مقاله علمی – پژوهشی:

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی پلی‌ساکاریدهای استخراجی از جلبک *Chlorella vulgaris* در شرایط آزمایشگاهی

زهرا یعقوب زاده*[۱]، رضا صفری[۱]

*za_yaghoub@yahoo.com

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

چکیده

جلبک *Chlorella vulgaris* یک ریزجلبک سبز آب شیرین است که دارای منابع غنی از متابولیت‌های ساختاری جدید و فعال بیولوژیک است. در این تحقیق، استخراج پلی‌ساکاریدهای *Chlorella vulgaris* به روش آب داغ انجام شد و بازده پلی‌ساکارید خام تقریباً ۵ درصد وزن خشک به‌دست آمد. فعالیت آنتی اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراجی به روش مهار رادیکال‌های ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و قدرت کاهندگی در ۵ غلظت (۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. پلی‌ساکاریدهای به‌دست آمده دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بودند. بالاترین فعالیت مهار DPPH ۱۵/۹۱ درصد در ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاترین قدرت کاهندگی در FRAP ۰/۷۸۱ در ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (جذب در ۶۰۰ نانومتر) بوده است. مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی BHA در غلظت ۰/۰۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۳۹/۷۸ درصد و ۳/۶۵ بوده است. مقدار IC50 برای مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی پلی‌ساکاریدهای کلرلا ولگاریس به‌ترتیب ۲۲/۳۴۲ و ۴۵/۷۹ بود. همچنین پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* دارای اثر بازدارندگی ۲۱ درصد بر *E. coli* در مقایسه با کشت شاهد پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون بود. پلی‌ساکاریدهای ریزجلبک *C. vulgaris* حاوی طیف گسترده‌ای از ترکیبات زیست فعال هستند و در مکمل‌های غذایی، واسطه موثری در از بین بردن رادیکال‌های آزاد خواهند بود و می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و دارویی بکار روند.

لغات کلیدی: پلی‌ساکاریدها، *Chlorella vulgaris*، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت آنتی باکتریال

*نویسنده مسئول

مقدمه

ریزجلبک‌ها منبع بالقوه‌ای برای به‌دست آوردن انواع ترکیبات فعال بیولوژیک هستند که می‌توانند موثرتر از کشت گیاهان سنتی باشند. تنوع زیستی بسیار زیاد و تنوع در ترکیب بیوشیمیایی زیست توده به‌دست‌آمده از کشت‌های کلرلا و ایجاد فناوری کشت در مقیاس بزرگ، امکان استفاده تجاری از این گونه را فراهم کرده است. بدین‌ترتیب، کشت این ریزجلبک انجام شده و منجر به تولید زیست‌توده برای تهیه غذا و نیز برای به‌دست آوردن ترکیبات طبیعی با ارزش بالا در بازار جهانی شده است. در میان ترکیبات متعددی که قبلاً استخراج شده‌اند می‌توان به اسیدهای چرب، کاروتنوئیدها، پلی‌ساکاریدهای سولفاته، ویتامین‌های مختلف و سایر ترکیبات زیست فعال طبیعی (آنتی اکسیدان‌ها، کاهش‌دهنده‌های کلسترول و ...) اشاره کرد که به دلیل خواص غذایی و دارویی می‌تواند به‌ویژه در توسعه غذاهای کاربردی کاربرد داشته باشد (Silva *et al*., 2019). جلبک ها امروزه کاربردهای فراوانی در زندگی انسان‌ها دارند که از جمله، برای تامین غذای انسان و حیوان و آبزیان، در صنایع بهداشتی و دارویی، در صنایع تصفیه فاضلاب و اخیراً برای تامین سوخت استفاده می شوند (Vazirzadeh and Moghadzadeh, 2018).

Chlorella یک ریزجلبک سبز تک سلولی از کلروفیتاست و در آب شیرین و دریایی وجود دارد. سرعت رشد سریع، مواد مغذی غنی، مواد فعال بیولوژیک گسترده و مقاومت در برابر شرایط رشد نامطلوب، *Chlorella* را به یکی از پرکاربردترین گونه‌های ریزجلبک‌ها تبدیل کرده است. ریزجلبک کلرلا به دلیل محتوای بالای پروتئین‌ها، فیبرهای غذایی، لیپیدها، ویتامین‌ها، کلروفیل ها و کاروتنوئیدها و فعالیت‌های بیولوژیک قوی مانند درمان فشار خون بالا و آماس‌زخمی‌روده و پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است. علاوه‌براین، این گونه دارای اثرات بسیار عالی تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد حساسیت، کاهش قند خون و کاهش چربی خون است. سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو)، ریزجلبک *Chlorella* را به عنوان یک غذای سالم سبز نام‌گذاری کرده است. سالانه هزاران تن *Chlorella* در آسیای شرقی، ایالات متحده و اروپا تولید می‌شود و به دلیل محتوای غذایی بالا و خواص مختلف این گونه برای ارتقاء سلامت، به عنوان غذای مکمل، محصولات غذایی یا دارو به فروش می‌رسد. *Chlorella* حاوی مقدار زیادی کربوهیدرات است که گروهی از قندهای احیاءکننده و پلی‌ساکاریدها هستند. پلی‌ساکاریدها از منابع طبیعی مشخص شده است که دارای مزایای بیولوژیک مختلفی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد توموری، تعدیل کننده ایمنی و ضد میکروبی بدون سمیت یا کم هستند (Yuan *et al*., 2020).

از آن‌جایی‌که جلبک‌ها موجودات فتوسنتزی هستند، هنگامی که در معرض غلظت‌های زیاد اکسیژن و نور قرار گیرند، رادیکال‌های آزاد و سایر معرف‌های اکسیداتیو را تولید می‌کنند. به دلیل عدم آسیب ساختاری، به‌نظر می‌رسد که این موجودات قادر به تولید ترکیبات لازم برای محافظت از خود در برابر اکسیداسیون هستند. از این‌رو، جلبک‌ها به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی قوی در نظر گرفته می‌شوند که می‌تواند برای محافظت از بدن ما در برابر اثرات مخرب گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر تولیدی درنتیجه متابولیسم طبیعی بدن نیز مناسب باشد (Soleimani *et al*., 2022). Chen و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلی‌ساکاریدهای *pyrenoidosa Chlorella* و اثرات ضد پیری آن در مگس سرکه *Drosophila melanogaster*، بیان کردند که سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی آزمایشگاهی نشان داد که پلی‌ساکاریدهای خالص *Chlorella pyrenoidosa* می‌توانند به طور موثری رادیکال‌های هیدروکسیل، ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل و سوپراکسید را با اثر قوی‌تر بر رادیکال‌های هیدروکسیل از بین ببرند.

مطالعات Hussein و همکاران (۲۰۱۸) درخواص ضد باکتریایی کلرلا ولگاریس جدا شده از آبهای آلوده در عراق، نشان داد که ترکیبات فعال زیستی خام *Chlorella vulgaris* دارای طیف وسیعی از خواص ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت جدا شده از پوسیدگی دندان بودند. این بررسی نشان داد که اثر ترکیبات فعال زیستی خام در *Chlorella vulgaris* تأثیر مشخصی

بر اشکال مختلف زندگی بیماری‌زا در غلظت‌های بالا دارد. ترکیبات فعال زیستی خام استخراجی از *Chlorella vulgaris*، خواص ضد باکتریایی موثری در برابر پاتوژن های گرم منفی و گرم مثبت نشان داده‌اند به‌جز *Klebsiella* (نام یک سر رده از تیره Enterobacteriaceae) که در غلظت‌های مختلف مقاوم‌تر بوده است (Hussein *et al*., 2018). Song و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقات خود با عنوان "بهینه‌سازی استخراج، خالص‌سازی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات ساختاری اولیه پلی‌ساکارید خام از جنس *Chlorella*" بیان کردند که پلی‌ساکارید مشتق از منابع دریایی (جلبک دریایی)، ممکن است از پتانسیل استفاده در صنایع غذایی و دارویی برخوردار باشد. وجود گروه‌های سولفات در پلی‌ساکاریدهای جلبک دریایی نقش مهمی در افزایش فعالیت‌های آنتی اکسیدانی ایفاء می‌کند (Song *et al*., 2018). تحقیقات Acurio و همکاران (۲۰۱۸) در پتانسیل ضد میکروبی جلبک *Chlorella* جدا شده از آبهای انباشته منطقه Andean (اکوادور)، در ابتدا جداسازی ریزجلبک‌ها را مشخص کردند و در مرحله دوم استخراج کلرلین را به عنوان یک متابولیت ضد میکروبی انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که کلرلین استخراجی از *Chlorella* دارای یک ظرفیت ضد میکروبی ضروری در برابر باکتری‌های جدا شده از دست بود. ظرفیت ضد میکروبی با آمپی سیلین و اگزاسیلین برای مهار گونه‌های استافیلوکوک برابر بود (Acurio *et al*., 2018). مطالعات Elsalhin و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه ضد باکتریایی *Chlorella vulgaris* جدا شده از آب شیرین گزارش دادند که عصاره استخراجی از *Chlorella vulgaris* به منظور بررسی کارایی آن در برابر چهار سویه باکتریایی (*Achromobacter* sp، *Staphylococcus* sp، *Escherichia coli* و *Shigella dysenteriae*) به روش انتشار دیسکی مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره با غلظت‌های مختلف از ریزجلبک *Chlorella vulgaris* (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) استفاده شد. نتایج نشان داد که ۷۵ درصد عصاره در برابر *E. coli* و پس از آن غلظت ۲۵ درصد در برابر جنس *Achromobacter* معنی‌دار بود، اما کمترین معنی‌داری در برابر جنس *Staphylococcus* در غلظت ۱۰۰ درصد بود. فعالیت ضد میکروبی عصاره *Chlorella vulgaris* بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش بود (Elsalhin *et al*., 2019).

Chlorella vulgaris یک میکروجلبک سبز تک سلولی است که در آب شیرین و اکوسیستم‌های دریایی یافت شده و زیاد به عنوان علوفه، دارو و افزودنی غذا استفاده می‌شود. فعالیت‌های آنتی اکسیدانی پروتئین‌های *Chlorella vulgaris* نیز به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. با این‌حال، مطالعات اندکی از خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها در *Chlorella vulgaris* وجود دارد. بنابراین، روش آب داغ برای استخراج پلی‌ساکاریدهای *Chlorella vulgaris* مورد استفاده قرار گرفته و فعالیت‌های بیولوژیک آنها از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه، فرآیند استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب زیست توده خشک *Chlorella vulgaris* به روش آب داغ انجام گرفته و در واقع، جلبک کشت داده شده با محیط کشت مناسب و بهینه، برای انجام این کار مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب *Chlorella vulgaris*

روش آب داغ برای استخراج پلی‌ساکاریدهای *Chlorella vulgaris* مورد استفاده قرار گرفت و اثرات آنتی اکسیدانی آنها در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از دو شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک)(FRAP) مورد ارزیابی قرار گرفتند (Wang *et al*., 2018; Yu *et al*., 2019).

روش آب داغ

ابتدا سوسپانسیون ۲/۵درصدی از جلبک در آب تهیه شد و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بن ماری به مدت ۸ ساعت با دور بالا شیک شد. سوسپانسیون حاصله، در ۵۰۰۰ دور در

دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی به‌دست آمده تغلیظ شد (جهت غلیظ شدن نمونه پلی‌ساکارید رو در بن ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا زمانی‌که به یک سوم حجم اولیه برسد). به مایع تغلیظ شده، ۵ برابر اتانول ۹۵ درصد اضافه شده و بعد از قرار دادن در فریزر به مدت یک شب، مجدداً سانتریفوژ (در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده) شدند. رسوب حاصله با استفاده از استن شسته شده و بعد از حلال پراکنی (Suctionfiltered)، میزان پلی‌ساکارید محاسبه می‌شود (Wang *et al.*, 2018):

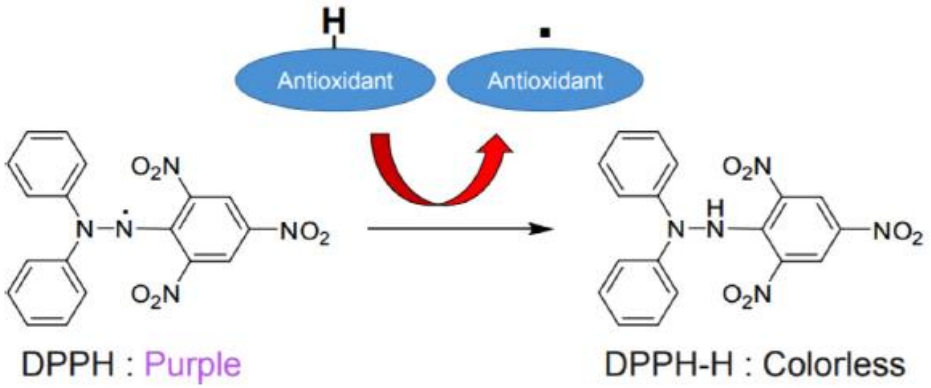
میزان استخراج پلی‌ساکارید (درصد)= (وزن پلی‌ساکارید / وزن خشک پودرکلرلا× ۱۰۰)

خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید جلبک *Chlorella vulgaris*

جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانی متابولیت های استخراجی، از دو شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک) (FRAP) استفاده شد. غلظت‌های مختلف (۶، ۳، ۱/۵، ۰/۷۵ و ۰/۳۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از پلی‌ساکارید جلبک ***Chlorella***، بعد از آماده سازی مواد و معرف‌ها در هر روش، جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج خواص آنتی اکسیدانی پلی‌ساکارید با آنتی اکسیدان مصنوعی هیدروکسی آنیزول بوتیله (BHA) مقایسه شد.

قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

رادیکال آزاد DPPH یک رادیکال نیتروژن آلی با عمر طولانی با رنگ بنفش تیره است. هنگامی که یک محلول DPPH با یک آنتی‌اکسیدان مخلوط می‌شود، رنگ آن از بنفش به زرد هیدرازین مربوطه تبدیل می‌شود (شکل ۱). توانایی کاهشی آنتی اکسیدان‌ها نسبت به DPPH را می‌توان با نظارت بر کاهش جذب آن در طول موج ۵۲۸-۵۱۵ نانومتر ارزیابی کرد. نتایج به عنوان IC50 (غلظتی از عصاره که منجر به ۵۰٪ مهار رادیکالی شود) یا ٪ حذف DPPH در غلظت آنتی اکسیدانی ثابت برای همه نمونه‌ها بیان می‌شود (Xiao *et al.*, 2020).



شکل ۱: واکنش بین DPPH• و آنتی اکسیدان برای تشکیل DPPH (Xiao *et al.*, 2020)

Figure 1: Reaction between DPPH• and antioxidant to form DPPH (Xiao *et al.*, 2020)

فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH با توجه به مطالعه Xiao و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد. ۷/۸۹ میلی‌گرم DPPH با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۹/۹۵ درصد حل شده و در نهایت به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH با ۸۰۰ میکرولیتر بافر (Tris-HCl pH 7.4) در یک لوله آزمایش اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمونه آزمایشی (پلی‌ساکارید جلبک *Chlorella*) اضافه شده و به سرعت مخلوط شد. محلول به مدت ۳۰

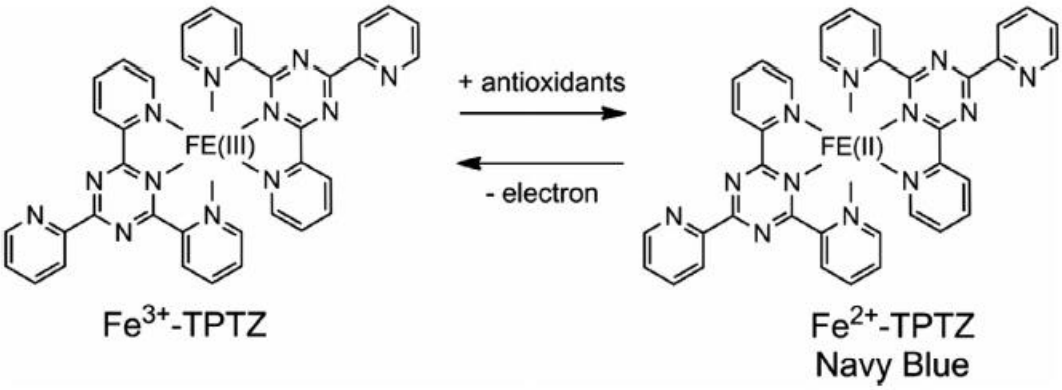
دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شده و جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از یک میکروپلیت خوان (Thermo Fisher, Multiskan Go) اندازه‌گیری شد. محلول مخلوط با ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول و ۸۰۰ میکرولیتر بافر (Tris-HCl pH 7.4) به عنوان بلانک استفاده شد. نسبت مهاری (٪) از معادله ذیل به‌دست آمد:

(A1 - A2) × ۱۰۰/A1 = نسبت مهاری (٪)

A1: جذب افزودن اتانول به جای نمونه پلی‌ساکارید، A2: جذب محلول نمونه پلی‌ساکارید

قدرت احیاءکنندگی یون آهن (III)

سنجش FRAP بر اساس کاهش یون Fe^{3+} –TPTZ (2,4,6-tri(2- pyridyl)-1,3,5-triazine) برای تولید Fe^{2+}-TPTZ به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌هاست. اتصال Fe^{2+} به لیگاند یک رنگ آبی سرمه‌ای بسیار شدید ایجاد می‌کند (شکل ۲). جذب در ۵۹۳ نانومتر را می‌توان برای آزمایش میزان کاهش آهن اندازه‌گیری کرد که می‌تواند با مقدار آنتی اکسیدان‌ها مرتبط باشد.



شکل ۲: تشکیل کمپلکس (Fe2+–TPTZ) از کمپلکس (Fe3+–TPTZ) به‌وسیله آنتی اکسیدان های تعیین خواص ضد باکتریایی (Xiao *et al.*, 2020)

Figure 2: Formation of (Fe2+–TPTZ) complex from (Fe3+–TPTZ) complex by antioxidants Determination of antibacterial properties (Xiao *et al.*, 2020)

در یک صفحه ۹۶ چاهی، ۱۸۰/۰ میکرولیتر محلول کاری FRAP و ۵ میکرولیتر نمونه پلی‌ساکارید جلبک *Chlorella* اضافه شده، خوب تکان داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. Trolox به عنوان استاندارد و آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. غلظت Trolox تحت شرایط مقدار جذب از ۲/۸-۰/۰ برای رسم منحنی استاندارد انتخاب شد (Xiao *et al.*, 2020).

محاسبه IC50

IC50 (غلظتی از عصاره که منجر به ۵۰٪ مهار رادیکالی شود) هر نمونه تحلیلی طبق روش ذیل محاسبه شد:

نسبت‌های مهارکنندگی (y) در برابر غلظت نمونه پلی‌ساکارید (x) در هر شش نقطه رسم شد و خط رگرسیون مربوطه (y = ax + b) ترسیم شد. خط رگرسیون برای عبور از مبدأ لازم نبود. در واقع، چون منحنی بازداری کاملاً مستقیم نبود، اما کمی منحنی است، می‌توان مقدار IC50 را با استفاده از روش درون‌یابی با پیوستن دو نقطه در اطراف مهار ۵۰٪ با یک خط مستقیم به صورت ذیل محاسبه نمود: دو نقطه دربرگیرنده نسبت بازداری ۵۰٪ انتخاب شدند و یک خط رگرسیون (Y = AX + B) رسم شد. خط رگرسیون برای عبور از مبدأ لازم نبود. X (غلظت نمونه) با جایگزینی مقدار Y با عدد ۵۰ در معادله رگرسیون Y=AX + B محاسبه شد (Xiao *et al*.2020).

خواص ضد باکتریایی

خواص ضد باکتریایی پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* بر اساس روش Sedighi و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییر تعیین شد. فعالیت ضد باکتریایی پلی‌ساکارید ها بر علیه E. *coli* sp. مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، *E. coli* در محیط Liquid broth (۱۰ گرم در لیتر تریپتون، ۱۰ گرم در لیتر NaCl، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. ۵۰ میکرولیتر از پلی‌ساکارید را به ۲۰۰ میکرولیتر به کشت باکتریایی اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان دادن انکوبه شد. اثر بازدارندگی در فواصل زمانی منظم بر اساس چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Sedighi *et al*., 2016).

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد .میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم افزارExcel نسخه ۱۰ محاسبه شد. از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 18 برای آنالیز داده‌ها و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید

نتایج

نتایج مربوط به تعیین تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Chlorella vulgaris* در جدول ۱ نشان داده شده است. استخراج پلی‌ساکارید خام از *Chlorella vulgaris* با استفاده از روش آب داغ انجام شد. بازده پلی‌ساکارید خام تقریباً ۵ درصد وزن خشک به‌دست آمد. پودر پلی‌ساکارید به‌دست آمده از جلبک *Chlorella vulgaris* در شکل ۳ نشان داده شد.

جدول ۱: ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Chlorella vulgaris*

Table 1: Biochemical compounds of *Chlorella vulgaris* algae

	Biochemical compounds	Amounts (%)
1	Crude protein (%)	0.05±47.02
2	Carbohydrates (%)	0.09±19.08
3	Lipid (%)	0.07±12.52
4	Humidity (%)	0.03±4.67
5	Ash (%)	0.04±7.45

داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف از معیار است (n=۳).

Data are based on mean ± standard deviation (n = 3).

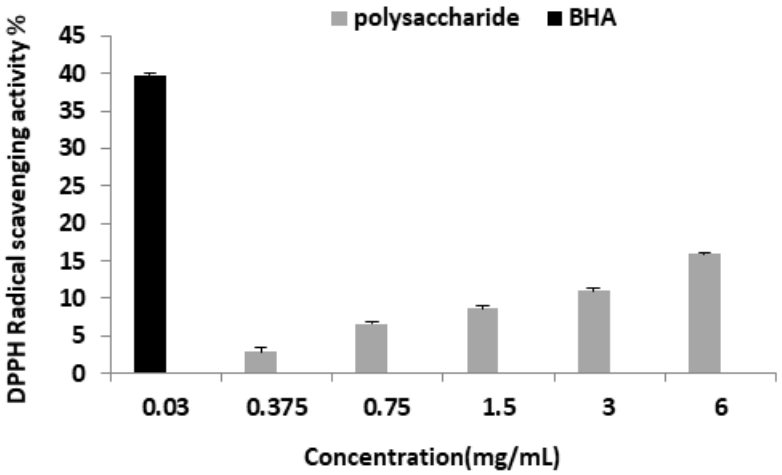
شکل ۳: پودر پلی‌ساکارید استخراجی از *Chlorella vulgaris*

Figure 3: Polysaccharide powder extracted from *Chlorella vulgaris*

خواص آنتی اکسیدانی

قدرت مهار رادیکال آزادDPPH

در شکل ۴ پلی‌ساکاریدهای استخراجی از جلبک *Chlorella vulgaris* در ۵ غلظت ۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهار رادیکال DPPH (۲/۸۴±۰/۵)، ۶/۵۹±۰/۳۶۷، ۸/۵۹±۰/۳۴۴، ۱۰/۹۸±۰/۳۲۷، ۱۵/۹۱±۰/۰۹۱) را به‌ترتیب داشت ($p<0/05$). آنتی اکسیدان سنتزی BHA با غظت ۰/۰۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای قدرت مهار رادیکال DPPH ۳۹/۷۸±۰/۲۷۷ بود ($p>0/05$). IC50 ۲۲/۳۴۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

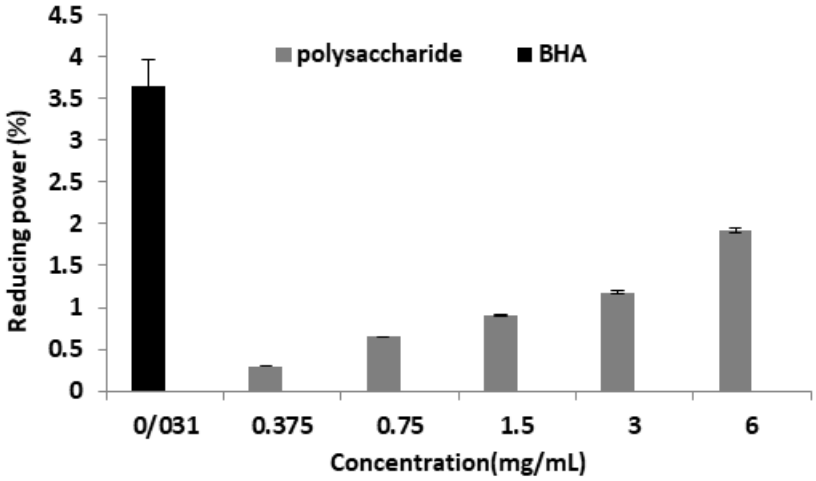


شکل ۴: فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزادDPPH پلی‌ساکاریدهای به‌دست آمده از جلبک *Chlorella vulgaris*

Figure 4: DPPH free radical inhibitory activity of polysaccharides obtained from *Chlorella vulgaris* Algae

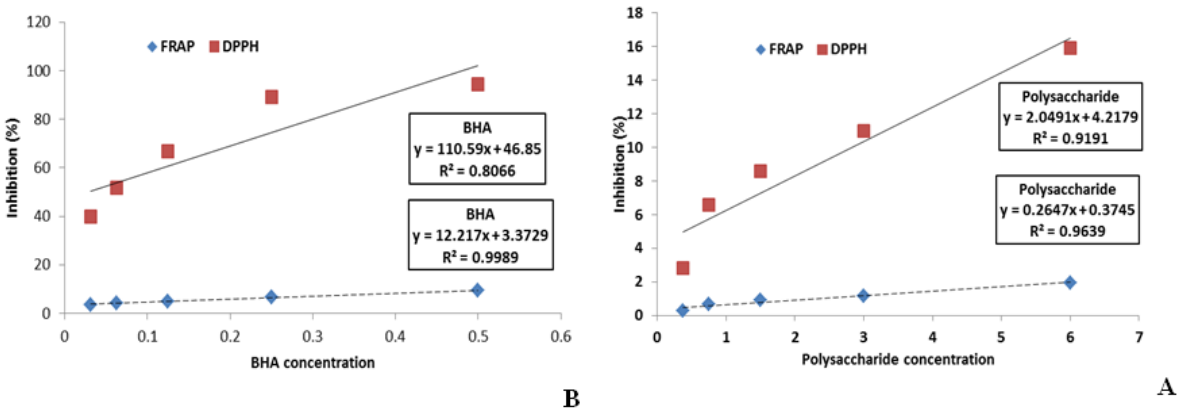
قدرت احیاءکنندگی یون آهن

مطابق شکل ۵ پلی‌ساکاریدهای استخراجی از جلبک *Chlorella vulgaris* در ۵ غلظت ۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای قدرت احیاءکنندگی (۱/۹۲۸±۰/۰۲۷، ۱/۱۷۷±۰/۰۱۷، ۰/۹۰۳±۰/۰۱۳، ۰/۶۴۵±۰/۰۰۹، ۰/۷۸۱±۰/۰۵۴) به‌ترتیب بود ($p<0/05$). BHA با غلظت ۰/۰۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای قدرت کاهندگی آهن سه‌ظرفیتی ۳/۶۵±۰/۳۲۴ بودند ($p>0/05$). IC50 ۱۸۷/۴۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۶ و جدول ۲).



شکل ۵: درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد FRAP پلی‌ساکاریدهای به‌دست آمده از *Chlorella vulgaris*. BHA به عنوان استاندارد مورد استفاده

Figure 5: FRAP free radical inhibition percentage of polysaccharides obtained from *Chlorella vulgaris*. BHA was used as standard



شکل ۶: نمودار همبستگی بین DPPH و فعالیت کاهندگی الف) پلی‌ساکاریدهای *Chlorella vulgaris*، ب) BHA با تجزیه و تحلیل رگرسیون

Figure 6: Correlation diagram between DPPH and reducing activity A: *Chlorella vulgaris* polysaccharides B: BHA by regression analysis

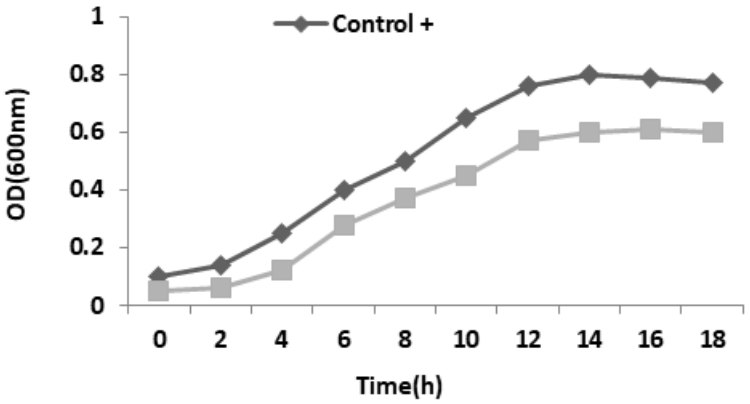
جدول ۲: مقدار IC50 فعالیت‌های مهار رادیکال‌های آزاد پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris*

Table 2: IC50 value of free radical scavenging activities of *Chlorella vulgaris* polysaccharide

Parameters	IC50 (mg/mL)	
	BHA	*Chlorella vulgaris*
DPPH free radical inhibition power	0.028	22.342
The reducing power	3.816	45.79

خواص آنتی باکتریال

پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* دارای اثر بازدارندگی ۲۱ درصد بر *E. coli* در مقایسه با کشت شاهد پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون بود و توانست منحنی رشد *E. coli* را تغییر دهد (شکل ۷).



شکل ۷: منحنی رشد *E. coli* برای تعیین فعالیت ضد میکروبی پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris*

Figure 7: *E. coli* growth curve to determine the antimicrobial activity of *Chlorella vulgaris* polysaccharide

بحث

در میزان تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی پروتئین دارای بالاترین مقدار (۰/۰۵± ۴۷/۰۲ درصد)، بعد کربوهیدرات (۰/۰۹± ۱۹/۰۸ درصد) و لیپید (۰/۰۷± ۱۲/۵۲ درصد) بودند که Prabakaran و همکاران (۲۰۱۹) ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Chlorella* را به صورت محتوای

پروتئین برای ۴۵/۲۳ درصد، به دنبال کربوهیدرات (۲۳/۴۳ درصد) و چربی کل (۱۸/۱۲ درصد) تخمین زدند (Prabakaran *et al*., 2019).

El-Naggar و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند که کربوهیدرات‌ها در دیواره‌های سلولی به عنوان اجزاء ساختاری و در سلول به عنوان ترکیبات ذخیره شده عمل می‌کنند (El-Naggar *et al*., 2020). بازده استخراج و زیست فعالی پلی‌ساکاریدها در میان گونه‌های مختلف *Chlorella* متفاوت است. در مطالعه حاضر، بازده پلی‌ساکارید خام که به روش آب داغ انجام شد، تقریباً ۵ درصد وزن خشک به‌دست آمد. درصورتی‌که در مطالعه Song و همکاران (۲۰۱۸) بازده پلی‌ساکارید خام از *Chlorella* sp. تقریباً ۹/۶۲ درصد وزن خشک به‌دست آمد. DPPH یک رادیکال شناخته شده است که به طور گسترده برای ارزیابی توانایی‌های مهار رادیکال ترکیبات طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. DPPH یک رنگ بنفش پر رنگ در محلول به‌خود می‌گیرد و دارای یک نوار جذب قوی در مرکز حدود ۵۱۷ نانومتر است. این رنگ در حضور آنتی اکسیدان‌ها محو می‌شود. در این مطالعه، سرعت مهار رادیکال DPPH با BHA مقایسه شد و نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که فعالیت مهاریDPPH، درغلظت‌های مختلف پلی‌ساکاریدهای استخراجی از جلبک *Chlorella vulgaris* در دامنه ۶-۰/۳۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که وابسته به دوز بود، افزایش یافت و بالاترین فعالیت مهار DPPH ۱۵/۹۱ درصد در ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۲۳) بر بررسی خصوصیات پلی‌ساکاریدهای استخراجی از *Chlorella* sp. به روش استخراج آب گرم و قلیایی، به این نتیجه رسیدند که تعیین شرایط استخراج پلی‌ساکاریدهای *Chlorella* باید تأثیر زیاد خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی را در نظر گرفت (Liu *et al*., 2023).

قدرت کاهندگی یک سنجش آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی مهم است. در اینجا قدرت آنتی اکسیدانی بر اساس توانایی کاهش آهن در یک واکنش رنگ‌سنجی مرتبط با ردوکس است که شامل انتقال تک الکترون است. قدرت کاهندگی پلی‌ساکاریدهای استخراجی از جلبک *Chlorella vulgaris* در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و مقادیر جذب تمام نمونه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است. قدرت کاهندگی پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* با افزایش غلظت افزایش یافت. در این تحقیق بالاترین قدرت کاهندگی ۰/۷۸۱ در ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (جذب در ۶۰۰ نانو متر) بوده است. روش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کاهندگی آهن یک سنجش کمی است که برای اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید محلول *Chlorella vulgaris* استفاده شد. این بر اساس احیاء فری سیانید به فرو سیانید (مشتق آهنی Fe^{2+}) ، در حضور پلی‌ساکارید محلول *Chlorella vulgaris* است. سپس فروسیانید با کلرید آهن واکنش می‌دهد تا مجتمع آهن-آهن را تشکیل دهد که به صورت رنگ‌سنجی با حداکثر جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده می‌شود (El-Naggar *et al*., 2020). Wang و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی رابطه مستقیم و مثبتی با پتانسیل کاهندگی دارد که به نوع قند، وزن مولکولی، درجه سولفاته شدن و موقعیت استیلاسیون و انشعاب گلیکوزیدی بستگی دارد (Wang *et al*., 2008). در نتیجه، پتانسیل آنتی اکسیدانی پلی‌ساکارید محلول *Chlorella vulgaris* را می‌توان به کسر سولفاتی پلی‌ساکاریدها نسبت داد که به خواص آنتی اکسیدانی کمک می‌کند (El-Naggar *et al*., 2020).

Pulz و Gross (۲۰۰۴) نشان دادند که ریزجلبک ها در معرض تنش‌های رادیکال و اکسیداتیو قرار دارند. در نتیجه، کمپلکس‌های آنتی‌اکسیدانی از سلول‌های خود در برابر استرس‌های اکسیداتیو رادیکال آزاد دفاع می‌کنند (Pulz and Gross, 2004).

با توجه به شکل ۷، پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* دارای اثر بازدارندگی ۲۱ درصد بر *E. coli* در مقایسه با کشت شاهد پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون بود. در تحقیق Mirzadeh و همکاران (۲۰۲۰) بیان شد که مهم‌ترین مکانیسم‌های دخیل در فعالیت ضد باکتریایی پلی‌ساکاریدها شامل تغییر نفوذپذیری غشاء، تخریب ساختاری پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، مهار عملکرد آنزیم‌ها، جلوگیری از سنتز اسیدهای نوکلئیک و افزایش آسیب دیواره سلولی، بود. نتایج مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که

پلی‌ساکارید *Cordyceps cicadae* با آسیب رساندن به دیواره سلولی و غشاء سلولی باکتری، فعالیت باکتری‌کشی خود را اعمال می‌کند و نفوذپذیری سلولی را افزایش می‌دهد که منجر به ضایعات ساختاری و آزاد شدن اجزای سلولی شده و در نتیجه، منجر به مرگ سلولی می‌شود.

در این مطالعه ترکیب شیمیایی *Chlorella vulgaris* مشخص گردید و پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* به روش آب داغ استخراج شد. پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* خاصیت آنتی باکتریال داشت و توانست منحنی رشد *E. Coli* را تغییر دهد. این پلی‌ساکاریدهای مورد بررسی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بودند. بنابراین، پلی‌ساکاریدهای ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در مکمل‌های غذایی، واسطه موثری در از بین بردن رادیکال‌های آزاد خواهند بود، زیرا حاوی طیف گسترده‌ای از ترکیبات زیست فعال هستند و می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و دارویی بکار روند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از مجموعه همکاران پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به جهت در اختیار قراردادن تجهیزات آزمایشگاهی و حمایت مالی و از همکاران انستیتو پاستور شمال برای انجام آزمایش‌های تکمیلی، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Acurio, L.P., Salazar, D.M., Valencia, A.F., Robalino, D.R., Barona, A.C., Alvarez, F.C. and Rodriguez, C.A., 2018. Antimicrobial potential of *Chlorella* algae isolated from stacked waters of the Andean Region of Ecuador. IOP Conference Series, *Earth and Environmental Science.*, Iop Publishing, 151:012040. DOI:10.1088/1755-1315/151/1/012040

Chen, Y., Liu, X., Wu, L., Tong, A., Zhao, L., Liu, B. and Zhao, C., 2018. Physicochemical characterization of polysaccharides from Chlorella pyrenoidosa and its anti-ageing effects in *Drosophila melanogaster*. *Carbohydrate Polymers*, 185:120-126. DOI:org/10.1016/j.carbpol.2017.12.077

El-Naggar, N.E.A., Hussein, M.H., Shaaban-Dessuuki, S.A. and Dalal, S.R., 2020. Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. *Scientific Reports*, 10(1):3011.

Elsalhin, H.E. and Abobaker, H.M., 2019. Antibacterial study of *Chlorella vulgaris* isolated from fresh water. *EPH-International Journal of Applied Science*, 5(3):23-27. DOI:org/10.53555/eijas.v5i3.115

Hussein, H.J., Naji, S.S. and Al-Khafaji, N.M.S., 2018. Antibacterial properties of the *Chlorella vulgaris* isolated from polluted water in Iraq. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(10):2457-2460.

Liu, F., Chen, H., Qin, L., Al-Haimi, A.A.N.M., Xu, J., Zhou, W., Zhu, S. and Wang, Z., 2023. Effect and characterization of polysaccharides extracted from *Chlorella sp.* By hot-water and alkali extraction methods. *Algal Research*, 70:102970. DOI:org/10.1016/j.algal.2023.102970

Mirzadeh, M., Arianejad, M.R. and Khedmat, L., 2020. Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate olymers*, 229:115421. DOI:org/10.1016/j.carbpol.2019.115421

Prabakaran, G., Moovendhan, M., Arumugam, A., Matharasi, A., Dineshkumar, R. and Sampathkumar, P., 2019. Evaluation of chemical composition and *in vitro* antiinflammatory effect of marine microalgae *Chlorella vulgaris*. *Waste and Biomass Valorization*, 10:3263-3270. DOI:10.1007/s12649-018-0370-2

Pulz, O. and Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65:635-648. DOI:10.1007/s00253-004-1647-x

Sedighi, M., Jalili, H., RANAEI, S.S.O. and Amrane, A., 2016. Potential health effects of enzymatic protein hydrolysates from *Chlorella vulgaris*. *Applied Food Biotechnology*, 3(3):160-169.

Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Reboleira, J., Pedrosa, R. and Bernardino, S., 2019. *Chlorella*. *In Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements*. Academic Press. Part 3 Plant and Algae Extracts, pp. 187-193. DOI:10.1016/B978-0-12-812491-8.00026-6

Soleimani, S., Yousefzadi, M. and Arman, M., 2022. Antioxidant compounds in seaweed and their use in different industries. *Journal of Plant Process and Function*, 1:77-98. [In Persian]

Song, H., He, M., Gu, C., Wei, D., Liang, Y., Yan, J. and Wang, C., 2018. Extraction optimization, purification, antioxidant activity, and preliminary structural characterization of crude polysaccharide from an arctic *Chlorella sp*. *Polymers*, 10(3):292. DOI:org/10.3390/polym10030292

Vazirzadeh, A. and Moghadzadeh, H. 2018. Optimizing the growth and amount of fat and chlorophyll of the microalgae Chlorella vulgaris in different levels of nitrogen, phosphorus and photoperiod using central composite design (CCD). *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 27(3):85-95. DOI:10.22092/ISFJ. 2018.117018

Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z. and Li, Z., 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2):127-132. DOI:org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.003

Xiao, F., Xu, T., Lu, B. and Liu, R., 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1):60-69. DOI:10.1002/fft2.10

Yu, M., Chen, M., Gui, J., Huang, S., Liu, Y., Shentu, H., He, J., Fang, Z., Wang, W. and Zhang, Y., 2019. Preparation of Chlorella vulgaris polysaccharides and their antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137:139-150. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.06.222

Yuan, Q., Li, H., Wei, Z., Lv, K., Gao, C., Liu, Y. and Zhao, L., 2020. Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163: 2199-2209. DOI:org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.080

Zhang, Y., Wu, Y.T., Zheng, W., Han, X.X., Jiang, Y.H., Hu, P.L., Tang, Z.X. and Shi, L.E., 2017. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*. *Journal of Functional Foods*, 38:273-279. DOI:org/10.1016/j.jff.2017.09.047

Antioxidant and antibacterial activities of the polysaccharides extracted from *Chlorella vulgaris in vitro*

Yaghoubzadeh Z.[1*]; Safari R.[1]

* za_yaghoub@yahoo.com

1-Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

Abstract

Chlorella vulgaris is a freshwater green microalgae, which is a rich source of novel structural and biologically active metabolites. In this research, the extraction of *Chlorella vulgaris* polysaccharides was done by hot water method and the crude polysaccharide yield was approximately 5% of dry weight. Antioxidant activity of the polysaccharide extracted by the methods of inhibiting 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH) and reducing power in 5 concentrations (0.375, 0.75, 1.5, 3 and 6 mg/ml) was investigated. The obtained polysaccharides had antioxidant activity. The highest DPPH inhibition activity was 15.91% at 6 mg/ml and the highest reducing power was 0.781 at 6 mg/ml (absorbance at 600 nm). DPPH free radical inhibition and BHA reduction power at the concentration of 0.031 mg/ml were 39.78% and 3.65, respectively. The value of IC50 for DPPH free radical inhibition and reducing power of *Chlorella vulgaris* polysaccharides was 22.342 and 45.79, respectively. Also, the polysaccharide of *Chlorella vulgaris* had an inhibitory effect of 21% on *E. coli* compared to the control culture after 18 hours of incubation. *C. vulgaris* microalgae polysaccharides contain a wide range of bioactive compounds, in food supplements they will be an effective mediator in scavenging free radicals and have the potential to be created as natural antioxidants for use in food and medicine industries.

Keywords: Polysaccharides, *Chlorella vulgaris*, Antioxidant activity, Antibacterial activity

*Corresponding author