ارزیابی ترکیبات فنلی ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با دو روش کروماتوگرافی TLC و HPLC

چکیده

اسپیرولینا پلاتنسیس یک ریزجلبک سبز- آبی است که به دلیل میزان بالای پروتئین به‌عنوان یک ماده غذایی باارزش معرفی‌شده است. این ریز جلبک منبع غنی از ترکیبات زیست فعال است. هدف از این مطالعه تعیین حضور و تنوع ترکیبات فنلی و همچنین تعیین درصد این ترکیبات در ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس با دو روش کروماتوگرافی TLC و HPLC است . در این مطالعه میزان ترکیبات فنلی تام با روش اسپکترو فتومتری اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) و کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) حضور ۱۴ ترکیب فنلی و همچنین آسکوربیک اسید و درصد این ترکیبات در کل ترکیبات فنلی بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان فنل تام استخراج‌شده در ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در عصاره آبی آن با حلال آب نسبت به عصاره الکلی با متانول به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. مقدار فنل تام در عصاره آبی ۰/۴۱± ۱۵۰/۵ میلی‌گرم و در عصاره متانولی ۰/۴۷± ۳۲/۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم اسپیرولینا بود. از میان ۱۴ ترکیب فنلی استاندارد حضور ۱۰ ترکیب فنلی کورکومین، آسکوربیک اسید ، تانیک اسید، سالیسیلیک اسید، الاژیک اسید،گالیک اسید، کاتچین، کوئرسیتین، وانیلین و بنزوئیک اسید در اسپیرولینا تأیید شد. بیشترین مقدار ترکیب فنلی موجود کورکومین با مقدار ۳۰ درصد و آسکوربیک اسید به میزان ۲۰/۳ درصد بود و کمترین ترکیب فنلی مربوط به بنزوئیک اسید با ۰/۰۵ درصد بود. حضور مقدار بالای ترکیبات فنلی و به‌ویژه درصد بالای کورکومین و اسید آسکوربیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی در اسپیرولینا بر ارزش غذایی این ریزجلبک که از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا به‌عنوان یک غذای برتر معرفی‌شده است، می‌افزاید.

واژگان کلیدی: ریزجلبک، اسپیرولینا، ترکیبات فنلی، TLC، HPLC.

محبوبه اکبری زارع[۱]

حمیده افقی[۲*]

مهناز هادی زاده[۳]

۱. دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

۲. دانشیار بیولوژی مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

۳. استادیار بیوشیمی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

***مسئول مکاتبات:**

ofoghi@irost.ir

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۳۰۷۳۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۸

این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

مقدمه

بررسی حضور ترکیبات زیست فعال با ویژگی‌های دارویی در منابع طبیعی از اهمیت ویژه‌ای در تحقیقات بیوتکنولوژی برخوردار است. ترکیبات فنلی مانند وانیلین، تانیک اسید، کاتچین، سالیسیلیک اسید، الاژیک اسید، کورکومین، کوئرسیتین، بنزوئیک اسید و غیره دسته‌ای از ترکیبات زیست فعال هستند که با عملکردهایی چون فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد فشارخون، ضد آرتریت و محافظت از قلب شناخته می‌شوند (Bhuyan and Basu, 2017; Kepekçi and Saygideger, 2012). استرس اکسیداتیو با تولید رادیکال‌های آزاد سبب تخریب DNA و ایجاد ناهنجاری در سلول می‌شوند که می‌تواند یکی از دلایل بروز سرطان باشد. ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی سبب خنثی شدن رادیکال‌های آزاد می‌شوند و علاوه بر آن با تأثیری که در فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها و گیرنده‌های آن‌ها دارند سبب تعدیل فعالیت آن‌ها شده و می‌توانند نقش مناسبی در پیشگیری از بیماری‌هایی چون سرطان داشته باشند. با توجه به عوارض کمتر ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی، این ترکیبات می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک باشند (Bhuyan and Basu, 2017). ترکیبات فنلی طبیعی مانند

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

کورکومین حاصل از زردچوبه با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد میکروبی به‌عنوان مکمل‌هایی با عوارض کمتر از داروهای شیمیایی، از دیرباز در مبارزه با بیماری‌هایی چون آلزایمر، دیابت، آسم و زخم معده استفاده می‌شوند (مشایخی و همکاران، ۱۳۹۵). جلبک‌ها و ریزجلبک‌ها گروهی متنوع از موجودات دریایی فتوسنتز کننده هستند که برای زنده ماندن در محیط‌های بسیار پیچیده و رقابتی، ازجمله سطوح شوری بالا، با تغییرات دما، شدت نور کم و مواد ناکافی مغذی در زیستگاهشان تطابق یافته‌اند (Samarakoon and Jeon, 2012). ریزجلبک‌ها که زیست شناسان آن‌ها را فیتوپلانکتون می‌نامند، ارگانیزم‌های شبه گیاهان و بسیار کوچک هستند و اندازه‌ای در حدود ۵۰-۱ میکرومتر دارند، بدون ریشه و برگ هستند و در هر دو محیط آبی شور و شیرین رشد می‌کنند و اساس زنجیره غذایی هستند. بیشتر آن‌ها دارای کلروفیلa و b هستند و از نور خورشید استفاده کرده، در مسیر فتوسنتز CO_2 را به زیست‌توده تبدیل می‌کنند و در حین فتوسنتز O_2 تولید می‌کنند (Wolkers *et al.*, 2011). جلبک‌ها ازلحاظ نیاز به آب و مواد مغذی بسیار مقرون‌به‌صرفه هستند چراکه در حضور CO_2 و مواد غنی فاضلاب به‌خوبی رشد می‌کنند. جلبک‌ها دارای ترکیبات بسیار مفید هستند و کشت ریزجلبک‌ها به‌طور فزاینده‌ای برای تولید مواد خام به‌عنوان‌مثال، تولید نفت، پروتئین، نشاسته و رنگدانه صورت می‌گیرد (wolkers *et al.*, 2011).

استخراج ترکیبات فنلی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* جداشده از خلیج‌فارس نشان داد این جلبک ترکیبات فنلی چون اسید گالیک، اسیدپروتئوکاتچوتیک، اسید جینستیک و اسید هیدروکسی بنزوئیک را دارا می‌باشد (لشکان و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین مطالعه انجام‌شده بر روی عصاره متانولی ۴ نمونه جلبک سبز *Caulerpa sertularioides f. farlowii* جداشده از سواحل شمالی خلیج‌فارس نشان داد انواع مختلف این جلبک دارای مقادیر متفاوت ترکیبات فنلی با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت هستند (فراست و همکاران ۱۳۹۲)

سیانو باکتری‌ها نیز ازجمله ریزجلبک‌هایی هستند که به دلیل ترکیبات موجود در آن‌ها به‌عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین ارگانیزم‌ها جهت جداسازی ترکیبات زیست فعال شناخته‌شده‌اند (Singh *et al.*, 2005). اسپیرولینا پلاتنسیس یک سیانوباکتر سبز-آبی رشته‌ای و مارپیچی است که امروزه به‌وفور در غنی‌سازی غذای انسان و حیوان استفاده می‌شود (زرین و همکاران ۱۳۹۳). اسپیرولینا مقدار قابل‌توجه ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین دارد که ۹۰ درصد آن قابل‌هضم است. تمام اسیدآمینه‌های ضروری را در حد بالایی در این ریزجلبک وجود دارند اما اسیدآمینه‌های گوگردی در آن کم است (Tang and Suter, 2011). علاوه بر این، عدم وجود یک دیواره سلولی (برخلاف دیگر ریزجلبک‌ها)، آن را به‌راحتی قابل‌هضم می‌کند این ریز جلبک دارای سطح وسیعی از عناصر کم‌مصرف ضروری، اسیدهای چرب امگا ۶، بسیاری از ویتامین‌های مهم مانند ویتامین‌های گروه B، ویتامین E، فیکوسیانین، بتا کاروتن و کلروفیل است (Posten and Walter, 2012). سازمان غذا و داروی آمریکا در سال ۱۹۹۷ بر اساس مطالعات متعدد انجام‌شده روی جوندگان و استفاده طولانی‌مدت انسان از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، ایمنی آن را تأیید و حداکثر جذب روزانه این ریزجلبک را برای فرد ۱/۳۵ گرم اعلام کرد (صالحی فر و همکاران، ۱۳۹۱). اسپیرولینا به‌عنوان یک غذای دارای مواد مفید و مناسب برای رفع سوءتغذیه معرفی‌شده است و در بسیاری کشورها این ریزجلبک به‌صورت سنتی و یک غذای رایج استفاده می‌شود (Posten and Walter, 2012). تحقیقات جهت دستیابی به منابع آنتی‌اکسیدان طبیعی در توسعه صنایع غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است (Bhuyan and Basu, 2017) مطالعات زیادی در شناسایی ترکیبات فنلی در گیاهان و تعدادی از جلبک‌ها انجام‌شده است و واضح است که ریزجلبک‌ها نیز دارای چنین ترکیبات باارزشی هستند چنانچه ترکیبات فنلی مانند سالسیلیک اسید، کلوژنیک اسید و کافئیک اسید در ریزجلبک اسپیرولینا گزارش‌شده است (Safafar *et al.*, 2015) لذا بررسی بیشتر این ریزجلبک جهت ردیابی ترکیبات فنلی جدید که اگر به‌طور مناسب استفاده شوند، می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های کند کننده اکسیداسیون در مواد غذایی باشند، از اهمیت ویژه‌ای برخورداراست. هدف از این مطالعه معرفی بیشتر اسپیرولینا پلاتنسیس با بررسی ترکیبات زیست فعال فنلی آن به‌عنوان یک مکمل غذایی مناسب به جامعه ایرانی است.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

مواد و روش‌ها

اسپیرولینا پلاتنسیس از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی غذایی تبریز (ABRII) تهیه شد. محیط مناسب برای کشت و تولید اسپیرولینا محیط کشت زاروک بود. جهت رسم منحنی رشد و تعیین زمان مراحل رشد اسپیرولینا و تولید زیست‌توده، تلقیح استاندارد ۱۰٪ ریزجلبک درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت زاروک استریل با pH برابر ۹-۸/۵ انجام شد. سپس ارلن‌ها به مدت ۱۴ روز در معرض شدت نوری ۱۸۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه (تعداد ۶ لامپ مهتابی OSRAML ۳۶ وات) با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و شرایط هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، در شیکر با دمای ۳۷ °C قرار گرفتند (Moazez *et al*., 2013; Tarko *et al*., 2012). همزمان با یک دوره کشت ریزجلبک و تولید زیست‌توده، نمونه‌برداری به‌طور متناوب انجام‌شده و منحنی رشد بر اساس میزان جذبی زیست‌توده در ۶۲۰ نانومتر و همچنین وزن خشک آن رسم شد و چون تولید متابولیت‌های ثانویه در فاز سکون صورت می‌گیرد، برداشت محصول در این روزها انجام شد.

مرحله جمع‌آوری زیست‌توده با استراحت دادن مخزن کشت و پس‌ازآن با سانتریفیوژ انجام شد. این زیست‌توده جمع‌آوری‌شده ابتدا منجمد شده و پس‌ازآن در دستگاه خشک‌کن خشک شد. زیست‌توده خشک حاصل در دمای ۲-۴ درجه نگهداری شد.

تعیین مقدار فنل تام بر اساس روش فولین سیوکالتیو انجام شد (El-Baky *et al*., 2009; Tambe and Bhambar, 2014). استخراج فنل در این ریز جلبک با استفاده از حلال‌های آب و متانول انجام شد. جهت استخراج ترکیبات فنلی ۰/۱ گرم از زیست‌توده اسپیرولینا با ۱۰ میلی‌لیتر از متانول مخلوط شد و پس از سانتریفیوژ محلول رویی برای آزمایش استفاده شد. در استخراج با آب ۰/۱ گرم زیست‌توده ریز جلبک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل‌شده و ۱۰ دقیقه در حمام آبی با دمای 80^{c}° در حال هم زدن قرار داده شد و پس از سانتریفیوژ محلول رویی برای آزمایش استفاده شد (Machu *et al*., 2015). ۲۰ میکرولیتر از محلول هر عصاره با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰٪ مخلوط شده و پس از گذشت ۵ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰٪ به مخلوط اضافه شد ولوله‌ها پس‌ازآنکه خوب مخلوط شدند، در حمام ۴۰ °c به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و پس‌ازآن جذب در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فنل کل پس از استفاده از هر حلال، بر اساس میلی‌گرم اسیدگالیک در یک گرم از زیست‌توده گزارش گردید و برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک با غلظت‌های ۸۰،۶۰،۴۰،۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و پس از انجام مراحل مختلف که در بالا شرح داده شد، جذب غلظت‌های مختلف در ۷۶۰ نانومتر خوانده و نمودار استاندارد اسید گالیک رسم شد (Singleton and Rossi, 1965; Tambe and Bhambar, 2014; قربانی و همکاران ۱۳۹۲).

جهت بررسی اولیه حضور ترکیبات فنلی برای آزمون TLC ۰/۱ گرم پودر اسپیرولینا در ۱ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد و پس از سانتریفیوژ مایع رویی جدا شد. جهت لکه‌گذاری از صفحات سیلیکا ژل ۶۰ نوع F254 ساخت شرکت (MERK) به‌عنوان فاز ثابت و مخلوط کلروفرم و متانول با نسبت حجمی ۲۷: ۰/۳ به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد و ۲۰ میکرو لیتر از این عصاره جهت آزمون استفاده شد. جهت ظاهر شدن لکه‌های فنلی بر روی کاغذ از معرف فولین که به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شده بود استفاده شد. پس از ریختن معرف و ظهور لکه‌ها مقدار Rf یا فاکتور بازدارندگی هر لکه محاسبه شد (Kannan *et al*., 2014).

در ادامه با توجه به اینکه میزان ترکیبات فنلی استخراج‌شده با حلال آب بیشتر بود، پس از استخراج ترکیبات فنلی با آب مجدداً آزمون TLC و این بار با حضور استانداردهای فنلی انجام شد. در این آزمون نیز جهت لکه‌گذاری از صفحات سیلیکا ژل ۶۰ نوع F254 به‌عنوان فاز ثابت و مخلوط فرمیک اسید، تولوئن و اتیل استات با نسبت حجمی (۱: ۴:۶) به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد (Ferry and Larson, 1991; Ou *et al*., 2015).

کروماتوگرافی با کارایی بالا جهت بررسی پروفایل ترکیبات فنلی موجود در اسپیرولینا انجام شد. این آزمون در دمای محیط و با دستگاه Kneuer model well chrom، با میزان تزریق ۱۰ میکرو لیتر و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انجام شد. ستون استفاده‌شده Perfect siltorgeloDs

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

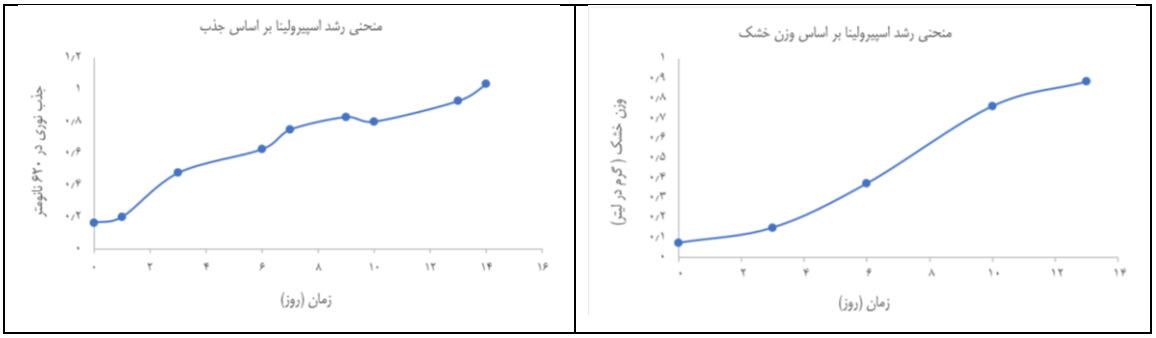
3- با دتکتور UV/Vis و طول‌موج‌های ۲۳۰، ۲۸۰، ۳۳۰ و ۳۶۰ نانومتر بود و جهت فاز متحرک از دو محلول A: H_2O (0.1% phosphoric acid) و B: acetonitrile استفاده شد (El-Baky *et al*., 2009; Mradu *et al*., 2012).

برای انجام این آزمون از ترکیبات فنلی خالص گالیک اسید، اپی گالوکاتچین گالات (EGCG)، وانیلین، تانیک اسید، کاتچین، سالیسیلیک اسید، الاژیک اسید، کورکومین، کوئرسیتین، بنزوئیک اسید، رزورسینول، کلروژنیک اسید وکومارین و همچنین آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شدند. استانداردها نیز در شرایط نمونه اصلی تزریق‌شده و کروماتوگرام و زمان بازدارندگی (Rt) هریک از استانداردها به‌صورت جداگانه مشخص شد. پس از به دست آمدن کروماتوگرام هر یک از ترکیبات استاندارد و زمان بازدارندگی هر یک از آن‌ها، تزریق با ترکیبات فنلی استخراج‌شده از اسپیرولینا نیز انجام شد و پیک مربوط به هر ترکیب در کروماتوگرام حاصل مشخص شد.

علاوه بر ترکیبات فنلی که به‌عنوان استاندارد استفاده شدند از آسکوربیک اسید نیز جهت شناسایی حضور این ترکیب در اسپیرولینا استفاده شد پس از مقایسه پیک‌های حاصل از نمونه فنلی استخراج‌شده از اسپیرولینا با پیک هر یک از ترکیبات استاندارد، در صورت مشاهده زمان بازداری مشابه با استانداردها در نمونه اصلی، حضور و درصد آن‌ها در ترکیبات فنلی استخراج‌شده گزارش شد.

نتایج

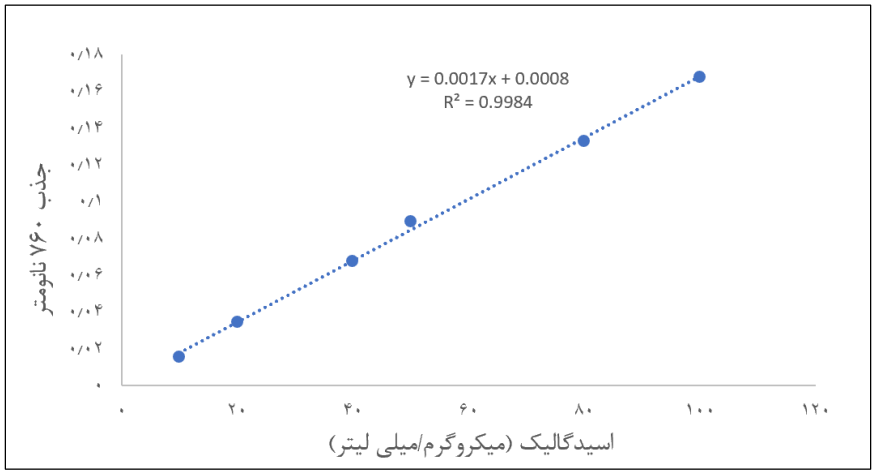
با رسم منحنی رشد اسپیرولینا (شکل ۱) و مشاهدات میکروسکوپی مشخص شد اواخر فاز لگاریتمی از روز ۱۱ آغاز می‌شود لذا با توجه به تشکیل متابولیت‌های ثانویه ازجمله ترکیبات فنلی پس‌ازاین مرحله از رشد، جمع‌آوری نمونه در این مرحله صورت گرفت.



شکل ۱: منحنی رشد استاندارد اسپیرولینا بر اساس جذب نوری و وزن خشک در ۱۴ روز.

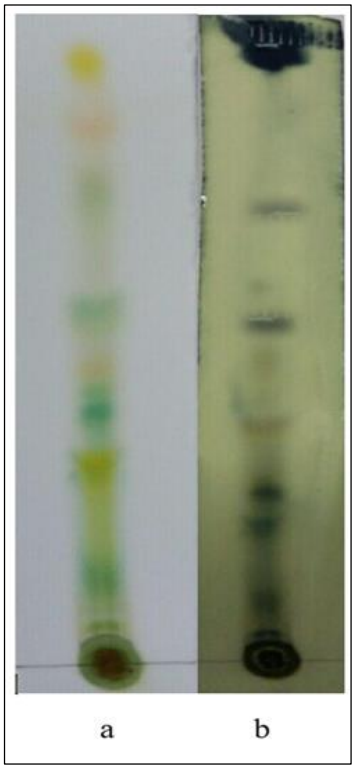
با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده بر اساس اسیدگالیک و به دست آمدن معادله خط y = ۰/۰۰۱۷ x + ۰/۰۰۰۸ با ضریب همبستگی (R^2) برابر با ۰/۹۹۸۴، مقدار فنل تام در عصاره متانولی و آبی به ترتیب ۰/۴۷± ۳۲/۸ و ۰/۴۱±۱۵۰/۵ میلی‌گرم در یک گرم اسپیرولینا محاسبه شد (شکل ۲).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۲: منحنی استاندارد ترکیبات فنلی بر اساس اسید گالیک.

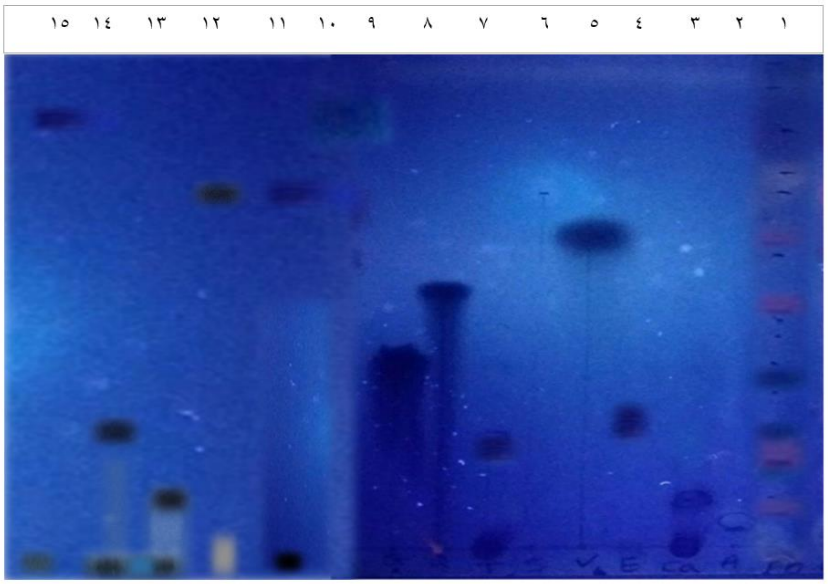
آزمون اولیه TLC با عصاره متانولی اسپیرولینا انجام شد که پس از اسپری کردن معرف فولین سیوکالتیو با تغییر رنگ باندها، ۱۰ باند فنلی با مقادیر Rf متفاوت از ۰/۰۷ تا ۰/۶۵ مشاهده شدند (شکل ۳).



شکل ۳: a) کروماتوگرافی با لایه‌نازک عصاره متانولی اسپیرولینا قبل از اسپری کردن معرف فولین b) تغییر رنگ باندهای مربوط به ترکیبات فنلی پس از اسپری کردن معرف فولین.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

پس از مشاهده باندهای مربوط به ترکیبات فنلی در کروماتوگرافی با لایه‌نازک عصاره متانولی، با توجه به مقدار بیشتر ترکیبات فنلی با استفاده از آب به‌عنوان حلال، باردیگر کروماتوگرافی با لایه‌نازک برای ترکیبات فنلی استخراج‌شده با این روش نیز به همراه استانداردهای فنلی انجام شد (شکل ۴).



۱- ترکیبات فنلی استخراج شده از اسپیرولینا ۲- آسکوربیک اسید ۳- کاتچین ۴- الازیک اسید ۵- وانیلین ۶- سالیسیلیک اسید ۷- تانیک اسید ۸- کوئرسیتین ۹- گالیک اسید ۱۰- کومارین ۱۱- رزورسینول ۱۲- کورکومین ۱۳- کلروژنیک اسید ۱۴- اپی گالو کاتچین گالات ۱۵- بنزوییک اسید

شکل ٤: کروماتوگرافی با لایه‌نازک ترکیبات فنلی استخراج‌شده با به همراه استانداردهای فنلی در زیر نور UV.

با روش کروماتوگرافی با لایه‌نازک حضور ۹ ترکیب از ۱۴ استاندارد استفاده‌شده تأیید شد. فاکتور بازدارندگی (Rf) هر یک از استانداردها محاسبه شد (جدول ۱) و با لکه‌های حاصل از کروماتوگرافی ترکیبات فنلی استخراج‌شده مقایسه شد. نتایج نشان داد اسید آسکوربیک با فاکتور بازدارندگی ۰/۰۴ سریع‌تر از ترکیبات دیگر جدا شد و لکه مربوط به کومارین با فاکتور بازدارندگی ۰/۸۶ در مراحل آخر کروماتوگرافی جدا شد. به دلیل نزدیک بودن فاکتور بازدارندگی دو ترکیب اسید سالیسیلیک و کومارین، رزورسینول و کورکومین و همچنین کلروژنیک اسید و آسکوربیک اسید، تفکیک باندهای مربوط به این ترکیبات در نمونه فنلی استخراج‌شده ممکن نبود.

جدول ۱: فاکتور بازدارندگی استانداردهای فنلی استفاده‌شده در آزمون TLC.

مقدار فاکتور بازدارندگی (Rf)	ترکیبات فنلی استفاده‌شده به‌عنوان استاندارد
۰/۰۴	آسکوربیک اسید
۰/۱۶	کاتچین
۰/۲۲	الاژیک اسید
۰/۶۰	وانیلین

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

مقدار فاکتور بازدارندگی (Rf)	ترکیبات فنلی استفاده‌شده به‌عنوان استاندارد
۰/۷	سالیسیلیک اسید
۰/۲۰	تانیک اسید
۰/۵۰	کوئرسیتین
۰/۳۶	گالیک اسید
۰/۸۶	کومارین
۰/۷۱	رزورسینول
۰/۷۱	کورکومین
۰/۰۶	کلروژنیک اسید
۰/۱۷	اپی گالوکاتچین گالات
۰/۸۰	بنزویک اسید

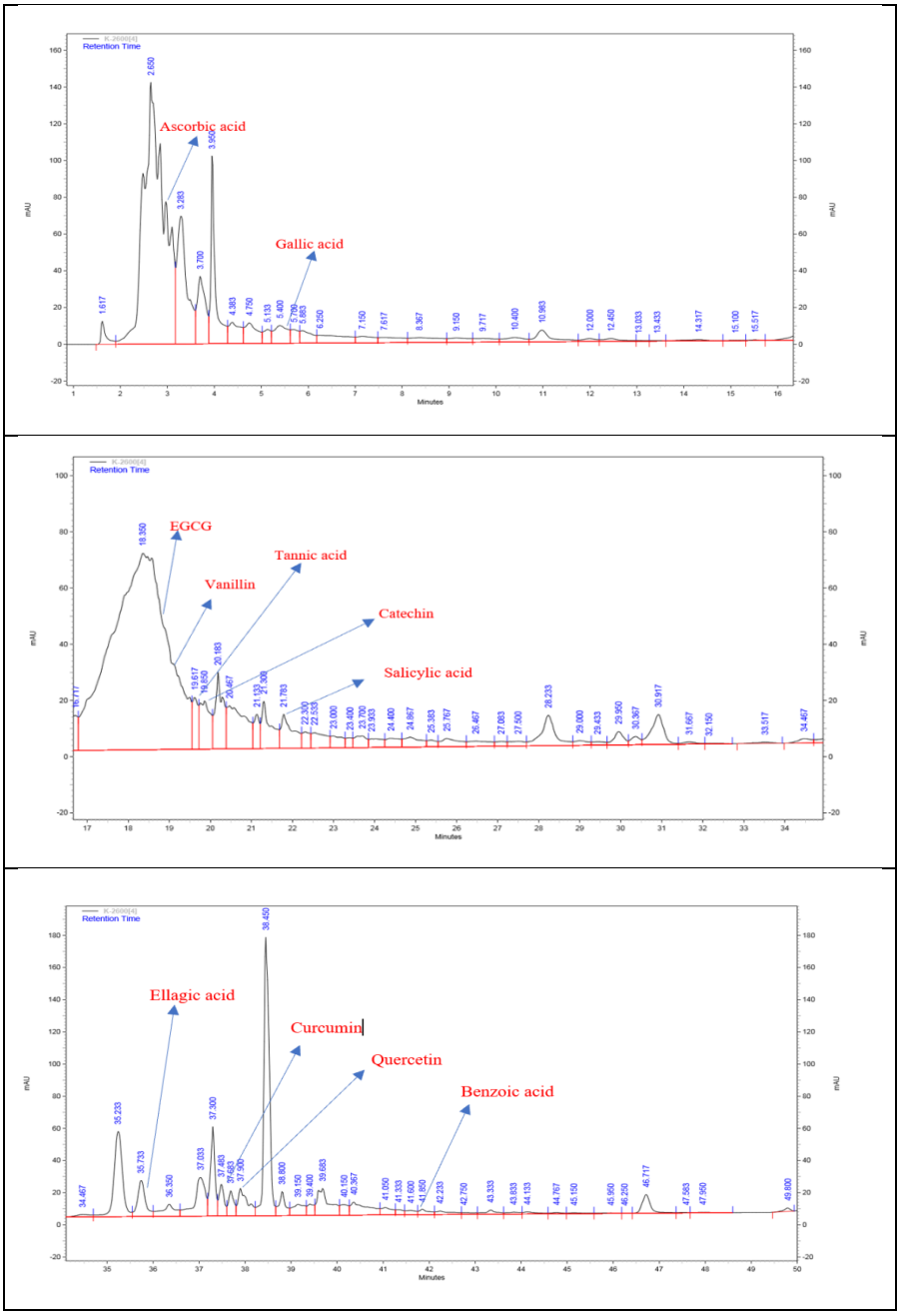
با انجام آزمون TLC حضور ۸ ترکیب و HPLC حضور ۱۰ ترکیب فنلی از ترکیبات انتخاب‌شده به‌عنوان استاندارد و همچنین حضور آسکوربیک اسید نیز با مقدار ۲۰/۳ درصد و در کوتاه‌ترین زمان بازدارندگی (۲/۸ دقیقه) همراه ترکیبات فنلی استخراج‌شده، تأیید شد. در آزمون TLC به دلیل نزدیک بودن فاکتور بازدارندگی دو ترکیب رزورسینول و کورکومین، اسید سالیسیلیک و کومارین و همچنین کلروژنیک اسید و آسکوربیک اسید، تفکیک باندهای مربوط به این ترکیبات ممکن نبود اما نتایج HPLC نشان داد ترکیبات فنلی کومارین، رزورسینول و کلروژنیک اسید در اسپیرولینا وجود ندارند. زمان بازدارندگی این ترکیبات به ترتیب ۲۳/۴، ۲۴/۷ و ۲۳/۷ بود که در پیک‌های حاصل از نمونه فنلی استخراج‌شده از اسپیرولینا مشاهده نشدند. با توجه به مساحت زیر پیک استانداردهای تزریق‌شده و مساحت زیر پیک ترکیبات موجود در نمونه فنل‌های استخراج‌شده از اسپیرولینا درصد وجود این ترکیبات در فنل تام استخراج‌شده محاسبه شد. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی جداشده به میزان ۳۰٪ مربوط به کورکومین و کمترین مقدار ترکیب فنلی، بنزوئیک اسید با مقدار ۰/۰۵٪ بود. در جدول ۲ زمان بازدارندگی و درصد ترکیبات فنلی شناسایی‌شده ارائه‌شده است.

جدول ۲: زمان بازدارندگی و درصد ترکیبات فنلی شناسایی‌شده در عصاره آبی اسپیرولینا پلاتنسیس.

ترکیبات فنلی شناسایی‌شده	گالیک اسید	وانیلین	تانیک اسید	کاتچین	سالسیلیک اسید	الاژیک اسید	کورکومین	کوئرستین	بنزوئیک اسید	EGCG
زمان بازدارندگی (دقیقه)	۵/۶۵	۱۹/۳۵	۱۹/۶۵	۱۹/۸	۲۱/۷	۳۵/۹	۳۷/۶	۳۷/۹	۴۱/۷	۱۸/۹
درصد در ترکیبات فنلی استخراج‌شده	۱/۷	۰/۰۸	۸/۳	۱	۵/۶	۳/۶	۳۰	۰/۹	۰/۰۵	–

با توجه به زمان بازدارندگی هریک از استانداردهای استفاده‌شده در این مطالعه، پیک مربوط به هریک از این ترکیبات بر روی کروماتوگرام به‌دست‌آمده از نمونه فنل استخراج‌شده از اسپیرولینا مشخص شد. این کروماتوگرام به‌صورت بسیط شده در شکل ۴ ارائه‌شده است.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۵: کروماتوگرام ترکیبات فنلی استخراج‌شده از اسپیرولینا در مقایسه بازمان بازدارندگی ترکیبات استاندارد استفاده‌شده.

چنانچه در شکل ۵ مشاهده می‌شود ترکیبات فنلی بیشتری نسبت به استانداردهای استفاده‌شده در این آزمون جدا شده‌اند که برای مطالعات بعدی می‌توانند موردبررسی قرار بگیرند.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

بحث و نتیجه‌گیری

تنوع متابولیکی ریزجلبک‌ها که ناشی از سازگاری این میکروارگانیزم‌ها با دنیای اطرافشان است باعث شده است که این میکرو ارگانیزم‌ها به‌عنوان نامزدهای مناسبی برای تحقیقات بیوتکنولوژی باشند (Sansone and Brunet, 2019). در میان ریزجلبک‌ها اسپیرولینا به‌عنوان یک غذای سودمند برای آینده معرفی‌شده است و با نگاهی به اهمیت غذایی آن، بررسی بیشتر این ریزجلبک در زمینه‌های کشت و تولید ترکیبات زیست فعال از آن ضروری به نظر می‌رسد (Mathur, 2018).

در منحنی استاندارد رشد اسپیرولینا در این مطالعه فاز سکون از روز ۷ آغاز می‌شود. معزز و همکاران نیز در بررسی رشد اسپیرولینا در شرایط استاندارد روزهای ۸ تا ۱۱ پس از اولین روز تلقیح را به‌عنوان فاز سکون گزارش کرده‌اند (Moazez *et al*., 2013). بر این اساس و بر اساس مطالعات دیگر جهت اطمینان بیشتر برداشت زیست‌توده اسپیرولینا از روز ۸ به بعد انجام شد. در این مطالعه روز یازدهم بعد از تلقیح استاندارد به‌عنوان آغاز فاز مرگ گزارش‌شده است درحالی‌که در منحنی استاندارد ما و مشاهدات میکروسکوپی، روز ۱۰ به‌عنوان آغاز فاز مرگ مشخص‌شده است درحالی‌که به دلیل لیز سلول‌ها پس از روز ده (در مشاهدات میکروسکوپی) همچنان جذب افزایش‌یافته و برخلاف گزارش معزز و همکاران شیب منحنی استاندارد رسم شده در مطالعه ما در ۱۴ روز سیر کاهشی را پیدا نکرد. منحنی استاندارد اسپیرولینا بر اساس وزن خشک اسپیرولینا نیز رسم شد و تغییرات وزن خشک در طول یک دوره رشد ۱۴ روزه بررسی شد. در مطالعه‌ای که توسط تارکو و همکارانش بر روی منحنی رشد اسپیرولینا انجام‌شده است روند رشد میزان زیست‌توده خشک اسپیرولینا مشابه نمودار ما از روز ۶ تا ۱۰ افزایشی بوده و پس‌ازآن از روز ۱۱ تا ۱۴ این شیب روند افزایشی کمتری دارد بر اساس این منحنی میزان زیست‌توده خشک حاصل از یک لیتر محیط کشت در یک دوره ۱۴ روزه حدود ۱ گرم بود که وزن نسبتاً مناسبی است درحالی‌که در مطالعه تارکو و همکارانش در یک دوره ۱۴ روزه میزان زیست‌توده خشک در ۱ لیتر محیط کشت برابر با ۶ میلی‌گرم بود و این نشان‌دهنده توانایی بیشتر سویه استفاده‌شده در مطالعه ما جهت تولید زیست‌توده خشک است (Tarko *et al*., 2012).

در بررسی انجام‌شده توسط تارکو و همکاران (۲۰۱۲) برای تعیین میزان فنل تام در عصاره اتانولی اسپیرولینا، حضور ترکیبات فنلی تأیید نشد درحالی‌که در این مطالعه در هر دو عصاره آبی و متانولی حضور ترکیبات فنلی تأیید شد (Tarko *et al*., 2012).

ماکو و همکاران (۲۰۱۵) طی بررسی میزان فنل تام در اسپیرولینا با حلال‌های مختلف، بهترین حلال جهت استخراج بیشترین فنل را از این ریزجلبک، آب مقطر با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کرده‌اند و با استفاده از این حلال میزان فنل تام را در اسپیرولینا ۴۳ میلی‌گرم در گرم گزارش کردند. در مطالعه ما نیز از میان حلال‌های استفاده‌شده آب مقطر با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بهترین نتیجه را در استخراج ترکیبات فنلی داد و میزان فنل تام در مطالعه ما با استفاده از آب در دمای ۸۰ درجه ۱۵۰/۵ میلی‌گرم در گرم بود که حدوداً سه برابر مقدار گزارش‌شده در مطالعه ایشان است و این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط رشد باشد. در همین مطالعه عدم حضور اسید گالیک و اپی گالوکاتچین گالات نیز گزارش‌شده است درحالی‌که نتایج ما حضور این دو ترکیب فنلی را نیز در اسپیرولینا تأیید می‌کند (Machu *et al*., 2015). مارتل و همکاران نیز عدم حضور بسیاری از ترکیبات فنلی ازجمله اسیدگالیک، کاتچین و اسیدکلروژنیک را در اسپیرولینا گزارش کرده‌اند (Jerez-Martel *et al*., 2017). در مطالعه ما نیز حضور اسید کلروژنیک تأیید نشد اما حضور کاتچین و گالیک اسید به ترتیب در زمان بازدارندگی ۱۹/۸ و ۵/۶۵ جداشده و تأیید شد.

علاوه بر ترکیبات فنلی که به‌عنوان استاندارد استفاده شدند از آسکوربیک اسید نیز جهت بررسی حضور این ترکیب در اسپیرولینا نیز استفاده شد و حضور این ترکیب نیز با مقدار ۲۰/۳ درصد همراه ترکیبات فنلی استخراج‌شده تأیید شد. درحالی‌که پوستن و همکارانش در سال ۲۰۱۲ ادعا کردند که ویتامین C در اسپیرولینا وجود ندارد (Posten and Walter., 2012). درمجموع نتایج این مطالعه نشان داد ترکیبات فنلی اپی گالوکاتچین گالات، بنزوئیک اسید، کوئرستین، کورکومین، الاژیک اسید، سالسیلیک اسید، کاتچین، تانیک اسید، وانیلین، گالیک اسید و آسکوربیک اسید در

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

اسپیرولینا حضور دارند. میزان بالای کورکومین و اسید آسکوربیک در اسپیرولینا دارای اهمیت است چراکه کورکومین در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند سرطان، مشکلات ریوی، بیماری‌های شبکه عصبی، بیماری‌های قلبی و کلیوی کاربرد دارد. مطالعات ثابت کرده‌اند که این ترکیب به‌شدت ضدالتهاب بوده و با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی التیام‌بخش زخم‌هاست (صبوری و همکاران ۱۳۹۶). اسید آسکوربیک هم به‌عنوان اولین سد آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از چربی‌ها و پروتئین‌های غشایی از خطر اکسیداسیون معرفی‌شده است و هم با احیای آهن ۳ ظرفیتی به آهن دو ظرفیتی سبب جذب بهتر آهن از منابع غیر هِم می‌شود. استفاده مرتب از این ترکیب خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن مانند آرتریت روماتوئید و سرطان را کاهش می‌دهد (Pehlivan., 2017).

مطالعات کمی در ارزیابی ترکیبات فنلی موجود در ریزجلبک‌ها و ارزش بالقوه آن‌ها برای کند کردن سرعت اکسیداسیون در مواد غذایی و حفظ سلامت غذایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها انجام‌شده است. نتایج نهایی این مطالعه نشان داد که اسپیرولینا دارای ترکیبات مهم فنلی ازجمله گالیک اسید، اپی گالوکاتچین گالات (EGCG)، وانیلین، تانیک اسید، کاتچین، سالیسیلیک اسید، الاژیک اسید، کورکومین، کوئرسیتین، بنزوئیک اسید و همچنین اسید آسکوربیک است. تأیید حضور ترکیباتی مانند اسید آسکوربیک و کورکومین که جزو آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند بر ارزش غذایی ریزجلبک خوراکی اسپیرولینا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و مکمل غذایی می‌افزاید.

منابع

زرین، ر.، زادباری، م.، علیزاده، م.، کیا، ا. م. و قاسمپور، ز.، ۱۳۹۳. بررسی اثرات ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و صمغ زدو در ماست پروبیوتیک. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۳(۳): صفحات ۲۱۰-۱۹۷.

صالحی فر، م.، زاده، س. ش.، دارانی، ک. خ.، بهمدی، ه. و فردوسی، ر. ا.، ۱۳۹۱. بررسی امکان استفاده از پودر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در تولید کلوچه صنعتی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۷ (۴): صفحات ۷۲-۶۳.

صبوری، ع. ا.، مظاهری، م.، رضایی، م. ح.، موحدی، ع. ا. م و فرهادی، م.، ۱۳۹۶. کورکومین، ملکول نیروهای چندگانه، تعدیل‌کننده بیولوژیکی و اثرات درمانی آن مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۲ (۱): صفحات ۱۳۲-۱۲۱.

فراست، م.، خاوری نژاد، ر.، نبوی، م. ب. و نامجویان، ف.، ۱۳۹۲. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی جلبک سبز دریایی *Caulerpa sertularioides f.farlowii*. زیست‌شناسی دریا، ۵ (۲۰): صفحات ۲۰-۱۳.

قربانی، م.، اعلمی، م.، ماهونک، ع. ص. و سلمانیان، ش.، ۱۳۹۲. ارزیابی ترکیبات تام فنولی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و فعالیت ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره استونی میوه ولیک. دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۳: صفحات ۶۶-۵۳.

لشکان، آ. ب.، رضایی، م.، رضایی، ک. و سیف آبادی، ج.، ۱۳۹۱. بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* خلیج‌فارس به روش استخراج به کمک ماکروویو. نشریه شیلات ، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۵ (۳)، صفحات ۲۵۵-۲۴۳.

مشایخی، ک.، خسروجردی، آ. و مرزونی، ه. ز.، ۱۳۹۵. کورکومین مستخرج از زردچوبه و اثرات درمانی آن. مجله حکیم سید اسماعیل جرجانی، ۴ (۲).

Bhuyan, D. J. and Basu, A., 2017. Phenolic Compounds Potential Health Benefits and Toxicity. Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste. Chapter 2: 27-59

El-Baky, H. H. A., Baz, F. K. E. and El-Barot, G. S., 2009. Production of phenolic compounds from Spirulina maxima microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3(4): 133-113.

Ferry, J. and Larson, R. A., 1991. A Mixed Solvent for Rapid TLC Analysis of Phenolic Compounds .Journal of Chromatographic Science, 29(11): 476–477.

Jerez-Martel, I., García-Poza, S., Rodríguez-Martel, G., Rico, M., Afonso-Olivares, C. and Gómez-Pinchetti, J. I., 2017. Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. Journal of Food Quality. (2017):1-9.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Kannan, M., Pushparaj, A., Dheeba, B. and Nageshwari, K., 2014. Phytochemical screening and antioxidant activity of marine algae Gracilaria corticata and Spirulina platensis. Chemical and Pharmaceutical Research, 6(11): 312-318.

Kepekçi, R. A. and Saygideger, S. D., 2012. Enhancement of phenolic compound production in Spirulina platensis by two-step batch mode cultivation. Journal of Applied Phycology. (24): 897-905.

Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J. and Jurikova, T., 2015. Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. Molecules, 20:1118-1133

Mathur, M., 2018. Bioactive Molecules of Spirulina: A Food Supplement. In J.-M. Mérillon and K.G. Ramawat (Eds.), *Bioactive Molecules in Food* (pp. 1-22). Cham: Springer International Publishing.

Moazez, Y., Memari, H. R., Ofoghi, H., Roayaei, M. and Ahmadi, D. N., 2013. Evaluation of *Spirulina platensis* resistance to different antibiotics to find a selectable marker for genetic transformation. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(7): 1-6.

Mradu, G., Saumyakanti, S., Sohini, M. and Arup, M., 2012. HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 4(3): 162-167.

Ou, L., He, Q., Ji, Z., Li, K. and Tian, S., 2015. Quantitative High-Performance Thin-Layer Chromatographic Analysis of Three Active Compounds in Gall of Quercus infectoria Olivier (Fagaceae) and Use of Thin-Layer Chromatography–2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl to Screen Antioxidant Component. Journal of Planar Chromatography, 28(4): 300-306.

Pehlivan, F. E., 2017. Vitamin C: An Antioxidant Agent. intecopen. Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, Botany Section, Süleymaniye, Fatih, Istanbul, Turkey.

Posten, C. and Walter, C., 2012. Microalgal Biotechnology: Integration and Economy.

Safafar, H., Wagenen, J. V., Møller, P. and Jacobsen, C., 2015. Carotenoids ,Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. Marine drugs, (13): 7339–7356.

Samarakoon, K. and Jeon, Y. J., 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae. Food Research International, 48: 948–960.

Sansone, C. and Brunet, C., 2019. Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *antioxidants*, *8*(199): 1-9.

Singh, S. Kate, B. and Banerjee, U., 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. Critical Reviews in Biotechnology, 25(3):73-95.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.

Tambe, V. D. and Bhambar, R. S., 2014. Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in hibiscus tiliaceus linn Wood Extracts. Journal of pharmacognosy and phytochemistry. 2(4): 41-47.

Tang, G. and Suter, P. M., 2011. Vitamin A, nutrition, and health values of algae: Spirulina,Chlorella, and Dunaliella. Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 1: 1111-1118.

T**arko, T. Duda-Chodak, A. and Kobus, M., 2012.** Influence of growth medium composition on synthesis of bioactive compounds and antioxidant properties of selected strains of arthrospira cyanobacteria. Czech Journal of Food Sciences | Agricultural Journals. 30(3): 258–267.

Wolkers, H., Barbosa, M., Kleinegris, D., Bosma, R. and Wjffels, R., **2011.** Microalgae the green gold of the future. large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities. Published in the series "Green raw materials".

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]