



## تغلیظ کشت جلبکی تتراسلمیس (*Tetraselmis suecica*) به روش سانتریفیوژ و تاثیر ویتامین های C و E بر میزان بازماندگی و شاخص های آنالیز تقریبی

فرزانه زمانیان<sup>۱\*</sup>، فرناز رفیعی<sup>۲</sup>، عبدالمحمد عابدیان کناری<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- استادیار، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی

۳- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۸/۱۳

\*نویسنده مسئول مقاله: fzamanian31@gmail.com

### چکیده:

کنسانتره ریزجلبک *Tetraselmis suecica* تولید و اثرات ویتامین های C و E در افزایش ماندگاری و ارزش های غذایی آن طی ۸ هفته نگهداری در دمای یخچال (4°C) بررسی شد. برای تغلیظ کشت جلبکی، ابتدا کشت انبوه جلبک مورد نظر تا مرحله رشد لگاریتمی در محیط کشت استاندارد کانوی انجام شد و پس از تعیین میزان زنده مانده سلول ها، با روش سانتریفیوژ توسط دستگاه خامه گیر تغلیظ شد. کنسانتره های جلبکی سپس تحت تیمارهای ویتامینی شامل ویتامین C، ویتامین E و ترکیب مساوی دو ویتامین (همگی به میزان وزنی/وزنی ۰/۱٪) قرار گرفتند. تراکم جلبک در کنسانتره جلبکی حاصل از این روش حدود ۱۰۹ × ۱/۳۸ سلول در میلی لیتر و بازده تولید حدود ۱/۷ گرم به ازای هر لیتر محیط کشت بود. نتایج نشان داد که میزان زنده مانده تیمار ویتامین E در انتهای دوره ۳۹/۹۹±۲/۱٪ و نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود (p>۰,۰۵) که مبین اثر مثبت نگه دارنده ها می باشد. نتایج آنالیز تقریبی نیز نشان داد که تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها کمترین تغییرات رطوبت (۸۶/۸٪)، تیمار ویتامین C بالاترین میزان پروتئین (۳۶/۶٪) و کمترین میزان خاکستر (۳۹/۹٪) و تیمار حاوی ترکیب مساوی دو ویتامین بالاترین میزان چربی (۱۳/۴٪) در طی دوره نگه داری را داشتند. مقادیر pH نیز در تیمار ویتامین C و شاهد کمتر از دو تیمار دیگر بود. در مجموع برای حفظ کیفیت کنسانتره این ریزجلبک، استفاده از ویتامین E و C و نگهداری آن در دمای یخچال پیشنهاد می گردد.

**کلید واژگان:** کنسانتره جلبکی، (*Tetraselmis suecica*)، ماندگاری، ویتامین C و E، سانتریفیوژ، آنالیز تقریبی، pH

## مقدمه

جلبک‌ها گروه بزرگی از گیاهان را تشکیل می‌دهند که قدیمیترین موجودات فتوسنتز کننده و تولید کننده اکسیژن بر روی کره زمین به شمار می‌روند. اگرچه تا به امروز بیش از ۲۵۰۰۰ گونه جلبک گزارش شده است اما تنها حدود ۷۰ گونه از جلبکها به عنوان غذا، علوفه، کود شیمیایی مصرف می‌شوند (Farboodnia, 2010).

آنچه مسلم است امروزه علوم مرتبط با استفاده از فرآورده های نوین با ارزش افزوده با سرعت زیادی در حال توسعه است و در این راستا می توان از کنسانتره های جلبکی در عرصه علوم جلبک شناسی نام برد. کنسانتره جلبکی در واقع یک محصول تغلیظ شده از سلولهای جلبک می باشد که به طرز صحیحی جمع آوری گردیده و با افزودن مواد نگاهدارنده مناسب در شرایط نگهداری مطلوب تا مدتها قابل استفاده می باشد. به طور معمول از هر ۲۰۰۰ لیتر محیط کشت و پرورش جلبک زنده در حدود ۴ لیتر Slurry و ۳ لیتر Paste که به ترتیب کنسانتره های رقیق و غلیظ جلبکی می باشند به دست می آید (Nunes et al., 2009). تولید کنسانتره جلبکی دارای معایب می باشد که محققین در جهت رفع آنها به تحقیقات خود ادامه میدهند. از جمله مهمترین معایب کنسانتره های منجمد شده نرخ رسوب سریعتر نسبت به جلبک زنده، امکان تخریب جداره سلولی جلبکها و آزاد شدن مواد آلی درون آنها به درون آب و عدم تولید اکسیژن توسط جلبکهای منجمد در آب می باشد (Heasman et al., 2001).

از نظر اقتصادی قیمت کنسانتره ای جلبکی نسبتا بالا و بر حسب گونه های مختلف در حال حاضر هر کیلو حدود ۲۰۰ تا ۴۰۰ دلار می باشد (Heasman et al., 2001). در این خصوص شرکتها و موسسات خصوصی در دنیا وارد

عرصه تولید و صادرات این محصول به تمام نقاط دنیا گردیده اند. اینگونه شرکتها معمولا تمایلی به ارائه روش کار و تکنیکهای تولید این محصول نداشته، لذا لازم است تا در این زمینه تحقیقات کاربردی در داخل کشور توسعه یافته تا به تکنولوژی تولید انبوه کنسانتره ها و سایر فرآورده های جلبکی برای تامین نیازهای داخلی و در صورت بازاریابی مناسب صادرات ارزآور آن نائل گردید. تولید کنسانتره جلبکی دارای چندین مزیت نسبت به جلبک زنده به شرح زیر می باشد

۱- کنسانتره جلبکی دارای غلظت بالایی می باشد و فضای کمی برای نگهداری نیاز دارد.

۲- با افزودن سطوح متفاوت نگاهدارنده های مواد غذایی می توان آنها را برای مدتی نسبتا طولانی استفاده نمود.

۳- مدیریت نگهداری از کنسانتره جلبکی بهتر از کشتهای تازه است

۴- کنسانتره جلبکی در صورت نیاز، می تواند حتی در شرایط کنترل شده به منظور عدم آلودگی آنها به انواع میکروارگانیسمها تولید شود.

۵- برای تولید آنها نیازی به استفاده از سموم و انواع کودها نمیباشد.

۶- از نقطه نظر اقتصادی تولید تجاری کنسانتره جلبکی در حجمهای بزرگ اقتصادی و قابل رقابت است

تکنیک های مختلفی برای تغلیظ کشتهای جلبکی وجود دارد که از جمله می توان به فلوکولاسیون،

فیلتراسیون و سانتریفیوژ اشاره نمود (Nunes et al.,

2009). در روش فلوکولاسیون یا ترسیب و انعقاد ریز جلبکها، از مواد مختلفی نظیر کلرید آهن، سولفات آهن، سولفات پلی فریک، کلرید آلومینیوم، سولفات آلومینیوم (آلوم) و کلراید پلی الومینیوم استفاده شده است (Ives

( 1959; Tenney et al., 1969; knuckey et al.2006 ). همچنین فلوکولاسیون ریزجلبک‌ها با استفاده از بیوپلیمر کیتوزان با موفقیت در برخی از گونه‌های جلبکی گزارش شده است (Lubian, 1989). جمع آوری ریزجلبک‌ها از طریق سانتریفیوژ کردن، از جمله تکنیک‌های موفق جهت برداشت میکروجلبک‌ها در مقیاس‌های انبوه بوده (Becker, 1994) و مورد پسند بیشتر برنامه نویسان تغذیه آبزیان واقع شده است (Griffith et al., 1973; Waston, 1986; Donaldson, 1989). فرایند سانتریفیوژ امکان ذخیره سازی تعداد زیادی از سلول‌ها را در حجم کم فراهم می‌کند (Palanichamy and Rani, 2004). همچنین سانتریفیوژ موجب افزایش تحمل نیروی جاذبه توسط جلبک می‌گردد (Wheaton, 1977) به این معنی که با بکار بردن نیروی گریز از مرکز سرعت ته نشین شدن آن به نسبت افزایش پیدا می‌کند. روش سانتریفیوژ مقدار باکتری‌های موجود در کشت جلبک را کاهش داده و دوره ذخیره سازی کنسانتره را بهبود می‌بخشد (Aji, 2011). با توجه به اینکه غلظت جلبک‌های حاصل از سانتریفیوژ معمولاً بالا می‌باشد، معمولاً پس از سانتریفیوژ و جمع آوری جلبک‌ها، غلظت آنرا با استفاده از محلول سوپرناتانت حاصل در حد مطلوب رقیق می‌نمایند. این روش با وجود مزایای اشاره شده مشکلاتی نیز دارد. در این فرایند از آنجا که سلول‌ها در معرض نیروی جاذبه بالا قرار می‌گیرند ممکن است به ساختار سلول صدمه وارد شود. (Aji, 2011). بهره‌برداری از کنسانتره جلبکی به‌عنوان جایگزین برتر سلول‌های زنده، عرصه‌ای کاربردی و اقتصادی در حوزه علم جلبک‌شناسی ایجاد نموده است. با توجه به کاربردهای مختلف این محصول در زمینه‌های ارزشمندی همچون تغذیه آبزیان، تولید ترکیبات زیستی، داروها و محصولات آرایشی، تولید سوخت‌های زیستی و غیره که

همگی نیازمند تولید انبوه جلبک‌ها، جمع‌آوری و نگهداری مناسب از سلول‌های جلبک می‌باشند. ریزجلبک (*Tetraselmis suecica*) از دسته جلبک‌های سبز است که به خاطر وجود ۴ تاژک بلند در یک طرف سلول بنام تتراسلمیس نامیده می‌شود. اندازه آن حدود ۲۰ تا ۳۰ میکرون است و بدلیل وجود تاژک‌ها همیشه در محیط آبی متحرک است و مانند یک زئوپلانکتون فعال در زیر میکروسکوپ نوری حرکت آن قابل مشاهده است. از طریق تقسیم شدن تکثیر می‌یابد و سلول‌ها بصورت انفرادی بوده بیشتر آنها در آب‌های لب‌شور و کاملاً شور یافت می‌شوند ولی قدرت تکثیر و رشد در آب‌های شور بیشتر است (Heasman et al., 2001). این ریزجلبک در آبرزی پروری و صنایع دارویی و غذایی به خوبی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. از آنجا که در تولید کنسانتره‌های جلبکی نحوه کشت انبوه، شیوه تغلیظ و کنسانتره نمودن و همچنین ترکیبات مواد نگهدارنده بر اساس گونه‌های متفاوت متغیر می‌باشد، هدف این تحقیق آن است تا با بهینه‌سازی محیط کشت و افزودن ویتامین‌های E و C بصورت مجزا و ترکیب آنها، گونه تتراسلمیس را بصورت کنسانتره جلبکی برای مدت حدود ۸ هفته با حفظ خواص کیفی اولیه نگهداری نمود. تاکنون در دنیا، افزودن ویتامین‌های E و C به عنوان مواد افزودنی نگهدارنده به کنسانتره جلبکی تتراسلمیس گزارش نشده است.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه نمونه جلبکی :

ذخیره اولیه گونه تتراسلمیس از پژوهشکده نرمتنان سازمان تحقیقات شیلات ایران واقع در بندر لنگه تهیه و توسط یونولیت حاوی یخ و در شرایط دمایی خنک شده به محل انجام تحقیق منتقل گردید. جهت بررسی سلامت

**تغلیظ کشت جلبکی با استفاده از سانتریفوژ:**

در این روش جمع آوری جلبکها توسط سانتریفیوژ (Arasan cream separator, Turkey) جداسازی ترکیبات معلق محلول که در واقع نوعی از دستگاه خامه گیر با حجم بالا و شتاب ۱۲۰۰۰g بود صورت پذیرفت (Csordas, 2004). پس از رسوب و جمع شدن جلبکها در قسمت داخلی روتور دستگاه، جلبکهای تغلیظ شده جمع آوری و به ظروف استریل جداگانه منتقل شدند. تراکم جلبک در کنسانتره جلبکی حاصل از این روش حدود  $10^9 \times 1/38$  سلول در میلی لیتر و بازده تولید حدود ۱/۷ گرم به ازای هر لیتر محیط کشت بود.

**افزودن ویتامین ها به عنوان مواد نگهدارنده، نگهداری جلبکها و نمونه برداری های دوره ای:**

در این مرحله افزودنی های مورد نظر شامل ویتامین C، ویتامین E و ترکیب مساوی دو ویتامین (همگی به میزان ۱/۰٪) به ظروف اضافه شده و سپس هموزن گردید (Nunes et al., 2009). تیمارهای مذکور در سه تکرار با تیمار شاهد که فاقد افزودنی بود مقایسه شدند. کنسانتره تولید شده به مدت ۸ هفته در شرایط محیط تاریک یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگاهداری و هر ۷-۱۵ روز یکبار (بر اساس نوع آزمایشات لازم) مورد نمونه برداری قرار گرفتند. بمنظور انجام آزمایشات آنالیز تقریبی (بجز شاخص رطوبت) ابتدا نمونه های مورد لزوم در آن ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲-۱۴ ساعت خشک و نمونه های خشک شده به روش (Bezerra Neto et al., 1994, Moura junior et al., 2007) مورد آنالیز قرار گرفتند.

**آنالیز تقریبی (AOAC, 1995, 2005):**

قبل از انجام آنالیز تقریبی به منظور محاسبه دقیق شاخصهای مورد نظر، از آنجا که نمونه ها ی جلبک حاوی

نمونه های تهیه شده ابتدا میزان زنده مانی سلولها با استفاده از میکروسکوپ نوری و لام هماسیتومتر بررسی و پس از اطمینان از خلوص نمونه ها و عدم آلودگی آنها توسط سایر گونه های جلبکی، استوکهای کاملا خالص جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

**بهینه سازی شرایط کشت**

کشت اولیه جلبک مذکور در محیط کشت کانوی (Laing, 1991) در مقادیر ۱۰۰ و سپس ۱۰۰۰ میلی لیتری و تحت شرایط کنترل شده در انکوباتور ژرمیناتور با دمای  $24 \pm 1$  و اجدا لامپهای فلورسنت با شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس، pH= ۷/۵-۸/۶ و شوری ۴۰ PPT توام با هوادهی، کشت داده شد. (Lavens, 1996 Sorgheloos and). پس از کشت اولیه جلبکها سپس در ظروف ۱۰ لیتری و به میزان ۲۰۰ لیتر مورد کشت انبوه قرار گرفتند. در این مرحله میزان نور با استفاده از دستگاه لوکسی متر در ۳۵۰۰ لوکس تنظیم و به منظور حصول به حداکثر رشد در مرحله لگاریتمی جلبکها به مدت ۱۰ روز با هوادهی و تنظیم دمای محیط مورد کشت قرار گرفتند. از آنجا که میکرو جلبک تتراسلمیس یک گونه ی آب شور است و شوری بهینه در شرایط استاندارد برای پرورش آن حدود ۴۰ قسمت در هزار می باشد. برای کشت این میکرو جلبک از آب دریای خزر با شوری ۱۲ قسمت در هزار به عنوان محلول پایه استفاده شد و با اضافه نمودن نمک دریا به میزان لازم، شوری آب در حد ۴۰ قسمت در هزار و با استفاده از دستگاه رفرکتومتر (Atago Co., Japan) تنظیم گردید. قبل از اضافه کردن محیط کشت جلبک و استوک جلبکی، آب را به مدت ۳۰ دقیقه زیر اشعه UV قرار داده شد تا کاملا استریل شود (Tompkins et al., ۱۹۹۵).

املاح محیط کشت هستند ابتدا املاح آنها به روش شوری زدایی (Fernandez و همکاران ۱۹۸۹) حذف شد. در این خصوص نمونه ها در دو نوبت با استفاده از محلول بیکربنات آمونیوم ۴ درصد شستشو و پس از سانتریفیوژ (۱۵۷ g بمدت ۵ دقیقه) سوپرناتانت تخلیه و در انتها با آب مقطر شستشو داده و پس از سانتریفیوژ مجدد و تخلیه سوپرناتانت نمونه ها به آون با دمای مورد لزوم هر شاخص منتقل و پس از خشک شدن نهایی مورد سنجش قرار گرفتند.

#### - سنجش میزان پروتئین به روش کلدال:

ابتدا ۰,۰۵ گرم کنسانتره جلبکی که قبلا شوری زدایی شده بود توزین و به لوله های شیشه ای هضم دستگاه کجلدال منتقل گردید و به آن حدود ۱,۵ گرم سولفات پتاسیم، ۰,۱۵ گرم سولفات مس، ۸ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد و تا هنگام سبز شدن محتویات بالن محلول حرارت داده شد. دما به تدریج به ۴۰۰ درجه رسانده شد تا به ملایمت بجوشد. جوشاندن ۲-۳ ساعت به طول انجامید تا محلول شفافی به دست آمد که نشاندهنده فرایند هضم بود. بعد از آن حدود نیم ساعت تامل نموده تا لوله ای هضم حاوی نمونه ها سرد شده و سپس ۱۰ سی سی آب مقطر به هر لوله اضافه گردید و در جایگاه مخصوص در دستگاه کجلدال قرار داده شد. سپس مقدار درصد پروتئینی که دستگاه نشان داد، ثبت گردید.

#### - سنجش میزان چربی به روش Folch:

ابتدا مقدار ۰,۱ گرم نمونه خشک جلبک توزین و به همراه ۸۰۰ میکرولیتر متانول و سپس ۱۶۰۰ میکرو لیتر کلروفرم در دکانتور ریخته و به خوبی هموژن شد. همچنین ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلرید سدیم افزوده شد ( این مراحل ۳ نوبت تکرار گردید). نمونه های جلبکی در این مرحله ۴۰ دقیقه در معرض ترکیبات فوق قرار گرفتند. سپس محلول

فوق در سانتریفیوژ ۱۵۷ g به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و لایه رویی تخلیه گردید. لایه زیرین که حاوی مواد آلی است از صافی عبور داده و در ویال شیشه ای (که قبلا کاملا خشک و توزین گردیده است) ریخته و سپس توسط گاز نیتروژن عمل حلال پرانی تا خشک شدن کامل ویال مذکور ادامه یافت. سپس ویالها در آون ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سرد شدن در دسیکاتور محدا توزین گردیدند. میزان چربی بر حسب درصد از طریق رابطه ۱ به دست آمد.

$$100 \times (\text{وزن نمونه} / \text{وزن ظرف} - \text{وزن ظرف و چربی}) =$$

درصد چربی: رابطه ۱

#### - سنجش میزان خاکستر

ابتدا ۰,۰۲ گرم نمونه شوری زدایی شده کنسانتره جلبک در بوته چینی که قبلا توزین (وزن اولیه) شده بود ریخته شد و در داخل کوره با دمای ۶۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه ها در داخل دسیکاتور به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه نگهداری و سرد شد و با ترازوی دیجیتالی توزین و نتایج حاصله به عنوان وزن ثانویه ثبت و میزان خاکستر نمونه با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید.

$$\text{وزن نمونه} \times 100 / \text{وزن اولیه} - \text{وزن ثانویه} = \text{میزان}$$

خاکستر: رابطه ۲

#### - سنجش میزان رطوبت

ابتدا لوله های آزمایش به مدت ۳ ساعت در اتو با حرارت ۱۰۳ درجه سانتیگراد قرار داده شد، پس از سرد کردن در داخل دسیکاتور توزین گردید، این عمل آنقدر تکرار شد تا وزن لوله های آزمایش ثابت و به عنوان وزن اولیه ثبت گردید. سپس ۰,۵ گرم نمونه ی تر کنسانتره جلبکی شوری زدایی شده در لوله های مذکور ریخته شد و به مدت ۲-۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد آون قرار گرفتند.

## نتایج

## آنالیز تقریبی نمونه

- نتایج سنجش رطوبت

میانگین میزان رطوبت نمونه‌های مورد آزمایش در ابتدای دوره  $۸۵,۸۶ \pm ۰/۹۵$  اندازه‌گیری شد که میزان آن در تیمار شاهد طی دوره نگهداری در مقایسه با روز صفر دارای افزایش بود، اما این افزایش در روزهای نمونه‌گیری با نوسان همراه بود. بعد از گذشت ۱۵ روز نگهداری مقدار آن افزایش یافت و با اختلاف معنی داری بالاتر از روز صفر وجود داشت ( $P < ۰,۰۵$ ) اما این افزایش، اختلاف معنی داری با روز ۳۰ و ۴۵ نداشت ( $P > ۰,۰۵$ ). در روز ۶۰ دوره نگهداری در افزایش این مقدار نسبت به روز صفر اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P > ۰,۰۵$ ) ولی میزان آن در روز ۱۵ با اختلاف معنی داری بالاتر از روز صفر این دوره بود ( $P < ۰,۰۵$ ). در تیمار ویتامین C با اختلاف معنی داری، رطوبت بالاتر از تیمارهای ویتامین E و تیمار حاوی دو ویتامین مشاهده شد ( $P < ۰,۰۵$ ) و میزان این پارامتر در روز ۳۰ نگهداری در دو گروه شاهد و ویتامین C دارای روند کاهشی و در دو تیمار ویتامین E و تیمار حاوی دو ویتامین دارای روند افزایشی بوده به طوری که در روز مذکور این میزان در بین گروه‌ها دارای اختلاف معنی داری نبود ( $P > ۰,۰۵$ ). مقدار رطوبت تیمار ویتامین C در روز ۱۵ دوره با اختلاف معنی داری بالاتر از روز صفر مشاهده گردید ( $P < ۰/۰۵$ ) که در این تیمار مقدار مذکور با بالاترین میزان، اختلاف معنی داری با روزهای ۳۰-۴۵ و ۶۰ داشت ( $P < ۰/۰۵$ ). میزان رطوبت تیمار ویتامین E در روز ۴۵ با اختلاف معنی داری بالاتر از روز صفر مشاهده گردید ( $P < ۰/۰۵$ ) که این مقدار با روزهای ۱۵، ۳۰ دوره نگهداری اختلاف معنی داری نداشت ( $P > ۰,۰۵$ ). مقدار رطوبت اندازه‌گیری شده در تیمار

پس از خشک و خنک شدن مجدد در دسیکاتور آنها را وزن کرده (وزن ثانویه) و میزان رطوبت از رابطه ۳ محاسبه شد.

وزن نمونه  $\times ۱۰۰ / \text{وزن اولیه} - \text{وزن ثانویه} = \text{میزان رطوبت}$ : رابطه ۳

## بررسی میزان ماندگاری و ارزیابی تغییرات pH نمونه‌ها:

ابتدا میزان ۱۰۰ میکرولیتر از کنسانتره جلبکی به وسیله ۹۰۰ میکرولیتر آب شور ۴۰ گرم بر لیتر رقیق گردید و از محلول حاصل ۱۰۰ میکرولیتر به زیر لام هموسیتومتر منتقل و تعداد سلولهای زنده و متحرک از رابطه ۴ محاسبه گردید.

$$۱۰۰ \times \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{شده شمارشهای سلول کل تعداد}} = \text{درصد زنده مانی: رابطه ۴}$$

برای سنجش میزان pH نمونه‌ها ابتدا میزان ۲۰۰ میلی گرم نمونه کنسانتره تر جلبکی (بدون شوری زدایی) در لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۱,۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از رقیق شدن نمونه‌های جلبکی میزان pH نمونه‌ها در دمای اتاق با استفاده از دستگاه pH متر مدل ۳۵۱۰ ساخت شرکت Jenway انگلستان اندازه‌گیری گردید (Suvanich و همکاران، ۲۰۰۰).

## پردازش آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تحقیق از نرم افزار SPSS و برای رسم نمودارها از Excel ۲۰۱۰ استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی گردیده و پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و برای بررسی وجود اختلاف‌ها و تفاوت‌های معنی دار بین میانگین نمونه‌ها از آزمون چند دامنه ای Tukey با سطح معنی دار ۹۵٪ استفاده شد. سطح اطمینان آماری تحقیق  $P = ۰/۰۵$  در نظر گرفته شد.

حاوی دو ویتامین نشاندهنده این بود که در روز ۴۵ مقدار آن با اختلاف معنی داری بالاتر از روز صفر وجود داشت (P < ۰/۰۵) اما مقدار مذکور با روزهای ۱۵ و ۳۰ دارای اختلاف معنی داری (P > ۰/۰۵) نبود (جدول ۱).

جدول ۱ تغییرات میزان رطوبت جلبک تتراسلمیس (بر حسب درصد) در تیمارهای مختلف، در طول مدت زمان نگهداری دردمایی خچال (۴ ° C)

زمان نگهداری (روز) تیمار	صفر	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
شاهد	۸۵,۸۶۵±۰,۹۵۱ <sup>c</sup>	۹۲,۵۷۴±۱,۲۳۸ <sup>ABa</sup>	۸۸,۴۱۱±۵,۲۷۷ <sup>abc</sup>	۹۰,۷۴۵±۰,۴۲۶ <sup>Bab</sup>	۸۶,۸۰۰±۰,۶۴۹ <sup>Babc</sup>
ویتامین C	۸۵,۸۶۵±۰,۹۵۱ <sup>c</sup>	۹۴,۱۵۵±۰,۷۲۴ <sup>Aa</sup>	۹۱,۳۲۱±۱,۴۲۸ <sup>b</sup>	۹۲,۰۵۴±۱,۰۵۶ <sup>ABb</sup>	۹۱,۶۹۹±۰,۱۹۹ <sup>Ab</sup>
ویتامین E	۸۵,۸۶۵±۰,۹۵۱ <sup>c</sup>	۹۰,۹۹۴±۰,۱۱۶ <sup>Ba</sup>	۹۲,۰۹۹±۰,۱۷۰ <sup>a</sup>	۹۲,۲۰۰±۱,۷۳۵ <sup>ABa</sup>	۸۸,۳۹۶±۱,۷۸۱ <sup>Bb</sup>
ویتامین C+E	۸۵,۸۶۵±۰,۹۵۱ <sup>c</sup>	۹۱,۹۸۲±۱,۲۱۲ <sup>Ba</sup>	۹۲,۵۰۰±۰,۴۸۲ <sup>a</sup>	۹۳,۵۳۴±۰,۸۲۳ <sup>Aa</sup>	۸۸,۷۱۵±۱,۶۲۴ <sup>Bb</sup>

حروف کوچک در هر ردیف نشاندهنده اختلاف معنی دار در سطح P < ۰/۰۵ در هر تیمار در طول نمونه برداری است. حروف بزرگ در هر ستون نشاندهنده اختلاف معنی دار در سطح P < ۰/۰۵ در بین تیمارها در هر هفته نمونه برداری است. عدم وجود حروف در هر ستون در ردیف نشاندهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح P > ۰/۰۵ است. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار سه تکرار گزارش شده‌اند. ویتامین‌های C و E در کنسانتره جلبکی به میزان ۰/۱٪ و مخلوط ویتامین‌های E و C به نسبت مساوی هر کدام به میزان ۰/۰۵٪ اضافه شده است.

#### - نتایج سنجش پروتئین

داری بیشتر از روزهای ۶۰-۱۵-۳۰ و صفر وجود داشت (P < ۰/۰۵). مقدار پروتئین تیمار حاوی دو ویتامین، دارای روند افزایشی بوده ولی در طی دوره نگهداری اختلاف معنی داری نداشت (P > ۰/۰۵).

مقایسه گروه های آزمایشی بیانگر این است که در روز ۴۵ با بالاترین میزان خود در تیمار شاهد ویتامین E مشاهده شد به نحوی که با اختلاف معنی داری بالاتر از تیمار ویتامین C و تیمار حاوی دو ویتامین وجود داشت (P < ۰/۰۵) و همچنین مقدار پروتئین روز ۶۰ دوره نگهداری در تیمار ویتامین C با اختلاف معنی داری بالاتر از تیمار ویتامین E ارزیابی شد لذا تیمار ویتامین C از نظر دارا بودن بالاترین مقدار پروتئین در انتهای دوره نگهداری (روز ۶۰) بهترین تیمار بود (جدول ۲).

میانگین میزان پروتئین در ابتدای دوره نگهداری در گروه های آزمایشی ۲,۳۸ ± ۳۳,۹۰ ارزیابی شد. با گذشتن زمان، تیمار شاهد دارای روند افزایشی بود. در روز ۴۵ مقدار آن دارا ایالاترین میزان، که با اختلاف معنی دار بیشتر از روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ ارزیابی شد (P < ۰/۰۵) که مقدار مذکور با روز ۶۰ اختلاف معنی داری نداشت (P > ۰/۰۵). مقدار پروتئین گروه ویتامین C نیز دارای روند افزایشی بوده که در روز ۶۰ دوره نگهداری با بالاترین مقدار با اختلاف معنی داری بیشتر از روزهای صفر و ۳۰ مشاهده شد (P < ۰/۰۵) و مقدار مذکور با روزهای ۱۵ و ۴۵ اختلاف معنی داری نداشت (P > ۰/۰۵). میزان پروتئین تیمار ویتامین E، دارای کاهش و افزایش بوده است به نحوی که در روز ۴۵ بالاترین مقدار آن مشاهده، که با اختلاف معنی

جدول ۲ تغییرات میزبان پروتئین جلیک تتراسلیمیس (بر حسب درصد) در تیمارهای مختلف، در طول مدت زمان نگهداری در دمای یخچال (۴ °C)

زمان نگهداری (روز) تیمار	صفر	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
شاهد	۳۳,۹۰۴±۲,۳۸ <sup>bc</sup>	۳۲,۲۱۲±۰,۷۰۴ <sup>Bc</sup>	۳۴,۷۷۳±۱,۱۴۳ <sup>bc</sup>	۳۷,۸۸۷±۱,۰۷۲ <sup>Aa</sup>	۳۶,۳۲۹±۱,۰۶۶ <sup>Aab</sup>
ویتامین C	۳۳,۹۰۴±۲,۳۸	۳۵,۲۳۰±۰,۵۱۹ <sup>A</sup>	۳۴,۱۳۲±۰,۷۵۵	۳۵,۰۹۵±۰,۵۷۱ <sup>B</sup>	۳۶,۶۴۹±۰,۵۹۸ <sup>A</sup>
ویتامین E	۳۳,۹۰۴±۲,۳۸ <sup>b</sup>	۳۰,۶۱۰±۰,۲۳۷ <sup>Bd</sup>	۳۲,۶۷۰±۱,۷۵۲ <sup>bc</sup>	۳۷,۷۵۰±۱,۴۵۲ <sup>Aa</sup>	۳۰,۴۷۴±۱,۰۳۶ <sup>Bd</sup>
ویتامین C+E	۳۳,۹۰۴±۲,۳۸	۳۵,۳۶۹±۲,۹۵۷ <sup>A</sup>	۳۴,۲۷۲±۱,۹۴۲	۳۵,۲۷۸±۱,۳۷۲ <sup>B</sup>	۳۵,۰۰۴±۳,۰۱ <sup>A</sup>

حروف کوچک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0,05$  در هر تیمار در طول نمونه برداری است. حروف بزرگ در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0,05$  در بین تیمارها در هر هفته نمونه برداری است. عدم وجود حروف در هر ستون در نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح  $P > 0,05$  است. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار گزارش شده‌اند. ویتامین C، ویتامین E و ترکیب مساوی دو ویتامین (همگی به میزان وزنی/وزنی ۱/۱) اضافه شده است.

#### - نتایج سنجش چربی

تیمارها در طی دوره نگهداری نشان دهنده این است که مقدار چربی در سه گروه دارای ویتامین برخلاف گروه شاهد دارای روند افزایشی بوده است به نحوی که میزان آن در تیمار حاوی دو ویتامین در روز ۱۵ دوره نگهداری دارای بالاترین مقدار (۱۷/۴۳٪) بود و در روز ۶۰ مقدار چربی در تیمار ویتامین C با اختلاف معنی داری بالاتر از تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0,05$ ) که باید توجه داشت که مقدار آن با تیمار ویتامین C و تیمار حاوی دو ویتامین اختلاف معنی داری نداشت ( $P > 0,05$ ) بنابراین نتایج نشان داد که کلیه تیمارها با محتوای ویتامین، در پایان دوره دارای میزان چربی بالاتری از گروه شاهد هستند ولی از این منظر، بهترین تیمار، با دقت به روند افزایشی آن تیمار حاوی دو ویتامین است (جدول ۳).

مقدار اولیه چربی نمونه‌های مورد آزمایش  $0,49 \pm$  ۱۲,۹۴ درصد بود، این میزان در گروه شاهد دارای روند کاهشی بوده به نحویکه بیشترین مقدار آن در روز صفر اندازه گیری و با اختلاف معنی داری بالاتر از روز ۶۰ و ۴۵ دوره نگهداری مشاهده شد ( $P < 0,05$ ). میزان چربی در سه گروه آزمایشی دیگر حاوی ویتامین دارای روندی افزایشی بود. میزان چربی در تیمار ویتامین C با توجه به روند افزایشی آن دارای اختلاف معنی داری نبود ( $P > 0,05$ ). مقدار چربی در تیمار ویتامین E در روز ۱۵ دارای بیشترین مقدار و با اختلاف معنی داری بالاتر از روزهای صفر -۶۰-۳۰ و ۴۵ مشاهده شد ( $P < 0,05$ ). مقدار چربی تیمار حاوی دو ویتامین در روز ۱۵ دوره نگهداری با اختلاف معنی داری بالاتر از روزهای صفر -۶۰-۴۵ ارزیابی شد ( $P < 0,05$ ) ولی مقدار مذکور با روز ۳۰ دارای اختلاف معنی داری نبود ( $P > 0,05$ ). مقایسه



**جدول ۳** تغییرات میزبانچربی جلبک تتراسلمیس (بر حسب درصد) در تیمارهای مختلف، در طول مدت زمان نگهداری در دمای یخچال (۴ °C)

زمان نگهداری (روز) تیمار	زمان نگهداری				
	صفر	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
شاهد	۱۲,۹۴±۰,۴۹ <sup>a</sup>	۱۲,۵۶±۰,۴۳ <sup>ab</sup>	۱۲,۵۲±۰,۳۸ <sup>ab</sup>	۹,۷۳±۳,۰۴ <sup>bB</sup>	۷,۴۷±۰,۴۹ <sup>bB</sup>
ویتامین C	۱۲,۹۴±۰,۴۹	۱۳,۹۳±۰,۵۸ <sup>B</sup>	۱۳,۸۱±۱,۴ <sup>B</sup>	۱۳,۶۶±۰,۶۹ <sup>A</sup>	۱۳,۵۱±۰,۶۲ <sup>A</sup>
ویتامین E	۱۲,۹۴±۰,۴۹ <sup>b</sup>	۱۶±۱ <sup>aA</sup>	۱۳,۸۴±۰,۰۵ <sup>bB</sup>	۱۳,۴±۰,۹۲ <sup>bA</sup>	۱۲,۹۸±۰,۱۸ <sup>bA</sup>
ویتامین C+E	۱۲,۹۴±۰,۴۹ <sup>c</sup>	۱۷,۴۳±۱,۴۹ <sup>aA</sup>	۱۵,۸۳±۱,۱۶ <sup>abA</sup>	۱۴,۲۷±۱,۰۹ <sup>bca</sup>	۱۳,۴۴±۱,۰۱ <sup>ca</sup>

حروف کوچک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0,05$  در هر تیمار در طول نمونه برداری است. حروف بزرگ در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0,05$  در بین تیمارها در هر هفته نمونه برداری است. عدم وجود حروف در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح  $P > 0,05$  است. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار گزارش شده‌اند.

ویتامین C، ویتامین E و ترکیب مساوی دو ویتامین (همگی به میزان وزنی ۰/۱٪) اضافه شده است.

### -نتایج سنجش خاکستر

روزهای آزمایش اندازه گیری شد ( $P < 0,05$ ) و میزان خاکستر در روزهای دیگر دارای اختلاف معنی داری با هم نبودند ( $P > 0,05$ ). مقدار خاکستر تیمار حاوی دو ویتامین، در روز ۶۰ با اختلاف معنی داری بالاتر از روزهای ۳۰-۱۵-۴۵ و روز صفر اندازه گیری شد ( $P < 0,05$ ) و میزان خاکستر در روزهای صفر-۱۵-۳۰ و ۴۵ دارای اختلاف معنی داری نبود ( $P > 0,05$ ). میزان خاکستر تمامی تیمارهای آزمایشی در پایان دوره نگهداری (روز ۶۰) با وجود افزایش دارای اختلاف معنی داری ( $P > 0,05$ ) نبودند (جدول ۴).

میانگین میزان خاکستر در ابتدای دوره نگهداری تیمارهای آزمایشی  $2/65 \pm 24/84$  بود. میزان خاکستر در تیمار شاهد در روز ۶۰ با اختلاف معنی داری بالاتر از روز ۳۰ و سایر روزهای نمونه گیری مشاهده شد ( $P < 0,05$ ). مقدار خاکستر تیمار ویتامین C در روز ۶۰ با اختلاف معنی داری بالاتر از روز ۳۰-۱۵ و روز صفر ارزیابی شد ( $P < 0,05$ ) لذا مقدار مذکور با روز ۴۵ دارای اختلاف معنی داری نبود ( $P > 0,05$ ). میزان خاکستر ویتامین E در طول دوره نگهداری در روز ۶۰ با اختلاف معنی داری بالاتر از سایر

**جدول ۴** تغییرات میزان خاکستر جلبک تتراسلمیس بر حسب درصد در تیمارهای مختلف، در طول مدت زمان نگهداری در دمای یخچال (۴ °C)

زمان نگهداری (روز) تیمار	زمان نگهداری				
	صفر	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
شاهد	۲۴,۸۴±۲,۶۵ <sup>b</sup>	۲۰,۸۳±۳,۹۱ <sup>ABbc</sup>	۱۸,۵۴±۲,۹۲ <sup>Bb</sup>	۲۲,۲۲±۲,۳ <sup>bc</sup>	۳۱,۲۷±۲,۹۹ <sup>a</sup>
ویتامین C	۲۴,۸۴±۲,۶۵ <sup>b</sup>	۱۹,۳±۱,۹۸ <sup>c</sup>	۲۴,۶۸±۰,۱۸ <sup>Ab</sup>	۲۷,۱۹±۱,۶۲ <sup>ab</sup>	۲۹,۹۶±۰,۸ <sup>a</sup>
ویتامین E	۲۴,۸۴±۲,۶۵ <sup>b</sup>	۲۴,۴۹±۰,۲۲ <sup>Ab</sup>	۲۳,۹۶±۱,۴۱ <sup>Ab</sup>	۲۵,۲۹±۳,۷۵ <sup>b</sup>	۳۱,۳۴±۱,۴۹ <sup>a</sup>
ویتامین C+E	۲۴,۸۴±۲,۶۵ <sup>b</sup>	۲۳,۱۵±۲,۴۶ <sup>ABb</sup>	۲۲,۸۸±۲,۲۷ <sup>Ab</sup>	۲۴,۰۴±۱,۶۲ <sup>b</sup>	۳۱,۴۲±۰,۴۲ <sup>a</sup>

حروف کوچک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  در هر تیمار در طول نمونه برداری است. حروف بزرگ در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  در بین تیمارها در هر هفته نمونه برداری است. عدم وجود حروف در هر ستون و ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح  $P > 0.05$  است. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار گزارش شده اند. ویتامین C، ویتامین E و ترکیب مساوی دو ویتامین (همگی به میزان وزنی/وزنی ۰/۱) اضافه شده است.

### نتایج سنجش pH

دارای روند کاهشی معنی داری بودند ( $p < 0.05$ ) البته شایان ذکر است میزان pH در تمامی تیمارها بعد از هفته سوم دارای روند کند افزایشی بود اما مقدار آن در سه هفته (۵-۶-۷) آخر دوره نگهداری در بین تیمارها اختلاف معنی داری ( $P > 0.05$ ) نداشت (جدول ۵)

میزان pH در تیمار شاهد در روز صفر با اختلاف معنی داری بالاتر از هفته سوم بود ( $p < 0.05$ ) و میزان آن نسبت به روز صفر روند کاهشی داشت. میزان pH در سه تیمار دیگر حاوی ویتامین نیز همانند گروه شاهد تا هفته چهارم

جدول ۵ تغییرات میزان pH جلبک تتراسلمیس در تیمارهای مختلف، در طول مدت زمان نگهداری دردمای یخچال ( $4^{\circ}C$ )

زمان نگهداری (هفته) تیمار	صفر	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
شاهد	$8.238 \pm 0.1^a$	$8.042 \pm 0.086^{Aa}$	$7.584 \pm 0.066^{Ab}$	$7.749 \pm 0.101^{Cc}$	$7.784 \pm 0.091^{Cc}$	$7.984 \pm 0.188^c$	$7.283 \pm 0.389^b$	$7.465 \pm 0.124^b$
ویتامین C	$8.238 \pm 0.1^a$	$7.811 \pm 0.42^{Bb}$	$7.463 \pm 0.073^{Bc}$	$7.997 \pm 0.162^{Bde}$	$7.852 \pm 0.059^{Cc}$	$7.021 \pm 0.14^d$	$7.415 \pm 0.67^c$	$7.453 \pm 0.053^c$
ویتامین E	$8.238 \pm 0.1^a$	$8.028 \pm 0.076^{Ab}$	$7.597 \pm 0.08^{Ac}$	$7.719 \pm 0.08^{Ae}$	$7.219 \pm 0.24^{Be}$	$7.05 \pm 0.24^f$	$7.607 \pm 0.05^c$	$7.481 \pm 0.13^d$
ویتامین C+E	$8.238 \pm 0.1^a$	$7.963 \pm 0.083^{ABb}$	$7.614 \pm 0.28^{Ac}$	$7.226 \pm 0.327^{Af}$	$7.350 \pm 0.24^{Ae}$	$7.083 \pm 0.051^E$	$7.545 \pm 0.17^c$	$7.020 \pm 0.45^d$

حروف کوچک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  در هر تیمار در طول نمونه برداری است. حروف بزرگ در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  در بین تیمارها در هر هفته نمونه برداری است. عدم وجود حروف در هر ستون و ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح  $P > 0.05$  است. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار گزارش شده اند. ویتامین C، ویتامین E و ترکیب مساوی دو ویتامین (همگی به میزان وزنی/وزنی ۰/۱) اضافه شده است.

### بحث

تولید انبوه جلبکها، جمع آوری و نگهداری مناسب از سلولهای جلبک می باشند لذا لازم است این امر بدقت مورد تحقیقات عملی در کشور قرار گرفته تا پس از طی مرحله پژوهشی به عرصه تولید انبوه وارد گردد.

امروزه توجه به محصولات با ارزش افزوده در زمینه های مختلف افزایش چشمگیری یافته و تلاش می گردد تا از موجوداتی که در طبقات بالاتر هرم زنجیره غذایی قرار دارند استفاده های مفید تری بعمل آید. در این راستا بهره برداری از کنسانتره جلبکی بعنوان جایگزین برتر سلولهای زنده، عرصه ای کاربردی و اقتصادی در حوزه علم جلبک شناسی ایجاد نموده است. با توجه به کاربردهای مختلف این محصول در زمینه های ارزشمندی همچون تغذیه آبزیان، تولید ترکیبات زیستی، داروها و محصولات آرایشی، تولید سوختهای زیستی و غیره که همگی نیازمند

پس از تولید کنسانتره های جلبکی و به منظور ارزیابی کیفی آنها معمولاً از شیوه ها و شاخصهای مختلف استفاده می شود. از جمله این گونه شاخصها، تراکم و میزان زنده مانی جلبکها عامل مناسبی برای ارزیابی می باشد. این شاخص خود تابع عواملی از قبیل نوع گونه جلبکی، شیوه جمع آوری جلبک و نحوه ذخیره سازی آن می باشد (Salavatian et al. 1385). در تحقیق حاضر میزان

تراکم کنسانتره جلبکی با استفاده از روش سانتریفیوژ حدود  $10^9 \times 1/38$  سلول در میلی‌لیتر به دست آمد که بیانگر آن است که روش سانتریفیوژ به لحاظ تولید کنسانتره با تراکم بیشتر سلولی روشی مناسب می‌باشد. شایان ذکر است که میزان تراکم سلولی تابع اندازه سلول جلبک می‌باشد. با توجه به اندازه متوسط جلبک تتراسلمیس (۲۰-۳۰ میکرون) میزان تراکم سلولی در مقایسه با جلبک ریز اندازه نانوکلوپسیس (۳-۵ میکرون) کمتر بوده است. در مطالعات سایر محققین تراکم خمیر جلبکی یا slurry برای گونه *Chaetoceros mulleri*  $10^6 \times 4$  (Nunes و همکاران، 2009) و برای *Nanochloropsis*  $10^9 \times 65$  سلول در میلی-لیتر (Ludwig و Pfeiffer، 2007) گزارش شده است.

تعیین مقادیر آب در کنسانتره های جلبکی به تبیین شیوه های بهتر، برای نگهداری آنها کمک خواهد نمود. در یک درجه حرارت ثابت، میزان رطوبت یک ماده غذایی (با جذب یا از دست دادن رطوبت) تغییر کرده تا به حالت تعادل با محیط اطراف خود (هوا) در آید. پس از این مرحله ماده غذایی در طول مدت نگهداری نه رطوبتی را جذب مینماید و نه رطوبتی را به محیط پس می‌دهد (Fatemi, 1392). لذا به نظر میرسد در طول مدت دو هفته اول پس از نگهداری کنسانتره جلبکی در ظروف نگهداری، ابتدا کنسانتره رطوبت محیط را جذب نموده و در تمامی تیمارها، از جمله گروه شاهد میزان رطوبت به صورت معنی داری افزایش یافت. اما پس از گذشت دو هفته اول، میزان رطوبت تا پایان دوره نگهداری در تمام تیمارها تقریباً با روندی یکسان، تغییرات محدودی را نشان داد بنابراین در نگهداری کنسانتره جلبک تتراسلمیس، حدود دو هفته زمان برای رسیدن نمونه‌ها به مرحله رطوبت متعادل زمان نیاز خواهد بود.

مطالعات گسترده ای در خصوص سنجش میزان خاکستر در کنسانتره های جلبکی در طی مدت نگهداری گزارش نشده است. اخیراً در طی مطالعه (Amuzad et al., 1392) و (Naghdi et al., 1393) در خصوص کنسانتره های جلبکی نانوکلوپسیس و کیتوسروس روندی افزایشی در میزان خاکستر این جلبکها در همه تیمارها گزارش شده است. در این مطالعات درصد خاکستر به عنوان شاخصی برایشان دادن میزان از دست رفتن ماده آلی در اثر فساد ذکر شده است. به طوری که مدتی بعد از نگهداری مقدار درصد خاکستر افزایش یافته که دلیل آن به از دست رفتن ماده آلی در نتیجه فساد نسبت داده شده و اظهار می‌گردد، اگرچه وزن واقعی خاکستر تغییری نکرد اما درصد آن (به خاطر کم شدن وزن کل در اثر فساد) افزایش یافته است. نتایج تحقیق حاضر با داشتن روند افزایشی میزان خاکستر تیمارها با نتایج مطالعات (Amuzad et al., 1393) (Naghdi et al., 1392) مطابقت داشته است.

در مطالعه حاضر مقایسه گروه های آزمایشی بیانگر این است که تیمار ویتامین C از نظر دارا بودن بالاترین مقدار پروتئین در انتهای دوره نگهداری (روز ۶۰) بهترین تیمار است. افزایش میزان پروتئین در روز ۴۵ دوره نگهداری برای تمامی تیمارها را می‌توان احتمالاً به افزایش میزان پروتئین حاصل از بار میکروبی آنها نسبت داد. نتایج تحقیق حاضر متضاد نتایج مطالعات (Amuzad et al., 1392) و (Naghdi et al., 1393) می‌باشد ولی شایان ذکر است که در مطالعه مذکور مقادیر پروتئین تیمار شاهد در روز صفر با مقادیر آن در مطالعات گذشته توسط (Reiriz et al., 1989) مطابقت داشته است.

در مطالعه حاضر تمامی تیمارهای دارنده افزودنیهای ویتامینی، در پایان دوره دارای میزان چربی بالاتری از گروه شاهد بودند و از این منظر، بهترین تیمار، با توجه به روند

به روز صفر روند کاهشی داشت. میزان pH در سه تیمار دیگر حاوی ویتامین نیز همانند گروه شاهد تا هفته چهارم دارای روند کاهشی معنی داری بودند. البته شایان ذکر است میزان pH در تمامی تیمارها بعد از هفته سوم دارای روند کند افزایشی بود اما مقدار آن در سه هفته (۵-۶-۷) آخر دوره نگهداری در بین تیمارها اختلاف معنی داری نداشت.

علت روند کاهشی شاخص مذکور را برخی، حلالیت بیشتر دی اکسید کربن در آب در دماهای پایین می دانند و منشا دی اکسید کربن را ناشی از وجود فعالیت‌های متابولیسمی میکرو جلبکهای زنده و باکتریهای هوازی در طی دوره نگهداری در ظروف درب بسته دانسته اند. در کنسانتره های جلبکی باغلظت بالا، با گذشت زمان نگهداری به سبب افزایش مصرف اکسیژن توسط سلولها، برای فعالیت‌های متابولیسمی، ذخایر اکسیژنی کاهش یافته و در نتیجه افزایش نرخ مرگ و میر را به دنبال دارد که در پیامد آن تجمع دی اکسید کربن و یا تولید اسیدهای آلی ناشی از فرآیند تجزیه ملوکولها در اثر فرماتاسیون یا آنزیمها و به طور کلی مجموعه تغییرات شیمیایی که در این جریان به وجود می آید باعث کاهش میزان pH شده است (Montaini et al., 1995). برخی دیگر نیز این کاهش را به تجمع فراورده های ثانویه اکسیداسیون مانند آلدهیدها و کتون ها مرتبط دانسته اند Killinceker et al., 2009). در تحقیق حاضر احتمالاً به واسطه افزایش فرآورده های ثانویه اکسیداسیون بعد از هفته اول میزان pH کاهش داشته است و علت افزایش میزان pH بعد از هفته سوم به خاطر افزایش تولید بازهای فرار مثل آمونیاک، تری متیل آمین و دی متیل آمین و ترکیبات نیتروژن دار به خاطر فعالیت آنزیمی باکتری‌ها و آنزیم‌های داخل سلولی دانست. et al., 2005;Manat Kostakiet al., 2009). نتایج تحقیق حاضر

افزایشی آن تیمار حاوی ترکیب مساوی دو ویتامین بوده است. روند کاهشی چربی تیمار شاهد در طی دوره می تواند به علت اکسیداسیون چربیها باشد. افزایش میزان چربی در تیمار ویتامین E و تیمار حاوی ترکیب دو ویتامین در روز ۱۵ دوره نگهداری احتمالاً به سبب افزودن ویتامین E و امولسیفایر به تیمارهای مذکور می باشد که هر دو آنها دارای ساختاری چرب و روغنی می باشند که در آنالیز مقادیر چربی میزان آنها بر افزایش چربی موثر بوده است. نتایج تحقیق حاضر در خصوص میزان چربی اولیه در این تحقیق با میزان آن در مطالعات گذشته توسط Utilling و همکاران ۱۹۸۵ مطابقت داشته و روند کاهشی چربی تیمار شاهد، تیمار ویتامین E و تیمار حاوی ترکیب دو ویتامین با نتایج Arashisara و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مطابقت دارد.

طی تاریخ طولانی مطالعات فساد فرآورده های آبزیان همواره سنجش pH امری متداول بوده است. افزایش pH در طی دوره نگهداری را می توان به خاطر افزایش تولید بازهای فرار مثل آمونیاک، تری متیل آمین و ... به خاطر فعالیت‌های آنزیمی باکتری ها و آنزیم های درونی دانست. با این وجود تغییرات زیاد ذاتی pH تحت تاثیر عوامل بیولوژیک موجود کاربرد آن بعنوان یک شاخص کارآمد فساد با محدودیت روبرو ساخته است (Rehebein و Oehlenschlager, 2009). با این وجود اگرچه pH بتهایی شاخصی کارآمد جهت تعیین کیفیت بحساب نمی آید اما می تواند راهنمایی کارآمد کنترل کیفی هنگام کاربرد همراه با دیگر شاخص های کیفیت باشد (Mahmudzadeh et al., 2010). نتایج مربوط به تغییرات pH تیمارهای مختلف در طی دوره نگهداری در جدول (۳-۸) نشان داده شده است. میزان pH در تیمار شاهد در روز صفر با اختلاف معنی داری بالاتر از هفته سوم مشاهده شد و میزان آن نسبت

شیوه ها و روشهای تولید و نگهداری این محصول در شرایط سرد موضوع جدیدی است که نیاز به بررسی و مطالعات زیاد دارد. لذا در این راستا انجام مطالعات تکمیلی از قبیل استفاده از روش فلوکولاسیون با کیتوزان (بدون تاثیر pH) برای تولید و ماندگاری بیشتر کنسانتره جلبکی تتراسلمیس برای اهداف تحقیقاتی، استفاده از سایر افزودنی‌های غذایی مانند گلیسرول، اسید سیتریک و ترکیب ویتامین‌های C و E به منظور بهبود ماندگاری کنسانتره جلبکی، بکارگیری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی سنتی به منظور لخته سازی جلبک‌ها و بهبود خواص میکروبی کنسانتره جلبکی، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به منظور کنترل رشد و تکثیر باکتری‌ها در کنسانتره جلبکی، سنجش ویتامین‌ها و آمینواسیدها در طی دوره نگهداری کنسانتره جلبکی، بکارگیری روش‌های بسته‌بندی خلا به منظور بهبود خواص کیفی کنسانتره جلبکی می‌تواند در راستای بهبود تولید این گونه فراورده‌های جلبکی مفید واقع گردد.

در جمع‌بندی نهایی نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ویتامین E و ترکیب ویتامین‌های E و C نسبت به گروه کنترل دارای میزان زنده‌مانی بالاتر و فساد اکسیداتیو کمتری بوده و موجب حفظ کیفیت کنسانتره جلبکی تولید شده گردیدند. بنابراین استفاده از ویتامین E و ترکیب ویتامین‌های E و C برای حفظ زنده‌مانی و کیفیت کنسانتره جلبکی توصیه می‌گردد.

منابع:

Aji, L. P. 2011. The use of algae concentrates dried algae and algae substitutes to feed bivalves. *Makara Sains*, 15 (1): 1-8.

AOAC. 2005. *Official Method of Analysis* (17th ed): Association of Official Analytical chemists. Washington, DC2000p.

با مطالعات گذشته توسط (Montaini et al., 1995) مطابقت داشته و متضاد نتایج مطالعات اخیر (Amuzad et al., 1392) و (Naghdi et al., 1393) در خصوص کنسانتره های جلبکی نانوکلوپسیس و کیتوسروس بوده است.

در مطالعه حاضر درصد زنده‌مانی در طی دوره نگهداری یک روند کاهشی را نشان داد و نتایج به دست آمده حاکی از آن است که این میزان در تیمار ویتامین E و تیمار حاوی ترکیب ویتامین‌های E و C همواره با اختلاف معنی داری بالاتر از تیمار شاهد بوده است. شایان ذکر است که تیمار ویتامین E در دو هفته ی پایانی با بالاترین درصد باز ماندگی دارای بهترین تاثیر بود. با این حال تیمار حاوی ویتامین E و مخلوط ویتامین‌های E+C بیشترین بازماندگی را در مقایسه با گروه شاهد داشت که این امر موید نقش مثبت افزودنیها در افزایش کیفیت ماندگاری کنسانتره های جلبکی می باشد. بالاتر بودن درصد زنده‌مانی سلول‌ها در تیمارهای حاوی ویتامین C در این تحقیق را می‌توان به نقش آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی آن نسبت داد (Heasman et al., 2000). همچنین از آنجا که اسکوربیک اسید در آب محلول است و ورود آن به بخش آب گریز غشا سلولی امکان پذیر نیست، چنین فرض می‌شود که رادیکال توکوفرول (ویتامین E) می‌تواند برای احیا شدن توسط اسکوربیک اسید موجود در خارج از غشا به نزدیکی سطح غشا نقل مکان کند و از فرم رادیکالی به صورت احیا شده تبدیل گردد. در واقع حضور ویتامین C میتواند موجب بازگردش ویتامین E و تشدید تاثیر آن در بهبود ماندگاری محصول شود (Gutteridge, Halliwell 1994). در مطالعه حاضر نیز تاثیر متقابل این دو ویتامین می‌تواند از جمله عوامل موثر در بهبود ماندگاری کنسانتره جلبکی تتراسلمیس بوده باشد.

harvested by centrifugation for bivalve mollusks – a summary. *Aquaculture Research*, 31: 637-659.

**Heasman, M. P., Sushames, T. M., J. A., Diemar, W. A., O'Connor, L. A., Foulkes. 2001.** Production of micro-algal concentrates for aquaculture. Part 2: development and evaluation of harvesting, preservation, storage and feeding technology. NSW Fisheries Final Report Series No. 34. NSW Department of Primary Industries, Port Stephens, Australia (FRDC Project No. 93/123 & 96/342).

**Knuckey R. M., Brown M. R., Robert R., Frampton D. M. F., (2006).** Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquaculture Engineering*, 35: 300-313.

**Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. 2009.** Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Journal of Food Microbiology*, 26: 475-482.

**Lavens, P., and Sorgeloos P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 295 p.

**Millamena OM, Aujero EJ, Borlongan I. G., 1990.** Techniques on algae harvesting and preservation for use in culture as larval food. *Aquaculture*, 9: 295-304.

**Montaini, E., G. C. Zittelli, M. C. Tredici, E. Molina Grima, J. M. F. Sevilla, and J. A. S. Pe' rez. 1995.** Long term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture*, 134: 81-90.

**Naghdi, N., 1993,** Production of *Chaetoceros muelleri* concentrated algae and evaluation of effects of vitamins C and E on increasing shelf life during preservation. M.Sc. thesis. Khazaruniversity, 62 p.

**Nunes, M., A. Pereira, J. F. Ferreira, and F. Yasumaru. 2009.** Evaluation of the microalgae paste viability produced in a mollusk hatchery in Southern Brazil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(1):87-94.

**Palanichamy, S. and V. Rani. 2004.** Observations on the long term preservation and culture of the marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Italian Journal of Animal Science*, 46 (1): 98 – 103.

**Amuzad, M., 1992,** Production of *Nannochloropsis oculata* concentrated algae and evaluation of effects of vitamins C and E on increasing shelf life during preservation. M.Sc. thesis. Tarbiat Modares university, 61 p.

**Becker, E. W. (1994).** *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press. 309 p.

**Bezerra Neto, E.; Andrade A. G.; Barreto L. P. (1994),** Análise química de tecidos e produtos vegetais, Recife, UFRPE.

**Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A., 1997.** Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331

**Divakaran, R. Pillai, V. S. (2002).** Flocculation of algae using chitosan. *Journal of Applied Phycology*, 14(5), 419-422.

**Farboodnia, T. 2010.** Biology of algae. *Oromiyeh university publication*, 300p.

**Fatemi, H. 1392.** Chemistry of nutrient elements. *Enteshar co. limited.*, 210 p.

**Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., & Labarta, U. (1989).** Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83(1), 17-37.

**Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal's tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.

**Harith Z. T, Yusoff F. M, Mohamed M. S, Din M. S, Ariff A. B. 2009.** Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. *Journal of Biotechnology*, 8 (21): 5970- 5978.

**O'Connor, W.A., Heasman, M.P., O'Connor, S.J., 2000.** Algal diets for bloodstock maintenance of the doughboy scallop *Mimachlamys asperrima* (Lamarck). *Aquaculture Research*, 31, 627-635.

**Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T., Foulkes, L., 2000.** Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets

**Robert, R., Trintignac, P., 1997.** Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resource*, 10 (5): 315–327.

**Salavatian, S. M, Azaritakami, GH., Vahabzadeh Rodsarri, and H., Rajabinezhad, R., 1385.** Assesment of groth and biomass of (*Nanochloropsis oculata*) in different media. *Journal of Marine Sciences*, 5: 43-53.

**Pfeiffer J. and Ludwig M. 2007.** Small-scale system for the mass production of rotifers using Algal Paste. *North American Journal of Aquaculture*, 69: 239–243.

**Ponis, E., G. Paris, C. Zittelli, F. Lavista, F. R. Robert, and M. R. Tredici. 2008.** *Pavlova lutheri* : production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282:91–103.

**Rani, V., Divakaran N., Sivasankara Pillai, 2001.** Flocculation of algae using chitosan. *Journal of Applied Phycology*, 14: 419–422.



## Concentration of *Tetraselmis suecica* cultured algae by centrifugation and effects of vitamins E and C on its shelf life and proximate analysis index

Farzaneh Zamanian<sup>1\*</sup>, Farnaz Rafiee<sup>2</sup>, Abdolmohammad Abedian Kenari<sup>3</sup>

1- M.Sc. Student, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology. Islamic Azad University

2- Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology. Islamic Azad University

3- Professor, Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences. Tarbiat Modares University, Nur

Received: 10.07.2015 Accepted: 04.11.2015

\*Corresponding author: fzamanian31@gmail.com

### Abstract:

In this work, the paste of microalga, *Tetraselmis suecica*, was produced and the effects of vitamin C and E on its food value and shelf life improvement during eight weeks of storage in refrigerator (4°C) was investigated. The microalga was initially mass grown up to logarithmic phase in standard convey medium, then concentrated by cream skimmer centrifugation method. The obtained algal paste was treated by adding vitamins C, E and their mixture (all 0.1% weight/weight), and refrigerated for 8 weeks. The density of algal cells was  $1.38 \times 10^9$  cells/ml and the production yield was about 1.7 gr/l. The cell viability in vitE-treated pastes ( $39/99 \pm 2/1\%$ ) was higher than the control group ( $p > 0.05$ ), indicating the positive effect of the preservatives. The proximate analysis showed that the control group had the lowest moisture (86.8 %), the vit C-treated group had the highest protein (36.6%) and lowest ash (29.9%), and the mixture of vits-treated group had the highest fat content (13.4%) at the end of the storage period. pH in the control and vit- C treated groups was lower than the other two treatments ( $p > 0.05$ ). In conclusion, using of vitamins E and C as well as refrigerator storage are suggested for qualitative preservation of *T. suecica* algal paste.

**Keywords:** Algal paste, *Tetraselmis suecica*, Shelf life, Vitamin C, Vitamin E, Centrifugation, Proximate analysis, pH