



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

اثر استفاده از پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از میکروجلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*)

سیده مریم علوی^۱، سکینه یگانه^۲، پرستو پورعاشوری^۳، مینا اسمعیلی خاریکی^۴، سروناز خلیلی تیلمی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
- ۲- استناد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
- ۳- دانشیار، گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ۴- استادیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
- ۵- استادیار، گروه میکروبیولوژی، تغذیه و رژیم درمانی، دانشکده کشاورزی، تغذیه و منابع طبیعی، دانشگاه علوم زیستی جمهوری چک، پراگ، کامبسکا ۱۲۹.

اطلاعات مقاله

چکیده

حدود دو دهه است که محققین به دنبال یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به منظور جایگزینی با انواع شیمیایی آن‌ها در فرمولاسیون مواد غذایی هستند تا از مضرات نگهدارنده‌های شیمیایی بکاهند. همچنین در راهکارهای نوین درمان سرطان، استفاده از ترکیبات ایمن طبیعی که هم توانایی نابودی سلول‌های سرطانی را داشته باشند و هم به سلول‌های سالم آسیب نرسانند، بسیار حائز اهمیت است. پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از جلبک‌ها می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان و یک ترکیب ضد سرطان طبیعی عمل کنند و روش استخراج از عوامل تعیین‌کننده در بروز خواص متعدد آن‌ها می‌باشد. هدف این تحقیق بررسی اثر استفاده از پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر بازده استخراج، میزان سولفات، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پلی‌ساکاریدهای کلرلا ولگاریس بود. به این منظور، توان ۳۰۰ وات و زمان ۲۰ دقیقه و همچنین ۶۰۰ وات و ۱۰ دقیقه (پس از بهینه‌یابی) به ترتیب برای پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو انتخاب شدند. مطابق یافته‌ها، استفاده از پیش تیمارهای مذکور موجب افزایش بازده استخراج، محتوی سولفات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پلی‌ساکاریدهای مستخرج (نسبت به شاهد) گردید ($p < 0.05$). بیشترین حد بازده استخراج و محتوی سولفات (به ترتیب $21.73 \pm 0.19\%$ و $34.06 \pm 1.07\%$)، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت کاهندگی، آنتی‌اکسیدانی کل و خاصیت ضد سرطانی مربوط به تیمار اولتراسوند بود ($p < 0.05$). این تیمار برای مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS به ترتیب 1.04 ± 0.03 و 0.99 ± 0.02 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. مطابق نتایج فعالیت ضد سرطانی تیمارها، LC_{50} شاهد و تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو برای نابودی سلول‌های سرطانی آدنوکارسینوما پستان T47D به ترتیب 1.033 ± 0.02 و 1.12 ± 0.05 میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو جهت استخراج، تا حد قابل توجهی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پلی‌ساکاریدهای کلرلا ولگاریس را ارتقاء می‌دهد. همچنین استفاده از این پلی‌ساکاریدها در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان نگهدارنده و در تولید داروهای ضد سرطان به عنوان ماده فعال پیشنهاد می‌گردد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۷

تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۶

کلمات کلیدی:

اولتراسوند، پلی‌ساکاریدهای سولفات، خاصیت ضد سرطانی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کلرلا ولگاریس، مایکروویو

DOI: 10.48311/fsct.2026.84095.0

* مسئول مکاتبات:

skyeganeh@gmail.com

s.yeganeh@sanru.ac.ir

۱-مقدمه

امروزه به منظور جلوگیری از فساد اکسیداتیو مواد غذایی از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و شیمیایی استفاده می‌شود. این آنتی‌اکسیدان‌ها برای سلامتی مصرف‌کنندگان بسیار مضر هستند و موجب نگرانی‌هایی شده‌اند. در چنین شرایطی یافتن منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی که نه تنها برای سلامتی مضر نیستند بلکه فوایدی هم دارند، بسیار اهمیت می‌یابد [۱]. از جمله آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که طی دو یا سه دهه اخیر از منابع طبیعی بویژه آبزیان تولید و استخراج شده‌اند می‌توان به آستاگزانتین [۲]، فیکوسیاینین [۳]، کیتوزان [۴]، ژلاتین [۵] و پپتیدهای زیست‌فعال [۶] اشاره کرد. یک دسته دیگر از ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ماهیت طبیعی، پلی‌ساکاریدهای (سولفات) مستخرج از جلبک‌های دریایی (سبز، قهوه‌ای و قرمز) نظیر فوکوئیدان^۱، آلژینات^۲، اولوان‌ها^۳، منان‌ها^۴، رامانان‌ها^۵ و گالاکتان‌ها^۶ هستند [۷-۱۰].

یکی از سرطان‌های رایج که طی دو دهه اخیر شیوع بسیار گسترده‌ای در اغلب کشورها داشته، سرطان پستان است [۱۱]. با پیشرفت تکنولوژی، روش‌های متعددی به منظور درمان این بیماری از جمله جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی لحاظ شده است. اما هر کدام از این روش‌ها معایب مهمی دارند. روش جراحی اثرگذاری بالایی ندارد و گاهی بسته به پیشرفت بیماری، به وخیم‌تر شدن بیماری و شرایط عمومی فرد منجر می‌شود [۱۲]. در دو روش دیگر، به دلیل اینکه اشعه‌ها و داروهای شیمیایی به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌رسانند، عوارض خطرناک و جبران‌ناپذیری متوجه بیمار است [۱۳]. همچنین در کشورهای مختلف گزارش‌های متعددی حاکی از افزایش مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی‌درمانی گزارش شده است [۱۴]. بنابراین استفاده از روش‌های دارویی برای درمان سرطان که هم مبتنی

بر ترکیبات طبیعی موثر و بی‌خطر باشند و هم آسیبی به سلول‌های سالم وارد نکنند (عدم ایجاد سمیت برای سلول‌های غیر سرطانی)، ضروری به نظر می‌رسد. به همین دلیل چند سالی است که محققین و متخصصین به استخراج ترکیبات طبیعی ضد سرطان از موجودات زنده نظیر آبزیان روی آورده‌اند و طی پژوهش‌های مختلف، یکسری مواد موثر برای درمان سرطان تولید (استخراج) و معرفی کرده‌اند. از جمله آبزیانی که پتانسیل بالایی به منظور استخراج ترکیبات ضد سرطان دارند، جلبک‌ها هستند. پلی‌ساکاریدهای مستخرج از جلبک‌ها [۱۵ و ۱۶] و همچنین عصاره‌های تولیدشده از آن‌ها [۱۷ و ۱۸] از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند با سلول‌های سرطانی مقابله و آن‌ها را نابود کنند.

نوع روش مورد استفاده جهت استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات از جلبک‌ها بر بروز خواص متعدد آن‌ها موثر است [۱۹]. سیال فوق بحرانی، آب زیر بحرانی، فشار بالا، استخراج به کمک مایکروویو، اولتراسوند، تیمار الکتریکی ولتاژ بالا، میدان الکتریکی پالسی، آنزیم و استخراج بر پایه تخمیر از جمله روش‌های نوین استخراج هستند که هر کدام معایب و مزایای خود را دارند و محصولی با ویژگی‌های خاص تولید می‌کنند [۲۰]. در روش اولتراسوند از امواجی با فرکانس بیشتر از ۱۸ کیلوهرتز برای استخراج ترکیبات فعال استفاده می‌شود. مکانیسم استخراج در این روش به پدیده کاویتاسیون^۷ مربوط می‌شود [۲۱] که به معنی تشکیل، رشد و متلاشی شدن حباب‌های کوچک در اثر ایجاد فشار منفی بزرگ در یک محیط مایع است. عدم استفاده از دماهای بالا در روش فراصوت موجب می‌شود محصول نهایی دارای ویژگی‌های زیست‌فعال پایدار باشد و خصوصیات ذاتی آن حفظ شود [۲۲]. امواج مایکروویو، امواجی الکترومغناطیسی با فرکانسی در محدوده ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز و

5 -Raman

6 -Galactan

7 -Cavitation

1- Fucoidan

2 -Alginate

3 -Ulvan

4 -Mannans

انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) خشک شد و در دمای ۲۰°C - نگهداری گردید [۲۴].

۲-۲- پیش تیمار میکروجلبک با اولتراسوند و مایکروویو
پودر ریزجلبک با آب مقطر با نسبت ۱۰ گرم: ۳۰۰ میلی لیتر به بشر منتقل شد. سپس سوسپانسیون حاصل تحت تیمار با اولتراسوند (Elmasonic، مدل P60H، آلمان) با توان خروجی ۳۰۰ وات در ۲۰ دقیقه قرار گرفت. افزایش دما به کمک حمام آب و یخ کنترل گردید. توان و زمان برای پیش- تیمار مایکروویو (NN-C2002W، ژاپن) به ترتیب ۶۰۰ وات و ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد [۲۵]. لازم به ذکر است که در پیش تست، از توان‌ها و زمان‌های مختلف برای پیش- تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو استفاده گردید و بر اساس بازده استخراج و میزان سولفات، توان‌ها و زمان‌های بهینه (تحت عنوان تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو) انتخاب شدند. این دو تیمار در کنار شاهد برای سایر تست‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۲- بازده استخراج پلی ساکارید از جلبک کلرلا ولگاریس

به این منظور ابتدا محتوای کل پلی ساکارید نمونه استخراج- شده با استفاده از روش فنل اسیدسولفوریک تعیین شد. سپس بازده پلی ساکارید به صورت درصد پلی ساکارید نسبت به وزن ریزجلبک محاسبه و بر حسب درصد گزارش شد [۱۹].

۴-۲- ارزیابی ترکیب شیمیایی پلی ساکاریدهای استخراج شده

۴-۲-۱- تعیین مقدار سولفات
ابتدا نمونه استخراج شده با استفاده از اسید هیدروکلریک (مرک، آلمان) ۱ مولار هیدرولیز و با کمک دستگاه تبخیرکننده چرخشی (HS-2005sn، برند Hahn shin، کره) خشک شد و باقیمانده خشک به دست آمده در ۱ میلی- لیتر آب حل گردید. سپس اسیدتری کلرواستیک (سیگما، آلمان) ۸٪ و محلول ژلاتین کلرید باریم ۵٪ مخلوط شدند و انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گرفت و در مرحله بعد، جذب مخلوط حاصل در ۳۶۰ نانومتر قرائت

طول موجی بین ۱ میلی متر تا ۱۰۰ سانتی متر هستند. گرمایش مایکروویو در مواد دی الکتریک به دلیل قطبش مولکول‌های آب به وسیله پرتو الکترومغناطیس رخ می دهد. مایکروویو که موجب تولید بسیار سریع حرارت می شود، از طریق سه مکانیسم، انرژی را به مواد انتقال می دهد. این مکانیسم‌ها عبارتند از پلاریزاسیون دو قطبی، هدایت یونی و پلاریزاسیون موازی [۲۳]. به صورت خلاصه، در هر دو تکنیک (اولتراسوند و مایکروویو)، امواج موجب تخریب دیواره سلولی و نشت محتویات از جمله پلی ساکاریدها به محیط حلال می شوند.

کلرلا ولگاریس، جلبک سبز تک سلولی و از آغازیان است که دارای سایز کروی با قطر ۲ تا ۱۰ میکرون می باشد. این جلبک فاقد تاژک و حاوی رنگدانه‌های فتوسنتز سبز کلروفیل a و b در کلروپلاست است. کلرلا ولگاریس از طریق فتوسنتز به سرعت تکثیر می شود و به این منظور به گاز دی اکسید کربن، نور خورشید و مقدار کمی از مواد معدنی احتیاج دارد [۸].

هدف تحقیق حاضر استفاده از پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو در فرآیند استخراج پلی ساکاریدهای کلرلا ولگاریس و ارزیابی اثر این پیش تیمارها بر بازده استخراج، میزان سولفات، خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی محصول است.

۲- مواد و روش

۲-۱- استخراج پلی ساکارید از جلبک کلرلا ولگاریس
۱۰ گرم پودر این جلبک (بانک ملی جلبک) در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۰°C هم زده و بعد با دور ۸۰۰۰ در دقیقه، ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت با اتانول ۹۵٪ (۱ V/V) در طول شب در دمای ۴°C رسوب داد و سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل مجدداً در آب دیونیزه حل و پروتئین به کمک کیسه دیالیز ۱۰۰۰ کیلودالتونی جدا شد. نهایتاً مایع رویی به صورت

29. آلمان) 100°C انکوبه شدند. پس از طی شدن این زمان، به لوله‌ها اجازه داده شد تا حد دمای اتاق خنک شوند. سپس $0/1$ میلی لیتر محلول کربازول که قبلاً آماده شده بود، به لوله‌ها اضافه و انکوباسیون در بن ماری 100°C برای ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از این زمان و خنک سازی لوله‌ها (25°C)، جذب آن‌ها پس از صفر کردن در مقابل شاهد در 530 نانومتر (اسپکتروفتومتر، کام اسپکت مدل M350، انگلستان) قرائت شد. از دی-گلوکورونیک اسید (سیگما، آلمان) به عنوان استاندارد استفاده گردید [۱۹].

۲-۵- شاخص‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی-

ساکاریدهای استخراج شده

۲-۵-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد $2, 2$ -دی فنیل پیکریل هیدرازیل^۹ (DPPH)

ابتدا 2 میلی لیتر از غلظت‌های مختلف نمونه به 2 میلی لیتر محلول $0/1$ میلی مولار DPPH (سیگما، آلمان) در اتانول اضافه شد. نمونه در محیط تاریک (25°C) به مدت 30 دقیقه انکوبه گردید و میزان جذب در 517 نانومتر ثبت شد. ویتامین C به عنوان کنترل مثبت بکار رفت. در گروه کنترل، آب دیونیزه با محلول DPPH و در گروه بلانک آب دیونیزه با محلول پلی ساکارید جایگزین گردید. فعالیت مهار رادیکال DPPH تیمارها با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد [۲۹]. در این رابطه، Ac جذب کنترل و As جذب نمونه است.

(رابطه

(۱)

$$100 \times (Ac - As) / Ac = \text{درصد مهار رادیکال آزاد}$$

۲-۵-۲- فعالیت مهار رادیکال $2, 2$ -آزینو- بیس- ۳-

اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید^{۱۰} (ABTS)

محلول 7 میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات (مرک، آلمان) $2/45$ میلی مولار تهیه و به مدت 16 ساعت در محیط تاریک (25°C) نگهداری شد. این محلول تا رسیدن به جذب

شد. در نهایت از محلول سولفات سدیم (مرک، آلمان) برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید [۲۶].

۲-۴-۲- مقدار کربوهیدرات

به این منظور، محلول استخراجی ($0/4$ میلی لیتر) با 1 میلی لیتر محلول فنل (5% وزنی/حجمی) مخلوط شد و به 5 میلی لیتر اسیدسولفوریک (مرک، آلمان) غلیظ اضافه گردید. این مخلوط در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه به دور از نور قرار گرفت و میزان جذب آن در طول موج 490 نانومتر ثبت شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف گلوکز رسم گردید [۲۶].

۲-۴-۳- تعیین میزان خاکستر و پروتئین

$0/5$ گرم از پلی ساکاریدهای خشک در یک بوته چینی در دمای 600°C به مدت 8 ساعت در کوره سوزانده شد و نتایج خاکستر به عنوان درصد وزن سوزانده شده پلی- ساکاریدها به وزن اولیه گزارش گردید. به منظور ارزیابی مقدار پروتئین نمونه‌ها از روش کلدال و ضریب $6/25$ استفاده شد [۲۸].

۲-۴-۴- اندازه گیری میزان اورونیک اسید^۸

ابتدا $0/503$ گرم سدیم تترابورات (سیگما، آلمان) در 100 میلی لیتر سولفوریک اسید 98% حل و واکنشگر سدیم-تترابورات $0/025$ مولار آماده گردید. این محلول به مدت 6 ساعت هم زده شد. در مرحله بعد، $0/125$ گرم کربازول با 100 میلی لیتر اتانول در یک ظرف شیشه‌ای تیره مخلوط و در دمای 4°C نگهداری گردید. 3 میلی لیتر واکنشگر تهیه شده به لوله‌های آزمایش وارد و این لوله‌ها در ظرف محتوی یخ سرد شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها با غلظت 1 میلی گرم در میلی لیتر در بنزوتیوک اسید اشباع (مرک، آلمان) به لوله‌های فوق‌الذکر اضافه و پس از تکان دادن، مجدداً لوله‌ها به مدت 5 تا 10 ثانیه در ظرف محتوی یخ سرد شدند. پس از سردسازی، لوله‌ها 10 دقیقه در بن ماری (Memert wnb)

10 -2,2-Azino-bis -3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid

8 -Uronic acid

9 -2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

دستگاه الیزاریدر (Hiperion Microplate Reader, MPR4+، آلمان) قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از محلول آسکوربیک اسید در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج این شاخص بر اساس میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک‌شده گزارش گردید [۳۲].

۶-۲- ارزیابی فعالیت ضد سرطانی تیمارها علیه رده سلولی سرطان پستان به روش MTT

رده سلولی سرطانی آدنوکارسینوما پستان T47D و رده نرمال HEK-293 (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت کامل RPMI 1640 و سرم جنینی گاوی ۱۰٪ در شرایط مرطوب انکوبه و در حضور ۵٪ گاز CO₂ و دمای ۳۷°C کشت داده شدند. سلول‌های کشت‌شده به میزان ۱۰^۵ سلول به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کشت انکوبه شدند. سپس تیمارهای تحقیق با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط کشت گرماگذاری شدند. چاهک‌هایی حاوی سلول‌های تیمارنشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. پس از مدت مذکور، ۳۰ میکرولیتر رنگ MTT (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه و عمل گرماگذاری به مدت ۳ ساعت انجام شد. کریستال‌های نامحلول آبی‌رنگ فورمازان در ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید حل شدند و جذب محلول حاصل با استفاده از دستگاه الیزاریدر (Hiperion Microplate Reader, MPR4+، آلمان) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. نهایتاً درصد سلول‌های زنده (C_L) بر حسب درصد سلول‌های تیمارنشده نسبت به سلول‌های تیمارنشده از طریق رابطه ۳ محاسبه شدند. در این رابطه، AT، جذب سلول‌های تیمارنشده با پلی‌ساکاریدهای استخراجی و AC، جذب نوری سلول‌های تیمارنشده (شاهد) است [۳۳].

۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه (غلظت‌های مختلف) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک (۳۰°C) قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد [۳۰]. از ویتامین C به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

$$\text{رابطه ۲)} \quad 100 \times [\text{جذب}]$$

شاهد (جذب نمونه-جذب شاهد) = فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS (%)

۳-۵-۲- سنجش FRAP^{۱۱} (قدرت احیاکنندگی یا کاهش‌دهندگی یون آهن)

۰/۵ میلی‌لیتر نمونه با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار و pH ۶/۶) و ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید (سیگما، آلمان) ۱٪ حجمی/وزنی ترکیب شدند. سپس این مخلوط در دمای ۵۰°C، ۲۰ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول TCA ۱۰٪ به مخلوط اضافه و ترکیب حاصل در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. ۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک-کلراید (سیگما، آلمان) ۰/۰۱٪ وزنی/حجمی مخلوط و (پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۲۵°C) جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. جذب بیشتر مخلوط نشان‌دهنده قدرت احیاءکنندگی بیشتر است [۳۱].

۴-۵-۲- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)

۰/۳ میلی‌لیتر نمونه با غلظت‌های مختلف با ۳ میلی‌لیتر محلول معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و مولیبدات آمونیوم ۴ میلی‌مولار) مخلوط و محلول بدست‌آمده در حمام آبی با دمای ۹۵°C به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از این مدت و خنک‌شدن محلول، در هر چاهک میکروپلیت، میزان ۱۰۰ میکرولیتر نمونه ریخته شد و جذب آن در طول موج ۶۹۵ نانومتر با استفاده از

(رابطه ۳)

EXCEL انجام شد. تمام آزمایشات در سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند.

$$C_L (\%) = (A_T / A_C) \times 100$$

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب شیمیایی جلبک کلرلا ولگاریس

در جدول ۱، ترکیب شیمیایی پودر جلبک کلرلا ولگاریس نشان داده شده است. مطابق این جدول، پودر مذکور دارای حدود ۴۸٪ پروتئین و ۲۱/۵٪ کربوهیدرات می باشد. همچنین حدود ۱۴٪ از کلرلا ولگاریس مورد استفاده را لیپیدها تشکیل می دادند.

تحقیق پیش رو در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One way Anova) و آزمون دانکن (برای مقایسه میانگین داده ها) در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. آنالیز داده ها بوسیله نرم افزار آماری SPSS22 و رسم اشکال با کمک نرم افزار

Table 1- Chemical composition of *Chlorella vulgaris* powder

Chemical composition	Amounts (%)
Protein	47.85 \pm 1.52
Lipid	14.06 \pm 0.23
Carbohydrates	21.37 \pm 1.05
Moisture	2.78 \pm 0.11
Ash	9.04 \pm 0.36

مایکروویو به صورت معنی داری بیشتر بودند ($p < 0/05$). همچنین تیمار اولتراسوند دارای کمترین مقدار پروتئین و خاکستر بود ($p < 0/05$). تیمار اولتراسوند، بیشترین میزان کربوهیدرات کل ($55/27 \pm 0/61$) و سولفات ($34/06 \pm 1/07$) را نشان داد ($p < 0/05$); ضمن اینکه میزان سولفات در تیمار مایکروویو به صورت معنی داری بیشتر از شاهد اندازه گیری شد ($p < 0/05$). این دو تیمار (مایکروویو و شاهد) از نظر میزان کربوهیدرات کل اختلاف قابل توجهی نداشتند ($p > 0/05$). در ادامه، شاهد و تیمار اولتراسوند از نظر میزان اورونیک اسید اختلاف معنی داری نشان ندادند ($p > 0/05$) و از این نظر در سطح پائین تری نسبت به تیمار مایکروویو ($15/02 \pm 0/93$) قرار داشتند ($p < 0/05$). مطابق جدول ۲، بیشترین بازده استخراج مربوط به تیمار اولتراسوند ($21/73 \pm 0/19$) بود ($p < 0/05$).

در تحقیق دیگری که از همین جلبک برای استخراج پلی- ساکاریدها استفاده شد، میزان پروتئین، چربی، کربوهیدرات و خاکستر به ترتیب حدود ۴۷، ۱۲/۵، ۱۹ و ۷/۵٪ گزارش گردید [۹]. ترکیب شیمیایی جلبک از آنجا اهمیت می یابد که مستقیماً بر ترکیب شیمیایی پلی ساکاریدهای استخراج شده و متعاقباً خواص آن ها موثر است. Prabakaran و همکاران (۲۰۱۹) ترکیب شیمیایی کلرلا ولگاریس را به صورت پروتئین معادل ۴۵/۲۳٪، کربوهیدرات معادل ۲۳/۴۳٪ و لیپید معادل ۱۸/۱۲٪ گزارش کردند [۳۴].

۳-۲- ترکیب شیمیایی و بازده استخراج تیمارهای تحقیق

در جدول ۲، ترکیب شیمیایی و بازده استخراج شاهد و تیمارهای تحقیق ارائه شده است. مطابق این جدول، میزان پروتئین و خاکستر در شاهد از تیمارهای اولتراسوند و

Table 2- Chemical composition and extraction efficiency of treatments

Treatments	Protein	Carbohydrates	Sulfate	Ash	Uronic acid	Extraction efficiency
Control	8.95 \pm 0.21 ^a	51.03 \pm 0.74 ^b	11.71 \pm 0.81 ^c	4.34 \pm 0.1 ^a	10.77 \pm 1.65 ^b	3.24 \pm 0.1 ^c
Ultrasound	2.03 \pm 0.18 ^c	55.27 \pm 0.61 ^a	34.06 \pm 1.07 ^a	0.32 \pm 0.07 ^c	9.83 \pm 1.24 ^b	21.73 \pm 0.19 ^a

Microwave 4.86±0.32^b 51.16±1.04^b 25.71±1.60^b 2.29±0.18^b 15.02±0.93^a 16.96±0.97^b

- Different lowercase letters in each column indicate significant differences between the data (p<0.05).

علت افزایش بازده استخراج به هنگام استفاده از پیش تیمار مایکروویو این است که امواج الکترومغناطیس، در ساختار سلولی تغییر ایجاد می‌کنند. به صورت روش تر می‌توان عنوان کرد که بیشتر شدن بازده استخراج (در تکنیک مایکروویو) در نتیجه ترکیب دو پدیده انتقال شامل گرادیان دما و جرم است که در یک جهت کار می‌کنند. در روشی که از پیش تیمارها استفاده نشود (تکنیک‌های ساده و معمول)، انتقال جرم از داخل به خارج و انتقال حرارت از خارج به داخل بستر انجام می‌شود. ضمن اینکه اگرچه در روش استخراج معمولی (بدون پیش تیمار) گرما از محیط گرمایشی به داخل نمونه انتقال می‌یابد اما در تکنیک مایکروویو، گرما در محدوده تابشی به صورت حجمی پراکنده می‌شود. همچنین حلال مورد استفاده به وسیله دیفوزیون با اثرگذاری قوی و شدید به ماتریکس سلولی میکروجلبک وارد و سپس ذرات حل-شونده تا رسیدن به غلظتی خاص (غلظتی که به وسیله ویژگی‌های مختلف ماده جامد محدود می‌گردد) حل می‌شوند. در مرحله بعد این فرآیند، محلولی که حامل ذرات حل‌شونده است، توسط دیفوزیون موثر به سطح نفوذ می‌کند. نهایتاً با جریانات همرفتی که می‌تواند اختیاری یا اجباری باشد، محلول از سطح به حلال انتقال می‌یابد [۲۳]. این فعل و انفعالات در روش مایکروویو به صورت پیوسته (و نهایتاً) منجر به افزایش بازده فرآیند می‌شوند. به طور کلی، مکانیسم‌های مایکروویو به منظور تولید حرارت به صورت حجمی در حلال و همچنین در محیط سلولی جلبک، دو پدیده پلاریزاسیون دوقطبی و هدایت یونی می‌باشند. از آنجا که آب توانایی بالقوه‌ای برای حل کردن کربوهیدرات‌ها و همچنین جذب امواج مایکروویو دارد، در این روش به عنوان کاراترین حلال در نظر گرفته می‌شود. در تکنیک مایکروویو، امواج توسط مولکول‌های آب جذب و انرژی الکترومغناطیس به انرژی حرارتی تبدیل می‌شود. این حرارت فشار درون سلول جلبک را افزایش می‌دهد و متعاقباً، سلول متلاشی شده و محتویات آن به درون حلال منتشر می‌شوند.

در این تحقیق استفاده از پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو، موجب افزایش معنی‌دار بازده استخراج پلی-ساکاریدهای کلرلا و لگاریس شد (تا حدی که بازده از ۳/۲۴±۰/۱٪ در نمونه شاهد به ۲۱/۷۳±۰/۱۹٪ در تیمار اولتراسوند و ۱۶/۹۶±۰/۹۷٪ در تیمار مایکروویو ارتقاء یافت). در واقع، اثر روش استخراج بر راندمان موثر بود که این یافته در پژوهش‌های متعددی تأیید گردید. در تحقیقی که به منظور استخراج فوکوئیدان از جلبک قهوه‌ای *Nizimuddinia Zanardini* از تیمار مایکروویو استفاده شد، افزایش راندمان در روش مایکروویو نسبت به روش معمولی گزارش گردید؛ به این صورت که راندمان فرآیند استخراج در تکنیک استفاده از مایکروویو، ۳/۷۱٪ و در روش معمول ۲/۳۵٪ بود [۳۵]. *Alboofetileh* و همکاران (۲۰۱۹) طی پژوهشی اثر تیمارهای مختلف شامل اولتراسوند (توان ۲۰۰ وات، فرکانس ۲۰ هرتز، دمای ۵۵°C و دو سیکل زمانی ۲۰ دقیقه)، مایکروویو (توان ۷۰۰ وات، دمای ۹۰°C و دو سیکل زمانی ۲۰ دقیقه)، سیال فوق بحرانی (توان ۱۵۰۰ وات، دمای ۱۵۰°C در دو سیکل زمانی ۲۰ دقیقه) و آب داغ (دمای ۶۵°C و دو سیکل زمانی ۳ ساعت) را بر بازده استخراج فوکوئیدان جلبک *N. Zanardini* مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند که بیشترین بازده مربوط به روش سیال فوق بحرانی (۱۳/۵٪) و کمترین این شاخص مربوط به تیمار اولتراسوند (۳/۶٪) بود. همچنین راندمان استخراج تیمار مایکروویو ۶/۱۷٪ اندازه‌گیری شد [۱۹]. در پژوهش دیگری که اثر استخراج با استفاده از روش‌های اسیدی، آنزیمی و اولتراسوند بر خصوصیات فوکوئیدان جلبک قهوه-ای *Sargassum ilicifolium* مورد بررسی قرار گرفت، بازده استخراج در روش آنزیمی (۱۱/۳۷٪) بیشتر از روش‌های اسیدی (۷/۸۷٪) و اولتراسوند (۸/۰۷٪) گزارش گردید [۳۶]. تحقیقات مذکور مانند پژوهش پیش‌رو، اثر روش استخراج را بر بازده فرآیند تأیید کردند.

سلولی در یک مدت زمان کوتاه شده و محتویات سلولی در طول دیواره سلولی انتشار می‌یابند [۲۲].

در پژوهش حاضر، استفاده از پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو موجب افزایش مقادیر سولفات در پلی- ساکاریدهای استخراج شده گردید. به این صورت که مقدار سولفات در نمونه شاهد $11/71 \pm 0/81$ ٪ اندازه‌گیری شد اما در تیمارهای فوق‌الذکر تا میزان $34/06 \pm 1/07$ ٪ (اولتراسوند) و $25/71 \pm 1/60$ ٪ (مایکروویو) هم ارتقا یافت.

Alboofetileh و همکاران (۲۰۱۹) که به منظور استخراج فوکوئیدان جلبک *N. zanardini* از امواج مایکروویو با توان ۷۰۰ وات در دمای 90°C استفاده کردند، میزان سولفات را $24/09$ ٪ و بیشتر از نمونه شاهد که با روش معمول استخراج شده بود ($18/44$ ٪)، گزارش نمودند [۱۹] که این یافته با تحقیق حاضر همخوانی دارد. در پژوهش Torabi Dastgerdouei و همکاران (۲۰۲۱)، محتوی سولفات در تیمار مایکروویو ($22/55$ ٪) و پلی ساکارید مستخرج از جلبک *N. zanardini* به روش معمول ($22/46$ ٪) تفاوت معنی‌داری نداشتند [۳۵]. اما در برخی از پژوهش‌ها میزان سولفات در تیمارهای مایکروویو نسبت به تیمارهای معمول کاهش نشان داد که علت آن به حساسیت سولفات به دماهای بالا و متعاقباً به تخریب حرارتی برمی‌گردد. Okolie و همکاران (۲۰۱۹) فوکوئیدان را با استفاده از روش‌های اولتراسوند، مایکروویو، آنزیم و معمول از جلبک *Ascophyllum nodosum* استخراج و میزان سولفات در تیمارها را به ترتیب $17/3$ ٪، $18/8$ ٪، $15/4$ ٪ و $21/7$ ٪ اندازه‌گیری کردند. در تحقیق آن‌ها بیشترین میزان سولفات مربوط به روش معمول و پس از آن مربوط به تکنیک مایکروویو بود [۳۷]. Yuan و Macquarrie (۲۰۱۵) اثر دماهای ۹۰، ۱۲۰، 150°C و زمان‌های ۵، ۱۵ و ۲۰ دقیقه تحت امواج مایکروویو را بر میزان سولفات فوکوئیدان مستخرج از جلبک *A. nodosum* ارزیابی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که با افزایش دما در یک زمان ثابت و همچنین افزایش زمان در یک دمای ثابت، محتوی سولفات کاهش می‌یابد. در تحقیق آن‌ها، میزان سولفات در شرایط بهینه مایکروویو، $27/83$ ٪ اندازه‌گیری شد

مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون مربوط می‌شود [۲۱]. همانطور که یک موج صوتی از میان یک محیط الاستیک عبور می‌کند، باعث جابه‌جایی طولی ذرات می‌گردد و به عنوان یک پیستون در سطح محیط عمل می‌کند و در نتیجه یک توالی مراحل انقباض و انبساط ایجاد می‌شود. طی این فرآیندها، مولکول‌ها بطور موقت از جایگاه اصلی خود جدا شده و به عنوان موج صوتی عبور می‌کنند که می‌توانند با مولکول‌های اطراف برخورد کنند. سپس، طی مرحله انبساط، اولین گروه از مولکول‌ها به عقب و سمت موقعیت اصلی خود کشیده شده و انرژی جنبشی، آن‌ها را بیش‌تر به عقب می‌کشاند. بنابراین، مناطق انبساطی در محیط ایجاد می‌شود و از آنجا که هر محیط فاصله مولکولی بحرانی دارد، هنگامی که این فاصله بیش از حد شود، فعل و انفعالات مولکولی شکسته شده و حفره‌ها در مایع ایجاد می‌شوند [۳۳]. حفره‌های ایجادشده در محیط، حباب‌های کاویتاسیون ناشی از فراصوت هستند که قادر به رشد در طول مراحل انبساط و کاهش اندازه در سیکل‌های انقباض می‌باشند. هنگامی که اندازه این حباب‌ها به یک نقطه بحرانی می‌رسد، آن‌ها در طول چرخه انقباض متلاشی شده و مقدار زیادی انرژی آزاد می‌گردد. دما و فشار در لحظه متلاشی شدن به ترتیب تا سقف ۵۰۰۰ کلوین و ۵۰۰۰ اتمسفر در حمام اولتراسونیک در دمای اتاق تخمین زده می‌شود. ایجاد این نقاط داغ می‌تواند به طور چشمگیری واکنش‌های شیمیایی را در محیط سرعت بخشد. وقتی این حباب‌ها روی سطح مواد جامد متلاشی می‌شوند، فشار و دمای بالای آزادشده به طور مستقیم میکروجت‌ها و امواج شوک را در سطح جامد تولید می‌کند. اصابت این میکروجت‌ها به سطح باعث سایش، شکستگی و تخریب آن می‌گردد. امواج فراصوت، مراحل فرایند استخراج ترکیبات گیاهی، یعنی تورم بافت به منظور جذب حلال و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها بهبود می‌بخشد و انتقال جرم را تسهیل و تسریع می‌کند. برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره

۱-۳-۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

شکل ۱، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH شاهد و تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو را در غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، در هر چهار غلظت مورد بررسی، فعالیت مهار تیمار اولتراسوند نسبت به شاهد و مایکروویو به صورت معنی‌داری بیشتر است ($p < 0/05$). همچنین این شاخص در تیمار مایکروویو در تمامی غلظت‌ها به غیر از ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به شاهد مقادیر بیشتری نشان داد ($p < 0/05$). در غلظت مذکور، شاهد و تیمار مایکروویو از نظر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، اختلاف معنی‌داری ارائه نکردند ($p > 0/05$). مطابق شکل ۱، در غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید و تیمار اولتراسوند اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشتند ($p > 0/05$). با افزایش ۰/۵ واحدی غلظت، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارهای تحقیق به صورت معنی‌داری افزایش یافتند ($p < 0/05$). البته در این مورد استثنائی هم وجود داشت؛ به این صورت که فعالیت مهار تیمار اولتراسوند (و همچنین آسکوربیک اسید) با افزایش غلظت از ۱/۵ به ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تغییر قابل توجهی نشان نداد ($p > 0/05$). فعالیت مهار تیمار اولتراسوند از $0/59 \pm 0/27$ ٪ در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا $1/31 \pm 0/68$ ٪ در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متفاوت بود. این مقایره برای تیمار مایکروویو از $0/27 \pm 0/19$ ٪ تا $0/92 \pm 0/55$ ٪ و برای شاهد از $0/48 \pm 0/19$ ٪ تا $0/42 \pm 0/47$ ٪ متغیر اندازه‌گیری گردید.

اما در روش معمول که مبتنی بر ۶ ساعت تیمار اسیدی در دمای 70°C بود، این مقدار $0/33/29$ ٪ گزارش گردید [۳۸]. این کاهش مقدار سولفات، به دلیل حساسیت حرارتی (سولفات) اتفاق می‌افتد و هنگام استفاده از مایکروویو باید این نکته مد نظر قرار گیرد [۳۷]. در تحقیق پیش‌رو نیز علت کم‌تر بودن میزان سولفات در تیمار مایکروویو نسبت به اولتراسوند احتمالاً به حساسیت و تخریب حرارتی مرتبط است.

پلی‌ساکاریدهای مستخرج در این پژوهش بسته به نوع تیمار دارای حدود ۲ تا ۹٪ پروتئین، ۵۱ تا ۵۵/۵٪ کربوهیدرات و ۹ تا ۱۵٪ اورونیک‌اسید بودند. پلی‌ساکاریدهای سولفاته استخراج‌شده از جلبک سبز *Monostroma nitidum* دارای ۴٪ پروتئین، ۶۱/۱٪ کربوهیدرات و ۱۶/۸٪ اورونیک‌اسید بودند [۳۹]. میزان اورونیک‌اسید در پلی‌ساکارید مستخرج از جلبک *N. Zanardini* با روش معمول و مایکروویو به ترتیب ۱۴/۵۷٪ و ۱۶/۲۶٪ گزارش شد [۳۵]. در تحقیق پیش‌رو، میزان اورونیک‌اسید در تیمار مایکروویو نسبت به تیمار اولتراسوند و شاهد بیشتر بود. در روش مایکروویو وقتی امواج توسط توده جلبک جذب می‌شوند و انرژی الکترومغناطیسی به انرژی حرارتی مبدل می‌گردد، دمای داخل سلول افزایش می‌یابد که نتیجه آن پارگی سلول و انتشار پلی‌ساکاریدها به داخل حلال است. در چنین شرایطی اورونیک‌اسید به همراه پلی‌ساکارید خارج می‌گردد. وجود اورونیک‌اسید در پلی‌ساکاریدها به دلیل بهبود و ارتقاء انعطاف‌پذیری زنجیره پلیمری، به افزایش خاصیت ضد انعقادی آن‌ها کمک می‌کند [۴۰].

۳-۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای تحقیق

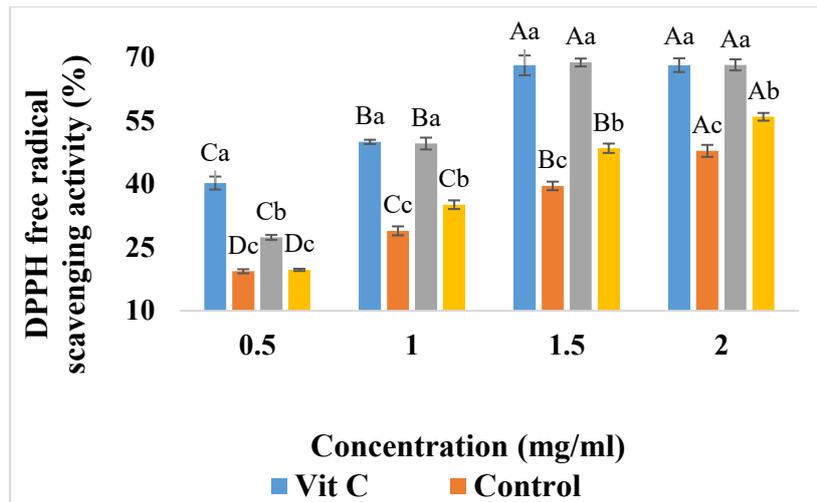


Figure 1-DPPH Free radical scavenging activity of treatments. Different capital letters indicate significant differences between data from a treatment at different concentrations ($p < 0.05$). Also, different lowercase letters indicate a significant difference between the data of different treatments at the same concentration ($p < 0.05$).

اسید (کنترل مثبت) نداشت ($p > 0.05$). همچنین IC_{50} تیمار مایکروویو ($1/61 \pm 0.05$ میلی گرم بر میلی لیتر) نسبت به شاهد ($2/12 \pm 0.07$ میلی گرم بر میلی لیتر) به صورت معنی-داری کمتر بود ($p < 0.05$).

جدول ۳، IC_{50} مهار رادیکال DPPH کنترل مثبت، شاهد، تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو را نشان می دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می شود، تیمار اولتراسوند کمترین میزان IC_{50} ($1/03 \pm 0.04$ میلی گرم بر میلی لیتر) را نشان داد ($p < 0.05$) و از این نظر اختلاف معنی داری با آسکوربیک-

Table 3- IC_{50} of DPPH free radical scavenging of treatments

Treatments	IC_{50} (mg/ml)
Ascorbic acid	1.03 ± 0.04^a
Control	2.12 ± 0.07^c
Ultrasound	1.04 ± 0.03^a
Microwave	1.61 ± 0.05^b

- Different letters indicate significant differences between data of different treatments ($p < 0.05$).

تیمار مایکروویو به صورت معنی داری بیشتر از شاهد بود ($p < 0.05$). مطابق شکل ۲، با افزایش ۰/۵ واحدی غلظت، فعالیت مهار همه تیمارها به صورت معنی داری بیشتر شد ($p < 0.05$). همچنین حداقل مقادیر مربوط به غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود و حداکثر آن در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر ثبت شد ($p < 0.05$). مقادیر فعالیت مهار رادیکال ABTS شاهد، اولتراسوند و مایکروویو در دو غلظت فوق-الذکر به ترتیب $2.0/54 \pm 1/46$ و $5.0/19 \pm 2/47$ و $29/1 \pm 97/16$ و $29/98 \pm 2/02$ و $29/45 \pm 1/01$ و $62/1 \pm 35/84$ اندازه گیری گردید.

۳-۲-۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS
شکل ۲، فعالیت مهار رادیکال ABTS کنترل مثبت، شاهد و تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو را نشان می دهد. مطابق این شکل، در غلظت های مورد بررسی به غیر از ۰/۵ میلی-گرم بر میلی لیتر، تیمار اولتراسوند فعالیت مهار قوی تری نسبت به شاهد و تیمار مایکروویو داشت ($p < 0.05$). در غلظت مذکور، دو تیمار مایکروویو و اولتراسوند از نظر فعالیت مهار اختلاف معنی داری ارائه نکردند ($p > 0.05$). همچنین در تمامی غلظت های مورد مطالعه، فعالیت مهار

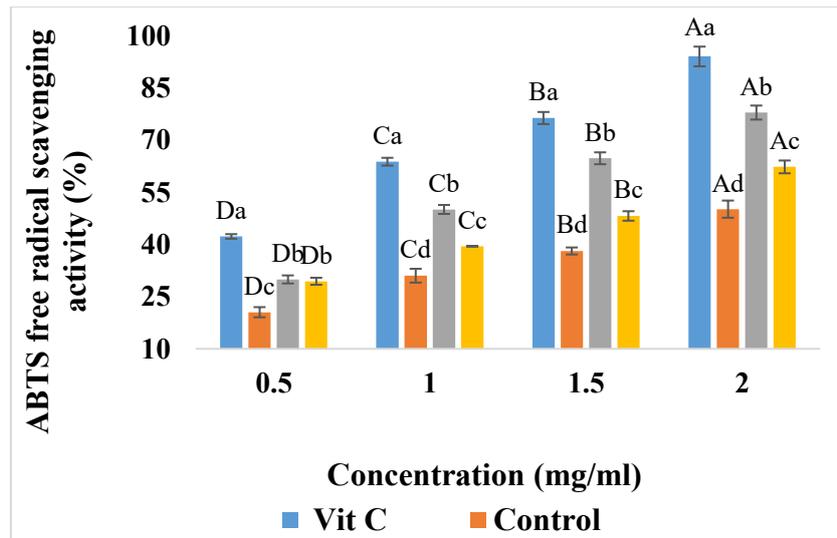


Figure 2-ABTS free radical scavenging activity of treatments. Different capital letters indicate significant differences between data from a treatment at different concentrations ($p < 0.05$). Also, different lowercase letters indicate a significant difference between the data of different treatments at the same concentration ($p < 0.05$).

جدول ۴، IC_{50} مهار رادیکال آزاد ABTS کنترل مثبت و تیمارها را نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، بین تیمارهای تحقیق کمترین IC_{50} مربوط به تیمار اولتراسوند (0.99 ± 0.02 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود

جدول ۴، IC_{50} مهار رادیکال آزاد ABTS کنترل مثبت و تیمارها را نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، بین تیمارهای تحقیق کمترین IC_{50} مربوط به تیمار اولتراسوند (0.99 ± 0.02 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود

Table 4- IC_{50} of ABTS free radical scavenging of treatments

Treatments	IC_{50} (mg/ml)
Ascorbic acid	0.68 ± 0.02^a
Control	1.97 ± 0.04^d
Ultrasound	0.99 ± 0.02^b
Microwave	1.56 ± 0.03^c

• Different letters indicate significant differences between data of different treatments ($p < 0.05$)

تمامی غلظت‌ها به غیر از ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشتر اندازه‌گیری گردید ($p < 0.05$). در این غلظت قدرت کاهندگی شاهد و تیمار مایکروویو اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند ($p > 0.05$). با افزایش ۰/۵ واحدی غلظت، قدرت کاهندگی همه تیمارها به صورت معنی‌داری بیشتر شد ($p < 0.05$). البته در مورد شاهد با افزایش غلظت از ۱/۵ به ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، افزایش معنی‌داری در قدرت کاهندگی رویت نشد ($p > 0.05$) که این یک استثناء بود. قدرت کاهندگی تیمار اولتراسوند از جذب 0.353 ± 0.023 در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا جذب 0.756 ± 0.031 (در طول موج ۷۰۰ نانومتر) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متفاوت بود. این مقادیر برای تیمار مایکروویو و شاهد به

شکل ۳-۳-۳ قدرت کاهندگی یون آهن دو ظرفیتی و شکل ۳، قدرت کاهندگی یون آهن دو ظرفیتی شاهد و تیمارهای تحقیق را در کنار کنترل مثبت (آسکوربیک‌اسید) نشان می‌دهد. مطابق این شکل، بین شاهد و دو تیمار اولتراسوند و مایکروویو، در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه، بیشترین فعالیت کاهندگی مربوط به تیمار اولتراسوند بود ($p < 0.05$). در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قدرت کاهندگی تیمار مذکور و آسکوربیک‌اسید اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$)، اما در غلظت‌های بالاتر، آسکوربیک‌اسید مقادیر بیشتری ارائه کرد ($p < 0.05$). در ادامه، قدرت کاهندگی تیمار مایکروویو نسبت به شاهد در

مایکروویو نسبت به شاهد نیز ثبت شد ($p < 0.05$). با افزایش ۰/۵ واحدی غلظت تیمارهای پلی ساکارییدی، فعالیت آنتی-اکسیدانی کل همه آنها به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت ($p < 0.05$)، البته استثنائاً در مورد تیمار اولتراسوند بیشتر شدن غلظت از ۴۵ به ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر، موجب افزایش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی کل نشد ($p > 0.05$). مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی کل شاهد، اولتراسوند و مایکروویو در غلظت‌های ۱۵ تا ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب از $۱۴۷/۲۳ \pm ۶/۰۴$ تا $۱۴۵/۷۴ \pm ۵/۶۳$ ، $۲۳۷/۴ \pm ۳۹/۹۱$ و $۱۰۱/۵۲ \pm ۲/۷۹$ تا $۱۹۶/۸۴ \pm ۴/۱۱$ میلی گرم آسکوربیک اسید بر گرم پلی ساکارید متغیر بودند.

ترتیب از جذب $۰/۲۵۹ \pm ۰/۰۱۵$ تا $۰/۵۹۸ \pm ۰/۰۲۲$ و از جذب $۰/۱۶۱ \pm ۰/۰۱۵$ تا $۰/۴۷۹ \pm ۰/۰۳۴$ در طول موج ۷۰۰ نانومتر متغیر اندازه‌گیری شد.

۴-۳-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی کل تیمارهای تحقیق

شکل ۴، فعالیت آنتی اکسیدانی کل شاهد و تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو را در غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر نشان می‌دهد. مطابق این شکل، در هر چهار غلظت مورد بررسی، فعالیت آنتی اکسیدانی کل تیمار اولتراسوند از تیمار مایکروویو و شاهد به صورت معنی داری بیشتر بود ($p < 0.05$). همچنین این برتری برای تیمار

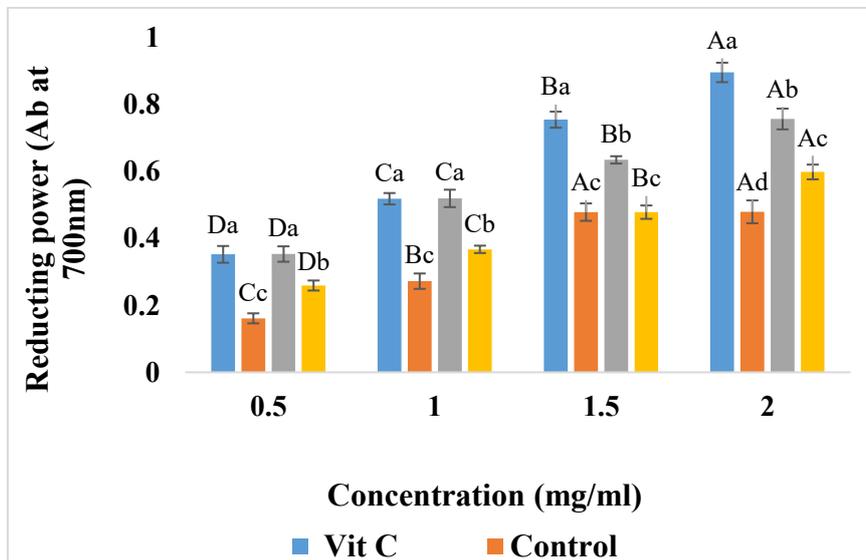


Figure 3- Reducing power of treatments. Different capital letters indicate significant differences between data from a treatment at different concentrations ($p < 0.05$). Also, different lowercase letters indicate a significant difference between the data of different treatments at the same concentration ($p < 0.05$).

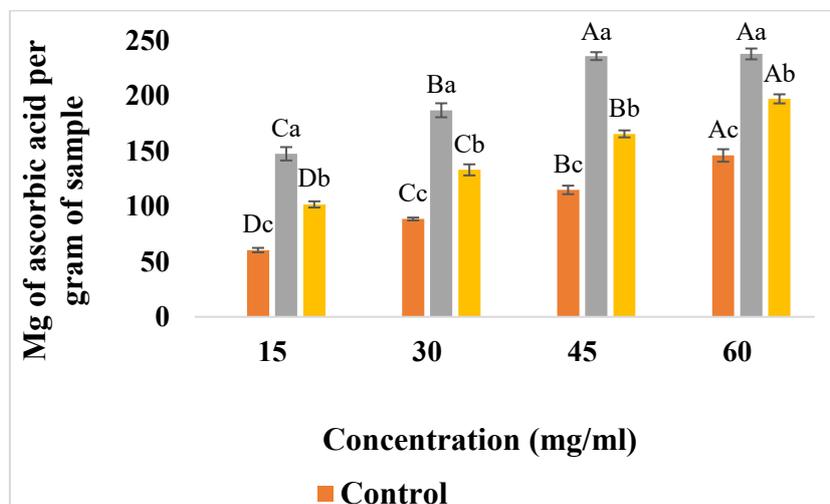


Figure 4-Total antioxidant activity of treatments. Different capital letters indicate significant differences between data from a treatment at different concentrations ($p < 0.05$). Also, different lowercase letters indicate a significant difference between the data of different treatments at the same concentration ($p < 0.05$).

تیمار مایکروویو به دلیل دارا بودن زنجیره‌های کوتاه‌تر (وزن مولکولی کمتر)، قابلیت بیشتری نسبت به شاهد در مهار رادیکال آزاد DPPH دارد [۳۵]. در پژوهش پیش‌رو، یکی از علل بیشتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمار اولتراسوند نسبت به مایکروویو و همچنین تیمار مایکروویو نسبت به شاهد، محتوی بالاتر سولفات می‌باشد. چرا که میزان سولفات در پلی‌ساکاریدهای مستخرج از جلبک‌های دریایی نقش ویژه‌ای در بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند [۴۱]. از آنجا که گروه سولفات قابلیت فعال‌سازی اتم هیدروژن کربن آنومریک را دارد، می‌تواند به باندا شدن هیدروژن توسط پلی-ساکارید کمک کند [۴۴].

۴-۳- فعالیت ضد سرطانی تیمارهای تحقیق

شکل ۵، درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی آدنوکارسینوما پستان T47D را در برابر غلظت‌های مختلف تیمارهای تحقیق نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه تیمارها، بیشترین سمیت سلولی که منجر به کمترین درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی شده است، مربوط به تیمار اولتراسوند بود ($p < 0.05$). همچنین از نظر میزان سمیت سلولی، تیمار مایکروویو در تمامی غلظت‌ها در سطح بالاتری از شاهد قرار داشت ($p < 0.05$). با افزایش غلظت تیمارهای پلی‌ساکاریدی، قدرت آن‌ها برای نابودی سلول‌های سرطانی به صورت معنی‌داری بیشتر و متعاقباً درصد زنده‌ماندن این سلول‌ها به صورت قابل توجهی کاهش یافت ($p < 0.05$). البته در این مورد یک استثناء وجود داشت و آن هم مربوط به نمونه از ۱۲۵ به ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرد ($p > 0.05$). در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار اولتراسوند، زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی مورد مطالعه به ترتیب $71/15 \pm 2/24$ ،

پلی‌ساکاریدهای مستخرج از کلرلا ولگاریس در تحقیق پیش‌رو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی ارائه کردند. تا جایی که در تست فعالیت مهار رادیکال DPPH، IC_{50} تیمار اولتراسوند با IC_{50} آسکوربیک‌اسید برابری می‌کرد. مطابق یافته‌های این بخش، استفاده از پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی-ساکاریدهای مستخرج شد. در ادامه مشخص گردید که تیمار اولتراسوند در تست‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به مایکروویو برتری قابل توجهی داشت. فعالیت آنتی-اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای سولفات به عوامل مختلفی مانند نوع قند، وزن مولکولی، درجه سولفات‌شدن، موقعیت استیل‌سیون و انشعاب گلیکوزیدی وابسته است و رابطه مستقیم و مثبتی با پتانسیل کاهندگی دارد [۴۱]. امواج اولتراسوند و مایکروویو در مواجهه با ساختار پلی‌ساکاریدها، موجب شکستن آن‌ها به قطعات کوچکتر و متعاقباً کاهش وزن مولکولی آن‌ها می‌شوند [۴۲]. این کاهش در وزن مولکولی موجب افزایش توانایی این بیوپلیمرها در مهار رادیکال‌های آزاد (و دادن پروتون) می‌گردد [۴۱ و ۴۳]. Wang و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی فوکوئیدان را از جلبک *Laminaria japonica* در اوزان مولکولی مختلف استخراج کردند. در پژوهش آن‌ها مشخص شد که توانایی پلی‌ساکارید مستخرج با کاهش وزن مولکولی و افزایش میزان سولفات، در مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی کم (LDL) بیشتر می‌شود [۴۱]. در تحقیقات متعددی نقش امواج اولتراسوند و مایکروویو در بهبود و ارتقای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای سولفات تأیید شده است. Yuan و Macquarrie (۲۰۱۵) در تحقیقی به استخراج فوکوئیدان با استفاده از مایکروویو از جلبک *A. nodosum* پرداختند و نقش موثر این روش را بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی فوکوئیدان گزارش کردند [۳۸]. در پژوهشی که به منظور استخراج فوکوئیدان از جلبک قهوه‌ای *N. Zanardini* از مایکروویو استفاده گردید، گزارش شد که

بر میلی لیتر) بود ($p < 0.05$). همچنین این شاخص در تیمار مایکروویو ($693/05 \pm 7/34$ میکروگرم بر میلی لیتر) به صورت معنی داری کمتر از نمونه شاهد ($1033/54 \pm 9/27$ میکروگرم بر میلی لیتر) محاسبه گردید ($p < 0.05$). در این غلظت‌ها (LC_{50}), 50% سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، فعال و 50% دیگر نابود شدند.

$12/28 \pm 1/12$ ، $45/33 \pm 1/05$ و $23/54 \pm 0/97$ محاسبه گردید. این مقادیر برای تیمار مایکروویو به ترتیب $13/96 \pm 2/13$ ، $72/45 \pm 1/32$ ، $58/74 \pm 2/19$ و $37/69 \pm 1/28$ اندازه‌گیری شدند.

در جدول 5، مقادیر LC_{50} تیمارها برای نابودی سلول‌های سرطانی ارائه شده است. مطابق این جدول، کمترین میزان LC_{50} مربوط به تیمار اولتراسوند ($412/76 \pm 5/02$ میکروگرم

Table 5- LC_{50} of research treatments for killing T47D breast adenocarcinoma cancer cells

Treatments	LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Control	1033.54 ± 9.27^c
Ultrasound	412.76 ± 5.02^a
Microwave	693.05 ± 7.34^b

- Different letters indicate significant differences between data of different treatments ($p < 0.05$).

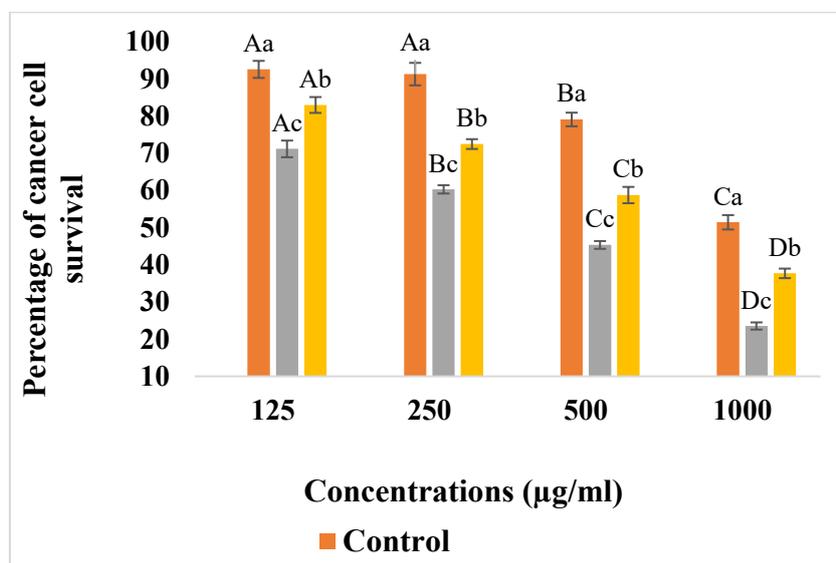


Figure 5- Percentage of survival of T47D breast adenocarcinoma cancer cells against different concentrations of research treatments. Different capital letters indicate significant differences between data from a treatment at different concentrations ($p < 0.05$). Also, different lowercase letters indicate a significant difference between the data of different treatments at the same concentration ($p < 0.05$).

بردن سلول‌های سرطانی کبد، سینه و دهانه رحم به ترتیب معادل $89/78 \pm 6/55$ ، $85/48 \pm 5/75$ و $66/95 \pm 2/45$ میکروگرم بر میلی لیتر بود [15]. در مطالعه‌ای که فعالیت ضد سرطانی پلی‌ساکارید مستخرج از جلبک قهوه-ای *Nemalion caricariense* مورد بررسی قرار گرفت، این پلی‌ساکارید با دوز 1000 میکروگرم بر میلی لیتر، $82\%/63$ فعالیت ضد سرطانی علیه رده سلولی سرطان ریه A549 نشان داد [16]. علاوه بر پلی‌ساکاریدهای موجود در

پلی‌ساکاریدهای موجود در جلبک‌ها از طریق مکانیسم‌های عملکردی چندگانه شامل مهار رشد سلول‌های سرطانی، مهاجم و متاستاز و همچنین القای نابودی سلولی، می‌توانند برای سلول‌های مذکور سمیت ایجاد کرده و آن‌ها را از بین ببرند [16]. Tran و همکاران (2023) طی تحقیقی پلی-ساکارید الوان را از جلبک سبز *U. papenfussii* استخراج و اثرات آن را بر سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های پژوهش آن‌ها نشان داد که IC_{50} الوان برای از بین-

بر میلی لیتر عصاره متانولی جلبک، بیشترین اثر سمیت سلولی را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ارائه کرد. همچنین LC_{50} عصاره متانولی برای سلول‌های سرطانی کولورکتال و سینه به ترتیب $۷۲۴/۲۵ \pm ۴۸/۵۲$ و $۸۴۵/۳۶ \pm ۴۱/۰۵$ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد [۴۷].

۴- نتیجه‌گیری

استفاده از پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو به منظور استخراج پلی‌ساکاریدهای میکروجلبک کلرلا و لگاریس موجب افزایش بازده فرآیند استخراج و محتوی سولفات پلی‌ساکاریدهای مستخرج می‌گردد. ضمن اینکه استفاده از این پیش‌تیمارها، خواص مختلف پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها از جمله آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی را ارتقا می‌دهد. پلی-ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج‌شده در تحقیق حاضر علاوه بر کاربرد در صنعت داروسازی (به منظور استفاده در فرمولاسیون داروهای ضد سرطان و همچنین مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی)، در صنایع غذایی هم می‌توانند نقش پررنگی از باب استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان یک ترکیب نگهدارنده (آنتی‌اکسیدان) ایفا کنند.

رضایت‌نامه کتبی

رضایت‌نامه کتبی و آگاهانه از همه شرکت‌کنندگان در مطالعه اخذ شد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام کردند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

بیانیه دسترسی‌ها

داده‌های پژوهش به اشتراک گذاشته نمی‌شوند.

جلبک‌ها، عصاره‌های آن‌ها هم خاصیت ضد سرطانی دارند. در تحقیقی مشخص شد که عصاره‌های آبی تولیدشده از دو جلبک *Hydroclathrus clathratus* و *Padina arborescens* بر نابودی سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 و HL-60 موثر هستند؛ ضمن اینکه این عصاره‌ها آسیبی به سلول‌های سالم وارد نکردند [۴۱]. نتایج پژوهش Ganesan و همکاران (۲۰۰۸) پیرامون بررسی سمیت سلولی عصاره-های جلبک قرمز گونه *Polysiphonia lanosa* علیه سلول‌های DLD1 و HTC116 (سرطان کورتال انسانی) نشان داد که عصاره‌های کلروفومی و متانولی عملکرد مطلوب‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها داشتند [۴۵]. یافته‌های پژوهشی که طی آن اثر عصاره‌های آبی، متانولی، کلروفومی، ان-هگزانی و اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *indica* *Cystoseira* بر درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی کولورکتال مورد ارزیابی قرار گرفت، نشان داد که عصاره متانولی دارای قوی‌ترین عملکرد و کمترین LC_{50} (۷۲۳/۱۴ \pm ۱۶/۴۷) میکروگرم بر میلی لیتر) بود. همچنین عصاره ان-هگزانی عملکرد قابل توجهی بر نانودی سلول-های سرطانی مورد مطالعه ارائه نکرد [۴۶]. در تحقیق پیش-رو، LC_{50} شاهد، تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو برای رده سلولی سرطانی آدنوکارسینومای پستان T47D به ترتیب $۱۰۳۳/۹ \pm ۵۴/۲۷$ ، $۴۱۲/۵ \pm ۷۶/۰۲$ و $۶۹۳/۰۵ \pm ۷/۳۴$ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد. به این معنی که توانایی تیمار اولتراسوند برای مقابله و نابودی سلول‌های سرطانی (مورد مطالعه) به صورت معنی‌داری از تیمار مایکروویو بیشتر است. همچنین این قابلیت بیشتر، در مورد تیمار مایکروویو نسبت به شاهد هم وجود دارد. Bavi و همکاران (۲۰۱۷) طی پژوهشی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های آلی جلبک *Gelidiella acerosa* صیدشده از سواحل چابهار را بر رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) و کولورکتال (HT-29) با استفاده از روش‌های MTT بررسی کردند. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم

ه-منابع

- [1] Reyhani Poul, S., & Yeganeh, S. (2023). Nanoencapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using maltodextrin-sodium caseinate coating and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the carrier nanocapsules. *Journal of Food Science and Technology*, 20(140), 52-65.
- [2] Luo, F., Wang, S., Zhang, X., Liu, Z., Zhu, R., & Xue, W. (2024). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and preparation of astaxanthin liposomes. *Molecules*, 29(14), 20-33.
- [3] Safari, R., & Reyhani Poul. (2023). Cell culture of *Spirulina* microalgae (*Spirulina platensis*) and comparison the efficiency of enzymatic, ultrasound, freeze-defrosting and mineral solvent methods in extraction of phycocyanin pigment. *Iranian Food Science and Technology*, 19 (5), 649-661.
- [4] Rajalakshmi, A., Krithiga, N., & Jayachitra, A. J. M. E. J. S. R. (2013). Antioxidant activity of the chitosan extracted from shrimp exoskeleton. *Middle East Journal of Scientific Research*, 16(10), 1446-1451.
- [5] Shiao, W. C., Wu, T. C., Kuo, C. H., Tsai, Y. H., Tsai, M. L., Hong, Y. H., & Huang, C. Y. (2021). Physicochemical and antioxidant properties of gelatin and gelatin hydrolysates obtained from extrusion-pretreated fish (*Oreochromis* sp.) scales. *Marine Drugs*, 19(5), 275.
- [6] Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R., & Fattahi, E. (2020). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 625-632.
- [7] Li, B., Liu, S., Xing, R., Li, K., Li, R., Qin, Y., ... & Li, P. (2013). Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1991-1996.
- [8] Jayshree, A., Jayashree, S., & Thangaraju, N. (2016). *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. *The Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(5), 575-581.
- [9] Yaghoubzadeh, Z., & Safari, R. (2023). Antioxidant and antibacterial activities of the polysaccharides extracted from *Chlorella vulgaris* in vitro. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 32(5), 37-47.
- [10] Akbal, A., Şahin, S., & Güroy, B. (2024). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Ulva rigida* and evaluation of their antioxidant activity. *Algal Research*, 77(1), 103-116.
- [11] Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(S3), 43-46.
- [12] Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... & Global Burden of Disease Cancer Collaboration. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncology*, 1(4), 505-527.
- [13] Fock, K. M. (2014). The epidemiology and prevention of gastric cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40(3), 250-260.
- [14] Rais, J., Jafri, A., Siddiqui, S., Tripathi, M., & Arshad, M. (2017). Phytochemicals in the treatment of ovarian cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 9(1), 67-75.
- [15] Tran, V. H. N., Mikkelsen, M. D., Truong, H. B., Vo, H. N. M., Pham, T. D., Cao, H. T. T., ... & Van, T. T. T. (2023). Structural characterization and cytotoxic activity evaluation of ulvan polysaccharides extracted from the green algae *Ulva papenfussii*. *Marine Drugs*, 21(11), 556-569.
- [16] Hoang, T. V., & Alshiekheid, M. A. (2024). A study on anticancer and antioxidant ability of selected brown algae biomass yielded polysaccharide and their chemical and structural properties analysis by FT-IR and NMR analyses. *Environmental Research*, 260(1), 119-127.
- [17] Guedes, É. A., Silva, T. G. D., Aguiar, J. S., Barros, L. D. D., Pinotti, L. M., & Sant, A. E. (2013). Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23 (1), 668-673.
- [18] Moussavou, G., Kwak, D. H., Obiang-Obonou, B. W., Ogandaga Maranguy, C. A., Dinzouna-Boutamba, S. D., Lee, D. H., ... & Choo, Y. K. (2014). Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. *Marine Drugs*, 12(9), 4898-4911.
- [19] Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., & You, S. (2019a). Bioactivities of *Nizamuddinia zanardinii* sulfated polysaccharides extracted by enzyme, ultrasound and enzyme-ultrasound methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1212-1220.
- [20] Lomartire, S., & Gonçalves, A. M. (2022). Novel technologies for seaweed polysaccharides extraction and their use in food with therapeutically applications—a review. *Foods*, 11(17), 26-44.
- [21] Khajenoori, M., & Haghghi Asl, A. (2014). Review of extraction of plant natural components by Microwaves and ultrasounds. *Innovative Food Technologies*, 1(3), 81-91.
- [22] You, Q., Yin, X., & Ji, C. (2014). Pulsed counter-current ultrasound-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Boletus edulis*. *Carbohydrate Polymers*, 101, 379-385.
- [23] Gude, V. G., Patil, P., Martinez-Guerra, E., Deng, S., & Nirmalakhandan, N. (2013). Microwave energy potential for biodiesel production. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 5-16.
- [24] Yu, M., Chen, M., Gui, J., Huang, S., Liu, Y., Shentu, H., He, J., Fang, Z., Wang, W., & Zhang, Y.

- (2019). Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137 (1), 139-150.
- [25] Dobrincic, A., Pedisic, S., Zoric, Z., Jurin, M., Roje, M., coz-Rakovac, R., & Dragovic-Uzelac, V. (2021). Microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction of sulfated polysaccharides from *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata*. *Foods*, 10(7), 14-81.
- [26] Jackson, S. G., & Mccandless, E. L. (1978). Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulfate and/or protein. *Analytical Biochemistry* 90, 802-808.
- [27] Srimongkol, P., Songserm, P., Kuptawach, K., Puthong, S., Sangtanoo, P., Thitiprasert, S., ... & Karnchanatat, A. (2023). Sulfated polysaccharides derived from marine microalgae, *Synechococcus* sp. VDW, inhibit the human colon cancer cell line Caco-2 by promoting cell apoptosis via the JNK and p38 MAPK signaling pathway. *Algal Research*, 69, 102-119.
- [28] AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International.
- [29] Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), 949-957.
- [30] Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.
- [31] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- [32] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [33] He, Y., Li, X., Wang, J., Yang, Q., Yao, B., Zhao, Y., ... & Zhang, Q. (2017). Synthesis, characterization and evaluation cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by Chinese herbal *Cornus officinalis* via environment friendly approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 56-60.
- [34] Prabakaran, G., Moovendhan, M., Arumugam, A., Matharasi, A., Dineshkumar, R., & Sampathkumar, P. (2019). Evaluation of chemical composition and in vitro antiinflammatory effect of marine microalgae *Chlorella vulgaris*. *Waste and Biomass Valorization*, 10(11), 3263-3270.
- [35] Torabi Dastgerdouei, P., Hamdami, N., & Keramat, J. (2021). Microwave-Assisted extraction of fucoidan from brown seaweeds of *Nizimuddinia zanardini* and assessment of the chemical and antioxidant properties of the extracted compound. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 16(1), 61-74.
- [36] Alboofetileh, M. (2024). Effect of acidic, enzymatic and ultrasonic extraction methods on the characteristics of fucoidan from *Sargassum ilicifolium*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 33(1), 119-132.
- [37] Okolie, C. L., Mason, B., Mohan, A., Pitts, N., & Udenigwe, C. C. (2019). The comparative influence of novel extraction technologies on in vitro prebiotic-inducing chemical properties of fucoidan extracts from *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 90(1), 462-471.
- [38] Yuan, Y., & Macquarrie, D. (2015). Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 129, 101-107.
- [39] Karnjanapratum, S., & You, S. (2011). Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(2), 311-318.
- [40] Koh, H. S. A., Lu, J., & Zhou, W. (2019). Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydrate Polymers*, 212 (3), 178-185.
- [41] Wang, S. K., Liang, P. H., Astronomo, R. D., Hsu, T. L., Hsieh, S. L., Burton, D. R., & Wong, C. H. (2008). Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of *Oligomannose dendrons* with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3690-3695.
- [42] Corsaro, A., Chiacchio, U., Pistarà, V., & Romeo, G. (2004). Microwave-assisted chemistry of carbohydrates. *Current Organic Chemistry*, 8(6), 511-538.
- [43] Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., & Song, S. (2019). Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Marine Drugs*, 17(3), 183-196.
- [44] Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 13-20.
- [45] Ganesan, P., Kumar, C. S., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8), 2717-2723.

- [46] Taheri, A., Ghaffari, M., Houshmandi, Sh., & Namavari, M. (2017). Investigation of the anticancer and antioxidant activity of the brown algae (*Cystoseira indica*) extract against the colorectal cancer cells. *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 21(4), 3117-325.
- [47] Bavi, Z., Ghaffari, M., Taheri, A., & Soheili, F. (2017). The cytotoxic effect of Chabahar Coast Marine algae *Gelidiella Acerosa* Organic extracts on breast (MCF-7) and colorectal (HT-29) cancer cell lines. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 16(8), 757-768.



Scientific Research

The effect of using ultrasound and microwave pretreatment on the antioxidant and anticancer activity of polysaccharides extracted from the *Chlorella vulgaris* microalgae

Seyyede Maryam alavi¹, Sakineh Yeganeh^{2*}, Parastoo Pourashouri³, Mina Esmaili Khariki⁴, Sarvenaz Khalili Tilami⁵

- 1- PhD student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
- 2- Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague, Kamycka 129

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2025/09/08

Review: 2025/10/07

Accepted: 2025/10/08

Keywords:

ultrasound,
Sulfated polysaccharides,
anticancer properties,
antioxidant activity,
Chlorella vulgaris,
microwave.

DOI: 10.48311/fsct.2026.84095.0

*Corresponding Author E-
skyeganeh@gmail.com
s.yeganeh@sanru.ac.ir

For about two decades, researchers have been looking for natural antioxidants to replace with their chemical types in food formulations to reduce the harmful effects of chemical preservatives. Also, in modern cancer treatment strategies, it is very important to use safe and natural compounds that have the ability to destroy cancer cells while not harming healthy cells. Polysaccharides extracted from algae can act as antioxidants and a natural anticancer compound, and the extraction method is one of the determining factors in the manifestation of their numerous properties. The aim of this study was to investigate the effect of using ultrasound and microwave pretreatments on the extraction efficiency, sulfate content, antioxidant and anticancer properties of *Chlorella vulgaris* polysaccharides. For this purpose, power of 300 W and time of 20 minutes, as well as 600 W and 10 minutes (after optimization) were selected for ultrasound and microwave pretreatments, respectively. According to the findings, the use of the aforementioned pretreatments increased ($p < 0.05$) the extraction efficiency, sulfate content, antioxidant and anticancer activity of the extracted polysaccharides (compared to the control). The highest extraction efficiency and sulfate content ($21.73 \pm 0.19\%$ and $34.06 \pm 1.07\%$, respectively), free radical scavenging activity, reducing power, total antioxidant and anticancer properties were related to ultrasound treatment ($p < 0.05$). The IC_{50} of this treatment for the inhibition of DPPH and ABTS radicals was calculated to be 1.04 ± 0.03 and 0.99 ± 0.02 mg/ml, respectively. According to the results of the anticancer activity of the treatments, the LC_{50} of the control and ultrasound and microwave treatments for the destruction of T47D breast adenocarcinoma cancer cells was measured as 1033.54 ± 9.27 , 412.76 ± 5.02 , and 693.05 ± 7.34 μ g/mL, respectively. From this study, it can be concluded that the use of ultrasound and microwave pretreatments for extraction, significantly enhances the antioxidant and anticancer properties of *C. vulgaris* polysaccharides. Also, use of these polysaccharides in food formulations as preservatives and in the production of anticancer drugs as active ingredients is proposed.