نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2021.343297.2808
جلد ۳۷، شماره ۲، صفحه ۲۹۹-۲۹۰ (۱۴۰۰)
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1400.37.290.106.2.1575.46

اثر عوامل محیطی دما و pH بر روی میزان ترکیب‌های بیوشیمیایی ریزجلبک *Monoraphidium* sp.

پریچهر حناچی[1*]، آسیه آقابابائی[2] و مصطفی نوروزی[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، بخش بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
پست الکترونیک: p.hanachi@alzahra.ac.ir
۲- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، بخش بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۹ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۹

چکیده

تولید متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط محیطی مختلف تغییر می‌کند. هدف این مطالعه بررسی اثرات pH و دما بر روی محتوی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌ای از جلبک‌های میکروسکوپی بود. نخست سویه ریز جلبکی *Monoraphidium* sp. تحت تیمارهای مختلف دمایی و pH کشت داده شد. سپس سنجش‌های بیوشیمیایی بر روی ترکیب‌هایی مانند میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی، ترکیب‌های فنلی و فلاونوئید کل انجام شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP و DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که ریز جلبک *Monoraphidium* sp. در pH اسیدی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای حداکثر رشد و محتوای بالایی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج حاصل بیانگر اینست که با تغییر عوامل محیطی می‌توان به شرایط اپتیمم برای تولید بالای ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی در ریز جلبک‌ها دست یافت که در صنایع دارویی، پزشکی و تولید مکمل‌های غذایی می‌توان از آن بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: ریزجلبک، *Monoraphidium*، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل، فلاونوئید.

مقدمه

کلروفیتا یا جلبک‌های سبز یکی از پرتعدادترین، پراکنده‌ترین و از دید مورفولوژیک متنوع‌ترین شاخه‌های جلبک‌ها به‌شمار می‌روند. تاکنون رده‌بندی‌های مختلفی از کلروفیتا ارائه شده است. طبق یکی از رده‌بندی‌های رایج، شاخه کلروفیتا به دو رده کلروفیسه و اولوفیسه تقسیم می‌شود. جلبک‌های رده کلروفیسه اغلب ساکن آب‌های شیرین هستند و دارای یاخته‌های متحرک تاژکدار می‌باشند. این رده شامل سه راسته ولوکال، کلروکوکال و اولوتریکال می‌باشد. جلبک‌های رده اولوفیسه اغلب دریازی هستند و بیشتر به‌صورت کف‌زی زندگی می‌کنند. جلبک‌های سبز شامل گونه‌های تک سلولی، کولونی‌شکل، رشته‌ای و شبه پارانشیمی هستند. این جلبک‌ها علاوه‌بر کلروفیل a و b دارای کاروتنوئیدهای مختلفی می‌باشند که در شرایط نامطلوب محیطی ممکن است در خارج کلروپلاست‌ها ذخیره شده و سبب تغییر رنگ جلبک به نارنجی یا قرمز شوند (Hajimahmoodi *et al.*, 2010).

ریزجلبک‌ها دارای تنوع زیستی بسیار زیادی هستند،

تاکنون حدود ۴۰ هزار گونه از آنها شناسایی شده‌است (Safi *et al*., 2014). ریزجلبک‌ها قادر به رشد در تمامی نقاط کره زمین حتی زمین‌های یخ زده اسکاندیناوی نیز می‌باشند، با زمین‌های کشاورزی رقابت نخواهند کرد و باعث جنگل‌زدایی نمی‌شوند (Safi *et al*., 2014). توده زیستی ریزجلبک‌ها در موارد مختلفی مانند تهیه خوراک دام و غذای آبزیان بکار می‌رود. همچنین عصاره حاصل از این توده در زمینه‌های متنوعی مانند ساخت فرآورده‌های آرایشی، بهداشتی، تهیه نوشیدنی‌های مختلف و غیره استفاده می‌شود (Cardozo *et al*., 2007).

توده زیستی ریزجلبک‌ها حاوی اسیدآمینه‌های ضروری، کربوهیدرات‌ها، انواع ویتامین‌ها، ترکیب‌های معدنی و مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که در صورت تغذیه از آنها نیاز بدن به این عوامل نیز تأمین می‌گردد (Cardozo *et al*., 2007). گزارش‌هایی مبنی بر بهبود بیماری‌های مرتبط با اکسیداسیون (بیماری‌های التهابی) به دنبال مصرف نوشیدنی‌های حاوی فرآورده‌های جلبکی وجود دارد که می‌توان این تأثیر را ناشی از سازوکار جمع‌آوری‌کننده رادیکال‌های آزاد آنتی‌اکسیدان‌های موجود در این فرآورده‌ها دانست (Ghasemi *et al*., 2007).

علاوه‌بر عوامل شیمیایی عوامل فیزیکی مانند نور و درجه حرارت نیز در ایجاد شرایط رشد بهینه ریزجلبک‌ها تأثیر بسزایی دارند (Shokravi *et al*., 2007؛ Soltani *et al*., 2006). بیشتر ریزجلبک‌ها در محدوده دمایی بین ۱۸ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر رشد خود را دارند و در دماهای بالاتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد از بین می‌روند (Guedes *et al*., 2011). برای حفظ دمای مناسب از انکوباتورهایی با قابلیت تنظیم درجه حرارت استفاده می‌شود. یکی دیگر از عوامل مهم و موثر بر رشد ریزجلبک‌ها و همچنین سایر ارگانیسم‌ها، تنظیم pH محیط کشت است. رشد بهینه هر ارگانیسم در محدوده نوسان کم از pH انجام می‌شود، معمولاً طی فرایند رشد ریزجلبک‌ها و تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه، pH محیط به سمت قلیایی شدن تا حدود ۹ بالا می‌رود، اما با وارد کردن دی‌اکسیدکربن از طریق هوادهی می‌توان pH را در حد بهینه ثابت نگه داشت (Singh & Singh, 2015). از آنجایی که ریزجلبک‌ها از بعد اقتصادی و بیوتکنولوژی مورد توجه بسیاری از محققان می‌باشند، ازاین‌رو این پژوهش اثر دما و pH بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی ریزجلبک *Monoraphidium* را مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت نمونه

ریزجلبک *Monoraphidium* sp. از بخش آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی، واحد کشت جلبک، دانشگاه الزهرا تهیه گردید. برای کشت ریزجلبک از محیط اختصاصی BBM استفاده شد. برای اطمینان از خالص بودن ریزجلبک ابتدا *Monoraphidium* در محیط کشت جامد به روش پلیت آگار کشت داده و بعد به محیط کشت مایع منتقل گردید. پس از رسیدن رشد ریزجلبک‌ها به مرحله لگاریتمی Cell/ml (۱۱۰۰۰۰)، به‌صورت پلکانی به حجم‌های بالاتر ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شدند و در هر بار انتقال ۱۰٪ از حجم کل محیط به ریزجلبک‌ها اختصاص داده شد. در تمامی این مراحل شرایط مناسب کشت، یعنی دما ۲°C ± ۲۵، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و نوردهی ۲۵۰۰ لوکس فراهم گردید. برای کسب بیومس لازم جهت اعمال تیمارها، ریزجلبک‌ها به محیط ۲۰۰۰ میلی‌لیتر منتقل و در این مرحله عمل هوادهی به مدت یک شبانه‌روز از طریق پمپ مرکزی انجام و برای جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی از طریق هوا از فیلترهای ۰/۲µm در مسیر ورود هوا به داخل محیط ریزجلبک‌ها استفاده گردید (Bischoff & Bold, 1963).

pH

به‌منظور بررسی تأثیر تغییرات pH، سه pH مختلف ۵، ۸، ۹ به همراه کنترل (حدود ۶/۸ تا ۷/۲) به‌عنوان تیمار

pH در نظر گرفته شد. برای تهیه ۱/۵ لیتر محیط کشت به همراه ریزجلبک (۱۳۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت BBM+ ۱۵۰ میلی‌لیتر از بیومس ریزجلبک) قبل از تلقیح کردن ریزجلبک به محیط کشت، نیاز به شرایط استریل و حفظ محدوده pH تیمار می‌باشد. در زمان تلقیح غلظت اولیه ریزجلبک *Monoraphidium* ۲۳۰۰۰۰ cell/ml بود (Kurade *et al*., 2016).

دما

برای بررسی اثر دما ۳ تیمار دمایی مختلف (۲± ۲۳، ۲۸، ۳۳ درجه سانتی‌گراد) سه بار تکرار در سه ارلن مختلف حاوی ۱/۵ لیتر محیط کشت BBM که ۱۰ ٪ آن نیز ریزجلبک در نظر گرفته شد، تنظیم دما ۲۸ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد به کمک انکوباتور انجام شد و دمای $23^{\circ}C$ نیز در دمای محیط به کمک وسایل خنک‌کننده تنظیم شد. غلظت اولیه سلول *Monoraphidium*، ۱۲۸۰۰۰۰۰cell/ml بود (Kurade *et al*., 2016).

استخراج ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان

ابتدا توده سلولی را به مدت ۲ ساعت در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت یک شبانه‌روز در فریزر ۳۰- سانتی‌گراد نگهداری کرده تا نمونه‌ها برای انجام لیوفیلیزه آماده شوند و در نهایت نمونه‌ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت به دستگاه فریز درایر وصل کرده تا نمونه‌ها کاملاً خشک شوند، بعد از انجام لیوفیلیزه نمونه‌های خشک شده را می‌توان به مدت ۴ ماه در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و حدود ۱۰ ماه در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد قابل نگهداری است. ابتدا به ۱۰ میلی‌گرم از نمونه خشک شده توسط فریز درایر، ۲ میلی‌لیتر متانول ۹۹٪ اضافه کرده، سپس برای شکستن دیواره سلولی از دستگاه هموژنایزر، ۱۴۰۰ دور، به مدت ۳۰ ثانیه استفاده کرده، بعد نمونه را داخل ویال تیره رنگ ریخته و ۳۰ دقیقه بر روی استیرر قرار داده، در نهایت نمونه را داخل میکروتیوپ ریخته و با سرعت ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ کرده و سوپرناتانت حاصل را در یک ویال تیره رنگ به صورت جداگانه ریخته و دوباره عمل استخراج با متانول را بر روی بیومس حاصل از سانتریفوژ تکرار کرده و بعد عصاره‌های متانولی را روی هم ریخته و برای تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری استفاده شد تا با تبخیر حلال، نمونه تغلیظ شود. در پایان تمامی نمونه‌ها در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hajimahmoodi *et al*., 2010).

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از روش FRAP (ferric-reducing antioxidant power) استفاده شد. برای تهیه معرف FRAP، ۵ میلی‌لیتر از محلول TPTZ (2, 4, 6- Tris (2-pyridyl) -1, 3, 5-triazine) ($10\ mmol\ L^{-1}$) در ۴۰ میلی‌لیتر HCl ($40\ mmol\ L^{-1}$) و بعد ۵ میلی‌لیتر از محلول کلروآهن ($20\ mmol\ L^{-1}$) به همراه ۵۰ میلی‌لیتر از محلول بافر استات ($0/3\ mol\ L^{-1}$, pH=۳/۶) را به‌ترتیب اضافه کرده تا محلولی به رنگ زرد-قهوه‌ای حاصل شود (Hanachi *et al*., 2018). این محلول باید تازه تهیه شود و پس از ۳۰ دقیقه ناپایدار و غیر قابل استفاده است. سپس مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف آماده FRAP را به محلول اضافه کرده و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای $37^{o}C$ نگهداری، سپس نمونه لیوفیلیزه را با ۲ میلی‌لیتر متانول رقیق کردیم، در نهایت از روی نمونه ۵۰ میکرولیتر برداشت کرده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای $37^{o}C$ در بن‌ماری نگهداری گردید؛ در نهایت شدت رنگ حاصل، در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (Hanachi *et al*., 2018).

تعیین محتوای کل فنل

تعیین ترکیب‌های فنلی کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتو انجام شد. در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش با ۱/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱۰ با هم مخلوط گردید، پس از

۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب مخلوط ذکرشده به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد (Al-Farsi *et al*., 2005).

تعیین محتوای کل فلاونوئید

محتوای کل فلاونوئید با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید ($AlCl_3$) تعیین گردید. در این روش ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه متانولی با ۷۵۰ میکرولیتر از متانول، ۵۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪w/v) در آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر از استات پتاسیم ۱ مولار به همراه ۱/۴ میلی‌لیتر از آب‌مقطر با هم مخلوط شد و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Al-Farsi *et al*., 2005).

استخراج رنگدانه‌ها

ابتدا ۴mg از نمونه لیوفیلیزه را وزن کرده و بعد از انتقال به فالکون، ۴ میلی‌لیتر متانول ۹۹٪ به آن افزوده و برای جلوگیری از نفوذ نور، دور فالکون‌ها فویل پیچیده، سپس برای شکستن دیواره سلولی ریزجلبک‌ها و همچنین همگن شدن محیط، از دستگاه هموژنایزر با سرعت ۸۰۰rpm، به مدت ۴ دقیقه استفاده گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت فالکون به بن‌ماری ۴۵°C منتقل شد. بعد از این مدت محتویات فالکون با دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید و از محلول رویی برای سنجش میزان رنگدانه‌ها استفاده شد. بعد از استخراج کل رنگدانه‌ها با متانول، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید توسط رابطه شرح داده شده توسط Wellburn (۱۹۹۴) محاسبه گردید. برای سنجش میزان کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئیدها جذب نور محلول فوقانی در سه طول موج ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده و بر حسب فرمول ارائه ذیل میزان رنگدانه‌ها برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (Wellburn, 1994).

$$C_a = 15.65A666 - 7.34A653$$

$$C_b = 27.05A653 - 11.21A666$$

$$Cx+c = (1000A470 - 2.86Ca - 129.2Cb) / 221$$

Ca= میزان کلروفیل a

Cb= میزان کلروفیل b

Cx+c= میزان کل کاروتنوئید

A= میزان جذب در طول موج دلخواه

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

بررسی داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۴ انجام شد. برای انجام تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از روش (One-Way ANOVA) استفاده گردید و میانگین‌ها به‌وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

اثر pH بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های فنل و فلاونوئیدی در *Monoraphidium*

نتایج حاصل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP نشان می‌دهد (جدول ۱) که بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با کنترل بعد از اعمال تیمارهای مختلف pH، به pH=8 و بعد به PH=5 تعلق دارد که این اختلاف افزایش در میانگین دیده شد اما از نظر آماری افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ (P>0.05) دیده نشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که تیمار با pH=9 اثر منفی بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک داشته و کاهش معنی‌داری را نسبت به کنترل از خود نشان می‌دهد.

مقایسه تنش‌های مختلف pH نشان می‌دهد که بیشترین محتوای فنل تام در مقایسه با کنترل مربوط به pH=5 و کمترین مقدار آن در pH=9 بود. این افزایش و کاهش از نظر میانگین می‌باشد اما از نظر آماری در مقدار فنول نسبت

به کنترل افزایش یا کاهش اختلاف معنی‌داری ($P>0.05$) مشاهده نشد.

طبق جدول ۱ محتوای فلاونوئید در اثر تغییرات pH نسبت به کنترل کاهش نشان داده و کمترین میزان فلاونوئید مربوط به pH=9 می‌باشد. این افزایش و کاهش از نظر میانگین می‌باشد اما از نظر آماری در مقدار فلاونوئید نسبت به کنترل، افزایش یا کاهش اختلاف معنی‌داری ($P>0.05$) مشاهده نشد.

جدول ۱- اثر pH بر روی شاخص‌های آنتی‌اکسیدان‌ها در *Monoraphidium* (Mean±SD)

pH	FRAP µmol Fe(II) /g	فنل کل (mg GAE/g)	فلاونوئید کل (mg/g)
کنترل= ۶/۸ تا ۷/۲	۱۰۲/۶۵ ± ۰/۱۸ (a)	۶/۶۷ ± ۰/۰۹ (a)	۳۲/۸۳ ± ۱/۰۲ (a)
۵	۱۲۱/۶۵ ± ۰/۱۵ (a)	۷/۶۲ ± ۰/۰۵ (a)	۲۷/۵۷ ± ۰/۵۴ (a)
۸	۱۲۹/۴ ± ۰/۰۰۵ (a)	۶/۵ ± ۰/۰۰۵ (a)	۲۸/۲۸ ± ۰/۰۰۹ (a)
۹	۷۲/۱۵ ± ۰/۰۶ (b)	۴/۹۴ ± ۰/۰۵ (a)	۲۴/۳۳ ± ۰/۵۳ (a)

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

اثر دما بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های فنل و فلاونوئیدی ریزجلبک *Monoraphidium*

جدول ۲ بیانگر اثر دما بر روی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی *Monoraphidium* می‌باشد. افزایش یا کاهش میزان آنتی‌اکسیدان در نتایج زیر برحسب میانگین گزارش شده، اما از نظر آماری هیچ افزایش یا کاهش معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP نشان می‌دهد که دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و کمترین قدرت آنتی‌اکسیدانی مربوط به دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

بیشترین میزان فنول تام متعلق به دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد بوده است. تأثیر دما بر میزان فلاونوئیدها چندان مشهود نبود و در بین نمونه‌های تیمار شده با دما، اختلاف چندانی در میزان فلاونوئید تولید شده وجود ندارد. باوجوداین بیشترین میزان فلاونوئید تولید شده مربوط به دمای ۲۸ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

جدول ۲- نتایج حاصل از اثر دما بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در *Monoraphidium* (Mean±SD)

دما (درجه سانتی‌گراد)	FRAP µmol Fe(II) /g	فنل کل (mg GAE/g)	فلاونوئید کل (mg/g)
۲۳	۱۱۶/۶۵ ± ۰/۰۳ (a)	۶/۹۱ ± ۰/۰۳ (a)	۴۰/۳۷ ± ۰/۵۷ (a)
۲۸	۱۲۷/۶۵ ± ۰/۰۳ (a)	۸/۰۶ ± ۰/۰۴ (a)	۴۲/۱۸ ± ۰/۵۳ (a)
۳۳	۱۰۵/۶۵ ± ۰/۱۶ (a)	۵/۵۸ ± ۰/۰۵ (a)	۴۲/۶۳ ± ۰/۶۳ (a)

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

نتایج حاصل از اثر pH بر میزان رنگریزه‌ها در *Monoraphidium*

بررسی تأثیر pH بر روی تولید رنگریزه‌ها نشان می‌دهد که pH=5، pH بهینه برای تولید رنگریزه‌هاست و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج حاصل از اثر pH بر میزان رنگریزه‌ها در *Monoraphidium* (Mean±SD)

pH	کلروفیل a (mg/g)	کلروفیل b (mg/g)	کاروتنوئید (mg/g)
کنترل= ۶/۸ تا ۷/۲	۱۸/۲۲ ± ۰/۱ (a)	۲۵/۴۰ ± ۰/۵۴ (a)	۵/۰۶ ± ۰/۱۰۹ (a)
۵	۱۶/۰۴ ± ۰/۱۰۸ (a)	۲۸/۰۶ ± ۱/۸۹ (a)	۷/۵۵ ± ۰/۲۸ (a)
۸	۱۸/۳۸ ± ۰/۰۵ (a)	۲۵/۱۰ ± ۰/۰۰۹ (a)	۵/۲۵ ± ۰/۰۸۲ (a)
۹	۱۳/۵۸ ± ۰/۳ (a)	۱۶/۳۲ ± ۰/۷ (a)	۲/۷۳ ± ۰/۰۶ (a)

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

نتایج حاصل از اثر دما بر میزان رنگریزه‌ها در *Monoraphidium*

جدول ۴ نشان می‌دهد که دماهای ۲۸ و ۲۳ درجه سانتی‌گراد دمای بهینه برای تولید رنگریزه‌های فتوسنتزی است و در دماهای بالاتر به مقدار اندکی از تولید کلروفیل کاسته می‌شود.

جدول ۴- نتایج حاصل از اثر دما بر میزان رنگریزه‌ها در *Monoraphidium* (Mean±SD)

دما (درجه سانتی‌گراد)	کلروفیل a (mg/g)	کلروفیل b (mg/g)	کاروتنوئید (mg/g)
۲۳	۱۷/۹۸ ± ۰/۱۵ (a)	۲۵/۸۳ ± ۰/۰۶ (a)	۴/۸۲ ± ۰/۲۵ (a)
۲۸	۱۸/۸۶ ± ۰/۱۵ (a)	۲۵/۷۷ ± ۰/۰۹ (a)	۴/۲۶ ± ۰/۰۸ (a)
۳۳	۱۵/۶۷ ± ۰/۱۲ (a)	۲۱/۳۸ ± ۰/۰۶ (a)	۳/۶۲ ± ۰/۲۵ (a)

حروف مشابه هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

بحث

یکی از راه‌های مناسب برای اطمینان از سلامت کشت، علاوه‌بر بو و رنگ کشت و همچنین مشاهدات منظم برای اطمینان از اینکه کشت به‌صورت نرمال و عاری از هر گونه آلودگی جلبکی باشد، تخمین رشد سلولی با استفاده از شمارش سلولی به کمک لام ئوبار و بررسی میزان جذب دانسیته نوری به‌وسیله اسپکتروفتومتر است (Hejazi *et al.*, 2002؛ Hejazi *et al.*, 2004). در این پژوهش نیز از روش شمارش سلولی و اسپکتروفتومتری استفاده شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بالاترین میزان رشد ریزجلبک *Monoraphidium* در محیط‌های اسیدی دیده شد.

نتایج حاصل از آزمایش‌های ما نشان داد که بهترین دما برای رشد در ریزجلبک *Monoraphidium* ۲۳ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد است. با توجه به اینکه هدف از این پژوهش

دست یافتن به مقادیر بالایی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان است، ازاین‌رو ازجمله عوامل دخیل در تولید ترکیب‌های بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها، می‌توان به عناصر غذایی موجود در محیط کشت و دیگر شرایط محیط کشت اشاره نمود. این تحقیق نیز نشان می‌دهد که رشد و عملکرد ریزجلبک *Monoraphidium* تحت تأثیر pH و دمای محیط کشت قرار گرفته است. Ahmed و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که شرایط بهینه رشد در ریزجلبک کلرلا در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH=9 و شدت نور ۳۵۰۰ لوکس رخ می‌دهد.

تحقیقی که Han و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ریزجلبک *Scenedesmus* انجام دادند به این نتیجه رسیدند که *Scenedesmus* تنها در مواجه کوتاه‌مدت قادر به تحمل دمای ۴۰ درجه و افزایش مقدار تولید لیپید می‌گردد و استرس‌های طولانی‌مدت باعث کاهش رشد و کاهش میزان بیومس در ریزجلبک می‌شود.

Kumar و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی که بر روی پارامترهای مختلف فیزیکی و شیمیایی بر روی رشد کلرلا انجام دادند به این نتیجه رسیدند که دمای مناسب ۳۰ درجه سانتی‌گراد با pH=7.5 و شدت نور 100µmol برای رشد میکروارگانیسم مناسب بود.

Singh و Singh (۲۰۱۵) اعلام کردند که *Scenedesmus* قادر به رشد در محدوده دمایی ۳۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد است، اما دمای بهینه برای تولید بیومس و لیپید تنها در ۲۰ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد.

Ho و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که ریزجلبک *Monoraphidium* تنها در دماهای بهینه قادر به رشد است و در صورت افزایش دما از ۲۵ به ۳۵ درجه سانتی‌گراد مقدار بیومس و محتوای لیپید کاهش می‌یابد.

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان تولید رنگدانه در *Monoraphidium* در pHهای اسیدی رخ می‌دهد. براساس نتایج بدست آمده، بالاترین میزان تولید رنگدانه در *Monoraphidium* در دمای ۲۸ و ۲۳ درجه سانتی‌گراد روی می‌دهد.

طبق تحقیقات Guedes و همکاران (۲۰۱۱) که بر روی ریزجلبک *Scenedesmus* انجام دادند به این نتیجه رسیدند که بالاترین سطح تولید لوتئین و بتاکاروتن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH=8 انجام می‌شود.

طبق تحقیقی که Gómez و González (۲۰۰۵) بر روی گونه‌های مختلف *Dunaliella salina* انجام دادند به این نتیجه رسیدند که با تغییر دما از ۱۵ درجه سانتی‌گراد به ۲۶ درجه سانتی‌گراد میزان تولید کاروتنوئید افزایش می‌یابد و همچنین اظهار داشتند که تغییرات دمایی بیشترین تأثیر را نسبت به تابش در کیفیت و مقدار کاروتنوئید تولیدی ایفاء می‌کنند.

در تحقیقات انجام شده توسط Del Campo و همکاران (۲۰۰۰) که تأثیر فاکتورهای محیطی را برای تحریک تولید کاروتنوئید مورد بررسی قرار دادند، به این نتیجه رسیدند که ریزجلبک *Muriellopsis* sp. در دمای ۲۸ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد است ولی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قادر به تولید بالاترین مقدار لوتئین می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ریزجلبک *Monoraphidium* در pH قلیایی (pH=8) میانگین میزان آنتی‌اکسیدان کل بیشتری از سایر تیمارها داشته است ($P>0.05$).

Blinks (۱۹۶۳) با تحقیقی که بر روی جلبک‌های قرمز و قهوه‌ای انجام داد نشان داد که pHهای بالا از ورود آسان یون Hco^{3-} به درون سلول جلوگیری کرده و به‌دنبال کاهش فتوسنتز، میزان رادیکال آزاد اکسیژن در سلول افزایش می‌یابد.

همچنین Han و همکاران (۲۰۱۲) چگونگی تولید رادیکال آزاد را در اثر تغییرات pH اینگونه بیان می‌کنند: هنگامی که CO_2 موجود در داخل سلول‌های فتوسنتزکننده کاهش می‌یابد، فعالیت‌های چرخه کلوین کاهش یافته اما فتوسیستم Π فعال باقی مانده که این منجر به یک انرژی تحریکی بیشتر در فتوسیستم شده و الکترون‌هایی که در زنجیره انتقال الکترون انباشته شده به اکسیژن رسیده و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. غیر فعال شدن رادیکال‌های آزاد در مرکز زنجیره فتوشیمیایی سرآغاز

واکنش‌های فتوشیمیایی در فتوسیستم Π می‌شود که این امر منجر به شرایط اکسیداتیو در ریزجلبک می‌گردد.

در مطالعه Hanachi و همکاران (۲۰۱۹)، ریزجلبک *Scenedesmus* sp. تحت استرس‌های متفاوت دما و pH قرار گرفت. نتایج نشان از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فلاونوئیدی در دمای ۲۳°C و pH ۹ و ۸ داشت. همچنین بر میزان کاروتنوئید و کلروفیل a نیز تأثیر گذاشت و باعث افزایش آنها در دمای ۲۳ °C و pH ۹ و ۷ شد. اگرچه pH نتوانست بر روی محتوای فنلی تأثیرگذار باشد اما دمای ۲۳°C توانست باعث افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) محتوای فنلی گردد. بنابراین تیمار pH و دما نشان دادند که می‌توانند در افزایش تولید آنتی‌اکسیدان در ریزجلبک *Scenedesmus* sp. مؤثر باشند.

نتایج نشان داد که ریزجلبک *Monoraphidium* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای بالاترین محتوای فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP و بالاترین میزان فلاونوئید به‌صورت مشترک در دمای ۲۸ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

نتایج بدست آمده از بررسی اثرهای دما و pH بر ریزجلبک *Monoraphidium* نشان می‌دهد که این ریزجلبک از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی در محیط‌های اسیدی بازده بیشتری دارد.

در این مطالعه، ریزجلبک *Monoraphidium* تحت شرایط محیطی مانند دما و pH قرار گرفت. نتایج نشان داد که بهترین دما برای رشد در ریزجلبک *Monoraphidium* ۲۳ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد است. همچنین بیشترین میزان تولید از رنگدانه در *Monoraphidium* در pHهای اسیدی و در دمای ۲۸ و ۲۳ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. نتایج نشان داد که ریزجلبک *Monoraphidium* به‌ترتیب در pHهای ۸ و ۵ دارای بالاترین میزان آنتی‌اکسیدان کل به روش FRAP بود و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارای بالاترین محتوای فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش FRAP و بالاترین میزان فلاونوئید به‌صورت مشترک در دمای ۲۸ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. بنابراین تیمار pH و دما نشان دادند که می‌توانند در افزایش تولید آنتی‌اکسیدان در ریزجلبک *Monoraphidium* مؤثر باشند و این ریزجلبک را می‌توان به‌عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌شمار آورد. در آینده نیز استفاده از سایر حلال‌ها برای استخراج بهتر ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان توصیه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Ahmed, A., Jyothi, N. and Ramesh, A., 2016. Improved ammonium removal from industrial wastewater through systematic adaptation of wild type *Chlorella pyrenoidosa*. Water Science and Technology, 75(1): 182-188.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A. and Baron, M.G., 2005. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoid and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 7592-7596.
- Bischoff, H.W. and Bold, H.C., 1963. Some algae from enchanted rock and related algal species. Phycological Studies, University of Texas, IV, Austin, 92p.
- Blinks, L.R., 1963. The effect of pH upon the photo synthesis of littoral marine algae. Journal Protoplasma. 57:126-136.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcao, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P. and Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146: 60-78.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J. and Guerrero, M.G., 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). Journal of Biotechnology,76(1): 51-59.
- Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A.A., Shokravi, S. and Morowat, A., 2007. Antifungal and antibacterial activity of microalgae collected from paddy-fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus dispersus*. Journal of Biological Science, 7(4): 904-910.
- Gómez, P.I. and González, M.A., 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of Dunaliellasalina (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. Biological Research, 38(2-3): 151-162.

- Guedes, A., Amaro, M.H., Pereira, R.D. and Malcata, F.X., 2011. Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. Biotechnology Progress, 27: 1218-1224.
- Hajimahmoodi, M. Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R. and Nafissi-Varcheh, N., 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae, Journal of Applied Phycology, 23: 43-50.
- Han, F., Pei, H., Hu, W., Han, L., Zhang, Sh. and Ma, G., 2016. Effect of high temperature stress on microalgae at the end of the logarithmic phase for the efficient production of lipid. Environmental Technology, 37: 2649-2657.
- Han, J.W., Yoon, M., Kupper, F.D., Klockkova, T.A., Oh, J.R. and Kim, G.H., 2012. Accumulation of galloyl derivatives in a green alga, *Spirogyra varinas*, in response to cold stress. Journal of Applied Phycology, 24: 1279-1286.
- Hanachi, P., Zarringhalami, R. and Ramezani Tamijani, R., 2018. Investigation of antioxidant properties of *Polygonatum orientale* Desf and *Tilia dasystyla* extracts by different methods and solvents. Hormozgan Medical Journal, 22(4): e86504.
- Hanachi, P., Aghababaei, A. and Noroozi, M., 2019. The effect of pH and temperature on growth, the antioxidants, phenols and flavonoids in *Scenedesmus* sp. Microalgae. Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources), 72(1): 13-27.
- Hejazi, M.A., de Lamarliere, C., Rocha, J.M.S., Vermue, M., Tramper, J.R. and Wijffels, R.H., 2002. Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability. Biotechnology and Bioengineering, 79: 29-36.
- Hejazi, M.A., Holwerda, E. and Wijffels, R.H., 2004. Milking microalga *Dunaliella salina* for β-carotene production in two-phase bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 85: 475-481.
- Ho, S.H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J.Sh. and Kondo, A., 2014. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae. Biotechnology Advances, 32: 1448-1459.
- Kumar, R.R., Rao, P.H., Subramanian, V.V. and Sivasubramanian, V., 2014. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant potentials of Chlorella vulgaris grown in effluent of a confectionery industry. Journal of Food Science and Technology, 51(2): 322-328.
- Kurade, M.B., Kim, J.R., Govindwar, S.P. and Jeon, B.H., 2016. Insights into microalgae mediated biodegradation of diazinon by *Chlorella vulgaris*: Microalgal tolerance to xenobiotic pollutants and metabolism. Algal Research, 20: 126-134.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y. and Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35: 265-278.
- Shokravi, S., Soltani, N., Amirlatifi, F. and Safai, M., 2007. The effect of irradiance, CO_2 availability, salt concentrations on some physiological characteristic of cyanobacterium *Nostoc* sp. Journal of Plant Science Researches, 3: 68-72.
- Singh, S.P. and Singh, P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 50: 431-444.
- Soltani, N., Khavari-Nejad, R. and Shokravi, S., 2006. The effect of ammonium on growth and metabolism of soil cyanobacterium *Ficherella* sp. FS18. Journal of Plant Science Reasearches,1: 48-53.
- Wellburn, A., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, 144: 307-313.

Effects of temperature and pH on biochemicals content of microalgae *Monoraphidium* sp.

P. Hanachi[1*], A. Aghababaie[2] and M. Noroozi[2]

1*- Corresponding author, Biotechnology Department, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
E-mail: p.hanachi@alzahra.ac.ir
2- Biotechnology Department, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

Received: June 2020 Revised: February 2021 Accepted: February 2021

Abstract

The production of secondary metabolites varies under the different environmental conditions. The aim of this study was to investigate the effects of pH and temperature on the content of antioxidant compounds in a species of microscopic algae. First, the microalgal strain *Monoraphidium* sp. was cultured under the different temperature and pH treatments. The biochemical assays were then performed on the compounds such as photosynthetic pigments, phenolic compounds, and total flavonoids. The total antioxidant activity was evaluated by FRAP and DPPH methods. The results of this study showed that the microalgae *Monoraphidium* sp. had the maximum growth and high content of antioxidant compounds at the acidic pH and temperature 28°C. The results indicated that the optimal conditions can be achieved for the high production of antioxidant compounds in microalgae by changing the environmental factors, which can be used in the pharmaceutical, medical, and production of nutritional supplements industries.

Keywords: Microalgae, *Monoraphidium*, antioxidant activity, phenol, flavonoid.