



Chlorophyll and Carotenoid Optimization of Spirulina Biomass by Innovative Photobioreactor

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ghobadian S.¹ PhD,
Ganjidoust H.*¹ PhD,
Ayati B.¹ PhD,
Soltani N.² PhD

How to cite this article

Ghobadian S, Ganjidoust H, Ayati B, Soltani N. Chlorophyll and Carotenoid Optimization of Spirulina Biomass by Innovative Photobioreactor. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):483-494.

¹Environmental Engineering Department, Civil & Environmental Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Petroleum Microbiology Department, Research Institute of Applied Science, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Environmental Engineering Department, Civil & Environmental Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jaleh-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883332
Fax: -
h-ganji@modares.ac.ir

Article History

Received: October 29, 2017

Accepted: March 11, 2018

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims Pigments such as Chlorophyll and Carotenoid are of particular interest due to their antioxidant and therapeutic properties. Spirulina is a great source to commercial pigments production due high pigment percentage and simple extraction processes. The aim of this study was chlorophyll and carotenoid optimization of spirulina biomass by innovative photobioreactor.

Materials & Methods In this experimental study, by designing and constructing an innovative photobioreactor for the elimination of some defects of commercial open cultures, spirulina combined culture was investigated. Using RSM-CCD method, the effect of circulation cycle factors, control volume, and irradiance intensity on total value of pigments were evaluated. The data were analyzed by SPSS 16, using linear regression.

Findings The highest amount of total Chlorophyll (3.63mg/l) was obtained in Test No. 7 with the shortest circulation cycle (2hr) and control volume of 30%. In this situation, total carotenoid was 0.90mg/l and the whole amount of two pigments was maximum. But, the highest amount of total carotenoid (1.59mg/l) was obtained in the least control volume (20%), circulation cycle of 9.5hr, and light intensity of 10500Lux.

Conclusion In order to attain the highest level of chlorophyll, the optimal irradiance intensity to increase the biomass and the short-range circulation cycle to increase content are the top priority.

But, to attain the maximum level of carotenoid, long-range circulation cycle to increase biomass and irradiance intensity at high level to increase content is predominate. The importance of the effect of increasing irradiance intensity on the increase of carotenoid content as well as the reduction of the circulation cycle on the increase of chlorophyll content is greater than its negative effect on the dry weight of biomass and results in an increase in the pigmentation.

Keywords Spirulina; Specific Growth Rate; Biomass; Combined Culture; Innovative; RSM-CCD

CITATION LINKS

[1] Enhancing microalgal photosynthesis and productivity ... [2] Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production ... [3] Use of Spirulina biomass produced from ... [4] Microalgal biotechnology for greenhouse gas control ... [5] Detection in situ of carotenoid in microalgae ... [6] Earth food Spirulina: How this remarkable ... [7] Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae ... [8] Microalgae as sources of pharmaceuticals ... [9] Effect of reducing the light intensity on ... [10] Role of chlorophyll in Spirulina on photocatalytic ... [11] Carotenoids in nature: Insights from plants ... [12] Carotenoids: chemistry, sources and physiology ... [13] Analysis of Anabaena vaginicola and ... [14] Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: Structural ... [15] Carotenoids and other pigments as ... [16] An investigation of effect of replacing nitrate by ... [17] Repeated fed-batch cultivation of Arthrospira ... [18] Reflector based chlorophyll production by Spirulina ... [19] Modeling on chlorophyll a and ... [20] Evaluation of the effects of aeration ... [21] Algal culturing ... [22] Photobioreactors: Design and performance ... [23] Biodiesel from ... [24] The innovative engineered photobioreactor ... [25] Improvement of the growth of Arthrospira ... [26] Photobiology of microalgae mass cultures ... [27] Encyclopedia of bioprocess ... [28] Experimental and numerical investigations ... [29] The use of acetone and ... [30] Molecular and biochemical ... [31] Response-surface ... [32] Effects of chemical ... [33] Photooxidative stress in ... [34] Fed-batch cultivation of Arthrospira ... [35] Effect of macro-and micro-nutrient ... [36] Nitrogen stress induced changes ... [37] Effect of various stress-regulatory ... [38] On the factors which determine massive ... [39] The effect of temperature and irradiance ... [40] Prerequisite for industrial microalga ... [41] Photosynthesis in ... [42] Nature and distribution of ... [43] Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid ... [44] Chlorophyll production from ... [45] The physiology of erythromycin ... [46] New mode of Dunaliella biotechnology ...

بهینه‌سازی مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید بیومس اسپیرولینا با بهره‌گیری از فتوبیوراکتوری نوین

ساسان قبادیان PhD

گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حسین گنجی‌دوست PhD*

گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بیبا آیتی PhD

گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

ندا سلطانی PhD

گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و کاروتنوئید به‌سبب خواص درمانی و آنتی‌اکسیدانی مورد توجه ویژه هستند. گونه ریزجلیکی اسپیرولینا به‌سبب درصد بالای رنگدانه، منبع مهمی برای تولید تجاری این رنگدانه‌ها است. هدف این پژوهش بهینه‌سازی مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید بیومس اسپیرولینا با بهره‌گیری از فتوبیوراکتوری نوین بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، با طراحی و ساخت یک فتوبیوراکتور نوین برای رفع برخی نواقص کشت‌های باز تجاری، به کشت تلفیقی ریزجلیک اسپیرولینا پرداخته و با روش RSM-CCD، تاثیر فاکتورهای سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی، شدت تابش بر محتوی و میزان کل رنگدانه‌ها، بررسی و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 از طریق آنموں رگرسیون خطی تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین کلروفیل کل (۳/۶۳ میلی‌گرم بر لیتر) در آزمایش شماره ۷ با کمترین سیکل اختلاط (۲ ساعت) و حجم کنترلی ۳۰٪ ایجاد شد. در این شرایط میزان کاروتنوئید کل ۰/۹۰ میلی‌گرم بر لیتر و مجموع دو رنگدانه در بیشترین حد قرار داشت، اما بیشترین کاروتنوئید کل (۱/۵۹ میلی‌گرم بر لیتر) در کمترین حجم کنترلی (۲۰٪)، سیکل اختلاط ۹/۵ ساعته و شدت تابش ۱۰۵۰۰ لوکس ایجاد شد.

نتیجه‌گیری: برای دستیابی به بیشترین میزان کلروفیل، شدت بهینه تابش برای افزایش بیومس و سیکل اختلاط کوتاه برای افزایش محتوی در اولویت هستند. اما برای دستیابی به بیشترین میزان کاروتنوئید، سیکل اختلاط طولانی برای افزایش بیومس و شدت تابش بالا برای افزایش محتوی غالب است. اهمیت اثر افزایش شدت تابش بر افزایش محتوای کاروتنوئید و نیز کاهش سیکل اختلاط بر افزایش محتوای کلروفیل، بیش از تاثیر منفی آنها بر میزان وزن خشک بیومس است و دربرآیند منجر به افزایش رنگدانه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: اسپیرولینا، نرخ رشد، بیومس، کشت تلفیقی، بیوراکتور نوین، RSM-CCD

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

*نویسنده مسئول: h-ganji@modares.ac.ir

مقدمه

فتوسنتز مرسوم‌ترین فرآیند ذخیره انرژی و پشتیبان حیات روی زمین است. ریزجلیک‌ها اجزای ارزشمند و وافر سیستم‌های آبی هستند که به‌طور موثر و با بهره‌وری‌های فتوسنتزیک متفاوت در محصولات فتوسنتزی مشارکت می‌کنند و این بهره‌وری به سیستم‌های کشت، نوع گونه، شدت تابش و غیره وابسته است [1]. بین آنها اسپیرولینا یک گونه جذاب تجاری به‌عنوان منبعی برای مواد مغذی، بیومس و رنگدانه‌ها است [2]. در کنار نقش زیست‌محیطی و کاربری‌های موفق، اسپیرولینا در تصفیه پساب [3] و تثبیت CO₂ [4] نیز منبع مهمی برای تولید تجاری رنگدانه‌ها (عمدتاً بتاکاروتن به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A) است [5]. این رنگدانه‌ها شامل کلروفیل، کاروتنوئید و فیکوسیانین [6] به‌سبب

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

کاربری بالا و فرآیند آسان استخراج، مورد توجه ویژه هستند و استفاده از آنها به‌عنوان عامل رنگ‌زا در صنایع دارویی، آرایشی، تزئینی و غذایی در کنار خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدجوش گزارش شده است [7]. هر چند در حال حاضر اغلب رنگدانه‌های تجاری از منابع مصنوعی یا مواد گیاهی استخراج می‌شوند، اما جایگزینی آنها با منابع سیانوباکتری و خصوصاً اسپیرولینا رو به افزایش است [8] و همین امر به‌عنوان محصولات جانبی می‌تواند نقش مثبتی در افزایش بهره‌وری و صرفه اقتصادی فرآیندهای تصفیه فاضلاب و تثبیت CO₂ به‌کمک اسپیرولینا داشته باشد.

کلروفیل a به‌سبب خواص پایدار به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک رنگ‌زا استفاده می‌شود. این ماده به‌طور معمول از گیاهان به دست می‌آید که منجر به تشکیل انواع دیگر آن می‌شود و لذا نیازمند فرآیندهای استخراج و جداسازی مناسب است [9]. اما برخلاف گیاهان، گونه اسپیرولینا فقط شامل کلروفیل a است و یکی از بیشترین محتوای کلروفیل در طبیعت را دارد [6]. علاوه بر خواص رنگ‌زایی، استفاده از کلروفیل اسپیرولینا برای افزایش فعالیت‌های فتوکاتالیست و نیز استفاده از اسپیرولینای اصلاح‌شده با دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂) برای کاهش فتوکاتالیست CO₂ گزارش شده است [10].

کاروتنوئید نیز یک رنگدانه ایزوپرنوئید طبیعی است که در غشاهای سایر محل‌های آب‌گریز در بافت‌های فتوسنتزیک گیاهان، جلبک‌ها و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود و دارای عملکرد آنتی‌اکسیدانی و نیز حفاظتی از بافت‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از نور و اکسیژن است [11]. بدن انسان قادر به تولید کاروتنوئیدها نیست و لازم است از منابع رژیم غذایی تامین شود [12]. افزایش آگاهی نسبت به خواص درمانی کاروتنوئید، تمایل به تولید محصولات غذایی و دارویی حاوی آن را افزایش می‌دهد و در کنار افزایش تقاضای سالیانه برای آن، تولید شیمیایی آن رو به افزایش است، اما تولید طبیعی آن در بازار سلامت ترجیح بیشتری دارد [13]. مطالعات بیانگر آن بوده است که سیانوباکتری‌ها دارای پتانسیل استفاده به‌عنوان منبع تولید بزرگ‌مقیاس کاروتنوئید هستند [14]. خواص رنگدانه‌ای و تثبیت‌گر انواع مختلف کاروتنوئید [15] نیز در بسیاری از صنایع مورد استفاده است. به‌طور مثال آستانزانتین به‌عنوان رنگدانه محیط‌های کشت آبی به‌ویژه سالمون استفاده می‌شود.

تاثیر فاکتورهای متعدد بر میزان رنگدانه‌های اسپیرولینا مورد بررسی قرار گرفته است که می‌توان به ترکیب محیط کشت و به‌ویژه منبع نیتروژن [16]، نحوه و زمان‌بندی تغذیه [17]، شدت نور [18] و حتی نوع منبع نوری (طول موج و رنگ) [19] اشاره کرد. اما برای تولید رنگدانه‌ها دو شاخص محتوای آن در بیومس و میزان بیومس استحصالی دارای اهمیت است. در واقع برای دستیابی به بیشترین میزان رنگدانه حاصل از کشت لازم است هم مقدار بیومس کل استحصالی (میلی‌گرم بر لیتر) و هم محتوای رنگدانه در بیومس (میلی‌گرم بر گرم) بیشینه شود. مثلاً در شرایط نوری محدود، محتوای کلروفیل زیاد می‌شود و برخلاف آن، میزان بیومس در شدت‌های تابش بالا افزایش می‌یابد و این امر فرآیندهای کشت دومرحله‌ای را ایجاب می‌کند [9].

نتایج پژوهش روی تاثیر فاکتورهای سیکل هوادهی، رقت محیط کشت [20] و نیز بر فاکتورهای سیکل و شدت تابش، به امکان بهره‌برداری از اندرکنش این فاکتورها در کشت‌های مرحله‌ای اسپیرولینا منتج شده است. با توجه به کاربری‌های اشاره‌شده، تلاش‌های افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه‌های کشت در این پژوهش با طراحی یک فتوبیوراکتور نوآورانه برای غلبه بر برخی

۴۵۰۰ لوکس و سیکل روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت منظور شد. جریان از برکه به ناحیه کنترلی و بالعکس از طریق شیر برقی انتهایی برکه و با فرمان تایمر دیجیتال طبق برنامه تنظیمی صورت گرفت. عدم امکان کنترل بر شرایط رشد در کنار حمله گونه‌های مهاجم، احتمال آلودگی^[22] و تغییر شرایط دمایی منجر به بهره‌وری پایین کشت‌های باز در مقابل فتوبیوراکتورها^[23] می‌شود که ناحیه کنترلی به‌منظور کاهش این مشکل طراحی شد تا با نگاهی اقتصادی، صرفاً در حجم کوچکی از کل برکه، امکان کنترل و تنظیم فاکتورهای مختلفی نظیر شدت و سیکل تابش، هوادهی^[24]، دما، pH و نظایر آن فراهم شود و بهره‌وری کل فرایند از طریق همین میزان کنترل بر شرایط ارتقا یابد. اما برای ارتباط برکه باز و مخزن کنترلی، استفاده از سیستم‌های پمپاژ پریستالتیک و نیز مستغرق در آزمایش‌های مقدماتی به آسیب سلول‌ها منجر شد. هر چند همین آسیب در مطالعات انجام‌شده بر تاثیر سیستم اختلاط روی سلول‌های اسپیرولینا گزارش و عدم استفاده از هم‌زدن پیشنهاد شده^[25]، اما به دلایل تامین سیکل بهینه تاریکی-روشنایی^[23]، جلوگیری از بازدارندگی نوری^[26] و ممانعت از رسوب جلبک‌ها^[27]، اختلاط مناسب لازم است. لذا طراحی سیستم آسانسوری جایگزین پمپاژ در ناحیه کنترلی صورت گرفت تا بدون برخورد مستقیم با سلول‌ها و صرفاً به‌واسطه تغییر هد ناحیه کنترلی نسبت به مخزن، جریان از یکی به دیگری میسر شود. همین مشکل اختلاط به‌ویژه در نواحی غیرخمیده برکه‌های باز^[28] در کنار عدم نفوذ نور مناسب به عمق برکه به‌ویژه در اثر افزایش بیومس و ممانعت آن از نفوذ نور، باعث طراحی بافل‌ها و سیستم هوادهی از کف شد تا با ایجاد جریان مارپیچی از بازشوها و سرریز جریان از روی بافل‌ها و نیز به‌کمک حباب‌های هوای ورودی از کف بافل‌ها، اختلاط عمودی کارآتر و دریافت نور بهتری صورت گیرد (شکل ۱).

مشکلات مرسوم در کشت‌های باز ریزجلبکی به‌منظور افزایش بهره‌وری بیومس، به کشت تلفیقی گونه ریزجلبکی اسپیرولینا پرداخته و شاخص‌های محتوای کلروفیل (Chl.C)، محتوای کاروتنوئید (Car.C)، کلروفیل کل (T.Chl) و کاروتنوئید کل (T.Car) برای بهینه‌سازی انتخاب شدند. بنا بر مطالب ذکرشده، پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید بیومس اسپیرولینا با بهره‌گیری از فتوبیوراکتوری نوین انجام شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، نمونه‌های ریزجلبک اسپیرولینا از سواحل خلیج فارس جمع‌آوری و با روش پلیت آگار جداسازی شدند و پس از کشت جداگانه کلنی‌های خالص^[21] به محیط مایع انتقال یافت. ذخیره جلبکی در فتوبیوراکتوری استوانه‌ای با حجم تقریبی ۵۰ لیتر و در شرایط کنترل‌شده دمایی، هوادهی و تابش به‌صورت استریل نگهداری شد. برای هر تیمار، ۲ لیتر از ذخیره مذکور با وزن خشک تنظیم‌شده، تلقیح و ۲ لیتر محیط کشت زاروک جایگزین آن شد تا علاوه بر غلظت، شرایط سنی کلیه جلبک‌های تلقیحی نیز در همه تیمارها یکسان باشد. کلیه تیمارها (۲۰ تیمار) در راکتور طراحی‌شده تحت کشت قرار گرفتند و شرایط ثابت و مشترک آنها شامل دمای اتاق ($26 \pm 2^\circ\text{C}$)، رقت محیط کشت زاروک (۸۰٪)، شدت تابش (۴۵۰۰ لوکس) و سیکل روشنایی به تاریکی (۱۲:۱۲ ساعت) در برکه باز بود.

شمای کلی پایلوت: طراحی کلی پایلوت این پژوهش به‌صورت ترکیب یک برکه باز با عرض ۰/۲ متر و طول یک‌متر (و عمق مفید ۰/۱۵ متر) با یک ناحیه کنترلی با طول و عرض ۰/۳۵ متر و ارتفاع ۰/۷۰ متر بود. کلیه موارد از شبیه با ضخامت ۰/۸ سانتی‌متر ساخته شد. لامپ‌های کناری برکه با شبیه‌سازی نور روز، شدت تابش



شکل ۱) نمای پایلوت طراحی، جریان‌های عرضی و اختلاط ناشی از بافل‌های مورب و سیستم هوادهی از کف

فاکتورها، چگونگی کنترل و بازه تغییرات: براساس ملاحظات ساختاری پایلوت و ایده اولیه طراحی بر مبنای افزودن ناحیه کنترلی و اثرگذاری آن بر کشت با روش پاسخ سطح- طراحی نقاط مرکزی (RSM-CCD)، تاثیر سه فاکتور سیکل اختلاط (Circ.Cyc.)، حجم ناحیه کنترلی (Con.Vol.) و شدت تابش (Irr.Int.) بررسی شد. این فاکتورها به ترتیب در بازه‌های ۲ تا ۱۲ ساعت، ۱۰ تا ۵۰٪ (از حجم اصلی برکه) و صفر تا ۴۰۰۰ لوکس ارزیابی شدند. تنظیم آنها نیز به همان ترتیب توسط فرمان اتصال برق به موتور بالابر، تغییر هد و ایجاد جریان، مدت بازشدن شیر برقی انتهای برکه باز از طریق تایمر دیجیتال و تنظیم شدت جریان منبع تغذیه متصل به لامپ‌های LED اطراف مخزن انجام شد. مقادیر گذشته و واقعی فاکتورها در طراحی آزمایش با روش

پاسخ سطح با آلفای برابر با ۲ در نرم‌افزار Design Expert 7.0.0 صورت گرفت (جدول ۱). به‌طور مثال در آزمایش شماره ۱، مقادیر فاکتورهای سیکل اختلاط، حجم کنترلی و شدت تابش به ترتیب معادل ۹/۵ ساعت، ۴۰٪ و ۱۰۰۰ لوکس بود. در این تیمار با شروع آزمایش، ۴۰٪ حجم برکه باز وارد ناحیه کنترلی شد و تحت تابش ۱۰۰۰ لوکس قرار گرفت و باقی در برکه تحت تابش ۴۵۰۰ لوکس و سیکل روشنایی به تاریکی ۱۲/۱۲ ساعت قرار داشت. پس از ۹/۵ ساعت با بالارفتن آسانسور، ناحیه کنترلی به‌طور کامل در برکه تخلیه شد و پس از فرصت ۱۵ دقیقه‌ای اختلاط، مجدداً آسانسور پایین آمد و ۴۰٪ حجم برکه وارد ناحیه کنترلی شد. همین روند تا پایان روز هفتم کشت هر ۹/۵ ساعت مجدداً تکرار شد.

جدول ۱) مقادیر فاکتورهای سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش و مقادیر واقعی و پیش‌بینی پاسخ‌ها در هر آزمایش در گونه اسپیرولینا

شماره آزمایش	سیکل اختلاط (ساعت)		حجم ناحیه کنترلی (درصد)		شدت تابش (لوکس)		کلروفیل کل (میلی‌گرم بر لیتر)		کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم)		کاروتنوئید کل (میلی‌گرم بر لیتر)		کلروفیل بر	
	کد واقعی	کد	کد واقعی	کد	کد واقعی	کد	A	P	A	P	A	P	A	P
۱	۹/۵	۱	۴۰	۱	۱۰۰۰	۱	۱/۸۶۳	۱/۷۷۰	۱/۵۶۰	۱/۳۵۱	۱/۳۴۷	۱/۱۴۵	۱/۱۹۴	۰/۷۰۷
۲	۹/۵	۱	۴۰	۱	۳۵۰۰	-۱	۳/۷۸۶	۳/۴۹۹	۱/۸۰۶	۱/۶۰۶	۲/۴۴۴	۲/۲۳۳	۲/۱۰۹۷	۲/۱۲۵
۳	۹/۵	۱	۴۰	۱	۳۵۰۰	-۱	۴/۳۶۹	۴/۱۲۷	۱/۳۰۸	۱/۲۸۰	۲/۳۷۰	۲/۱۰۲	۳/۳۴۱	۳/۸۴۵
۴	۷	۰	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۳/۷۲۴	۳/۸۵۳	۱/۱۴۰	۱/۴۰۹	۲/۲۸۶	۲/۴۸۲	۳/۲۶	۲/۷۳۰
۵	۷	۰	۵۰	۲	۷۰۰۰	۰	۲/۴۸۳	۲/۵۱۳	۱/۲۵۱	۱/۲۵۰	۱/۷۲۴	۲/۱۰۸	۱/۹۸۶	۱/۷۰۶
۶	۷	۰	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۲/۵۲۲	۳/۸۵۳	۱/۴۰۹	۱/۳۷۱	۲/۴۸۲	۲/۱۰۸	۱/۸۴۰	۲/۷۳۰
۷	-۲	-۲	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۶/۳۳۲	۵/۹۹۵	۱/۵۶۷	۱/۷۳۶	۳/۶۲۷	۳/۳۹۰	۴/۱۰۴	۳/۷۹۴
۸	۷	۰	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۳/۲۱۵	۳/۸۵۳	۱/۴۰۹	۱/۲۹۶	۲/۴۸۲	۲/۱۰۸	۲/۴۸۱	۲/۷۳۰
۹	۱۲	۲	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۱/۷۰۵	۱/۷۱۰	۱/۵۶۰	۱/۰۸۲	۱/۵۶۰	۱/۵۷۳	۱/۸۱۰	۱/۶۶۶
۱۰	۷	۰	۳۰	۰	۱۴۰۰۰	۲	۲/۷۱۱	۲/۵۹۱	۲/۴۷۲	۲/۴۸۰	۱/۳۱۴	۱/۲۳۵	۱/۰۹۷	۱/۶۰۱
۱۱	۹/۵	۱	۲۰	-۱	۳۵۰۰	-۱	۴/۵۱۲	۳/۷۹۳	۱/۱۸۳	۱/۰۳۲	۲/۴۶۴	۲/۳۷۶	۳/۸۱۲	۳/۲۸۳
۱۲	۷	۰	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۴/۱۰۳	۳/۸۵۳	۱/۴۰۹	۱/۳۱۲	۲/۴۸۲	۲/۱۰۸	۳/۱۲۷	۲/۷۳۰
۱۳	۷	۰	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۳/۹۷۶	۳/۸۵۳	۱/۵۰۶	۱/۴۰۹	۲/۷۱۰	۲/۴۸۲	۲/۶۴۱	۲/۷۳۰
۱۴	۷	۰	۳۰	۰	۰	-۲	۴/۷۷۳	۵/۱۱۴	۱/۲۶۷	۱/۵۲۶	۱/۳۴۷	۱/۵۹۴	۳/۷۶۷	۳/۸۵۹
۱۵	۹/۵	۱	۲۰	-۱	۱۰۰۰۰	۱	۱/۸۴۳	۱/۴۳۶	۱/۹۱۴	۱/۴۴۵	۱/۵۱۸	۱/۵۱۸	۰/۹۰۷	۰/۹۵۶
۱۶	۷	۰	۱۰	-۲	۷۰۰۰	۰	۴/۳۷۳	۵/۱۹۲	۱/۲۳۶	۱/۵۶۷	۲/۷۵۰	۲/۸۵۵	۳/۵۳۷	۳/۷۵۴
۱۷	۴/۵	-۱	۲۰	-۱	۱۰۰۰۰	۱	۶/۸۰۰	۶/۳۴۸	۱/۷۱۵	۲/۲۴۱	۳/۱۵۱	۳/۱۰۵	۳/۹۶۵	۴/۸۰۴
۱۸	۴/۵	-۱	۴۰	۱	۱۰۰۰۰	۱	۳/۱۰۴	۳/۳۳۴	۱/۴۴۴	۱/۶۷۷	۲/۵۶۶	۲/۷۳۲	۲/۱۰۵	۲/۱۹۵
۱۹	۴/۵	-۱	۲۰	-۱	۳۵۰۰	-۱	۶/۸۴۴	۶/۵۱۳	۱/۳۵۹	۱/۷۶۶	۲/۶۰۲	۲/۶۰۷	۳/۸۷۶	۳/۹۲۴
۲۰	۷	۰	۳۰	۰	۷۰۰۰	۰	۴/۰۷۴	۳/۸۵۳	۱/۴۰۹	۱/۶۶۹	۲/۷۲۱	۲/۴۸۲	۲/۴۴۱	۲/۷۳۰

A نشان‌دهنده مقدار واقعی و P نشان‌دهنده مقدار پیش‌بینی است.

اسپکتروفتومتر WPA-S2000 (Biochrom-ltd؛ انگلستان)، سنجش و اندازه‌گیری کلروفیل با استفاده از شوک متانول [29] و سنجش کاروتنوئید به کمک حلال استون [30] انجام شد. در کلیه برازش‌ها تلاش برای کاهش مرتبه مهم و حذف ضرایب کم‌تاثیر براساس مقایسه مقادیر سطح معنی‌داری انجام شد. فرم کلی مدل رگرسیون خطی برازش‌شده به کلیه نتایج به‌صورت رابطه زیر بود:

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j$$

Y: پاسخ مورد بررسی (محتوی و میزان کل کلروفیل یا کاروتنوئید)

b₀: جمله مستقل بیانگر میانگین نتایج آزمایش‌ها

b_i: نماینده ضرایب خطی و بیانگر تاثیرگذاری هر یک از پارامترها

b_{ij}: ضرایب رگرسیون و بیانگر اندرکنش مرتبه اول بین متغیرها

b_{ii}: ضرایب رگرسیون درجه دوم

X_i: فاکتورهای گذشته مورد بررسی هستند. X₁، X₂ و X₃ به ترتیب بیانگر فاکتورهای سیکل اختلاط (C)، حجم ناحیه کنترل

پاسخ‌ها، روش‌های سنجش، تحلیل و آنالیز آماری: در این پژوهش پنج پاسخ مربوط به رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید شامل محتوای کلروفیل، محتوای کاروتنوئید، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (Chl.C/Car.C) بررسی شد. محتوای کلروفیل (کاروتنوئید) برابر میزان کلروفیل به‌ازای بیومس (میلی‌گرم بر گرم) بود. با ضرب این مقدار در میزان غلظت بیومس، مقدار کلروفیل کل (میلی‌گرم بر لیتر) حاصل شد که با ضرب در حجم راکتور، کل کلروفیل قابل استحصال از کشت به دست آمد. لذا علاوه بر بررسی محتوای رنگدانه در بیومس، لازم بود تا تاثیر میزان بیومس و در نتیجه میزان رنگدانه کل نیز منظور شود [9].

قرائت اندازه‌گیری‌های کلیه پاسخ‌ها با سه‌بار تکرار و ارایه میانگین انجام شد. فاکتور شدت تابش با لوکس‌متر TES-1336A (TES Electrical Electronic Crop؛ تایوان) سنجش شد. شروع فاز لگاریتمی رشد براساس پیش‌آزمایش‌ها در روز پنجم بود و بر این اساس نرخ رشد مخصوص از اختلاف وزن خشک روزهای هفتم و پنجم محاسبه شد. وزن خشک به کمک کالیبراسیون با چگالی نوری و توسط قرائت میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر دستگاه

بالا بر بیومس در این روند موثر نیست و با افزایش شدت تابش، کاروتنوئیدها سهم بیشتری از رنگدانه‌های بیومس داشتند و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید نیز کاهش یافت (جدول ۲).

علامت مثبت ضریب b_{12} در محتوای کلروفیل حاکی از آن بود که برای تاثیر مثبت باید فاکتورهای سیکل اختلاط و حجم کنترلی در مقادیر کمینه یا بیشینه خود باشند، اما با لحاظ تاثیر ضرایب b_1 و b_2 ، برای داشتن بیشترین تاثیر مثبت بر محتوای کلروفیل هر دو فاکتور باید در مقادیر کمینه خود باشند. بیشترین تاثیر منفی نیز زمانی بود که سیکل اختلاط در بیشترین مقدار و حجم کنترلی در کمترین مقدار خود بودند. علامت منفی ضریب b_{12} در پاسخ کاروتنوئید کل در کنار تاثیر مستقل هر یک (b_1 و b_2) نشان داد که برای دستیابی به بیشترین اثر مثبت باید حجم کنترلی در بیشترین حد و سیکل اختلاط در کمترین حد خود باشد و این دقیقاً عکس حالتی بود که برای دستیابی به بیشترین بیومس باید بین این دو فاکتور برقرار می‌بود. در شرایط معکوس که بیشترین بیومس حاصل شد، باز هم میزان کاروتنوئید کل، تحت تاثیر این دو فاکتور نزدیک به بیشینه بود. علامت مثبت ضریب b_{12} برای نسبت کلروفیل به کاروتنوئید در کنار تاثیر مستقل هر یک از فاکتورها، شرایطی مشابه با روند تاثیر بر محتوای کلروفیل ایجاد کرد (جدول ۲).

نماینده اندرکنش فاکتورهای سیکل اختلاط و شدت تابش (b_{13}) در پاسخ‌های کلروفیل کل و محتوای کلروفیل منفی بود، یعنی تحت تاثیر اندرکنش این دو فاکتور و با توجه به تاثیر مستقل هر یک (ضرایب b_1 و b_3) بیشترین محتوای و نیز مقدار کل کلروفیل زمانی بود که شدت تابش، زیاد و سیکل اختلاط کم بود و بیشترین تاثیر منفی نیز زمانی بود که هر دو فاکتور در بیشینه مقدار خود بودند. این امر علی‌رغم تاثیر مثبت شدت تابش بر بیومس نشان داد که اثر منفی آن بر محتوای کلروفیل قوی‌تر بود و بر روند تاثیر فاکتور بر کلروفیل کل غالب بود. علامت همین ضریب و ضرایب b_1 و b_3 در نسبت کلروفیل به کاروتنوئید نیز بیانگر تاثیر همواره مثبت این فاکتورها بود و بیشترین اثر مثبت نیز در کمترین شدت تابش و بیشترین سیکل اختلاط ایجاد شد، هر چند در حالت عکس نیز (بیشترین شدت تابش و کمترین سیکل اختلاط) تاثیر مثبتی نزدیک به همان مقدار دیده شد. هر گونه اندرکنش این دو فاکتور موجب برتری کلروفیل به کاروتنوئید است (جدول ۲).

نماینده اندرکنش فاکتورهای حجم کنترلی و شدت تابش (b_{23}) در هر دو پاسخ کاروتنوئید کل و محتوای کاروتنوئید منفی بود و مقدار آن در محتوای کاروتنوئید بیشتر بود. با توجه به تاثیر مستقل هر یک از دو فاکتور، بیشترین تاثیر مثبت زمانی بود که حجم کنترلی در کمترین مقدار و شدت تابش در بیشترین مقدار خود بود و بیشترین تاثیر منفی هم زمانی بود که هر دو فاکتور در کمترین حد خود بودند (جدول ۲).

(V) و شدت تابش (I) بودند که براساس روابط زیر از روی مقادیر واقعی حاصل شدند:

$$X_1 = \frac{C_{Actual} - \bar{C}}{(C_{Hi} - C_{Low})/2}$$

$$X_2 = \frac{V_{Actual} - \bar{V}}{(V_{Hi} - V_{Low})/2}$$

$$X_3 = \frac{I_{Actual} - \bar{I}}{(I_{Hi} - I_{Low})/2}$$

اندیس‌های Low و Hi به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار و اندیس Actual مقدار واقعی فاکتور را نشان می‌دهد [31].

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 از طریق آزمون رگرسیون خطی برای بررسی تاثیر فاکتورهای سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش بر محتوای و میزان محتوای کلروفیل، محتوای کاروتنوئید، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید تحلیل شدند و از نرم‌افزار Excel 2010 برای رسم گراف‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده محتوای کلروفیل، محتوای کاروتنوئید، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید به دست آمد (جدول ۱). ضریب b_1 در تمامی پاسخ‌های کیفی منفی بود و فقط برای کاروتنوئید کل، مقدار مثبت ناچیزی داشت. بیشترین میزان منفی نیز مربوط به محتوای کلروفیل بود. مقادیر مثبت این ضریب در رگرسیون بیومس نشان داد (داده‌ها آورده نشده است) اگر چه افزایش سیکل اختلاط منجر به افزایش بیومس می‌شود، اما به دلیل تاثیر منفی زیاد بر محتوای کلروفیل، منجر به کاهش کلروفیل کل می‌شود. با افزایش سیکل اختلاط، نسبت کلروفیل به کاروتنوئید، کم و در واقع میزان کاروتنوئید در بیومس به میزان کلروفیل نزدیک می‌شود. تاثیر مستقل حجم ناحیه کنترلی (ضریب b_2)، مشابه ضریب b_1 و موید همان روند تاثیر برای این فاکتور بود. با این تفاوت که برای پاسخ کاروتنوئید کل، مقدار مثبت بیشتری داشت که بیانگر تاثیر مثبت این حجم بر میزان کاروتنوئید کل بود (جدول ۲).

علامت منفی ضرایب b_3 و b_{33} در پاسخ‌های کلروفیل کل و محتوای کلروفیل بیانگر ماهیت تاثیر منفی شدت تابش بر آنها بود. در کلروفیل کل با توجه به تاثیر توأم دو ضریب، بیشترین تاثیر منفی در بالاترین شدت‌های تابش روی داد که ناشی از تاثیر منفی همزمان بر محتوای کلروفیل و میزان بیومس (با توجه به همین ضرایب در بیومس روز هفتم و به خاطر اثر بازدارندگی نوری) بود. علامت مثبت ضرایب b_3 و b_{33} در پاسخ کاروتنوئید کل و محتوای کاروتنوئید نشان داد که با افزایش شدت تابش، هم محتوای و هم میزان کل کاروتنوئید زیاد می‌شود و حتی اثر بازدارندگی شدت‌های

جدول ۱) ضرایب رگرسیون پاسخ‌های مختلف بر حسب مقادیر گذشته سه متغیر سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش

محتوای	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{33}	b_{12}	b_{13}	b_{23}	R ²	سطح معنی‌داری
کلروفیل	۳/۸۵۳	-۱/۰۷۱	-۰/۶۷۰	-۰/۶۳۱	-	۰/۸۳۷	-۰/۵۴۸	-	۸۹/۹	۰/۰۰۰۱
کلروفیل کل	۲/۴۸۲	-۰/۴۵۴	-۰/۱۸۷	-۰/۹۰	-۰/۲۶۷	-	-۰/۳۳۹	-	۸۷/۵	۰/۰۰۰۱
کاروتنوئید	۱/۴۰۹	-۰/۱۶۳	-۰/۰۷۹	۰/۲۳۸	۰/۱۴۹	-	-	-۰/۲۰۳	۷۵/۳	۰/۰۰۰۷
کاروتنوئید کل	۰/۹۳۶	۰/۰۰۲	۰/۰۳۶	۰/۲۳۵	-	-۰/۱۵۰	-	-۰/۱۴۲	۷۹/۰	۰/۰۰۰۲
کلروفیل بر کاروتنوئید	۲/۷۳۰	-۰/۵۳۲	-۰/۵۱۲	-۰/۵۶۴	-	۰/۵۹۰	-۰/۸۰۲	-	۸۸/۸۲	۰/۰۰۰۱

میزان سیکل اختلاط در بیشترین حد خود (۱۲ ساعت) بود. آزمایش ۷ با بیشترین میزان کلروفیل کل (۳/۶۳ میلی‌گرم بر لیتر)

مقادیر کلروفیل، کاروتنوئید کل و محتوای آنها: کمترین محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در آزمایش شماره ۹ حاصل شد که در آن

تابش در سیکل‌های اختلاط طولانی (خط‌های توپر) منجر به کاهش محتوای کلروفیل شد، اما در سیکل‌های اختلاط کوتاه اثر چندانی نداشت و در این سیکل‌ها افزایش حجم کنترلی موجب کاهش محتوای کلروفیل شد (نمودار ۲-ب). در سیکل‌های اختلاط کوتاه، تفاوت معنی‌داری بین شدت‌های تابش دیده نشد، اما با افزایش سیکل (خطوط توپر)، تاثیر شدت تابش بر کاهش محتوای کلروفیل مشخص‌تر شد. در سیکل‌های اختلاط طولانی، افزایش حجم کنترلی منجر به اندکی افزایش محتوای کلروفیل شد (خطوط پُر؛ نمودار ۲-ب)، اما در سیکل‌های کوتاه و متوسط، روند برعکس داشت (خط‌چین‌ها؛ نمودار ۲-ب تا ۱ تا ب ۳).

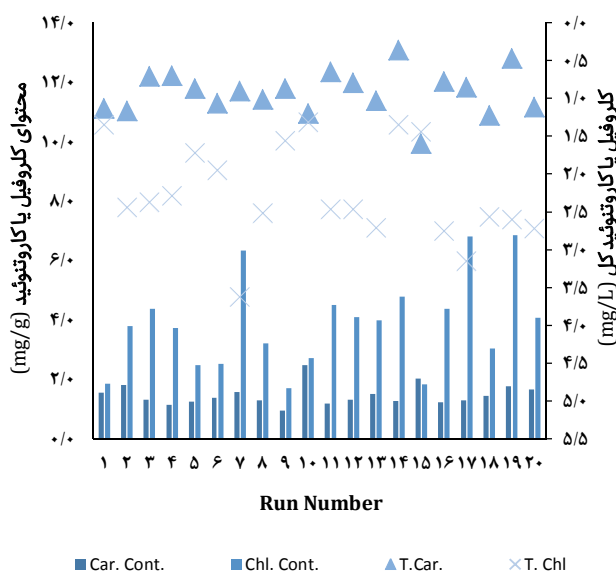
افزایش سیکل اختلاط موجب کاهش میزان کلروفیل کل شد و این روند کاهشی در شدت‌های تابشی بالا با شیب تندتری صورت گرفت (نمودار ۳-الف). همچنین احجام کنترلی بزرگ‌تر، کلروفیل کل کمتری داشتند (خط‌های پُر نسبت به خط‌چین‌ها). با افزایش سیکل اختلاط در شدت‌های بالای تابش، کلروفیل کل کاهش یافت، اما مقدار این کاهش در شدت‌های پایین تابش، ناچیز بود (نمودار ۳-الف). شدت تابش بر کلروفیل کل در سیکل‌های اختلاط طولانی تاثیر منفی و در سیکل‌های اختلاط کوتاه تاثیر مثبتی داشت، هر چند بیشترین کلروفیل کل در شدت تابش ۸۷۰۰ لوکس روی داد و پس از آن اندکی کاهش در کلروفیل دیده شد. همچنین کاهش جزئی کلروفیل کل در اثر افزایش حجم کنترلی مشهود بود و شیب این کاهش در شدت‌های مختلف تابش تفاوتی نداشت (نمودار ۳).

محتوای کاروتنوئید و میزان کاروتنوئید کل: افزایش سیکل اختلاط بر محتوای کاروتنوئید در کلیه شدت‌های تابش و احجام کنترلی تاثیر منفی داشت. همچنین محتوای کاروتنوئید در اثر افزایش شدت تابش به‌ویژه در احجام کنترلی کم (خط‌چین‌ها) افزایش یافت، به‌طوری که در شدت‌های بالای تابش (نمودار ۴-الف ۳) محتوای کاروتنوئید احجام کنترلی کم (خط‌چین‌ها) بیشتر از احجام کنترلی زیاد (خطوط پر) بود، ولی در شدت‌های تابش کم (نمودار ۴-الف ۱) خلاف این روند دیده شد. در شدت‌های کم تابشی (نمودار ۴-الف ۱)، افزایش حجم کنترلی موجب افزایش محتوای کاروتنوئید شد، اما در شدت‌های بالای تابش، روند معکوس بود (نمودار ۴).

محتوای کاروتنوئید با افزایش شدت تابش به‌ویژه در احجام کنترلی کم، روند افزایشی داشت و برتری این محتوای در سیکل‌های اختلاط کوتاه (خط‌چین‌ها نسبت به خطوط پر) دیده می‌شد (نمودار ۴-ب).

سیکل اختلاط بر کاروتنوئید کل در احجام کنترلی کوچک (خط‌چین‌ها) تاثیر مثبتی داشت و تاثیر منفی آن در احجام کنترلی بزرگ (خطوط پر) مشاهده شد (نمودار ۵-الف). افزایش میزان کاروتنوئید کل در اثر افزایش شدت تابش نیز دیده شد (نمودار ۵-الف ۱ تا الف ۳). همچنین تاثیر مثبت حجم کنترلی بر کاروتنوئید کل در شدت‌های پایین تابش (برتری خطوط پُر نسبت به خط‌چین‌ها؛ نمودار ۵-الف ۱) مشخص بود، اما میزان این اثر مثبت با افزایش سیکل اختلاط رو به نزول بود (خط‌چین‌ها). این سیر نزولی در شدت‌های تابش زیاد (خط‌های پر) محسوس‌تر بود، به‌طوری که در سیکل‌های اختلاط طولانی، ماهیت مثبت اثر حجم کنترلی، معکوس و افزایش آن موجب کاهش کاروتنوئید کل شد (نمودار ۵-الف ۳؛ برتری خط‌چین‌ها نسبت به خطوط پر). افزایش شدت تابش بر میزان کاروتنوئید کل در تمام شرایط تاثیر مثبتی داشت (نمودار ۵-ب)، اما با افزایش حجم کنترلی، برتری

دارای کمترین سیکل اختلاط (۲ ساعت) بود. بیشترین محتوای کاروتنوئید (۲/۴۷ میلی‌گرم بر گرم) در آزمایش ۱۰ بود که دارای بیشترین شدت تابش (۴۰۰۰ لوکس) بود و در همین آزمایش کمترین میزان کلروفیل کل (۱/۳۱ میلی‌گرم بر لیتر) نیز ثبت شد. کمترین میزان کاروتنوئید کل (۰/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر) در آزمایش شماره ۱۴ با کمترین شدت تابش (صفرلوکس) حاصل شد و هر چند میزان کلروفیل کل آن نیز کم بود، اما نسبت کلروفیل به کاروتنوئید بالایی (۳/۷۷) داشت که بیانگر سهم بالای کلروفیل از کل رنگدانه‌ها بود. بیشترین میزان کاروتنوئید کل (۱/۵۹ میلی‌گرم بر لیتر) نیز در آزمایش ۱۵ با حجم کنترلی کم و شدت تابش و سیکل اختلاط زیاد به دست آمد که کمترین نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (۰/۹۰۷) را داشت و بیانگر سهم بالای کاروتنوئید از مجموع رنگدانه‌ها بود. بیشترین محتوای کلروفیل (۶/۸۴ میلی‌گرم بر لیتر) نیز در آزمایش ۱۹ با کمترین حجم کنترلی (۲۰٪) مشاهده شد. همچنین تناسب محتوای کلروفیل با کلروفیل کل مشخص بود، به‌صورتی که آزمایش‌های ۷، ۱۷ و ۱۹ که دارای بیشترین میزان کلروفیل کل بودند، محتوای کلروفیل بالایی نیز داشتند و در آزمایش‌های ۱، ۵، ۹ و ۱۵ محتوای کلروفیل و کلروفیل کل هر دو پایین بود. اما در آزمایش‌های ۱۸، ۱۴، ۸ و تا حدی ۳ این تناسب بین محتوای کلروفیل با مقادیر کل آن وجود نداشت. در مورد کاروتنوئید نیز تناسب بین محتوای بالا و میزان کل بالا در آزمایش‌های ۱، ۲، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ و تناظر بین محتوای کم و میزان کل پایین نیز در آزمایش‌های ۴، ۱۱ و ۱۶ مشاهده شد، اما عدم تناظر محتوای کاروتنوئید و کاروتنوئید کل در آزمایش‌های ۳، ۱۴ و ۱۹ و تا حدی ۱۸ مشهود بود (نمودار ۱).



نمودار ۱) مقایسه مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید کل و محتوای آنها در بیومس در کلیه تیمارها (۲۰ تیمار): مقادیر کلروفیل کل و کاروتنوئید کل به‌ترتیب نقاط مثلث و دایره و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید به‌ترتیب ستون‌های کمرنگ و پررنگ هستند

محتوای کلروفیل و میزان کلروفیل کل: با افزایش شدت تابش از ۳۵۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس در احجام کنترلی بزرگ (حجم کنترلی ۴۰٪)، روند تاثیر سیکل اختلاط بر محتوای کلروفیل متفاوت بود. به‌طوری که در شدت‌های پایین تابش، افزایش سیکل اختلاط باعث افزایش محتوای کلروفیل شد (نمودار ۲-الف ۱)، اما در شدت‌های بالای تابش (نمودار ۲-الف ۳) روند برعکسی داشت. افزایش شدت

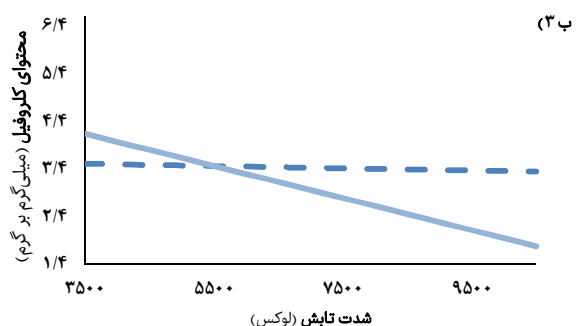
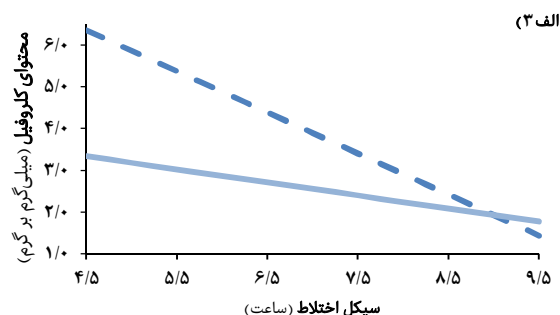
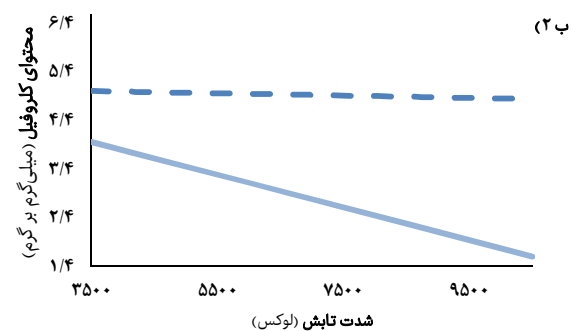
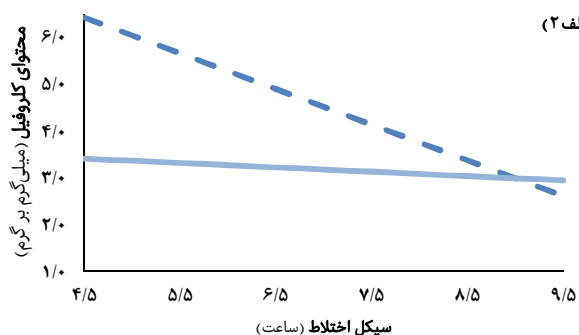
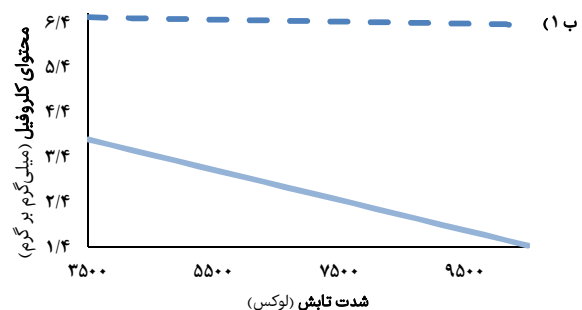
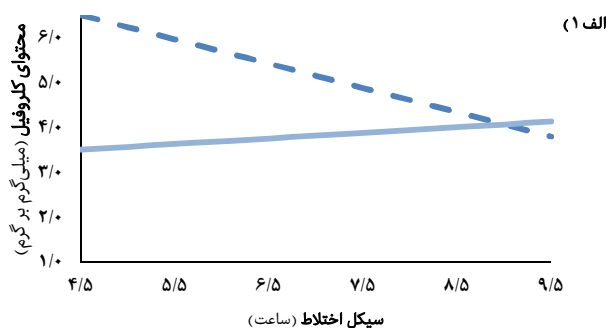
افزایش سیکل اختلاط موجب کاهش کلروفیل کل و افزایش کاروتنوئید کل شد. روند تاثیر فاکتور حجم کنترلی در شدت‌های تابش بالا مشابه بود، اما در شدت‌های پایین تابش، افزایش حجم کنترلی به کاهش کلروفیل کل و افزایش کاروتنوئید کل انجامید (نمودارهای ۳ و ۵- الف). در مورد تاثیر شدت تابش نیز با افزایش شدت تابش در سیکل‌های اختلاط بزرگ، کلروفیل کل کم شد، اما کاروتنوئید کل زیاد شد (نمودارهای ۳ و ۵- ب).

بیشترین کلروفیل کل ($3/63$ میلی‌گرم بر لیتر) در آزمایش شماره ۷ با کمترین سیکل اختلاط (۲ ساعت) و حجم کنترلی ۳۰٪ ایجاد شد. در این شرایط میزان کاروتنوئید کل $0/90$ میلی‌گرم بر لیتر و مجموع دو رنگدانه در بیشترین حد قرار داشت. اما بیشترین کاروتنوئید کل ($1/59$ میلی‌گرم بر لیتر) در کمترین حجم کنترلی (۲۰٪)، سیکل اختلاط $9/5$ ساعت و شدت تابش 10500 لوکس ایجاد شد. مقادیر بهینه فاکتورها برای دستیابی به بیشترین مقدار هر یک از پاسخ‌ها نیز تعیین شد (نمودار ۶).

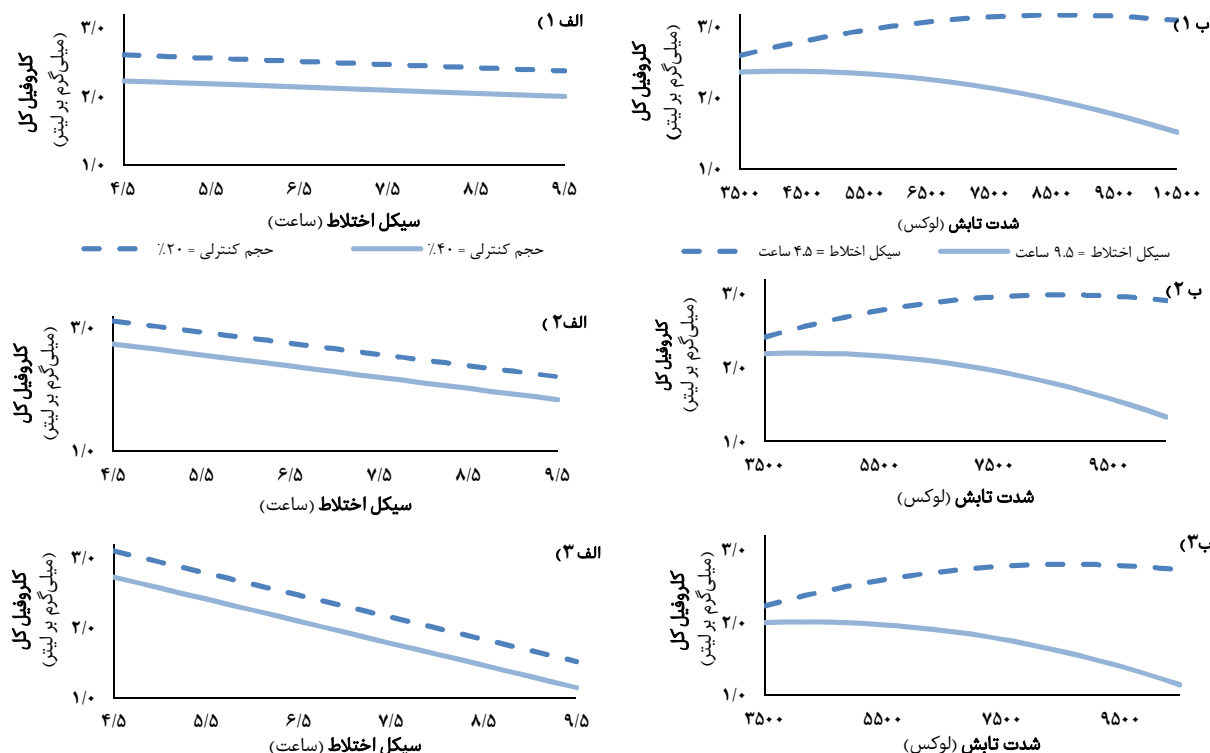
کاروتنوئید کل در سیکل‌های طولانی (نمودار ۵- ب) به برابری (نمودار ۵- ب) رسید و در نهایت حالت عکس و برتری سیکل‌های اختلاط کوتاه‌تر دیده شد (نمودار ۵- ب).

افزایش سیکل اختلاط در حجم کنترلی ۴۰٪ نشان داد که بر محتوای کلروفیل اثر مثبت و بر محتوای کاروتنوئید اثر منفی داشت. در سیکل اختلاط $9/5$ ساعته، افزایش حجم کنترلی در شدت‌های بالای تابش موجب افزایش محتوای کلروفیل و کاهش محتوای کاروتنوئید شد، اما در شدت‌های پایین تابش تفاوت بیشتر بود. در سیکل‌های اختلاط $4/5$ و ۷ ساعته، افزایش حجم کنترلی به کاهش محتوای کلروفیل و افزایش محتوای کاروتنوئید منتج شد (نمودارهای ۲ و ۴- الف). افزایش شدت تابش در سیکل‌های کوتاه تاثیری بر محتوای کلروفیل نداشت و در سیکل‌های طولانی موجب کاهش آن شد، اما در هر دو سیکل، محتوای کاروتنوئید را زیاد کرد (نمودارهای ۲ و ۴- ب).

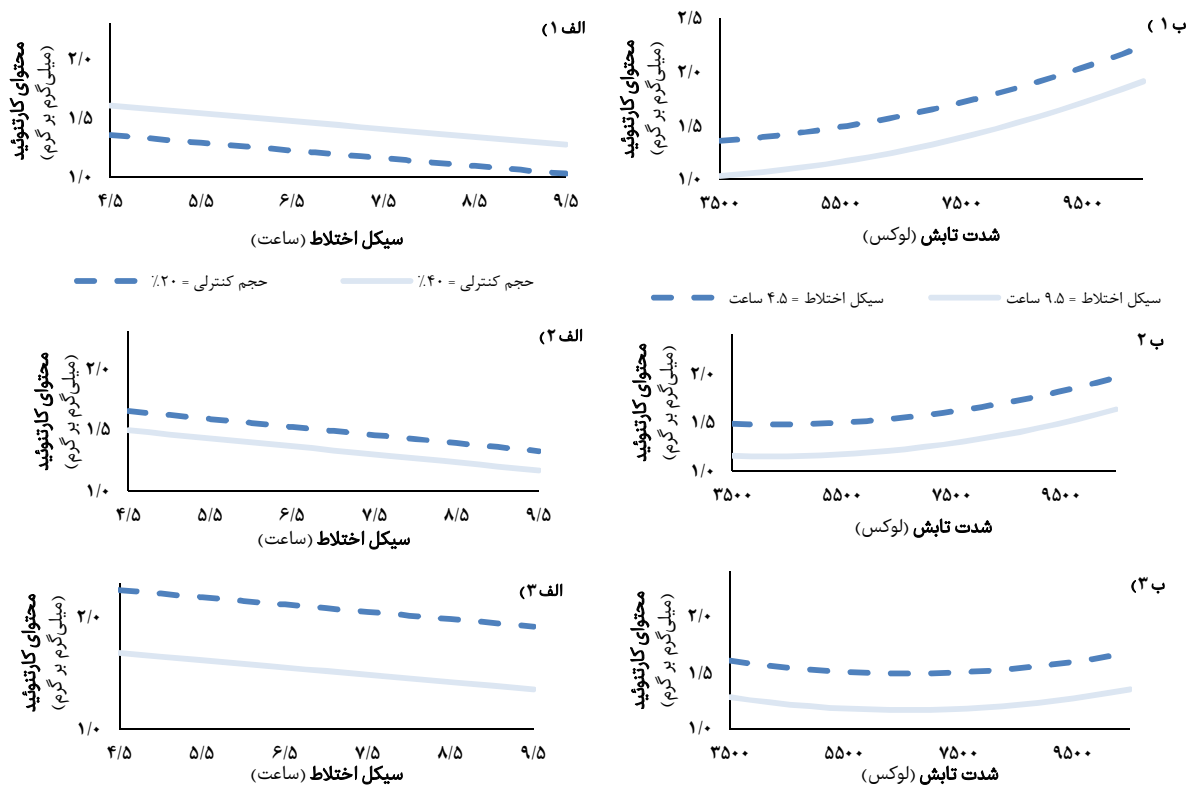
روند تاثیر سیکل اختلاط بر کلروفیل و کاروتنوئید کل در احجام کنترلی بزرگ تقریباً یکسان بود، اما در احجام کنترلی کوچک،



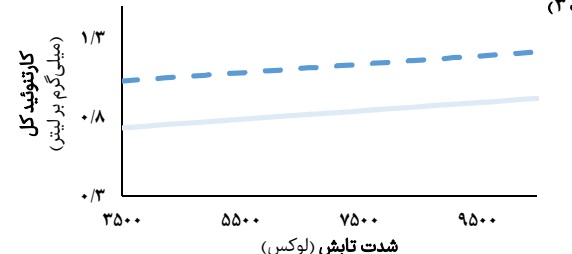
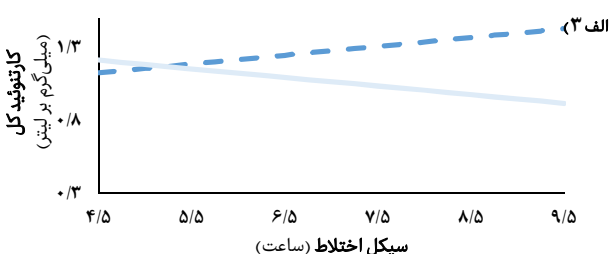
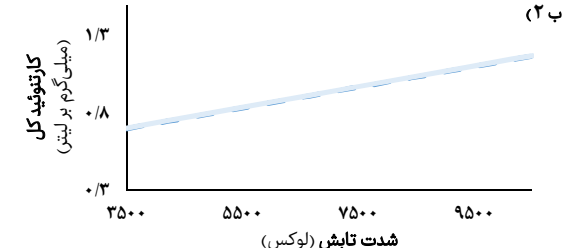
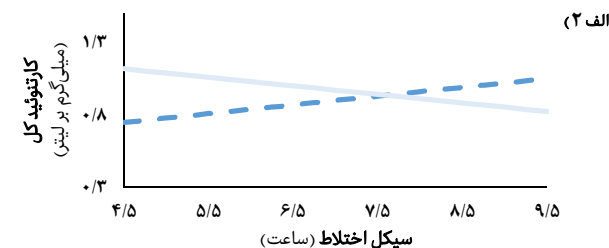
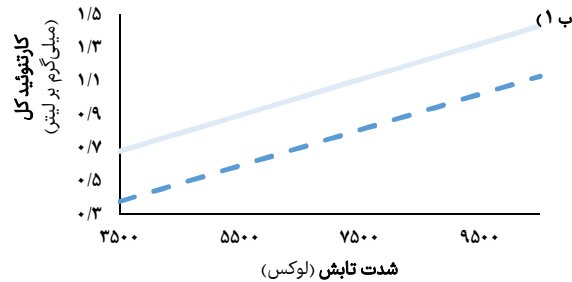
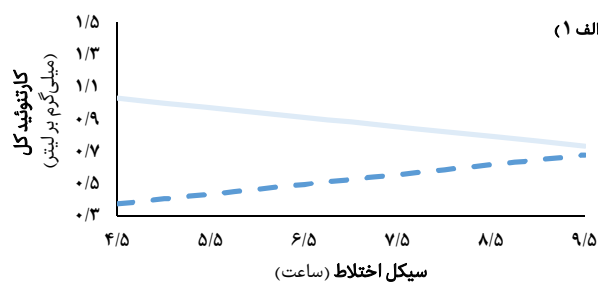
نمودار ۲) اندرکنش تاثیر سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش بر میزان محتوای کلروفیل؛ الف ۱) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش 3500 لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کلروفیل، الف ۲) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش 7000 لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کلروفیل، الف ۳) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش 10500 لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کلروفیل، ب ۱) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۲۰ و سیکل اختلاط $4/5$ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کلروفیل، ب ۲) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۳۰ و سیکل اختلاط $4/5$ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کلروفیل، ب ۳) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۴۰ و سیکل اختلاط $4/5$ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کلروفیل



نمودار ۳ اندرکنش تاثیر سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش بر میزان کلروفیل کل؛ الف ۱) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۳۵۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کلروفیل کل، الف ۲) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۷۰۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کلروفیل کل، ب ۱) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۲۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ بر میزان محتوای کلروفیل کل، ب ۲) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۳۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کلروفیل کل، ب ۳) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۴۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کلروفیل کل



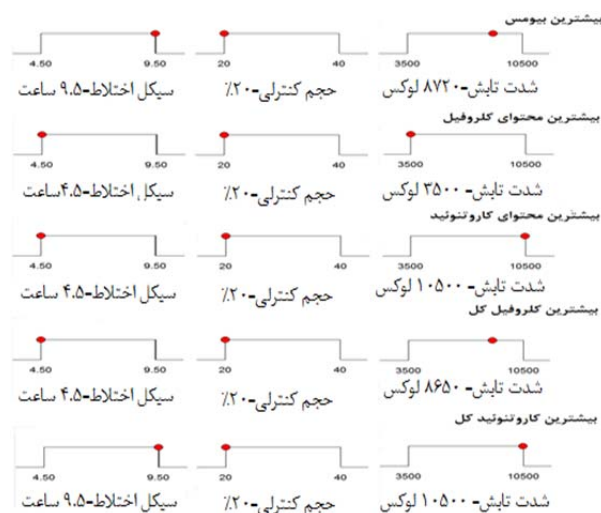
نمودار ۴ اندرکنش تاثیر سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش بر میزان محتوای کاروتنوئید؛ الف ۱) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۳۵۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کاروتنوئید، الف ۲) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۷۰۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کاروتنوئید، ب ۱) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۳۵۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کاروتنوئید، ب ۲) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۷۰۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کاروتنوئید، ب ۳) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۷۰۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۳۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کاروتنوئید، ب ۴) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۷۰۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۴۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کاروتنوئید



نمودار ۵) اندرکنش تاثیر سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش بر میزان کارتنوئید کل؛ الف ۱) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۳۵۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کارتنوئید کل، الف ۲) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۷۰۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کارتنوئید کل، الف ۳) تاثیر اندرکنش سیکل اختلاط، شدت تابش ۱۰۵۰۰ لوکس و حجم کنترلی ۲۰ و ۴۰ بر میزان محتوای کارتنوئید کل، ب ۱) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۲۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کارتنوئید کل، ب ۲) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۳۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کارتنوئید کل، ب ۳) تاثیر اندرکنش شدت تابش، حجم کنترلی ۴۰ و سیکل اختلاط ۴/۵ و ۹ ساعت بر میزان محتوای کارتنوئید کل

کشت تجاری اسپیرولینا برای تولید رنگدانه، هم محتوای رنگدانه در بیومس و هم وزن خشک بیومس تولیدی دارای اهمیت است. لذا در این پژوهش در کنار بهره‌گیری از فتوبیوراکتوری نوین برای کشت تلفیقی اسپیرولینا، تاثیر فاکتورها و اندرکنش آنها بر محتوای و نیز بر میزان کل رنگدانه تولیدی بررسی شد و برای توجیه تفاوت تاثیرات، اثرگذاری فاکتورها بر میزان بیومس نیز مد نظر قرار گرفت. محتوای کلروفیل در تمام آزمایش‌ها به‌مراتب بیش از محتوای کارتنوئید بود (به‌طور میانگین ۲/۷۴ برابر بود)، اما در آزمایش‌های ۱ و ۱۰ این مقادیر نزدیک به یکدیگر بود و تنها در آزمایش ۱۵، محتوای کارتنوئید بیش از محتوای کلروفیل بود. در این آزمایش شدت نور ۱۰۵۰۰ لوکس و سیکل اختلاط ۹.۵ ساعت بود، یعنی حجم کنترلی در مدت زیادی تحت تابش بالایی بود. لذا می‌توان این پدیده را به نقش حفاظتی کارتنوئید از کلروفیل در مقابل اکسیداسیون و تخریب نوری مربوط دانست [32, 33].

افزایش محتوای کلروفیل در شدت‌های پایین تابش به‌واسطه سنتز بیشتر این رنگدانه برای جبران کمبود نور دریافتی سلول‌هاست [34]. در واقع چون با افزایش سیکل اختلاط سلول‌ها در ناحیه کنترلی در مدت بیشتری تحت کمبود نور قرار داشتند، همین امر، روند عکس در شدت‌های بالای تابش را توجیه می‌کند. در احجام کنترلی کوچک (خط‌چین، حجم کنترلی ۲۰٪) در همه شدت‌ها کاهش محتوای کلروفیل با افزایش سیکل اختلاط روی داد، ولی در شدت‌های



نمودار ۶) مقادیر بهینه فاکتورهای سیکل اختلاط، حجم ناحیه کنترلی و شدت تابش برای دستیابی به بیشترین مقدار بیومس، محتوای کلروفیل، کارتنوئید، کلروفیل کل و کارتنوئید کل

بحث

هدف پژوهش حاضر، بهینه‌سازی مقادیر کلروفیل و کارتنوئید بیومس اسپیرولینا با بهره‌گیری از فتوبیوراکتوری نوین بود. در

شده [42] و نقش حفاظتی آن نیز از کلروفیل در مقابل اکسیداسیون و تخریب نوری گزارش شده است [32]. مشابهت میزان کلروفیل و کاروتنوئید در پژوهش والش و همکاران [43] نیز در بررسی سه شدت تابش اشاره شده، بیشینه کلروفیل و کاروتنوئید در تابش متوسط ۴۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه حاصل شده است.

با نگاهی کلی می‌توان گفت علی‌رغم افزایش محتوای کلروفیل در شدت‌های کم تابش، میزان بیومس در شدت‌های بالای تابش، زیاد می‌شود و بیشترین بهره‌وری کلروفیل در موازنه‌ای بین رشد سلول‌ها و بیوسنتز مولکول‌های کلروفیل دست‌یافتنی است [44] که در مطالعات زیادی به همین بالانس اشاره شده است [9, 43]. ایده کشت دومرحله‌ای برای افزایش رشد در فاز اول و سپس کاهش نور و افزایش تجمیع کلروفیل در مرحله دوم نیز از همین موازنه منتج شده و نمونه‌های موفق آن در کشت‌های هتروتروفیک [45] و اتوتروفیک [46] انجام شده است. تبیین کامل ارتباط سه فاکتور و تاثیر اندرکنش آنها روی محتوی و میزان کل رنگدانه با مقایسه نتایج با تاثیر فاکتورها بر بیومس حاصل شد. طبق یافته‌ها کاهش فاکتور حجم کنترلی، تاثیر مثبتی بر محتوای رنگدانه‌ها و نیز میزان بیومس داشت، اما کاهش سیکل اختلاط علی‌رغم تاثیر مثبت بر محتوای رنگدانه‌ها موجب کاهش بیومس شد که باعث تاثیر منفی بر میزان کل رنگدانه می‌شد. شدت تابش نیز اثری مثبت بر محتوای کاروتنوئید و اثری منفی بر محتوای کلروفیل داشت و در مورد بیومس نیز تا حد بهینه ۸۷۰۰ لوکس، اثر مثبت داشت و پس از آن بازدارندگی نوری رخ داد.

از محدودیت‌های پذیرش حاضر می‌توان به عدم امکان ثبت آنالین داده‌ها اشاره کرد تا از این طریق با ارزیابی پارامتر زمان، بهینه‌سازی این فاکتور صورت گیرد. همچنین با توجه به کاربری‌های متعدد ریزجلبک اسپیرولینا، در صورت امکان اندازه‌گیری (مالی و تجهیزاتی) سایر پاسخ‌ها مانند میزان انواع پروتئین‌ها، فرآیند بهینه‌سازی معطوف به کاربری خاص قابل انجام بود. همچنین به دلیل یکتا بودن دستگاه کشت و نیز اندرکنش موثر فاکتورها، لازم است پیش از تعمیم نتایج به سایر شرایط محیطی و کشت‌های مشابه بررسی‌های لازم صورت پذیرد. کشت‌های مرحله‌ای و دستیابی به محصولات جانبی برای ارتقای فرآیندهای تصفیه قابل اجرا است. با بهره‌گیری از نتایج پیشنهاد می‌شود در راستای انجام کشت‌های مرحله‌ای به منظور افزایش رنگدانه‌های استحصالی با منظور کردن حجم کنترلی کوچک (۲۰٪) برای تمام شرایط بتوان در فاز اول با انجام کشت در سیکل اختلاط بالا (۹/۵ ساعت) و شدت تابش بهینه ۸۷۰۰ لوکس، وزن خشک تولیدی را بیشینه کرد و سپس در فاز دوم برای افزایش محتوای کلروفیل یا کاروتنوئید به ترتیب به صورت روش‌های زیر عمل نمود:

الف) کاهش شدت تابش تا ۳۵۰۰ لوکس و کاهش سیکل اختلاط به ۴/۵ ساعت، برای افزایش محتوای کلروفیل در بیومس تولیدی در فاز اول

ب) افزایش شدت تابش تا ۱۰۵۰۰ لوکس و کاهش سیکل اختلاط به ۴/۵ ساعت، برای افزایش محتوای کاروتنوئید در بیومس فاز اول.

هر چند لازم است در مطالعات آتی اندرکنش فاکتورها و نیز زمان‌بندی مناسب برای هر یک از فازهای مراحل پیشنهادی مورد ارزیابی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

برای دستیابی به بیشترین میزان کلروفیل، شدت بهینه تابش برای افزایش بیومس و سیکل اختلاط کوتاه برای افزایش محتوی در

بالای تابش، روند کاهش با شیب بیشتری بود که به تاثیر شدت نور در سنتز این رنگدانه مرتبط است. با افزایش سیکل (خطوط توپر)، تاثیر شدت تابش بر کاهش محتوای کلروفیل مشخص‌تر شد. این روند عکس محتوای کلروفیل با شدت تابش، در بسیاری از مطالعات گزارش شده است و در اینجا این اثر در سیکل‌های اختلاط طولانی که زمان لازم برای اثرگذاری فراهم است یا با بزرگ‌تر شدن حجم ناحیه کنترلی و کمیت بیومس تحت تابش (با شدتی بیش از شدت تابش در برکه باز) مشهودتر بود. به نظر می‌رسد ۴/۵ ساعت زمان کافی برای تاثیر شدت تابش بر کاهش محتوی نباشد. در مطالعات زیادی به روند عکس محتوای کلروفیل و شدت تابش اشاره [19, 35] شده و در گونه‌های *اوسیلاتوریا ویلی (Oscillatoria willei)* [36]، *هماتوکوکوس (Haematococcus)* [37]، *دونالیا بارد/ویل (Dunaliella bardawil)* و *دونالیا سالینا (Dunaliella salina)* [38] نیز اثر شدت نور و نبود نیتروژن در کاهش محتوای کلروفیل دیده شده است.

با توجه به تاثیر مثبت سیکل اختلاط و حجم کنترلی بر بیومس (که در پژوهش قبلی مورد نظر قرار گرفته است) [24]، افزایش محتوای کلروفیل با افزایش حجم کنترلی در سیکل‌های اختلاط طولانی می‌تواند به اثر سایه ناشی از ازدیاد بیومس مرتبط باشد که منجر به افزایش محتوای کلروفیل به واسطه کاهش نور دریافتی می‌شود. در واقع با افزایش حجم کنترلی در سیکل طولانی، فرصت نشست برای حجم بیشتری از کشت فراهم می‌شود و اثر سایه ایجاد شده نیز به واسطه بیومس بیشتر افزایش می‌یابد و در نتیجه محتوای کلروفیل این حجم بیشتر، تحت اثر سایه اضافه می‌شود. اثر سایه در افزایش بیوسنتز کلروفیل برای افزایش بهره‌وری، جذب فوتون و جبران کاهش نور در مطالعات دیگری نیز اشاره شده است [17].

روند افزایشی محتوای کاروتنوئید با افزایش شدت تابش به‌ویژه در احجام کنترلی کم و نیز برتری این محتوی در سیکل‌های اختلاط کوتاه قابل توجه بود. بررسی‌های انجام شده روی گونه‌های *دونالیا بارد/ویل* [38]، *دونالیا سالینا* [39] و *هماتوکوکوس پلوویالیس (Haematococcus pluvialis)* [37] موید تاثیر مثبت شدت بالای تابش بر محتوای کاروتنوئید بوده است و به نظر می‌رسد در احجام کنترلی کوچک و همین‌طور سیکل‌های کوچک اختلاط، اثر ناشی از بازدارندگی نوری نیز کمتر بوده و به همین خاطر افزایش محتوای کاروتنوئید در این حالات بیشتر بوده است. هر چند در این زمینه اجماعی بین پژوهش‌ها وجود نداشته و به عنوان مثال در مطالعات *آجایان و سلو/راجو* [18] افزایش محتوای کاروتنوئید در شدت نور کم در کنار استفاده از دوره گزارش شده است.

با توجه به تاثیر میزان بیومس و محتوی بر میزان کل کلروفیل یا کاروتنوئید لازم بود تاثیر توأم فاکتورها بر بیومس و محتوای رنگدانه در آن بررسی شود. همچنین با توجه به آن که سیانوباکتری‌ها، امکان انجام فتوسنتز با انواع رنگدانه‌ها نظیر کلروفیل (سبز)، کاروتنوئید (زرد- نارنجی) و نیز سایر رنگدانه‌های پروتئینی مثل فیکوسیانین (آبی)، فیکواریتین (قرمز)، آلفوکوسیانین، فیکواریتروسیانین و امکان ضبط نور در طول موج‌های مختلف را داشته [40] و محدوده نوری قرمز (طول موج ۶۰۰-۷۰۰ نانومتر) برای جذب توسط کلروفیل و محدوده نوری آبی (طول موج ۴۰۰-۵۰۰ نانومتر) برای جذب توسط کاروتنوئید ارایه شده است [41]، لذا تحلیل اثرگذاری فاکتورها باید با منظور کردن ارتباط این رنگدانه‌ها صورت گیرد. به‌ویژه آن که نقش اساسی کاروتنوئید موجود در جلبک‌ها در انجام فتوسنتز در کنار کلروفیل اثبات

CO2 reduction under visible light over modified N-doped TiO2 photocatalysts. Appl Catal B Environ. 2015;168:114-24.

11- Cazzonelli CI. Carotenoids in nature: Insights from plants and beyond. Funct Plant Biol. 2011;38(11):833-47.

12- Ishida BK, Bartley GE. Carotenoids: chemistry, sources and physiology. In: Caballero B. Guide to nutritional supplements. Cambridge: Academic Press;2009.

13- Hashtroudi MS, Shariatmadari Z, Riahi H, Ghassempour AR. Analysis of Anabaena vaginicola and Nostoc calcicola from Northern Iran, as rich sources of major carotenoids. Food chem. 2013;136(3-4):1148-53.

14- Liang C, Zhao F, Wei W, Wen Z, Qin S. Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: Structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics. Int J Biol Sci. 2006;2(4):197-207.

15- Mortensen A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. Pure Appl Chem. 2006;78(8):1477-91.

16- Danesi EDG, Rangel-Yaguí CO, De Carvalho JCM, Sato S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis. Biomass Bioenerg. 2002;23(4):261-9.

17- Matsudo MC, Bezerra RP, Sato S, Perego P, Converti A, Carlos J. Repeated fed-batch cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis using urea as nitrogen source. Biochem Eng J. 2009;43(1):52-7.

18- Ajayan KV, Selvaraju M. Reflector based chlorophyll production by Spirulina platensis through energy save mode. Bioresour Technol. 2011;102(16):7591-4.

19- Chen HB, Wu JY, Wang CF, Fu CC, Shieh CJ, Chen CI. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by Spirulina platensis under various light-emitting diodes. Biochem Eng J. 2010;53(1):52-6.

20- Ghobadian S, Ganjidoost H, Ayati B, Soltani N. Evaluation of the effects of aeration cycle and culture medium concentration on biomass qualitative and quantitative indices in microalga Spirulina as candidate for wastewater treatment. J Aquat Ecol. 2015;5(2):87-99. [Persian]

21- Andersen RA. Algal culturing techniques. Cambridge: Academic press; 2005.

22- Pulz O, Scheibenbogen K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. In: Pulz O, Scheibenbogen K. Bioprocess and algae reactor technology, apoptosis. 59th Vol. Berlin: Springer; 1998. p. 123-52.

23- Chisti Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. 2007;25(3):294-306.

24- Ghobadian S, Ganjidoost H, Ayati B, Soltani N. The innovative engineered photobioreactor to optimize the amount of microalgae Spirulina biomass. Nova Biol Repert. 2018;5(1):13-25. [Persian]

25- Ravelonandro PH, Ratianarivo DH, Joannis-Cassan C, Isambert A, Raheirmandimby M. Improvement of the growth of Arthrospira (Spirulina) platensis from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO2 addition. Food Bioprod Process. 2011;89(3):209-16.

26- Tredici MR. Photobiology of microalgae mass cultures: Understanding the tools for the next green revolution. Biofuels. 2010;1(1):143-62.

27- Flickinger MC, Drew SW, editors. Encyclopedia of bioprocess technology. Hoboken: John Wiley & Sons; 1999.

28- Prussi M, Buffi M, Casini D, Chiaramonti D, Martelli F, Carnevale M, et al. Experimental and numerical

اولویت هستند. اما برای دستیابی به بیشترین میزان کاروتنوئید، سیکل اختلاط طولانی برای افزایش بیومس و شدت تابش بالا (حتی در محدوده بازدارندگی) برای افزایش محتوی غالب است. اهمیت اثر افزایش شدت تابش بر افزایش محتوای کاروتنوئید و نیز کاهش سیکل اختلاط بر افزایش محتوای کلروفیل، بیش از تاثیر منفی آنها بر میزان وزن خشک بیومس است و در برآیند منجر به افزایش رنگدانه استحصالی می‌شود.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله مراتب سپاس از کمک مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور وابسته به معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری از این پژوهش اعلام می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

سهم نویسندگان: ساسان قبادیان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪): حسین گنجی‌دوست (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روشناس/پژوهشگر اصلی (۲۵٪): بیتا آیتی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪): ندا سلطانی (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع مالی: کمک مالی توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور وابسته به معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری صورت گرفته است.

منابع

- 1- Sutherland DL, Howard-Williams C, Turnbull MH, Broady PA, Craggs RJ. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresour technol. 2015;184:222-9.
- 2- Chen HB, Wu JY, Wang CF, Fu CC, Shieh CJ, Chen CI, Wang CY, Liu YC. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by Spirulina platensis under various light-emitting diodes. Biochem Eng J. 2010;53(1):52-6.
- 3- Wuang SC, Khin MC, Chua PQD, Luo YD. Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. Algal Res. 2016;15:59-64.
- 4- Moraes L, Da Rosa GM, Cardias BB, Dos Santos LO, Viera Costa JA. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control: Carbon dioxide fixation by Spirulina sp. at different diffusers. Ecol Eng. 2016;91:426-31.
- 5- Shao Y, Pan J, Zhang C, Jiang L, He Y. Detection in situ of carotenoid in microalgae by transmission spectroscopy. Computer Electron Agric. 2015;112:121-7.
- 6- Henrikson R. Earth food Spirulina: How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet. San Rafael: Ronore Enterprises; 1989.
- 7- Le Tutour B, Benslimane F, Gouleau MP, Gouygou JP, Saadan B, Quemeneur F. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, Laminaria digitata, Himanthalia elongata, Fucus vesiculosus, Fucus serratus and Ascophyllum nodosum. J Appl Phycol. 1998;10:121.
- 8- Borowitzka MA. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J Appl Phycol. 1995;7(1):3-15.
- 9- Danesi EDG, Rangel-Yaguí CO, Carvalho JCM, Sato S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis. Biomass Bioenerg. 2004;26(4):329-35.
- 10- Phongamwong T, Chareonpanich M, Limtrakul J. Role of chlorophyll in Spirulina on photocatalytic activity of

- Haematococcus pluvialis. Bioresour Technol. 2013;128:118-24.
- 38- Ben-Amotz A, Avron M. On the factors which determine massive β -Carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 1983;72(3):593-7.
- 39- Gómez PI, González MA. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. Biol Res. 2005;38(2-3):151-62.
- 40- Richmond A. Prerequisite for industrial microalga culture: Efficient utilization of solar irradiance. Stadler T, editor. Unknown: Algal Biotechnology; 1988.
- 41- Masojídek J, Torzillo G, Koblížek M. Photosynthesis in microalgae. In: Richmond A, Hu Q, editors. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Hoboken: John Wiley & Sons; 2004. p. 20.
- 42- Goodwin TW. Nature and distribution of carotenoids. Food Chem. 1980;5(1):3-13.
- 43- Walsh K, Jones GJ, Dunstan RH. Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. Phytochemistry. 1997;44(5):817-24.
- 44- Rangel-Yagui, CDO, Danesi ED, De Carvalho JC, Sato S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresour Technol. 2004;92(2):133-41.
- 45- Lynch HC, Bushell ME. The physiology of erythromycin biosynthesis in cyclic fed batch culture. Microbiology. 1995;141(Part 12):3105-11.
- 46- Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: Two-phase growth for β -carotene production. J Appl Phycol. 1995;7(1):65-8.
- investigations of mixing in raceway ponds for algae cultivation. Biomass Bioenerg. 2014;67:390-400.
- 29- Marker AFH. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshw Biol. 1972;2(4):361-85.
- 30- Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. J Biol Chem. 1993;268(23):17348-53.
- 31- Lenth RV. Response-surface methods in R, using rsm. J Stat Softw. 2010;32(7):1-17.
- 32- Soundarapandian P, Vasanthi B. Effects of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: Optimized method for phycocyanin extraction. Int J Zool Res. 2008;4(1):1-11.
- 33- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. Photooxidative stress in plants. Physiologia Plant. 1994;92(4):696-717.
- 34- Rodrigues M, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. Bioresour Technol. 2010;101(12):4491-8.
- 35- Saha SK, Moane S, Murray P. Effect of macro-and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18. Bioresour Technol. 2013;147:23-8.
- 36- Saha SK, Uma L, Subramanian G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. FEMS Microbiol Ecol Banner. 2003;45(3):263-72.
- 37- Saha SK, McHugh E, Hayes J, Moane S, Walsh D, Murray P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga