



Evaluation of culture conditions of *Donalilla salina* on its antioxidant content

Abstract

Article Info

Introduction: *Donalilla* algae, especially *Donalilla salina*, is one of the most studied algae cultivars for mass cultivation of *Donalilla* as a food source.

Methods: Culture medium conditions with salinity (1, 3 and 5 M), light intensity (35, 127.5 and 220 μmol) and nitrogen source (200, 500 and 800 mmol / l) on the level of antioxidant activity of (DPPH) *Donalilla salina* was optimized. Therefore, 15 treatments were designed according to the Bonken box response level method in 16 minitabs.

Results: The results showed that different culture conditions (salinity, light intensity and nitrogen content) had a significant effect on the amount of antioxidants in *Donalilla salina* so that the amount of antioxidants decreased significantly with increasing nitrogen in algae culture medium and increased significantly with increasing salinity and light and varied in the range of DPPH 18.02 to DPPH 20.95.

Conclusion: The highest level of antioxidants (20.79% of DPPH) can be achieved by creating optimal conditions of light irradiation of 165 micromol photons, salinity of 3.34 M and nitrate concentration of 375.75 macromol per liter.

Keywords: Algae, *Donalilla salina*, Antioxidant, Free radical scavenging of DPPH.

Authors:

Alireza Dolatyari ¹

Orang Eyvazzadeh*²

Leila Nateghi ³

Affiliations

1 . PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2 . * Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

3 . Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

*Correspondence email: orang_eyvazzadeh@yahoo.com



بررسی شرایط کشت جلبک دونالیلا سالیئا بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در سنجش میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی آن

چکیده

اطلاعات مقاله

علیرضا دولت یاری^۱
اورنگ عیوض زاده^۲
لیلا ناطقی^۳

مقدمه: جلبک دونالیلا، بخصوص دونالیلا سالیئا، یکی از ریز جلبک‌هایی است که به عنوان یک منبع غذایی بیشترین میزان مطالعه جهت کشت انبوه دونالیلا بر روی آن صورت گرفته است.

روش کار: شرایط محیط کشت با شوری (۱، ۳ و ۵ مولار)، شدت نور (۳۵، ۱۲۷/۵ و ۲۲۰ میکرومول) و منبع نیتروژن (۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ میلی مول بر لیتر) بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) جلبک دونالیلا سالیئا بهینه سازی شد. بنابراین ۱۵ تیمار مطابق با روش سطح پاسخ باکس بنکن در مینی تب ۱۶ طراحی گردید. یافته‌ها: نتایج نشان داد شرایط متفاوت کشت (میزان شوری، شدت نور و میزان نیتروژن) تأثیر قابل توجهی بر میزان آنتی اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا دارد؛ بطوریکه میزان آنتی اکسیدانی با افزایش میزان نیتروژن در محیط کشت جلبک بطور معنی داری کاهش و با افزایش میزان شوری و میزان نور بطور معنی داری افزایش یافته و در محدوده DPPH ۱۸/۰۲ تا DPPH ۲۰/۹۵ متغیر بود. نتیجه‌گیری: می توان با ایجاد شرایط بهینه تابش نور ۱۶۵ میکرومول فوتون، شوری ۳/۳۴ مولار و غلظت نترات ۳۷۵/۷۵ ماکرومول بر لیتر به بالاترین میزان آنتی اکسیدان (۲۰/۷۹ درصد DPPH) دست یافت.

کلیدواژگان: جلبک، دونالیلا سالیئا، آنتی اکسیدانی، مهار رادیکال آزاد DPPH.

وابستگی سازمانی نویسندگان

- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- *استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

مقدمه

دونالیلا سالینا^۱ جلبک سبز تک سلولی و شورپسندی با پراکندگی جغرافیایی وسیع است. این گونه از جنس دونالیلا تولیدکننده اولیه در محیط‌های شور بوده و تحت شرایط القایی قادر به تولید مقدار فراوانی کاروتنوئید است. جلبک دونالیلا سالینا نخستین بار در سال ۱۸۳۸ در حوضچه‌های نمکی در جنوب فرانسه توسط میشل فلیکس دونال تحت عنوان هماتوکوکوس معرفی گردید. با این وجود، تئودورسکو در سال ۱۹۰۵ نام دونالیلا را بر روی آن نهاد. اتل در سال ۱۹۸۳، جنس دونالیلا و ۱۶ جنس دیگر را در رده ی کلروپلیسه آ و راسته‌ی دونالیلس قرار داد این راسته شامل ۴ خانواده‌ی دونالیلا سالینا، آستروناداسه آ، دانجریلاسه آ، راسی برسکیلاسه آ می‌باشد. با استفاده از منابع مختلف بهترین رده‌بندی ارائه‌شده برای جلبک دونالیلا سالینا به صورت زیر است: شاخه *Chlorophyta*، رده *Chlorophyceae*، راسته *Volvocales*، زیر راسته *Chlamydomonadinea*، خانواده *Polybepharidaceae*، جنس *Dunaliella* (۸).

چینیها و رومیها اولین مردمانی بودند که به ارزش جلبکها پی برده و از آنها در زمینهای مختلف استفاده می‌کردند. بزرگ‌ترین نقش جلبکها را میتوان در اکوسیستمهای آبی جستجو کرد. در چنین محیطهایی جلبکها به عنوان تولیدکنندگان اولیه محسوب میشوند. در کشور ما به دلیل برخورداری از شرایط اقلیمی خاص، گسترش جلبکها چنان است که میتوان با بهره‌گیری از آنها در زمینه تولید ترکیبات و متابولیت‌های دارویی و مکملهای غذایی، از واردات این مواد از خارج از کشور جلوگیری نمود (۲). منبع طبیعی آن دریاچه‌های نمکی فوق اشباع میباشد و به همین دلیل اکوسیستم ایران به دلیل وجود دریاچه‌های آب شور متعدد مانند دریاچه ارومیه، قم و مارلو پرورش این جلبک را ممکن می‌سازد (۳).

جلبک دونالیلا سالینا دارای فعالیتهای زیستی مختلف نظیر فعالیت ضد سرطانی، ضد تصلب شرائین، ضد دیابت، بهبود دهنده نور چشم، ممانعت از آلرژی، سم زدایی و غیره است (۴). اندازه سلولی این میکروارگانیسم ۱۴-۶ میلی متر بوده و قادر به تجمع بتاکاروتن در دیواره سلولی خود میباشد. علاوه بر این، به آسانی قابل کشت است، سرعت کشت نسبتا بالایی داشته و محتوای چربی آن نیز بالاست (۵).

به علت کمبود تنوع زیستی در آب‌های شور، گونه‌هایی از جنس دونالیلا در این اکوسیستم، کمتر مورد تغذیه قرار می‌گیرند و به طور کلی عامل اصلی محدودکننده رشد و تکثیر آنها در غلظت بالای نمک، میزان مواد غذایی و غلظت CO₂ محلول میباشد، درحالی که گونه‌های ساکن آب‌های شیرین غذای جانوران دیگر بوده و به این ترتیب جمعیت آنها کاهش می‌یابد.

گونه‌های دونالیلا در محدوده دمایی از زیر صفر تا بالای ۳۸ درجه سانتی‌گراد زندگی می‌کنند. برای مثال *D. antarctica* در دمای زیر صفر درجه و بعضی از سویه‌های دونالیلا سالینا در شدت نور زیاد قادر به ادامه حیات هستند. این جلبک پراکنش وسیعی در عمق‌های مختلف آب‌ها داشته به‌طوری که برخی از گونه‌ها نظیر *D. viridis* در اعماق آب و دونالیلا سالینا در سطوح بالای آب زندگی می‌کنند و گونه *D. perva* با توجه به شرایط اکوسیستم از جمله میزان شوری و شدت نور در عمق‌های مختلف زیست می‌نماید (۱).

بهترین منبع نیتروژن برای دونالیلا سالینا نیترات است و جذب نیترات وابسته به نور است برای مثال گزارش شده است که نیترات آمونیوم از تشکیل بتاکاروتن جلوگیری می‌کند (۶). رادیکالهای آزادی که در داخل بدن تولید میشوند یا از محیط وارد بدن می‌گردند، سبب آسیب به ساختارهای سلولی نظیر DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و غشاهای سلولی شده و در بروز بیماریهای سرطان و آترواسکلروز نقش مهمی ایفا می‌کنند. همچنین این ترکیبات از عوامل اصلی فساد مواد غذایی و تولید ترکیبات سمی در غذا میباشند (۷ و ۸).

جلبکها محصولاتی ارزان قیمت برای مصرف انسانها میباشند. این محصولات غنی از پروتئین، رنگدانه، امگا ۳ و اسید چرب، که از لحاظ ارزش تغذیه‌ای بسیار حائز اهمیت میباشند، هستند. از محاسن اصلی جلبکها، میتوان به انبارداری آسان و امکان استفاده از آنها در فرآوری موادغذایی اشاره کرد. جلبکها دارای اثرات مفیدی بر سلامت انسان هستند؛ به طوریکه سازمان جهانی بهداشت توصیه به مصرف آنها نموده است. جلبکها به عنوان طیفی از مواد غذایی مفید میباشند که میتوانند در صنعت غذاهای تجاری مورد استفاده قرار گیرند. دونالیلا سالینا به عنوان یک ماده آنتیاکسیدان و ضدسرطان دارای متقاضیان بسیار زیادی در سراسر دنیا است. با توجه به افزایش شیوع سرطان در ایران، استفاده از محصولات طبیعی حاوی آنتیاکسیدان میتواند نقش مهمی در فراهم آوردن تغذیه سالم و سلامتی افراد جامعه ایفا نماید. همچنین، از آنجاییکه در سالیان اخیر کشور ما با خشکسالی شدیدی مواجه شده است کشت این جلبک، که نیاز به مصرف آب زیادی برای رشد ندارد، سبب خواهد گردید پرورش گسترده این جلبک به راحتی مهیا گردد (۹).

روش سطح پاسخ (RSM) Response surface method) در برگزیده گروهی از تکنیکهای ریاضی و آماری است که امکان رسیدن به شرایط بهینه در یک سیستم پیچیده را فراهم میکند. پایه تئوریک RSM ابزاری قوی برای بهینه سازی تجربی است که رابطهای را بین متغیرهای مستقل و متغیرهای وابسته جستجو میکند. طرح BOX- Behnken یک

صورت گرفت. شرایط مختلف محیط کشت با شوری ۱، ۳ و ۵ مولار و غلظت‌های نیترات ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ میکرومول بر لیتر برای انجام تحقیق در نظر گرفته شد. نمونه‌های آماده شده در ژرمیناتور تحت تابش نورهای ۳۵، ۱۲۷/۵ و ۲۲۰ میکرومول فوتون قرار داده شدند و برای جلوگیری از خطا در آزمایش مورد نظر از هر نمونه سه تکرار تهیه گردید. جهت اندازه‌گیری میزان رشد جلبک دونالیلا سالیئا، شمارش سلول‌ها با نمونه‌برداری از ۳ تکرار هر تیمار، به صورت روزانه انجام گرفت. شرایط مختلف محیط کشت جلبک دونالیلا سالیئا فراهم شد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های تولید شده در شرایط مختلف، مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶).

۳-۲- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)

۲-۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیا شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. در این روش به طور اختصار، ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره گیاه که توسط اسید گالیک و ترولوکس (۴۰-۵۰ میکروگرم بر لیتر) جدا شده بود با ۳/۶ میلی‌لیتر محلول متانولیک DPPH به عنوان نمونه کنترل استفاده گردیده، تمامی نمونه‌ها به مدت یک دقیقه ورتکس شده و بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (ساخت کشور آمریکا - UV-Visible) در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر شاهد قرائت شد و با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید (۹).

$$\text{ABTS inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad \text{معادله ۱}$$

در نهایت نتایج بصورت IC_{۵۰} (غلظتی از عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد از فعالیت آنتی‌اکسیدانیش را انجام دهد) بیان گردید (۱۷و۷).

۴-۲- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی شرایط بهینه محیط کشت (شوری، شدت نور و منبع نیتروژن) بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) جلبک دونالیلا سالیئا، توسط نرم افزار سطح پاسخ به روش باکس بنکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

طرح مستقل درجه دوم است که در برگزیده طرح‌های فاکتوریل کامل یا ناقص نمی‌باشد. در این طرح، ترکیب‌های تیمارها در لبه‌های فضای فرآیند قرار ندارند بلکه در میان‌ها و مرکز واقع شده‌اند. این طرحها قابل چرخش بوده و هر فاکتور باید دارای سه سطح باشد (۱۰).

اگرچه در ایران و جهان تحقیقات فراوانی در خصوص ترکیبات آنتیاکسیدان موجود در گیاهان صورت گرفته است، در مورد جلبکها این تحقیقات اندک بوده است. در نتیجه لازم است در خصوص ارزش گونه‌های جلبکی آبهای ایران تحقیقات وسیعی صورت گیرد. بطور مثال نخستین و همکاران (۱۳۹۵) بهینه‌سازی روش اندازه‌گیری ظرفیت آنتیاکسیدانی ریز جلبکها با استفاده از روش متداول Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) (۱۱)، نبی زاده و همکاران (۱۳۹۷) کاربرد آبینیر بعنوان محیط کشت جهت کشت ریزجلبک دونالیلا سالیئا (۱۲)، Herrero و همکاران (۲۰۰۶) بهینه‌سازی استخراج آنتیاکسیدانها از ریزجلبک دونالیلا سالیئا توسط مایعات تحت فشار (۱۳)، Belghith و همکاران (۲۰۱۶) رشد را تحت تأثیر آلودگی کادمیوم (Cd) و ارزیابی میزان ترکیبات فنولی، کاروتنوئیدی (۱۴) و Molina & Iovine (۲۰۱۸) ویژگی‌ها و کاربرد جلبکها در مواد غذایی برای انسان و حیوانات را مورد بررسی قرار دادند (۱۵).

در این تحقیق با توجه به تنوع، پراکندگی و توان بالقوه جلبک دریاچه ارومیه، اقدام به نمونه‌برداری و شناسایی ریز جلبک و بررسی میزان فعالیت آنتیاکسیدانی آن به روش مهار رادیکال آزاد (DPPH^۲) شد. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر بهینه‌سازی شرایط کشت جلبک دونالیلا سالیئا بر میزان فعالیت آنتیاکسیدانی آن بود.

روش کار

۱-۲- مواد

نمونه‌های آب حاوی جلبک از دریاچه ارومیه تهیه شد و نمونه‌برداری با استفاده از ظروف شیشه‌ای یک لیتری از مکان‌های مختلف دریاچه انجام پذیرفت. مواد شیمیایی مورد مصرف در جهت انجام آزمون شامل اتانول، متانول و ۱ و ۱ دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) (Merck-آلمان) بود.

۲-۲- کشت جلبک دونالیلا سالیئا در غلظت‌های مختلف شوری، نیتروژن و شدت نور

نمونه‌های آب حاوی جلبک تهیه شده از دریاچه ارومیه، به آزمایشگاه مواد غذایی اداره بهداشت، امداد و درمان نیروی زمینی ارتش جمهوری اسلامی ایران منتقل گردیدند. پس از خالص سازی با استفاده از روش پلیت آگار، کشت سریالی

یافته‌ها

۱-۳- نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ برای میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا در شرایط مختلف کشت

جدول شماره ۱ و معادله ۲ به ترتیب نتایج آنالیز واریانس میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا و مدل رگرسیونی میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا در شرایط مختلف کشت (میزان نیتروژن - نور و شوری) را نشان می‌دهند. بر اساس جدول ۱ مدل رگرسیونی پیش‌بینی شده معنی‌دار ($p \geq 0.05$) بود. مقدار ضریب تبیین این مدل ($R-Sq$) مقدار $0.96/86$ و ضریب تبیین اصلاح شده آن ($R-Sq(adj)$) مقدار $0.99/20$ به دست آمد که نشان‌دهنده برآزش خوب مدل به داده‌های آزمایشی بود. اثرات خطی و مربعی هر سه متغیر میزان شوری، شدت نور و میزان نیتروژن بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا معنی‌دار بود ($p \geq 0.05$). همچنین اثر متقابل «شدت نور و شوری» بر میزان آنتی‌اکسیدان معنی‌دار ($p \geq 0.05$) بود. با این وجود، اثرات متقابل «میزان نیتروژن و شدت نور» و «شوری و میزان نیتروژن» بر میزان آنتی‌اکسیدان معنی‌دار نبود ($p < 0.05$). با توجه به میزان فاکتور F، اثر خطی شدت نور و پس از آن اثر مربعی شدت نور بیشترین تأثیر را در میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا داشتند (معادله ۲).

شکل شماره ۱ (a) نتایج اثرات متقابل و سطحی (شوری × شدت نور) بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا در شرایطی که نیتروژن در 0.05 ماکرومول بر لیتر ثابت نگه داشته شد را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است میزان آنتی‌اکسیدان $12/0$ درصد HPPD و بالاتر از آن، تحت تابش نور 251 تا 991 میکرومول فوتون، شوری $2/8$ تا $4/2$ مولار و غلظت نیترات ثابت 0.05 ماکرومول بر لیتر مشاهده گردید.

۲-۳- نتایج اثرات متقابل و سطحی «شوری × شدت نور»، «شوری × میزان نیتروژن» و «نیتروژن × شدت نور» بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا

شکل شماره ۱ (a) نتایج اثرات متقابل و سطحی (شوری × شدت نور) بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا در شرایطی که نیتروژن در 0.05 ماکرومول بر لیتر ثابت نگه داشته شد را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است میزان آنتی‌اکسیدان $0/21$ درصد DPPH و بالاتر از آن، تحت تابش نور 152 تا 199 میکرومول فوتون، شوری $2/8$ تا $4/2$ مولار و غلظت

نیترات ثابت 0.05 ماکرومول بر لیتر مشاهده گردید. شکل شماره ۱ (b) نتایج اثرات متقابل و سطحی (شوری × میزان نیتروژن) بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا، در شرایطی که تحت شدت نور $127/5$ میکرومول فوتون ثابت نگه داشته شد را نشان می‌دهد. میزان آنتی‌اکسیدان $8/20$ درصد DPPH و بالاتر از آن، با شوری $2/2$ تا 5 مولار و غلظت نیتروژن 200 تا 580 ماکرومول بر لیتر تحت تابش نور ثابت $127/5$ میکرومول فوتون مشاهده گردید.

شکل شماره ۱ (c) نتایج اثرات متقابل و سطحی (میزان نیتروژن × شدت نور) بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا، در شرایطی که میزان شوری 3 مولار ثابت نگه داشته شد، را نشان می‌دهد. میزان آنتی‌اکسیدان 21 درصد DPPH و بالاتر از آن، در نیتروژن 220 تا 550 ماکرومول بر لیتر و شدت تابش نور 130 تا 205 میکرومول فوتون با میزان شوری ثابت 3 مولار مشاهده گردید.

۳-۳- نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH جلبک دونالیلا سالیئا در شرایط مختلف کشت به روش آزمون شده و پیش‌بینی شده

جدول شماره ۲، میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا را در شرایط مختلف کشت به روش آزمون شده و پیش‌بینی شده نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری بین نتایج میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا کشت شده در شرایط مختلف به روش آزمون شده و پیش‌بینی شده مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج جدول شماره ۲، مشاهده می‌شود که شرایط متفاوت کشت (میزان شوری، شدت نور و میزان نیتروژن) تأثیر قابل‌توجهی بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا دارد؛ بطوریکه میزان آنتی‌اکسیدان در محدوده DPPH $0.2/18$ تا $95/20$ DPPH متغیر بود. بالاترین میزان آنتی‌اکسیدان $20/95$ درصد DPPH تحت تابش نور 220 میکرومول فوتون، شوری 3 مولار و غلظت نیترات 200 ماکرومول بر لیتر به دست آمد و کمترین میزان آنتی‌اکسیدان $0.2/18$ درصد DPPH تحت تابش نور 35 میکرومول فوتون، شوری 3 مولار و غلظت نیترات 800 ماکرومول بر لیتر به دست آمد.

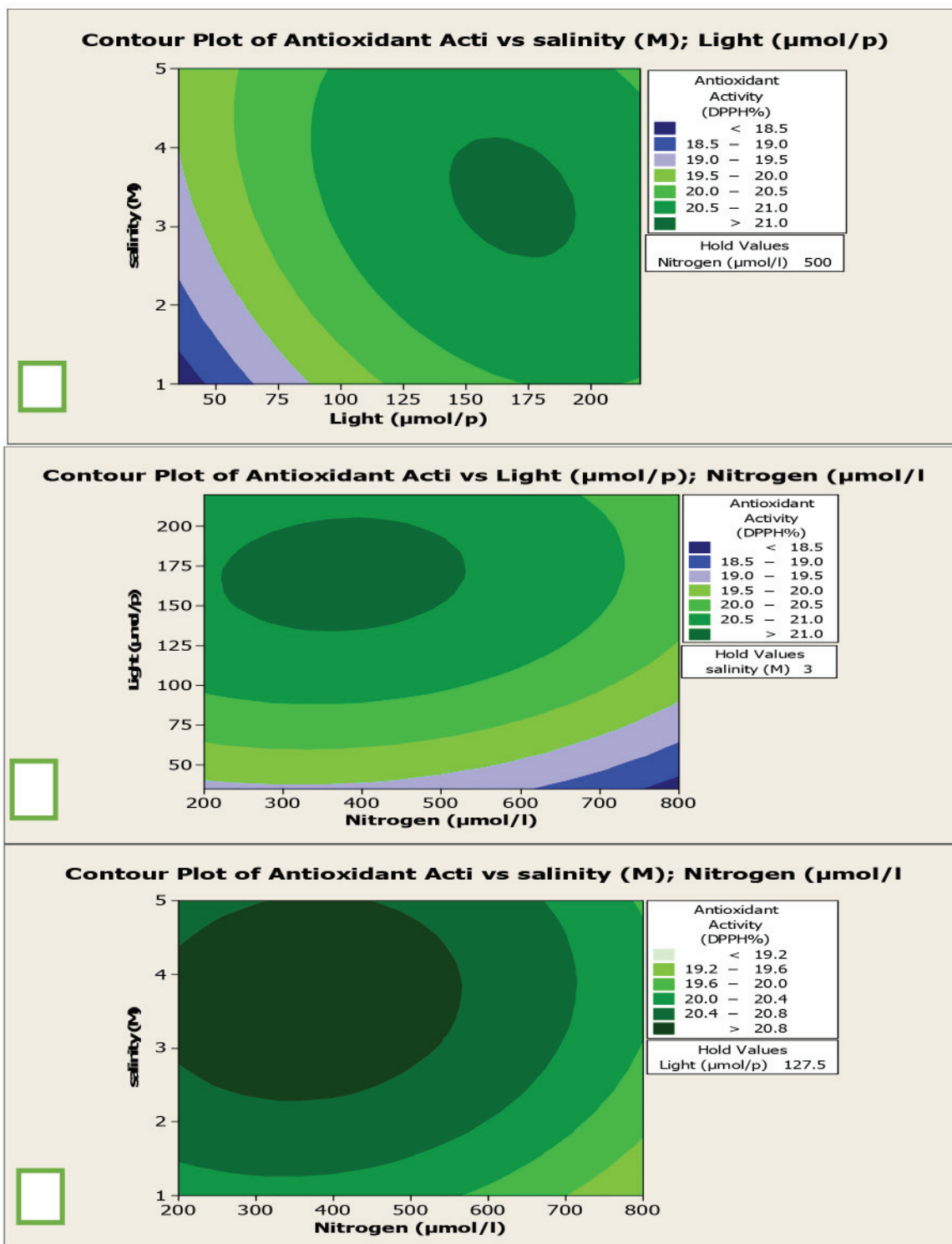
۳-۴- شرایط بهینه میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا در شرایط مختلف کشت

مطابق با شکل ۲، شرایط بهینه پیش‌بینی شده جهت تولید حداکثر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک دونالیلا سالیئا $12/21$ درصد DPPH با 100 درصد مطلوبیت، تحت تابش

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز واریانس میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* در شرایط مختلف کشت (میزان نیتروژن- نور و شوری).

مقدار P P-value	مقدار F F-value	میانگین مربعات Mean square	مجموع مربعات sum of squares	کارایی رگرسیون Regression Coefficients	درجه آزادی degrees of freedom	منبع تغییرات Source
۰/۰۰۳*	۱۷/۱۳	۱/۲۲۱۷۷	۱۰/۹۹۵۹	۲۰/۸۵۰۰	۹	ثابت رگرسیون Constant
۰/۰۰۱*	۳۳/۱۹	۲/۳۶۷۵۱	۷/۱۰۲۵	-	۳	اثرات خطی Linear
۰/۰۰۷*	۱۹/۹۰	۱/۴۱۹۶۱	۱/۴۱۹۶	-۰/۴۲۱۳	۱	نیتروژن (A) Nitrogen
۰/۰۰۰*	۶۸/۹۰	۴/۹۱۴۱۱	۴/۹۱۴۱	۰/۷۸۳۸	۱	نور (B) Light
۰/۰۲۲*	۱۰/۷۸	۰/۷۶۸۸۰	۰/۷۶۸۸	۰/۳۱۰۰	۱	شوری (C) Salinity
۰/۰۰۶*	۱۵/۴۹	۱/۱۰۴۸۳	۳/۳۱۴۵	-	۳	اثرات درجه دوم Square
۰/۰۲۴*	۱۰/۱۹	۰/۷۲۷۰۷	۰/۴۷۵۷	-۰/۴۴۳۷	۱	نیتروژن × نیتروژن (A ²) Nitrogen × Nitrogen
۰/۰۰۲*	۳۳/۴۴	۲/۳۸۵۲۸	۲/۲۱۴۳	-۰/۸۰۳۸	۱	نور × نور (B ²) Light * Light
۰/۰۳۲*	۸/۷۶	۰/۶۲۴۴۷	۰/۶۲۴۵	-۰/۴۱۱۲	۱	شوری × شوری (C ²) Salinity * Salinity
۰/۱۵۶	۲/۷۱	۰/۱۹۲۹۸	۰/۵۷۸۹	-	۳	اثر متقابل Interaction
۰/۴۱۹	۰/۷۷	۰/۰۵۵۲۳	۰/۰۵۵۲	۰/۱۱۷۵	۱	نیتروژن × نور (A×B) Nitrogen × Light
۰/۶۲۳	۰/۲۷	۰/۰۱۹۶۰	۰/۰۱۹۶	۰/۰۷۰۰	۱	نیتروژن × شوری (A×C) Nitrogen × Salinity
۰/۰۴۵*	۷/۰۷	۰/۵۰۴۱۰	۰/۵۰۴۱	-۰/۳۵۵۰	۱	نور × شوری (B×C) Light × Salinity
-	-	۰/۰۷۱۳۲	۰/۳۵۶۶	-	۵	باقی مانده خطا (Residual Error)
۰/۰۰۳*	۲۹۶/۵۲	۰/۱۱۸۶۱	۰/۳۵۵۸	-	۳	عدم برازش مدل Lack-of- Fit
-	-	۰/۰۰۰۴۰	۰/۰۰۰۸	-	۲	خطای خالص Pure Error
-	-	-	۱۱/۳۵۲۶	-	۱۴	کل (Total)
						R ²
						R-Sq (adj)

*اختلاف معنی‌دار (p ≤ ۰/۰۵)

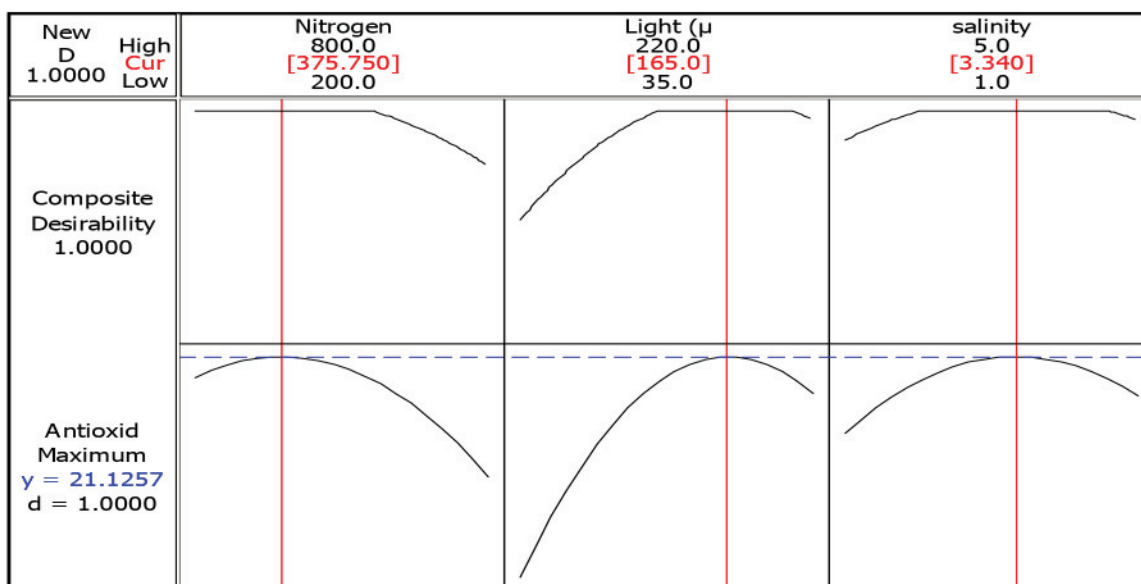


شکل شماره ۱- اثرات متقابل: (a) شوری \times شدت نور بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* در میزان نیتروژن ثابت ۵۰۰ میکرومول بر لیتر، (b) شوری \times میزان نیتروژن بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* در میزان شدت نور ثابت ۱۲۷/۵ میکرومول فوتون و (c) شدت نور \times میزان نیتروژن بر میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* با میزان شوری ثابت ۳ مولار.

جدول شماره ۲- مقایسه بین میزان آنتی‌اکسیدان آزمون شده با پیش بینی شده موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* در شرایط مختلف

باقی مانده Residual	آنتی‌اکسیدانی پیش بینی شده DPPH %	آنتی‌اکسیدانی آزمون شده (DPPH) %	شوری (M)	نور ($\mu\text{mol/p}$)	نیترژن ($\mu\text{mol/l}$)	تیمار Treatment
-۰/۰۰۶	۲۰/۱۷۶	۲۰/۱۷۰	۱	۱۲۷/۵	۲۰۰	۱
-۰/۲۵۴	۲۰/۴۶۴	۲۰/۲۱۰	۱	۲۲۰/۰	۵۰۰	۲
۰/۲۶۰	۲۰/۶۹۰	۲۰/۹۵۰	۳	۲۲۰/۰	۲۰۰	۳
۰/۰۲۰	۲۰/۸۵۰	۲۰/۸۷۰	۳	۱۲۷/۵	۵۰۰	۴
۰/۰۶۴	۱۸/۱۸۶	۱۸/۲۵۰	۱	۳۵/۰	۵۰۰	۵
-۰/۱۹۶	۲۰/۶۵۶	۲۰/۴۶۰	۵	۱۲۷/۵	۲۰۰	۶
-۰/۰۲۰	۲۰/۸۵۰	۲۰/۸۳۰	۳	۱۲۷/۵	۵۰۰	۷
۰/۱۹۶	۱۹/۱۹۴	۱۹/۳۹۰	۱	۱۲۷/۵	۸۰۰	۸
۰/۰۰۶	۱۹/۹۵۴	۱۹/۹۶۰	۵	۱۲۷/۵	۸۰۰	۹
۰/۲۵۴	۱۹/۵۱۶	۱۹/۷۷۰	۵	۳۵/۰	۵۰۰	۱۰
۰/۰۰۰	۲۰/۸۵۰	۲۰/۸۵۰	۳	۱۲۷/۵	۵۰۰	۱۱
-۰/۲۶۰	۱۸/۲۸۰	۱۸/۰۲۰	۳	۳۵/۰	۸۰۰	۱۲
-۰/۰۶۴	۲۰/۳۷۴	۲۰/۳۱۰	۵	۲۲۰/۰	۵۰۰	۱۳
۰/۰۵۸	۲۰/۰۸۳	۲۰/۱۴۰	۳	۲۲۰/۰	۸۰۰	۱۴
-۰/۰۵۷	۱۹/۳۵۷	۱۹/۳۰۰	۳	۳۵/۰	۲۰۰	۱۵

۳-۴- شرایط بهینه میزان آنتی‌اکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* در شرایط مختلف کشت



شکل شماره ۲- شرایط بهینه میزان آنتی اکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* در شرایط مختلف کشت

با افزایش میزان نیتروژن در محیط کشت جلبک، بطور معنی داری کاهش یافته و با افزایش میزان شوری و میزان نور بطور معنی داری افزایش می یابد. جلبک *دونالیلا سالینا* مقاوم ترین موجود یوکاریوتی در مقابل شوری است که در بسیاری از محیط های حاوی نمک نظیر دریاچه ها و مرداب های آب شور یافت می شود. میزان شوری مطلوب جهت رشد مناسب *دونالیلا سالینا* غلظت ۳ مولار (۱۷۴ مولار) است ولی نقاط بحرانی شوری را ۵/۰ مولار (۲۹ مولار) و ۵ مولار (۲۹۰ مولار) ذکر نموده اند (۱۹). با توجه به مطالعات پیشین، علت افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانی در این مطالعه، که حاصل افزایش نور و میزان نمک است، می تواند ایجاد تنش های شیمیایی نظیر فقر مواد غذایی و شوری زیاد باشد؛ زیرا جلبک *دونالیلا سالینا* در تنش های حاصل از افزایش نور، قادر به افزایش سنتز و تجمع کاروتنوئیدها تا ۴۲ پیکوگرم در سلول می باشد. این ترکیبات دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی بوده و ایفا کننده نقش هایی حیاتی از جمله حفاظت سلول در برابر تشعشعات بالا و از بین بردن رادیکال های آزاد می باشند (۲۰). در نتیجه، با توجه به بالا بودن میزان منابع نیتروژنی در مطالعه حاضر، علت کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی، بالا بودن مقدار منابع نیتروژنی است.

به طور کلی تغییرات در محتوای آنتی اکسیدانی در سلول های *دونالیلا* بستگی به غلظت منبع نیتروژن و نمک محیط دارد. همچنین سطح آنتی اکسیدانی سلولی در *دونالیلا سالینا* با سطح پایین نیتروژن، غلظت نمک بالا و شدت نور زیاد افزایش

نور ۱۶۵ میکرومول فوتون، شوری ۳۴/۳ مولار و غلظت نترات ۷۵/۳۷۵ میکرومول بر لیتر بود. شرایط بهینه برای استخراج حداکثر میزان آنتی اکسیدان پیش بینی شده به صورت عملی در آزمایشگاه اعمال شد و میزان آنتی اکسیدان آن ۲۰/۷۹ درصد DPPH بدست آمد که اختلاف معنی داری با میزان آنتی اکسیدان پیش بینی شده توسط روش سطح پاسخ نداشت ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

تحقیقات در مورد پتانسیل آنتی اکسیدانی، موضوعی مهم در زمینه صنایع دارویی و غذایی است. اکسیداسیون حاصل از گونه های فعال اکسیژن می تواند سبب از هم پاشیدگی غشاء سلولها، آسیب به پروتئین های غشایی و موتاسیون DNA و گسترش بسیاری از بیماریها همچون سرطان، آسیب کبدی و بیماری های قلبی و عروقی گردد. اگرچه بدن دارای روندهای دفاعی همچون آنزیمها و مولکولهای آنتیاکسیدانی است که رادیکال های اکسیژن را دفع می کنند، ولی قرار گرفتن مداوم در معرض مواد شیمیایی و آلاینده ها می تواند منجر به افزایش تعداد رادیکال های آزاد خارج از توان بدن شود و موجب آسیب اکسیداتیو غیر قابل بازگشت گردد. بنابراین، آنتیاکسیدانها با خاصیت جاروکنندگی رادیکال های آزاد نقشی مهم در پیشگیری یا درمان بیماری های مرتبط با اکسیداسیون یا رادیکال های آزاد ایفا می کنند (۱۸). نتایج بدست آمده نشان داد که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی

میباشد (۲۱).

در پژوهشی دیگر، سپهوند و همکاران (۱۳۹۷) پس از بررسی امکان استخراج انواع رنگدانه و تولید میزان بالای مواد آنتیاکسیدان توسط ریز جلبک *دونالیلا سالینا* تحت شرایط مختلف کشت (سه محیط کشت تحت شرایط فاقد منبع نیتروژن، استرس نمک و شدت نور بالا با دوره نوری ۱۲ ساعته روشن، تاریک)، بیان نمودند که ریز جلبک *دونالیلا سالینا* تحت شرایط شدت نور بالا به خوبی رشد کرده، راندمان بهتری نسبت به سایر کشتها داشته و میزان محتوای ترکیبات آنتیاکسیدانی آن نیز در این کشت بیشتر از سایر کشتها بوده است (۲۲)، که با نتایج تحقیق حاضر که بیانگر افزایش میزان آنتیاکسیدان با افزایش میزان شدت نور بود، مشابهت داشت.

Hemalatha و همکاران (۲۰۱۳) خواص آنتی اکسیدانی یک دیاتوم دریایی به نام *Navicula clavata* و ریز جلبکهای *Chlorella marina* و *دونالیلا سالینا* را بررسی کرده و بیان نمودند در جلبک *دونالیلا سالینا*، بیشترین میزان خواص آنتی اکسیدانی به ترتیب در عصاره متانولی، استونی و هگزانی مشاهده شد. در حالیکه عصاره متانولی ریز جلبکهای سبز و دیاتوم از پتانسیل آنتی اکسیدانی خوبی برخوردار بودند. این مطالعه نشان میدهد که عصاره‌های مختلف حلال، حاوی ترکیبات آنتیاکسیدانی مختلفی بوده و قادر به از بین بردن انواع مختلف رادیکالهای آزاد هستند (۲۳) که با نتایج تحقیق حاضر که بیان کننده بالا بودن میزان آنتیاکسیدانی در عصاره متانولی است، همخوانی دارد.

Belghith و همکاران (۲۰۱۶)، رشد *دونالیلا سالینا* را تحت تاثیر آلودگی کادمیوم (Cd) بررسی نمودند و نشان دادند که وجود این فلز در محیط باعث تحریک سنتز برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند پلیفنولها، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها میشود. این ترکیبات دارای نقش مهمی در محافظت از *دونالیلا سالینا* در برابر گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر^۳ (ROS) تولید شده در حضور Cd در محیط هستند که این امر با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی *دونالیلا سالینا* در معرض Cd نشان داده شده است (۱۴). در تحقیق حاضر، نور و میزان شوری بالا سبب افزایش میزان پتانسیل آنتیاکسیدانی شدند که این عوامل نشان دهنده تحریک سنتز مواد آنتیاکسیدانی میباشد.

به طور کلی تحقیقات نشان داده‌اند که در جلبکها عواملی چون شوری، دما، منبع نیتروژن و اکسیژن محیط، pH، عناصر سنگین، پرتوهای UV و سایر عوامل تنشزای محیطی بر ترکیب شیمیایی و فعالیت آنتیاکسیدانی اثر میگذارند؛ بنابراین می‌توان این تفاوت را در اعضای مختلف یک گونه، که در زمانها و مکانهای متفاوت جمع‌آوری شده‌اند، به عوامل محیطی

و تغییر در پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب نسبت داد (۲۴). این پژوهش با هدف بررسی شرایط بهینه جهت رشد و تولید مواد آنتیاکسیدانی تحت شرایط مختلف ایجاد شده در محیط کشت جلبک *دونالیلا سالینا* انجام گردید. شرایط محیط کشت با شوری (۱، ۳ و ۵ مولار)، شدت نور (۳۵، ۱۲۷/۵ و ۲۲۰ میکرومول) و منبع نیتروژن (۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ میلی مول بر لیتر) بر میزان فعالیت آنتیاکسیدانی (DPPH) جلبک *دونالیلا سالینا* بهینه‌سازی شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنتیاکسیدانی با افزایش میزان نیتروژن در محیط کشت جلبک بطور معنی‌داری کاهش و با افزایش میزان شوری و میزان نور بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد. شرایط بهینه پیش‌بینی شده جهت تولید حداکثر میزان آنتیاکسیدان موجود در جلبک *دونالیلا سالینا* ۱۲/۲۱ درصد DPPH با ۱۰۰ درصد مطلوبیت، تحت تابش نور ۱۶۵ میکرومول فوتون، شوری ۳۴/۳ مولار و غلظت نترات ۷۵/۳۷۵ میکرومول بر لیتر بدست آمد که با بهینه‌سازی شرایط تولید میتوان میزان ترکیبات آنتیاکسیدانی را از ۲۰/۹۵ به ۲۱/۱۲۵ افزایش داد.

منابع

- erzbicka A. Applications of microalgae paste and powder as food and feed: An update using text mining tool. Beni-suef university- Journal of Basic and Applied sciences. 2016: 14(4); 523-528.
10. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons. 2017: 490-506.
 11. Nakhostin Agah M, Aghaei, A, Rashidnejad Z. Measurement of antioxidant activity of methanolic extract of *Donalilla salinaba* using antioxidant power reduction method, 19th National Congress and 7th International Congress of Biology of Iran, Tabriz, 2016, <https://civilica.com/doc/688169>. [Persian]
 12. Nabizadeh Gholeji A, Rezazade Bari M, Atashbar B, Amiri S, Lotfi Goshayesh M. Use of cheese whey as an alternative culture medium for the production of *Donalia Salina* algae. JFST. 2018: 78(15); 43-54. [Persian]
 13. Herrero M, Jaime L, Martín-Álvarez PJ, Cifuentes A, Ibáñez E. Optimization of the Extraction of Antioxidants from *Dunaliella salina* Microalga by Pressurized Liquids. J. Agric. Food Chem. 2006: 54(15); 5597-5603.
 14. Belghith T, Athmouni Kh, Bellassoued Kh, El Feki A, Ayadi H. Physiological and biochemical response of *Dunaliella salina* to cadmium pollutio. Journal of Applied Phycology. 2016: 28; 991-999.
 15. Molina A, Iovine A. Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. International journal of research and public health. 2018: 54(4); 243-265.
 16. Tavalaei S, Mazaheri Asadi M, Rostami Kh. Cultivation of *Donalina salina* and production of carotenoids from it, a step towards sustainable development, Second National Conference on Agriculture and Sustainable Development (Opportunities and Challenges Ahead), Shiraz, Islamic Azad University, Shiraz Branch. 2011. pp 1-7. [Persian]
 1. Ben- Amotz A, Avron M. The role of glycerol in the osmotic regulation in the halophilic algae, *Dunaliella parva*. Plant physiol. 1973: 51; 875-878.
 2. Shahsavani L, Mostaghim T. The Effects of seaweed Powder on Physicochemical Properties of Yellow Alkaline Noodles. Journal of Food Biosciences and Technology. 2017: 7(2); 27-34.
 3. Bernardo MP, Coelho LF, Sass DC, Contiero J. L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 From dairy industry easte. Brazilian journal of Microbiology. 2016:47(3); 640-646.
 4. Boscaiu M, Sanchez M, Bautista I, Donar P, Lidon A, Linares J, Vicente O. Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitas. Bulletin of university of agricultural science and veterinary medicine cluj-nopoca. Horticultur. 2010: 67(1); 44-49.
 5. Cho K, Kim KN, Lim N L, Kim MS, Ha JC, Shin H H, Oda T. Enhances biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. Biomass and bioenergy. 2015: 72; 1-7.
 6. Milko ED. Study of requirement of two *Dunaliella* sp in mineral and organic components of the media. Moscow univercity vest Biology. 2008: 6; 21-23.
 7. Beyzaei H, Hashmi SH, Jamshidjan A, Ghasemi B, Moghaddam-Manesh MR. Evaluation of Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Effects of the Hydroalcoholic Extract of Frankincense. Quarterly Journal of Nurse and Physician in War. 2018: 21(6); 60- 66. [Persian]
 8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 22-7915 ;90(17) :1993 .
 9. Rathinam R, Wyrwisz J, Kurek MA, Wi-

- the red Alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of applied phycology*. 2002; 14; 151-157.
17. Shah N, Shah M, Patel M, Patel R. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some new biquinoline derivatives containing a thiazole moiety. *Chinese Chemical Letters*. 2012; 23; 445-454.
 18. Hassan Sultan T, Nowruzi M, Amozegar MA. Investigation of chlorophyll a and b and total carotenoids as well as antioxidant activity of four species of green algae isolated from the shores of Golestan Caspian Sea, *New Journal of Biotechnology-Cellular-Molecular*. 2016; P 31-36. [Persian]
 19. Trenkenshu RP, Gevorgiz RG, Borovkov AB. The experience of industrial cultivation *Dunaliella salina*. *Sevastopol*. 2005; 90-97.
 20. Trenkenshu RP. Simplest models of microalgae growth, 2 queasy continuous culture. *Ecologia moray*. 2005; 67; 98-110.
 21. Helena S, Zainuri M, Suprijanto J. Microalgae *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) Growth Using the LED Light (Light Limiting Dioda) and Different Media. *Aquatic Procedia*. 2016; 7; 226-230.
 22. Sepahvand M, Rashidi H. Possibility of extracting various pigments by *Donalilla salina* microalgae under different culture conditions. Fourth National Conference on New Sciences and Technologies of Iran, Tehran, Association for the Development and Promotion of Basic Sciences and Technologies. 2018. p. 94. [Persian]
 23. Hemalatha A, Girija K, Parthiban C, Saranya C, Anantharaman P. Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research (Pelagia Research Library)*. 2013; 4(5); 151-157.
 24. Rossa MM, Oliveira MC, Okamoto OK, Lopes PF, Ande coleicolo P. Effect of visible light on super oxidase dismutase SOD activity in