شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰
صفحات ۴۵۲-۴۴۳

تاثیر محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف گلیسرول و گلوکز بر میزان تولید کربوهیدرات، لیپید و پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌های *Scenedesmus* و *Monoraphidium*

پریچهر حناچی[1*]، مرضیه مطلب[2]، مصطفی نوروزی[3]، روشنک زرین قلمی[2]

۱. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۳

چکیده

ریزجلبک‌ها گروهی بسیار متنوع از گیاهان آبزی هستند که امروزه طیف کاربردی گسترده ای در علم فناوری زیستی یافته اند. این فتوسنتز کنندگان میکروسکوپی، علی رغم نقش گسترده ای که در تولید اکسیژن روی کره زمین ایفا می‌کنند، به دلیل پراکنش و فراوانی بالایی که دارند تقریبا در تمام آب‌های روی زمین یافت می‌شوند. در این پژوهش به منظور بررسی اثر منابع کربن روی ترکیبات بیوشیمیایی از قبیل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و آنتی اکسیدان‌ها از گلوکز و گلیسرول به عنوان منابع کربن آلی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین کربوهیدرات در نمونه ای با ۳گرم/لیتر گلوکز به همراه ۵ گرم/لیتر گلیسرول در *Monoraphidium* و کمترین میزان آن در نمونه کنترل *Scenedesmus* وجود دارد. کمترین میزان پروتئین مربوط به نمونه حاوی ۱ گرم/ لیتر گلوکز در *Scenedesmus* و بیشترین میزان در نمونه کنترل *Monoraphidium* به دست آمد. میزان آنتی اکسیدان که از طریق FRAP محاسبه شد، در نمونه کنترل *Monoraphidium* بالاترین و در نمونه حاوی ۳گرم/لیتر گلوکز در *Monoraphidium* کمترین میزان را داشت. نتایج نشان داد که استفاده از منابع کربن آلی پیچیده یعنی ترکیب گلوکز و گلیسرول، میزان تولید کربوهیدرات را تحریک می‌کند ولی تولید پروتئین و آنتی اکسیدان‌ها را کاهش خواهد داد.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان،ریزجلبک، گلوکز، گلیسرول، منابع کربن آلی

* نویسنده مسئول: پریچهر حناچی
Email p.hanachi@alzahra.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 3, Autumn 2021
pp. 443-452

Effects of media containing glycerol and glucose on carbohydrates, lipids and protein production and antioxidant activity in *Scenedesmus* and *Monoraphidium*

Parichehr Hanachi[1*], Marzieh Motalleb[2], Mostafa Noroozi[3], Roshanak Zarringhalami[2]

1. Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. M.Sc. Graduated student, Biotechnology Department., Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Biotechnology Department, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Received: 25-May-2021 **Accepted: 25-Jul-2021**

Abstract

Microalgae are a very diverse group of aquatic plants that have numerous applications in biotechnology today. These microscopic photosynthesizers, have an extensive role in producing oxygen on Earth, they are found in almost all water sources on Earth due to their high dispersion and abundance. In this study, to investigate the effect of carbon sources on biochemical compounds such as proteins, carbohydrates and antioxidants, sources of organic carbon like glucose and glycerol were used. The results showed that most carbohydrates production was in a sample with 3 g / liter of glucose plus 5 g / Liters of glycerol in *Monoraphidium* and the lowest amount in the control sample of *Scenedesmus*. The lowest amount of protein was in the sample contains 1 g / liter of glucose in *Scenedesmus* and the highest amount in the control sample of *Monoraphidium*. The amount of antioxidants calculated by FRAP, and it was the highest in the control sample of *Monoraphidium* and the lowest recorded in the sample containing 3 g / liter of glucose in *Monoraphidium*. The results of this study indicated that the use organic carbon sources such as a combination of glucose and glycerol stimulates the production of carbohydrates but reduces the production of proteins and antioxidants.

Key words: Antioxidant, Microalgae, glucose, glycerol, organic carbon sources

Corresponding author: Parichehr Hanachi Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

۱. مقدمه

اغلب شکل‌های پیچیده در بین جلبک‌های سبز شناسایی شده اند و در واقع گیاهان اولیه روی زمین شامل جلبک‌های آب‌های تازه از قبیل چارا (Chara) بودند که قدمت آنها به بیش از ۴۰۰ میلیون سال پیش برمی‌گردد (Cao *et al*., 2009). مهمترین نفعی که طبیعت از جلبک ها می‌برد به نقش تولید کنندگی و فعالیت فتوسنتزی آنها مربوط می‌شود. جلبک‌ها تولید کننده های اولیه مواد آلی در محیط های آبی هستند. حیات جانوران آبزی به فعالیت جلبک های درون آب وابسته است، زیرا مواد آلی و اکسیژن مورد نیاز آنها توسط جلبک‌ها تأمین می شود. در اکوسیستمهای آبی، جلبک‌ها حلقه اولیه و اصلی زنجیره غذایی را تشکیل می‌دهند. به علاوه، با تولید مداوم اکسیژن، ادامهٔ تنفس جانوران آبزی را ممکن می‌سازند (Alassali *et al*., 2016). اخیراً علاقه زیادی به مواد بیولوژیکی فعال جدا شده از جلبک‌ها و اثر آنها روی عملکرد فیزیولوژیک بدن انسان مخصوصا افزایش قابلیت سیستم ایمنی و فعالیت ضد سرطانی این مواد نشان داده شده است. پژوهشهای اخیر روی جلبک‌های قرمز و دیگر جلبک‌های دریایی نشان داده که این جلبک‌ها دارای مواد دارویی با ارزشی و ماده خام اولیه در تهیه آگارند. میزان تقاضای آن به دلیل کاربردهای صنعتی، دارو سازی، کاغذسازی و صنایع چوب بسیار بالاست و جلبک‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات ویژه پلی ساکاریدی و نیز ترکیبات دارویی خاص، دارای کاربردهای وسیعی خواه به صورت مصرف مستقیم دارویی و خواه به صورت مصرف ترکیبات آنها در طی پروسه‌های داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bird and McLachlan., 1986).

فاکتور هایی از قبیل تغییرات آب و هوایی، رشد جمعیت، کاهش ذخائر نفتی و مشکلات منابع غذایی در تولید آبزیان و در صنعت شیلات منجر به افزایش علاقه به میکروجلبک‌ها به عنوان منبع بیومس، بیودیزل، جایگزینی برای غذای ماهی و غذا شده است. پروتئین در ریزجلبک به ویژه برای غذای حیوانات و مصرف انسان، فناوری پروتئین نوترکیب و به عنوان محصول جانبی در دسترس حاصل از تولید سوخت زیستی پتانسیل مصرف دارد. محتوای بالای پروتئین در ریزجلبک ها یکی از دلایل مهمی است که آنها را به عنوان منبع غیرمعمول پروتئین می‌دانند. برخلاف سایر گیاهان، بیشتر ریزجلبک‌ها حاوی اسیدآمینه‌های ضروری هستند که در بدن انسان یا جانوران ساخته نمی شود (Becker *et al*., 2007). به طور کلی اجزای ذخیره‌ای مثل پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها به ریزجلبک اجازه می‌دهند تا رشد شان را با تغییرات شرایط محیطی مطابقت دهند. محتوای کربوهیدراتی توده جلبکی به سویه‌های ریزجلبکی و کشت و شرایط محیطی بستگی دارد(Harun *et al*., 2010). دو جلبک *Scenedesmus* و *Monoraphidium* از ریزجلبک‌های ساکن دریاچه‌های آب شیرین هستند که از مزیت‌های آنها می‌توان به رشد سریع، مقاومت بالا در برابر آلودگی و مدیریت آسان آنها در کشت داخل آزمایشگاه اشاره کرد (Hanachi *et al*., 2021). در این پژوهش گلوکز با غلظت‌های ۱و۳ گرم/لیتر و گلیسرول با غلظت‌های ۲و۵ گرم/ لیتر به عنوان منابع کربن آلی به محیط کشت‌های هر دو جلبک *Scenedesmus* و *Monoraphidium* افزوده شد تا تاثیر این مواد روی میزان ترکیبات بیو شیمیایی از قبیل کربوهیدرات، آنتی اکسیدان، پروتئین بررسی شود تا محیط بهینه جهت کشت جلبک فراهم گردد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه و کشت نمونه

ریز جلبک *Monoraphidium* و *Scenedesmus* از بخش آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی، واحد کشت جلبک، دانشگاه الزهرا تهیه گردید. جهت کشت ریزجلبک ازمحیط اختصاصی BBM استفاده شد. جهت اطمینان از خالص بودن ریزجلبک‌ها، ابتدا آن‌ها در محیط کشت جامد به روش پلیت آگار کشت داده شدند و سپس به محیط کشت مایع انتقال داده شدند. پس از رسیدن ریزجلبک‌ها به مرحله لگاریتمی، آن‌ها به صورت پلکانی به

حجم های بالاتر ۱۰۰،۲۵۰،۵۰۰،۱۰۰۰میلی‌لیتر منتقل شدند، و در هر بار انتقال ۱۰در صد ازحجم کل محیط به ریزجلبک‌ها اختصاص داده شد. در تمامی این مراحل شرایط منا سب کشت، یعنی دما ۲۵ ± ۲°c، دوره نوری ۱۲ ساعت رو شنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و نوردهی ۲۵۰۰ لوکس فراهم گردید. در نهایت برای رسیدن به زیست توده لازم جهت اعمال تیمارها، ریزجلبک ها به محیط ۲۰۰۰ میلی‌لیتر منتقل، و در این مرحله عمل هوادهی از طریق پمپ مرکزی انجام، و جهت جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی از طریق هوا از فیلتر های ۰/۲ µm میکرو متر در مسیر ورود هوا به داخل محیط ریزجلبک ها استفاده گردید (Bischoff *et al*., 1963).

۲،۲. تیمار جلبک‌ها با غلظت‌های مختلف گلوکز و گلیسرول

در این آزمایش غلظت‌های مختلف گلیسرول (۲ و ۵ گرم/ گلیسرول) و (۱و ۳ گرم/ لیتر) و مخلوط ۳ گرم/ لیتر گلوکز و ۵ گرم / لیتر گلیسرول (میکسوتروف) به محیط کشت جلبک‌های *Scenedesmus* و *Monoraphidium* افزوده شد. نمونه کنترل هم در شرایط مشابه، مورد آزمایش قرار گرفت. محیط شامل مخلوط گلوکز با غلظت ۳ گرم / لیتر و گلیسرول با غلظت ۵ گرم/ لیتر بود که در آن افزودن گلوکز و غلظت های مختلف گلیسرول در ابتدای فاز لگاریتمی صورت گرفت و در فاز stationary phase (ثبات) نمونه‌ها برداشت شد. تمام نمونه‌ها روی شیکر اوربیتال با ۱۲۰ rpm، با دوره‌های ۱۲ ساعت رو شنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، در ارلن‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی۱ میلی‌لیتر محیط کشت BBM، با روشنایی ۱۸۰۰ Lux قرار داده شدند. پس از ۱۴ روز نمونه‌ها برداشت شد، و توسط دستگاه سانتریفیوژ فالکوندار یخچالدار سانتریفوژ و سپس به مدت ۲۴ ساعت داخل فریزر با دمای ۳۰ c۰ - درجه سانتی‌گراد فریز شدند و سپس توسط دستگاه فریزدرایر به پودر تبدیل و سنجش‌ها روی پودر جلبک انجام شد (Kong *et al*., 2013).

۲.۳. استخراج و تعیین پروتئین‌های محلول

برای سنجش محتوای پروتئین از نمونه خشک استفاده و با معرف بردفورد سنجیده شد. بدین منظور جلبک خشک شده، با هاون پودر شد. به ۵ میلی‌گرم از ماده خرد شده ۱میلی‌لیتر سود (۰/۵ مولار) افزوده شد و نمونه ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس در دمای آزمایشگاه سرد شد. نمونه در دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی در لوله دیگری انتقال یافت و برای تعیین پروتئین مورد آزمایش قرار گرفت. از نمونه‌های مورد بررسی مقداری برداشته شد و با بافر سدیم استات۰/۲ مولار با pH ۵/۴ به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد و بعد از گذشت ۲ دقیقه جذب آن در جذب ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد، غلظت محلول پروتئینی محاسبه شد (Kobayashi *et al*., 2013).

۲.۴. استخراج و تعیین کربوهیدرات‌های محلول

سلول‌های جلبک با سانتریفوژ جدا گردید و سپس دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و در فریزدرایر خشک گردید. ۰/۰۲ گرم از جلبک برداشت شد و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و محتویات توسط هاون چینی کوبیده شد تا دیواره سلولی متلاشی شود. سپس محلول حاصل را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه توسط سانتریفیوژ فالکون یخچالدار سانتریفیوژ نموده و پس از حذف دیواره سلول‌های ته نشین شده، با استفاده از روش فنل سولفوریک اسید میزان قند آنها اندازه‌گیری شد (Chen and Vaidyanathan., 2013).

۲.۵. استخراج و اندازه گیری آنتی اکسیدان

سه حلال با قطبیت متفاوت برای انجام استخراج‌ها استفاده شد. به طور خلاصه، مقدار ۰/۱ گرم از توده‌های سلولی خشک شد و مواد خارج سلولی به طور دقیق وزن شد، سپس دو مرتبه با ۲ میلی‌لیتر هگزان در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه استخراج صورت گرفت. سپس سانتریفوژ شد. در استخراج‌های بعدی به همان شیوه از

اتیل استات و بعد از آن از آب استفاده شد (دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و سوپرناتانت‌های مربوط به هر حلال با هم ترکیب شدند. به منظور بی رنگ شدن عصاره‌های هگزان و اتیل استات از نیتروژن استفاده شد و تمام نمونه‌ها در دمای صفردرجه نگهداری شدند. روش کار FRAP برای سنجش میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بکار رفت. مقدار ۱/۵میلی‌لیتر معرف آماده فرپ به هر یک از لوله ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷درجه نگهداری، سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر ازنمونه‌ها واز هر یک از استانداردها با غلظت‌های مختلف به لوله‌های مربوطه اضافه و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ نانومتر و در مقابل شاهد (حاوی ۱/۵ سی سی از معرف فرپ + ۲۵۰ میکرولیتر حلال متانول) و بر اساس غلظت‌های مختلف استاندارد، میزان جذب خوانده شد و منحنی استاندارد رسم شد (Hanachi *et al*., 2019a; Hanachi *et al*., 2019b).

۲.۶. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش براساس طرح آماری بلوک‌های کاملا تصادفی در ۳ تکرار طراحی شده‌اند. بعد از انجام هر سنجش، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ در سطح احتمال P<0/05 تجزیه و تحلیل شدند. براساس نوع عوامل مورد آزمایش به کمک تجزیه واریانس یک طرفه برای طرح یک عاملی(ANOVA) میانگین‌ها مقایسه و معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها تعیین گردید و داده‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن گروه بندی شدند.

۳. نتایج

۳.۱. سنجش پروتئین در *Scenedesmus*

بعد ازبرداشت نمونه‌ها در روز چهاردهم، سانتریفیوژ کردن و پودر کردن نمونه توسط دستگاه فریزدرایر، استخراج و سنجش غلظت پروتئین در نمونه از طریق روش Bradford در جلبک *Scenedesmus* با سه بار تکرار انجام شد.

۳.۲. سنجش آنتی اکسیدان با روش FRAP

بعد ازبرداشت نمونه‌ها در روز چهاردهم، سانتریفیوژ کردن و پودر کردن نمونه توسط دستگاه فریزدرایر، استخراج و سنجش غلظت آنتی اکسیدان در نمونه از طریق روش FRAP در جلبک *Scenedesmus* با سه بار تکرار انجام شد. غلظت نمونه‌ها شامل نمونه کنترل، محیط حاوی ۲ گرم/لیتر گلیسرول، ۳ گرم/لیتر گلوکز،۱گرم/لیتر گلوکز، محیط حاوی ۳ گرم/لیتر گلوکز+ ۵ گرم/لیتر گلیسرول و محیط حاوی ۵گرم/لیتر گلیسرول بود.

۳.۳. سنجش قند در نمونه *Scenedesmus*

بعد ازبرداشت نمونه‌ها در روز چهاردهم، سانتریفیوژ کردن و پودر کردن نمونه توسط دستگاه فریزدرایر، استخراج و سنجش غلظت قند در نمونه از طریق روش فنل سولفوریک اسید در جلبک *Scenedesmus* با سه بار تکرار انجام شد.

همانطور که در جدول۱ مشاهده می‌شود در جلبک *Scenedesmus* بالاترین غلظت پروتئین مربوط به محیط با غلظت ۲گرم/لیتر گلیسرول و کمترین غلظت پروتئین مربوط به محیط با غلظت ۱گرم/لیتر گلوکز است. بالاترین غلظت آنتی اکسیدان مربوط به محیط کنترل و کمترین غلظت آنتی اکسیدان مربوط به محیط با غلظت۳ گرم/لیتر گلوکز و ۵ گرم/لیتر گلیسرول است. بالاترین غلظت قند مربوط به محیط حاوی ۵ گرم/لیتر گلیسرول و کمترین غلظت قند مربوط به محیط کنترل است.

و طبق نتایج جدول ۲ در جلبک *Monoraphidium* بالاترین غلظت پروتئین مربوط به محیط کنترل و کمترین غلظت پروتئین مربوط به محیط حاوی۱گرم/لیتر گلوکز است. بالاترین غلظت آنتی اکسیدان مربوط به محیط کنترل و کمترین غلظت آنتی اکسیدان مربوط به محیط با غلظت ۳گرم/لیتر گلوکز می‌باشد. بالاترین غلظت قند مربوط به محیط حاوی ۳ گرم/لیتر گلوکز + ۵

گرم/لیتر گلیسرول و کمترین غلظت قند مربوط به محیط ۵گرم/لیتر گلیسرول است.

جدول ۱- میانگین (± انحراف معیار) غلظت ترکیب بیوشیمیایی جلبک *Scenedesmus* در غلظت‌های مختلف گلوکز و گلیسرول در پایان آزمایش

غلظت(gr/lit)		قند (mg/l)	آنتی اکسیدان (میکرومول Fe^{2+}/ گرم وزن خشک)	پروتئین (mg/l)
گلیسرول	۲	۳۷/۳۹ ± ۰/۳۷ ab	۳/۱۲ ± ۰/۰۵ a	۱۲/۳۷ ± ۰/۰۲ a
گلیسرول	۵	۵۲/۲۴ ±۰/۴۶ a	۳/۷۵ ± ۰/۰۳ a	۱۱/۱۵ ± ۰/۰۴ a
گلوکز	۱	۴۵/۸۳ ±۰/۶۵ a	۴/۱۴ ± ۰/۰۲ a	۲/۷۸ ± ۰/۰۳ b
گلوکز	۳	۴۱/۰۳ ±۰/۴۷ a	۲/۳۸ ± ۰/۰۳ a	۱۱/۲۷ ± ۰/۰۱ a
کنترل		۱۶/۲۲ ±۰/۳۲ b	۴/۶۵ ± ۰/۰۲ a	۱۰/۶۴ ± ۰/۰۲ a
میکسوتروف	۳ گرم/لیتر گلوکز و ۵ گرم/لیتر گلیسرول	۲۶/۹۴ ± ۰/۲۲ c	۱/۳۲ ± ۰/۰۱ b	۸/۵۰±۰/۰۵ c

اعداد با حروف نامشابه، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ردیف‌های مختلف با یکدیگر است (p <۰/۰۵).

جدول۲- میانگین (± انحراف معیار) غلظت ترکیب بیوشیمیایی جلبک *Monoraphidium* در غلظت‌های مختلف گلوکز و گلیسرول در پایان آزمایش

غلظت (gr/lit)		قند (mg/l)	آنتی اکسیدان (میکرومول Fe^{2+}/ گرم وزن خشک)	پروتئین (mg/l)
گلیسرول	۲	۱۱۱/۹۴ ± ۲/۳۲ b	۲/۰۹ ۰±/۰۲ c	۱۱/۹۶ ± ۰/۲۶ a
گلیسرول	۵	۷۱/۲۹ ± ۱/۶۵ c	۱/۷±۰/۰۱ c	۱۲/۴۱±۰/۲۷ a
قند	۱	۱۰۱/۸۱ ± ۱/۱۶ b	۴/۹۶±۰/۱۶ b	۹/۵۰±۰/۱۸ a
قند	۳	۱۳۴/۲۷ ± ۳/۰۱ a	۱/۴±۰/۰۰۱ c	۱۱/۵۴ ± ۰/۲۳ a
کنترل		۱۴۹/۸۶ ± ۳/۴۲ a	۷/۷۱±۰/۴۱ a	۱۲/۴۳±۰/۲۱ a
میکسوتروف	۳ گرم/لیتر گلوکز و ۵ گرم/لیتر گلیسرول	۱۸۲/۳۳ ± ۲/۰۴ a	۲/۱۶±۰/۰۱ c	۱۱/۲۴±۰/۲۰ a

اعداد با حروف نامشابه، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ردیف‌های مختلف با یکدیگر است (p <۰/۰۵).

۳.۴. سنجش لیپید در جلبک *Scenedesmus*

بعد ازبرداشت نمونه‌ها در روز چهاردهم، سانتریفیوژ کردن و پودر کردن نمونه توسط دستگاه فریزدرایر، استخراج و سنجش غلظت لیپید در نمونه از طریق در جلبک *Scenedesmus* و *Monoraphidium* با سه بار تکرار انجام شد.غلظت نمونه‌ها شامل نمونه کنترل، محیط حاوی ۲ گرم/لیتر گلیسرول، ۳ گرم/لیتر گلوکز،۱گرم/لیتر گلوکز، محیط حاوی ۳ گرم/لیتر گلوکز + ۵ گرم/لیتر گلیسرول و محیط حاوی ۵گرم/لیتر گلیسرول به صورت زیر است (جدول ۳).

در این پژوهش گلوکز با غلظت ۳گرم/لیتر به نمونه جلبک *Scenedesmus* افزوده شد. تعداد سلول‌ها بعد از گذشت چند روز و همچنین میزان کربوهیدرات و پروتئین نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. میزان آنتی اکسیدان کاهش یافت. در این پژوهش گلوکز با غلظت ۱گرم/لیتر به نمونه افزوده شد تعداد سلول‌ها بعد از گذشت چند روز افزایش یافت. میزان کربوهیدرات نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت و میزان پروتئین نسبت به نمونه کنترل و میزان آنتی اکسیدان کاهش شدیدی را نشان داد. همچنین افزودن گلوکز و گلیسرول باهم (محیط

میکسوتروف شامل محیط حاوی گلوکز با غلظت ۳گرم/لیتر و گلیسرول با غلظت ۵ گرم/لیتر) به محیط کشت جلبک *Scenedesmus* باعث کاهش پروتئین نسبت به نمونه شد. اثر افزودن گلیسرول با غلظت۲ گرم/لیتر و غلظت ۵ گرم/لیتر به محیط کشت جلبک *Scenedesmus* سبب تولید میزان پروتئین کمتر و قند بیشتری نسبت به نمونه کنترل شد و میزان آنتی اکسیدان کاهش نشان داد.

جدول ۳- غلظت لیپید (میانگین ± انحراف معیار) درجلبک‌های *Scenedesmus* و *Monoraphidium*

تیمارها	غلظت(%) *Scenedesmus*	غلظت(%) *Monoraphidium*
کنترل	۸/۱۶ ± ۰/۲۱ [a]	۸/۲۸ ± ۰/۱۷ [a]
۲ گرم/لیتر گلیسرول	۴/۷۹ ± ۰/۱۴ [b]	۶/۴۵ ± ۰/۱۶ [a]
۳ گرم/لیتر گلوکز	۶/۹۲ ± ۰/۲۰ [a]	۶/۷۸ ± ۰/۱۵ [a]
۳ گرم/لیتر گلوکز و ۵ گرم/لیتر گلیسرول	۶/۶ ± ۰/۲۷ [a]	۸/۲۶ ± ۰/۲۲ [a]
۱گرم/لیتر گلوکز	۷/۱۷ ± ۰/۳۱ [a]	۷/۶۲ ± ۰/۲۱ [a]
۵گرم/لیتر گلیسرول	۷/۴۴ ± ۰/۴۲ [a]	۷/۹۸ ± ۰/۲۸ [a]

اعداد با حروف نامشابه، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ردیف‌های مختلف با یکدیگر است (p <۰/۰۵).

اثر افزودن گلوکز به محیط کشت روی جلبک *Monoraphidium* در این پژوهش نشان داد که گلوکز با غلظت ۳گرم/لیتر به نمونه افزوده شد تعداد سلول‌ها بعد از گذشت چند روز افزایش یافت. میزان کربوهیدرات و پروتئین نسبت به نمونه کنترل کاهش نشان داد و میزان آنتی اکسیدان هم کاهش یافت. در این پژوهش گلوکز با غلظت ۱گرم/لیتر به نمونه افزوده شد که در آن تعداد سلول‌ها بعد از گذشت چند روز افزایش یافت. میزان کربوهیدرات نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت میزان پروتئین نسبت به نمونه کنترل کاهش شدیدی نشان داد، میزان آنتی اکسیدان همچنین کاهش یافت. اثر افزودن گلوکز و گلیسرول باهم (میکسوتروف) به محیط کشت جلبک *Monoraphidium* مبنی بر آن است که این محیط به دلیل دارا بودن دو نوع منبع کربنی میزان رشد و تعداد سلول‌ها را به میزان زیادی افزایش خواهد داد و میزان کربوهیدرات نسبت به نمونه کنترل افزایش زیادی دارد. اما میزان پروتئین در محیط میکسوتروف (محیط حاوی گلوکز با غلظت ۳گرم/لیتر و گلیسرول با غلظت (۵ گرم/لیتر) نسبت به نمونه نرمال کاهش داشت. در نهایت اثر افزودن گلیسرول با غلظت ۲گرم/لیتر و غلظت ۵ گرم/لیتر به محیط کشت روی جلبک *Monoraphidium* به عنوان منبع کربن آلی میزان رشد جلبک و تعداد سلول‌ها افزایش داد. این نمونه میزان پروتئین کمتری و قند بیشتری کمتری نسبت به نمونه کنترل دارد.میزان آنتی اکسیدان هم کاهش نشان داد. با افزودن ۵گرم/ لیتر گلیسرول به عنوان منبع کربن آلی میزان رشد جلبک و تعداد سلول‌ها افزایش پیدا کرد.این نمونه میزان پروتئین تقریبا مشابه نمونه کنترل است، میزان قند نسبت به نمونه کنترل کاهش داشت و میزان آنتی اکسیدان هم کاهش داشت.

۴. بحث و نتیجه گیری

Kong و همکاران (2010) از غلظت‌های مختلف گلوکز و گلیسرول به عنوان منبع کربن برای بررسی میزان زیست توده و ترکیبات بیو شیمیایی *chlorella vulgaris* استفاده کردند، غلظت‌ها شامل گلیسرول (۱، ۵ و ۱۰ گرم بر لیتر) و گلوکز (۲ گرم بر لیتر) و نمونه کنترل بود. نمونه

ای که با منابع کربن آلی تغذیه شـده بود، در مقایسـه با نمونه کنترل رشـد بالاتری داشـت. هم چنین مخلوط گلیسـرول و گلوکز نسـبت به محیطی که فقط گلیسـرول داشت بهتر عمل کرد. در مورد غلظت گلیسرول بیشترین تولیـد توده جلبکی ۶۵۴,۱۷ میلی‌گرم / (لیتر. روز) در محیط با ۱۰ گرم بر لیتر گلیسرول و ۲ گرم بر لیتر گلوکز بود که تفاوت چشمگیری (p<۰,۰۵) با نمونه کنترل (۸۵,۴۲ میلی‌گرم / (لیتر. روز) داشـت. اما با نمونه با غلظت ۵ گرم بر لیتر و ۲ گرم بر لیتر گلوکز (۶۵۰,۰۰ میلی‌گرم/ (لیتر. روز) تفاوت چشـمگیری نداشـت. همچنین زمانی که ۱۰ گرم بر لیتر گلیسرول و ۲ گرم بر لیتر گلوکز به محیط کشت اضافه شد، در مقایسه با نمونه کنترل اتوتروف، محیط حاوی گلوکز و گلیسرول مقدار کربوهیدرات تولید بیشتری داشت. علاوه بر آن نشان داده شدکه هر محیط کشتی که حاوی مخلوط گلوکز و گلیسـرول باشـد، محتوای کربوهیدراتی بیشـتری نسبت به محیط فقط حاوی گلیسرول دارد. تفاوت در تولید کربوهیدرات محلول میان گروه‌های مورد آزمایش چشـمگیر اسـت و با افزایش غلظت گلیسـرول و گلوکز افزایش می‌یابد. تاثیرات شـرایط مخلوط (نور، تحریک یا کربن آلی) روی آنابولیسم پروتئین محلول نسبت به تاثیر روی کربوهیدرات و لیپید متفاوت اسـت، اما مشـابه تاثیر روی بیوسـنتز پیگمان فتوسـنتزی اسـت.حداقـل محتوای پروتئین محلول (۱,۵۸درصـد) و تولید آن (۱۰,۳۷میلی‌گرم / (لیتر. روز) زمانی بدسـت می‌آید که ۱۰ گرم/ لیتر گلیسـرول و ۲ گرم/ لیتر گلوکز به محیط کشـت افزوده شـود. بیشـترین مقدار ۱۸/۱۳درصـد و ۱۵/۴۱ میلی‌گرم / (لیتر / روز) به ترتیب مربوط به محیط کنترل اتوتروف بود. زمانی که محتوای پروتئینی کلرلا ولگـاریس کـاهش پیـدا کرد، محتوای کربوهیدراتی و لیپید آن افزایش یافت. کاهش پروتئین در محیط مخلوط را می‌توان با افزایش کربوهیدرات و لیپید جبران کرد که این نشـان می‌دهد که شـرایط میکسـوتروف، مسیرهای متابولیکی نیتروژن و کربن را می‌تواند تغییر دهد (Kong *et al*., 2013).

Bajwa و همکاران (2015) در مورد اثر اسـتفاده از گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و هم چنین در ترکیب با گلیسـرول به منظور تولید بیومس (گرم بر لیتر)، لیپید (dcw٪) و ترکیبات بیو شیمیایی از قبیل کربوهیدرات‌های محلول تام (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پروتئین‌ها (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) توسـط جلبک *Chlorella pyrenoidosa* تحقیق کردند. این مطالعه نشان داد که استفاده از گلوکز به عنوان تنها منبع کربن در غلظت‌های مختلف در دامنه تغییرات (۱ تا ۲۰گرم بر لیتر)، چربی کل، زیسـت توده کل، پروتئین کل و کربوهیدرات کل افزایش می‌یابد. تأثیر افـزودن گـلـوکـز روی مـحـیـط‌هـای کشـت *Chlorella pyrenoidosa* با غلظت‌های ۰,۱ تا ۲درصـد گلوکز برر سی شد و تولید پیاپی بالاتری نسبت به نمونه کنترل را نشـان داد .هم چنین بیومس و محتوای لیپیدی بیشتری نسبت به کنترل حاصل شد. افزودن گلوکز باعث رشـد سـریعتر جلبک می‌شـود، زیرا گلوکز قند سـاده ای است و به راحتی تجمع پیدا می‌کند و با تولید استیل کوآ که در چندین مسـیر چندگانه از جمله سـنتز اسـیدهای چرب نقش مهمی مواد مختلف خواهد داشـت، ولی اثر محرکی آن در تولید کلروفیل تام در این پژوهش دیده نشـد، چون محتوای کلروفیل تام با افزایش غلظت گلوکز کاهش پیدا کرد (Bajwa *et al*., 2015). طبق مطالعه دیگر رشـد هتروتروفیک منجر به کاهش کلروفیل در کلروپلاسـت می‌شـود. به هرحال با افزایش غلظت گلوکز افزایش زیسـت توده و محتوای لیپیدی در کلرلا، افزایش در محتوای کربوهیدرات و کاهش در بیوسـنتز پروتئین به اثبات رسده است (Kong *et al*., 2010).

نشان داده شده است که زمانیکه محتوای پروتئینی در کلرلا ولگـاریس کـاهش می‌یـابـد، محتوای لیپیـدی و کربوهیدراتی افزایش می‌یابد. شرایط میکسوتروف (گلوکز+ گلیسـرول) و افزودن منابع کربن آلی، تولید زیسـت توده، لیپید و کربوهیدرات را تحریک می‌کند. در حالیکه بیوسنتز پیگمان و پروتئین کاهش می‌یابد. تمامی این نتایج نشـان می‌دهد که شـرایط میکسـوتروف مسـیرهای متابولیک نیتروژن و کربن را تغییر می‌دهد(Kong *et al*., 2011).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که استفاده از منابع کربن آلی پیچیده یعنی ترکیب گلوکز و گلیسرول، میزان تولید کربوهیدرات را تحریک می‌کند ولی تولید پروتئین و آنتی اکسیدان‌ها را کاهش خواهد داد.

۵. منابع

References

Alassali, A., Cybulska, I., Brudecki, G. P., Farzanah, R., Thomsen, M. H. 2016. Methods for upstream extraction and chemical characterization of secondary metabolites from algae biomass. *Advanced Techniques in Biology & Medicine* 1-16.

Bajwa, K., Bishnoi, N. R. 2015. Osmotic stress induced by salinity for lipid overproduction in batch culture of Chlorella pyrenoidosa and effect on others physiological as well as physicochemical attributes. *Journal of Algal Biomass Utln 6*, 26-34.

Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, *25*(2), 207-210.

Bird, C. J., McLachlan, J. 1986. The effect of salinity on distribution of species of Gracilaria Grev.(Rhodophyta, Gigartinales): an experimental assessment.

Bischoff, H.W., Bold, H.C., 1963. Some algae from enchanted rock and related algal species. Phycological Studies, University of Texas, IV, Austin5, 68.

Chen, Y., Vaidyanathan, S., 2013. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica chimica acta 776*(-), 31-40.

Hanachi, P., Aghababaei, A., Norozi, M., 2019. The effect of pH and temperature on growth, the antioxidants, phenols and flavonoids in *Scenedesmus spp*. microalgae. *Journal of Fisheries 72*(1), 13-27.

Hanachi, P., Aghababaei, A., Noroozi, M., Zarringhalami, R., 2021. Effect of heavy metals on the antioxidant compounds of *Monoraphidium* and *Scenedesmus* microalgae. *Journal of Fisheries 74*(1), 107-118.

Hanachi, P., Zarringhalami, R., & Tamijani, R. R. 2019. Investigation of antioxidant properties of Polygonatum orientale Desf and Tilia dasystyla extracts by different methods and solvents. *Hormozgan Medical Journal*, *22*(4), e86504-e86504.

Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews 14*(3), 1037-1047.

Kobayashi, N., Noel, E. A., Barnes, A., Watson, A., Rosenberg, J. N., Erickson, G., & Oyler, G. A. 2013. Characterization of three Chlorella sorokiniana strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. *Bioresource technology 150*, 377-386.

Kong, Q., Zhu, L., Shen, X. 2010. The toxicity of naphthalene to marine Chlorella vulgaris under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials 178*(1-3), 282-286.

Kong, W. B., Yang, H., Cao, Y. T., Song, H., Hua, S. F., & Xia, C. G. 2013. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by Chlorella vulgaris in mixotrophic culture. *Food Technology and Biotechnology 51*(1), 62.

Kong, W., Song, H., Cao, Y., Yang, H., Hua, S., Xia, C., 2011. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of Chlorella vulgaris under mixotrophic cultivation. *African Journal of Biotechnology 10*(55), 11620-11630.

Wang, H., Zhang, W., Chen, L., Wang, J., Liu, T., 2013. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource technology 128*(-), 745-750.