

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی روش استخراج اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین (MAA) از جلبک
قرمز *Hypnea musciformis* و سیانوباکتری جدا شده از چشمه آب گرم گنو

مریم سلطانی^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۲*}، فائزه ثمری^۲، مریم کوکبی^۴

تاریخ دریافت: آبان ۹۷

تاریخ پذیرش: بهمن ۹۸

چکیده

جلبک‌ها موجوداتی فتوسنتز کننده هستند که برای مقابله با آسیب‌های پرتوهای فرابنفش، ترکیبات محافظت کننده‌ای را همچون اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین (MAA) تولید می‌کنند. هدف از این مطالعه استخراج ترکیبات جاذب فرابنفش با استفاده از حلال و دمای مناسب است. در این مطالعه سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* و جلبک قرمز *Hypnea musciformis* برای استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور از حلال‌های متانول ۱۰۰ و ۲۰ درصد، اتانول ۷۰ درصد، آب مقطر و اتیل استات ۱۰۰ درصد در دو دمای مختلف ۴ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به منظور عصاره‌گیری استفاده شد. در سیانوباکتری *Leptolyngbya fragile* بیشترین میزان ترکیبات استخراج شده با استفاده از اتیل استات ۱۰۰ درصد و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۳۸۴ نانومتر ($\lambda_{max} = 1/78154$) و در جلبک قرمز *Hypnea musciformis* با استفاده از متانول ۲۰ درصد و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۳۳۶ نانومتر ($\lambda_{max} = 0/933$) به دست آمد. همچنین در عصاره اتانولی ۷۰ درصد جذب در دامنه فرابنفش بسیار ناچیز بود. به طور کلی می‌توان گفت نه تنها حلال و دمای مورد استفاده برای استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش در بازده استخراج تاثیرگذار است، بلکه این شاخص‌ها در گونه‌های مختلف نیز یکسان نیستند.

واژگان کلیدی: سیانوباکتری، جلبک قرمز، ترکیبات جاذب فرابنفش، اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین،

MAA

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۳- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۴- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

* نویسنده مسئول: Morteza110110@gmail.com

مقدمه

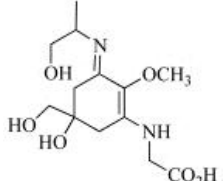
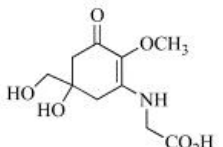
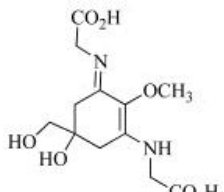
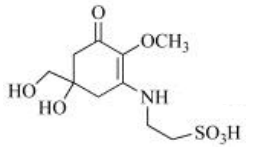
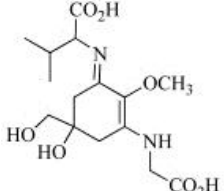
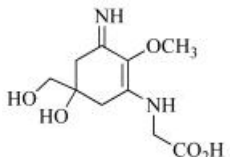
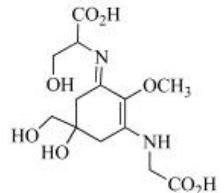
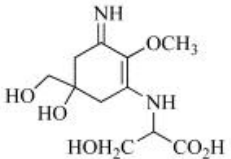
آسیب رساندن به سلول‌ها و DNA می‌شود. به همین دلیل آن‌ها برای کاهش یا جلوگیری از اثرات مضر تابش اشعه فرابنفش، ترکیبات حفاظت کننده تولید می‌کنند که اسید آمینه-های شبه مایکوسپورین (Mycosporine-like Amino Acids: MAA) نام دارند (Ganesan et al., 2006).

تابش اشعه فرابنفش یکی از مضرترین عوامل خارجی است که بر عملکردهای زیستی موجودات فتوسنتز کننده تاثیر می‌گذارد. گیاهان به علت وابستگی به نور و اجتناب‌ناپذیری از تابش خورشید، در خود ساز و کارهای دفاعی را توسعه داده‌اند تا اثرات مضر اشعه فرابنفش را کاهش دهند (Lee and Richa et al., 2011; Shiu, 2009). از جمله مکانیزم‌های دفاعی، تولید و تجمع ترکیبات جاذب فرابنفش، مانند اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین است. این ترکیبات وزن مولکولی کمی دارند (کمتر از ۴۰۰ دالتون) و محلول در آب هستند. ساختار شیمیایی آن‌ها از یک گروه رنگی Cyclohexylamine یا Cyclohexane تشکیل شده که به واحدهای نیتروژنی اسید آمینه متصل شده است (Carreto et al., 2001; Sinha and Hader, 2008). حداکثر

سیانوباکتری‌ها در اوایل دوره پرکامبرین (حدود ۳/۵ میلیارد سال قبل) تکامل یافتند (Ananya and Ahmad, 2014). آن‌ها اولین تولیدکنندگان اکسیژن در جو کره زمین بودند که میزان اکسیژن را به طرز قابل توجهی افزایش دادند (Oren, 2004). این جلبک‌ها که در سراسر جهان پراکنش دارند، منبعی غنی از متابولیت‌های زیست‌فعال (Bioactive) به شمار می‌روند. مطالعات اخیر وجود انواع ترکیبات زیست‌فعال را در سیانوباکتری‌ها نشان می‌دهد که بسیاری از آن‌ها دارای اثرات ضدسرطانی، ضد میکروبی، ضدقارچی، ضد اشعه فرابنفش (UV) و دیگر مصارف دارویی هستند (Ghasemi et al., 2004). دریایی (Seaweeds) جزو تولیدکنندگان اولیه محسوب می‌شوند که میزان تولید آن‌ها در واحد سطح (۱۰-۲ کیلوگرم بر متر مربع در سال) حتی بیشتر از مراتع و جنگل‌ها (معمولاً کمتر از یک کیلوگرم بر متر مربع در سال) است (یوسفزادی و کوبی، ۱۳۹۵). ماکروجلبک قرمز (*Hypnea musciformis*) در محیط‌های دریایی کم‌عمق، گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند. این جلبک‌ها در معرض اشعه فرابنفش قرار دارند که باعث

جذب آن‌ها در دامنه ۳۶۲-۳۱۰ نانومتر است تاکنون بیش از ۲۰ نوع MAA از موجودات که در طیف فرابنفش قرار دارد (Sinha and Hader, 2008; Richa et al., 2011). جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: ساختار مولکولی تعدادی از اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین (MAA) و حداکثر جذب آن‌ها (Bhatia et al., 2011)

λ_{\max} (nm)	ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش	λ_{\max} (nm)	ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش
۳۳۲	 <p>Palythiol</p>	۳۱۰	 <p>Mycosporine-Gly</p>
۳۳۴	 <p>Mycosporine-2Gly</p>	۳۰۹	 <p>Mycosporine-Taurine</p>
۳۳۵	 <p>Mycosporine-Gly:Val</p>	۳۲۰	 <p>Palythine</p>
۳۳۴	 <p>Shinorine</p>	۳۲۰	 <p>Palythine-Ser</p>

استفاده از حلال‌ها و دماهای مختلف انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* از بین سیانوباکترهای شناسایی شده توسط آرمان و همکاران (۱۳۹۳) که قبلاً از چشمه آب گرم گنو واقع در ۳۰ کیلومتری شهر بندرعباس جمع‌آوری و شناسایی شده بودند، پس از واکشت مجدد و موفقیت کشت در محیط مایع برای استخراج عصاره انتخاب شد.

ماکروجلبک قرمز *Hypnea musciformis* از ساحل جزیره قشم جمع‌آوری و پس از شست و شو با آب، به مدت یک هفته در سایه خشک شد.

کشت و انبوه‌سازی سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis*

به منظور خالص‌سازی سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* از روش کشت متناوب استفاده شد. در این مطالعه از محیط کشت جامد BG-11 در آب شیرین (آب مقطر) و آگار با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد. برای رشد سیانوباکتری، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۰۰۰ لوکس با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی

مطالعات نشان داده‌اند که جانوران MAAهای مورد نیاز خود را از طریق تغذیه از جلبک‌ها و یا همزیستی به دست می‌آورند. بنابراین MAAها نه تنها در تولیدکنندگان بلکه در مصرف‌کنندگان اولیه و ثانویه زنجیره غذایی نیز مسئول حفاظت اندام‌ها در برابر اشعه فرابنفش هستند (Richa et al., 2011). MAA و دیگر مایکوسپورین‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه چند منظوره، فراتر از نقش کرم ضدآفتاب در برابر اشعه فرابنفش عمل می‌کنند (Oren and Gunde-Cimerman, 2007). به عنوان مثال می‌توان به نقش آن‌ها در کاهش تنش اسمزی در برخی سیانوباکتری‌ها و مخمرها (Kogej et al., 2006) خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Oren and Gunde-Cimerman, 2007) و نقش احتمالی آن‌ها در مقاومت به خشکی (Wright et al., 2005) اشاره کرد. با توجه به این که روش عصاره‌گیری، در بازده استخراج این ترکیب تاثیرگذار است، هدف از این مطالعه بهینه‌سازی روش استخراج اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین در یک نمونه ماکروجلبک (*H. musciformis*) و یک نمونه سیانوباکتری جدا شده از چشمه آب گرم گنو است که با

musciiformis خشک شده به طور جداگانه با ۳ میلی‌لیتر از محلول‌های متانول ۱۰۰ درصد، متانول ۲۰ درصد، اتانول ۷۰ درصد و آب مقطر مخلوط شد. به منظور بررسی اثر دما بر میزان استخراج ترکیبات MAA، تیمارهای مختلف سیانوباکتری و ماکرو جلبک قرمز در دو دمای ۴ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به صورت جداگانه قرار داده شدند. به این ترتیب که نمونه‌ها برای تیمار در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت دو ساعت در بن ماری و برای دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت یک شب در یخچال قرار نگهداری شدند. سپس، تمام تیمارها با دور ۸۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی برداشته شد. در تیمار متانول ۱۰۰ درصد برای هر دو نمونه به منظور حذف رنگیزه‌های اضافه چند قطره کلروفرم اضافه و مخلوط شد. سپس دوباره در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره نسبتاً خالص به دست آمده، برای خشک شدن به شیشه‌های کوچک انتقال داده شد. عصاره خشک شده پس از حل شدن در آب دو بار تقطیر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر اسکن شد. قابل ذکر است حلال اتیل

در نظر گرفته شد. بعد از رشد کافی سیانوباکتری‌ها در محیط کشت جامد و واکشت‌های مجدد درون پلیت‌های جدید، کلنی‌های خالص به دست آمد. سپس به منظور انبوه‌سازی سیانوباکتری‌ها، کلنی‌های خالص از سطح محیط کشت جامد به ارلن‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع BG-11 با pH ۷/۳ منتقل شدند.

استخراج اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین استخراج ترکیبات اسید آمینه‌ای شبه مایکوسپورین (MAA) دو نمونه جلبکی از تلفیق چندین روش مختلف (Garica-Pichel and Castenholz, 1991; Sinha et al., 2000; Mushir and Fatma, 2011; Asencio and Hoffmann, 2013; Rastogi et al., 2013) با اندک تغییراتی در درصد حلال‌ها و دماهای مورد استفاده، صورت گرفت.

برای استخراج عصاره حاوی ترکیبات MAA، ۱۰ میلی‌گرم توده خشک سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* به طور جداگانه با ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های متانول ۱۰۰ درصد، متانول ۲۰ درصد، اتانول ۷۰ درصد، اتیل استات ۱۰۰ درصد و آب مقطر مخلوط شد. همچنین ۲۰ میلی‌گرم جلبک قرمز *Hypnea*

تیمار محاسبه و برای مقایسه معنی داری آماری بین میانگین‌های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) در نرم‌افزار SPSS 19 استفاده شد.

نتایج

در پژوهش حاضر کروماتوگرام HPLC به دست آمده از عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* در شکل ۱ ارائه شده است. بررسی این کروماتوگرام، الگوی پروفایلی پیچیده‌ای را در طول موج‌های ۳۰۲ و ۳۳۱ نانومتر نشان داد. پیک‌ها مربوط به ترکیبات اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین (MAA) هستند که در این محدوده جذب ماکزیمم داشتند.

کروماتوگرام HPLC جلبک قرمز *Hypnea musciformis* (شکل ۲) پیک مشخصی را در طول موج ۳۲۰ نشان داد که در محدوده ترکیبات MAA قرار داشت.

در مطالعه حاضر که به منظور استخراج ترکیبات اسید آمینه‌ای شبه مایکوسپورین از حلال‌ها و دو دمای متفاوت استفاده شد، این ترکیبات در طول موج ۳۱۰-۳۶۲ نانومتر مشاهده شدند. نتایج به دست آمده از استخراج

استات فقط در سیانوباکتری مورد استفاده قرار گرفته شد.

برای تعیین ماهیت ترکیبات اسید آمینه-های شبه مایکوسپورین از روش کروماتوگرافی (HPLC) استفاده شد. به این صورت که هر یک از عصاره‌های به دست آمده از دو گونه مورد مطالعه بعد از اضافه کردن فاز متحرک (آب دیونیزه)، به دستگاه HPLC تزریق شدند.

اندازه‌گیری اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین

محاسبه مقدار اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین بر اساس روش Mushir و Fatma (۲۰۱۱) از رابطه ۱ انجام شد.

رابطه ۱:

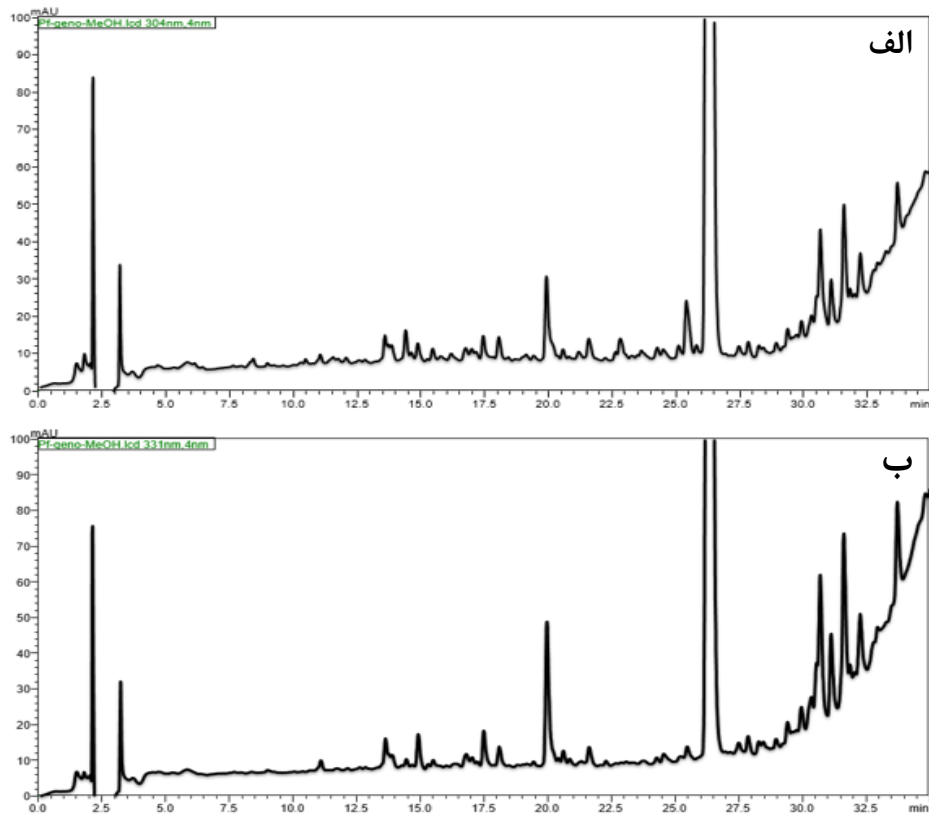
$$A_8^* = A_8 - A_{260} (1.85 - 0.005\lambda)$$

A_8^* : اصلاح جذب اسید آمینه در حداکثر؛ A_8 : مقدار اندازه‌گیری جذب در حداکثر؛ λ : طول موج از حداکثر جذب.

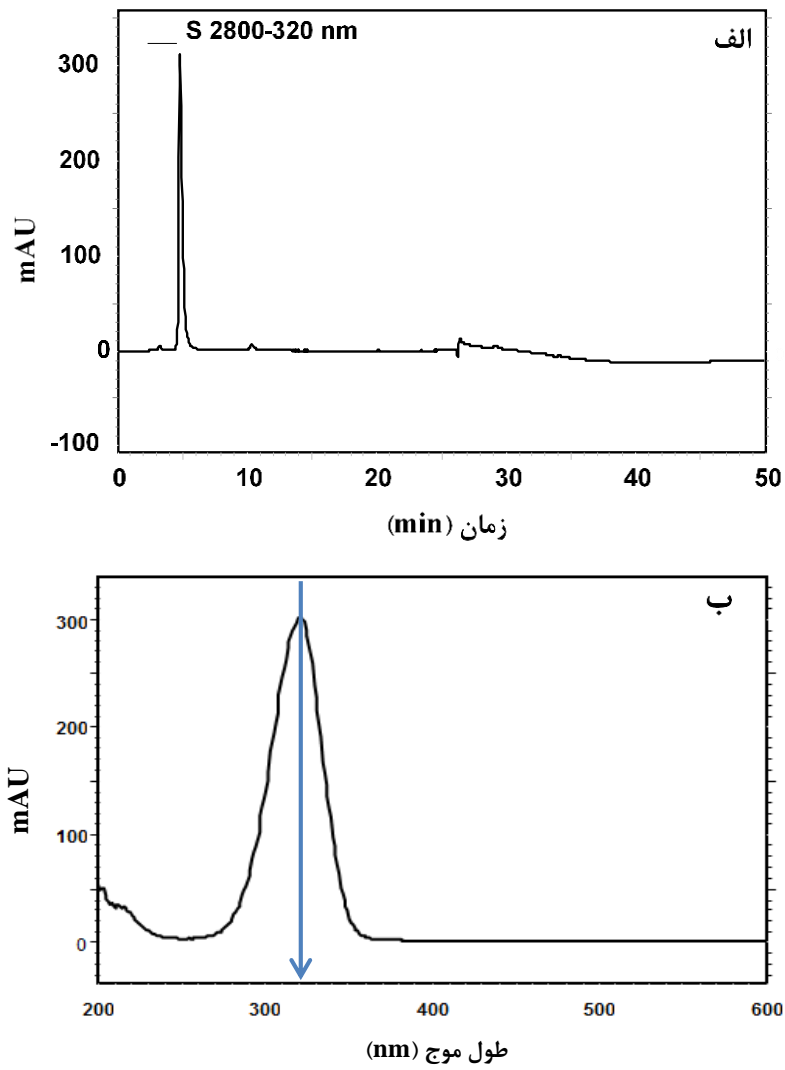
تجزیه و تحلیل آماری

مرتب کردن داده‌ها برای تجزیه و تحلیل‌های آماری و همچنین رسم نمودارها به وسیله نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 انجام شد. همچنین میانگین و انحراف معیار داده‌ها با استفاده از حداقل سه تکرار برای هر

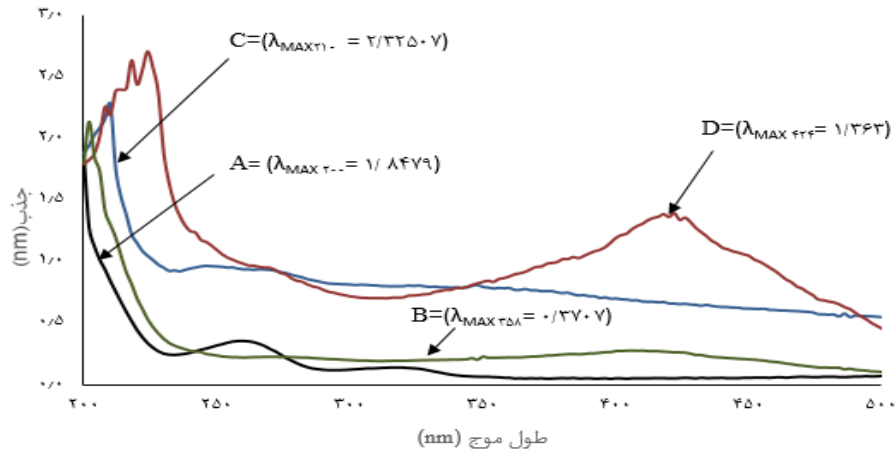
MAAها با حلال متانول ۱۰۰ درصد در دماهای مختلف، تنها در سیانوباکتری *L. fragilis* MAAها در طول موج ۳۵۸ نانومتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ($\lambda_{max} = 0/7407$) مشاهده شدند (شکل ۳).
 در استخراج ترکیبات MAA با استفاده از متانول ۲۰ درصد در دماهای مختلف، تنها در گونه جلبک قرمز *H. musciformis* MAAها در طول موج ۳۳۶ نانومتر در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد ($\lambda_{max} = 0/9333$) مشاهده شدند (شکل ۴).



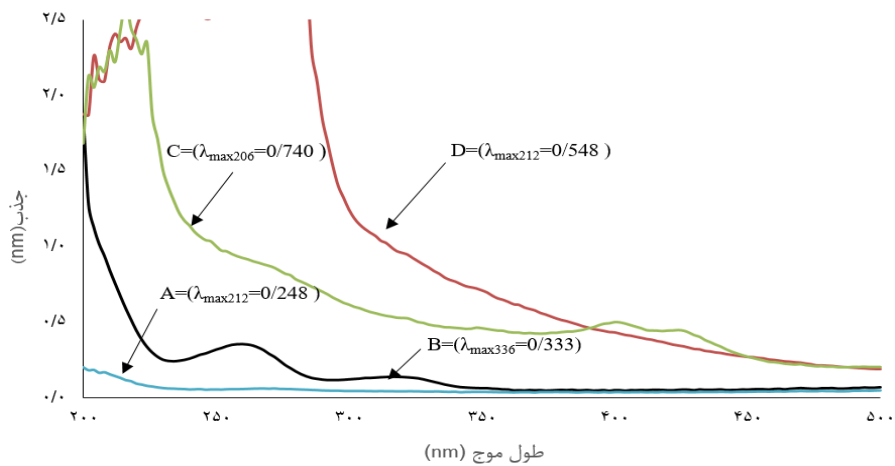
شکل ۱: کروماتوگرام HPLC عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* در طول موج‌های ۳۰۲ نانومتر (الف) و ۳۳۱ نانومتر (ب)



شکل ۲: کروماتوگرام HPLC عصاره ماکرو جلبک قرمز *Hypnea musciformis*. الف) زمان مشاهده پیک در دقیقه پنجم. ب: پیک جذب عصاره در طول موج ۳۲۰ نانومتر



شکل ۳: طیف اسپکتروفوتومتری عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* و ماکرو جلبک قرمز *Hypnea musciformis* با استفاده از متانول ۱۰۰ درصد در دماهای مختلف. A: جلبک قرمز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ B: سیانوباکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ C: جلبک قرمز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ D: سیانوباکتری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۴: طیف اسپکتروفوتومتری عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* و ماکرو جلبک قرمز *Hypnea musciformis* با استفاده از متانول ۲۰ درصد در دماهای مختلف. A: جلبک قرمز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ B: جلبک قرمز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ C: سیانوباکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ D: سیانوباکتری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد.

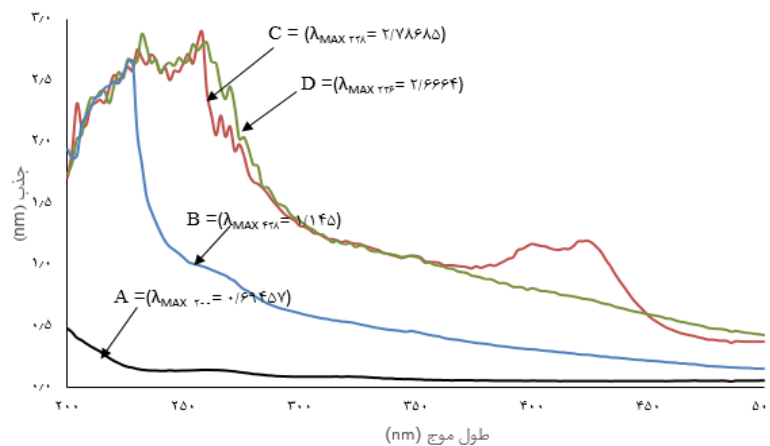
در استخراج ترکیبات MAA با استفاده از اتانول ۷۰ درصد در دماهای مختلف، در هیچ یک از دو گونه جلبک قرمز و سیانوباکتری ترکیبات MAA در طول موج ۳۱۰-۳۶۰ نانومتر مشاهده نشد (شکل ۵).

در استخراج ترکیبات MAA با استفاده از آب دیونیزه در دماهای مختلف، تنها در جلبک قرمز *H. musciformis* MAAها در طول موج ۳۱۱ نانومتر ($\lambda_{max} = 0/6252$) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شدند (شکل ۶).

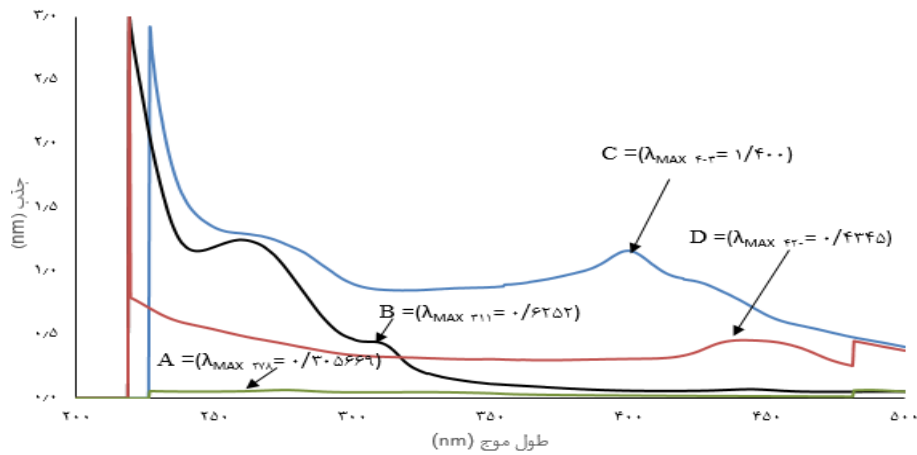
در استخراج ترکیبات MAA با استفاده از اتیل استات ۱۰۰ درصد در دماهای مختلف، سیانوباکتری *L. fragilis* حداکثر جذب را در

طول موج‌های ۳۸۴ نانومتر ($\lambda_{max} = 1/78154$) و ۳۳۶ نانومتر ($\lambda_{max} = 0/830$) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۸۳ نانومتر ($\lambda_{max} = 1/53927$) و ۳۳۵ نانومتر ($\lambda_{max} = 0/6045$) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد داشت و در این طول موج‌ها ترکیبات جذب اشعه فرابنفش مشاهده شدند (شکل ۷).

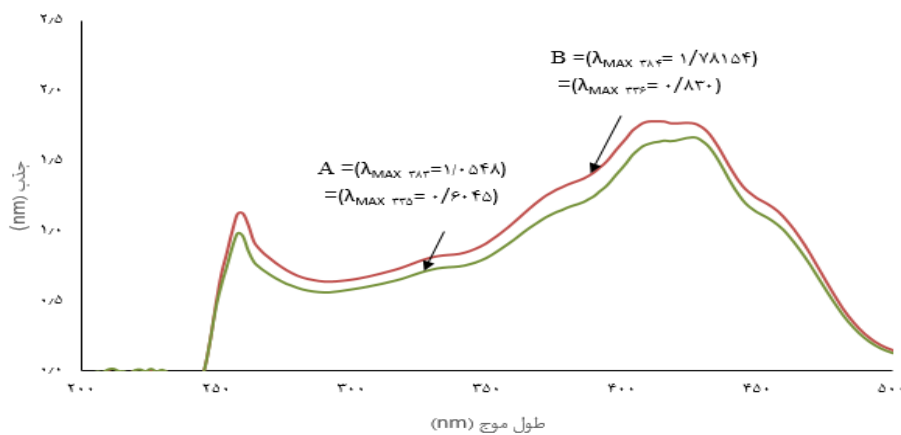
حداکثر میزان جذب عصاره‌های مختلف سیانوباکتری *L. fragilis* و جلبک قرمز *H. musciformis* در حلال‌ها و دماهای مختلف بین طول موج‌های ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.



شکل ۵: طیف اسپکتروفوتومتری عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* و ماکروجلبک قرمز *Hypnea musciformis* با استفاده از اتانول ۷۰ درصد در دماهای مختلف. A: جلبک قرمز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ B: جلبک قرمز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ C: سیانوباکتری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ D: سیانوباکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۶: طیف اسپکتروفوتومتری عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* و ماکروجلبک قرمز *Hypnea musciformis* با استفاده از آب دیونیزه در دماهای مختلف. A: سیانوباکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ B: جلبک قرمز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد؛ C: جلبک قرمز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ D: سیانوباکتری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد.



شکل ۷: طیف اسپکتروفوتومتری عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* با استفاده از اتیل استات در دماهای مختلف. A: سیانوباکتری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد؛ B: سیانوباکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

جدول ۲: حداکثر میزان جذب عصاره‌های سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* در حلال‌ها و دماهای مختلف در طول موج ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر

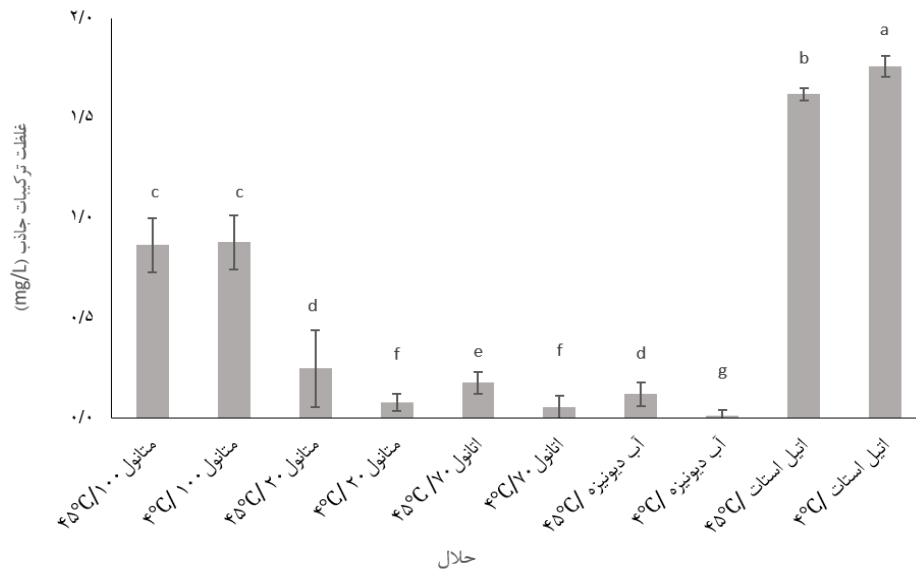
حلال	دما (درجه سانتی‌گراد)	حداکثر میزان جذب	طول موج حداکثر جذب
متانول ۱۰۰ درصد	۴	۰/۷۴۰۷	۳۵۸
		۰/۱۹۳۸	۳۲۰
		۰/۳۳۱۳	۲۶۶
متانول ۲۰ درصد	۴۵	۰/۳۰۱۰۴	۴۱۴
		۱/۳۶۳	۴۲۴
		۰/۹۲۹۶	۲۷۲
		۰/۵۶۲۸	۲۰۶
اتانول ۷۰ درصد	۴	۰/۴۸۹۹	۴۰۴
		۰/۴۱۳۲	۴۳۰
		۰/۷۵۹۲۷	۲۱۶
آب دیونیزه	۴۵	۲/۷۸۶۸۵	۲۲۸
		۲/۶۶۶۴	۲۲۶
		۰/۳۰۵۶۶۹	۴۰۳
		۱/۲۴۷۴۷۱	۲۵۹
اتیل استات ۱۰۰ درصد	۴	۱/۲۰۵۴	۲۶۷
		۱/۴۰۰	۴۲۰
		۱/۷۸۱۵۴	۳۸۹
		۱/۰۴۲۱	۳۶۸
		۰/۸۳۰	۳۳۶
		۱/۱۱۲۵	۲۶۱
		۱/۵۳۹۲	۳۸۸
۴۵	۱/۰۵۴۸	۳۶۷	
	۰/۶۰۴۵	۳۳۵	
	۰/۹۶۳	۲۶۰	

جدول ۳: حداکثر میزان جذب عصاره‌های ماکرو جلبک قرمز *Hypnea musciformis* در حلال‌ها و دماهای مختلف در طول موج ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر

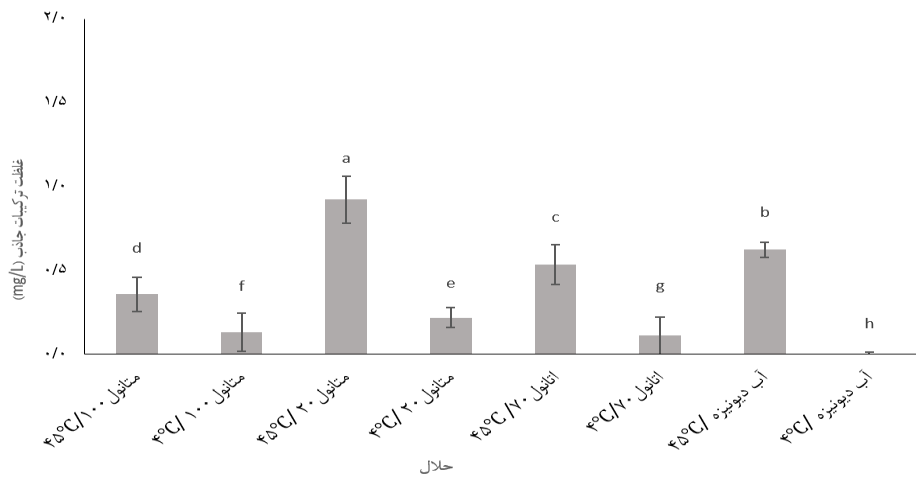
حلال	دما (درجه سانتی‌گراد)	حداکثر میزان جذب	طول موج حداکثر جذب
متانول ۱۰۰ درصد	۴	۱/۸۴۷۹	۲۰۰
	۴۵	۲/۳۲۵۰۷	۲۱۰
	۴۵	۰/۹۳۳	۳۳۶
متانول ۲۰ درصد	۴	۰/۳۳۵۲	۲۶۰
	۴	۰/۵۴۸	۲۱۲
	۴۵	۰/۶۹۴۵۷	۲۰۰
اتانول ۷۰ درصد	۴	۰/۵۱۲۵۶۷	۲۰۸
		۱/۱۴۵	۴۰۴
		۱/۲۴۵۸	۴۲۸
آب دیونیزه	۴۵	۰/۶۲۵۲	۳۱۱
		۱/۲۱۹	۲۶۵
	۴	۰/۴۶۷۸	۲۹۹

معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$; شکل ۸).
 بین حلال‌ها و دو دمای مورد استفاده برای
 استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از
 عصاره جلبک قرمز *H. musciformis* تفاوت
 معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$; شکل ۹).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که بین
 حلال متانول ۱۰۰ درصد در دو دمای متفاوت و
 بین متانول ۲۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد مورد
 استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای
 استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از
 عصاره سیانوباکتری *L. fragilis* تفاوت



شکل ۸: مقایسه حلال‌ها در دو دمای متفاوت برای استخراج بیشترین میزان ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از عصاره سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis*



شکل ۹: مقایسه حلال‌ها در دو دمای متفاوت برای استخراج بیشترین میزان ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از عصاره جلبک قرمز *Hypnea musciformis*

بحث

اتیل استات موثرتر از سایر محلول‌ها عمل می‌کند. Matsui و همکاران (۲۰۱۲) اظهار داشتند که ترکیبات استخراج شده از سیانوباکتری در اتیل استات به صورت طبیعی و بدون تغییر در ساختار آن‌ها و در نتیجه به شکل موثرتری استخراج می‌شود. از طرفی، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد احتمالاً با تخریب موثرتر دیواره سلولی و اسیدهای چرب غشای سیانوباکتری‌ها بدون آسیب رساندن به ترکیبات باعث آزادسازی بهتر محتویات سلول می‌شود. نتایج مطالعه حاضر مشابه با نتایج Rath و Adhikary در سال ۲۰۱۲ و همچنین Rastogi و Incharoensakdi در سال ۲۰۱۴ است. حلال آب و متانول ۱۰۰ درصد مقدار کمی از میزان ترکیبات را نشان داد. به نظر می‌رسد که در این گونه سیانوباکتری علت کم بودن میزان ترکیبات MAA، وجود سایر ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از جمله سایتونمین (Scytonemins) باشد که منحصراً در سیانوباکتری‌ها یافت می‌شود (Sinha and Hader, 2008). متانول حلالی قوی است و در برخی مطالعات استفاده از متانول ۱۰۰ درصد برای استخراج ترکیبات MAA از سیانوباکتری موفقیت‌آمیز بوده است (Singh et al., 2010). علت عدم مشاهده این ترکیبات را در

اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که به طور مستقیم و غیرمستقیم اشعه فرابنفش خورشیدی را جذب می‌کنند و از موجودات زنده‌ای که تحت تاثیر اشعه فرابنفش هستند، محافظت می‌کنند. این ترکیبات نه تنها در سیانوباکتری‌ها و ماکرو جلبک‌ها وجود دارند، بلکه در فیتوپلانکتون‌ها، روتیفرها و برخی از بی‌مهرگان نیز یافت می‌شوند (Rastogi et al., 2010). مطالعه حاضر نشان داد که از حلال‌های مورد استفاده برای استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از عصاره سیانوباکتری تنها بین حلال متانول ۱۰۰ درصد در دو دمای ۴ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و بین حلال متانول ۲۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$)، اما بین سایر حلال‌ها در این دو دما تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P < 0.05$). بیشترین میزان ترکیبات MAA استخراج شده در سیانوباکتری *L. fragilis* در عصاره به دست آمده از حلال اتیل استات ۱۰۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. این مسئله نشان می‌دهد که برای استخراج این گروه از ترکیبات در سیانوباکتری

همکاران (۲۰۱۷) است. در مطالعه حاضر از اتانول ۷۰ درصد نیز به منظور عصاره‌گیری استفاده شد که نتایج برای هیچ یک از گونه‌ها موفقیت‌آمیز نبود. Kulkarni و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از متانول ۲۰ درصد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به استخراج اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین از سیانوباکتری *Chlamydomonas hedleyi* پرداختند و میزان زیادی از ترکیبات را مشاهده کردند. در حالی که در مطالعه حاضر، در سیانوباکتری *L. fragilis* حلال متانول ۲۰ درصد تاثیر ناچیزی بر میزان استخراج ترکیبات داشت، اما با حلال اتیل استات بیشترین میزان ترکیبات جاذب فرابنفش در این سیانوباکتری استخراج شد. Velasco-Charpentier و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از متانول ۲۵ درصد به استخراج اسید آمینه‌های شبه مایکوسپورین جلبک قرمز گونه *Lemanea fluviatilis* پرداختند و میزان زیادی از این ترکیبات را استخراج کردند که با نتایج مطالعه حاضر منطبق است. MAAهای جدا شده از نمونه‌ها دارای قابلیت بالا در جذب امواج فرابنفش خورشید (بین ۳۰۷ و ۳۶۲ نانومتر) است. داده‌های شکل‌های ۱ و ۲ تاییدی بر

عصاره آبی سیانوباکتری می‌توان به دیواره سلولی مستحکم سیانوباکتری‌ها نسبت داد. سیانوباکتری‌ها شبیه باکتری‌های گرم منفی، دارای پوشش سلولی چندلایه‌ای و بسیار پیچیده هستند که نفوذپذیری آن بسیار کم است (Urmeneta et al., 2003). از آنجا که آب حلالی قطبی است امکان شکستن دیواره سلولی فسفولیپیدی سیانوباکتری و خارج کردن محتویات سلولی را ندارد.

بین حلال‌ها و دو دمای متفاوت برای استخراج ترکیبات جاذب فرابنفش از عصاره ماکرو جلبک قرمز *H. musciformis*، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$) و بیشترین میزان ترکیبات استخراج شده در حلال متانول ۲۰ درصد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. به نظر می‌رسد که دیواره سلولی ماکرو جلبک‌ها نسبت به سیانوباکتری‌ها استقامت کمتری دارد و وجود ترکیبات پلی‌ساکاریدی در دیواره سلولی آن‌ها به حلال‌های آبی امکان نفوذ می‌دهد. بنابراین با توجه به محلول بودن ترکیبات MAA در آب، استفاده از حلال متانول ۲۰ درصد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد باعث تخریب آسان‌تر دیواره سلولی و آزادسازی این ترکیبات شده است. این نتایج مشابه با نتایج Pandey و

فرابنفش در نمونه سیانوباکتری و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و حلال متانول ۲۰ درصد برای استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش در نمونه ماکرو جلبک قرمز مناسب است. همچنین طبق مطالعات پیشین مشاهده شده است که در گونه‌های مختلف حلال و دمای مورد نیاز برای استخراج این ترکیبات متفاوت است پس به طور کلی می‌توان گفت نه تنها حلال و دمای مورد استفاده برای استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش در بازه استخراج تاثیرگذار است بلکه این شاخص‌ها در گونه‌های مختلف نیز یکسان نیست.

وجود این دسته از ترکیبات در دو گونه مورد مطالعه است. در مطالعه حاضر استخراج ترکیبات جاذب اشعه فرابنفش از جلبک قرمز *Hypnea musciformis* و سیانوباکتری *Leptolyngbya fragilis* جدا شده از چشمه آب گرم گنو در دو دمای ۴ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از حلال‌های مناسب (متانول ۱۰۰ درصد، متانول ۲۰ درصد، اتانول ۷۰ درصد، اتیل استات ۱۰۰ درصد و آب دو بار تقطیر شده) صورت گرفت و مشاهده شد دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و حلال اتیل استات ۱۰۰ درصد برای استخراج ترکیبات جاذب اشعه

منابع

- آرمان م.، ریاحی ح.، حیدری ف. و سنبل ع. ۱۳۹۳. بررسی خواص ضد میکروبی سیانوباکتری‌های چشمه آب گرم گنو. نشریه علمی بوم‌شناسی آبزیان، ۳: ۱۹-۲۴.
- یوسف‌زادی م. و کوی م. ۱۳۹۵. ماکرو جلبک‌های دریایی ایران، ویژگی‌ها و کاربردها. انتشارات دانشگاه هرمزگان. ۲۴۸ص.
- Ananya A.K. and Ahmad I.Z. 2014.** "Cyanobacteria" the blue green algae" and its novel applications: A brief review. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7(1): 251-261.
- Asencio A.D. and Hoffmann L. 2013.** Chemosystematic evaluation of the genus *Scytonema* (Cyanobacteria) based on occurrence of phycobiliproteins, scytonemin, carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds. *European Journal of Phycology*, 48(4): 331-344.
- Bhatia S., Garg A., Sharma K., Kumar S., Sharma A. and Purohit A.P. 2011.** Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacognosy Reviews*, 5(10): 138-146.
- Carreto J.I., Carignan M.O. and Montoya N.G. 2001.** Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. *Marine Ecology Progress Series*, 223: 49-60.
- Ganesan M. Thirupathi S. and Jha B. 2006.** Mariculture of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux in south east coast of India. *Aquaculture*, 256(1): 201-211.
- Garcia-Pichel F. and Castenholz R.W. 1991.** Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27(3): 395-409.
- Ghasemi Y., Yazdi M.T., Shafiee A., Amini M., Shokravi S. and Zarrini G. 2004.** Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology*, 42(4-5): 318-322.
- Kogej T., Gostincar C., Volkmann M., Gorbushina A.A. and Gunde-Cimerman N. 2006.** Mycosporines in extremophilic fungi-novel complementary osmolytes? *Environmental Chemistry*, 3(2): 105-110.
- Kulkarni A., Lee J.H., Seo H.H., Kim H.S., Cho M.J., Shin D.S.**

- and Moh S.H. 2015.** Photoinduced conductivity in mycosporine-like amino acids. *Materials Chemistry and Physics*, 151: 1–4.
- Lee T.M. and Shiu C.T. 2009.** Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocladia capillacea* and *Gelidium amansii*. *Marine Environmental Research*, 67(1): 8–16.
- Matsui K., Nazifi E., Hirai Y., Wada N., Matsugo S. and Sakamoto T. 2012.** The cyanobacterial UV-absorbing pigment scytonemin displays radical-scavenging activity. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(2): 137–144.
- Mushir S. and Fatma T. 2011.** Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in cyanobacterium *Aulosira fertilissima*: Environmental perspective and characterization. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(2): 165–171.
- Oren A. 2004.** A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5): 1895–1902.
- Oren A. and Gunde-Cimerman N. 2007.** Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters*, 269(1): 1–10.
- Pandey A., Pandey S., Pathak J., Ahmed H., Singh V., Singh S.P. and Sinha R.P. 2017.** Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of two marine red macroalgae, *Gelidium* sp. and *Ceramium* sp. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(1): 12–21.
- Rastogi R.P. and Incharoensakdi A. 2014.** UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 130: 287–292.
- Rastogi R.P., Sinha R.P. and Incharoensakdi A. 2013.** Partial characterization, UV-induction and photoprotective function of sunscreen pigment, scytonemin from *Rivularia* sp. HKAR-4. *Chemosphere*, 93(9): 1874–1878.
- Rastogi R.P., Sinha R.P., Singh S.P. and Hader D.P. 2010.** Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(6): 537–558.

- Rath J., Mandal S. and Adhikary S.P. 2012.** Salinity induced synthesis of UV-screening compound scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 115: 5–8.
- Richa R.R., Kumari S., Singh K.L., Kannaujiya V.K., Singh G., Kesheri M. and Sinha R.P. 2011.** Biotechnological potential of mycosporine-like amino acids and phycobiliproteins of cyanobacterial origin. Journal of Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering, 1: 159–171.
- Singh S.P., Klisch M., Sinha R.P. and Hader D.P. 2010.** Sulfur deficiency changes mycosporine-like amino acid (MAA) composition of *Anabaena variabilis* PCC 7937: A possible role of sulfur in MAA bioconversion. Photochemistry and Photobiology, 86(4): 862–870.
- Sinha R.P. and Hader D.P. 2008.** UV-protectants in cyanobacteria. Plant Science, 174(3): 278–289.
- Sinha R.P., Klisch M., Groniger A. and Hader D.P. 2000.** Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*-effects of UV and heat. Environmental and Experimental Botany, 43(1): 33–43.
- Urmeneta J., Navarrete A., Huete J. and Guerrero R. 2003.** Isolation and characterization of cyanobacteria from microbial mats of the Ebro Delta, Spain. Current Microbiology, 46(3): 0199–0204.
- Velasco-Charpentier C., Pizarro-Mora F. and Navarro N.P. 2016.** Variation in mycosporine-like amino acids concentrations in seaweeds from Valparaiso and Magellan Regions, Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 51(3): 703–708.
- Wright D.J., Smith S.C., Joardar V., Scherer S., Jervis J., Warren A. and Potts M. 2005.** UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (Cyanobacteria). Journal of Biological Chemistry, 280(48): 40271–40281.



Research Paper

Optimization of the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) from red alga *Hypnea musciformis* and cyanobacteria isolated from the Geno hot springs

Maryam Soltani¹, Morteza Yousefzadi^{2*}, Faezeh Samari³, Maryam Kokabi⁴

Received: November 2019

Accepted: February 2020

Abstract

Algae are photosynthetic organisms that have developed protective compounds, such as mycosporine-like amino acids (MAAs), to counteract the optical damage. The purpose of this study was to extract ultraviolet absorbing compounds using different solvent and temperature. Thus, the cyanobacterium *Leptolyngbya fragilis* and red algae *Hypnea musciformis* were used to extract ultraviolet absorbing compounds. Different solvents including 100% and 20% methanol, 70% ethanol, distilled water and 100% ethyl acetate were used for MAA extraction at 2 different temperatures of 4°C and 45°C. The cyanobacterium *Leptolyngbya fragilis* showed the highest amount of UV-absorbing compounds in the 100% ethyl acetate extract at 4°C at a wavelength of 384nm ($\lambda_{\max} = 1.78154$), while red algae *Hypnea musciformis* in the 20% methanol extract at 45°C at a wavelength of 336nm ($\lambda_{\max} = 0.933$). Moreover, in the 70% ethanol extract, absorption in the ultraviolet range was almost zero. In general, it can be said that not only the solvent and temperature used to extract ultraviolet adsorbents effect the extraction efficiency, but these indices are not the same in different species.

Key words: *Cyanobacteria, Red Algae, Ultraviolet Absorbing Compounds, Mycosporine-like Amino Acids, MAA.*

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

4- Ph.D. Students in Marine Biology, Faculty of Marine Science, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: Morteza110110@gmail.com

