

## بررسی اثر هورمون ملاتونین بر شاخص‌های رشدی و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک *Chlorella vulgaris*

محمدصادق مالکی سامانی و حکیمه منصوری\*

بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۰۶)

### چکیده

ملاتونین به‌عنوان یک هورمون رشدی می‌تواند موجب القای رشد و تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه در ریزجلبک‌ها گردد. ریزجلبک‌های سبز از جمله کلرلا وولگاریس (*Chlorella vulgaris*) به‌عنوان منابع تجدیدپذیر زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه به‌شمار می‌آیند. در این پژوهش اثرات این هورمون بر پارامترهای رشدی و بیوشیمیایی ریزجلبک کلرلا وولگاریس مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، ریزجلبک‌ها تحت غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین کشت شدند و پس از ۲۱ روز به منظور اندازه‌گیری و سنجش پارامترها برداشت شدند. نتایج نشان داد بالاترین میزان بهره‌وری زیست‌توده، تعداد سلول ریزجلبک و رنگ‌دانه‌های کلروفیل تحت غلظت ۱۰ میکرومولار و کمترین مقدار این پارامترها در غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده گردید. همچنین بیشترین میزان رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی، ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم فنیل آمونیا لیاز تحت غلظت ۵۰۰ میکرومولار بدست آمد. با توجه به داده‌های فوق می‌توان پیشنهاد کرد که از یک‌سوی ملاتونین در غلظت‌های بهینه با نقش تنظیم‌کنندگی خود موجب تحریک رشد و تولید رنگ‌دانه‌های کلروفیل می‌شود و از سوی دیگر در غلظت بالا با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آمونیا لیاز محتوای ترکیبات فنلی و رنگیزه‌های کاروتنوئیدی را افزایش می‌دهد. افزایش در این ترکیبات در نهایت منجر به بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک می‌گردد.

کلمات کلیدی: ترکیبات فنلی، زیست‌توده، کاروتنوئید، ملاتونین

### مقدمه

ملاتونین در افزایش زیست‌توده ریزجلبکی، افزایش متابولیت‌های اولیه و همچنین متابولیت‌های ثانویه همچون ترکیبات فنلی و رنگ‌دانه‌ها نشان داده شده است (Zhao et al., 2023). با این حال مطالعه دقیقی از نقش ملاتونین بر آنزیم‌های بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه در ریزجلبک‌ها به‌ویژه ریزجلبک کلرلا گزارش نشده است. در مطالعات انجام‌شده هورمون ملاتونین توانست محتوای کاروتنوئید کل را در ریزجلبک *Dunaliella bardawil* (Xie et al., 2022) و همچنین رنگ‌دانه‌های لوتئین را در ریزجلبک *Acutodesmus* sp. (Zhu

ملاتونین یکی از محرک‌های رشدی است که در سال ۱۹۵۸ در غده پینه‌آل گاو کشف و در ادامه برای اولین بار در گیاهان در ریزجلبک تک‌سلولی *Lingulodinium polyedrum* استخراج شد (Singh et al., 2023). این ترکیب نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی همچون افزایش رشد، کارایی فتوسنتزی، تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را در گیاه اعمال می‌کند و همچنین در فرآیندهای گلدهی و تشکیل و رسیدن میوه‌ها و دانه‌ها نقش دارد (Ahmad et al., 2023). در مطالعات نقش

\* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: h\_mansori@uk.ac.ir

تولیدکنندگان اصلی آن ژاپن، آلمان و تایوان هستند ( Brennan and Owende, 2010). با توجه به تولید مثل سریع و سازگاری بالا و همچنین توانایی تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه همچون ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی، مانند آستاگزانتین، لوتئین و کاروتن‌ها، پیشنهاد شده است که این ریزجلبک می‌تواند به‌منظور استفاده‌های صنعتی و تجاری مناسب باشد (Ru et al., 2020). از سوی دیگر میزان ترکیبات ارزشمند این ریزجلبک می‌تواند در طول شرایط بهینه و کنترل‌شده افزایش یابد؛ بنابراین استفاده از استراتژی‌های مختلف به‌منظور افزایش رشد و بهره‌وری تولید لپید، پروتئین، کربوهیدرات و رنگدانه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. رشد و تولید متابولیت‌های ریزجلبک‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل زیستی همچون باکتری‌ها و ویروس‌ها و عوامل غیرزیستی همانند دما، pH، نور، کمیت و کیفیت مواد غذایی، غلظت اکسیژن محلول و همچنین تنظیم‌کننده‌های زیستی قرار گیرد (Chowdury et al., 2020).

در همین راستا استفاده از هورمون ملاتونین به‌عنوان یک استراتژی در جهت بهبود رشد و القای متابولیت‌های ثانویه می‌تواند کارایی اقتصادی و تجاری استفاده از ریزجلبک‌ها را برای اهداف مذکور ارتقا بخشد. هر چند مطالعات متعددی از نقش هورمون ملاتونین بر القای متابولیت‌های ثانویه و مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها در گیاهان منتشر شده است، با این حال تحقیقات کمی از اثرات ملاتونین بر متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آن‌ها در ریزجلبک‌ها به‌ویژه کلرلا وولگاریس ارائه شده است (Hongjian et al., 2023; Yongteng et al., 2024). این مطالعه با هدف بررسی اثرات غلظت‌های مختلف هورمون ملاتونین بر میزان زیست‌توده، متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز این ترکیبات انجام شده است. ضرورت بررسی این رویکرد می‌تواند به انتخاب غلظت بهینه این هورمون در ریزجلبک کلرلا وولگاریس در جهت افزایش بهره‌وری زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه کمک کند.

(et al., 2022) و آستاگزانتین در ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* (Cui et al., 2020; Ding et al., 2018a) را افزایش دهد.

محتوای متابولیت‌های ثانویه می‌تواند توسط آنزیم‌های مختلف از جمله فنیل‌آلانین آمونیلایز و تیروزین آمونیلایز تنظیم گردند. به‌گونه‌ای که ملاتونین با افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر فنیل پروپانوئید می‌تواند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه همچون فنل، فلاونوئید و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی را افزایش دهد. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز به‌عنوان آنزیم کلیدی در سنتز متابولیت‌های ثانویه موجب تبدیل اسیدآمینو فنیل‌آلانین به ترانس سینامیک اسید و آنزیم تیروزین آمونیلایز نیز در تبدیل تیروزین به کوماریک اسید نقش دارد (Barros and Dixon, 2020). مطالعات نشان دادند گونه‌های فعال اکسیژن و تنش‌های حاصل از آن‌ها می‌توانند القای متابولیت‌های ثانویه همچون ترکیبات فنلی را در ریزجلبک‌ها افزایش دهند (Park et al., 2022; Sreenikethanam et al., 2022) که این امر به دلیل افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی همچون فنیل‌آلانین آمونیلایز در ریزجلبک‌ها است (Zhang et al., 2020).

ریزجلبک‌ها میکروارگانیسم‌های اتوتروف هستند که به علت نرخ بالای رشد، امکان تولید زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه را در حجم بالا و زمان کوتاه فراهم می‌کنند. ریزجلبک‌ها به‌منظور تولید زیست‌توده، غذای انسان، تصفیه فاضلاب، سوخت‌های زیستی، کاربرد کشاورزی و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از ریزجلبک‌هایی که به‌عنوان میکروارگانیسم الگو در مطالعات زیست‌شناسی و فیزیولوژیکی مورد مطالعه قرار می‌گیرد ریزجلبک *Chlorella vulgaris* است. این ریزجلبک از ریزجلبک‌های سبز متعلق به رده کلروفیتا است که برای اولین بار توسط Martinus Willem Beijerinck در سال ۱۸۹۰ میلادی به‌عنوان اولین ریزجلبک با یک هسته مشخص کشف گردید (Krienitz et al., 2015). آمارها نشان می‌دهند که تولید سالانه ریزجلبک *C. vulgaris* در سال ۲۰۰۹ به ۲۰۰۰ تن وزن خشک رسیده است و

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه به منظور بررسی اثر هورمون ملاتونین بر ریزجلبک کلرلا از ریزجلبک *C. vulgaris* (سویه UTEX 265) متعلق به بانک جلبک دانشگاه تگزاس ایالات متحده آمریکا در محیط‌کشت BBM استفاده گردید. این مطالعه در دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۴۰۲ انجام گرفت. ریزجلبک مورد استفاده در این مطالعه از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک‌های فارس خریداری شد. برای شروع آزمایش، یک میلی‌لیتر از ریزجلبک کلرلا وولگاریس در فاز رشدی که دارای  $7 \times 10^6$  سلول ریزجلبکی بودند به درون ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر اضافه گردید. سپس به منظور تیماردهی در این مطالعه از شش سطح هورمون ملاتونین در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار در محیط‌کشت ریزجلبکی استفاده شد. در ادامه ریزجلبک‌های کشت‌شده تحت نور سفید ال‌ای‌دی (LED) با شدت ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه در دمای  $3 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه کشت داده شدند. نمونه‌برداری و برداشت جهت اندازه‌گیری پارامترها در پایان روز ۲۱م صورت گرفته و فاکتورهای همچون بهره‌وری زیست‌توده، تعداد ریزجلبک، کلروفیل a و b، آستاگزانتین، لوتتین، ترکیبات فنلی و آنزیم PAL مورد سنجش قرار گرفتند. در این مطالعه نمونه شاهد نمونه‌ای است که فاقد هورمون ملاتونین و تحت نور سفید است.

**اندازه‌گیری میزان بهره‌وری زیست‌توده:** رشد ریزجلبک‌ها با استفاده از پارامتر بهره‌وری زیست‌توده با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Abomohra et al., 2019).

$$BP = \frac{N_1 - N_2}{T_1 - T_2}$$

در این معادله BP بیانگر بهره‌وری زیست‌توده،  $N_1$  و  $N_2$  به ترتیب بیانگر میزان زیست‌توده در زمان‌های  $T_1$  و  $T_2$  است.  $T_1$  و  $T_2$  نیز به ترتیب بیانگر روز انتهای دوره کشت و روز اول کشت ریزجلبک است.

**اندازه‌گیری تعداد ریزجلبک:** شمارش سلولی ریزجلبک‌ها با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰

در چهار مربع سفید روی لام نئوبار در هفت سطح زمانی با فاصله سه روزه و با سه تکرار انجام گرفت (Sohrabi et al., 2019). برای شمارش سلولی ریزجلبک‌ها، با استفاده از سمپلر استریل، یک قطره از سوسپانسیون ریزجلبکی بر روی مناطق مدرج لام قرار داده شد و در ادامه با قرارگیری لامل سنگی بر روی آن، شمارش سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری محاسبه شد. برای تعیین تعداد سلول‌های ریزجلبکی در هر میلی‌لیتر از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{تعداد سلول در هر میلی‌لیتر} = \text{میانگین تعداد سلول در } 10 \text{ مربع} \times \text{ضریب رقت } \times 10^4$$

**اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و b، کاروتنوئید و لوتتین:**

جهت اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید کل در ابتدا ۰/۰۱ گرم از ریزجلبک‌های خشک‌شده توزین و به درون هاون چینی منتقل و با ۲ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ سائیده گردید. محلول همگن و یکنواخت به‌دست آمده را به اپندرف‌های ۲ میلی‌لیتری اضافه کرده و عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را به درون فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و با استفاده از استون ۸۰٪ به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئید به ترتیب طبق فرمول‌های زیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ریزجلبک (mg/g FW) محاسبه گردید (Lichtenthaler and Wellburn, 1983). در این فرمول D بیانگر جذب نوری، V بیانگر حجم نهایی عصاره برحسب میلی‌لیتر و W بیانگر وزن ریزجلبک برحسب گرم است و با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید.

$$\text{Chla (mg/(g.Fw))} = [(12.7 D^{663}) - (2.69 D^{647}) \times V] / 1000W$$

$$\text{Chlb (mg/(g.Fw))} = [(22.9 D^{647}) - (4.93 D^{663}) \times V] / 1000W$$

$$\text{Total Chlorophyll (mg/(g.Fw))} = [(20.2 D^{647}) + (8.02 D^{663}) \times V] / 1000W$$

$$\text{Carotenoid (mg/(g.Fw))} = [(1000 D^{470}) - (1.8 \text{ Chla}) - (85.02 \text{ Chlb})] / 198$$

به یک میلی‌لیتر رسانیده شد. واکنش تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال به مدت ۷۰ دقیقه در دمای اتاق اتفاق افتاد. فعالیت آنزیم PAL با تولید ترانس سینامیک اسید در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم برحسب میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین در واحد زمان ( $\mu \text{mol.mg}^{-1} \text{protein.min}^{-1}$ ) بیان شد.

#### اندازه‌گیری میزان فنل کل: به منظور سنجش محتوی فنل

کل از روش معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد (Singleton *et al.*, 1999). بدین منظور ۰/۰۵ گرم از ریزجلبک تازه در ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار گرفت. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و به یک میلی‌لیتر از محلول متانولی رویی ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه شد. محلول حاصل به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت یک میلی‌لیتر  $\text{NaCO}_3$  ۱۲ درصد به محلول بدست آمده اضافه و به مدت دو ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محتوای فنلی حاصل در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت و غلظت فنل بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر ( $\text{mg GAE.g}^{-1} \text{FW}$ ) بیان شد.

#### بررسی فعالیت رادیکال آزاد DPPH: فعالیت رادیکال

آزاد DPPH به منظور بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005). در این روش ۱/۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۲ میلی‌مولار با ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره ریزجلبکی مخلوط و با استفاده از ورتکس همگن شدند. در ادامه محلول‌های حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک قرار داده شدند. در نهایت جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر در یک بازه زمانی ۳۰ دقیقه‌ای قرائت و به صورت درصد مهار DPPH بیان شد.

کلیه آزمایش‌ها برای هر تیمار در سه تکرار مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. میانگین داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری پارامترها با تجزیه واریانس با ضریب اطمینان ۹۵

برای اندازه‌گیری میزان لوتئین از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد (Pocock *et al.*, 2004). بدین منظور، رنگ‌دانه‌های استخراج‌شده به کمک استون در طول موج ۴۴۶ نانومتر قرائت و غلظت این رنگیزه با استفاده از معادله زیر و ضریب خاموشی ۱۴۴۵۰۰ لیتر بر مول بر سانتی‌متر محاسبه گردید. مقادیر رنگ‌دانه لوتئین نیز بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن ریزجلبک بیان شد.

$$A = \varepsilon bc$$

در این معادله  $\varepsilon$  بیان‌کننده ضریب خاموشی،  $b$  بیان‌کننده عرض کووت و  $c$  بیان‌کننده غلظت نمونه است.

#### اندازه‌گیری میزان آستاگزانتین: برای اندازه‌گیری میزان

آستاگزانتین میزان ۰/۲ گرم ریزجلبک خشک در ۵ میلی‌لیتر DMSO حل شده و به درون لوله‌آزمایش منتقل گردید. برای افزایش میزان استخراج آستاگزانتین لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی در طول موج ۵۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد (Li *et al.*, 2012). میزان آستاگزانتین به کمک معادله زیر محاسبه و برحسب میکروگرم بر گرم وزن ریزجلبک بیان گردید.

$$A = 0.1556C + 0.0107$$

در این معادله  $A$  بیان‌کننده میزان جذب و  $C$  بیان‌کننده غلظت آستاگزانتین است.

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیاپاز:

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاپاز (PAL) در ابتدا ۰/۱ گرم از ریزجلبک‌های تازه در ۲ میلی‌لیتر بافر Tric-HCl ۰/۵ مولار حاوی ۲-مرکاپتواتانول ۱۵ میلی‌مولار ساییده و همگن شد (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985). در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. محلول واکنش در این آزمایش حاوی فنیل‌آلانین ۶ میکرومولار برای اندازه‌گیری آنزیم PAL به همراه ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tric-HCl و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که در نهایت حجم نهایی

را در میزان کاروتنوئید کل و آستاگزانتین ایجاد نکرد. همچنین غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار نیز تأثیر معنی‌داری را بر مقدار رنگ‌دانه لوتئین نداشتند.

#### تأثیر ملاتونین بر رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی کلروفیل: نتایج

حاصل از این مطالعه نشان داد میزان کلروفیل ریزجلبک *C. vulgaris* با افزایش غلظت ملاتونین نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری یافت و بالاترین مقدار رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی تحت غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد (جدول ۱). غلظت ۱۰ میکرومولار میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل را به ترتیب ۳۲، ۲۲ و ۲۸ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش داد. میزان کلروفیل در غلظت ۵۰۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری داشت.

#### تأثیر ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم PAL و محتوای فنل کل: میزان فعالیت آنزیم PAL و محتوای فنل کل تحت

تیمار ملاتونین ریزجلبک *C. vulgaris* الگوی یکسانی را نشان دادند (شکل ۲). در این مطالعه با افزایش میزان غلظت ملاتونین محتوای فنل کل و فعالیت آنزیم PAL بهبود یافت به‌گونه‌ای که بالاترین مقادیر در غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد. هر چند در غلظت ۰/۱ میکرومولار تفاوت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد و غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار نیز تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند.

#### تأثیر ملاتونین بر DPPH: همان گونه که در شکل ۳

مشاهده می‌شود میزان مهار رادیکال DPPH نیز با افزایش غلظت ملاتونین، افزایش یافت و بالاترین میزان درصد مهار در غلظت ۵۰۰ میکرومولار مشاهده شد. با این حال غلظت ۰/۱ میکرومولار نتوانست تفاوت معنی‌داری را در میزان درصد مهار رادیکال DPPH در مقایسه با نمونه‌های فاقد ملاتونین ایجاد نماید. نتایج بدست آمده از این آنالیز با تغییرات فعالیت آنزیم PAL و میزان فنل هماهنگ بود.

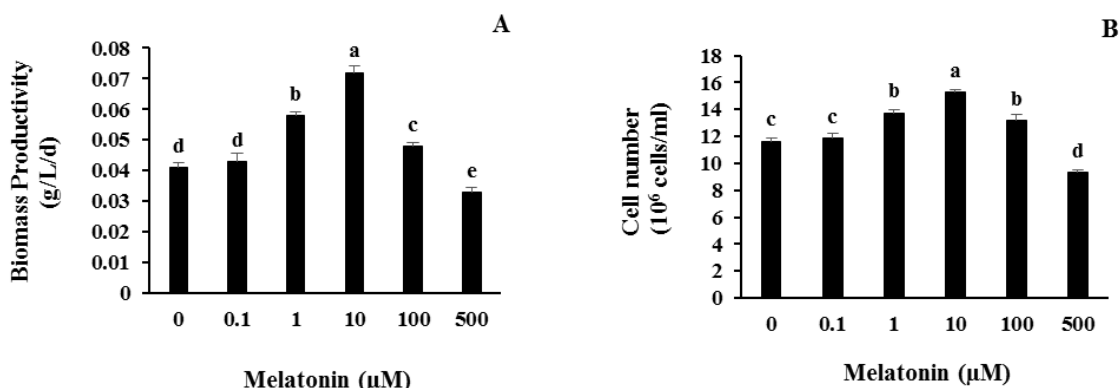
درصد با استفاده از آزمون Duncan ( $P \leq 0.05$ ) با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد مقایسه و تحلیل آماری قرار گرفت و نمودارها به وسیله نرم‌افزار Excel رسم شد.

#### نتایج

تأثیر تیمار ملاتونین بر شاخص‌های رشدی: با توجه به نتایج شکل ۱، پارامترهای رشدی همچون بهره‌وری زیست‌توده و تعداد سلول ریزجلبک *C. vulgaris* تحت تیمار ملاتونین الگویی تقریباً یکسان نشان دادند. به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت ملاتونین تا ۱۰ میکرومولار روند افزایش و در ادامه روند کاهشی شاخص‌های رشدی مشاهده شد. در این مطالعه تعداد سلول و بهره‌وری زیست‌توده در تیمار ۰/۱ میکرومولار ملاتونین تفاوت معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. درحالی‌که غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین باعث افزایش معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد شد. بالاترین میزان بهره‌وری زیست‌توده و تعداد سلول در غلظت ۱۰ میکرومولار به ترتیب با ۷۵ و ۳۱ درصد افزایش نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. غلظت ۵۰۰ میکرومولار با روندی متفاوت میزان شاخص‌های رشدی را نسبت به نمونه شاهد کاهش داد.

#### تأثیر تیمار ملاتونین بر کاروتنوئید کل، لوتئین و

آستاگزانتین: در جدول ۱ نتایج حاصل از اثر ملاتونین بر رنگی‌های کاروتنوئیدی ریزجلبک *C. vulgaris* نشان داده شده است. تمام غلظت‌های استفاده‌شده ملاتونین به غیر از ۰/۱ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار محتوای کاروتنوئید کل، لوتئین و آستاگزانتین نسبت به نمونه شاهد شد. با افزایش غلظت ملاتونین میزان رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی با شیب تدریجی افزایش یافتند. به‌گونه‌ای که محتوای کاروتنوئید کل در غلظت ۵۰۰ میکرومولار در مقایسه با نمونه شاهد بیش از سه برابر افزایش یافت. همچنین بیشترین میزان رنگ‌دانه‌های لوتئین و آستاگزانتین در غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین به ترتیب با ۳۹ و ۱۷۰ درصد افزایش در مقایسه با نمونه فاقد ملاتونین بدست آمد. باین‌حال، غلظت ۰/۱ میکرومولار تغییر معنی‌داری

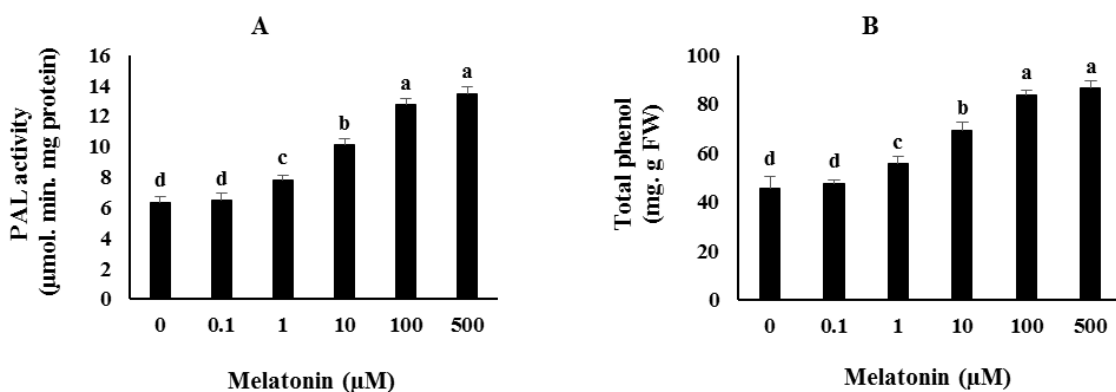


شکل ۱- اثر ملاتونین بر بهره‌وری زیست‌توده (A) و تعداد سلول ریزجلبک (B). حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است.

جدول ۱- مقایسه میانگین بررسی اثر ملاتونین بر میزان کاروتنوئید کل، لوتئین و آستاگزانتین

تیمار	غلظت (Mμ)	کاروتنوئید کل	لوتئین	آستاگزانتین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
ملاتونین	۱	۰/۳۶±۰/۰۸۱ <sup>e</sup>	۵/۰±۱/۰۳۴ <sup>d</sup>	۰/۰±۶۸/۰۳ <sup>e</sup>	۱۲/۰±۸/۰۲۳ <sup>e</sup>	۹/۰±۲/۰۴۲ <sup>d</sup>	۰±۲۲/۳۱ <sup>e</sup>
	۰/۱	۰/۴۵±۰/۰۱۳ <sup>e</sup>	۰/۱۴ <sup>e</sup>	۰/۰±۷/۰۱ <sup>e</sup>	۱۴/۰±۱/۰۱۲ <sup>d</sup>	۱۰/۰±۲/۰۱۶ <sup>c</sup>	۲۴/۰±۳/۲۸ <sup>d</sup>
	۱	۰/۶۹±۰/۰۳۳ <sup>d</sup>	۵/۰±۸/۰۸۷ <sup>c</sup>	۰/۰±۹۳/۰۲۵ <sup>d</sup>	۱۴/۰±۹/۰۱۸ <sup>c</sup>	۱۰/۰±۸/۰۲۱ <sup>b</sup>	۲۵/۰±۶/۰۱۵ <sup>c</sup>
	۱۰	۱/۰۲±۰/۰۵۴ <sup>c</sup>	۶/۰±۴/۰۱۱ <sup>b</sup>	۱/۰±۳۵/۰۴۶ <sup>c</sup>	۱۶/۰±۹/۰۲۴ <sup>a</sup>	۱۱/۰±۳/۰۱۱ <sup>a</sup>	۲۸/۰±۲/۰۱۹ <sup>a</sup>
	۱۰۰	۱/۴۵±۰/۰۲۴ <sup>b</sup>	۶/۰±۷/۰۷۷ <sup>a</sup>	۱/۰±۵۷/۰۳۹ <sup>b</sup>	۱۶/۰±۱/۰۳۶ <sup>b</sup>	۱۰/۰±۸/۰۲ <sup>b</sup>	۲۶/۰±۹/۰۲۲ <sup>b</sup>
	۵۰۰	۱/۵۸±۰/۰۴۷ <sup>a</sup>	۷/۰±۱/۰۲۳ <sup>a</sup>	۱/۰±۸۴/۰۲۸ <sup>a</sup>	۱۲/۰±۶/۰۲۵ <sup>e</sup>	۸/۰±۶/۰۳۵ <sup>e</sup>	۲۱/۰±۲/۰۱۲ <sup>f</sup>

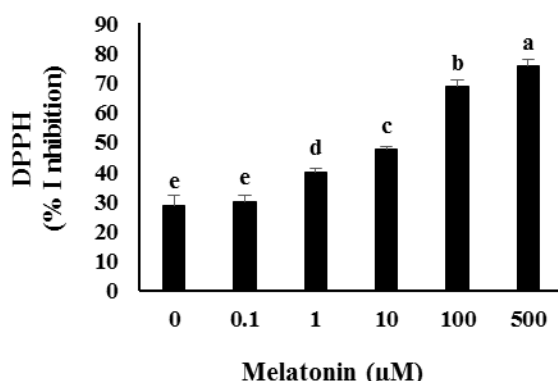
مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P < 0.05 است.



شکل ۲- اثر ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم PAL (A) و ترکیبات فنل کل (B). حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است.

پاسخ‌های ریزجلبک در مقابل تیمار و یا عوامل زیستی و غیرزیستی مورد استفاده و ارزیابی قرار گیرد. با توجه به نتایج

بحث بررسی پارامترهای رشدی می‌تواند به منظور تحلیل چگونگی



شکل ۳- اثر ملاتونین بر درصد مهار رادیکال DPPH. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است.

اولیه همچون کلروفیل، پروتئین و کربوهیدرات به‌عنوان ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسکلت سلولی ریزجلبک و همچنین نقش این هورمون در افزایش تقسیم سلولی در گیاه که در نهایت می‌تواند منجر به افزایش رشد گردد دانست (Fujikura *et al.*, 2020; Tsukaya, 2019). در این مطالعه میزان پارامترهای رشد تحت غلظت‌های بالای ملاتونین کاهش یافت. می‌توان پیشنهاد نمود که این کاهش در پارامترهای رشد احتمالاً به دلیل فعال‌شدن سایر مسیرهای متابولیسمی و یا تولید متابولیت‌های تنش‌زا و در نهایت اثرات منفی بر رشد گیاه باشد. در این مطالعه میزان رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی کلروفیل در غلظت‌های پایین ملاتونین نسبت به نمونه‌های فاقد ملاتونین افزایش معنی‌داری را نشان دادند. مطالعات مشابه در ریزجلبک‌ها نیز نشان داد که استفاده از هورمون ملاتونین در ریزجلبک *C. reinhardtii*، میزان کلروفیل‌های a و b نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری یافتند (Meng *et al.*, 2020). مطالعات بر روی گیاهان نشان داد هورمون ملاتونین در گیاه سیب در غلظت‌های پایین با سرکوب ژن‌های تجزیه‌کننده کلروفیل (Sharif *et al.*, 2018) و در گیاه گیلان با افزایش پورفیرین به عنوان یکی از ترکیبات اصلی مسیر بیوسنتزی رنگ‌دانه کلروفیل میزان کلروفیل را افزایش داده است (Sarropoulou *et al.*, 2012). می‌توان توجیه نمود که ملاتونین با افزایش فعالیت آنزیم‌ها و پیش‌ماده‌های سنتز کلروفیل و سرکوب آنزیم‌های تجزیه‌کننده میزان کلروفیل‌های a و b را

بدست آمده، ملاتونین توانست در غلظت‌های پایین میزان پارامترهای رشدی (بهره‌وری زیست‌توده و تعداد سلولی) را نسبت به نمونه‌های فاقد ملاتونین افزایش دهد به‌گونه‌ای که بالاترین میزان رشد در غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده گردید. مطالعات نشان دادند که اثرات هورمون ملاتونین به غلظت مورد استفاده به‌شدت وابسته است به‌گونه‌ای که در غلظت‌های پایین اثر القایی و در غلظت‌های بالا اثر مهاری بر رشد و عملکرد ریزجلبک دارد (Arnao and Hernandez-Ruiz, 2014). به همین دلیل می‌توان پیشنهاد نمود که بهبود در میزان بهره‌وری زیست‌توده و تعداد سلول ریزجلبکی می‌تواند به دلیل نقش القایی ملاتونین بر متابولیسم ریزجلبک در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان و هورمون رشد باشد (Li *et al.*, 2022). در نتایج مشابه با مطالعه حاضر مشاهده شد که هورمون ملاتونین در غلظت ۱۰ میکرومولار میزان زیست‌توده را در ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* (Cui *et al.*, 2020) و *Monoraphidium sp* (Dong *et al.*, 2019) نسبت به نمونه شاهد افزایش داد. همچنین در مطالعه‌ای بالاترین میزان زیست‌توده و تعداد سلول ریزجلبکی تحت هورمون ملاتونین در غلظت ۱۰ میکرومولار در ریزجلبک کلرلا در محیط فاضلاب مشاهده شد (Maleki Samani and Mansouri, 2023). علاوه‌براین، بهبود رشد ریزجلبک در غلظت‌های بهینه می‌تواند به دلیل تجمع رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های

با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی این ترکیبات می‌توانند موجب القای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و حذف گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده به وسیله ملاتونین و تنش‌های اکسیداتیو ناشی از آن گردند (Del Mondo et al., 2022). در این مطالعه با کاربرد ملاتونین در غلظت‌های متفاوت، ترکیبات فنلی و آنزیم PAL به‌عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی افزایش یافت. مطالعات مشابه نیز تأیید می‌کنند که ملاتونین میزان متابولیت‌های ثانویه همچون ترکیبات فنلی را در ریزجلبک‌های مختلف القا می‌نماید (Zhao et al., 2023). بنابراین از یک‌سو، افزایش محتوای ترکیبات فنلی می‌تواند ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات باشد (Banik and Bhattacharjee, 2020)، از سوی دیگر افزایش ترکیبات فنلی و رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی می‌تواند ناشی از القای فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله ملاتونین باشد. نقش این هورمون در افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL در گیاهان گزارش شده است (Esmaeili et al., 2023; Vafadar et al., 2020).

در این مطالعه از درصد مهار رادیکال DPPH به‌منظور سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک استفاده گردید. متابولیت‌های ثانویه همچون ترکیبات فنلی و رنگیزه‌های کاروتنوئیدی در نقش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی می‌توانند درصد مهار رادیکال DPPH را بهبود بخشند که در نهایت موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ریزجلبک می‌گردد (Mtaki et al., 2020; Leon-Vaz et al., 2023). بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه، افزایش در این ترکیبات موجب تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و DPPH می‌گردد که در نهایت می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن و تنش‌های اکسیداتیو ناشی از آن را تقلیل دهند.

#### نتیجه‌گیری

هورمون ملاتونین در غلظت‌های بهینه می‌تواند موجب تنظیم و القای مسیرهای متابولیسمی و در نهایت بهبود رشد و

افزایش داده است. با این حال، غلظت‌های بالای ملاتونین می‌تواند موجب اکسیداسیون نوری کلروفیل شده و تغییر در ساختار و عملکرد آن‌ها را باعث شود که در نهایت می‌تواند میزان رنگ‌دانه‌ها را کاهش دهد. بنابراین کاهش میزان کلروفیل a و b در غلظت ۵۰۰ میکرومولار در این مطالعه، می‌تواند به دلیل تخریب کلروفیل‌ها و اثرات مهاری بر آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز کلروفیل در این غلظت باشد.

با افزایش غلظت ملاتونین میزان کاروتنوئید کل، آستاگزانتین و لوتئین در الگوی تقریباً یکسانی افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد نشان دادند و در این میان ریزجلبک‌های تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین بالاترین مقدار کاروتنوئید را نشان دادند. در مطالعه بر روی *Ocimum basilicum* L. غلظت ۱ میکرومولار توانست میزان کاروتنوئید کل را افزایش دهد (Bahcesular et al., 2020). در دو مطالعه دیگر مشابه با نتایج ما، هورمون ملاتونین در ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* میزان آستاگزانتین را نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری داد (Ding et al., 2018a; Ding et al., 2018b). همچنین در مطالعه‌ای مولکولی، ملاتونین ژن‌هایی را که در سنتز کاروتنوئیدها و آستاگزانتین نقش دارند را افزایش داد (Ding et al., 2018a; Wen et al., 2015). گزارش شده است که ملاتونین موجب بیش‌تنظیمی ژن لیکوپن سیکلاز (LCY) شده و میزان بتاکاروتن را افزایش می‌دهد. بتاکاروتن نیز به‌عنوان پیش‌ماده آستاگزانتین در نهایت موجب افزایش میزان آستاگزانتین شده است (Zhao et al., 2021). تیمار ملاتونین در ریزجلبک *Acutodesmus* sp. باعث القای ژن‌های بیوسنتزی مسیر لوتئین و در نتیجه افزایش مقدار لوتئین شد (Zhu et al., 2022). علاوه‌براین گزارش شده است که رنگ‌دانه‌های کلروفیل و پروتئین‌ها به‌عنوان شاخص‌های اصلی رشدی ریزجلبک‌ها ممکن است تحت القای ملاتونین به آستاگزانتین تبدیل شود (Ding et al., 2018b). بنابراین در مطالعه حاضر کاهش در این ماکرومولکول‌ها در غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار می‌تواند موجب تغییر مسیر به سمت تولید کاروتنوئید و آستاگزانتین شده باشد.

محتوای فنلی و در نهایت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک گردد. از سوی دیگر ملاتونین می‌تواند منجر به القای ترکیبات فنلی و رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی همچون لوتئین و آستاگزانتین گردد. بر این اساس می‌توان پیشنهاد نمود که ملاتونین با توجه به غلظت مورد استفاده می‌تواند موجب القای پارامترهای رشدی و یا تولید متابولیت‌های ثانویه و در نهایت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک *C. vulgaris* گردد.

متابولیت‌های گیاهان و ریزجلبک‌ها گردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در ریزجلبک *C. vulgaris* ملاتونین در غلظت ۱۰ میکرومولار بهره‌وری زیست‌توده، تعداد سلول و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی را به‌عنوان شاخص‌های رشدی بهبود بخشید. درحالی‌که بالاترین میزان رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی و ترکیبات فنلی در غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین بدست آمد. ملاتونین می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه موجب بهبود

### منابع

- Abomohra, A. E., Shang, H., El-Sheekh, M., Eladel, H., Ebaid, R., Wang, S., & Wang, Q. (2019). Night illumination using monochromatic lightemitting diodes for enhanced microalgal growth and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 288, 121514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121514>
- Ahmad, I., Song, X., Hussein, M. E., Jamal, Y., Younas, M. U., Zhu, G., Zhou, G., & Adam, A. (2023). The role of melatonin in plant growth and metabolism, and its interplay with nitric oxide and auxin in plants under different types of abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 14, 110-117. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1108507>
- Arnao, M. B., & Hernandez-Ruiz, J. (2014). Melatonin: Plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in Plant Science*, 19(12), 789-797. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.006>
- Bahcesular, B., Yildirim, E. D., Karaçocuk, M., Kulak, M., & Karaman, S. (2020). Seed priming with melatonin effects on growth, essential oil compounds and antioxidant activity of basil (*Ocimum basilicum*) under salinity stress. *Industrial Crops Products*, 146, 112165. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112165>
- Banik, N. F., & Bhattacharjee, S. (2020). Complementation of ROS scavenging secondary metabolites with enzymatic antioxidant defense system augments redox-regulation property under salinity stress in rice. *Physiology Molecular Biology of Plants*, 26(8), 1623-1633. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00844-9>
- Barros, J. S., & Dixon, R. (2020). Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends in Plant Science*, 25(1), 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
- Beaudoin-Eagan, L. D., & Thorpe, T. (1985). Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, 78(3), 438-441. <https://doi.org/10.1104/pp.78.3.438>
- Brennan, L. A., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chowdury, K. H., Nahar, N., & Deb, U. (2020). The growth factors involved in microalgae cultivation for biofuel production: A review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering*, 9(4), 185-215. <https://doi.org/10.4236/cwee.2020.94012>
- Cui, J., Yu, C., Zhong, D. B., Zhao, Y., & Yu, X. (2020). Melatonin and calcium act synergistically to enhance the coproduction of astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* under nitrogen deficiency and high light conditions. *Bioresource Technology*, 305, 123-169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123069>
- DelMondo, A., Sansone, C., & Brunet, C. (2022). Insights into the biosynthesis pathway of phenolic compounds in microalgae. *Computational Structural Biotechnology Journal*, 20, 1901-1913. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.04.019>
- Ding, W., Zhao, P., Peng, J., Zhao, Y., Xu, J. W., Li, T., Reiter, R. J., Ma, H., & Yu, X. (2018a). Melatonin enhances astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis* by mechanisms possibly related to abiotic stress tolerance. *Algal Research*, 33, 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.021>
- Ding, W., Zhao, Y., Xu, J. W., Zhao, P., Li, T., Ma, H., Reiter, R. J., & Yu, X. (2018b). Melatonin: A multifunctional molecule that triggers defense responses against high light and nitrogen starvation stress in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 66(29), 7701-7711. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02178>
- Dong, X., Zhao, Y., Li, T., Huang, L., Zhao, P., Xu, J. W., Ma, H., & Yu, X. (2019). Enhancement of lipid production and nutrient removal of *Monoraphidium* sp. by combined melatonin and molasses wastewater treatment. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 99, 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.03.010>
- Esmaili, S., Sharifi, M., Ghanati, F., Soltani, B. M., Samari, E., & Sagharyan, M. (2023). Exogenous melatonin induces phenolic compounds production in *Linum album* cells by altering nitric oxide and salicylic acid. *Scientific*

- Reports*, 13(1), 4158-4166. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30954-9>
- Fujikura, U., Ezaki, K., Horiguchi, G., Seo, M., Kanno, Y., Kamiya, Y., Lenhard, M., & Tsukaya, H. (2020). Suppression of class compensated cell enlargement by xs2 mutation is mediated by salicylic acid signaling. *PLoS Genetics*, 16(6), e1008873. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008873>
- Hongjian, W., Jiajin, W., Qi, W., Wenyuan, H., Songkai, L., Jiahao, H., Wentao, H., Ming, T., & Hui, C. (2023). Role of melatonin in enhancing arbuscular mycorrhizal symbiosis and mitigating cold stress in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers Microbiology*, 14, 1123632. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1123632>
- Krienitz, L., Huss, V., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*, 20(2), 67-69. doi:10.1016/j.tplants.2014.11.005
- Leon-Vaz, A., Leon, R., Vigara, J., & Funk, C. (2023). Exploring nordic microalgae as a potential novel source of antioxidant and bioactive compounds. *New Biotechnology*, 73, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.12.001>
- Li, A., Sun, X., & Liu, L. (2022) Action of salicylic acid on plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 13, 878-976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.878076>
- Li, Y., Miao, F., Geng, Y., Lu, D., Zhang, C., & Zeng, M. (2012). Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus* crude extract spectrophotometrically. *Chinese Journal of Oceanology Limnology*, 30(4), 627-637. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1217-5>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. (1983). Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls a and b of Leaf Extracts in Different Solvents. Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Liyana-Pathirana, C. D., & Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(7), 2433-2440. <https://doi.org/10.1021/jf049320i>
- Maleki Samani, M. S., & Mansouri, H. (2023). The novel strategy for enhancing growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* microalgae cultured in dairy wastewater by monochromatic LEDs and melatonin. *Journal of Applied Phycology*, 35(2), 593-601. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02898-6>
- Meng, Y., Chen, H., & Liu, J. (2020). Melatonin facilitates the coordination of cell growth and lipid accumulation in nitrogen-stressed *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production. *Algal Research*, 46, 101-186. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101786>
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. (2020). Assessment of antioxidant contents and free radical-scavenging capacity of *Chlorella vulgaris* cultivated in low cost media. *Applied Sciences*, 10(23), 86-91. <https://doi.org/10.3390/app10238611>
- Park, Y. H., Han, S. I., Oh, B., Kim, H. S., Jeon, M. S., Kim, S., & Choi, E. (2022). Microalgal secondary metabolite productions as a component of biorefinery: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126-206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126206>
- Pocock, T., Krol, M., & Huner, N. (2004). The determination and quantification of photosynthetic pigments by reverse phase high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, and spectrophotometry. *Photosynthesis Research*, 5, 137-148. <https://doi.org/10.1385/1-59259-799-8:137>
- Ru, I., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: A perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2-11. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>
- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., & Koukourikou, M. (2012). Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium* × *Prunus cerasus*). *Plant Physiology Biochemistry*, 61, 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.10.001>
- Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M. B., Ali, M., Ali, Q., Muhammad, I., Shalmani, A., Nawaz, M. A., & Chen, P. (2018). Melatonin and its effects on plant systems. *Molecules*, 23(9), 23-52. <https://doi.org/10.3390/molecules23092352>
- Singh, A., Pandey, H., Pal, A., Chauhan, D., Pandey, S., Gaikwad, D. J., Sahu, C., & Atta, K. (2023). Linking the role of melatonin in plant stress acclimatization. *South African Journal of Botany*, 159, 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.05.034>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sohrabi, D., Jazini, M. D., & Shariati, M. (2019). Mixotrophic cultivation of *Dunaliella salina* on crude glycerol obtained from calcinated fatty acid production process. *Russian Journal of Marine Biology*, 45, 470-480. <https://doi.org/10.1134/S1063074019060105>
- Sreenikethanam, A., Raj, S., Gugulothu, P., & Bajhaiya, A. (2022). Genetic engineering of microalgae for secondary metabolite production: Recent developments, challenges, and future prospects. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*, 10, 836-856. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.836056>
- Tsukaya, H. (2019). Re-examination of the role of endoreduplication on cell-size control in leaves. *Journal of Plant*

- Research*, 132(5), 571-580. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01125-7>
- Vafadar, F., Amooaghaie, R., Ehsanzadeh, P., Ghanadian, M., Talebi, M., & Ghanati, F. (2020). Melatonin and calcium modulate the production of rosmarinic acid, luteolin, and apigenin in *Dracocephalum kotschyi* under salinity stress. *Phytochemistry*, 177, 112-422. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112422>
- Wen, Z., Liu, Z., Hou, Y., Liu, C., Gao, F., Zheng, Y., & Chen, F. (2015). Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Plant Growth Regulation*, 78, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.010>
- Xie, S. R., Li, Y., Chen, H. H., Liang, M. H., & Jiang, J. (2022). A strategy to promote carotenoids production in *Dunaliella bardawil* by melatonin combined with photoinduction. *Enzyme Microbial Technology*, 161, 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110115>
- Yongteng, Z., Qingwei, W., Dan, G., Feiyan, H., Jiani, L., Lei, Y., & Xuya, Y. (2024). Melatonin, a phytohormone for enhancing the accumulation of high-value metabolites and stress tolerance in microalgae: Applications, mechanisms, and challenges. *Bioresource Technology*, 393, 130-093. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130093>
- Zhang, L., Yang, S., Xu, J., Liu, T., Yang, D., Wu, Z., & Shao, M. (2020). Application of exogenous salicylic acid on improving high temperature resistance of *Nannochloropsis oceanica*. *Aquaculture International*, 28, 2235-2246. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00592-3>
- Zhao, Y., Cui, J., Li, Q., Qiao, T., Zhong, D., Zhao, P., & Yu, X. (2021). A joint strategy comprising melatonin and 3-methyladenine to concurrently stimulate biomass and astaxanthin hyperaccumulation by *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 341, 125-784. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125784>
- Zhao, Y., Wang, Q., Gu, D., Huang, F., Liu, J., Yu, L., & Yu, X. (2023). Melatonin, a phytohormone for enhancing the accumulation of high-value metabolites and stress tolerance in microalgae: Applications, mechanisms, and challenges. *Bioresource Technology*, 5, 130-193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130093>
- Zhu, L., Gao, H., Li, L., Zhang, Y., Zhao, Y., & Yu, X. (2022). Promoting lutein production from the novel alga *Acutodesmus* sp. by melatonin induction. *Bioresource Technology*, 362, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127818>

## Investigating the effect of the melatonin hormone on growth indicators and biochemical compounds of *Chlorella vulgaris* microalgae

Mohammad Sadegh Maleki Samani, Hakimeh Mansouri

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(Received: 2024/06/03, Accepted: 2024/08/27)

### Abstract

Melatonin is one of the growth hormones that can induce growth and primary and secondary metabolites in microalgae. Green microalgae, including *Chlorella vulgaris* can be considered renewable sources of biomass and secondary metabolites. This research was studied to investigate the effects of this hormone on the growth and biochemical parameters of *Chlorella vulgaris* microalgae. For this purpose, microalgae were cultured under concentrations of 0, 0.1, 1, 10, 100 and 500  $\mu\text{M}$  melatonin. After 21 days, microalgae were used to measure parameters. The results showed that the maximum productivity of biomass, cell number, and chlorophyll pigments were observed under the concentration of 10  $\mu\text{M}$  and the lowest value of these parameters was observed at the concentration of 500  $\mu\text{M}$  melatonin. Also, the maximum amount astaxanthin and lutein pigments, phenolic compounds and antioxidant capacity were obtained under the concentration of 500  $\mu\text{M}$ . According to the above data, it can be suggested that melatonin, by producing reactive oxygen species and its regulatory role, induces growth parameters and chlorophyll pigments in optimal concentrations, and on the other hand, by increasing PAL enzyme activity, the content of phenolic compounds and increases carotenoid pigments. The increase in these compounds ultimately leads to the improvement of the antioxidant capacity of microalgae.

**Keywords:** Biomass, Carotenoids, Phenolic compounds, Melatonin

Corresponding author, Email: h\_mansori@uk.ac.ir