مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره سوم (پیاپی ۴۰) پاییز ۱۳۹۸
صفحات ۲۵۱-۲۳۹

Original Article

مقایسه و بهینه سازی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان سویه های بومی و غیر بومی قارچ *آسپرژیلوس*

فاطمه مشکی[۱]، نفیسه سادات نقوی[*۲]، مسعود فولادگر[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۲]استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۳]دانشیار، گروه علوم پایه، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آنتی اکسیدان ها با خنثی سازی رادیکال های آزاد موجب کاهش خطر ابتلا به بیمار یهای قلبی عروقی و سکته و جلوگیری از پیشرفت سرطان می شوند. این پژوهش با هدف تولید و بهینه سازی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان با استفاده از سویه های *آسپرژیلوس* انجام شد.

مواد و روش‌ها: قارچ ها از خاک مناطق مختلف استان اصفهان و مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه شدند و به منظور تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در محیط کشت زاپک (Czapek) تلقیح شدند. غربال گری و مقایسه خواص آنتی اکسیدانی سویه های منتخب با استفاده از چهار آزمون احیای رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، احیای رادیکال آهن، میزان فنل تام و سنجش ترکیبات فلاونوئیدی انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی از نظر pH، دما، نوع منبع کربن و نیتروژن، با آزمون های تک فاکتوری و فاکتوریل جزیی (تاگوچی) بهینه سازی شد.

یافته‌ها: بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی شده از خاک اطراف ذوب آهن و بیشترین میزان فلاونوئید قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداسازی شده از خاک گلخانه مشاهده شد. میزان احیای رادیکال DPPH در بهترین شرایط pH ٦، دمای ۲۵ درجه سلسیوس، منبع کربن ساکارز و منبع نیتروژن نیترات پتاسیم برابر با ۸۹/۱۹ درصد بود. بهینه سازی با روش تاگوچی موجب افزایش ۱۰ تا ۱۵ درصدی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان شد.

نتیجه گیری: جدایه های قارچی بومی قدرت بالایی برای تولید ترکیبات با خاصیت آنتی اکسیدانی داشتند و قابل ارائه به صنایع مرتبط می باشند.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، *آسپرژیلوس*، غربال گری، بهینه سازی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۸

مقدمه

امروزه آنتی اکسیدان ها به طور فزایندهای به منظور به تأخیر انداختن فرآیند اکسیداسیون به مواد غذایی اضافه می شوند (۱). تولید رادیکال آزاد، مسأله ای طبیعی است و در طی عمل تنفس به وجود می آید (۲ و ۳). رادیکال های آزاد می توانند در ایجاد بسیاری از فرآیندهای آسیب شناختی شرکت کنند (٤). آنتی اکسیدان ها بر حسب منشا به دو گروه ساختنی و طبیعی تقسیم می شوند. بعضی آنتی اکسیدان های ساختنی و شیمیایی شامل بوتیلات هیدروکسی تولوئن (Butylated hydroxyl toluene)، بوتیلات هیدروکسی آنیزول (*Butylated-hydroxyanisole*)، ترشیاری بوتیل هیدروکینون (tertiar butyl

*) آدرس برای مکاتبه: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۳۱۳۷٤۲۰۱۳٤ پست الکترونیک: naghavi@iaufala.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

hydroquinone) و گریندوکس۱۱۷ (Grindox 117) هستند. به دلیل اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی بر سلامت، یافتن منابع آنتی اکسیدان طبیعی به میزان زیادی مورد توجه محافل علمی قرار گرفته است (۵ و ٦).

تاکنون بیش از ۸۰۰ گونه *آسپرژیلوس* شناخته شده است که فقط چند گونه از آن‌ها قادرند در افرادی که دچار نقص ایمنی هستند ایجاد بیماری کنند و برخی نیز استفاده صنعتی و غذایی دارند (۳، ۹-۷).

پلی فنل ها (Phenols)، استروئیدها (Steroids)، ترپنوئیدها (Terpenoids)، آلکالوئیدها (Alkaloids)، بنزوکینون ها (Benzoquinones)، فلاونوئیدها (Flavanoids)، از نمونه ترکیبات آنتی اکسیدان تولید شده توسط قارچ ها می باشند. حدود یک و نیم میلیون گونه قارچی پتانسیل تولید انواع ترکیبات آنتی اکسیدانی را دارند. برخی گونه های قارچ *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) مانند *آسپرژیلوس اواموری* (*A. awamori*)، *آسپرژیلوس نایجر* (*A. niger*) ، *آسپرژیلوس ترئوس* (*A. terreus*)، *آسپرژیلوس اوریزیه* (*A. oryzae*) و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (*A. fumigatus*) از قارچ هایی هستند که می توانند موادی با خاصیت آنتی اکسیدانی تولید کنند (۳، ٤ و ۱۰).

روش های مختلفی برای اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی وجود دارد که می توان به آزمون آون (Aven test)، آزمون رنسیمت (rancimat test)، روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل، احیا کنندگی آهن، اندازه گیری فنل تام و ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل ترلکس (capacity trolox equivalent antioxidant) اشاره کرد (۱۱-۹).

آنتی اکسیدان های طبیعی مولکو ل هایی هستند که سلول را در برابر اثرات مخرب رادیکا ل های آزاد محافظت می کنند. در میان ۲۲۵۰۰ ترکیب استخراج شده فعال زیستی حدود ٤۵ درصد توسط *اکتینوباکترها*، ۳۷ درصد توسط قارچ ها و ۱۷ درصد توسط سایر باکتری ها تولید شده است (۱ و ۱۲).

هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط سویه های بومی و غیر بومی قارچ *آسپرژیلوس* بود.

مواد و روش ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و به صورت توصیفی انجام پذیرفت.

الف) تهیه قارچ ها: چهار سویه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* PTCC ۵۰۱۲، *آسپرژیلوس اواموری* PTCC ۵۰۹۷، *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ۵۲٦۷ و *آسپرژیلوس اورایزیه* PTCC ۵۱٦۳ از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه شد. جداسازی سایر قارچ ها از خاک مناطق مختلف شامل زمین های زراعی در اطراف کارخانه ذوب آهن اصفهان، خاک گلخانه کشت نهال در فولاد شهر استان اصفهان و خاک کارگاه مسگری اصفهان انجام گرفت. کلیه قارچ ها بر روی محیط PDA کشت و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز، گرمخانه گذاری شدند و جدایه های *آسپرژیلوس* بر اساس ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی شناسایی شدند. *آسپرژیلوس* از نظر ساختمانی دارای میسلیوم با تیغه میانی، کونیدیوفور، وزیکول، استریگما و کونیدیا می باشد که استریگما در برخی گونه ها یک ردیف و در برخی گونه ها دو ردیفی می باشد. از خصوصیات ماکروسکوپی این قارچ می توان به کلنی کرکی و رنگ های متنوع در جدایه های مختلف اشاره کرد (۱۳ و ۱٤).

ب) تهیه عصاره حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی: پس از رشد قارچ ها روی محیط کشت PDA، از هر محیط دو عدد دیسک ۸ میلی متری جدا شد و در محیط کشت زاپک استریل با ترکیب ۳ درصد ساکارز، ۰/۲ درصد نیترات سدیم، ۰/۱ درصد دی پتاسیم فسفات، ۰/۰۵ درصد سولفات منیزیم، ۰/۰۵ درصد کلرید پتاسیم و ۰/۰۰۱ درصد سولفات آهن II تلقیح شد و به مدت ۱۰ روز در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس عصاره محیط کشت با سانتریفوژ در دمای ٤ درجه سلسیوس و با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و سپس با پالایش توسط کاغذ واتمن شماره یک تهیه گردید (۲، ۱۵ و ۱٦).

ج) غربالگری سویه های تولید کننده ترکیبات آنتی اکسیدان: برای این منظور از آنتی اکسیدان سنتزی بوتیلات هیدروکسی

تولوئن (BHT) برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد.
میزان ۰/۰۱ گرم از پودر BHT در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد و سپس همگن شد. غلظت های مختلف از BHT در ۵ عدد بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری تهیه گردید. برای رسم نمودار استاندارد، از هر یک از لوله های تهیه شده با رقت های مختلف از BHT، مقدار ۰/۵ میلی لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۱ میلی لیتر معرف DPPH اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه جذب نوری نمونه ها در ۵۱۷ نانومتر قرائت و منحنی استاندارد ترسیم گردید (۱۵، ۱۷). برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی قارچ ها از عصاره های مایع تهیه شده، مقادیر ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و ۱ میلی لیتر معرف DPPH به هر لوله اضافه گردید. برای خواندن جذب هر یک از محلول ها ابتدا جذب با محلول بلانک (DPPH اتانولی) صفر شد. پس از قرار دادن به مدت ۳۰ دقیقه در فضای تاریک جذب نوری نمونه ها درطول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و منحنی مربوط به آن ترسیم گردید. پس از خواندن جذب های مربوط به هر یک از محلول ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/Vis) و با توجه به غلظت محلول های تهیه شده نمودار درصد مهار بر حسب غلظت رسم گردید تا از روی نمودار رسم شده، غلظتی از نمونه که توانایی از بین بردن نیمی از رایکال آزاد DPPH را دارا است (IC_{50}) محاسبه شود. درصد مهار هر یک از محلول ها، با توجه به جذب محلول های تهیه شده و جذب محلول شاهد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

درصد مهار= A1- A2/A0× 100

در این فرمول A0 جذب محلول شاهد، A1 جذب محلول نمونه مورد نظر در ترکیب با DPPH، A2 جذب محلول مورد نظر به تنهایی می باشند (۱۵ و ۱۸).

د) سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با روش اندازه گیری فنل تام: از روش فولین سیو کالتئو(FC) استفاده شد. برای این منظور از گالیک اسید برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون غلظت های مختلف از گالیک اسید در محلول آب مقطر تهیه شد (۱۸). برای رسم نمودار استاندارد، از هر یک از لوله های تهیه شده با رقت های مختلف گالیک اسید، مقدار ۰/۵ میلی لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۰/۲ میلی لیتر معرف فولین و ۰/٦ میلی لیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد اضافه گردید و پس از ٤۰ دقیقه جذب نوری نمونه ها درطول موج ۷٦۰ نانومتر قرائت و منحنی استاندارد ترسیم گردید. برای خواندن جذب هر یک از محلول ها، ابتدا جذب با محلول آب مقطر صفر شد. مقادیر ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی لیتر از عصاره های مایع به دست آمده از مرحله فیلتراسیون در ٤ لوله آزمایش جداگانه ریخته و سپس ۰/۲ میلی لیتر معرف فولین و ۰/٦ میلی لیتر سدیم کربنات ۲۰درصد به هر لوله اضافه گردید و پس از٤۰ دقیقه جذب نوری نمونه ها درطول موج ۷٦۰ نانومتر قرائت گردید. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد، محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسیدگالیک در هرمیلی لیتر عصاره بیان شد (۱۷-۱۵).

ه) *سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با روش سنجش ترکیبات فلاونوئیدی:* در این مرحله از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. محلول هایی با غلظت های مختلف کوئرستین آماده شدند. سپس مقدار ۰/۵ میلی لیتر از هر لوله به ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۰/۱ درصد و همچنین ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم، اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید و میزان جذب نوری آن بعد از ۳۰ دقیقه نگه داری در دمای اتاق و تاریکی درطول موج ٤۱٤ نانومتر خوانده شد. نهایتاً نمودار استاندارد کوئرستین ترسیم گردید. مقادیر ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی لیتر از عصاره های به دست آمده در ٤ لوله ریخته شد و سپس به هر لوله ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۰/۱ درصد و همچنین ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم، اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید و جذب آن بعد از ۳۰ دقیقه نگه داری در دمای اتاق و تاریکی در طول موج ٤۱٤ نانومتر خوانده شد. پس از قرائت جذب ها و فرمول شیب خط به دست آمده از نمودار استاندارد کوئرستین، میزان فلاونوئید تولید شده توسط هر عصاره محاسبه گردید (۲۱-۱۹).

جدول ۱: فاکتورها و سطوح بهینه شده در نرم افزار تاگوچی.

فاکتورهای آزمون	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
pH	۵	٦	۷	۸
دما (درجه سلسیوس)	۲۳	۲۵	۲۷	۳۰
منبع کربن (۳۰ گرم در لیتر)	ملاس چغندر	گلوکز	آب پنیر	ساکارز
منبع نیتروژن (۲ گرم در لیتر)	عصاره مخمر	پپتون	نیترات سدیم	نیترات پتاسیم

و) سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با روش آزمون قدرت احیاکنندگی رادیکال آهن: از روش قدرت احیا کنندگی یون پتاسیم فری سیانید به پتاسیم فرو سیانید برای عصاره های قارچی استفاده گردید. برای این منظور از آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان استاندارد استفاده شد. محلول هایی با غلظت های مختلف BHT تهیه گردید. مقدار ۰/۵ میلی لیتر از هر لوله با ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید و ۰/۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید و همچنین ۰/۱ میلی لیتر کلرید آهن سه ظرفیتی، در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد و جذب آن درطول موج ۷۰۰ نانومتر پس از ۲۰ دقیقه قرائت گردید و در آخر نمودار استاندارد بوتیل هیدروکسی تولوئن ترسیم شد. برای سنجش میزان احیای رادیکال آهن توسط عصاره ها، مقادیر ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی لیتر از عصاره های به دست آمده از مرحله فیلتراسیون در ٤ لوله مختلف با ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید و ۰/۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید و همچنین ۰/۱ میلی لیتر کلرید آهن سه ظرفیتی، در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد و سپس جذب آن درطول موج ۷۰۰ نانومتر پس از ۲۰ دقیقه قرائت گردید (۱، ۱۵ و ۱۹).

ز) آزمون های آماری به منظور بهینه سازی عوامل: آزمون t استاندارد برای مقایسه تولید آنتی اکسیدان توسط جدایه های قارچی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به دلیل این که قارچ های مختلف از نظر دما و pH مؤثر در تولید آنتی اکسیدان رفتار متفاوتی نشان می‌دهند (۱۵، ۲۲ و ۲۳) محدوده تأثیر این عوامل همراه با عامل زمان، اثر شیکر و نوع عصاره (خشک و مایع) بر روی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان با روش احیای رادیکال آزاد DPPH سنجش شد. سپس با استناد به نتایج به دست آمده از آزمون های تک فاکتوری، نوع منابع کربن و نیتروژن در محدوده های به دست آمده دما و pH با استفاده از روش طراحی آزمایش تاگوچی (نرم افزار Qualitek-4) بهینه گردید. هر یک از این عوامل در چهار سطح مختلف به برنامه وارد شدند (جدول ۱) و با استفاده از آرایه متعامد L-16، شانزده تیمار مختلف طراحی و به اجرا در آمد. مقایسه میانگین ها به روش ANOVA با استفاده از نرم افزار Qualitek-4 انجام پذیرفت و سطح معنی داری ۰/۰۱ درصد برای بررسی اختلاف ها در نظر گرفته شد.

ح) اثبات تولید ترکیبات رنگی جدید با استفاده از طیف سنجی اشعه ماورای بنفش (اسپکتروفوتومتر UV/Vis): این روش برای اولین بار برای سنجش تولید ترکیبات جدید در محیط کشت زاپک مورد استفاده قرار گرفت. طیف ایجاد شده به وسیله عصاره های قارچی کشت یافته ترسیم شد و ایجاد قله های جدید در طیف نور ماورای بنفش نسبت به طیف ایجاد شده به وسیله محیط کشت زاپک استریل بررسی گردید.

یافته‌ها

الف) غربالگری سویه های منتخب تولید کننده ترکیبات آنتی اکسیدان: بهترین جدایه ها از لحاظ توانایی احیای رادیکال های آزاد DPPH شناسایی گردیدند که در جدول ۲ نشان داده شده است.

مقایسه نتایج با آزمون t استاندارد نشان داد که دو جدایه *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی شده از خاک مناطق کشاورزی اطراف ذوب آهن و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداسازی شده از

جدول ۲: میزان احیای رادیکال های آزاد DPPH توسط هر جدایه و سویه.

نمونه	میانگین میزان احیا (درصد) ± انحراف معیار
آسپرژیلوس نایجر PTCC ۵۰۱۲	۹۳/۵۳± ۳/۰۳
آسپرژیلوس نایجر *	۱۷/۷۸± ۰/۷۷
آسپرژیلوس نایجر #	۳۵/٦۷± ۲/٦۱
آسپرژیلوس فلاووس	۲٤/٦۲± ٤/٤۸
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۷۵/۰۲± ۱
آسپرژیلوس اوریزیه PTCC ۵۱٦۳	۵۵/۰۵± ۲/۰۱
آسپرژیلوس اواموری PTCC ۵۰۹۷	۰/۰۰
آسپرژیلوس ترئوس PTCC ۵۲٦۷	٤۳/۷۱± ۳/٤
موکور	۳۹/٦٤± ۳/۷
اسکوپولاریوپسیس	۰/۰۰

*آسپرژیلوس نایجر جداسازی شده از خاک اطراف کارخانه ذوب آهن، #آسپرژیلوس نایجر جداسازی شده از خاک گلخانه

جدول ۳: نتایج کلی فعالیت آنتی اکسیدانی سه قارچ منتخب.

روش ها	*آسپرژیلوس نایجر*	*آسپرژیلوس فومیگاتوس*	*آسپرژیلوس ترئوس*
IC50 (mg/ml)	۲/۳۵۵ ±۰/۰۵	۲/٤٥٤ ±۰/۰۹	۲/٥٤١ ±۰/۰۳
فنل تام (mg/ml)	٥/۹۰٤ ±۰/۰۱	٥/۱٤٤ ±۰/۰٦	۳/٦٥٥ ±٤/۰٤
احیاءکنندگی آهن (mg/ml)	۲/۳۸۸ ±۰/۰۸	۰/۳٤ ±۰/۰٤	۱/۱٦٤ ±۰/۰٦
ترکیبات فلاونوئیدی (mg/ml)	۰/۱۲ ±۰/۰۱	۰/٤۱ ±۰/۰٤	۰/۲۱ ±۰/۰٦

خاک گلخانه و یک سویه *آسپرژیلوس ترئوس* خریداری شده از کلکسیون با PTCC ٥۲٦۷ توانستند با اختلاف معنی داری ($p< ۰/۰٥$) بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدان را تولید نمایند. به این ترتیب این سه قارچ برای سنجش در مراحل بعدی مورد بررسی قرارگرفتند.

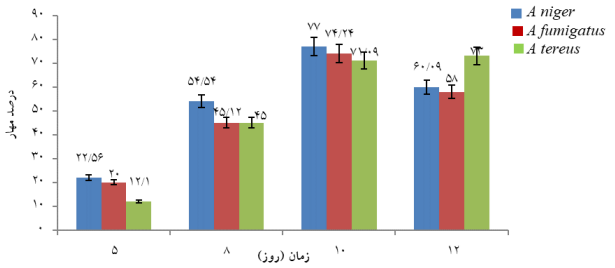
ب) ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی سه جدایه منتخب: مقایسه IC_{50} بدست آمده برای سه عصاره قارچی با IC_{50} نمونه استاندارد BHT نشان داد که عصاره قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در مقایسه با عصاره های دو قارچ دیگر دارای قدرت احیای رادیکال آزاد بیشتری می باشد. بیشترین میزان فنل تام برابر ٥/۹۰٤ میلی گرم در میلی لیتر عصاره مربوط به عصاره قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و کمترین مقدار مربوط به عصاره قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* (۳/٦٥٥ میلی گرم در میلی لیتر عصاره) می باشد. نتایج نشان داد که میزان فنل تام در عصاره با گذشت زمان و با نگه داری طولانی مدت، کاهش می یابد. نتایج بررسی میزان فنل تام موجود در عصاره ها، به طور کامل با آزمون ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره به روش DPPH هم خوانی داشت. بیشترین میزان احیای آهن برابر ۲/۳۸۸ میلی گرم BHT در گرم عصاره مربوط به عصاره قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و کمترین مقدار مربوط به عصاره قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود. بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی برابر ۰/٤۱ میلی گرم کوئرستین در میلی لیتر عصاره مربوط به عصاره قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و کمترین مقدار مربوط به عصاره قارچ *آسپرژیلوس نایجر* محاسبه گردید.

نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی به روش احیای DPPH، فنل تام، ترکیبات فلاونوئیدی و احیاکنندگی رادیکال آهن آنتی اکسیدانی سه قارچ منتخب در جدول ۳ نشان داده شده است.

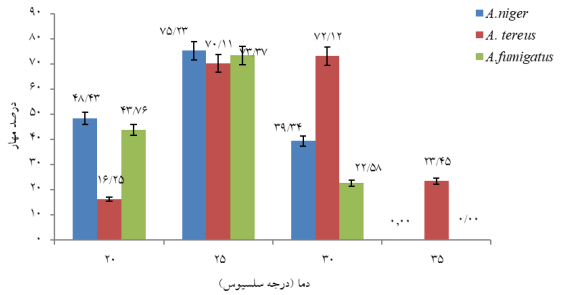
مقایسه نتایج با آزمون t استاندارد با سطح معنی داری ۰/۰٥ نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان احیای DPPH توسط سه قارچ منتخب وجود ندارد. اما تولید فنل تام توسط *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به طور معنی داری از تولید آن توسط *آسپرژیلوس ترئوس* بیشتر بود. میزان احیا کنندگی آهن توسط هر ۳ قارچ اختلاف معنی داری داشتند و بیشترین مقدار آن متعلق به *آسپرژیلوس نایجر* و کمترین مقدار آن متعلق به *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود. همچنین میزان تولید فلاونوئید توسط هر ۳ قارچ اختلاف معنی داری نشان داد و بیشترین مقدار آن مربوط به *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و کمترین مقدار آن متعلق به *آسپرژیلوس نایجر* بود.

ج) بهینه سازی به روش تک فاکتوری: برای انجام بهینه سازی با روش تاگوچی باید زمان مناسب برای تولید قارچ ها تعیین گردد و بر اساس آن بهینه سازی انجام شود. به همین منظور پس از تلقیح قارچ به محیط زاپک و گرمخانه گذاری در دمای ۲٥ درجه سلسیوس مقدار میانگین تولید ترکیبات آنتی اکسیدان پس از گذشت ۱۲، ۱۰، ۸ و ٥ روز پس از تلقیح هر قارچ بررسی شد و مشخص شد بیشترین تولید در مورد دو قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۱۰ روز و در مورد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* ۱۲ روز پس از گرمخانه گذاری قارچ ها در محیط کشت تولید ترکیبات آنتی اکسیدان می باشد. در بهینه سازی دما مشخص شد بیشترین تولید در مورد دو قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در دمای ۲٥ درجه سلسیوس و در مورد قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود. در بهینه سازی pH، بهترین pH برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط سه جدایه انتخابی، ۷-٥ pH تشخیص داده شد. میزان تولید ترکیبات توسط هر جدایه در شرایط ثابت و استفاده از شیکر آزمایش گردید و نشان داد که در شرایط ثابت و بدون استفاده از لرزاننده، میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در هر سه جدایه بیشتر می باشد. بنابراین این فاکتور در محاسبات تاگوچی حذف گردید.

با بررسی میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان به صورت خشک و مایع با روش DPPH، مشخص شد میزان تولید ترکیبات



شکل ۱: بهینه زمان مناسب تولید ترکیبات آنتی اکسیدان بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH.



شکل ۲: مقایسه فعالیت قارچی در دماهای مختلف برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH.

آنتی اکسیدان در هر سه جدایه در حالت مایع بیشتر می باشد. بنابراین این فاکتور در محاسبات تاگوچی حذف گردید. در شکل ۱ زمان مناسب برای بهینه سازی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط قارچ های منتخب با یکدیگر مقایسه شده است.

در شکل ۲ دماهای مختلف برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط قارچ های منتخب با یکدیگر مقایسه شده است.

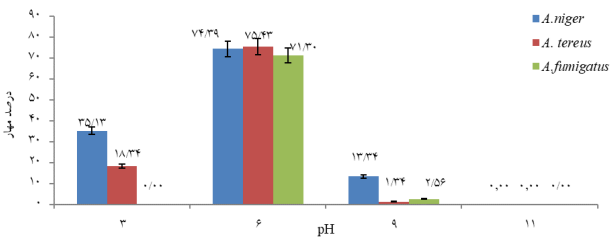
در شکل ۳ میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در هر pH توسط قارچ های منتخب با یکدیگر مقایسه شده است.

در شکل ٤ میزان تولید ترکیبات را توسط هر جدایه در شرایط ثابت و استفاده از شیکر با یکدیگر مقایسه شده است.

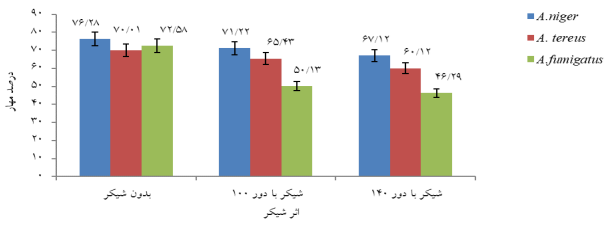
در شکل ۵ میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط هر جدایه به صورت خشک و مایع با روش DPPH با یکدیگر مقایسه شده است.

د) نتایج بهینه سازی با استفاده از روش فاکتوریل جزئی (تاگوچی): بالاترین نتایج به دست آمده از آزمایش های ۱٦ تیمار مختلف طراحی شده با نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان از نظر دما، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن بر اساس درصد احیای رادیکال آزاد DPPH برای ۳ قارچ منتخب در جدول ۵ مشاهده می شود. مقایسه میانگین ها با آزمون t در سطح معنی داری ۰/۰۵ اختلاف معنی داری میان میزان احیای رادیکال آزاد DPPH توسط ۳ قارچ نشان نداد.

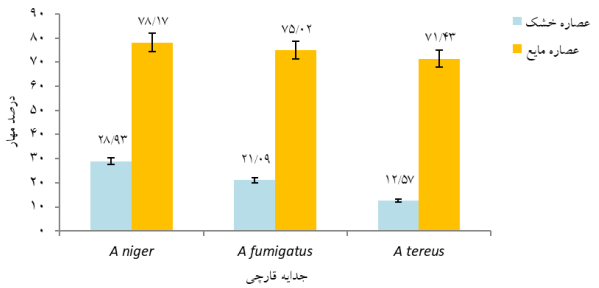
ه) تحلیل نتایج بهینه سازی ترکیبات آنتی اکسیدان: آنالیز واریانس ها در مورد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی شده از خاک مناطق کشاورزی اطراف کارخانه ذوب آهن نشان داد که معنی دارترین اثر در ایجاد تغییر در مقدار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مربوط به میزان pH با سهم ۳۸/۳۰ درصد و سپس مربوط به منبع کربن با سهم ۳٤/۹۲۵ درصد می باشد و تغییرات دما در دامنه مطالعه شده تأثیر کمی (٤/۵۸۵ درصد) در تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* دارد. آنالیز واریانس ها در مورد قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداسازی شده از خاک گلخانه نشان داد که معنی دارترین اثر در ایجاد تغییر در مقدار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مربوط به نوع منبع کربن با سهم ۵۲/۵٤۷ درصد و سپس مربوط به دما با سهم ۱۹/۷۸۸ درصد می باشد و تغییرات pH در دامنه مطالعه شده تأثیر کمی (۹/۷۸۲ درصد) در تولید ترکیبات آنتی اکسیدان



شکل ۳: میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در گستره های مختلف pH بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH.



شکل ۴: میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در شرایط ثابت و استفاده از شیکر بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH.



شکل ۵: مقایسه میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان به صورت خشک و مایع بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH.

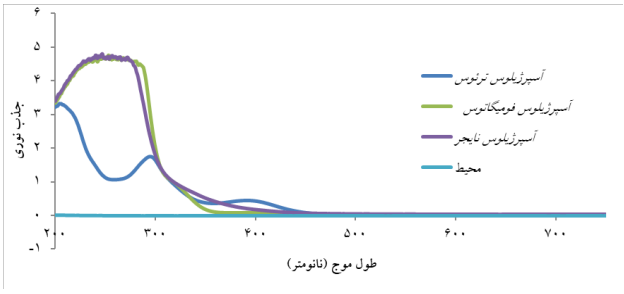
از قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* داشت. آنالیز واریانس ها در مورد سویه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ۵۲۶۷ نشان داد که معنی دارترین اثر در ایجاد تغییر در مقدار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مربوط دما با سهم ۴۰/۳۱۹ درصد و سپس مربوط به منبع کربن با سهم ۲۶/۰۶۷ درصد می باشد و تغییرات pH در دامنه مورد مطالعه تأثیر کمی (۱۲/۳۸۲ درصد) در تولید ترکیبات آنتی اکسیدان از قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* نشان داد.

و) تعامل بین فاکتورهای آزمون در سه قارچ منتخب: با توجه به تعامل بین فاکتورها در آزمون تاگوچی مربوط به جدایه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* مشخص شد که بیشترین میزان تعامل مربوط به میزان میان کنش بین دما و منبع کربن با میزان ۴۰/۴۷ درصد است و کمترین تعامل مربوط به میان کنش تعامل بین فاکتور pH و دما با میزان ۳/۰۵ درصد می باشد. با توجه به تعامل بین فاکتورها در آزمون تاگوچی مربوط به جدایه قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مشخص شد بیشترین میزان تعامل

جدول ٤: تعیین بهترین شرایط تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط هر قارچ با استفاده از نرم افزار تاگوچی.

قارچ	دما (°C)	pH	نوع منبع کربن	نوع منبع نیتروژن	درصد احیای رادیکال آزاد DPPH
آسپرژیلوس نایجر	۲۷	٦	ساکارز	نیترات سدیم	۷۸/۷۱ ±۱/۰٦
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۲۷	٦	ساکارز	نیترات سدیم	۷۱/۲۰ ±۳/۰۱
آسپرژیلوس ترئوس	۲۵	۷	ساکارز	عصاره مخمر	۷۰/۱۲ ±۳/۷٤
آسپرژیلوس ترئوس	۲۷	٦	ساکارز	نیترات سدیم	۷۱/۱۲ ±۳/٤٦

نتایج میانگین سه تکرار



شکل ٦: نمودار طیف سنجی اشعه ماورای بنفش.

مربوط به میزان میان کنش بین pH و منبع نیتروژن با میزان ۳۸/۵ درصد است و کمترین تعامل مربوط به میان کنش تعامل بین فاکتور منبع کربن و منبع نیتروژن با میزان ۲/۷۳ درصد می باشد. با توجه به تعامل بین فاکتورها در آزمون تاگوچی مربوط به سویه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ۵۲۶۷ مشخص شد که بیشترین میزان تعامل مربوط به میزان میان کنش بین منبع کربن و منبع نیتروژن با میزان ۵۷/۷۱ درصد است و کمترین تعامل مربوط به میان کنش تعامل بین فاکتور دما و منبع نیتروژن با میزان ۰/۵۲ درصد می باشد.

ز) پیش بینی شرایط بهینه شده توسط روش آماری تاگوچی در سه قارچ منتخب: با توجه به داده های به دست آمده در نرم افزار تاگوچی برای تولید بهینه ترکیبات آنتی اکسیدان توسط جدایه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* معادل ۹٤/۷۹ درصد، برای جدایه قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* معادل ۸۳/٦۱ درصد و برای سویه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ۵۲٦۷ معادل ۸۷/۳٤ درصد پیش بینی گردید. اما تولید واقعی ترکیبات آنتی اکسیدان در این شرایط منتج به اخذ ترکیباتی با خاصیت آنتی اکسیدانی به میزان ۸۹/۱۹ درصد توسط جدایه قارچی *آسپرژیلوس نایجر*، ۸۰/۱۹ درصد برای جدایه قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و ۸۲/۱۹ درصد برای سویه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC۵۲٦۷ گردید که همه نتایج در فاصله کمی از نتایج پیش بینی شده قرار دارند و اختلاف معنی داری بین میزان تولید پیش بینی شده توسط نرم افزار تاگوچی و میزان تولید شده در آزمایش ها مشاهده نشد ($p<0/05$).

ح) نتایج طیف سنجی اشعه ماورای بنفش (اسپکتروفوتومتر UV/Vis): با استفاده از تکنیک طیف سنجی اشعه ماورای بنفش،

تولید ترکیبات رنگی جدید در عصاره هر ۳ قارچ اثبات گردید. بیشترین جذب در طول موج ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر بود. برای هر سه عصاره محدوده طول موج که در آن بیشترین جذب مشاهده شد مشابه بوده است و این طیف در محیط کشت زاپک وجود ندارد و همین نشان دهنده تولید ترکیبی جدید به صورت آزاد شده در محیط کشت توسط قارچ های مورد بررسی می باشد. شکل ٦ نتایج حاصل از طیف سنجی اشعه ماوراء بنفش را در سه عصاره قارچی بررسی شده نشان می دهد.

بحث

در تحقیق حاضر، شش جدایه قارچی *آسپرژیلوس* جداسازی شده از خاک و چهار سویه کلکسیونی از سویه های مورد استفاده در صنایع غذایی و بهداشتی بودند، از نظر تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مورد مقایسه قرار گرفتند. جدایه های قارچی مورد بررسی برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان از مناطق صنعتی و کارگاهی مانند زمین های کشاورزی اطراف ذوب آهن، گلخانه های اطراف فولاد مبارکه و کارگاه مسگری جداسازی گردیدند. با خشکاندن عصاره های قارچی، شاهد کاهش فعالیت این ترکیبات تا ٦٠ درصد بودیم. این مسأله نشان می دهد ترکیبات آنتی اکسیدان تولید شده، احتمالاً ترکیباتی فرار می باشند. رادیکال DPPH تشابه کمی به رادیکال پراکسی دارد اما به دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولاً این روش برای بررسی مقدار آنتی اکسیدان استفاده می شود (١٢).

غربالگری و سنجش اولیه تولید ترکیبات آنتی اکسیدان بر اساس میزان احیای رادیکال DPPH نشان داد دو جدایه *آسپرژیلوس نایجر* (٧٨/١٧ درصد) و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (٧٥/٠٢ درصد) و سویه *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ٥٢٦٧ (٧١/٤٣ درصد) بیشترین میزان تولید را دارند. سپس این سه قارچ از نظر تولید میزان فنل تام، میزان احیای رادیکال آهن و میزان فلاونوئید مورد سنجش قرار گرفتند. جدایه *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به جدایه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و سویه *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ٥٢٦٧، بیشترین میزان ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت احیای آهن را داشتند. اغلب با افزایش ترکیبات فنل تام خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر می شود. ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد (تانن ها) توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکا ل های آزاد را دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه های آروماتیکی و ماهیت گرو ه های جا به جا شونده هیدروکسیل دارد (٢٤). در پژوهش حاضر، پس از دریافت شرایط پیشنهادی نرم افزار تاگوچی و انجام آزمایش ها، میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان ١٠ تا ١٥درصد افزایش یافت. به این ترتیب که مقادیر احیای رادیکال آزاد DPPH در *آسپرژیلوس نایجر* از ٧٨ درصد به ٨٩ درصد، در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از ٧٤ درصد به ٨٠ درصد، و در *آسپرژیلوس ترئوس* از ٧٢ درصد به ٨٢ درصد افزایش یافت. سرستو و فراندیز (Cerecetto and Ferrandiz) در سال ٢٠١١ با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداسازی شده از خاک، ترکیب فنلی تولید کردند. در این پژوهش با روش فولین سیوکالتو مقدار فنل تام عصاره برابر ٥/٦٨ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد (١٤). در سال ٢٠١٢ دوی (Dewi) و همکاران نشان دادند که قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* جداسازی شده از خاک، توانایی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان را دارند. این قارچ ترکیباتی با نام ترییک اسید و ترموتین با قابلیت ٧٠ درصد احیای رادیکال آزاد DPPH را تولید می کرد (٢٥).

در سال ٢٠١٦ ماتئو (Mathew) و همکاران توانستند از قارچ *آسپرژیلوس سودودفلکتوس* جداشده از خاک، نانو ذره نقره تولید کنند و اثر آنتی اکسیدانی این نانوذره تولید شده را اثبات کنند. آن ها برای اثبات اثر آنتی اکسیدانی این ترکیب از DPPH استفاده کردند. در بیشترین میزان غلظت، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد رادیکالی برابر یا ٨٢/١٨ درصد گزارش گردید (٢٦). در سال ٢٠١٤ ابوالمجد (Abo-Elmagd) با استفاده از قارچ *کائتومیوم مادراسنس* AUMC 9376 ترکیبات آنتی اکسیدان تولید کرد و این تولید را بهینه سازی نمود. در این پژوهش عوامل زمان، دما، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن به روش تک فاکتوری بهینه سازی شد. بهترین شرایط برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در روز پانزدهم، دمای ٢٥ درجه سلسیوس، pH ٦ گلوکز به عنوان منبع کربن و نیترات سدیم به عنوان منبع

نیتروژن تعیین گردید و پس از انجام آزمون در این شرایط، میزان احیای رادیکال آزاد DPPH، ٦٤ درصد گزارش گردید (۲۷). در سال ۲۰۱۷ ناگدا (Nagda) و همکاران از جدایه های *آسپرژیلوس* جداسازی شده از گیاه *کالوتروپیس پروسرا* در محیط کشت PDB ترکیبات آنتی اکسیدان تولید کردند. میزان احیای رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره متانولی این قارچ برابر با ۸۰ درصد، میزان فنل تام برابر با ۱۲ میکروگرم در میلی گرم و میزان فلانوئید برابر با ۱۳۰ میکروگرم در میلی گرم عصاره، گزارش گردید (۲۸).

در روش طراحی آزمایش تاگوچی از تحلیل واریانس (ANOVA) به عنوان ابزار تصمیم گیری برای تعیین میزان تغییر در میانگین گروه های مورد آزمایش استفاده می شود. تحلیل واریانس عموماً در طراحی آزمون ها بهترین سطح را مشخص نمی کند، اما فاکتورهایی که میانگین نتایج آن ها با تغییر سطوح، تغییر می کند را مشخص می کند (۱۹ و ۲۱). آنالیز واریانس در مورد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی شده از خاک مناطق کشاورزی اطراف کارخانه ذوب آهن نشان داد که معنی دارترین اثر در ایجاد تغییر در مقدار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مربوط به میزان pH با سهم ۳۸/۳۰ درصد و سپس مربوط به منبع کربن با سهم ۳٤/۹۲۵ درصد می باشد و تغییرات دما در دامنه موردمطالعه تأثیر کمی (٤/۵۸۵ درصد) در تولید ترکیبات آنتی اکسیدان از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* دارد. آنالیز واریانس در مورد قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداشده از خاک گلخانه نشان داد که معنی دارترین اثر در ایجاد تغییر در مقدار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مربوط به نوع منبع کربن (۵۲/۵٤۷ درصد) و سپس مربوط به دما با (۱۹/۷۸۸ درصد) می باشد و تغییرات pH در دامنه مورد مطالعه تأثیر کمی (۹/۷۸۲ درصد) در تولید ترکیبات آنتی اکسیدان از قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* دارد. آنالیز واریانس در مورد سویه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* با PTCC ۵۲٦۷ خریداری شده از کلکسیون کشت میکروبی نشان داد که معنی دارترین اثر در ایجاد تغییر در مقدار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان مربوط دما (٤۰/۳۱۹ درصد) و سپس مربوط به منبع کربن (۲٦/۰٦۷ درصد) می باشد و تغییرات pH در دامنه مطالعه شده تأثیر کمی (۱۲/۳۸۲ درصد) در تولید ترکیبات آنتی اکسیدان از قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* دارد. همچنین، با بررسی تأثیرات متقابل بین دو عامل مختلف می توان نتیجه گرفت که آیا اثر یک عامل در فرایندهای بهینه سازی بستگی به شرایط عامل های دیگر دارد یا خیر. این بخش توانایی های متفاوت تاگوچی را در زمینه بهینه سازی نشان می دهد. زمانی که این تعامل بین فاکتورها انجام شد و نسبت به میزان تولید ترکیبات آنتی اکسیدان محاسبه گردید، در مجموع شش میان کنش مشاهده شد که بالاترین میزان میان کنش در جدایه قارچی *آسپرژیلوس نایجر*، بین منبع کربن و دما (٤۰/٤۷ درصد)، در جدایه قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بین pH ومنبع نیتروژن (۳۸/۵ درصد) و در سویه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* PTCC ۵۲٦۷، بین منبع کربن و منبع نیتروژن (۵۷/۷۱ درصد) شناسایی شد. کمترین میان کنش در جدایه *آسپرژیلوس نایجر*، مربوط به pH و دما (۱۳/٦۳ درصد) در جدایه قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بین منبع کربن و منبع نیتروژن (۳/۰۵ درصد) و در جدایه قارچی *آسپرژیلوس ترئوس* بین منبع نیتروزن و دما (۰/۵۲ درصد) شناسایی گردید. این مطلب نشان می دهد که تأثیر هر یک از فاکتورها بر تولید ترکیبات آنتی اکسیدان وابسته به شرایط سایر فاکتورها در بهینه سازی ترکیبات آنتی اکسیدان در جدایه های مختلف قارچ *آسپرژیلوس* می باشد.

سویه های *آسپرژیلوس* از جمله توانمندترین میکروارگانیسم های مولد آنتی اکسیدانت ها شناخته شده اند. به عنوان نمونه در پژوهشی سرستو و فراندیز در سال ۲۰۱۱ با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداسازی شده از خاک، ترکیب فنلی تولید کردند که رادیکال آزاد DPPH را به میزان ۵۰/۲ درصد احیا می نمود (۱٤). در پژوهش دیگری که توسط الاسر و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد از قارچ *آسپرژیلوس کاندیدیوس* جداسازی شده از خاک، ترکیبی آنتی اکسیدان با ساختار شیمیایی دی هیدروکسی متیل پیرانون تولید شد. این ترکیب خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد هرپسی نیز داشت که قابل مقایسه با آنتی بیوتیک های

سیپروفلوکساسین، فلوکونازول، آلفاتوکوفرول و داروی ضد ویروسی آسیکلوویر بود. میزان احیای رادیکال آزاد ترکیب شناسایی شده با روش DPPH سنجش شد و برابر با ۸۳/۱ درصد به دست آمد (۲۹).

جدایه *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی شده در بررسی حاضر علاوه بر تولید قابل توجه ترکیبات آنتی اکسیدان نسبت به دو قارچ دیگر دارای سازگاری و تحمل بالایی نسبت به شرایط محیطی بود. عوامل زیادی در توجیه سازگاری نقش دارد که از آن جمله می توان به توانایی ژنتیکی سویه، شرایط اقلیمی، نوع آب و هوا، نوع خاک، میزان ارتفاع و سازگاری های محیطی را نام برد که همه این موارد می تواند نقش بسیار مهمی بر میزان بیان ژن های میکروارگانیسم ها و سایر موجودات زنده داشته باشند (۱).

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر مشخص گردید جدایه های قارچ *آسپرژیلوس* توانایی تولید ترکیبات آنتی اکسیدان را به میزان بالایی دارند. بنابراین پیشنهاد می شود برای استفاده از منابع طبیعی غیر از گیاهان و با هدف جایگزین کردن منابع بیولوژیک به جای مواد و ترکیبات شیمیایی مضر، می توان از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان در صنایع غذایی و بهداشتی استفاده نمود؛ همان طور که سویه های دیگر این قارچ هم اکنون در صنایع غذایی برای تولید بسیاری از آنزیم ها و داروها استفاده می شوند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان از طریق در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی انجام شده است که بدین وسیله از رئیس و معاون پژوهشی این دانشگاه سپاس گذاری می گردد.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Alaei A, Hamedi J, Panah Mohammadi F, Motaed Mohammadi S, Rezayat M. Evaluation of antioxidant activity and thyroid toxicology of native actinomites of Iran. J Cell Biol Mol. 2014; 5(19): 9-19 [In Persian].
2. Gupta C, Prakash D, Gupta S. Natural useful therapeutic products from microbes. J Microbiol Exper. 2014; 1(1): 1-9.
3. Shariat Zadeh M, Dezfoulian A, Fanny A, Maleki rad A. Free radicals and antioxidants. Tehran. Aeez publications; 2007 [In Persian].
4. Malpure P, Shah A, Juvekar A. Antioxidant and anti-inflammatory activity of extract obtained from *Aspergillus candidus* MTCC 2202 broth filtrate. Ind J Exp Biol. 2006; 44(6): 468- 473.
5. Chandra P, Arora D. Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. Braz J Microbiol. 2010; 41(3): 765-777.

6. Sun T, Powers J, Tang J. Loss of rutin and antioxidant activity of *Asparagus* juice caused by a pectolytic enzyme preparation from *Aspergillus niger*. Food Chem. 2007; 115(1): 173-178.

7. Yadav M, Yadav A, Yadav J. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7(1): 256- 261.

8. Hosseini S, qrachorelo M, Tarzi ghiasi B, ghavami M. A review on the methods of determination of antioxidant capacity. Food Sci Nutr. 2014; 4(11): 84-110 [In Persian].

9. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J. Frisvad C, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson R. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Stud Mycol. 2007; 59(7): 53-66.

10. Blainski A, Lopes G, Palazzo J. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense*. Molecules. 2013; 18 (6): 6852-6865.

11. Mariken J, Haenen , Hans J, Voss P , Bast A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) Assay. Food Chem Toxicol. 2004; 42(1): 45-49.

12. Chen Q, Chen J, Du H, Li Q, Chen J, Zhang G, Liu H, Wang H. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from the pulp of *Elaeagnus angustifolia*. Int J Mol Sci. 2014; 15(7): 11446-11455.

13. Akhavan sepahi A, farahani S. 2014. Soil microbiology. Tehran. Etminan publishing; 1972. [In Persian].

14. Cerecetto H, Ferrandiz M. Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*. ISRN Pharmacol. 2011; 2011(2011): 67-78.

15. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999; 299(1): 152-178.

16. Hamed S, Mahamoud M, Sayed E, Hamed S. Scavenging activity of secondary metabolites extracted from food borne fungi. J Chem Pharm. 2016; 8(3): 600-604.

17. Beketov E, Pakhomov V, Nesterova O. Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. Pharm Chem J. 2005; 39(6): 316-318.

18. Chandra P, Arora D. Antioxidant potential of fungal isolates assayed through various procedures, screening of functional compounds and their purification from *Aspergillus terreus*.

J Microbiol Biotechnol. 2014; 4(3): 15-24.

19. Malakut Tabaris, Gorbani M, Sahaiyan Sh, Musa Zadeh. Comparison of antioxidant and phytochemical properties of *Tramethes gibosa*. J Cell Biol Mol Sci. 2012; 3 (10): 73-79 [In Persian].

20. Ramanathan K, Karthick H, ArunH. Structure based drug designing for diabetes mellitus. Proteomics J. 2010; 3(11): 310-313.

21. Arora D, Singh C. Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under varius physio-chemical conditions. Braz J Microbiol. 2010; 4(3): 1-13.

22. Luis M, De la M, Marie T, Pezzlo E. Color atlas of diagnostic microbiology. US Midwestrn states. The University of Michigan; 1997.

23. Mefton S. 1971. Laboratory evaluation of compounds and antioxidant effects of essential oil of cinnamon. M. Sc. Islamic Azad University of Damghan.

24. Lagouri V, Boskou D. Nutrient antioxidants in oregano Int J Food Sci Nutr. 1996; 47(6): 493-497.

25. Dewi D, Tachibana S, Itoh K, Ilyas M. Isolation of antioxidant compounds from *Aspergillus terreus* LS01. Microbiol and Biotech J. 2012; 4(1): 10-14.

26. Mathew J, Rathod V, Singh D, Kumar Singh A, Kulkarni P. Antioxidant potential of AgNps from the fungus *Aspergillus pseudodeflectus* by DPPH radical scavenging assay. Int J Pharm Pharm Sci. 2016; 6(1): 6-11.

27. Abo-Elmagd H. Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. Gen Engin and Biotechnol J. 2014; (12): 21-26.

28. Nagda V, Gajbhiye A, Kumar D. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Calotropis procera* for their antioxidant activity. Asian J Pharm Clin Res. 2017; 10(3): 254- 258.

29. Elaasser M, Abdel-Aziz M, El-Kassas R. Antioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor activities of pyranone derivative obtained from *Aspergillus candidus*. Microbiol Biotech Res J. 2011; 1(6): 5-17.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 3, September 2019

Original Article

Comparison and optimization of antioxidant compounds produced by autochthonous and allochthonous *Aspergillus* strains

Fatemeh Moshki[1], Nafiseh Sadat Naghavi[2], Masoud Fooladgar[3]

[1]M.Sc. student, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Basic Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Antioxidants reduce the risk of cardiovascular diseases, and stroke and prevent the development of cancer by neutralizing free radicals. The present study aimed to produce and optimize the production of antioxidant compounds by *Aspergillus* strains.

Materials & Methods: Fungi samples were collected from different regions of Isfahan province or obtained from the Persian Type Culture Collection. Purified fungi samples were inoculated to the Czapek medium to produce antioxidant compounds. Screening and comparison of antioxidant properties of the selected strains were carried out using four assays including free DPPH (Diphenyl pycryle-Hydrazyl) radical reduction, iron radical recovery, and total phenol content and flavonoid content assays. Fungi antioxidant activity was optimized in terms of pH, temperature, and type of carbon and nitrogen sources by single factor and detailed factorial (Taguchi) designed experiments.

Results: The highest antioxidant activity was observed in *Aspergillus niger* isolated from the soil of the Iron melting factory and the highest amount of flavonoid content was shown by *Aspergillus fumigatus* isolated from greenhouse soil. DPPH radical reduction rate by *Aspergillus niger* was 89.9% in the optimum condition (pH 6, the temperature of 25°C, sucrose as carbon source and potassium nitrate as nitrogen source). Optimization by Taguchi designed experiments resulted in a 10-15 percent increase in antioxidant compounds production.

Conclusion: Autochthonous isolated fungi had high potential to produce antioxidant compounds and can be proposed to related industries.

Keywords: Antioxidant, *Aspergillus*, Screening, Optimization.

Correspondence to: Nafiseh Sadat Naghavi

Tel: +98 3137420134

E-mail: naghavi@siaufala.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(3): 239-251.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.