

اثر pH و دما روی رشد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید در ریزجلبک *Scenedesmus sp.*

پریچهر حناچی^{*}، آسیه آقابابائی^۱ و مصطفی نوروزی^۱

۱- دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه الزهرا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۸

چکیده

ریزجلبک‌ها یکی از منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با کاربردهای مختلف در صنایع غذایی و دارویی هستند. در این پژوهش، اثر دما (۳۳، ۲۸، ۲۳ درجه سانتیگراد) و pH (۵، ۷، ۸، ۹) روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و میزان ترکیبات رنگی در ریزجلبک *Scenedesmus sp.* مورد مطالعه قرار گرفت. شرایط محیطی برای کلیه تیمارها ۱۲:۱۲ نور: تاریکی، هوادهی مداوم و مدت زمان تیمار ۱۶ روز در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که، بهترین شرایط برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید فلاونوئید در pH بالا (۸ و ۹) و دمای پایین (۲۳ درجه سانتیگراد) روی می‌دهد. در رابطه با محتوای فنلی، نتایج حاکی از آن است که دما نقش مؤثرتری را نسبت به pH در افزایش معنادار (P<0.05) محتوای فنلی (۷.۵۳ ± ۰.۰۶ mg GAE /g DW) بازی می‌کند، و pH باعث کاهش معنادار (P<0.05) محتوای فنلی نسبت به کنترل گردید. همچنین، استرس pH و دما نتوانستند بر میزان کلروفیل b تأثیر بگذارند. اما به طور کلی، نتایج گویای این مطلب بود که تیمار pH و دما می‌تواند بر تولیدات آنتی‌اکسیدان در ریزجلبک *Scenedesmus sp.* مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: ریزجلبک، FRAP، ترکیبات فنلی، فلاونوئید.

۱. مقدمه

می‌دهد، که باعث نگرانی‌های جهانی در مورد ایمنی و سمیت آن‌ها شده است (Shetty & Sibi, 2015). بنابراین علاقه جهانی در سراسر جهان، یافتن آنتی‌اکسیدان‌های جدید، ایمن و قوی از منابع طبیعی است. تا با بکارگیری این آنتی‌اکسیدان‌ها آسیب‌های اکسیداتیو به سلول‌های زنده را به حداقل رساند و از تشدید اکسیداتیو در محصولات تجاری، مانند مواد غذایی، داروها و لوازم آرایشی جلوگیری کرد (Maadane et al., 2015). زیست توده ریز جلبک‌ها یا ترکیبات استخراج شده از آن‌ها، با انواع مختلفی از اثرات فیزیولوژیکی و دارویی به عنوان یک جایگزین شگفت‌انگیز برای تامین نیازهای روزافزون آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع غذایی، دارویی و سایر صنایع مرتبط به شمار می‌روند (Morovat and Ghasemi, 2016). از جمله این ریز جلبک‌ها می‌توان به ریز جلبک *Scenedesmus sp.* اشاره کرد که یک میکروارگانیسم ساکن دریاچه‌های آب شیرین و رودخانه‌ها است (Guedes et al., 2011). از مزیت‌های این ریز جلبک می‌توان به رشد سریع، مقاومت بالا در آلودگی و مدیریت آسان آن، در کشت داخل آزمایشگاه اشاره کرد (Aremu et al., 2014; Guedes et al., 2011). همچنین این ریز جلبک به دلیل تأثیرات دارویی فراوان، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی است. مدت زمان کشت یکی از فاکتورهای تأثیرگذار روی محتوای فیتوشیمی این ریز جلبک محسوب می‌گردد (Aremu et al., 2014). با توجه به مطالعات صورت گرفته، شدت نور، و دما از عوامل ضروری و از جمله فاکتورهای کلیدی مؤثر در فعالیت فتوسنتزی و در نتیجه تولید یست توده و تولید ترکیبات ثانویه در جلبک‌ها محسوب می‌شوند (Breuer et al., 2013; Cabello et al., 2015). بنابراین، در مطالعه حاضر اثرات تغییرات pH و دما بر رشد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنلی و فلاونوئیدی و رنگدانه‌های فتوسنتزی در ریز جلبک *Scenedesmus sp.* بررسی شد.

جلبک‌ها جزء قدیمی‌ترین جانداران روی زمین به شمار می‌روند. امکان کشت ریز جلبک‌ها در محیط‌های مختلف مانند دریا و زمین‌های لم‌بزرع وجود دارد (Maadane et al., 2015; Safafar et al., 2015). ریز جلبک‌ها به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده منبع سرشاری از ترکیبات ارزشمند از قبیل آنتی‌اکسیدان‌ها، رنگدانه‌ها، اسیدهای چرب اشباع نشده و ترکیبات فنلی هستند، که محققان توانسته‌اند این ترکیبات را در مقیاس‌های آزمایشگاهی و همچنین در فتوبیوراکتورها تولید کنند (Morovat and Ghasemi, 2016). ریز جلبک‌ها به دلیل تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و بی‌خطر، جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی محسوب می‌شوند. از این رو در سال‌های اخیر، ریز جلبک‌ها مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند. ریز جلبک‌ها با تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، خود قادرند پاسخ‌های سازگارانه به تنش‌های اکسیداتیو و رادیکال‌ها دهند. استرس‌های اکسیداتیو به علت تولید فرم‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد موجب بیماری‌های قلبی و عروقی، آترواسکلروز و سرطان می‌گردند (Shetty and Sibi, 2015). آنتی‌اکسیدان‌ها ماکرومولکول‌های بیولوژیکی هستند که از ارگانیسم‌ها و ترکیبات بیولوژیکی در برابر رادیکال‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Morovat and Ghasemi, 2016). آن‌ها از طریق تجزیه پراکسیدازها، و با پیشگیری از ادامه جذب هیدروژن این کار را انجام می‌دهند. امروزه مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها برای افزایش طول عمر انسان و بهبود کیفیت زندگی، توصیه می‌شود. شایع‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی که مورد استفاده قرار می‌گیرند، از قبیل: بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیل هیدروکسی آنیل (BHA)، هیدروکینون بوتیل (TBHQ) و پروپیل گالات هستند، که برای کاهش آسیب اکسیداتیو در بدن انسان، استفاده می‌شوند. با این وجود برخی مطالعات، سمیت و سرطان‌زایی آن‌ها را نشان

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه و کشت جلبک

استوک ریزجلبک *Scenedesmus* sp. از بخش آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی، واحد کشت جلبک، دانشگاه الزهرا (ع) تهیه گردید. جهت کشت ریزجلبک از محیط اختصاصی BBM استفاده شد (Bischoff, 1963; Bold, 1949). جهت اطمینان از خالص بودن ریزجلبک‌ها ابتدا *Scenedesmus* در محیط کشت جامد به روش پلیت آگار کشت داده شد، سپس ریزجلبک به محیط کشت مایع انتقال داده شد. پس از رسیدن ریزجلبک‌ها به مرحله لگاریتمی، آن‌ها به صورت پلکانی به حجم‌های بالاتر ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر منتقل شدند، و در هر بار انتقال ۱۰ درصد از حجم کل محیط به ریزجلبک‌ها اختصاص داده شد (به طور مثال برای تهیه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط BBM، ۹۰۰ میلی‌لیتر محیط بعلاوه ۱۰۰ میلی‌لیتر ریزجلبک). در تمامی این مراحل شرایط مناسب کشت، یعنی دما $2 \pm$ °C و ۲۵ درجه سانتیگراد دوره نوری ۱۲ ساعت روشنائی، ۱۲ ساعت تاریکی و نوردهی ۲۵۰۰ لوکس فراهم گردید. در نهایت برای کسب بیومس لازم جهت اعمال تیمارها، ریزجلبک‌ها به محیط ۲۰۰۰ میلی‌لیتر منتقل و در این مرحله عمل هوادهی از طریق پمپ مرکزی انجام شد. جهت جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی از طریق هوا از فیلترهای $0.2 \mu\text{m}$ میکرو متر در مسیر ورود هوا به داخل محیط ریزجلبک‌ها استفاده گردید.

۲.۲. طراحی شرایط اعمال تنش

تنش pH: بعد از تهیه ذخیره اولیه ریزجلبک به صورت انبوه، به منظور اعمال شرایط استرس‌زا pH، بدین ترتیب عمل شد که، سه pH مختلف 9 ± 0.2 ، 8 ± 0.2 ، 5 ± 0.2 به همراه کنترل که pH حدود ۶٫۸ تا ۷٫۲ را دارا است، به عنوان تنش در نظر گرفته شد. به این صورت که برای تهیه ۱٫۵ لیتر محیط کشت به همراه ریزجلبک (۱۳۵۰ میلی‌لیتر

محیط کشت BBM + ۱۵۰ میلی‌لیتر از بیومس ریزجلبک)، احتیاج به ۴ ارلن بزرگ دو لیتری یا بزرگتر از دو لیتر است، قبل از تلقیح ریزجلبک، محدوده pH را به کمک HCl و NaOH یک مولار با $0.2 \pm$ خطا، در زیر لامیناریفلو تحت شرایط استریل تنظیم گردید. غلظت اولیه ریزجلبک 4.7×10^5 cell/ml بود. شرایط محیطی آزمایش در دمای 20 ± 2 °C، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنائی، ۱۲ ساعت تاریکی و نوردهی ۲۵۰۰ لوکس و تحت هوادهی مداوم از طریق پمپ مرکزی (جهت جلوگیری از نفوذ آلودگی از فیلتر سرسرنگی $0.2 \mu\text{m}$ میکرونی استفاده شد) تنظیم شد. مدت زمان اعمال تنش برای تیمار، بر اساس بررسی‌های صورت گرفته ۱۶ روز در نظر گرفته شد.

۳.۲. تنش دما

سه ارلن حاوی ۱٫۵ لیتر محیط کشت BBM که ۱۰ درصد آن نیز ریزجلبک *Scenedesmus* sp. تشکیل می‌داد، در سه دمای مختلف 2 ± 23 ، 2 ± 28 ، 2 ± 33 درجه سانتیگراد تنظیم گردید. تنظیم دما 28 °C و 33 °C درجه سانتیگراد به کمک انکوباتور صورت پذیرفت، و دمای 23 درجه سانتیگراد نیز تحت دمای محیط به کمک وسایل خنک کننده تنظیم شد. غلظت اولیه سلول *Scenedesmus* 4.75×10^6 cell/ml بود. شرایط محیطی آزمایش در دوره نوری ۱۲ ساعت روشنائی، ۱۲ ساعت تاریکی و نوردهی ۲۵۰۰ لوکس و تحت هوادهی مداوم از طریق پمپ مرکزی (جهت جلوگیری از نفوذ آلودگی از فیلتر سرسرنگی $0.2 \mu\text{m}$ میکرونی استفاده شد) تنظیم گردید. مدت زمان اعمال تنش برای تیمار، بر اساس بررسی‌های صورت گرفته ۱۶ روز در نظر گرفته شد. رشد ریزجلبک‌ها هر دو روز یکبار توسط اندازه‌گیری OD ۶۸۰ نانومتر و شمارش سلولی اندازه‌گیری شد (Kurade et al., 2016).

۴.۲. آماده سازی جهت استخراج

پس از گذشت ۱۶ روز از ایجاد تنش (اواخر فاز لگاریتمی)، برای بدست آوردن بیومس لازم برای انجام

بر اساس احیاء آنالوگ یون فریک به نام $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ (2, 4, 6 Tripyridyl-s-triazine) در محیط اسیدی بنا شده است. ماده آنتی‌اکسیدان با دادن الکترون به این یون، آن را به کمپلکس یون فرو Fe^{2+} (TPTZ) تبدیل می‌کند. این یون، رنگ آبی در محلول داشته، که شدت رنگ آن نشان‌دهنده خاصیت احیاکنندگی نمونه‌هاست، و این محلول در ۵۹۳ نانومتر جذب نوری دارد.

به طور خلاصه برای تهیه معرف FRAP، ۵ میلی‌لیتر از محلول TPTZ (10 mmol L^{-1}) در HCl (40 mmol L^{-1})، و بعد ۵ میلی‌لیتر از محلول کلروآهن (20 mmol L^{-1}) به همراه ۵۰ میلی‌لیتر از محلول بافر استات (0.3 mol L^{-1} , $\text{pH}=3.6$) را به ترتیب اضافه کرده، تا محلولی به رنگ زرد-قهوه‌ای حاصل شود. این محلول باید تازه تهیه، و پس از ۳۰ دقیقه ناپایدار و غیر قابل استفاده است. سپس مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف آماده فرپ را به لوله‌ها اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری، سپس نمونه لیوفیلیزه را با ۲ میلی‌لیتر متانول رقیق کردیم، در نهایت از روی نمونه ۵۰ میکرولیتر برداشت کرده، و به لوله‌های مربوطه اضافه و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن‌ماری نگهداری، در نهایت شدت رنگ حاصل، در طول موج ۵۹۳ نانومتر و در مقابل شاهد (حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف فرپ به اضافه ۵۰ میکرولیتر حلال عصاره‌گیری (متانول)) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از سولفات آهن ($1000-125 \mu\text{M}$) برای رسم منحنی-استاندارد استفاده شد (Hanachi et al, 2018). همه اندازه‌گیری‌ها در ۳ تکرار و برحسب میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند.

۷.۲. تعیین محتوای کل فنل

تعیین ترکیبات فنلی کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتو انجام گرفت (Hanachi et al, 2019).

در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش با ۱/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو (قبلاً ۱۰ برابر با

سنجش‌ها، محیط کشت حاوی ریزجلبک داخل فالكون ریخته و با سرعت ۸۰۰۰ rpm، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ شد، سپس مایع رویی دور ریخته شد، سلول‌ها ۲ بار، با آب مقطر شستشو داده شدند (De Jesus et al., 2016)، سپس بعد از انجام سانترفیوژ، بیومس حاصله به مدت ۴۸ ساعت لیوفیلیزه گردید. بعد از انجام لیوفیلیزه، نمونه‌های خشک شده به داخل ویال منتقل گردیدند و تا زمان انجام سنجش‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Gruber- Brunhumer et al., 2015).

۵.۲. استخراج آنتی‌اکسیدان

جهت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان از متانول ۹۹ درصد استفاده شد؛ بدین منظور، ابتدا به ۱۰ mg میلی‌گرم از نمونه خشک شده توسط فریز درایر، دو میلی‌لیتر متانول اضافه کرده، سپس برای شکستن دیواره سلولی از دستگاه هموژنایزر، ۱۴۰۰ دور، به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد، بعد نمونه را داخل ویال تیره رنگ ریخته، و ۳۰ دقیقه روی استیر قرار داده شد. در نهایت نمونه را داخل میکروتیوپ ریخته، و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانترفیوژ کرده و سوپرناتانت حاصل را در یک ویال تیره رنگ به صورت جداگانه ریخته و مجدداً عمل استخراج با متانول را روی بیومس حاصل از سانترفیوژ تکرار شد و سپس عصاره‌های متانولی را روی هم ریخته و برای تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری استفاده شد، تا با تبخیر حلال، نمونه تغلیظ شود. در پایان تمامی نمونه‌ها در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در هنگام استفاده از عصاره‌ها، جهت سنجش‌های آنتی‌اکسیدان (FRAP, Phenol, Flavonoid) دو میلی‌لیتر متانول روی نمونه تغلیظ شده اضافه گردید (Hajimahmoodi et al., 2010).

۶.۲. سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

روش FRAP (ferric-reducing antioxidant power)

میلی گرم از نمونه لیوفیلیزه را وزن کرده، و بعد از انتقال به فالکون، ۴ میلی لیتر متانول ۹۹ درصد به آن افزوده، و برای جلوگیری از نفوذ نور، دور فالکون‌ها فویل پیچیده، سپس برای شکستن دیواره سلولی ریزجلبک‌ها و همچنین همگن شدن محیط، از دستگاه هموژنایزر با سرعت ۸۰۰ rpm، به مدت ۴ دقیقه استفاده گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت فالکون به بن‌ماری در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد منتقل گردید. بعد از این مدت محتویات فالکون با دور ۸۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش میزان رنگدانه‌ها استفاده شد. بعد از استخراج کل رنگدانه‌ها با متانول، محتوا کلروفیل و کاروتنوئید توسط معادله شرح داده شده توسط Wellburn (۱۹۹۴) محاسبه گردید.

۱۰.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

بررسی داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS ورژن ۲۴، و رسم نمودارها به وسیله نرم افزار EXCEL انجام شد. برای انجام آنالیز داده‌ها از تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA)، و میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با یکدیگر مقایسه شدند. مطالعه ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدان و محتوا کل فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید با استفاده از آنالیز رگرسیون خطی چندگانه انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. اثر pH روی رشد *Scenedesmus sp.*

منحنی رشد *Scenedesmus* در محیط‌های کشت با pH متفاوت (۵، ۷، ۸، ۹) در طول دوره آزمایش ۱۶ روزه در شکل ۱ (به روش شمارش سلولی) و شکل ۲ (به روش اسپکتروفتومتری) نشان داده شده است. با توجه به شکل ۱، pH=۵ و کنترل (pH=۷) از روز ۱ تا ۳ آزمایش، در تعداد سلول‌های ریزجلبک افزایش چندانی مشاهده نشد؛ و تراکم سلولی در روز سوم برای pH=۵ و کنترل (pH=۷)

آب مقطر رقیق شده) با هم مخلوط گردید، و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم بی‌کربنات (60 g L^{-1}) اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب مخلوط فوق به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد. میزان کل فنل از روی منحنی استاندارد، از اندازه‌گیری جذب در مقابل غلظت محلول استاندارد گالیک اسید ($150-20 \text{ mg L}^{-1}$) از محلول ذخیره ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر گالیک اسید) بدست آمد. نتایج برحسب معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک ($\text{Gallic acid equivalent (GAE) g}^{-1} \text{ dry weight}$) ریزجلبک محاسبه شد. و با میانگین ۳ بار تکرار آزمایش \pm انحراف معیار گزارش گردید.

۸.۲. تعیین محتوای کل فلاونوئید

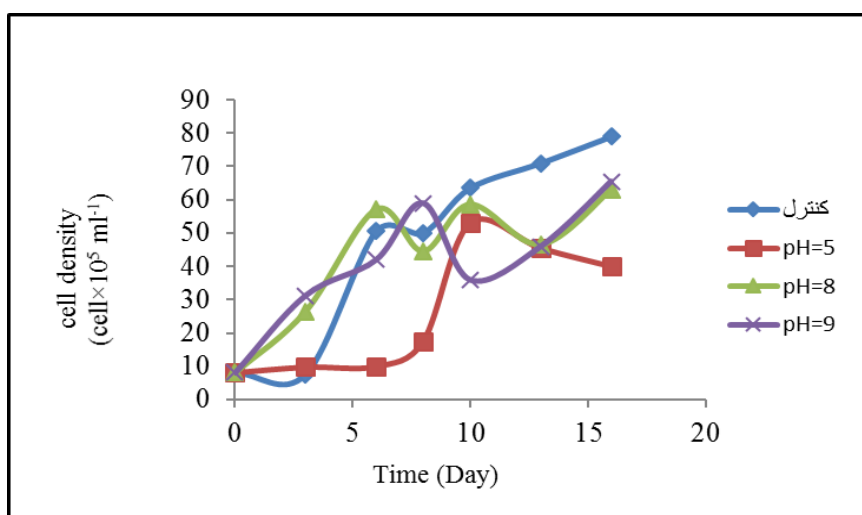
محتوای کل فلاونوئید با استفاده از روش رنگ سنجی، به کمک معرف آلومینیوم کلرید (AlCl_3) توسط روشی که در زیر شرح داده شده تعیین گردیده است، با اندکی تغییر (Hanachi *et al.*, 2019) در این روش ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه متانولی با ۷۵۰ میکرولیتر از متانول، ۵۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪ w/v) در آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر از استات پتاسیم ۱ مولار به همراه ۱/۴ میلی لیتر از آب مقطر با هم مخلوط شد، و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. در این آزمایش از غلظت‌های مختلف استاندارد کوئرستین (۲۰۰-۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) جهت رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. محتوای کل فلاونوئید بر مبنای میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک و با میانگین ۳ بار تکرار آزمایش \pm انحراف معیار گزارش گردید.

۹.۲. استخراج رنگدانه‌ها

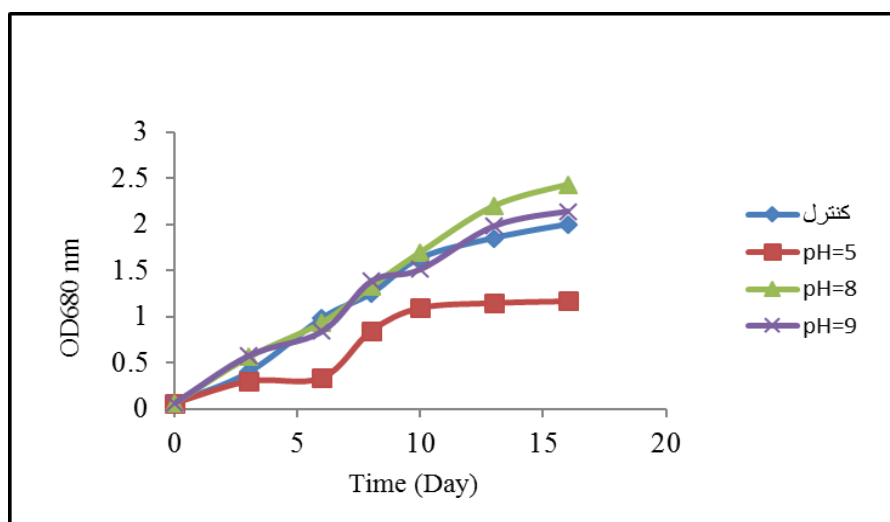
جهت استخراج رنگدانه‌ها از روش تغییر یافته Paliwal و همکاران (۲۰۱۶) استفاده گردید. ابتدا ۴

پس از آن روند کاهش رشد مشاهده گردید؛ و تقریباً رشد تیمارها تا روز دهم با هم تلاقی داشتند؛ اما در نهایت بیشترین تراکم سلولی با 79×10^5 سلول بر میلی لیتر مربوط به pH کنترل بود و محیط‌های قلیایی با $pH=8$ و $pH=9$ به ترتیب 63×10^5 و 65×10^5 سلول بر میلی لیتر، کمترین اختلاف را با pH کنترل نشان دادند. نتایج شکل ۲ نیز گویای آن است که، محیط‌های قلیایی با $pH=8$ و $pH=9$ دارای بالاترین مقدار رشدند.

به ترتیب 9.8×10^5 و 7.5×10^5 سلول بر میلی لیتر است؛ در حالی که $pH=8$ و $pH=9$ به سرعت وارد سیر صعودی شدند؛ و تراکم سلولی در روز سوم برای $pH=8$ و $pH=9$ به ترتیب 26.5×10^5 و 31.3×10^5 سلول بر میلی لیتر بود. از روز سوم به بعد pH کنترل هم وارد سیر صعودی شد؛ اما $pH=5$ از روز ششم وارد فاز لگاریتمی شد و تنها تا روز دهم در این مرحله باقی ماند؛ و بعد از مرحله دهم وارد مرحله سکون شد. روند صعودی ریز جلبک‌ها در کنترل $pH=7$ ، $pH=8$ و $pH=9$ نیز، تا روز دهم ادامه داشت؛ و



شکل ۱- نمودار رشد سلولی در *Scenedesmus* در نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف pH به روش شمارش سلولی با لام نئوبار (تعداد سلول $\times 10^5$ در میلی لیتر) (محیط کشت BBM، دما $25 \pm 2^\circ C$ ، شدت نور 2500 لوکس، تحت هوادهی مداوم، مدت تیمار ۱۶ روز).

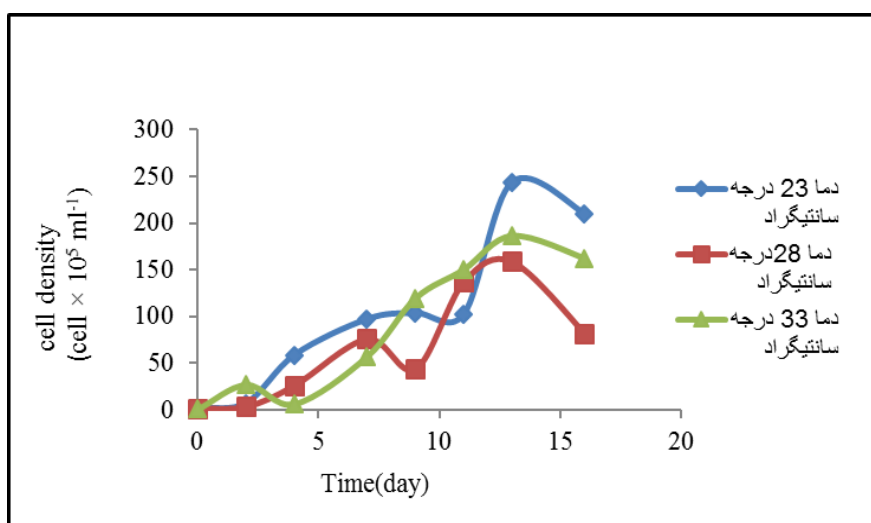


شکل ۲- نمودار رشد سلولی در *Scenedesmus* در نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف pH به روش اسپکتروفوتومتری (محیط کشت BBM، دما $25 \pm 2^\circ C$ ، شدت نور 2500 لوکس، تحت هوادهی مداوم، مدت تیمار ۱۶ روز).

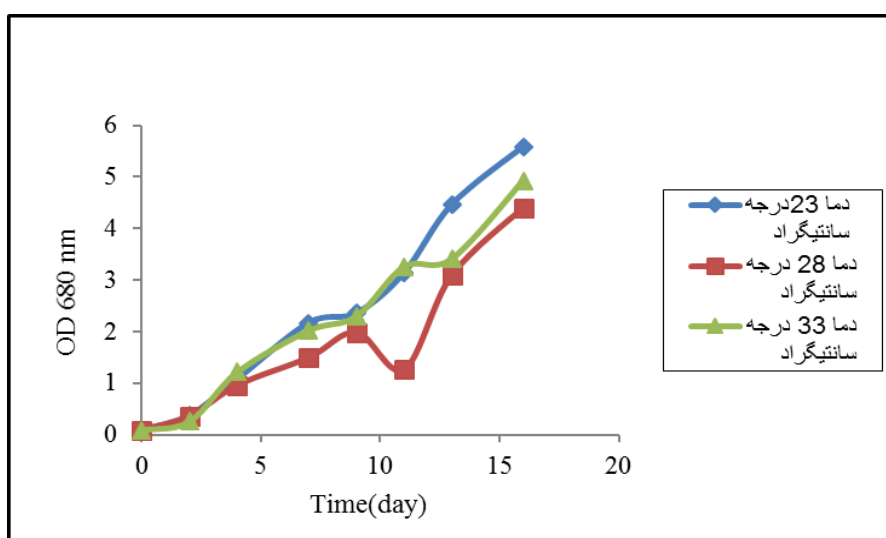
۲.۳. اثر دما روی رشد *Scenedesmus sp.*

منحنی رشد *Scenedesmus* در دامنه دمایی ۲۸، ۳۳، ۲۸ درجه سانتیگراد بررسی شد، و نتایج نیز، در شکل ۳ (به روش شمارش سلولی) و شکل ۴ (به روش اسپکتروفتومتری) نمایش داده شدند. با توجه به شکل ۳ تعداد سلول‌های ریز جلبک تا روز دوم افزایش چندانی نداشت و بعد از روز سوم تقریباً همه تیمارها وارد سیر

صعودی شدند. افزایش سرعت رشد در تمامی تیمارها از روز سیزدهم ک بود، ولی همچنان به سیر صعودی خود ادامه دادولی جلبک‌ها وارد مرحله سکون نشدند. در نهایت با توجه به منحنی رشد نمایش داده شده در شکل ۳ و ۴، بهترین دما برای رشد *scenedesmus* ۲۳ درجه سانتیگراد به دست آمد.



شکل ۳- نمودار رشد سلولی در *Scenedesmus* در تیمار با دماهای مختلف به روش شمارش سلولی با لام نتوبار (تعداد سلول $\times 10^5$ در میلی‌لیتر) محیط کشت BBM، $pH = 7 \pm 0.2$ ، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس، تحت هوادهی مداوم، مدت تیمار ۱۶ روز).



شکل ۴- نمودار رشد سلولی در *Scenedesmus* در تیمار با دماهای مختلف به روش اسپکتروفتومتری محیط کشت BBM، $pH = 7 \pm 0.2$ ، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس، تحت هوادهی مداوم، مدت تیمار ۱۶ روز).

۳.۳. فعالیت فارماکولوژی

تأثیر pH و دما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریز جلبک *Scenedesmus sp.*: جدول ۱ و ۲ به ترتیب بیانگر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریز جلبک *Scenedesmus* تحت تأثیر pH و دما متفاوت است. بر طبق داده‌های بدست آمده توسط سنجش FRAP، بالاترین ظرفیت

آنتی‌اکسیدانی در pH های مختلف در مقایسه با کنترل (pH=۷)، مربوط به pH=۸ ($\mu\text{mol Fe(II) /g DW}$) و کمترین فعالیت نیز مربوط به pH=۵ (70.65 ± 0.05) و بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (26.65 ± 0.05) است. بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ($67.9 \mu\text{mol Fe(II) /g DW}$) نیز مربوط به دمای 23°C است.

جدول ۱- میانگین (میانگین \pm sd) نتایج حاصل از اثر pH بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک *Scenedesmus* در پایان آزمایش.

اثر pH	FRAP ($\mu\text{mol Fe(II) /g DW}$)	فنل کل (mg GAE*/g DW)	فلاونوئید (mg quercetin /g DW)
کنترل (pH=۷)	42.9 ± 0.1 (c)	64.4 ± 0.10 (a)	1.97 ± 0.08 (b)
pH=۵	26.65 ± 0.05 (d)	5.26 ± 0.2 (c)	1.96 ± 0.2 (b)
pH=۸	70.65 ± 0.05 (a)	6.03 ± 0.05 (b)	2.43 ± 0.2 (a)
pH=۹	53.65 ± 0.04 (b)	5.47 ± 0.10 (c)	2.48 ± 0.05 (a)

حروف کوچک غیر یکسان در بالای اعداد در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

جدول ۲- میانگین (میانگین \pm sd) نتایج حاصل از اثر دما بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک *Scenedesmus* در پایان آزمایش.

اثر دما	FRAP ($\mu\text{mol Fe(II) /g DW}$)	فنل کل (mg GAE*/g DW)	فلاونوئید (mg quercetin /g DW)
دمای 23°C	67.9 ± 0.15 (a)	7.53 ± 0.06 (a)	2.08 ± 0.2 (a)
دمای 28°C	26.15 ± 0.15 (c)	4.47 ± 0.09 (c)	1.41 ± 0.08 (c)
دمای 33°C	62.4 ± 0.12 (b)	6.76 ± 0.06 (b)	1.88 ± 0.2 (b)

حروف کوچک غیر یکسان در بالای اعداد در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

نتوانست روی محتوا فنلی تأثیر مثبتی بگذارد، و باعث کاهش معنادار تیمارها نسبت به نمونه کنترل شد. در حالی که اثر دما باعث افزایش معناداری در سطح احتمال 0.05 در دمای 23 درجه سانتیگراد (mg GAE/g DW) 7.53 ± 0.06 شد.

۵.۳. تأثیر pH و دما روی میزان رنگدانه‌های

ریز جلبک *Scenedesmus sp.*

بررسی تأثیر هر یک از تیمارهای pH و دما روی محتوای کاروتنوئید و کلروفیل (mg/g DW) نشان داد که،

۴.۳. تأثیر pH و دما روی محتوای فیتوشیمیایی

ریز جلبک *Scenedesmus sp.*

محتوا فلاونوئیدی در اثر تیمار با دما و pH های متفاوت دارای مقادیر مختلفی از mg quercetin/g DW تا $2.48 \text{ mg quercetin/g DW}$ است (جدول ۱ و ۲). بالاترین محتوای فلاونوئیدی ($> 2 \text{ mg quercetin/g DW}$) با اختلاف معنادار ($P \leq 0.05$) نسبت به سایر تیمارها، در pH = ۸ و دما 23°C دیده شد. تعیین کل محتوا فنلی (mg GAE/g DW) با استفاده از واکنشگر فولین انجام گرفت. برخلاف محتوای فلاونوئیدی تیمار با pH

شد (جدول ۴)، و این در حالی است که هر دو تیمار pH و دما نتوانستند تأثیری بر تولید کلروفیل b داشته باشند ($P \geq 0.05$)

بهینه‌ترین محیط برای تولید کاروتنوئید ۹ و pH=۷ و بیشترین میزان تولید کلروفیل a نیز متعلق به pH=۹ است (جدول ۳). همچنین بالاترین میزان کاروتنوئید و کلروفیل در اثر تیمار با دما در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد دیده

جدول ۳- نتایج حاصل از اثر pH بر میزان رنگدانه‌ها در *Scenedesmus* (Mean±SD).

اثر pH	Chlorophyll α mg/g DW	Chlorophyll β mg/g DW	Carotenoid mg/g DW
کنترل (pH = ۷)	۱۴,۰۵ ± ۱,۱۳(b)	۳,۸۳ ± ۰,۶۵ (a)	۳,۰۵ ± ۰,۳۲ (ab)
pH=۵	۱۱,۶۰ ± ۱,۰۸ (c)	۳,۵۲ ± ۰,۸(a)	۱,۹۸ ± ۰,۳۶(c)
pH=۸	۱۳,۹۶ ± ۱,۲۱ (b)	۳,۸۸ ± ۰,۶(a)	۲,۸ ± ۰,۳۶(b)
pH=۹	۱۷,۸۵ ± ۱,۰۷ (a)	۴,۴۹ ± ۰,۸۵ (a)	۴,۰۱ ± ۰,۲۷(a)

حروف کوچک غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون در $P \leq 0.05$ است.

جدول ۴- نتایج حاصل از اثر دما بر میزان رنگدانه‌ها در *Scenedesmus* (Mean±SD).

اثر دما	Chlorophyll α mg/g	Chlorophyll β mg/g	Carotenoid mg/g
دمای ۲۳ °c	۱۵,۹۵ ± ۱,۱۵(a)	۴,۲۸ ± ۰,۶ (a)	۳,۳۸ ± ۰,۳۸(a)
دمای ۲۸ °c	۷,۴۴ ± ۱,۱۹(c)	۲,۶۲ ± ۰,۸۳(a)	۱,۶۰ ± ۰,۴۳(b)
دمای ۳۳ °c	۸,۹۵ ± ۱,۲۱ (b)	۲,۹۱ ± ۰,۷(a)	۲,۱۳ ± ۰,۳۶(b)

حروف کوچک غیر مشابه بر اساس آزمون دانکن، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان نمونه‌های هر ستون در $P \leq 0.05$ است.

آنتی‌اکسیدانی داشته باشد؛ اگرچه متغیر کاروتنوئید نتوانست اثر معناداری بر فعالیت آنتی‌اکسیدان داشته باشد، زیرا مقدار P-value آن برابر ۰,۰۹۹ بود که بزرگتر از ۰,۰۵ می‌باشد. نتایج آنالیز رگرسیون در تیمار با دما (جدول ۶) نیز گویای آن است که، درصد (R₂) از تغییرات متغیر وابسته (فعالیت آنتی‌اکسیدان) به وسیله متغیرهای مستقل (محتوا فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید) تبیین شده است، و محتوا فنل با بتا ۰,۹۸۳ به صورت معناداری ($P \leq 0.05$) توانست فعالیت آنتی‌اکسیدانی را پیش‌بینی کند، و محتوا فلاونوئید (بتا ۰,۴۳۰ -؛ $P \geq 0.05$) و کاروتنوئید (بتا ۰,۱۵۷ -؛ $P \geq 0.05$) اثر معناداری بر فعالیت آنتی‌اکسیدان نداشتند.

۶.۳. اثر محتوای فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید

روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج در مورد آنالیز رگرسیونی خطی چندگانه (جدول ۵ و ۶) نشان داد که، هر دو محتوا فنل و فلاونوئید به طور معنی‌داری در فعالیت آنتی‌اکسیدان اثرگذار می‌باشند. در خصوص تیمار با pH (جدول ۵)، R₂ (ضریب تعیین یا ضریب تشخیص) نشان می‌دهد که ۰,۹۲۳ درصد از تغییرپذیری در فعالیت آنتی‌اکسیدان به وسیله متغیرهای فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید بیان شده است. ضرایب رگرسیونی استاندارد شده یعنی بتا (Beta) نیز گویای آن است که، محتوا فلاونوئید با بتا ۰,۹۴۸ ($P \leq 0.05$) توانسته اثرگذاری بیشتری نسبت به فنل با بتا ۰,۳۶۹ ($P \leq 0.05$) بر روی متغیر وابسته یعنی فعالیت

جدول ۵- آنالیز رگرسیون خطی چندگانه محتوا فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید در مقابل فعالیت آنٹی اکسیدان در اثر تیمار با pH با استفاده از t-test برای معناداری.

X-variable	Y-variable	B	Std. Error	Beta	t Stat	P-value
	فعالیت FRAP	-۱۲۲,۰۱۱	۲۳,۹۱۲		-۵,۱۰۳	۰,۰۰۱
محتوا فنل		۱۱,۱۶۷	۳,۰۴۶	۰,۳۶۹	۳,۶۶۶	۰,۰۰۶
محتوا فلاونوئید		۵۳,۷۷۰	۵,۸۴۴	۰,۹۴۸	۹,۲۰۰	۰,۰۰۰
محتوا کاروتنوئید		-۴,۷۴۴	۲,۵۴۱	-۰,۱۹۶	-۱,۸۶۷	۰,۰۹۹
Adj. R ₂ =۰,۸۹۴			R ₂ = ۰,۹۲۳		R= ۰,۹۶۱	

جدول ۶- آنالیز رگرسیون خطی چندگانه محتوا فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید در مقابل فعالیت آنٹی اکسیدان در اثر تیمار با دما با استفاده از t-test برای معناداری.

X-variable	Y-variable	B	Std. Error	Beta	t Stat	P-value
	فعالیت FRAP	۱,۸۴۵	۰,۱۴۵		۱۲,۶۹۸	۰,۰۰۰
محتوا فنل		۰,۳۲۳	۰,۰۲۳	۰,۹۸۳	۱۴,۲۵۸	۰,۰۰۰
محتوا فلاونوئید		-	-	-۰,۴۳۰	-۰,۴۸۲	۰,۶۴۷
محتوا کاروتنوئید		-	-	-۰,۱۵۷	-۱,۵۱۰	۰,۱۸۲
Adj. R ₂ =۰,۹۶۲			R ₂ = ۰,۹۶۷		R= ۰,۹۸۳	

۴. بحث و نتیجه گیری

(Zhang et al., 2014). در یک آزمایش مشابه که روی این ریز جلبک انجام شد، متوجه شدند که بالاترین میزان رشد تحت دامنه ۹-۱۱ pH است، همچنین آن‌ها دریافتند که ۱۱ pH موجب تغییر شکل در ریز جلبک می‌گردد، که این نکته برای کشت انبوه ریز جلبک در مصارف صنعتی دارای اهمیت می‌باشد (Varshney et al., 2016). برخلاف این مطلب، گزارش شده که رشد *Chlorella* در pH های قلیایی مهار می‌شود و سلول‌های *Chlorella* در pH = ۵ دارای نرخ رشد بالاتری نسبت به pH های دیگر (۴، ۴/۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵) است. به طور کلی می‌توان این نکته را بیان کرد که، پاسخ‌های رشد ریز جلبک‌های مختلف نسبت به تغییرات pH، ممکن متفاوت باشد (Zhang et al., 2014). در میان پارامترهای رشد دما یکی از فاکتورهای مهم برای

عامل pH یکی از فاکتورهای اثرگذار روی رشد ریز جلبک‌ها محسوب می‌شود (Spilling et al., 2013). به این صورت که، افزایش pH موجب افزایش کربنات (CO_3^{2-}) و بیکربنات (HCO_3^-) در سلول گردیده، بنابراین میزان مولکول CO_2 در سلول کاهش می‌یابد (Spilling et al., 2013; Zhang et al., 2014). اگرچه جلبک‌ها به کمک آنزیم کربنیک انیدراز قادرند HCO_3^- را به CO_2 تبدیل کرده، و میزان CO_2 در دسترس برای انجام فتوسنتز را افزایش دهند (Spilling et al., 2013). در این مطالعه تغییرات رشد تحت تیمار با pH، نشان از تمایل *Scenedesmus* به سمت محیط‌های قلیایی است، که می‌توان یکی از علت‌های آن را فتوسنتز خود ریز جلبک بیان کرد، که باعث افزایش pH محیط با افزایش زمان در طول دوره کشت می‌شود

قبیل تغییر در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مانند تغییر در N, pH, P و دما، ریزجلبک‌ها می‌توانند راه‌های بیوسنتزی خاصی را تنظیم کرده، که در نهایت بر روی تولید ترکیبات تجاری مهم و افزایش تدریجی بیومس می‌تواند موثر باشد (Aremu et al., 2015). یکی از این ریزجلبک‌ها، ریزجلبک *Scenedesmus* است، که به دلیل ارزش تجاری فراوان مورد توجه بسیاری از محققین می‌باشد، همچنین بیشترین تمرکز تحقیقات در ریزجلبک، بر روی تولید سوخت زیستی است، و اکثراً توان دارویی ریزجلبک‌ها نادیده گرفته شده، یا به صورت ثانوی باقی می‌مانند (Aremu et al., 2014). در این مطالعه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی *Scenedesmus* با استفاده از سنجش FRAP تخمین زده شد. روش FRAP اغلب برای اندازه‌گیری ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی است. FRAP می‌تواند با آهن و گروه Sh از آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش دهد (Hajimahmoodi et al., 2010). که در تیمارها، pH=8 و دما ۲۳ درجه سانتیگراد در *Scenedesmus* توانست بالاترین ماکزیمم جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر را داشته باشد. در واقع در محیط‌های قلیایی و دما پایین تولید آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش یافت، که نتایج ما در مورد اثر pH مطابق با نظریه‌ی Guedes و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد. آن‌ها که اثر pH و دما را، روی تولید آنتی‌اکسیدان‌ها در ریزجلبک *Scenedesmus obligus* مطابق با روش فاکتوریال کامل سنجیدند، دریافتند که میزان تولید آنتی‌اکسیدان با افزایش pH، افزایش می‌یابد، و ماکزیمم تولید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در ۸ و pH=7 و دما ۳۰ درجه سانتیگراد گزارش کردند، که با نتایج ما در مورد دما مشابه نیست، که این اختلافات را می‌توان به گونه ریزجلبک، شرایط آزمایش، مبدأ محیطی یا روش‌های استخراج و حلال مورد استفاده نسبت داد (Trabelsi et al., 2016).

در اطراف دیواره سلولی ریزجلبک‌ها ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها وجود دارد، بنابراین ریزجلبک‌ها با کاهش خطر آسیب، می‌توانند از اختلال در دیواره سلولی جلوگیری کنند (Safafar et al., 2015). ترکیبات فنلی

کارایی رشد ریزجلبک‌ها محسوب می‌شود (Chokshi et al., 2015). دما بر فعالیت آنزیم‌ها و نرخ واکنش‌های بیولوژیک می‌تواند موثر باشد (Han et al., 2016; Park et al., 2016). ریزجلبک‌ها همچنین دارای تحمل دمایی وسیعی هستند و این به عنوان یک مزیت محسوب می‌شود، زیرا باعث کاهش خطر آلودگی توسط پاتوژن‌ها و موجب کاهش هزینه‌های سرمایشی می‌گردد (Varshney et al., 2016). در مطالعه حاضر بالاترین نرخ رشد *Scenedesmus* در اغلب برای *Scenedesmus* تحمل دمایی ۲۵-۳۵°C را گزارش کردند (Varshney et al., 2016). همچنین در مقالات پیشین، به ارتباط مثبت نرخ رشد با رنج دمایی ۲۰-۳۰ درجه سانتیگراد در *Scenedesmus* اشاره شده، اگرچه در مقالات شواهدی مبنی بر این‌که، این گونه‌ها قادر به تحمل دماهای بالاتر از ماکزیمم نیز هستند وجود دارد (Kumar et al., 2014). آن‌ها بیان داشتند که *Scenedesmus quadricauda* دارای قدرت تحمل دمایی ۴۰ درجه سانتیگراد، بعد از رسیدن ریزجلبک به مرحله پایان فاز لگاریتمی می‌باشد، و قادر به تولید لیپید در این دما هست. اما با افزایش زمان مواجهه با استرس دمایی بالا، میزان غلظت بیومس کاهش پیدا می‌کند. اصولاً به دلیل نامطلوب بودن شرایط، دماهای بالاتر منجر به کاهش فتوسنتز و فعالیت آنزیم در سلول‌های ریزجلبک، و در نتیجه منجر به کاهش بیومس در ریزجلبک‌ها می‌گردند (Han et al., 2016).

یکی از مهم‌ترین گونه‌های اکسیژن فعال که در مواجهه با آسیب‌ها در بدن تولید می‌شوند، هیدروکسیل‌ها (OH°) هستند. تقریباً تمامی رادیکال‌های آزاد موجب آسیب به مولکول‌های بیولوژیک، پروتئین‌ها و در نهایت باعث جهش و مرگ سلولی می‌گردند (Trabelsi et al., 2016). یکی از مکانیسم‌های دفاعی ریزجلبک‌ها برای جلوگیری از این‌گونه آسیب‌های اکسیداتیو، تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان است، تا ریزجلبک‌ها بتوانند سلول‌ها را از تخریب توسط رادیکال‌های آزاد محافظت کنند (Shtty & Sibi, 2015). با ایجاد شرایط استرس‌زا، از

ریز جلبک‌ها در مواجهه با نور UV افزایش می‌یابد (Maadane et al., 2015). یا محتوا بالای فنل و فلاونوئید در سیانوباکتر *Leptolyngbya* sp. و در مواجهه با سطح بالای دما در چشمه آب‌گرم، به عنوان راهی برای جلوگیری از استرس‌های اکسیداتیو در این ریزجلبک محسوب می‌گردد (Trabelsi et al., 2016). در نتایج ما نیز محتوای ماده فنلی و فلاونوئیدی در *Scenedesmus* در مواجهه با دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و همچنین محتوای فلاونوئید در اثر تیمار با ۹ درجه و $\text{pH}=8$ افزایش نشان داد که این امر گویای این است که این تیپ از استرس‌ها می‌تواند نقش مهمی در افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان بازی کند (Maadane et al., 2015). اما نتایج ما در مورد تیمار با pH نتوانست بر روی محتوا فنلی اثر مثبتی داشته باشد. مطالعات قبلی در مورد سایر استرس‌ها، از قبیل محدودیت در N و P نشان داد که، این تیمارها نتوانستند در افزایش محتوا آنتی‌اکسیدانی در ریزجلبک‌ها مؤثر باشد. اگرچه این نوع از استرس، در افزایش تولید ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل توکوفرول یا آسکوربیک‌اسید مفید بود (Goiris et al., 2015).

ترکیبات رنگی در ریزجلبک‌ها شامل کلروفیل a، b و c، β -کاروتن، آستاگزانتین و فیکوبیلی‌پروتئین‌ها هستند. آن‌ها دارای کاربردهای متعددی در صنایع غذایی، آرایشی-بهداشتی و داروسازی هستند. همچنین به دلیل اینکه، این ترکیبات دارای خواص ضد سرطانی و غیر سمی هستند، بیشتر از نوع سنتزی آن، دارای اهمیت می‌باشند (Begum et al., 2015). کاروتنوئیدها می‌توانند با مکانیسم دفاع محافظت نوری، سلول‌های ریزجلبک را در برابر شدت نور بالا محافظت کنند (Goiris et al., 2015). همچنین علاوه بر جذب نور می‌توانند اکسیژن فعالی که در طی فتوسنتز تولید می‌شود را غیرفعال کنند (Goiris et al., 2012; Maadane et al., 2015). تولید ترکیبات رنگی در ریزجلبک‌ها بستگی به گونه ریزجلبک و شرایط کشت از قبیل: دما، شوری، تابش، طول موج رنگی، دوره‌های نوری، pH ، محدودیت مواد غذایی، مکمل N، آفت‌کش‌ها و فلزات سنگین دارد. دما یکی از

به خصوص فلاونوئیدها به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی دارای فعالیت ضد رادیکالی قوی هستند (Trabelsi et al., 2016)، همچنین دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع از قبیل: ضد التهابی، ضد تصلب شراین و فعالیت‌های ضد سرطانی است، که این فعالیت‌ها ممکن است، با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط باشد، و به عنوان کمک‌کننده اصلی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته می‌شود (Li et al., 2007). پلی‌فنل‌ها با مکانیسم‌های متعدد از قبیل انتقال اتم هیدروژن یا الکترون تک، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند و از اجزای مهم در سلول‌های ریزجلبک محسوب می‌شوند (Goiris et al., 2012; Morowvat & Ghasemi, 2016;) (Shetty and Sibi, 2015). واژه پلی‌فنل دارای یک معنای وسیع از ۸۰۰۰ ترکیب مختلف با ساختار مولکولی متفاوت است (Morowvat and Ghasemi, 2016). که در این میان استخراج توسط حلال مناسب، به طور معناداری در محتوا فنل تأثیر دارد. از آنجا که ترکیبات آنتی‌اکسیدان ریزجلبک‌ها دارای قطبیت‌های مختلف می‌باشد، بنابراین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک‌ها قویاً تحت تأثیر توسط حلال می‌باشد. همچنین کارایی استخراج نیز، نیازمند حلال‌هایی است که بتواند به داخل سلول نفوذ کرده و ترکیبات هدف، مطابق با قطبیت را، در داخل خود حل کند. در این میان متانول بخاطر قطبیت بالا و حل‌پذیری مناسب بیشتر به عنوان حلال متداول برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان از قبیل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مطرح می‌باشد (Safafar et al., 2015; Trabelsi et al., 2016). همچنین متانول به دلیل اینکه می‌تواند غشای سلولی را بیشتر از سایر حلال‌ها متلاشی کند، می‌تواند قدرت آنتی‌اکسیدانی را در ریزجلبک‌ها، بیشتر از سایر حلال‌ها استخراج کند. اگرچه زمانی که ما داده‌های خود را با مطالعات دیگران مقایسه می‌کنیم، می‌بایست این را نیز در نظر بگیریم، که تولیدات فنل بعلاوه ترکیبات آنتی‌اکسیدان در ریزجلبک‌ها وابسته به شرایط رشد و استرس‌هایی از قبیل استرس اکسیداتیو است (Safafar et al., 2015). برای نمونه محتوا مواد فنلی در

آنتی‌اکسیدان باشند. اگرچه نتایج استخراج با متانول، دلالت بر اثر منفی pH، در محتوا فنلی داشت. تعدادی از مطالعات قبلی نیز، حاکی از ارتباط قوی بین دو پارامتر محتوای فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد؛ که از جمله آن‌ها می‌توان به نتایج Hajimahmoodi و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد، آن‌ها بیان کردند که تنها بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با کمک روش FRAP و محتوا فنلی یک ارتباط مثبت وجود دارد، و در سنجش DPPH-HPLC، احتمالاً سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان مؤثر می‌باشند. Maadane و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که، ترکیبات فنل و کاروتنوئیدها، ممکن است کمک‌کننده اصلی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک‌ها نباشند. همچنین تعدادی از مطالعات پیشین، حاکی از ارتباط غیر معنادار بین فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و محتوای فنلی دارد (Li et al., 2007)؛ اگرچه محتوای فنلی از ترکیبات اصلی آنتی‌اکسیدان در تعدادی گونه‌ها مثل سبزیجات، میوه‌ها و گیاهان دارویی محسوب می‌شود (Li et al., 2007). اما با توجه به وجود نتایج ضد و نقیض در مطالعات صورت گرفته، در مورد ارتباط بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن، می‌توان به این نکته اشاره کرد که، ریزجلبک‌ها تولیدکننده طیف وسیعی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله کاروتنوئیدها، اسیدهای چرب غیراشباع و پلی‌ساکاریدها هستند؛ که ممکن است، نقش مهمی در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ایفا کنند (Hajimahmoodi et al., 2010; Li et al., 2007). بنابراین در آینده نیاز به مطالعات بیشتری در مورد نقش سایر ترکیبات شرکت‌کننده در محتوای فنلی و کاروتنوئیدی و ارتباط آن‌ها با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

در مطالعه حاضر، ریزجلبک *Scenedesmus sp.* تحت استرس‌های متفاوت دما و pH قرار گرفت. نتایج نشان از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فلاونوئیدی در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و ۹ و ۸ pH داشت. همچنین بر میزان کاروتنوئید و کلروفیل a نیز تاثیر گذاشت، و باعث افزایش آن‌ها در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و ۹ و

فاکتورهای اساسی در فرایند متابولیک در تمامی ارگانیسم‌های زنده محسوب می‌شود. تغییرات شدید در دما موجب استرس در ریزجلبک می‌شود. اگرچه دماهای بالا در افزایش تدریجی کاروتنوئید (β -کاروتن) در ریزجلبک‌های سبز-آبی مؤثر می‌باشد، اما موجب تغییراتی در فشار اسمزی و در نهایت موجب آسیب سلول‌ها می‌شود (Begum et al., 2015). در این آزمایش نیز دمای بهینه برای تولید کاروتنوئید 23°C بود. pH نیز یکی از فاکتورهایی است که در میزان رنگدانه، طی فتوسنتز مؤثر می‌باشد. حل‌پذیری و در دسترس بودن مواد غذایی، همچنین وجود کربن غیرآلی در تغییرات pH مؤثر می‌باشد. طبق تحقیقات پیشین $\text{pH}=8$ ، بهترین pH برای تولید کاروتنوئید در ریزجلبک *Scenedesmus almerensis* و $\text{pH}=9$ نیز بهینه برای تولید کلروفیل در *Spirulina platensis* می‌باشد (Begum et al., 2015). طبق نتایج ما نیز، ۹ و $\text{pH}=7$ در افزایش کاروتنوئید و کلروفیل مؤثر بود، که تا حدودی با گزارش‌های پیشین تطابق دارد. در ادامه می‌بایست این نکته را بیان کرد که، به دلیل یکسان نبودن شرایط محیطی و تفاوت در نوع گونه و شرایط آزمایش، امکان مقایسه داده‌ها با سایر مقالات بسیار مشکل می‌باشد.

ریزجلبک‌ها قادرند کلاس‌های مختلفی از متابولیت‌ها و بیومولکول‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی مختلف را در سلول‌ها تولید کنند؛ که در این میان کاروتنوئیدها و دیگر پیگمان‌ها نقش بسزایی در سیستم‌های سلولی ایفا می‌کنند (Morowvat and Ghasemi, 2016). نتایج مطالعات قبلی در جلبک‌ها حاکی از ارتباط معنادار محتوا کاروتنوئید و فنل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است (Foo et al; 2017) که با قسمتی از نتایج ما در تناقض است. نتایج ما در ارتباط با آنالیز رگرسیونی چندگانه در اثر تیمار با دما نشان از تنها ارتباط قوی محتوا فنل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. سایر ترکیبات نتوانستند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر معناداری بگذارند؛ در صورتی که در تیمار با pH، هر دو محتوای فنلی و فلاونوئیدی به همراه هم نتوانستند جزء ترکیبات مؤثر بر فعالیت

۵. سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه الزهرا به لحاظ فراهم آوردن بودجه و امکان تحقیق سپاسگزاری می‌شود. همچنین از تمامی کسانی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

در $pH=7$ شد. اگرچه pH نتوانست بر روی محتوا فنلی تاثیرگذار باشد. اما دمای ۲۳ درجه سانتیگراد توانست باعث افزایش معنادار ($p<0.05$) محتوای فنلی گردد. بنابراین تیمار pH و دما نشان داد که، می‌تواند در افزایش تولید آنتی‌اکسیدان در ریزجلبک *Scenedesmus* sp. مؤثر باشد، و این ریزجلبک را می‌توان به عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار آورد. در آینده نیز، استفاده از سایر حلال‌ها برای استخراج بهتر ترکیبات آنتی‌اکسیدان توصیه می‌گردد.

۶. منابع

- Aremu, A.O., Masondo, N.A., Molnar, Z., Stirk, W.A., Ördög, V., Staden, J.V., 2014. Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. *Journal of Applied Phycology* 26(1), 407-415.
- Aremu, A.O., Masondo, N.A., Molnar, Z., Stirk, W.A., Ördög, V., Staden, J.V. 2015. Changes in phytochemical content and pharmacological activities of three *Chlorella* strains grown in different nitrogen conditions. *Journal of Applied Phycology* 28(1), 149-159.
- Begum, H., Yusoff, F.M.D., Banerjee, S., Khaton, H., Shariff, M., 2015. Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (13), 2209-2222.
- Bischoff, H.W., Bold, H.C. 1963. Some algae from enchanted rock and related algal species. *Phycological Studies, University of Texas, IV, Austin* 5, 68.
- Bold, H.C., 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bull. Bulletin of the Torrey Botanical Club* 76,101-108.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2013. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 143, 1-9.
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revan, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology* 181, 128-135.
- Chokshi, K., Pancha, I., Trivedi, K.H., George, B., Maurya, R., Ghosh, A., 2015. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresource Technology* 180, 162-171.
- De Jesus, S.S., Santana, A., Ponce, G.H., Filho, R.M., 2016. Potential use of vegetable waste for biofuel production. *Journal of Chem Technol Biotechnology* 92(1), 90-99.
- Foo, S.C., Yosoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Yau, S.K., Khong, N.M.H., 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology* 241, 175-183.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., Brabanter, J.D., Cooman, L.D., 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24(6), 1477-1486.
- Goiris, K., Colen, W.V., Wilches, I., León-Tamariz, F., Cooman, L.D., Muylaert, K., 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research* 7, 51-57.
- Gruber-Brunhumer, M.R., Jerney, J., Zoher, E., Nussbaumer, M., Hieger, C., Bochmann, G., 2015. *Acutodesmus obliquus* as a benchmark strain for evaluating methane production from microalgae: Influence of different storage and pretreatment methods on biogas yield, *Algal Research*. 12, 230-238.

- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Pereira, R.D., Malcata, F.X. 2011. Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnology Progress* 27(5), 1218-1224.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Naffissi-Varchen, N., 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22, 43-50.
- Hanachi P , Salehizadeh Sh , Kiarostami K , Ramezani R., 2019. Investigation of Antioxidant properties of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* and their cytotoxic effect on gastric cancer AGS cell line. *Cell & Tissue Journal* 9(4), 378-387.
- Han, F., Pei, H., Hu, W., Han, L., Zhang, S., Ma, G., 2016. Effect of high-temperature stress on microalgae at the end of the logarithmic phase for the efficient production of lipid. *Environmental Technology* 37(20), 2649-2657.
- Hanachi P., Zarringhalami R and Ramezani Tamijani R., 2018. Investigation of Antioxidant Properties of *Polygonatum orientale* Desf and *Tilia dasystyla* Extracts by Different Methods and Solvents. *Hormozgan Medical Journal* 22(4), 86504.
- Kumar, K., Dasgupta, Ch.N., Das, D., 2014. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource Technology* 167, 358-366.
- Kurade, M.B., Kim, J.R., Govindwar, S.P., Jeon, B.H., 2016. Insights into microalgae mediated biodegradation of diazinon by *Chlorella vulgaris*: microalgal tolerance to xenobiotic pollutants and metabolism. *Algal Reserarch*. 20, 126-134.
- Li, H-B., Cheng, K-W., Wong, Chi-Ch., Fan, K-W., Chen, F., Jiang, Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 1, 771-776.
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., Arroussi, H.E., Benhima, R., Amzazi, S., 2015. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology* 215, 13-19.
- Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2016. Evaluation of antioxidant properties of some naturally isolated microalgae: Identification and characterization of the most efficient strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8, 263-269.
- Paliwal, Ch., Ghosh, T., George, B., Pancha, I., Maurya, R., Chokshi, K., 2016. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research* 15, 24-31.
- Park, Ch.H., Kim, D.H., Han, G.B., 2016. Optimizing nutrient removal in municipal wastewater under microalgal-bacterial symbiosis with mesh screen separation. *Environmental Engineering Science* 33(12), 996-1003.
- Safafar, H., Wagenen, J.V., Moller, P., Jacobsen, Ch., 2015. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *MarDrugs* 13(12),7339-7356.
- Shetty,V., Sibi, G., 2015. Relationship between total phenolics content and antioxidant activities of microalgae under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth. *Journal of Food Resource Science* 4(1), 1-9.
- Spilling, K., Brynjólfssdóttir, A., Enss, D., Rischer, H., Svavarsson, H.G., 2013. The effect of high pH on structural lipids in diatoms. *Journal of Applied Phycology* 25(5), 1435-1439.
- Trabelsi, L., Mnari, A., Abdel-Daim, M.M., Abid-Essafi, S., Aleya, L., 2016. Therapeutic properties in tunisian hot springs: first evidence of phenolic compounds in the cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. biomass, capsular polysaccharides and releasing polysaccharides. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16(1), 515.
- Varshney, P., Sohoni, S., P. Wangikar, P., Beardall, J., 2016. Effect of high CO₂ concentrations on the growth and macromolecular composition of a heat- and high-light-tolerant microalga. *Journal of Applied Phycology* 28(5), 2631-2640.
- Wellburn, A. R., 1994. The spectral determination of chlorophylls α and β , as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144(3), 307-313.
- Zhang, Q., Wang, T., & Hong, Y., 2014. Investigation of initial pH effects on growth of an oleaginous microalgae *Chlorella* sp. HQ for lipid production and nutrient uptake. *Water Science & Thechnology* 70(4), 712-719.

