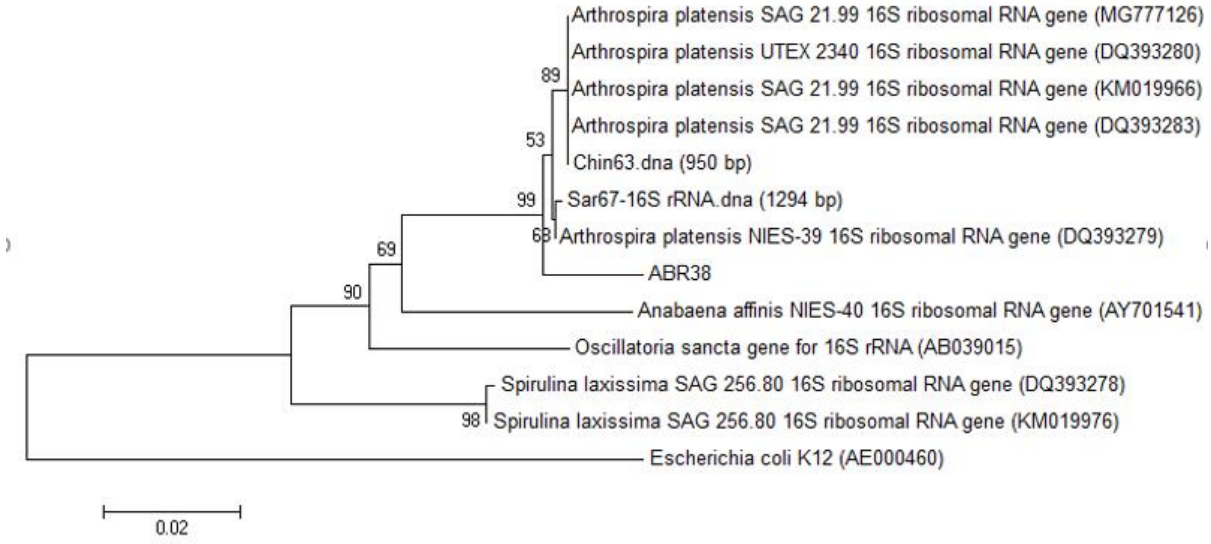
پس از انجام توالی‌یابی نتایج قطعات تکثیری، توالی ژن *16SrRNA* در سویه‌ها با داده‌های بانک ژنی NCBI و با استفاده از برنامه بلست (BLAST) مورد مقایسه قرار گرفت. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining و با استفاده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]



شکل ۲- تصویر ژل رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم برماید برای محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۱۵۰۰ جفت باز برای ژن *16SrRNA*.

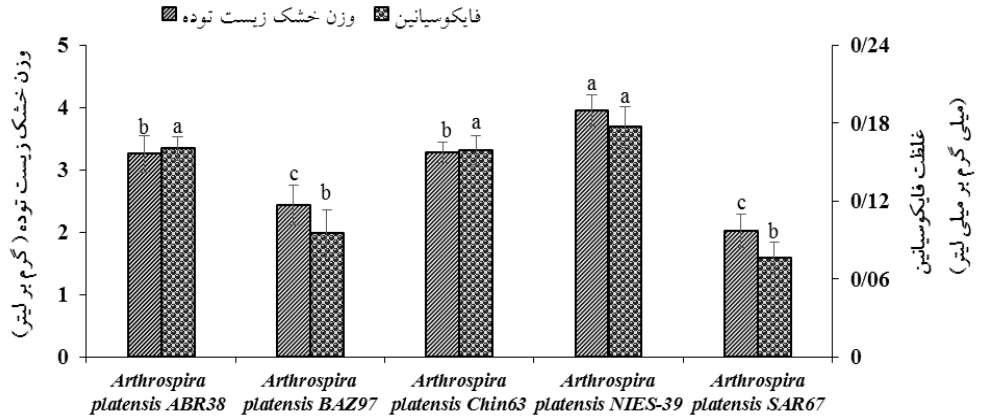


شکل ۳- آنالیز فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی برای توالی *16srRNA* سویه‌های Chin63، Sar67، ABR38 و *Arthrospira platensis* NIES-39 توضیح: درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining و با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد.

از نرم‌افزار مگا ۴ (MEGA4) ترسیم شد (شکل ۳). سویه Baz97 به‌دلیل آنکه درنتیجه توالی‌یابی پاسخ مناسبی نداد، در ترسیم درخت فیلوژنی استفاده نشد. نتایج آنالیز درخت فیلوژنی توالی *16srRNA* نشان می‌دهد تمامی سویه‌های مورد مطالعه ما به احتمال ۹۹ درصد در گروه *Arthrospira platensis* هستند (شکل ۳).

مقایسه میزان تولید زیست‌توده و فایکوسیانین در سویه-های *اسپیرولینا*: پنج سویه *اسپیرولینای* مورد بررسی در یک دوره رشدی ۱۲ روزه از نظر میزان تولید زیست‌توده و فایکوسیانین تولیدی مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج آنالیز واریانس بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال کوچکتر از ۰/۰۰۱ بین سویه‌ها است. نتایج مقایسه میانگین سویه‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]



شکل ۴- مقایسه سویه‌های *اسپیرولینا* مورد بررسی از نظر تولید زیست‌توده و فایکوسیانین پس از یک دوره رشدی ۱۲ روزه.

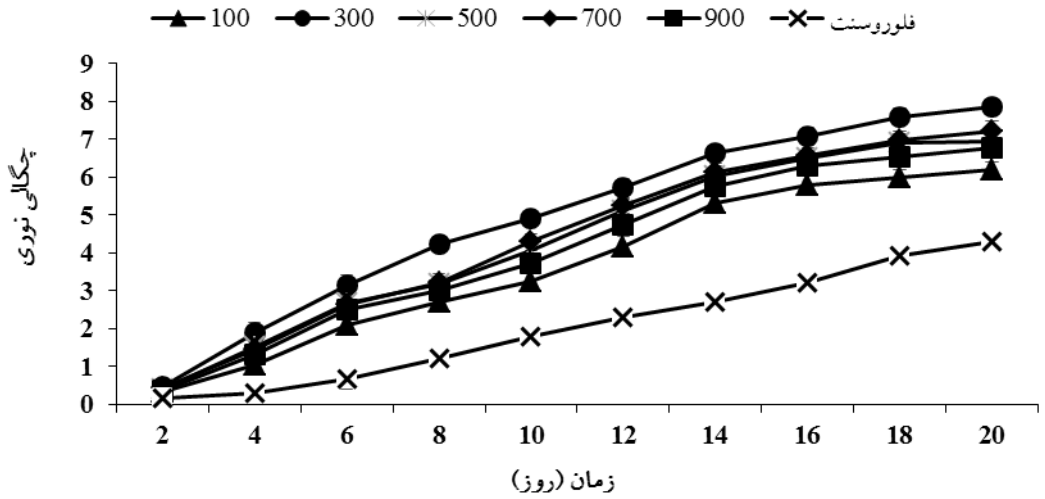
اسپیرولینا از نظر تولید زیست‌توده و فایکوسیانین در شکل ۴ نشان می‌دهد که سویه *اسپیرولینا پلاتینسیس* NIES-39 با میزان تولید ۳/۹ گرم بر لیتر زیست‌توده بیشترین میزان تولید را به‌صورت معنی‌داری ($P <$ ۰/۰۵) در میانگین سویه‌ها داشته و همچنین میزان فایکوسیانین این سویه نیز ۰/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. با توجه به آنکه اطلاعات کامل ژنومی سویه *اسپیرولینا پلاتینسیس* NIES-39 در پایگاه داده‌های ژنومی (NCBI) هم در دسترس است برای انجام سایر آزمایشات دیگر این سویه انتخاب شد.

بررسی تأثیر شدت‌های مختلف نور سوپر الای‌دی سفید و نور فلوروسنت بر میزان چگالی نوری *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39: اثر شدت‌های مختلف مؤثر نور سفید در یک دوره رشدی ۲۰ روزه در شکل ۵ نشان‌دهنده آن است که نور سفید در شدت نوری ۳۰۰ میکرومول فتون بر مترمربع بر ثانیه بطور معنی‌داری تأثیرگذارتر از سایر شدت‌ها بر میزان چگالی نوری (شاخص رشد سلولی) *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 است. همچنین شدت‌های نوری ۵۰۰،۷۰۰ و ۹۰۰ در اکثر روزها اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. اما چگالی حاصل از شدت نور ۱۰۰ میکرومول فتون بر مترمربع بر ثانیه در روزهای انتهای دوره به‌صورت معنی‌داری کمتر از سایر شدت‌های نور الای‌دی بود. همچنین نتایج مقایسه شدت نور مساوی ۳۰۰ میکرومول فتون بر مترمربع بر ثانیه از منبع نوری سوپر الای‌دی و نور فلورسنت در شکل ۵ نشان‌دهنده آن است که میزان زیست‌توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 (چگالی نوری) در نور سوپر الای‌دی سفید بیش از یک و نیم برابر نور فلورسنت سفید است. در روز بیستم دوره رشدی، بیشترین میزان چگالی نور سوپر الای‌دی سفید ۷/۸۵ بدست آمد که در این روز میزان چگالی نوری نمونه تیمارشده با نور فلوروسنت ۴/۳۰ بدست آمد.

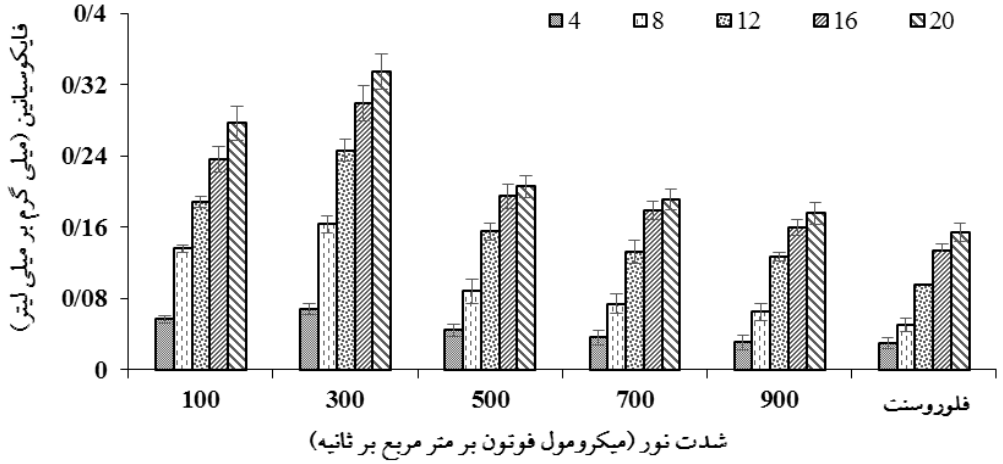
بررسی تأثیر شدت‌های مختلف مؤثر نور سوپر الای‌دی سفید و نور فلوروسنت بر میزان فایکوسیانین تولیدی در *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39: مقایسه شدت‌های مختلف نور سوپر الای‌دی و نور فلوروسنت بر میزان فایکوسیانین، در یک دوره بیست روزه با فواصل چهار روز از دوره رشد *اسپیرولینا* نشان داد، بیشترین مقدار فایکوسیانین تولیدشده، در نمونه‌های ریزجلبکی تیمارشده با شدت نور ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، در روز بیستم و به میزان ۰/۳۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. پس از آن شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون متر مربع بر ثانیه مؤثر بوده است که بیشترین میزان تولید فایکوسیانین آن در روز بیستم از دوره رشد و به میزان ۰/۲۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. با افزایش میزان شدت نور از ۳۰۰ میکرومول به بالا میزان فایکوسیانین تولیدی کاهش یافته و این کاهش در بین روزهای مختلف از دوره رشد اختلاف معنی‌دار ($P <$ ۰/۰۵) زیادی مشاهده نشد، نتایج میزان فایکوسیانین تولیدی توسط نور فلوروسنت نیز کمتر از نورهای الای‌دی بدست آمد (شکل ۶).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]



شکل ۵- نتایج بررسی تأثیر شدت مؤثر نور سوپر الای‌دی سفید و نور فلورسنت سفید (شدت نور فلوروسنت مساوی ۳۰۰ میکرومول فتون بر متر مربع بر ثانیه) بر میزان چگالی نوری *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 . نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار ± انحراف معیار است.

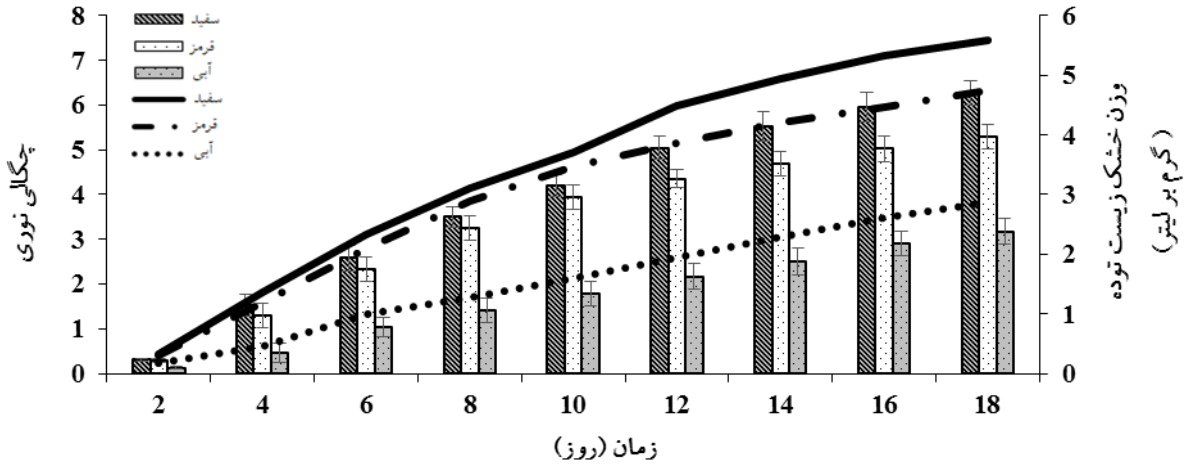


شکل ۶- نتایج بررسی تأثیر شدت‌های مختلف از نور سوپر الای‌دی سفید و نور فلوروسنت (شدت ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) بر میزان فایکوسیانین تولیدشده توسط *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 ، در یک دوره رشد بیست روزه با فواصل چهار روز. نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار ± انحراف معیار است.

مقایسه تأثیر نورهای سوپر الای‌دی سفید، قرمز و آبی بر میزان زیست‌توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39: در ادامه بررسی به تأثیر نورهای مختلف سوپر الای‌دی بر روی پارامترهای رشدی ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 پرداخته شد و نتایج تأثیر نورهای مختلف سوپر الای‌دی با شدت ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بر میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست توده ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 نشان‌دهنده آن است که در پایان دوره رشد نور سفید دارای بیشترین میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده با مقادیر به‌ترتیب ۷/۴۶ و ۴/۷۰۹ و نور آبی با میزان چگالی نوری ۳/۸۱ و وزن خشک زیست‌توده ۲/۳۸ گرم بر لیتر دارای کمترین میزان است (شکل ۷).

تأثیر ترکیبی نورهای مختلف سوپر الای‌دی بر میزان چگالی نوری و زیست‌توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39:

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]



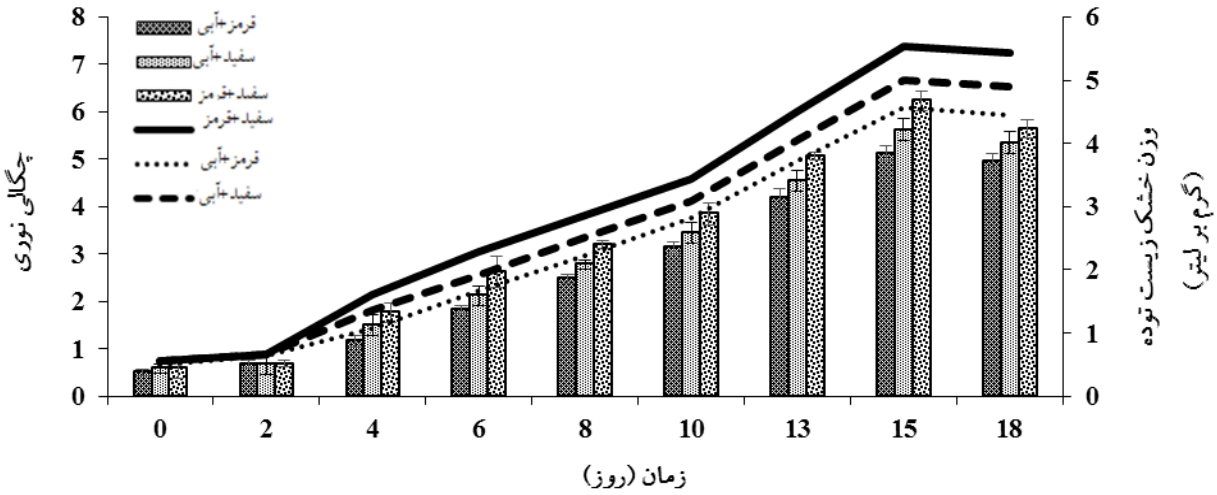
شکل ۷- تأثیر نورهای مختلف سوپر الای‌دی بر میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39. داده‌ها با میانگین سه تکرار ± انحراف معیار ($P < 0.05$) است.

نتایج تأثیر نورهای ترکیبی سوپر الای‌دی با شدت ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بر میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 نشان‌دهنده آن است که در پایان دوره رشدی ۱۸ روزه نور ترکیبی سفید و قرمز در روز ۱۵ دوره رشد دارای بیشترین میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده به‌ترتیب با مقادیر ۷/۳۷ و ۴/۶۷ گرم بر لیتر و نور ترکیبی قرمز و آبی با میزان ۶/۰۹ چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده ۳/۸۵ گرم بر لیتر دارای کمترین میزان است (شکل ۸). همچنین استفاده از نورهای ترکیبی سفید و قرمز در مقایسه با نورهای سفید تنها موجب آن شده تا در روزهای کمتر (۱۵ روز) از دوره رشد به میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده مشابه دست یافت.

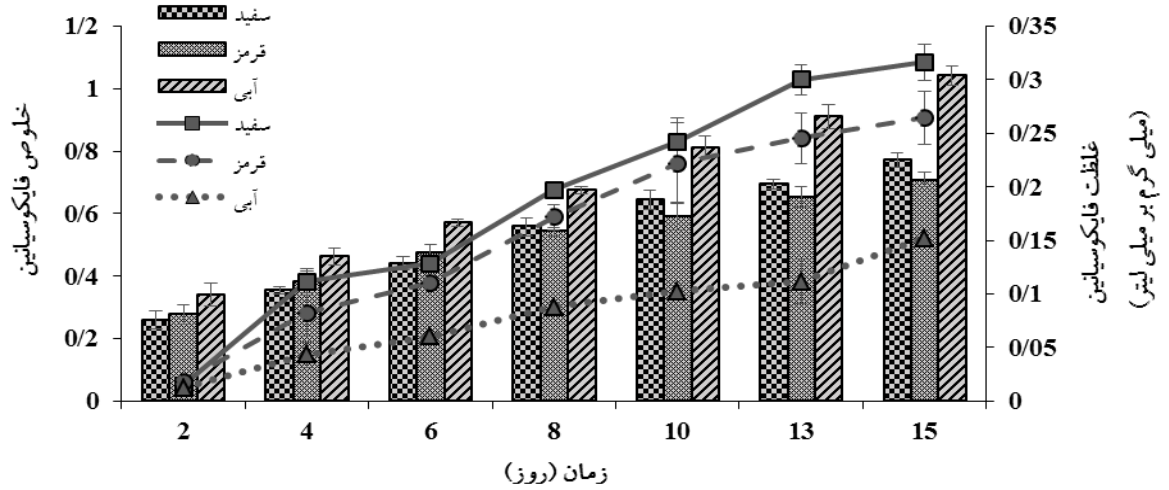
تأثیر نورهای سوپر الای‌دی سفید، قرمز و آبی بر مقدار و خلوص فایکوسیانین در *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39: نتایج تیمارهای مختلف نور با شدت ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بر میزان و خلوص فایکوسیانین نشان‌دهنده آن است که در طول دوره رشدی ۱۵ روزه به‌ترتیب نور سفید دارای بیشترین (۰/۳۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) سپس نور قرمز (۰/۲۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و نورآبی (۰/۱۵۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کمترین میزان بر تولید رنگدانه فایکوسیانین را دارد. اما در مورد خلوص رنگدانه فایکوسیانین نور آبی با داشتن خلوص ۱/۰۴ دارای بیشترین خلوص و نور قرمز با خلوص ۰/۷۰ کمترین میزان خلوص را در پایان دوره رشدی ۱۵ روزه دارا است. نتایج همچنین نشان‌دهنده آن است که نور سفید به‌صورت معناداری در تمام روزهای دوران رشدی، بر میزان غلظت فایکوسیانین تولیدی توسط ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 از دو نور قرمز و آبی مؤثرتر بوده است اما در مورد خلوص فایکوسیانین نور آبی فاکتور مؤثر بوده است (شکل ۹).

تأثیر ترکیبی نورهای مختلف سوپر الای‌دی بر میزان غلظت و خلوص فایکوسیانین *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39: نتایج تأثیر نورهای ترکیبی سوپر الای‌دی با شدت ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بر میزان غلظت و خلوص فایکوسیانین ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 در شکل ۱۰ نشان‌دهنده آن است نور ترکیبی سفید و آبی در پایان دوره رشدی ۱۵ روزه بیشترین تأثیر بر غلظت (۰/۲۸۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و خلوص (۰/۹) فایکوسیانین را داشته است. پس از آن نور ترکیبی قرمز و آبی با غلظت ۰/۲۴۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و خلوص ۰/۸۵ در جایگاه دوم قرار داشته و نور سفید و قرمز هم با غلظت ۰/۲۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و خلوص ۰/۵۹ دارای کمترین تأثیر از بین نورهای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]



شکل ۸- تأثیر ترکیبی نورهای مختلف سوپر الای‌دی بر میزان چگالی نوری و وزن خشک زیست‌توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39. داده-ها با میانگین سه تکرار ± انحراف معیار ($P<0.05$) است.



شکل ۹- تأثیرطول‌موج‌های نور زرد، قرمز و آبی بر غلظت و خلوص فایکوسیانین در سویه *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39. داده‌ها با میانگین سه تکرار ± انحراف معیار ($P<0.05$) است.

ترکیبی است.

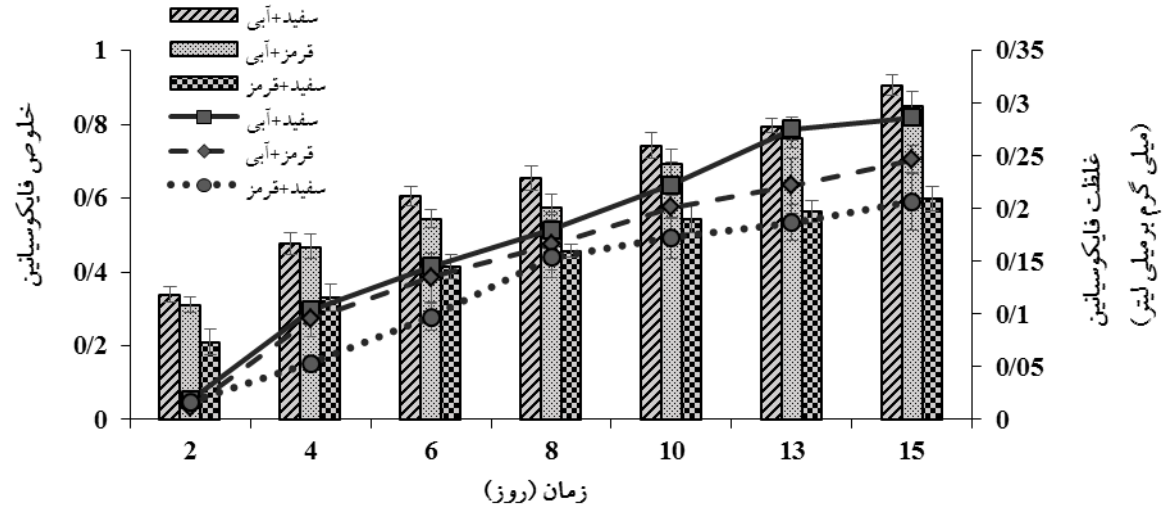
با توجه به نتایج نمودارهای ۹ و ۱۰ در مقایسه بین همه نورهای ساده و ترکیبی، از نظر غلظت فایکوسیانین نور سفید بیشترین میزان تولید را داشته و به‌دنبال آن نور ترکیبی سفید و آبی درجایگاه دوم و نور قرمز در جایگاه سوم قرار داشت.

بحث

با توجه به محتوی پیگمان‌های سلولی هر ریزجلبک، استفاده از طول‌موج‌های مختلف نور موجب پاسخ‌های فیزیولوژی و بیوشیمایی مختلفی در ریزجلبک‌ها می‌شود. با توجه به مقایسه سویه‌های مختلف *اسپیرولینا پلاتنسیس*، سویه NIES-39 با میزان تولید زیست‌توده و فایکوسیانین بیشتر نسبت به سویه‌های دیگر در یک دوره رشدی ۱۲ روزه انتخاب و اثر تیمارهای نوری بر روی این سویه مورد مطالعه قرار گرفت.

اثر شدت‌های مختلف مؤثر نور سفید در یک دوره رشدی ۲۰ روزه نشان داد *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 در شدت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]



شکل ۱۰- تأثیر ترکیبی نورهای مختلف سوپر الای‌دی بر میزان و خلوص فایکوسیانین در *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39. نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار ± انحراف معیار است.

نوری ۳۰۰ میکرومول فتون بر متر مربع بر ثانیه بطور معنی‌داری میزان چگالی نوری (شاخص رشد سلولی) بیشتری در مقایسه با شدت نورهای دیگر تولید نمود. همچنین استفاده از نورهای مختلف سوپر الای-دی موجب تغییر کیفیت و کمیت توده زیستی ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 در طول دوره رشدی مشخص شد. نتایج حاضر نشان داد نور آبی به تنهایی موجب افزایش خلوص فایکوسیانین شده ولی چون این طول‌موج برای فعالیت‌های فتوسنتزی مؤثر نیست، میزان رشد و نیز میزان فایکوسیانین تولیدی کل در این نور نسبت به سایر نورها بسیار کمتر بود. در مقابل ترکیب نور آبی با نور سفید و یا قرمز موجب افزایش خلوص فایکوسیانین نسبت به استفاده از این نورها به‌صورت جدا می‌شود. Chen و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند اگر چه نور آبی موجب کاهش سرعت رشد می‌شود اما استفاده از این نور در شدت‌های بالا موجب افزایش تولید فایکوسیانین با خلوص بیشتر می‌شود (Chen *et al.*, 2010). مطالعات نشان می‌دهد توجه به محتوی پیگمان‌های سلولی ریزجلبک استفاده از طول‌موج‌های مختلف نور به‌صورت ترکیبی موجب پاسخ‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی مختلفی در ریزجلبک‌ها می‌شود. استفاده از نور آبی در ابتدای رشد موجب افزایش سایز و محتوی دورن سلولی ریزجلبک شده و به‌دنبال آن استفاده از نور قرمز موجب افزایش تقسیمات سلولی بیشتر می‌شود. این تغییر شیفت دو مرحله‌ای نور درنهایت می‌تواند بیشتر از هر کدام از نورهای سفید یا قرمز به تنهایی موجب افزایش رشد سلولی شود (Ooms *et al.*, 2016). Lee و همکارن (۲۰۱۵) با استفاده از سیستم دو مرحله‌ای رشد با استفاده از نور الای‌دی قرمز و آبی توانستند در مرحله اول با استفاده از ترکیب این دو نور به رشد سریع دست یافته تا میزان جذب ۱/۴-۱/۶ برای طول‌موج ۶۸۰ نانومتر و در مرحله بعد با استفاده تنها از نور آبی به میزان ۱/۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فایکوسیانین با خلوص ۲/۷ دست یابند (Lee *et al.*, 2015). اگر چه نتایج مطالعات ما در توالی استفاده از طول‌موج‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نتایج ارائه نشده‌اند) درحالی‌که ترکیب نورهای مختلف به‌صورت همزمان بیشترین تأثیر بر میزان زیست‌توده و کمیت و خلوص فایکوسیانین نشان داد.

Akimoto و همکاران (۲۰۱۲) نیز بر استفاده از طول موج‌های کوتاه نور آبی در مقایسه با طول‌موج‌های بلند قرمز و مادون قرمز در تولید بیشتر فایکوبیلی پروتئین‌ها تأکید کردند (Akimoto *et al.*, 2012). همچنین در تحقیق Lee و همکاران (۲۰۱۵) اشاره شده که همزمان با افزایش میزان نرخ رشد ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 در طول موج‌های بلند، نیاز سلول به منابع نیتروژن افزایش یافته و با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

کاهش میزان نیتروژن درون سلولی، سلول از منابع ذخیره‌ای جایگزین چون فایکوسیانین استفاده کرده که یک منبع ذخیره‌های خوب نیتروژن بوده و این موجب کاهش میزان فایکوسیانین در زمان افزایش رشد سلولی می‌شود. اما استفاده از نور آبی به‌دلیل آنکه سرعت رشد و تقسیم سلولی کمتر بوده، میزان مصرف فایکوسیانین کمتر و میزان تولید آن افزایش می‌یابد (Lee *et al.*, 2015). میزان دسترسی به نیتروژن یک نقش مهم و کلیدی برای رشد سلولی و تولید و تجمع فایکوسیانین دارد. یکی از دلایل میزان کمتر فایکوسیانین در نور آبی به‌دلیل مصرف نشدن مناسب و کافی نیتروژن سلولی نیز بوده که این موضوع خود موجب تولید کمتر زیست‌توده می‌شود. همچنین منابع بیان کردند که معمولاً بیشترین میزان فایکوسیانین در ابتدای شروع قحطی نیتروژن سلولی رخ می‌دهد (Ho *et al.*, 2018). در کشت‌های هتروتروف که نقش فتوسنتز کمرنگ شده است با استفاده از نور با طول‌موج بالا میزان فایکوسیانین کاهش می‌یابد (Hamedi *et al.*, 2016).

همچنین استفاده از استراتژی نورهای ترکیبی نسبت به تک طول‌موج نور نشان داد که در دوره رشدی کوتاه‌تری میزان رشد سلولی بیشتری از نظر تولید زیست‌توده بدست خواهد آمد. براساس نتایج حاصل از این تحقیق ترکیب نور سفید و قرمز در روز ۱۵ کشت به میزان ۴/۶۴ گرم بر لیتر از زیست‌توده رسیده درحالی‌که با نور سفید تنها در روز ۱۸ کشت ۴/۷۱ گرم بر لیتر زیست‌توده تولید شد. ترکیب این دو نور سه روز دوره رشد را کاهش داد. نتایج Lee و همکاران (۲۰۱۵) نیز نتیجه مشابهی بدست آوردند و با استفاده از نور ترکیبی آبی و قرمز در روز ۱۲ کشت به حداکثر میزان تولید زیست‌توده ۳/۱ گرم بر لیتر رسیدند که مشابه با مقدار بدست آمده برای این تحقیق در روز ۱۲ است، در تحقیق حاضر همچنین با این ترکیب نور آبی و قرمز در روز ۱۵ کشت بیشینه میزان ۳/۸۵ گرم بر لیتر بدست آمد که در مقایسه با مطالعات سایرین بسیار قابل‌توجه است.

نتیجه‌گیری

فایکوسیانین رنگ طبیعی با ساختار پروتئینی است که کاربردهای فراوانی در غذا، دارو و صنعت دارد. با توجه به آنکه این ترکیب به‌عنوان آنتن گیرنده نور و جزئی از ساختار فتوسنتزی *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 است می‌توان با استفاده از سیستم سازگاری رنگدانه‌ها با نور و با تغییر در طول‌موج و شدت نور میزان تولید آن را افزایش داد. براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان درکل بیان کرد در مقایسه بین نور فلوروسنت معمولی و نورهای سوپر الای‌دی، میزان چگالی نوری *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 در نور سوپر الای‌دی سفید بیش از یک و نیم برابر نور فلورسنت سفید است و همچنین با استفاده شدت نوری ۳۰۰ میکرومول فتون بر متر مربع بر ثانیه نسبت به سایر شدت‌های نور بطور معنی‌داری میزان بیشتری از زیست‌توده و فایکوسیانین در سویه *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 بدست آمد. همچنین نتایج استفاده از طول‌موج‌های مختلف از نورهای سوپر الای‌دی، موجب افزایش کمیت و کیفیت فایکوسیانین تولیدی شده، بطوری‌که استفاده از طول‌موج‌های مجزای سفید و آبی به ترتیب باعث بیشترین میزان غلظت و خلوص فایکوسیانین شدند و همچنین استفاده از ترکیب دو نور سفید و قرمز به صورت همزمان موجب کوتاه‌شدن دوره‌ی رشد گردید. استفاده از سیستم‌های نوری سوپر الای‌دی با طول‌موج‌های متناسب می‌تواند موجب افزایش تولید و کاهش هزینه‌های مصرف انرژی در سیستم‌های بزرگ و صنعتی کشت *اسپیرولینا پلاتنسیس* NIES-39 شود.

سپاسگزاری

از همکاری ارزشمند آقای مهندس محمدعلی فریدونی‌زاده در تهیه و ساخت لامپ‌های سوپر الای‌دی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

Akimoto, S., Yokono, M., Hamada, F., Teshigahara, A., Aikawa, S. and Kondo, A. (2012) Adaptation of light-

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics 1817: 1483-1489.

Bercea, V., Hegedus, A. and Sicora, C. (2012) Study on the effect of different light intensities on the structure and function of PSII in *Cyanothece sp*. ATCC 51142. Annals of the Romanian Society for Cell Biology 17: 373-378.

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

Choi, G. G., Ahn, C. Y. and Oh, H. M. (2012) Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-IGS sequences. Algae 27: 75-82.

Dautania, G. K. and Singh, G. P. (2012) Growth and protein profiling by the cyanobacterium *Anacystis nidulans* strains at different temperature and photoperiod. Open Access Scientific Reports 1: 2-5.

Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M. and Sijtsma, L. (2014) Microalgae-based products for the food and feed sector: An outlook for Europe. Jaint Research Centre Scientific and policy reports, EU Commission 1831-9424.

Fekrat, F., Nami, B., Ghanavati, H., Ghaffari, A. and Shahbazi, M. (2018) Optimization of chitosan / activated charcoal-based purification of *Arthrospira platensis* phycocyanin using response surface methodology. Journal of Applied Phycology 31: 1095-1105.

Gaese, H. (2012) Chemical composition and potential application of *Spirulina platensis* biomass. International Journal of Agricultural and Environmental Information Systems 4: 35-40.

Hamedi, S., Mahdavi, M. A. and Gheshlaghi, R. (2016) Improved lipid and biomass productivities in *Chlorella vulgaris* by differing inoculation medium from production medium. Biofuel Research Journal 10: 410-416.

Ho, S. H., Liao, J. F., Chen, C. Y., Chang, J. S. (2018) Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. Bioresource Technology 247: 669-675.

Kaczynska, A., Los, M. and Węgrzyn, G. (2013) An improved method for efficient isolation and purification of genomic DNA from filamentous cyanobacteria belonging to genera *Anabaena*, *Nodularia* and *Nostoc*. International Journal of Oceanography and Hydrobiology 42: 8-13.

Klanchui, A., Khannapho, Ch., Atchara Phodee, A., Cheevadhanarak, S. and Meechai, A. (2012) iAK692: A genome-scale metabolic model of *Spirulina platensis* C1. BMC Systems Biology 6: 71.

Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Reddy, C. R. K. and Jha, B. (2010) Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (*Gracilariales, Rhodophyta*) to salinity induced oxidative stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 391: 27-34.

Lafarga, T., Fernandez-Sevilla, J. M., Gonzalez-Lopez, C. and Acien-Fernandez, F. G. (2020) *Spirulina* for the food and functional food industries. Food Research International 137: 0963-9969.

Larrosa, A. P. Q., Camara, A. S., Pohndorf, R. S., Rocha, S. F. D. and Pinto, L. A. D. A. (2018) Physicochemical, biochemical, and thermal properties of *Arthrospira (Spirulina)* biomass dried in spouted bed at different conditions. Journal of Applied Phycology 30: 1019-1029.

Lee, S. H., Lee, J. E., Kim, Y. and Seung-Yop Lee, Y. (2015) The production of high purity phycocyanin by *Spirulina platensis* using light-emitting diodes based two-stage cultivation. Applied Biochemistry and Biotechnology 178: 382-95.

Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X. and Jing, K. (2018) Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. Bioresource Technology 255: 293-301.

Mogany, T. (2014) Optimization of culture conditions and extraction method for Phycocyanin production from a hypersaline cyanobacterium. Ph.D thesis, Durban University.

Ooms, M. D., Dinh, C. T., Sargent, E. H. and Sinton, D. (2016) Photon management for augmented photosynthesis. Nature Communications 7: 12699.

Poza-Carrion, C., Fernandez-Valiente, E., Pinas, F. F. and Leganes, F. (2001) Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc sp*. strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. Journal of Plant Physiology 158: 1455-1461.

Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Briao, V. B., Bertolin, T. E., Colla, L. M., Alberto, J. and Costa, J. A. V. (2016) Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. Bioresource Technology 209: 133-141.

Schulze, P. S. C., Barreira, Luisa, A., Pereira, Hugo, G. C., Perales Jose, A. and Varela Joao, C. S. (2014) Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. Trends in Biotechnology 32: 422-30.

Singh, S. P., Rastogi, R. P., Hader, D. P. and Sinha, R. P. (2011) An improved method for genomic DNA extraction from *cyanobacteria*. World J Microbiol Biotechnol 27: 1225-1230.

Wan, M., Zhenyang Wang, Zh., Zhang, Zh., Wang, J., Li, Sh., Yu, A. and Yuanguang, L. (2016) A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. Bioresource Technology 218: 272-278.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y. and Jing, K. (2015) Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under phototrophic cultivation. Bioresource Technology 180: 281-287.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]

Optimization of light conditions by affecting the growth and production of C-Phycocyanin in *Spirulina platensis* microalgae

Farzaneh Fekrat[1], Maryam Shahbazi[1, 2*], Mohammad Amin Hejazi[3], Behnam Nami[1]

[1] Department of Molecular Plant Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[2] Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[3] Branch for Northwest and West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran
(Received: 15/09/2021, Accepted: 25/11/2021)

Abstract

Spirulina microalgae are a rich source of protein and valuable biological compounds. As well, one of the most important Spirulina microalgae pigments is phycocyanin. Phycocyanin is widely used in industries as a natural blue pigment and it's also an effective antioxidant. In order to improve phycocyanin production as well as *Spirulina* growth, by autotrophic cultivation it should be focused on the fact that autotrophic cultivation depends mainly on the source of light with different wavelength distribution and intensity and also access of the *Spirulina* microalgae to nutrients ingredient in culture medium. Given that phycocyanin is a photosynthetic pigment, and a component of light-harvesting (antenna) complexes, the rate and efficiency of the photosynthetic activity is important in the production of phycocyanin. In this study, the molecular *16srRNA* identification of *spirulina* strains was performed. The best strain (*Arthrospira platensis* NIES-39) in terms of biomass and phycocyanin production was selected from five *spirulina* strains. The effect of different super Light Emitting Diode (LED) emitting white, red and blue as a light source in terms of biomass and phycocyanin production in *Arthrospira platensis* NIES-39 was compared, and the results showed that white super LED had the best performance significantly in terms of biomass production (4.71 g/l) and the highest concentration of phycocyanin (0.316 mg/ml). But the purity of phycocyanin produced by blue super LED (1.04) was significantly higher compared white super LED (0.77) and others. The results also showed that the use of combined wavelengths of white and red super LEDs in the growth stages of *Arthrospira platensis NIES-39* compared to the use of only each ones increased the growth rate of algae and three-day shortening the growth period to achieve the maximum biomass (4.67 g/l). As a general result, it can be said that the use of super LED could increase the biomass, purity and amount of phycocyanin produced in the economic production of this microalgae.

Keywords: Biomass, Microalgae, Phycocyanin, *Spirulina*, super LED lights

Corresponding author, Email: maryam.shahbazi@gau.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1401.11.48.6.7]