ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره الکلی میکروجلبک *کلرلا* جمع‌آوری شده از شهرستان نوشهر

ساره رضایی[1*]،عباسعلی دهپور جویباری[2]،فرزاد منتظری[3]

۱-دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی دانشگاه پیام نور تهران
۲- استادیار دانشگاه آزاد قائمشهر، دانشکده علوم گروه زیست شناسی
۳-دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر
sarhrezaee@yahoo.com

چکیده

رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در ایجاد بیماری های مختلف دارند و ترکیبات ضد اکسیدان می‌توانند در پیش گیری و درمان این بیماری ها مفید باشند. امروزه آنتی‌اکسیدان های طبیعی نسبت به مصنوعی سالم‌تر و ایمن تر بوده و محدود به منابع خشکی زی نمی باشند.ترکیبات زیستی فعال موجود در جلبک ها دارای اثرات گسترده ضدباکتریایی، ضد توموری، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی هستند، میکرو جلبک کلرلا از منطقه سیسنگان واقع در استان مازندران جمع آوری گردید پس از شناسایی خشک گردیده سپس با روشهای متداول عصاره گیری شد و فعالیت آنتی اکسیدانتی ان با روش DPPH و محتوی فنول و فلاونوئید آن مورد ارزیابی قرار گرفت در بررسی اثرات انتی اکسیدانتی با روش DPPH میزان IC50 =780 mg.ml تعیین گردید و میزان فنل و فلاونوئید آن به ترتیب 44.6 و32.12mg/ml تعیین شد در نتیجه عصاره جلبکی مورد نظر دارای منبع آنتی اکسیدانی با ارزشی می باشد، همچنین عصاره اتانولی جلبک مورد نظر دارای مقدار بالای فنل می باشد که باعث مهار رادیکالهای آزاد می شود.

کلمات کلیدی :آنتی اکسیدان ، عصاره ، میکرو جلبک *کلرلا*

مقدمه

در بسیاری از کشورها جلبک تازه دریایی به‌عنوان غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد، چرا که جلبک‌ها به‌دلیل ارزش غذایی دارای پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و فیبر و همچنین غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها و ریزمغذی‌ها مانند ویتامین‌ها می‌باشند(Govindan *et al.*,2012). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها معمولا در گیاهان و جلبک‌های دریایی یافت می‌شود این شامل مواد مختلف آلی و غیرآلی که می‌تواند در سلامت انسان بهره‌مند شوند، این ترکیبات می‌توانند رادیکال‌های آزاد که نقش مهمی را بر سلامت انسان دارد که موجب بیماری‌هایی مثل: بیماری قلبی، سرطان، فشارخون بالا، دیابت و آترواسکلروز می‌باشد را مهار کند (Farasat *et al.*,2014)، جلبک کارا به‌عنوان یک منبع غذایی مهم در بسیاری از نقاط جهان است و با وجود مواد مغذی، ویتامین‌های فراوان، عناصر و رژیم غذایی حاوی فیبر به‌عنوان دارو در طب سنتی و برای چربی خون، گرمازدگی و بیماری‌های اداری و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (Qi *et al.*, 2005) . میکروجلبک کلرلا جز جلبک‌های سبز محسوب می‌شود که دارای پراکنش وسیع در آب‌های شور و شیرین گزارش شده‌است . (Chang *et al.*,2002) هدف از این بررسی خواص آنتی‌اکسیدانتی و میزان فنل و فنلاونوئیدی عصاره اتانولی میکروجلبک کلرلا جمع‌آوری شده از منطقه سیسنگان واقع در استان مازندران می‌باشد.

Algalnas

روش تحقیق

استخراج عصاره اتانولی

برای تهیه عصاره ابتدا ۶۰ گرم از جلبک خشک شده را وزن و در دکانتور ریخته و دو برابر حجم ماده خشک اتانول می-ریزیم اینکار را سه بار با اتانول تکرار می‌کنیم سپس عصاره بدست آمده را بوسیله روتاری یا روش تقطیر عصاره خالص را بدست می‌آوریم .

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. آسکوربیک اسید، BHA و کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC50 به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاکسازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد(Yen and chen,1995).

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100$$

AB =جذب بلانک،AS=جذب نمونه یا استاندارد

اندازه گیری محتوی فنلی :

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیوکالتیو انجام شد(Ordone *et al*., 2006).غلظت ۱ میلی‌گرم / میلی لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم‌زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵گرم درلیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در ۷۶۰ نانومتراندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت مقادیر هم‌ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد. به این صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به‌دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به‌عنوان محتوای تام فنولی عصاره بر اساس میزان معادل «میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره» گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۲ بار تکرار شد(Ghasemi *et al*., 2009).

اندازه گیری محتوی فلاونوئید :

میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ‌سنجی ارزیابی شد(Chang,2002). غلظت ۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ٪۱۰ به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم

به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- ماوراءبنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره» گزارش گردید. آزمایشات ۲ بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش شد(Ghasemi *et al.*,2009).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق متد ین و چن (۱۹۹۵) ارزیابی شد.غلظتهای مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با pH= ۶/۵ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید- [K3Fe(CN6)] مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی- لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید (FeCl3) به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. دراین آزمایش آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرار شد.

یافته ها

نتایج حاصل از داده ها نشان می‌دهد که محتوی فنولی عصاره اتانولی میکروجلبک کلرلا۴۴.۶ mg/ml، همچنین محتوی فلاونوئیدی عصاره اتانولی میکروجلبک کلرلا۳۲.۱۲mg/ml می‌باشد. در بررسی فعالیت به‌روش DPPHمشخص گردید که IC_{50}عصاره متانولی ۷۸۰mg.ml می‌باشد، در مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدان میکروجلبک کلرلا که مورد بررسی قرار گرفته‌است به علت محتوی فنل و فلاونوئید فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بالاست، همبستگی مثبت و معنی‌دار قوی بین DPPH و مهار رادیکال و فنولیک و مطالعه فلاونوئید نشان داد که ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها علل اصلی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل گونه میکروجلبک کلرلا است. همچنین لازم به کار بیشتر در آزمایشگاه جهت بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جلبک دریایی سواحل شمال به علت شرایط محیطی و اثرات آن بر روی پارامترهای فیزیکوشیمیایی به‌طور طبیعی می‌باشد.

جدول ۱: میزان به دام‌اندازی DPPH توسط استاندارد آسکوربیک اسید

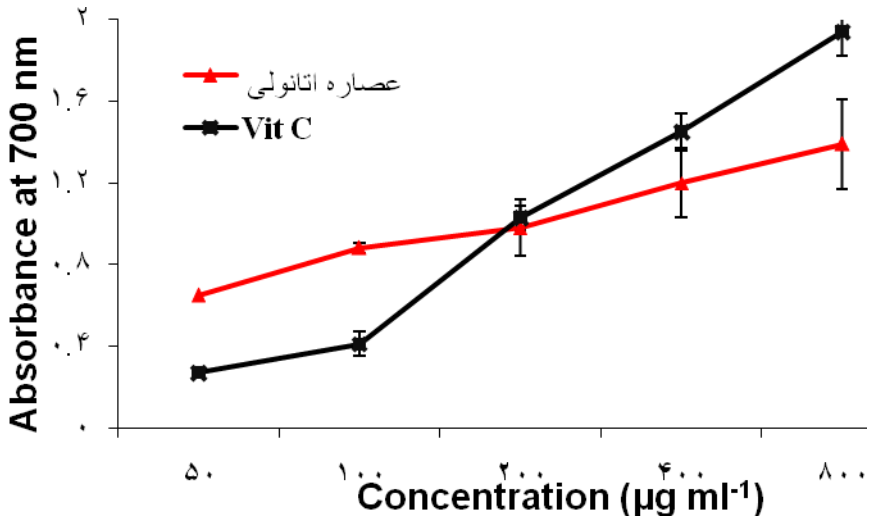
غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	درصد به دام اندازی
۲۵	۹۶/۴
۱۲/۵	۷۱/۲
۶/۲۵	۵۵/۱
۳/۱۲۵	۴۴/۸
۱/۵۶۳	۳۸/۷

هر یک از مقادیر جدول میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف ± انحراف استاندارد می‌باشد.

جدول ۲: بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانتی عصاره اتانولی میکرو جلبک کلرلا اثرگذاری رادیکال آزاد DPPH

غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	درصد مهار(٪)
۸۰۰	۵۳/۳۷±۰/۲
۴۰۰	۴۲/۹۶±۰/۲
۲۰۰	۴۰/۷۶±۰/۱
۱۰۰	۲۱/۲۶ ±۰/۲
۵۰	۱۳/۴۸ ±۰/۲

در عصاره اتانولی جلبک با افزایش غلظت از ۵۰ تا ۸۰۰ درصد مهار از ۱۳/۴۸ تا ۵۳/۳۷ افزایش یافته‌است. اجزای جلبک به آرامی روند صعودی را طی کردند عصاره اتانولی درصد احیاء کمتری را نسبت به Vitamin C (کنترل مثبت) نشان داد. بیشترین فعالیت مربوط به: Vitamin C



نمودار ۱: مقایسه میزان قدرت احیاکنندگی عصاره جلبک با استاندارد آسکوربیک‌اسید

بحث و نتیجه‌گیری

فنول‌ها و پلی‌فنول‌ها به‌طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با منشأ گیاهی یافت می‌شوند و می‌توانند اثرات آنتی-اکسیدانی بسیار بالایی داشته باشند(Sasaki *et al.*,1996). مکانیسم عمل فلاونوئیدها برای بروز اثر آنتی‌اکسیدانی به صورت جمع‌آوری رادیکال‌های آزادی مثل سوپراکسید، آنیون‌ها، رادیکال‌های پراکسید چربی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد. علاوه بر این توانایی به دام‌اندازی اکسیژن منفرد و شلات کردن فلزات را نیز دارند (Pokomy *et al.*, 2001). مدل به دام‌اندازی رادیکال پایدارDPPH برای ارزیابی توانایی نمونه‌های مختلف در به دام‌اندازی رادیکال آزاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیا شدن و تولید مولکول پایدار DPPH-Hاز ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال DPPH در ۵۱۷ نانومتر جذب دارد اما به محض احیا توسط یک آنتی‌اکسیدان، جذب کاهش می‌یابد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به‌صورت ناپدید شدن رنگ ارغوانی بیان می شود(Junior *et al.*, 2009). .با توجه به داده‌های جداول، نتایج آزمون (درصد احیاء) یا مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با ویتامین C مقایسه شد. همانگونه که دیده شد عصاره جلبک مورد درصد احیاء کمتری دارند، در مقایسه با ویتامین C . اجزای جلبک روند صعودی را طی کردند و با افزایش غلظت افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی دیده شد. درصد احیاء در ویتامین C بالاترین می‌باشد. با توجه به بررسی درصد احیاء، جلبک مورد بررسی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار بوده و می‌تواند جایگزین خوبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باشد. روش DPPH یک روش ساده و سریع و ارزان‌قیمت برای اندازه گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانت غذاها است. DPPH یک رادیکال پایدار و به عنوان پذیرنده هیدروژن غیرفعال بوده و به‌طور وسیعی برای مطالعه خواص آنتی-اکسیدانی ترکیبات فعال زیستی (بیواکتیو) جدا شده از عصاره گیاهی به کار می‌رود. قدرت احیا کنندگی، توانایی الکترون دهندگی آنتی اکسیدان را نشان می‌دهد. چنانچه ترکیبی دارای این ویژگی باشد می‌تواند باعث کاهش میزان ترکیبات حد واسط اکسیده ساخته شده طی مراحل لیپیدپراکسیداسیون شود. به این ترتیب باعث شکستن زنجیره واکنش می‌شود و می تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان اولیه و ثانویه عمل کند(yen and chen, 1995). سنجش قدرت احیاکنندگی نمونه، با استفاده از احیا آهنIII (فریک)به آهنII (فروس) انجام شد. با توجه به بررسی درصد مهار، جلبک مورد بررسی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخورداراست. جلبک‌های دریایی به‌علت داشتن دیواره سلولی پلی‌ساکاریدی سولفاته از گیاهان دریایی متمایز هستند. یکی از نکاتی که در خصوص خواص بیولوژیکی جلبک‌ها از گیاهان تمایز می‌شوند، وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانتی دیواره پلی ساکاریدی جلبک‌ها می باشد(Govindan,2012).

منابع

Govindan, s., Thomas,j.andkurup , 2012 . invitro antioxidant and antitumor activity of plysacarir isolated from ulvafusciata . p-238

Farasat,m., khavari-nejad , A. Bagher-nabavi,M and forooghnamjooyan. 2014. Antioxidant activity, totalphenolics and flavonoid contents of som edible green seaweeds from northern coastsof the Persian Gulf. 13(1):163-170

Qi H, Zhao T, Zhang Q, Li Z, Zhao Z, Xing R (2005). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from Ulva pertusa Kjellm (Chlorophyta). Appl. Phycol., 17: 527-534.

1. Ordone, AAL. et al. (2006).Antioxidant activities of Sechiumeduleswartz extracts, Food Chemistry,97,452-458.

Algalmag

Ghasemi,K., Ghasemi, Y., Ebrahimzadeh, M.A.(2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus specis peels and tissues. Pak. J. Pharm. Sci.,22 (3): 277-281.
Chang, C. et al. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods,J Food Drug Analysis, 10,178-182.

Yen, G C., Duh, P D. (1995). Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut halsfromvariouscaltivars. Journal of the American oil chemist society. Vol. 62. pp. 1065-1067.

Sasaki, A.B.E. et al.: Structural aspects of anti oxidants activity of flavonoids,Free radic.Biol.Med,1996,20:331-342

Junior, M.R.M. et al.: Anti oxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil,Food chemistry,2009,116:8-12

Pokorny, J. et al.: Anti oxidant in food ;practical application,America,Wood head publishing Ltd,2001:46-48

Evaluation of the antioxidant effects of chlorine microalgae alcoholic extract from Nowshahr city

Abstract

Free radicals play an important role in the development of various diseases, and antioxidant compounds can be useful in the prevention and treatment of these diseases. Today, natural antioxidants are healthier and safer than artificial ones and are not limited to dry sources. The active biological compounds in algae have broad-spectrum antibacterial, anti-tumor, antifungal, antioxidant and anti-cancer effects. Chlorella microalgae were collected from Sisangan region in Mazandaran province and dried after identification, then extracted by conventional methods and its antioxidant activity was evaluated by DPPH method and its phenol and flavonoid content. In the study of antioxidant effects by DPPH method, the level of IC50 = 780 mg.ml was determined and the amount of phenol and flavonoids was determined as 44.6 and 32.12 mg / ml, respectively, so the desired algae extract has a valuable antioxidant source, as well as ethanolic extract. The algae has a high amount of phenol, which inhibits free radicals.

Keywords: Antioxidant, Extract, Chlorella Microalgae