



مقاله علمی - پژوهشی:

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

زهرا یعقوب زاده^{*}، 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 پذیرش: آذر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: آبان 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 به دست آمد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 به دست آمده دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 به ترتیب ۳۹/۷۸ درصد و ۳/۶۵ بوده است. مقدار IC50 برای مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی پلی‌ساکاریدهای کلرلا ولگاریس به ترتیب 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 آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنتی‌باکتریال

*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. بدین ترتیب، 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 (آنتی‌اکسیدان‌ها، 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). جلبک‌ها امروزه کاربردهای فراوانی در زندگی انسان‌ها دارند که از جمله، برای تامین غذای انسان و حیوان و آبیان، در صنایع بهداشتی و دارویی، در صنایع تصفیه فاضلاب و اخیراً برای تامین سوخت استفاده می‌شوند (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، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها و فعالیت‌های بیولوژیک قوی مانند درمان فشار خون بالا و آماس زخمی‌روده و پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است. علاوه‌براین، این گونه دارای اثرات بسیار عالی تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد حساسیت، کاهش قند خون و کاهش چربی خون است. سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فاو)، 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 آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد توموری، تعدیل‌کننده ایمنی و ضد میکروبی بدن سمیت یا کم هستند (Yuan et al., 2020).

از آنجایی که 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 آنتی‌اکسیدانی قوی در نظر گرفته می‌شوند که می‌تواند برای محافظت از بدن ما در برابر اثرات مخرب گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر تولیدی در نتیجه متابولیسم طبیعی بدن نیز مناسب باشد (Soleimani et al., 2022). Chen و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی خصوصیات فیزیوشیمیایی پلی‌ساکاریدهای *Chlorella pyrenoidosa* و اثرات ضد پیری آن در مگس سرکه *Drosophila melanogaster*، بیان کردند که سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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) در خواص 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

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 آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های *Chlorella vulgaris* نیز به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال، 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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 ۲/۵ درصدی 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

بر اشکال مختلف زندگی بیماری‌زا در غلظت‌های بالا دارد. ترکیبات فعال زیستی خام استخراجی از *Chlorella vulgaris*، خواص ضد باکتریایی موثری در برابر پاتوژن‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان داده‌اند به جز *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 آنتی‌اکسیدانی 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 آمپی‌سیلین 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 (*Staphylococcus* sp, *Achromobacter* 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

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 (Suction filtered)، میزان پلی‌ساکارید محاسبه می‌شود (Wang *et al.*, 2018):

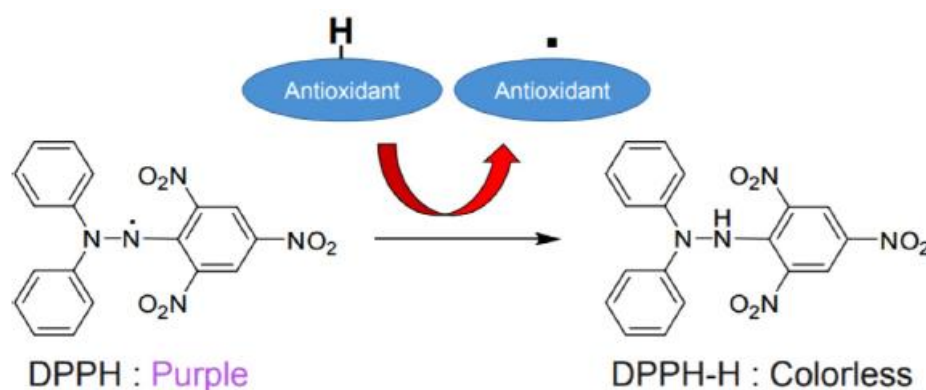
$$\text{میزان استخراج پلی‌ساکارید (درصد)} = (\text{وزن پلی‌ساکارید} / \text{وزن خشک پودر کلرلا} \times 100)$$

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 کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به DPPH را می‌توان با نظارت بر کاهش جذب آن در طول موج ۵۱۵-۵۲۸ نانومتر ارزیابی کرد. نتایج به عنوان IC_{50} (غلظتی از عصاره که منجر به ۵۰٪ مهار رادیکالی شود) یا % حذف DPPH در غلظت آنتی‌اکسیدانی ثابت برای همه نمونه‌ها بیان می‌شود (Xiao *et al.*, 2020).

خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید جلبک *Chlorella vulgaris*

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



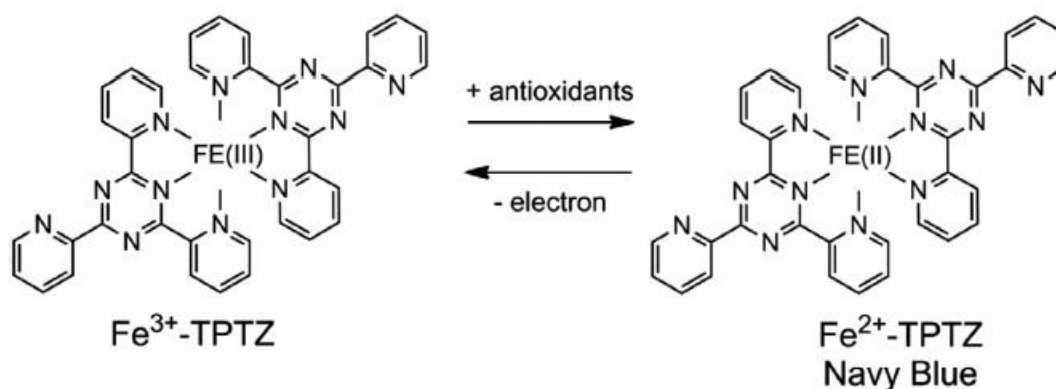
شکل ۱: واکنش بین DPPH• و آنتی‌اکسیدان برای تشکیل DPPH (Xiao *et al.*, 2020)
Figure 1: Reaction between DPPH• and antioxidant to form DPPH (Xiao *et al.*, 2020)

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

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

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 به وسیله آنتی اکسیدان‌هاست. 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 (Fe^{2+} -TPTZ) از کمپلکس (Fe^{3+} -TPTZ) به وسیله آنتی اکسیدان‌های تعیین خواص ضد باکتریایی (Xiao *et al.*, 2020)

Figure 2: Formation of (Fe^{2+} -TPTZ) complex from (Fe^{3+} -TPTZ) complex by antioxidants Determination of antibacterial properties (Xiao *et al.*, 2020)

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 بازداري کاملاً مستقیم نبود، اما کمی منحنی است، می‌توان مقدار IC_{50} 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 بازداري 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).

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 ۲/۸-۰/۱ برای رسم منحنی استاندارد انتخاب شد (Xiao *et al.*, 2020).

محاسبه IC_{50}

IC_{50} (غلظتی از عصاره که منجر به ۵۰٪ مهار رادیکالی شود) هر نمونه تحلیلی طبق روش ذیل محاسبه 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 \pm انحراف از معیار است (n=3).

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

شکل ۳: پودر پلی‌ساکارید استخراجی از *Chlorella vulgaris*Figure 3: Polysaccharide powder extracted from *Chlorella vulgaris*

خواص آنتی‌اکسیدانی

قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

در شکل ۴ پلی‌ساکاریدهای استخراجی از جلبک *Chlorella vulgaris* در ۵ غلظت ۰/۳۷۵، ۰/۱۷۵، ۰/۱۵، ۰/۰۷۵ و ۰/۰۳۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهار رادیکال DPPH (۲/۸۴±۰/۱۵، ۶/۵۹±۰/۳۶۷، ۸/۵۹±۰/۳۴۴، ۱۰/۹۸±۰/۳۲۷، ۱۵/۹۱±۰/۰۹۱) را به ترتیب داشت (p<۰/۰۵). آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA با غلظت ۰/۰۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای قدرت مهار رادیکال DPPH (۳۹/۷۸±۰/۲۷۷ بود (p>۰/۰۵). IC50 ۲۲/۳۴۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

خواص ضد باکتریایی

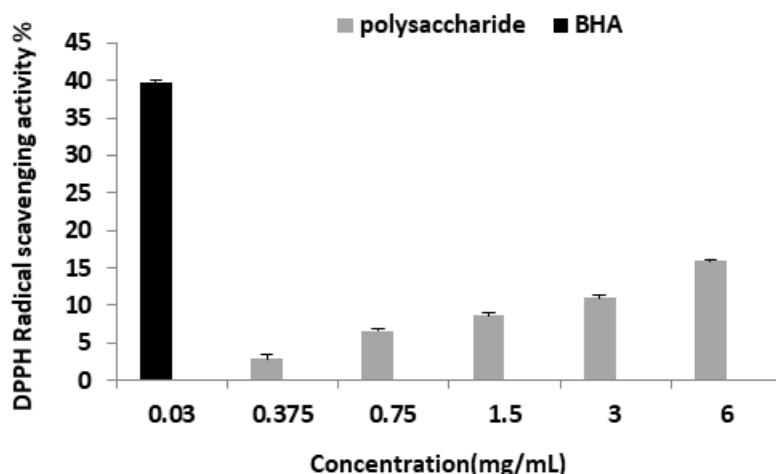
خواص ضد باکتریایی پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris* بر اساس روش Sedighi و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییر تعیین شد. فعالیت ضد باکتریایی پلی‌ساکاریدها بر علیه *E. coli* sp. مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ۱۰ گرم در محیط Liquid broth (۱۰ گرم در لیتر تریپتون، ۱۰ گرم در لیتر NaCl، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر) 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 آنکوبه شد. اثر بازدارندگی در فواصل زمانی منظم بر اساس چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Sedighi et al., 2016).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل 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 افزار Excel نسخه ۱۰ محاسبه شد. از نرم افزار آماری SPSS نسخه 18 برای آنالیز داده‌ها و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

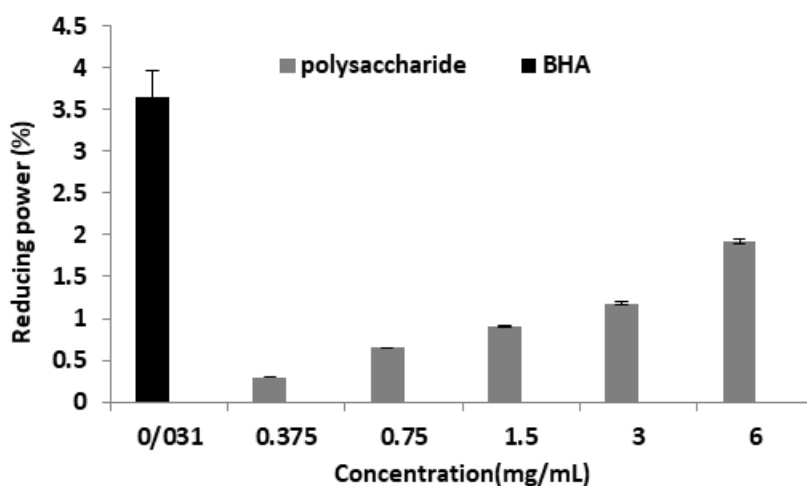
نتایج مربوط به تعیین تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Chlorella vulgaris* در جدول ۱ نشان داده شده است. استخراج پلی‌ساکارید خام از *Chlorella vulgaris* با استفاده از روش آب داغ انجام شد. بازده پلی‌ساکارید خام تقریباً ۵ درصد وزن خشک به دست آمد. پودر پلی‌ساکارید به دست آمده از جلبک *Chlorella vulgaris* در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



شکل ۴: فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH پلی ساکاریدهای به دست آمده از جلبک *Chlorella vulgaris*
 Figure 4: DPPH free radical inhibitory activity of polysaccharides obtained from *Chlorella vulgaris* Algae

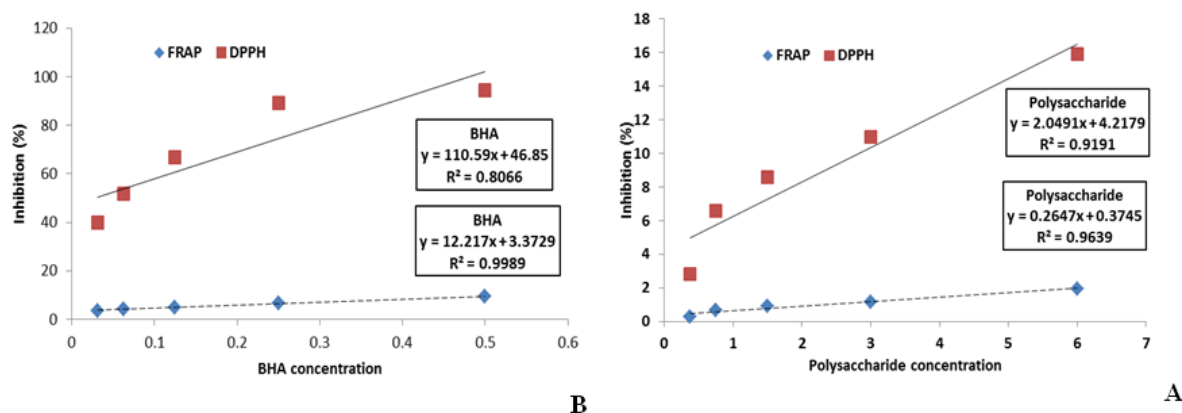
قدرت احیاءکنندگی یون آهن
 مطابق شکل ۵ پلی ساکاریدهای استخراجی از جلبک
Chlorella vulgaris در غلظت ۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و
 ۶ میلی گرم بر میلی لیتر دارای قدرت احیاءکنندگی
 (۰/۹۲۸±۰/۰۲۷)، (۱/۱۷۷±۰/۰۱۷)، (۰/۹۰۳±۰/۰۱۳)
 (۰/۶۴۵±۰/۰۰۹)، (۰/۷۸۱±۰/۰۵۴) به ترتیب بود (p<۰/۰۵).
 BHA با غلظت ۰/۰۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر دارای قدرت
 کاهندگی آهن سه ظرفیتی ۳/۶۵±۰/۳۲۴ بودند (p>۰/۰۵).
 IC50 ۱۸۷/۴۰۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود (شکل ۶ و
 جدول ۲).

شکل ۵: درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد FRAP پلی ساکاریدهای به دست آمده از *Chlorella vulgaris* BHA به عنوان استاندارد
 مورد استفاده



شکل ۵: درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد FRAP پلی ساکاریدهای به دست 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

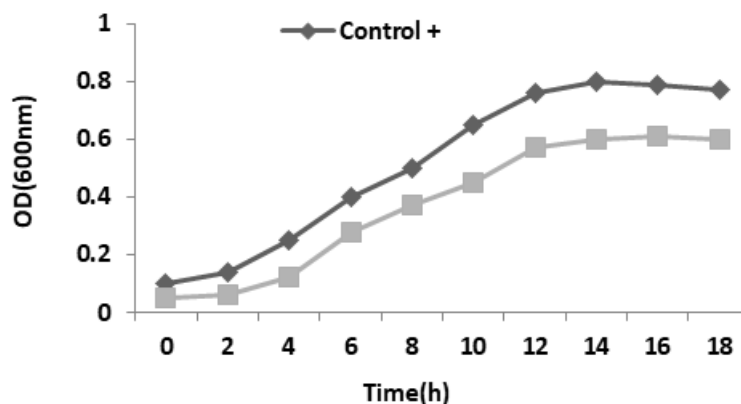
خواص آنتی‌باکتریال

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).

جدول ۲: مقدار IC_{50} فعالیت‌های مهار رادیکال‌های آزاد پلی‌ساکارید *Chlorella vulgaris*

Table 2: IC_{50} value of free radical scavenging activities of *Chlorella vulgaris* polysaccharide

| Parameters | IC_{50} (mg/mL) | |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------|
| | BHA | <i>Chlorella vulgaris</i> |
| DPPH free radical inhibition power | 0.028 | 22.342 |
| The reducing power | 3.816 | 45.79 |



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

($19/08 \pm 0/09$ درصد) و لیپید ($12/52 \pm 0/07$ درصد) بودند که Prabakaran و همکاران (۲۰۱۹) ترکیبات بیوشیمیایی جلبک *Chlorella* را به صورت محتوای

در میزان تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی پروتئین دارای بالاترین مقدار ($47/02 \pm 0/05$ درصد)، بعد کربوهیدرات

بحث

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 (Wang et al., 2020). همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم و مثبتی با پتانسیل کاهندگی دارد که به نوع قند، وزن مولکولی، درجه سولفات‌شدن و موقعیت استیل‌سیون و انشعاب گلیکوزیدی بستگی دارد (Wang et al., 2008). در نتیجه، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید محلول *Chlorella vulgaris* را می‌توان به کسر سولفاتی پلی‌ساکاریدها نسبت داد که به خواص آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند (El-Naggar et al., 2020).

Pulz و Gross (۲۰۰۴) نشان دادند که ریزجلبک‌ها 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

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 زیست‌فعالی 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. در صورتی‌که 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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 مهار DPPH، در غلظت‌های 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 آنتی‌اکسیدانی را در نظر گرفت (Liu et al., 2023).

قدرت کاهندگی یک سنجش آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی مهم است. در اینجا قدرت آنتی‌اکسیدانی 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*

- 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 polymers*, 229:115421.
DOI:org/10.1016/j.carbpol.2019.115421
- 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

- 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., RANAELI, 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