



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گنجان

بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد نهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۹
۵۳-۶۷

<http://japu.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/japu.2019.16909.1512

کشت میکسوتروف *Spirulina platensis*: پتانسیل تولید زیست‌توده، متابولیت‌ها و رنگدانه‌ها

زهرا رسولی^۱، مهدی پارسا^۲ و حسین احمدزاده^۳

^۱ دانشجوی دکتری گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

آستاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،

^۳ آستاد گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۳

چکیده

اخیراً جلبک *Spirulina platensis* به‌عنوان گونه زراعی مهم در جهان مطرح شد؛ هر چند معرفی و کشت آن در ایران در ابتدای راه است. در این راستا، کشت اتوتروف (فاقد گلوکز) و میکسوتروف این گونه در محیط‌های دارای ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ۴، ۶، ۱۰، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. تغییر شرایط رشد از اتوتروفی به میکسوتروفی، سبب تغییر ترکیب شیمیایی سلول‌ها به‌دلیل جهت‌گیری متفاوت تخصیص کربن به پروتئین، کربوهیدرات و لیپید شد. به‌طوری‌که کاربرد ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز در کشت میکسوتروفی سبب افزایش وزن خشک، غلظت سلول، پروتئین، کربوهیدرات، کلروفیل، فلاونوئید، آنتوسیانین و فایکواریتترین به‌ترتیب ۱۰۲/۷۹، ۱۰۶/۰۶، ۱۴۱/۳۸، ۱۰۱/۱۱، ۱۲۹/۸۲، ۱۹۶/۷۷ و ۱۱۲/۳۵ درصد نسبت به کشت اتوتروفی شد. هم‌چنین شرایط میکسوتروفی دارای ۶ و ۴ گرم بر لیتر گلوکز سبب افزایش به‌ترتیب ۳۳۷/۹۳ و ۳۱۷/۲۴ درصدی کربوهیدرات نسبت به کشت اتوتروفی شدند. از طرف دیگر، کشت اتوتروف در افزایش تولید لیپید، فایکوسیانین و آلفافایکوسیانین مؤثرتر از میکسوتروفی بود. در کل، تغییر فرمولاسیون محیط‌های کشت مرسوم و افزودن ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز جهت افزایش معنی‌دار بهره‌وری و مواد مؤثره پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، رنگدانه، فایکوبیلی پروتئین، گلوکز، میکسوتروف

* مسئول مکاتبه: parsa@um.ac.ir

مقدمه

ریزجلبک *Spirulina platensis* یک گونه زراعی مهم در جهان منطبق بر برنامه‌های تغذیه‌ای سازمان سلامت جهانی است و کشت آن در کشورهای زیادی (از جمله فرانسه، ژاپن و رژیم اشغالگر قدس) رایج است. رشد زیاد و سریع، سهولت برداشت، توان اثرگذاری بر زنجیره غذایی، بازار بالقوه محصولات دارویی و غذایی، تولید مواد اولیه تجدیدپذیر برای سوخت، مکمل غذایی انسانی و حیوانی، رنگ طبیعی و لوازم آرایشی سبب توجه خاص به این گونه شده است (آراجو و همکاران، ۲۰۱۵؛ برویتزکا، ۲۰۱۳؛ چیستی، ۲۰۰۷). این میکروجلبک دارای ۷۴ درصد وزن خشک پروتئین (اسید آمینه‌های ضروری در مقادیر توصیه شده اداره بهداشت جهانی به‌جز متیونین؛ بکر، ۲۰۰۷) همراه با غلظت بالای مواد معدنی، اسیدهای چرب اشباع‌نشده، پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌ها، فایکوبیلی‌پروتئین‌ها و ویتامین‌ها می‌باشد (چن و همکاران، ۱۹۹۶). رنگدانه‌های ارزشمند کلروفیل، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین، فلاونوئید، فایکوسیانین، فایکواریتین، آلفایکوسیانین آن نیز در ساخت دارو و مکمل غذایی کارایی دارند.

کشت اتوتروفی گیاهان بر پایه فتوسنتز یا اصلی‌ترین مسیر تثبیت کربن و کشت هتروتروفی بر اساس تجزیه کربن خارجی (برای مثال، گلوکز محیط) انجام می‌شود. ترکیب این فتوسنتز اتوتروفی و اسیمیلاسیون هتروتروفی، نوع دیگری از کشت به‌نام میکسوتروفی را پدید می‌آورد که سبب افزایش زیست‌توده در برخی گونه‌ها می‌شود (سولتو و همکاران، ۲۰۰۸). در این فرآیند دوگانه، شدت نور و غلظت کربن آلی، دو محدودیت هم‌زمان تثبیت فتوسنتزی و اسیمیلاسیون هتروتروفی هستند (ژانگ و همکاران، ۱۹۹۹). تثبیت بیولوژیک، جذب کربن از هر دو مولکول کربن دی‌اکسید و کربوهیدرات را ترکیب

کرده، مسیری امیدوارکننده برای کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای، آثار مخرب زیست‌محیطی و هزینه‌های کشت را می‌سازد. با این حال، رشد هتروتروفیک برای تولید فایکوبیلی‌پروتئین‌ها و سایر رنگدانه‌ها مناسب نیست، زیرا مشخص شده است که جلبک در این شرایط دارای سرعت رشد ویژه کم‌تر و فاز تاخیری بسیار طولانی‌تری است (مارکوئز و همکاران، ۱۹۹۵).

S. platensis دارای ۱۳-۵۰ درصد کربوهیدرات (از تثبیت فتوسنتزی کربن دی‌اکسید) شامل گلوکز به همراه رامنوز، مانوز، زایلوز، گالاکتوز و دو قند غیررایج است (مداوی شکارام و همکاران، ۱۹۸۷). افزون بر این، ۵۰ درصد از C_{۱۴} گلوکز محیط کشت به کربن ساختاری تبدیل می‌شود (اگاوا و تروئی، ۱۹۷۰) و ۲/۸ کیلوژول بر مول انرژی تولید می‌کند (در مقایسه با ۰/۸ کیلوژول بر مول برای استات؛ بویل و موگان، ۲۰۰۹) از سوی دیگر، این کربوهیدرات را می‌توان به راحتی توسط هیدروژناز برای تولید هیدروژن استفاده کرد (مارکوئز و همکاران، ۱۹۹۵) و به‌ندرت در تولید فراتر از حد پایین دستی عمل می‌کند. بدین ترتیب، تعجب‌آور نیست که نرخ‌های رشد و تنفس بسیار بالاتری با گلوکز نسبت به سایر سوسترها از جمله اسیدهای ارگانیک، قندها، فسفات‌های قندی، الکل‌های قند و الکل‌های منوهیدریک به‌دست آیند (گریفیتز و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین به‌نظر می‌رسد که گلوکز مناسب‌ترین ترکیب برای رشد هتروتروفیک یا میکسوتروفیک *Spirulina* باشد.

در این زمینه، پژوهش حاضر با ارزش‌گذاری میکسوتروفی به واسطه تولید زیست‌توده و ترکیب بیوشیمیایی *S. platensis* در گلوکز روبرو است. به این ترتیب با بومی‌سازی تولید ترکیبات متنوع و بهینه‌سازی شرایط کشت این جلبک از واردات آن جلوگیری شده و امکان کاربرد در صنایع غذایی

هوا توسط یک کمپرسور کوچک برای اختلاط و تبادل گازها در محیط کشت تزریق شد. محیط‌های کشت با pH اولیه ۹/۵ به‌طور مداوم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هوادهی می‌شد. روشنایی مورد نیاز توسط سه لامپ فلورسنت در فتوپریود ۱۶:۸ ساعت روشنایی با شدت نور ۳ کیلولوکس فراهم شد. اندازه‌گیری‌های چگالی شار فوتونی توسط حسگر داخلی کوانتوم سنج (لامی‌کور، آمریکا) انجام شد.

روش‌های پردازش: غلظت سلول در محلول‌های کشت به‌صورت روزانه با اسپکتروفتومتر (فوتونیکس، ایران) در ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت جلوگیری از تداخل به‌دلیل استفاده از محیط‌های کشت مختلف، تراکم نوری به‌عنوان تابعی از غلظت گلوکز تصحیح شد. وزن خشک سلول در هر فاز با برداشت نمونه در هر دو روز و خشک کردن سلول‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آن خلاء تا وزن ثابت تعیین شد. این مقادیر با منحنی‌های کالیبراسیون استاندارد از تقابل دانسیته نوری در مقایسه با وزن خشک *S. platensis* مقایسه شد. کلروفیل آ (مارکر، ۱۹۷۲)، کاروتنوئیدها (ولبرن، ۱۹۹۴)، آنتوسیانین (واگنر، ۱۹۷۹)، فلاونوئیدها (کریزک، ۱۹۹۸)، فایکوبیلی‌پروتئین‌ها شامل سه گروه اصلی آلفایکوسیانین، فایکوسیانین و فایکوارترین (تارکو و همکاران، ۲۰۱۲)، پروتئین (بردفورد، ۱۹۷۶)، کربوهیدرات (دوبیوس، ۱۹۵۶) و لیپید (بلایت و دایر، ۱۹۵۹) با استفاده از سانتیفریژ (بهداد، ایران)، ورتکس (بوئکو، آلمان)، اولتراسونیک (اس بی اولترا، کره)، ترازو (جمینی، آمریکا) و اسپکتروفتومتر در قالب روابط زیر محاسبه شدند. در این روابط، A مقدار جذب در طول موج ارائه شده (نانومتر)، ε ضریب خاموشی (۳۳۰۰۰ مول بر سانتی‌متر) و b عرض کووت (سانتی‌متر) می‌باشند.

(رنگ، اسانس، آرد، غذای دام) و دارویی (داروهای مکمل غذایی و درمانی) حاصل می‌شود. بررسی گسترده مقالات منتشر شده نشان داد که هیچ گزارشی از سنجش ترکیب بیوشیمیایی مشابه در گلوکز وجود نداشته و این مقاله، اولین گزارش در این باب است (چن و همکاران، ۲۰۰۶؛ کوکا و همکاران، ۲۰۱۵؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۴). افزون بر این، بیش‌تر آثار قبلی به کشت در سیستم بیج (و نه متدارم) پرداخته‌اند.

مواد و روش‌ها

میکروجلبک و محیط کشت: *S. platensis* توسط مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد فراهم و در محیط کشت زاروک (۱۹۶۶) در حجم‌های افزایشی کشت شد. این محیط با ۱۰ غلظت مختلف گلوکز (مرک، آلمان) شامل ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ۴، ۶، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر غنی شد. این غلظت‌ها با توجه به نتایج مطالعات پیشین انتخاب (کوکا و همکاران، ۲۰۱۵؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۴) و غلظت ۲۰ گرم نیز برای اولین مرتبه آزموده شد. تمام محیط‌ها، ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و pH اولیه با ۱ مولار NaOH در حد ۹/۵ تنظیم شد. کشت پیوسته در فتوبیوراکتور با افزودن ۰/۷ میلی‌گرم بر لیتر بیومس، ۳۰ میکروگرم بر لیتر استرپتومایسین (زیگما الدریچ، آلمان) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنومیل (اگروکمیکال ملی، ایران) به هر مخزن شروع شد.

روش‌های آزمایش‌های تجربی: آزمایش‌های ابتدایی جهت انتخاب شرایط مطلوب در فتوبیوراکتور و سیستم بیج در دانشگاه فردوسی مشهد طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. سپس آزمایش‌های تداومی ۳۰ روزه در فتوبیوراکتورهای استرلیزه با حجم کل ۱ لیتر در سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ ادامه یافت. ۱۰ درصد حجمی

داشتند. چرا که ATP و NADPH در کشت میکسوتروف سریع‌تر تولید می‌شوند (کوکا و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین افزایش بیومس و سایر ترکیبات در این محیط‌ها قابل پیش‌بینی است؛ ولی مقدار آن قابل‌بحث است که برای این گونه در غلظت‌های کم‌تر گلوکز موفق‌تر بود. متابولیسم فتوسنتز و تنفس هوازی، هر دو به‌صورت مستقل و هم‌زمان در سلول‌های *S. platensis* گزارش شده‌اند (اشتنگل و همکاران، ۲۰۱۱)؛ اما افزودن کربن ارگانیک و در واقع کاهش نسبت کربن به نیتروژن، می‌تواند هر دو شرایط را تغییر دهد. البته محصولات تخمیری (اتانول، استات و لاکتات) در رشد میکسوتروفیک *S. platensis* گزارش نشده‌اند و فعالیت‌های تنفسی حتی در نور نیز اجازه فعالیت چنین محصولاتی به‌عنوان مهارکننده را نمی‌دهند (مارکونز و همکاران، ۱۹۹۹). علاوه بر این، شرایط کشت مانند کدر شدن محیط در حضور گلوکز زیاد، نور کم در دسترس و تولید مواد جدید می‌تواند مسیرهای اتوتروفی یا هتروتروفی را تغییر دهد (میناس و همکاران، ۲۰۱۶). به‌نظر می‌رسد این پدیده در مقادیر بالاتر گلوکز اتفاق افتاده و مسیرهای اتوتروفی را با مشکل مواجه ساخته است. از طرفی، ارتباط نور و غلظت‌های کم کربن در مقایسه با غلظت‌های بالاتر، به‌صورت هم‌افزاییست و هر دو کشت اتوتروفیک و هتروتروفیک (میکسوتروفیک) به‌صورت بهینه و هم‌زمان انجام می‌شوند (چن و واکر، ۲۰۱۱). مثلاً، وزن *Chlorella protothecoides* با افزودن ۳ گرم گلوکز در ۶ روز از ۱۵ به ۲۴ گرم افزایش یافت (پرز گارشیا و همکاران، ۲۰۱۰).

$$\text{Chl, mg l}^{-1} = 13.14 \times A665$$

$$\text{کاروتنوئید (mg l}^{-1}) = [1000 A470 - 2.860 \text{ Chl}] / 221$$

$$\text{آنتوسیانین (mmol l}^{-1}) = A550 / \epsilon b$$

$$\text{فلاونوئیدها (mmol l}^{-1}) = A300 / \epsilon b$$

$$\text{آلوفایکوسیانین (APC, mg l}^{-1}) =$$

$$[1000 (A652-A750) - 208 (A615-A750)] / 5.09$$

$$\text{فایکوسیانین (PC, mg l}^{-1}) =$$

$$[1000 (A615-A750) - 474 (A652-A750)] / 5.34$$

$$\text{فایکواریترین (PE, mg l}^{-1}) =$$

$$[1000 (A562-A750) - (2.41 \text{ PC}) - (0.949 \text{ APC})] / 9.62$$

$$\text{فایکوبیلی پروتئین (mg l}^{-1}) = \text{APC} + \text{PC} + \text{PE}$$

$$y_{\text{پروتئین}} = 0.856x + 0.5686 \quad (R^2 = 0.953)$$

$$y_{\text{کربوهیدرات}} = 4.8494x + 0.1421 \quad (R^2 = 0.9042)$$

تحلیل آماری: جهت تعیین آثار هر فاز بر پارامترهای مختلف، تمامی صفات ۷ مرتبه طی ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند. نرم‌افزار MSTATC برای تعیین میانگین، انحراف معیار و تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ آزمون دانکن بر اساس طرح کاملاً تصادفی استفاده شد.

نتایج و بحث

وزن تر و خشک در انتهای آزمایش، تغییرات نسبتاً مشابهی را نشان دادند (جدول ۱) و تیمارهای به‌ترتیب ۰/۵، ۰ و ۱ گرم گلوکز اوزان بیش‌تری

جدول ۱- مقایسه صفات *S. platensis* در کشت‌های اتوتروفی (0 g l^{-1}) و میکسوتروفی.

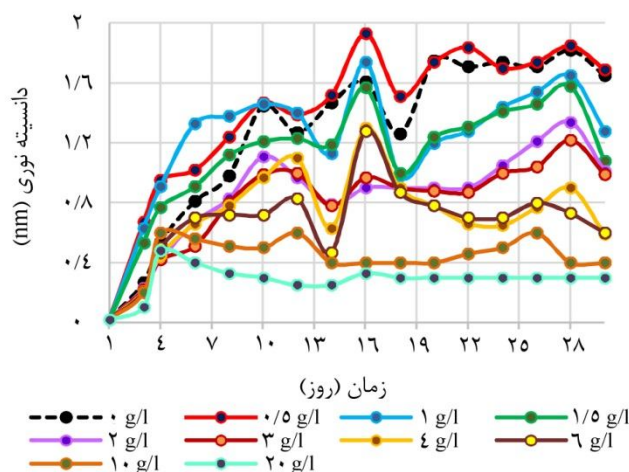
شاخص تحمل (درصد)	وزن خشک (g)	وزن تر (g)	گلوکز (g l^{-1})
۱۰۰ B	۱/۲۸۴ B	۸/۸۶۴ B	۰
۱۰۲/۴۷ A	۱/۳۱۶ A	۹/۰۶۳ A	۰/۵
۷۷/۲۳ C	۰/۹۹۲ C	۷/۰۲۳ C	۱
۶۴/۹۱ D	۰/۸۳۴ D	۶/۰۲۸ D	۱/۵
۶۰/۶۰ E	۰/۷۷۸ E	۵/۶۸۰ E	۲
۵۹/۳۷ E	۰/۷۶۲ E	۵/۵۸۰ E	۳
۳۴/۷۳ F	۰/۴۴۶ F	۳/۵۹۰ F	۴
۳۵/۳۴ F	۰/۴۵۴ F	۳/۶۴۰ F	۶
۲۳/۰۲ G	۰/۲۹۶ G	۲/۶۴۵ G	۱۰
۱۶/۸۶ H	۰/۲۱۷ H	۲/۱۴۸ H	۲۰

الفبای یکسان، اختلاف معنادار با سطح ۰/۰۵ در آزمون دانکن ندارند.

به ترتیب ۰/۵، ۰، ۱ و ۱/۵ گرم گلوکز بیش‌ترین دانسیته نوری را داشتند. یک چرخه کامل با تمامی فازها و یک چرخه تا اواسط فاز ثبات در محیط کشت زاروک بدون گلوکز، با رنگ سیاه و حالت مقطع در شکل دیده می‌شود. بیش‌ترین دانسیته نوری آن، مربوط به پایان رشد نسبی چرخه دوم و پس از تطبیق سلول‌ها با محیط کشت خود در روز ۲۸ ام است. بنابراین حداکثر تولید در محیط زاروک به دوره کشت ۲۸ روزه نیاز دارد. اما در تیمار ۰/۵ گرم، دانسیته نوری در روز ۱۶ ام به اوج رسیده و پیش‌رسی دیده می‌شود. کوتاه‌ترین چرخه‌ها و بیش‌ترین شیب‌ها در رشد نمایی تیمارهای ۴ و ۶ گرم دیده شدند و به دلیل فرار از شرایط تنش در محیط اتفاق افتاد. تیمارهای ۱۰ و ۲۰ گرم نیز دارای کم‌ترین و یکنواخت‌ترین رشد بودند که تنها امکان بقا را فراهم آوردند. در تمامی محیط‌ها، ارتباط میان نور و غلظت زیاد کربن سبب تداخل چرخه‌های اتوتروفی و هتروتروفی شده و دوره فاز ثابت را افزایش می‌دهد (چن و واکر، ۲۰۱۱). بنابراین تیمارهای دارای گلوکز بسیار بالا، منحنی‌های رشد یکنواخت با فازهای ثبات طولانی دارند.

شاخص تحمل، بالاترین درصد تحمل تنش در تیمارهای طی فصل رشد را در مقایسه با تیمار شاهد (۱۰۰ درصد) می‌سنجد. این شاخص در تیمار ۰/۵ گرم گلوکز به بالاترین مقدار رسید (جدول ۱). بر این اساس، مقادیر بالا و محیط کشت بسیار غلیظ، عامل تنش برای بیومس است؛ اما باید دید که می‌توان این تنش را در جهت هدایت چرخه سلولی به سمت تولید مواد خاص کنترل کرد.

جهت تمایز چرخه زندگی بر اساس فازهای رشد، مقادیر در قالب اندازه‌گیری دانسیته نوری به صورت روزانه در طول موج ۷۵۰ نانومتر انجام و در شکل ۱ آورده شد. با توجه به انتخاب دوره مناسب رشد، ۲-۳ مرتبه شروع فاز جدید رشدی در هر تیمار دیده شد؛ بنابراین حداقل ۱ چرخه کامل زندگی برای هر تیمار وجود دارد. در تیمارهای موفق، چرخه اول در حدود ۱۸ روز به طول انجامید و دارای کم‌تر از ۱ روز رشد تاخیری، ۳ روز رشد نمایی، ۱۴ روز رشد نسبی و ۲ روز فاز ثبات می‌باشد؛ در چرخه دوم نیز ۲ روز رشد نمایی، ۸ روز رشد نسبی و سپس شروع فاز ثبات مشهود است. میان تمامی تیمارها، تیمارهای دارای



شکل ۱- منحنی رشد *S. platensis* در فتویوراکتور دارای غلظت‌های مختلف گلوکز.

۴ آورده شده‌اند. تیمارهای ۰، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر گلوکز با به ترتیب ۰/۸۸، ۰/۸۶ و ۰/۸۲ گرم بر لیتر بالاترین میزان پروتئین را داشتند. مجدداً تیمارهای میکسوتروفی در ۵ روز زودتر (۱۵ در برابر ۲۰ روز) به بالاترین مقادیر رسیدند. هر چند در سایر مطالعات دوره کشت ۲۵ روزه توصیه شد (پندی و تیواری، ۲۰۱۰)، به نظر می‌رسد که دوره رشد ۲۰ روزه جهت استحصال پروتئین مناسب باشد. بر اساس نتایج مطالعات پیشین، کشت *S. maxima* در محیط دارای ۱ درصد ویناز سبب تولید ۷۶/۵ درصد پروتئین، ۶/۴ درصد کربوهیدرات و ۱۱/۵ درصد لیپید شد (سانتوز و همکاران، ۲۰۱۶). همچنین کشت *S. platensis* در ۱-۲ گرم بر لیتر ملاس چغندر قند با افزایش تا ۷۷ درصد محتوای پروتئین همراه بود (سانتوز و همکاران، ۲۰۱۶). چراکه مواد محلول سلول مانند پلی‌ساکارید، اسید آمینه آزاد، هورمون و سایر ترکیبات آلی در حضور منابع کربن بیش‌تر است (هو و همکاران، ۲۰۱۲). با این حال در مطالعات دیگری، الگوی بیان پروتئین در شرایط اتوتروفی و هتروتروفی فاقد تفاوت معنی‌دار بود (یانگ و همکاران، ۲۰۰۲) و یا کشت هتروتروف اثر مهارکنندگی بر رشد داشت (پرز

شکل ۲- الف، غلظت سلول که با استفاده از جذب تصحیح‌شده نمونه‌ها و به صورت غیرمستقیم از منحنی استاندارد به دست آمد را در طول فصل رشد نشان می‌دهد. تیمارهای ۰/۵ (۱/۵۱ گرم در روز ۱۵)، ۰ و ۱ (۱/۳۵ گرم در روز ۱۵) بیش‌ترین و ۱۰ و ۲۰ گرم گلوکز کم‌ترین سلول را داشتند. تیمارهای میکسوتروفی در ۵ روز زودتر (۱۵ در برابر ۲۰ روز) به این غلظت رسیدند. در پژوهشی افزایش معنی‌دار وزن در کشت ۲۵ روزه *S. maxima* در زاروک گزارش شد (پندی و تیواری، ۲۰۱۰). در صورت تمرکز بر بیومس، تیمار دارای ۰/۵ گرم گلوکز از محیط اصلی زاروک بهتر بود. افزایش ۱۳۸/۵ درصد غلظت سلول‌ها با افزودن ۰/۵ گرم گلوکز در برخی جنس‌ها نیز گزارش شد (چن و همکاران، ۲۰۰۶؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۴). در این محیط‌ها، گلوکز برای تنظیم افزایشی ژن‌های رشد *bkt*، *chy-b* و *pds* استفاده می‌شود (سان و همکاران، ۲۰۰۸). هر چند مطالعاتی مبنی بر کاهش معنی‌دار غلظت سلول با افزایش غلظت گلوکز وجود دارند (میناس و همکاران، ۲۰۱۶؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

عملکرد یا میزان پروتئین موجود در جلبک در شکل ۲- ب و شاخص برداشت یا درصد آن در شکل

کمک نمود. این در حالیست که افزایش سایر منابع کربن مانند بی‌کربنات (کستا و همکاران، ۲۰۰۴) و کربن دی‌اکسید (کیم و همکاران، ۲۰۱۳) بر تولید کربوهیدرات و رشد این جلبک با اثر مشابه و مثبت همراه نبود. تیمار ۶ و ۴ گرم گلوکز با ۰/۴۹ و ۰/۴۶ گرم بر لیتر بیش‌ترین میزان و شاخص برداشت را داشتند (شکل ۲- ج و ۴). بخشی از این ترکیبات جهت تنظیم اسمزی (گلايسين بتاين) و سایرین جهت حفظ چرخه‌ها و بقای سلول‌ها (ساکارز، ترهالوز و گلوکوزیل گریسرول) به‌کار می‌روند (رید و همکاران، ۱۹۸۴). از طرف دیگر، ممکن است که این مکانیسم از سنتز پروتئین تا زمان عرضه نیتروژن مجدد در محیط و افزایش نسبت نیتروژن به کربن، حمایت کند (گرانم و همکاران، ۲۰۰۲). نتایج مشابهی در گونه‌های دیاتوم مانند *Achnanthes brevipes* و *Tetraselmis spp* در شرایط گرسنگی نیتروژن گزارش شد (گوئرینی و همکاران، ۲۰۰۰). با این وجود، برخی مقدار کربوهیدرات را از جمله عوامل مؤثر در گونه‌های *Klebsormidium* ندانستند (کاپلان و همکاران، ۲۰۱۲).

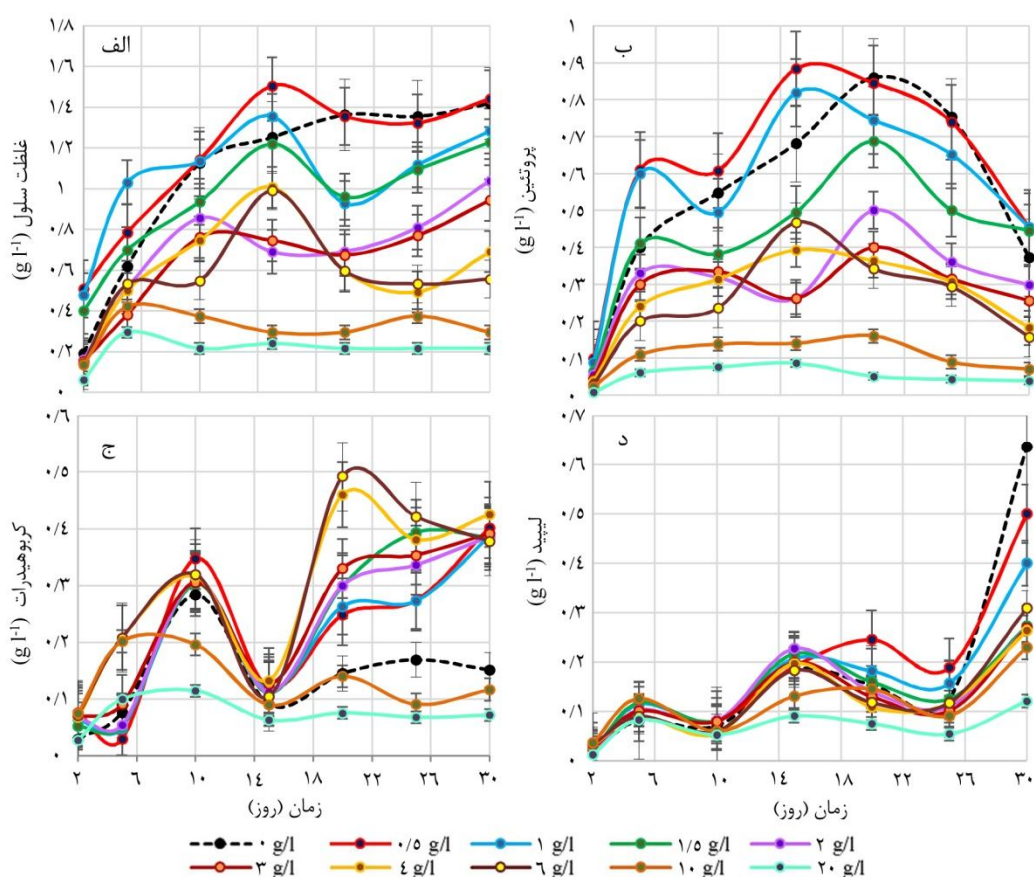
تیمارهای ۰، ۰/۵ و ۱ گرم با ۰/۶۴، ۰/۵۰ و ۰/۴۰ گرم بر لیتر بیش‌ترین لیپید را تولید کردند (شکل ۲- د). میزان تولید در روز ۳۰ ام یا پایان رشد نسبی در چرخه دوم به اوج رسید که ممکن است به دلیل زمان بر بودن انباشت این ماده در جلبک باشد. چراکه پروتئین و کربوهیدرات در شرایط تنش به منظور بهبود تنفس و کاهش اثر مهارکنندگی غلظت زیاد گلوکز بر رشد، به لیپید تجزیه می‌شوند (ژانگ و همکاران، ۱۹۹۹). در حالی‌که در ابتدای رشد، تقویت فعالیت فتوسنتزی به غلظت بالاتر گلوکز برای رفع نیازهای اولیه و تولید کلروفیل، پروتئین و کربوهیدرات بیش‌تر نیاز دارد. بنابراین، فصل کشت ۳۰ روزه جهت برداشت لیپید ضروری است. اما

گارشی و همکاران، ۲۰۱۱). در این پژوهش، نقاط اوج و فرود نمودار تولید پروتئین بر نقاط نمودار دانسیته نوری و رشد جلبک کاملاً منطبق بود. بنابراین، تیمارهای دارای رشد بیش‌تر، پروتئین بیش‌تری را نیز تولید کردند. اسیدیته مطلوب این محیط‌ها یکی از عوامل مؤثر بر این موفقیت بود (پندی و تیواری، ۲۰۱۰). شاخص برداشت پروتئین، در ابتدای فصل رشد دارای بالاترین، در اواسط دوره رشد نسبی دارای افت سریع (با امکان پیش‌بینی اتمام فاز رشد نسبی) و در انتهای آن دارای پایین‌ترین درصدها بود. کاهش معنی‌دار شاخص برداشت در دوره‌های گفته شده، به دلیل بیومس بسیار زیاد، آب درون بافتی بیش‌تر و در نتیجه شاخص توده‌ای پایین‌تر و البته تبدیل پروتئین به سایر ترکیبات روی داده است. بالاترین درصد شاخص برداشت در تیمار ۰/۵ و ۰ گرم گلوکز و در روز ۵ ام به ۷۷/۶ و ۶۴/۵ درصد رسید.

میزان و درصد کربوهیدرات در روز ۲۰ ام (اواسط تا انتهای رشد نسبی در چرخه اول و ابتدای چرخه دوم) افزایش یافت، بنابراین حداقل دوره کشت جهت استحصال کربوهیدرات ۲۰ روز می‌باشد. افزایش کربوهیدرات تا اواسط فاز نسبی ادامه یافت؛ در انتهای چرخه اول از میزان آن به شکل معنی‌داری کاسته شد و در چرخه دوم، روند افزایشی سریعی را ادامه داد (شکل ۲- ج). کاهش انباشت کربوهیدرات در ابتدای رشد و کاهش تولید در آستانه شروع چرخه دوم، ممکن است به دلیل نیاز بالای سلول‌ها برای شکستن این ماده و تبدیل آن به سایر بلوک‌های مورد نیاز در رشد و سلول‌سازی باشد. هر چند این نکته قابل توجه است که مقادیر کم‌تر گلوکز، مقدار کربوهیدرات بیش‌تری را در نیمه ابتدایی رشد (روز ۱۰) انباشت نمودند. بنابراین دسترسی جلبک به گلوکز محیط کشت، سبب کاهش تولید آن شد؛ ولی همین دسترسی در طولانی‌مدت به ساخت بیش‌تر کربوهیدرات‌ها

کشت‌های میکسوتروفی *Chlorella sp* (۲۰ گرم بر لیتر؛ لیزینگ و همکاران، ۲۰۱۱)، *C. vulgaris* (۲۰ گرم بر لیتر؛ کنگ و همکاران، ۲۰۱۱) و *C. sorokiniana* (وان و همکاران، ۲۰۱۲) نیز دیده شد. هم‌چنین افزایش بهره‌وری لیپید با افزایش غلظت گلوکز تا زمانی که نور عامل محدودکننده نباشد، برای برخی گونه‌ها گزارش شد (میناس و همکاران، ۲۰۱۶؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۴)؛ اما توانایی تولید لیپید این گونه در چنین غلظت‌های بالایی قبلاً اندازه‌گیری نشده بود (شکل ۴).

تیمارهای دارای گلوکز بیشتر، شاخص برداشت لیپید بالاتری را تولید نمودند؛ و تیمارهای ۱۰، ۲۰ و ۶ گرم گلوکز به ترتیب ۷۷/۸، ۵۶/۰ و ۵۵/۵ درصد لیپید داشتند. بنابراین، درصد لیپید با میزان تنش رابطه مستقیم و با تقسیم یا نرخ رشد رابطه عکس دارد. افزایش لیپید در کشت‌های هتروتروفی *Auxenochlorella protothecoides* (۳۰ g l⁻¹) گرم بر لیتر؛ هردیا آرویو و همکاران، ۲۰۱۰)، *C. vulgaris*، *Botryococcus braunii* و *Scenedesmus sp* (۲ درصد؛ چوی و یو، ۲۰۱۵) و



شکل ۲- تغییرات الف. غلظت سلولی؛ ب. پروتئین، ج. کربوهیدرات، د. لیپید *S. platensis* در غلظت‌های مختلف گلوکز.

درصد) گرم گلوکز بالاترین مقادیر را در روز ۳۰ ام (انتهای دومین چرخه تقسیم) داشت (شکل ۳- الف). بنابراین تیمارهای دارای حداکثر رشد، تقسیم و

تنها کلروفیل *S. platensis*، کلروفیل آ است که در محیط‌های دارای ۰/۵ (۰/۰۴۶ گرم، ۳/۵ درصد)، ۰ (۰/۰۴۵ گرم، ۳/۲ درصد) و ۱ (۰/۰۴۲ گرم، ۳/۱

مستقیم با یکدیگر داشته باشند و پاسخ یکسانی به شرایط محیطی دهند؛ هر چند مطالعات پیش‌تر و تخصصی‌تر لازم است. تیمارهای به‌ترتیب ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۰ گرم گلوکز با ۰/۰۶۱، ۰/۰۵۷، ۰/۰۵۰ و ۰/۰۳۱ گرم بر لیتر بالاترین آنتوسیانین را داشتند (شکل ۳-د). افزایش ۲۵ درصد آنتوسیانین با افزودن کربن دی‌اکسید نیز گزارش شده بود (کیم و همکاران، ۲۰۱۳).

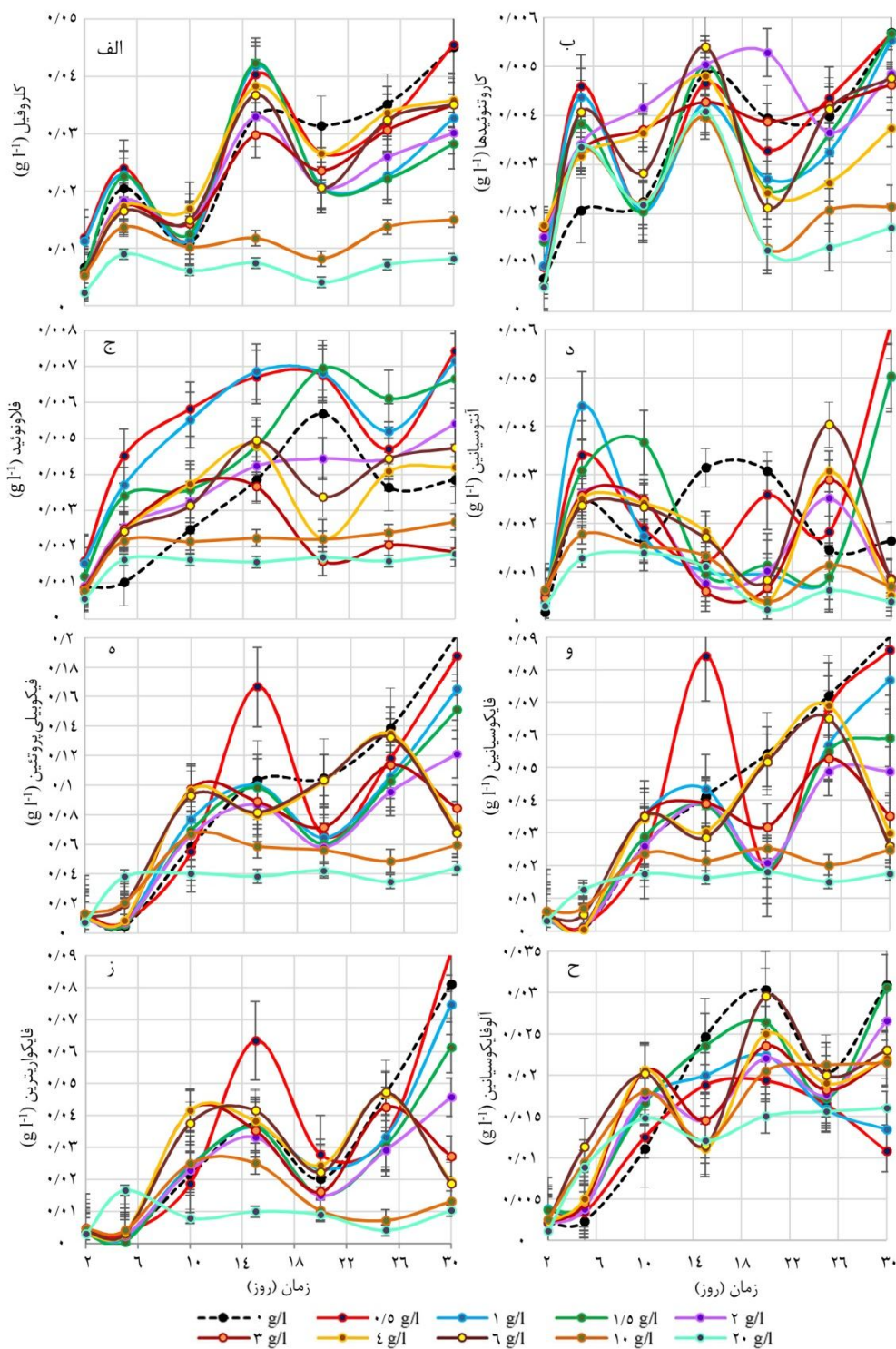
رنگدانه‌های فتوسنتزی کمکی مانند فایکوبیلی‌پروتئین‌ها برای بهبود استفاده از انرژی نور می‌باشند (پالز و همکاران، ۲۰۰۴). به‌طور طبیعی، تمام رنگدانه‌ها در شرایط اتوتروفیک تولید می‌شوند، اما شگفت‌آور است که برخی از آن‌ها در مقادیر زیادی در شرایط هتروتروف و تاریک تولید شوند (دلکامپو و همکاران، ۲۰۰۷). ۰، ۰/۵ و ۱ گرم گلوکز با ۰/۲۰، ۰/۱۹ و ۰/۱۷ گرم بر لیتر بیش‌ترین میزان، و ۴ و ۶ گرم با ۲۷/۳ درصد و ۲۴/۸ درصد بالاترین شاخص برداشت مجموع فایکوبیلی‌پروتئین‌ها را داشتند (شکل ۳-ه و ۴). در مطالعه‌ای، افزودن ۲ گرم گلوکز سبب افزایش بیومس، فایکوسیانین و آلفافایکوسیانین تا میزان ۲/۵۷، ۰/۲۸ و ۰/۱۳ گرم در *S. platensis* شد، که بسیار بالاتر از کشت فوتوتوتروف (به‌ترتیب ۱/۱، ۰/۱۲ و ۰/۰۴ گرم) بود (چن و همکاران، ۲۰۰۶). البته غلظت زیاد گلوکز دارای اثر مهارکنندگی بر فایکوسیانین است (ژانگ و همکاران، ۱۹۹۹). هر چند بیش‌ترین میزان فایکوبیلی‌پروتئین‌ها هماهنگ با حداکثر رشد دیده شد؛ نمودار هر یک از اجزای آن تابع نمودار رشد نبود. بنابراین، این سه رنگدانه دارای رابطه مستقیم با یک دیگر نیستند و کاملاً مستقل از هم به شرایط محیطی پاسخ می‌دهند. تیمارهای ۰ و ۰/۵ گرم گلوکز به‌ترتیب ۰/۰۶۹ و ۰/۰۵۷ گرم بر لیتر در مرتبه نخست میزان فلاونوئید قرار گرفتند (شکل ۳-ج). شاخص برداشت تیمارهای ۶، ۱۰ و ۲۰ گرم نیز به بالاترین مقادیر رسید (شکل ۴). به‌نظر می‌رسد که تولید کاروتنوئید، آنتوسیانین، فلاونوئید و لیپید رابطه

پروتئین، بیش‌ترین کلروفیل را تولید نمودند که در انتهای چرخه حداکثر شد. افزون بر رنگدانه اصلی فتوسنتز - کلروفیل، جلبک دارای رنگدانه فتوسنتزی کمکی مانند کاروتنوئیدها برای حفاظت در برابر تابش خورشیدی است (پالز و همکاران، ۲۰۰۴). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزیمی مانند کاروتنوئیدها در پاسخ به تنش با کاهش برخی رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (چن و همکاران، ۲۰۰۶). تیمارهای ۰/۵، ۱/۵، ۰، ۱ و ۶ گرم گلوکز با ۰/۰۵۷، ۰/۰۵۷، ۰/۰۵۶، ۰/۰۵۵ و ۰/۰۵۴ گرم بر لیتر بیش‌ترین کاروتنوئیدها را در روز ۳۰ ام (دومین چرخه تقسیم) تولید کردند (شکل ۳-ب). شاخص برداشت تیمارهای ۶، ۱۰ و ۲۰ گرم گلوکز، از طرفی با توجه به بیومس کم‌تر و تنش بیش‌تر در آن‌ها و از طرف دیگر به‌دلیل افزایش شاخص برداشت این ماده در تنش‌های محیطی، به‌خصوص در اواخر رشد بالا بود (شکل ۴). این روند متناظر با افزایش شاخص برداشت لیپید اتفاق افتاد و رابطه مستقیم تولید لیپید و کاروتنوئیدها را نشان می‌دهد. افزایش بیومس، لیپید و کاروتنوئید در کشت میکسوتروف گزارش شده بود؛ اما پایداری تولید کاروتنوئید دیده نشد (میناس و همکاران، ۲۰۱۶). در مطالعه دیگری، میزان کلروفیل، کاروتنوئیدها و فایکوسیانین در رشد هتروتروفیک *S. platensis* بسیار کم شد؛ ولی محتوای کاروتنوئیدها در کشت میکسوتروف مشابه با کشت اتوتروف بود (مارکوئز و همکاران، ۱۹۹۵).

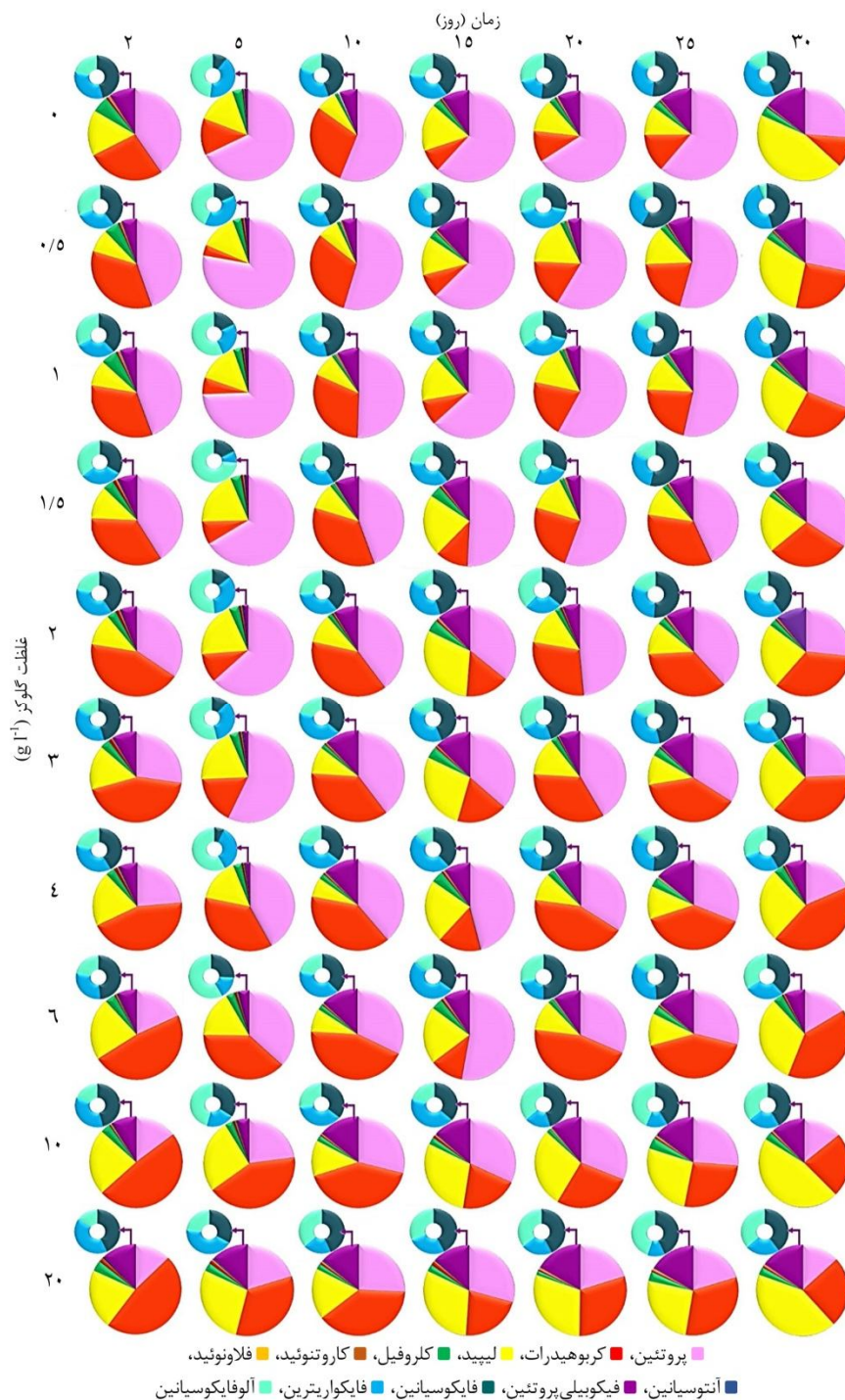
فلاونوئید نیز در تیمارهای دارای رشد و تقسیم بیش‌تر، افزایش یافت. به این ترتیب تیمارهای به‌ترتیب ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۰ گرم گلوکز با ۰/۰۷۴، ۰/۰۷۱، ۰/۰۶۹ و ۰/۰۵۷ گرم بر لیتر در مرتبه نخست میزان فلاونوئید قرار گرفتند (شکل ۳-ج). شاخص برداشت تیمارهای ۶، ۱۰ و ۲۰ گرم نیز به بالاترین مقادیر رسید (شکل ۴). به‌نظر می‌رسد که تولید کاروتنوئید، آنتوسیانین، فلاونوئید و لیپید رابطه

هتروتروفیک *S. platensis*، ۴ برابر کم شد؛ ولی در کشت میکسوتروف تقریباً مشابه با کشت اتوتروف بود (مارکوئز و همکاران، ۱۹۹۵).

مطالعه‌ای ارتقای فایکوسیسانین تا ۰/۱۲ گرم با کاربرد ۲ گرم گلوکز گزارش شد (چن و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه دیگری، میزان فایکوسیسانین در رشد



شکل ۳- تغییرات رنگدانه‌های *S. platensis* در غلظت‌های مختلف گلوکز طی آزمایش ۳۰ روزه.



شکل ۴- مقایسه ترکیب ماکرومولکولی (درصد) *S. platensis* در کشت فتوتروف و میکسوتروف طی آزمایش ۳۰ روزه.

نتیجه گیری کلی

بر این اساس، غلظت کربن مطلوبی برای رشد بهینه وجود دارد که پس از آن، اثر مهارکنندگی غلظت بالای گلوکز رخ می‌دهد. مصرف کل کربن با میزان

کارامدی متابولیسم و انتقال از غشای سلولی تخمین زده می‌شود (آزما و همکاران، ۲۰۱۱). این روند و انتقال یون در سراسر غشای سلولی وابسته به پروتون است (دی‌سواف و همکاران، ۲۰۰۳) که می‌تواند با

نیز بر اساس هدف کشت متفاوت بوده و از ۲۰ تا ۳۰ روز متغیر بود.

رهیافت ترویجی

در این پژوهش، کشت موفق و استحصال قابل توجه بیومس و مواد اصلی جلبک *S. platensis* که از گونه‌های زراعی بسیار نوپا در کشور است، انجام شد. کشت موفق این جلبک در شرایط میکسوتروفیک بیانگر امکان کشت آن در عصاره ملاس و ضایعات کارخانه قند و شکر دارد. مقادیر مواد مؤثره مختلف و اساسی در تیمارهای پیشنهاد شده، امکان کاربرد آن در صنایع غذایی و دارویی را بیان می‌نماید. به این ترتیب تامین بخشی از غذای روزانه با کشت پیشنهادی در این پژوهش، به افزایش سلامت اجتماع از لحاظ فردی و محیطی کمک شایانی خواهد کرد. از طرفی، با توجه به افزایش مشکلات اقتصادی کشور، تولید این جلبک برای کاربرد مستقیم و غیرمستقیم در صنایع غذایی، آرایشی-بهداشتی و دارویی سبب بهبود کارایی اقتصادی بخش‌های تولیدکننده، کاهش مصرف انرژی و مواد، تصفیه پساب کارخانه‌ها، اجرای برنامه‌های حفظ آب، کاهش وابستگی به واردات مواد اولیه، افزایش صادرات و افزایش شغل در شهرستان‌ها می‌شود.

کشت در عصاره ملاس بر پایه نتایج حاصل از شبیه‌سازی کشت آن در محیط‌های میکسوتروف در این پژوهش، کشت در تیمارهای هورمونی و مطالعه برهمکنش‌ها، کشت در بیوراکتورهای بزرگ و استخرهای روباز، تخمین روابط استوکیومتری فتوسنتز این جلبک در شرایط اتوتروفی و میکسوتروفی، مطالعه پروفایل پروتئین، لیپید و کربوهیدرات جهت تولید بهینه و کاربرد در موارد مصرف خاص، متعادل نمودن عناصر غذایی و مواد مؤثره جلبک جهت

گلوکز محیط به شکل مطلوبی تامین شود. اگرچه گلوکز به‌عنوان محصول نهایی فتوسنتز، امکان تولید انرژی زیاد (بویل و همکاران، ۲۰۰۹) و جذب سریع برای تولید ترکیبات و مواد مؤثره سلول را دارد (گارشیا گونزالز و همکاران، ۲۰۰۵)، آثار چاپ شده متمرکز بر اثر گلوکز بر محصولات با ارزش جلبک *S. platensis* کم است. زیرا گمان می‌شد که میکروجلبک‌ها نمی‌توانند از منابع کربن خارجی استفاده کنند و *S. platensis* به‌عنوان یک اتوتروف اجباری شناخته می‌شد (اوگاوا و آبی، ۱۹۸۱؛ میناس و همکاران، ۲۰۱۶). اگرچه در رشد هتروتروفیک *Spirulina*، گلوکز فقط برای حفظ متابولیسم تخمیر می‌شود (مارکوئز و همکاران، ۱۹۹۵)، کشت میکسوتروف آن باورهای پیشین را تغییر داد.

با توجه به نتایج، تیمارهای به‌ترتیب ۰/۵، ۰ و ۱ گرم بر لیتر گلوکز بیش‌ترین وزن تر (۸/۸۶۴، ۹/۰۶۳) و ۷/۰۲۳ گرم بر لیتر) و خشک (۱/۳۱۶، ۱/۲۸۴ و ۰/۹۹۲ گرم بر لیتر) را داشتند. قرار گرفتن محیط مرسوم کشت یا تیمار شاهد فاقد گلوکز در کشت اتوتروفی در ردیف دوم قابل‌توجه است و موفقیت‌آمیز بودن کاربرد ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز در کشت میکسوتروفی این جلبک را اثبات می‌نماید. البته هر تیمار اجرا شده در این پژوهش، جهت تولید ماده مؤثره خاصی بهترین تیمار بود. ۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز جهت افزایش غلظت سلول، پروتئین، کلروفیل، کاروتنوئید، فلاونوئید، آنتوسیانین و فایکواریترین (به‌ترتیب ۱/۵۱، ۰/۸۸، ۰/۰۴۶، ۰/۰۰۵۷، ۰/۰۰۷۴، ۰/۰۰۶۱ و ۰/۰۹۱ گرم بر لیتر)؛ ۶ و ۴ گرم بر لیتر گلوکز جهت افزایش کربوهیدرات (به‌ترتیب ۰/۴۹ و ۰/۴۶ گرم بر لیتر) و نهایتاً تیمار فاقد گلوکز (اتوتروفی) جهت افزایش لیپید، فایکوسیانین و آلفایکوسیانین (به‌ترتیب ۰/۶۴، ۰/۰۹۰ و ۰/۰۳۱ گرم بر لیتر) کارآمدترین تیمارها بودند. دوره کشت بهینه

ایمنی انسان و حیوانات، مطالعه و توسعه مراحل نوین تکنولوژیکی تولید و فرآورده‌های مبتکرانه در تکنولوژی غذایی و نهایتاً مطالعه و ارائه روش‌های کارآمد جهت افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان از ترکیبات فراسودمند و لزوم مصرف آن‌ها به صورت روزانه نیز به سایر پژوهشگران پیشنهاد می‌شود.

کاربرد در رژیم‌های غذایی انسانی، دام، طیور، آبزیان و فرآورده‌های غذایی و دارویی، مطالعه و ارائه روش‌های بدون خطر و بر پایه مواد خوراکی در جداسازی و استخراج مواد مؤثره مختلف جهت کاربرد رنگدانه‌ها و سایر ترکیبات در مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی، بررسی آثار مثبت و منفی کاربرد ترکیبات مختلف این جلبک بر سیستم گوارشی و

منابع

1. Araújo, O.Q.F., Medeiros, J.L., Yokoyama, L., and Morgado, C.R.V. 2015. Metrics for sustainability analysis of post-combustion abatement of CO₂ emissions: Microalgae mediated routes and CCS (carbon capture and storage). *Energy*, 92: 556-8.
2. Becker, E.W. 2007. Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advance*, 25: 207-10.
3. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Biochemical Physiology*, 37: 911-7.
4. Borowitzka, M.A. 2013. High-value products from microalgae: their development and commercialization. *Applied Phycology*, 25: 743-56.
5. Boyle, N.R., and Morgan, J.A. 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, Pp: 3-4.
6. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
7. Chen, F., Zhang, Y., and Guo, S. 1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters*, 18: 603-8.
8. Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.S., Yang, F., and Bai, Y. 2006. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. *Bioresource Technology*, 97: 2260-5.
9. Chen, Y.H., and Walker, T. 2011. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology Letters*, 33: 1973-83.
10. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 3. 294-306.
11. Coca, M., Barrocal, V.M., Lucas, S., González-Benito, G., and García-Cubero, M.T. 2015. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food Bioprod Process*, 94: 306-12.
12. Costa, J.A.V., Colla, L.M., and Filho, P.F.D. 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed batch process. *Bioresource Technology*, 92: 237-41.
13. Del Campo, J.A., García-González, M., and Guerrero, A.M. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Microbial Biotechnology*, 74: 1163-74.
14. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 3. 350-6.
15. Granum, E., Kirkvold, S., and Myklestad, S.M. 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: dual variations and effects of N depletion. *The Marine Ecology Progress Series*, 242: 82-93.

16. Griffiths, M., Garcin, C., Hille, R., and Harrison, S. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Microbiological Methods*, 85: 119-23.
17. Hu, B., Min, M., Zhou, W., Du, Z., Mohr, M., Chen, Zhu, J., Cheng, Y., Liu, Y., and Ruan, R. 2012. Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. *Bioresource Technology*, 126: 71-79.
18. Kaplan, F., Lewis, L.A., Wastian, J., and Holzinger, A. 2012. Plasmolysis effects and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (*Streptophyta*). *Protoplasma*, 249: 789-804.
19. Kim, K., Hoh, D., Ji, Y., Do, H., and Lee, B. 2013. Wilhelm Holzzapfel Impact of light intensity, CO₂ concentration and bubble size on growth and fatty acid composition of *Spirulina platensis* KMMCC CY-007. *Biomass bioenergy*, 49: 181-187.
20. Krizek, D.T., Britz, S.J., and Mirecki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth cv. New Leaf Fire lettuce. *Physiol Plantarum*, 103: 1-7.
21. Madhavi Shekharam, K., Venkataraman, L.V., and Salimath, P.V. 1987. Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga, *Spirulina platensis*. *Phyahtmiwy*, 26: 8. 2267-9.
22. Marker, A.F.H. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Fresh water biology*, 2: 4. 361-85.
23. Marquez, F.J., Nishio, N., Nagai, S., and Sasaki, K. 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. *Chemical, Technology and Biotechnology*. 62: 159-64.
24. Marquez, F.J. 1999. Reassessment of the bioenergetic yield of *Arthrospira platensis* using continuous culture. *Microbial biotechnology*, 15: 209-11.
25. Minhas, A.K., Hodgson, P., Barrow, C.J., and Adholeya, A. 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front Microbiology*, 3: 7. 546-65.
26. Ogawa, T., and Terui, G. 1970. Studies on the growth of *Spirulina platensis*. I. On the pure culture of *Spirulina platensis*. *Fermentation Technology*, 48: 361-7.
27. Pandey, J.P., and Tiwari, A. 2010. Optimization of Biomass Production of *Spirulina maxima*. *Algal Biomass Utilization*, 1: 2. 20-32.
28. Perez-Garcia, O., de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., and Bashan, Y. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Phycology*, 46: 800-12.
29. Santos, R.R., Araújo, O.Q., Medeiros, J.L., and Chaloub, R.M. 2016. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*, 204: 38-48.
30. Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Zilli, M., and Converti, A. 2008. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering*, 3: 369-75.
31. Stengel, D., Connan, and Popper, Z. 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29: 483-501.
32. Sun, N., Wang, Y., Li, Y.T., Huang, J.C., and Chen, F. 2008. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (*Chlorophyta*). *Process Biochemistry*, 43: 1288-92.

33. Tarko, T., Duda-Chodak, A., and Kobus, M. 2012. Influence of Growth Medium Composition on Synthesis of Bioactive Compounds and Antioxidant Properties of Selected Strains of *Arthrospira* Cyanobacteria. *Czech J. Food Sci.* 30: 258-67.
34. Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R., and Stewart, W.P.D. 1984. Osmotic adjustment in cyanobacteria from hypersaline environment. *Archives of Microbiology*, 138: 333-7.
35. Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93.
36. Wang, S.B., Chen, F., Sommerfeld, M., and Hu, Q. 2004. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 220: 17-29.
37. Wellburn, A.R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiology*, 144: 3. 307-13.
38. Yang, C., Hua, Q., and Shimizu, K. 2002. Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 813-22.
39. Zarrouk, C. 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler Ph.D. Thesis, University of Paris.
40. Zhang, X., Rong, J., Chen, H., He, C., and Wang, Q. 2014. Current status and outlook in the application of microalgae in biodiesel production and environmental protection. *Front Energy Resources*, 2: 1-32.
41. Zhang, X.W., Zhang, Y.M., and Chen, F. 1999. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 34: 477-81.

