بررسی تاثیر شدت نور و pH بر میزان رشد، محتوای پروتئین و چربی در *Spirulina platensis*

معصومه حلمی سرشت[۱]، سارا سعادتمند[۲]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۳
تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۲۷

چکیده

سیانوباکتری Arthrospira (Spirulina) platensis یک جلبک سبز آبی رشته ای است که دارای ارزش غذایی و دارویی بسیاری برای انسان و جانوران می باشد. دراین مطالعه تاثیر شدت نور و pH بر میزان تولید پروتئین، چربی، کلروفیل و کارتنوئید ها در Spirulina platensis مورد بررسی قرار گرفته است. نمونه خالص اسپیرولینا در محیط کشت BG-11 مایع تحت تاثیر۳ شدت نوری (Lux ۱۵۰۰ ,۱۰۰۰(شاهد) , ۵۰۰) وپنج تیمار pH شامل (۸/۱, ۹/۱ ,۷/۱ (شاهد) ,۶/۱, ۵/۱) رشد داده شد و در شرایط بهینه به مدت ۲۵ روز تیماردهی گردید. نتایج نشان داد افزایش شدت نور تاثیر

[۱] کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
[۲] استادیار، گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران (نویسنده مسئول)؛ s_saadatmand@srbiau.ac.ir
[۳] استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

معنی‌داری در میزان تولید چربی در این سیانوباکتری دارد ولی در میزان تولید پروتئین و رنگدانه های فتوسنتزی تاثیر معنی داری مشاهده نگردید. همچنین نتایج حاصل از بررسی اثرگذاری تغییرات pH در Spirulina platensis نشان داد که pH قلیایی در تولید چربی و پروتئین از pH خنثی مناسب تر بوده و بطور معنی‌داری سبب افزایش میزان این ترکیبات در سیانوباکتری اسپیرولینا می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Spirulina platensis*، pH، شدت نور، پروتئین، چربی

مقدمه

Spirolina platensis یکی از سیانو باکتری‌های رشته ای چند سلولی است که شامل سلول‌های استوانه‌ای شکل سبز آبی به قطر ۱۲-۱ میلی‌متر می باشد که در یک مارپیچ بدون انشعاب جای گرفته‌اند. رشته‌های اسپیرولینا متحرک بوده و در طول محور تریکوم به طریق سریدن حرکت می‌کند. اسپیرولینا از سیانوباکتری های فاقد هتروسیست می باشد (Richmond, 1990). رشته های اسپیرولینا قادر است در محیط‌هایی که برای اکثر موجودات نامناسب می باشد کلونیزه شود و در آب های شیرین، دریاچه های شور ، اکثر محیط های دریایی قلیایی جمعیت هایی را تشکیل می دهد (Richmond, 1990). دما و pH قلیایی فاکتورهای کلیدی در کشت اسپیرولینا در مقیاس وسیع می باشد (Hu ,2004). دمای بهینه برای کشت اسپیرولینا در گستره ۳۸-۳۵°C بوده و pH بین ۹/۸-۹/۵ می باشد (Hu, 2004).

سیانوباکتری *Spirulina platensis* به عنوان یک مکمل غذایی در رژیم غذایی انسان و جانوران مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ruiz Flores et al., 2003). بر اساس بسیاری از مطالعات توکسیکولوژیک انجام شده، سالم بودن استفاده از این سیانوباکتری جهت مصرف انسان به اثبات رسیده است (Hirahashi et al., 2002).

این مطالعات نشان می دهد که *Spirulina platensis* یک منبع غنی از عناصر معدنی، اسیدهای چرب ضروری و آمینواسیدها می باشد، همچنین دارای انواع ویتامین ها بخصوص ویتامین B12 و رنگدانه های آنتی اکسیدان از قبیل کاروتنوئیدها است (Belay et al., 2002).

گونه های مختلف اسپیرولینا دارای اثرات بیولوژیک متعددی از جمله اثرات ضد التهابی(Reddya et al., 2000)، ضد تومـوری(Mittal et al., 1999)، محافظت کننده کبدی (Sharma et al., 2007)، ضد میکروبی(Sharma et al., 2005)، محافظت کننده از پرتوهای مضر (Verma et al., 2000)، تقویت کننده سیستم ایمنی(Qureshi et al., 1995)؛ 1996، حفاظت کننده از اثرات سمی فلزات سنگین (Shastri et al., 1999) و اثرات آنتی‌اکسیدانی (Upasani et al., 2003) می‌باشد.

سیانوباکتری اسپیرلینا پتانسیل زیادی در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری های وابسته به افزایش چربی خون و فشار خون را دارا می باشد(Juarez-Oropeza, 2009). اسپیرولینا دارای مقادیر زیادی پروتئین (۶۵-۵۹٪) می باشد که از سایر منابع پروتئینی گیاهی مانند سویا (۳۵٪)، بادام زمینی (۲۵٪) یا دانه ها (۱۰-۸٪) بیشتر می باشد. اسپیرولینا دارای رنگدانه هایی مختلف از جمله کاروتنوئیدها، فیکوسیانین و کلروفیل می‌باشد (Henrikson, 1989). *Spirolina platensis* تنها دارای کلروفیل a می باشد که در حدود ۱/۱۵ ٪ زیتوده آن را تشکیل می‌دهد (Henrikson, 1989). استفاده از رنگدانه های اسپیرولینا در مواد آرایشی و بهداشتی و صنایع غذایی از گذشته صورت می گرفته است. این سیانوباکتری یکی از غنی ترین منابع تولید کننده کلروفیل می باشد.

در این پژوهش تاثیر pH و شدت نور در رشد، رنگدانه های فتوسنتزی و میزان تولید چربی و پروتئین مورد بررسی قرار گرفته است تا شرایط مطلوب تر برای رشد و تولیدات مفید این سیانوباکتری بدست آید.

روش کار

- تهیه سویه خالص سیانوباکتری

نمونه خالص Geitler *Arthrospira (Spirulina) platensis* مورد مطالعه، ازپژوهشکده آبزی‌پروری موسسه تحقیقات شیلات ایران وزارت جهاد کشاورزی بندر انزلی (در محیط کشت مایع) تهیه گردید.

- کشت *Spirulina platensis*

برای تکثیر نمونه های جلبکی از محیط کشت BG-11 (Rippka et al., 1979) مایع استفاده شد. سپس نمونه ها در یک دوره انکوباسیون ۲۵ روزه تحت تیمارهای مختلف نوری و pH قرار گرفتند. شدت های نوری اعمال شده شامل (Lux۱۵۰۰, ۱۰۰۰(شاهد), ۵۰۰) با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و تیمارهای pH شامل(۹/۱ ,۸/۱ ,۷/۱ (شاهد),۶/۱,۵/۱) بود.

-اندازه گیری میزان وزن تر و وزن خشک

کشت‌های ۲۵ روزه *Spirulina platensis* با استفاده از روش فیلتراسیون جداسازی گردید و به منظور اندازه گیری وزن تر توزین شد. سپس نمونه‌ها جهت سنجش‌های بیوشیمیایی در دمای ۲۰°C- قرار گرفتند. برای تعیین وزن خشک سیانوباکتری، نمونه‌های تازه به مدت ٢٤ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند سپس با استفاده از ترازو توزین گردیدند.

-اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی

به منظور سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید ، از روش (Lichtenthaler,۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۰۳۵گرم *Spirulina platensis* فریز شده داخل هاون چینی که حاوی ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد بود، ساییده و پس از صاف کردن با کاغذ صافی، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible در طول موج‌های ٤٧٠، ٦٤٦، ٦٦٣ نانومتر اندازه گیری شد .برای صفر نمودن دستگاه، از استون ۸۰ درصد استفاده گردید. غلظت رنگیزه ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

Chla = 12.25 A663.2 - 2.79 A646.8

Car = (1000A470 - 1.8 Chla - 85.02 Chlb)/198

در این فرمول Chla و Car به ترتیب غلظت کلروفیل a و کارتنوئید ها هستند. غلظت بر حسب میلی گرم برمیلی لیتر عصاره گیاهی تعیین و سپس نتایج بر حسب میکرو گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید.

-اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های محلول

برای سنجش غلظت پروتئین محلول، از روش براد فورد (Bradford, 1976) استفاده گردید.

-اندازه‌گیری میزان چربی

توده *Spirulina platensis* فریز شده از ٦ تکرار که دارای حجم و وزن بیشتر بود در این سنجش مورد استفاده قرار گرفت. بعد از توزین وزن تر و آماده‌سازی آن برای قرار گرفتن در بطری‌های دستگاه اتوماتیک سوکسله، mL ۱۰۰ هگزان به عنوان حلال به بطری ها اضافه شد و در دمای ۲۲۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۹۹ دقیقه استخراج چربی انجام گردید، بعد از تبخیر هگزان در دستگاه هر کدام از بطری‌ها به مدت ٦٠- ۳۰ دقیقه در داخل آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده، مرحله بعد برای خنک شدن کامل بطری‌ها داخل دسیکا تور قرار داده شدند. میزان درصد چربی تولیدی توسط ۸ تیمار توسط فرمول زیر محاسبه شد.

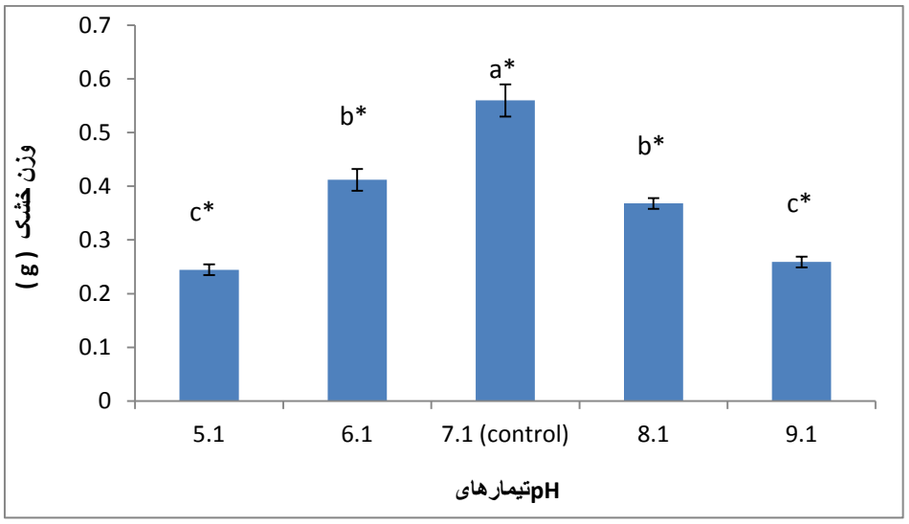
$$\text{درصد چربی} = \frac{\text{وزن اولیه (gr)} - \text{وزن ثانویه (gr)}}{\text{وزن نمونه(gr)}} \times 100$$

- آنالیز آماری

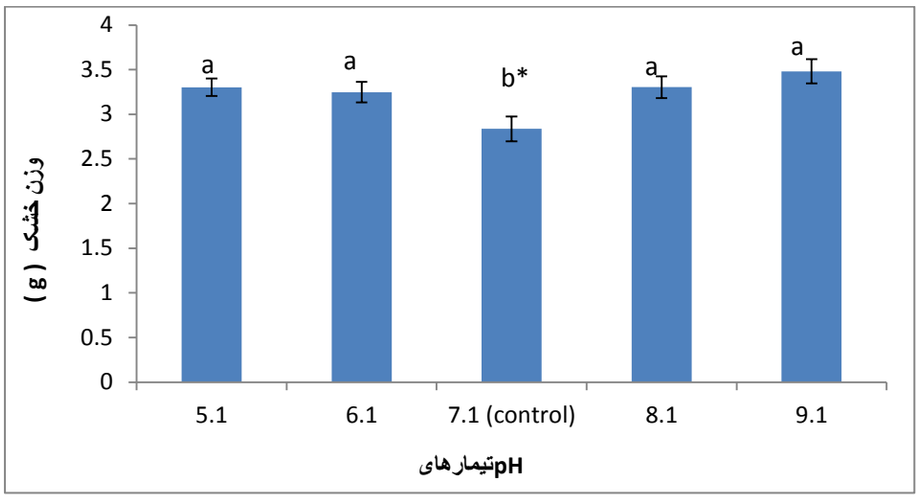
نتایج آزمون های بیوشیمیایی بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سطح احتمال خطای ۵٪ تجزیه وتحلیل شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سه تکرار استفاده گردید. داده ها به صورت آماری و در یک مدل کاملا تصادفی به وسیله تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و نرم‌افزار SPSS 11 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

در pH خنثی در حدود ۷/۱ بیشترین تولید ماده خشک توسط اسپیرولینا (۰/۵۸ گرم)حاصل شد (نمودار۱). از این pH بیشتر و یا کمتر از میزان وزن خشک سیانوباکتری به طورمعنی داری کاسته شد. نمودار ۲ نشان می دهد تغییرات pH به سمت اسیدی شدن یا قلیایی شدن تاثیر معنی داری در میزان وزن تر سیانوباکتری نداشته و حتی در pH خنثی کاهش معنی دار وزن تر مشاهده می شود که به دلیل کاهش احتمالی جذب آب می باشد.

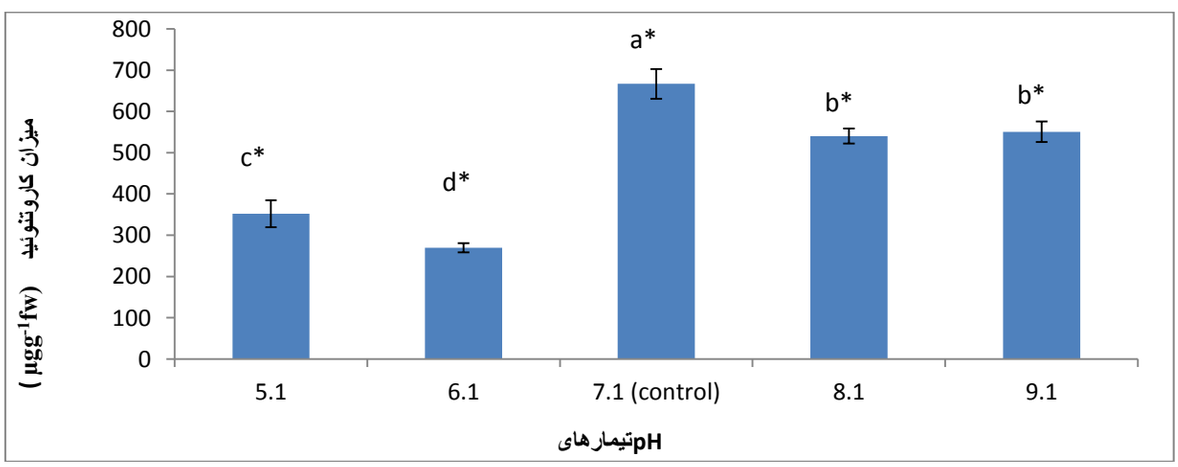


نمودار ۱ : رابطه بین میزان وزن خشک *Spirulina platensis* و تیمارهای pH

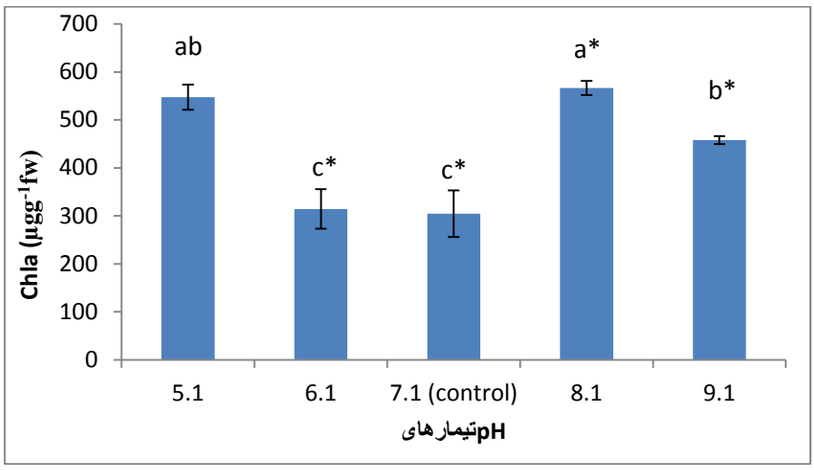


نمودار ۲ : رابطه بین میزان وزن تر *Spirulina platensis* و تیمارهای pH

درpH خنثی میزان کاروتنوئید در نمونه اسپیرولینا به حدود ۶۸۵µg g^{-1} fw رسید که در میان تیمارهای اعمال شده بیشترین مقدار بود. از pH خنثی به سمت اسیدی یا قلیایی میزان کاروتنوئید به طور معنی داری کاهش یافت که این روند کاهشی از محدوده خنثی به سمت قلیائی کمتر می‌باشد (نمودار ۳). اما میزان کلروفیل a در pH اسیدی ۵/۱ و قلیائی ۸/۱ معادل ۵۶۵ µg g^{-1} fw بوده که به صورت معنی‌داری بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد (نمودار ٤).

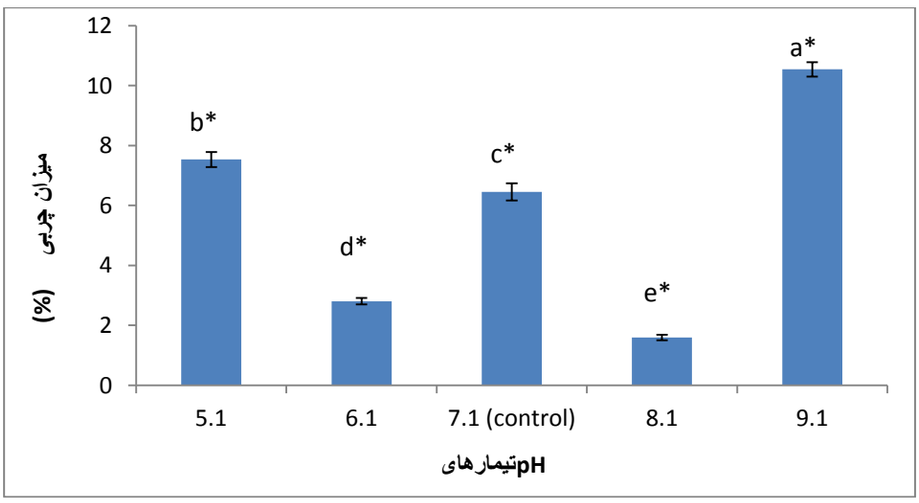


نمودار۳ : میزان کاروتنوئید در تیمارهای pH

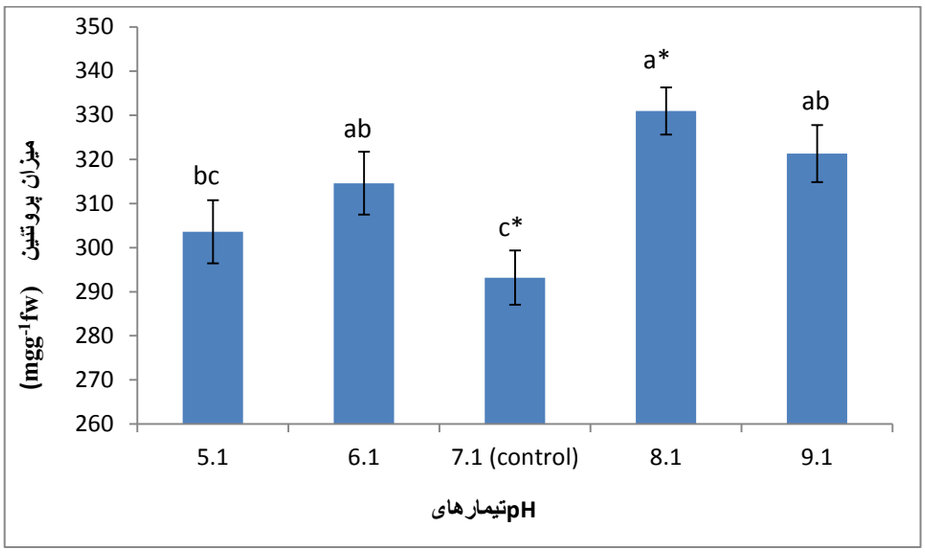


نمودار ۴: میزان کلروفیل a در تیمارهای pH

تغییرات در صد چربی در نمونه اسپیرولینا تحت pH های مختلف در نمودار ۵ مشاهده می گردد. در pH قلیائی ۹/۱ در حدود ۱۰/۹٪ چربی توسط سیانوباکتری تولید شده است که در مقایسه با میزان چربی تولید شده در سایر تیمارها بیشترین در صد چربی می باشد. نتایج بدست آمده از اندازه گیری پروتئین های محلول در اسپیرولینا نشان می‌دهد که در محیط با اسیدیته خنثی در مقایسه با سایر تیمارها، تولید پروتئین به طور معنی داری کاهش یافته و به $mg\ g^{-1}$ Fw ۲۹۵ رسیده است. در حالیکه در pH قلیائی(۹/۱) میزان پروتئین به $mg\ g^{-1}$ Fw ۳۲۸ می رسد و افزایش معنی داری در درصد پروتئین مشاهده می شود (نمودار ٦).

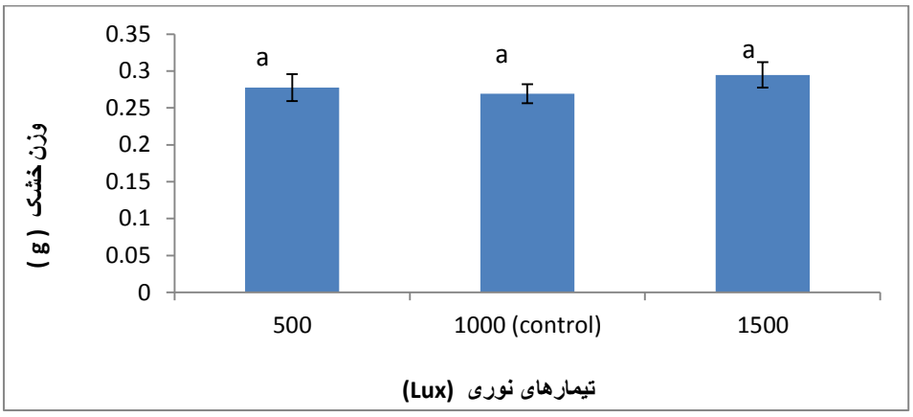


نمودار ۵: تغییرات درصد چربی تیمارهای pH

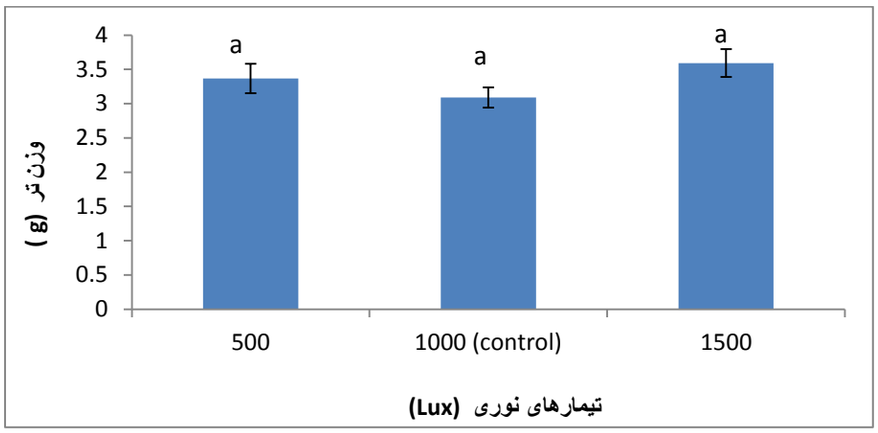


نمودار۶: تغییرات میزان پروتئین در تیمارها pH

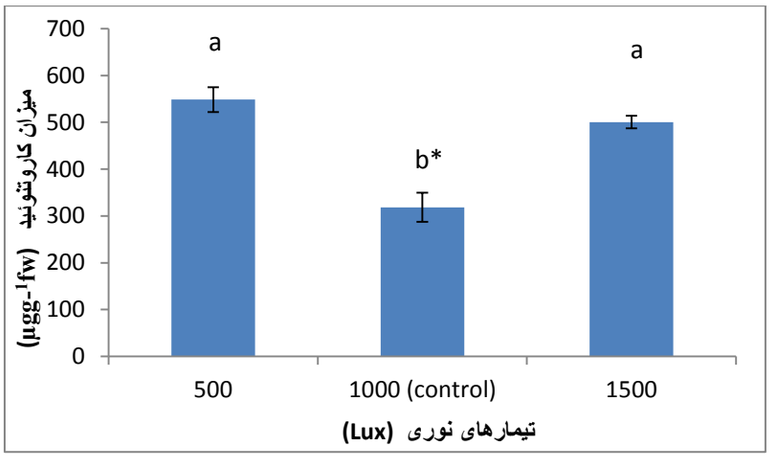
نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که تغییر شدت نور در حد Lux ۵۰۰ تاثیری بر میزان وزن تر و وزن خشک *Spirulina platensis* ندارد (نمودارهای ۷ و ۸). همچنین میزان کلروفیل a نیز در تیمارهای نوری Lux ۵۰۰ و Lux ۱۵۰۰ در مقایسه با نمونه شاهد اختلاف معنی داری ندارد (نمودار ۱۰). اما میزان کاروتنوئیدها در شدت های نوری بررسی شده نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی دار داشته است (نمودار ۹).



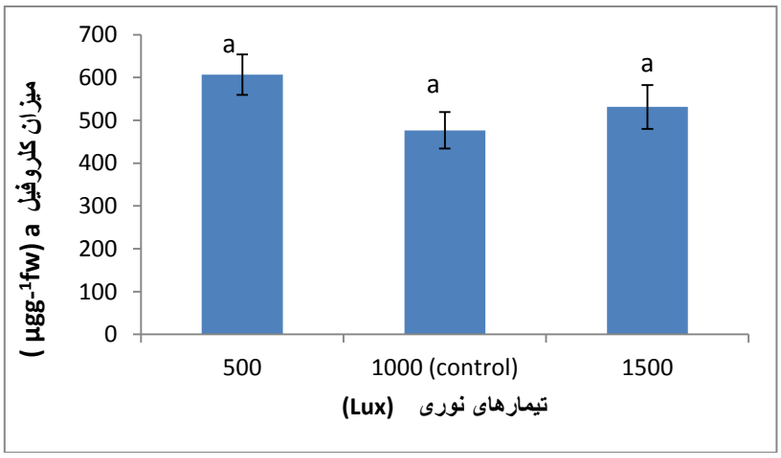
نمودار ۷ : رابطه بین میزان وزن خشک *S. platensis* و تیمارهای نوری



نمودار ۸: رابطه بین میزان وزن تر *S. platensis* و تیمارهای نوری

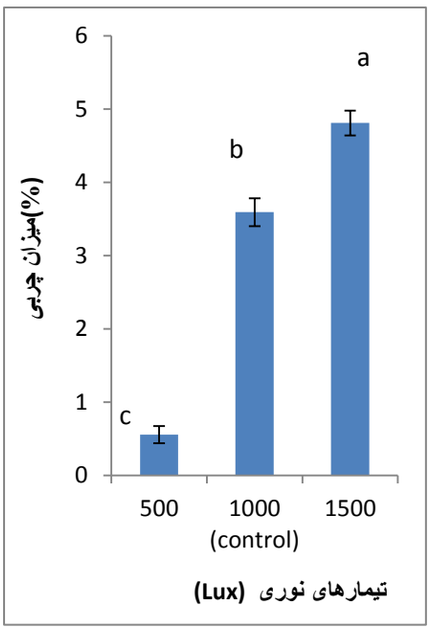


نمودار ۹ : میزان کاروتنوئید در تیمارهای نوری

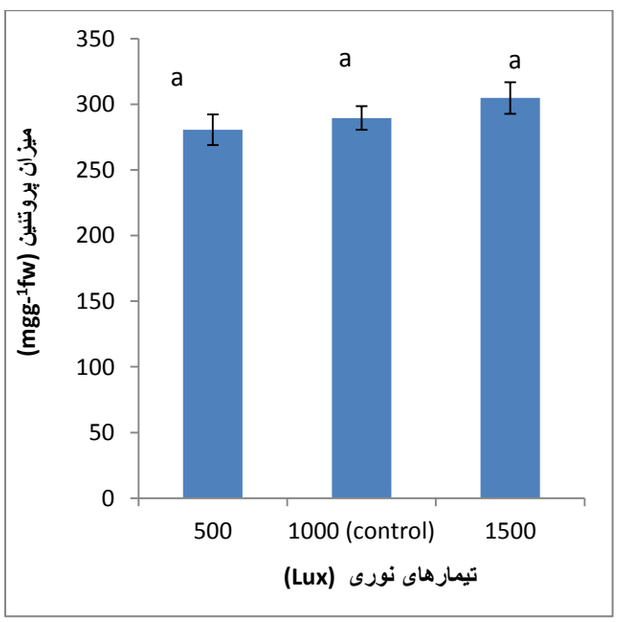


نمودار ۱۰: میزان کلروفیل a در تیمارهای نوری

افزایش شدت نور از ۵۰۰ Lux تا ۱۵۰۰ Lux سبب افزایش معنی دار در صد چربی در سیانوباکتری اسپیرولینا می گردد هرچند که تغییرات شدت روشنایی در گستره مورد بررسی تاثیر معنی داری در میزان تولید پروتئین‌ها در این سیانوباکتری نداشته است (نمودار ۱۱).



نمودار ۱۱: درصد چربی تیمارهای نوری



نمودار ۱۲: میزان پروتئین درتیمارهای نوری

بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد در pH خنثی حدود ۷/۱، وزن خشک اسپیرولینا به بیشترین مقدار می رسد و در pH های قلیایی و اسیدی میزان وزن خشک بطور معنی داری کاهش می یابد. بر اساس مطالعات Jain و Singh در سال ۲۰۱۲ ، ماکزیمم میزان تولید بیومس در *Spirulina platensis* در pH قلیایی بوده و pH ۹/۵ مناسب ترین pH می باشد. بر اساس مطالعات Pandy و Tiwari در ۲۰۱۰ نیز مشاهده گردیده که pH بهینه برای ماکزیمم رشد *Spirulina maxima* بین گستره ۹/۵-۹ می باشد و *S.maxima* به عنوان یک ارگانیسم قلیادوست در طبیعت در نظر گرفته می شود. در نتایج بدست آمده از این تحقیق مشاهده می شود میزان وزن خشک *S.platensis* ایران در pH خنثی بیشترین مقدار می باشد اما میزان کلروفیل و ترکیبات بیوشیمیایی در pH قلیایی بالاتر است. در بررسی صورت گرفته در خصوص اندازه گیری وزن تر اسپیرولینا مشاهده گردید بدلیل جذب آب توسط سلول ها تقریبا بین کلیه تیمارهای pH اعمال شده، میانگین وزن تر یکسان می باشد (نمودار۲). در بررسی‌های صورت گرفته در روی رنگدانه های فتوسنتزی مشاهده گردید که در pH های قلیایی ۸/۱ و ۹/۱ میزان کلروفیل a و کاروتنوئیدها در مقایسه با سایر تیمارها افزایش معنی داری یافته که با نتایج Jain و Singh در سال ۲۰۱۲ همخوانی دارد. در pH اسیدی۵/۱ نیز میزان کلروفیلa تا حدی افزایش یافته که احتمالا بدلیل افزایش فعالیت مکانیسم‌های سازشی در مقابل تنش اسیدیته بالا می باشد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در pHهای بین گستره ۹/۱-۵/۱ درصد چربی دارای تغییرات تناوبی است اما در pH حدود ۹/۱ به بیشترین حد خود می رسد. در *Spirulina platensis* محتوای لیپید ۱۰/۹۵٪ وزن خشک سیانوباکتری می باشد. محتوای چربی زیتوده سیانوباکتری به میزان بسیار زیادی وابسته به شرایط رشد می باشد (Ehimen et al., 2009). شرایط کشت اسپیرولینا از جمله شدت نور مناسب، دما و pH بر محتوای روغن سیانوباکتری اثر گذاشته و در نتیجه بهینه سازی کشت *Spirulina platensis* برای استفاده از آن به عنوان سوخت زیستی مفید است (Sommerfeld et al., 2008). نتایج بدست آمده در خصوص افزایش میزان پروتئین در pH های غیر خنثی بخصوص قلیایی با نتایج مطالعات Pandy و Tiwari در سال ۲۰۱۰ همخوانی دارد. نتایج حاصل از بررسی سه شدت نوریLux ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ نشان داد که سیانوباکتری *Spirulina platensis* در هر سه شدت نور دارای رشد، رنگدانه فتوسنتزی و پروتئین تقریبا یکسانی است اما

درصد چربی در این سیانوباکتری با افـزایش شدت نور رابطه مستقیم داشته است بطوری که هر چه شدت نـور بیشـتر گردیـده میـزان درصد چربی به صورت معنی داری افـزایش یافته است. کیفیت و شـدت نـور بـا تـاثیر در فتوسنتز بر سنتز ترکیبات مختلـف اثـر گـذار است. شدت نور اعمال شده در این تحقیق در گستره شدت نور کـم تـا میانـه اسـت کـه در ابتدای رشد اسپیرولینا برای تولیـد ترکیبـات مفید فتوسنتزی مناسب می‌باشد.

منابع

Belay, A., (2002) The potential application of *Spirulina* (*Arthrospora*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. Jana 5: 27-48.

Bradford, M.M., (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. 72: 248-254.

Ehimen, E. A. , Sun, Z. F. and Carrington, C. G., (2010) Variables Affecting the *in Situ* Transesterification of Microalgae Lipids, El-Sevier Fuel 89(3): 677- 684.

Henrikson R. (1989). Earth food *Spirulina*. California, Ronore Enterprises Inc. 180p.

Hirahashi, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Saeki, Y., Ui, M., Seya, T., (2002) Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. Int. Immunopharmacol. 2(4): 423-434.

Hu Q., (2004) Industrial production of microalgal cell mass and secondary products Ð major industrial species: *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: Richmond A. ed. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd.; Oxford, pp. 264-272.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis E., Ghiradi, M., Posewitz, M., Siebert, M. and Darzins, A., (2008) Microalgal Triacy- glycerols as Feedstock for Biofuel Production: Perspectives and Advances, Plant J. 54 (4): 621-639.

Jain, Sh., Singh, S.G., (2012). Optimization of biomass yield of *Spirulina platensis* grown in petha (Benincasa hispida Thunb.) waste in different culture conditions. I. J. B. T. 11: 498-501.

Juarez-Oropeza, MA., Mascher, D., Torres-Duran, PV., Farias, JM., Paredes-Carbajal, MC., (2009) Effects of *Spirulina* on vascular reactivity. J Med Food 12(1): 15-20.

Lichtenthaler, HK., (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. Methods Enzymol 148: 350–382.

Mittal, A., Suresh, K.P., Banerjee, S., Rao, A. R., Kumar, A., (1999) Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolizing enzymes in swiss albino mice. Phytother. Res. 13: 111-114.

Pandey, J.P., Tiwari, A., (2010). Optimization of biomass production of *Spirulina maxima*. J Algal Biomass Utln, 1(2): 20-32.

Qureshi, M.A., Garlich, J.D., Kidd, M.T., (1996) Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. Immunophar. Immunotox. 18(3):465-476.

Qureshi, M.A., Kidd, M. T., Ali, R. A., (1995) *Spirulina platensis* extract enhances chicken macrophage functions after *in vitro* exposure. J. Nutritional. Immunol. 3(4):35-45.

Reddya, C.M., Bhatb, V.B., Kiranmaia, G., Reddya, M.N. (2000) Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by C-Phycocyanin, a Biliprotein from *Spirulina platensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun 277: 599-603.

Richmond A., (1990), Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, FL. 3240-0.

Rippka, R., (1988) Isolation and purification of cyanobacteria, Methods Enzymol, 167: 3-27.

Ruiz Flores, L.E., Madrigal-Bujaidar, E., Salazar, M., Chamorro, G., (2003) Anticlastogenic effect of *Spirulina maxima* extract on the micronuclei induced by maleic hydrazide in Tradescantia. Life. Sci. 72(12): 1345-1351.

Sharma M.K., Patni, R., Kumar, M., Kumar, A., (2005) Modification of mercury-induced biochemical alterations in blood of Swiss albino mice by *Spirulina fusiformis*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 20 (2): 289-296.

Sharma, M.K., Sharma, A., Kumar, A., Kumar, M., (2007) *Spirulina fusiformis* provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in Swiss albino mice. Food. Chem. Toxicol. 45(12): 2412-2419.

Shastri, D., (1999) Modulation of heavy metal induced toxicity in the testes of Swiss albino mice by certain plant extracts. Ph.D.Thesis. University of Rajasthan, Jaipur, India.

Upasani, C.D., Balaraman, R., (2003) Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. Phytother. Res. 17: 330-334.

Verma, S., (2000) Chemical modification of radiation response in Swiss albino mice. Ph.D. Thesis. University of Rajasthan, Jaipur, India.