



مقاله پژوهشی

استخراج، تخلیص و شناسایی ساختار پلی ساکارید ریزجلبک نمک دوست
Cyanotheca sp. و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی آن

زهرامینی خوئی^{۱*}، اشکان اژدری^۲، المیرا عرفانی فر^۳، سجاد پورمظفر^۴

DOI: 10.22124/japb.2024.28244.1551

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

این پژوهش با هدف استخراج، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پلی ساکارید ریزجلبک سبز-آبی نمک دوست *Cyanotheca* sp. انجام شد. این ریزجلبک در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد و زی توده آن جمع آوری شد. فرایند استخراج پلی ساکارید با بررسی تاثیر دما (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد) و زمان استخراج (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه) بهینه سازی شد. پس از استخراج اولیه، پلی ساکارید خام با استفاده از روش های کروماتوگرافی و ژل فیلتراسیون تخلیص شد. ویژگی های فیزیکوشیمیایی پلی ساکارید استخراج شده شامل همگنی، وزن مولکولی و پروفایل مونوساکاریدی سنجش شد. فعالیت ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش انتشار دیسک ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بالاترین بازده استخراج پلی ساکارید در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و در مدت زمان ۱۸۰ دقیقه به دست آمد. پلی ساکارید استخراج شده دارای وزن مولکولی ۱۰۳ کیلودالتون بود. پروفایل واحدهای مونومری رامنوز، فوکوز، گزایلوز، مانوز، گلوکز، گالاکتوز، اسید گلوکورونیک و اسید گالاکتورونیک به ترتیب با نسبت های مولی ۱/۷، ۰/۸، ۱/۰، ۳/۲، ۶/۱، ۴/۵ و ۵ درصد بود. همچنین پلی ساکارید استخراج شده به طور معنی داری رشد باکتری های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* را مهار کرد ($P < 0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش پلی ساکارید مشتق شده از ریزجلبک *Cyanotheca* sp. دارای فعالیت ضدباکتریایی مناسبی است و می تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه برای کاربردهای دارویی و بهداشتی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ریزجلبک، *Cyanotheca* sp.، نمک دوست، پلی ساکارید، فعالیت ضدباکتریایی.

- ۱- استادیار بخش زیست فناوری، مرکز تحقیقات شیلای آب های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلای کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.
- ۲- دکتری بهداشت آبیان، مرکز تحقیقات شیلای آب های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلای کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.
- ۳- کارشناس ارشد بخش اکولوژی، مرکز تحقیقات شیلای آب های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلای کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.
- ۴- استادیار بخش آبی پروری، ایستگاه تحقیقات نرم تنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلای کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر عباس، ایران.

* نویسنده مسئول: zamini.41@gmail.com

مقدمه

ریز جلبک‌های نمک‌دوست (هالوفیل) که در اکوسیستم‌های فوق شور زندگی می‌کنند، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که آنها را از دیگر میکروارگانیسم‌های معمول متمایز می‌کند. از جمله این ویژگی‌ها توان سازگاری و رشد مناسب در محیط‌هایی با غلظت نمک بسیار بالا (گاهی تا حد اشباع) است. دستگاه فتوسنتزی این جلبک‌ها در مقایسه با جلبک‌های آب شیرین کارایی بالاتری را برای بهره‌برداری از طیف وسیع‌تر نور نشان داده است. از طرفی، مکانیسم‌های حفاظتی منحصر به فرد مانند تولید اسمولیت‌ها و ترکیبات سازگارکننده، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی قوی برای مقابله با استرس اکسیداتیو در آنها به وجود آمده است (Oren, 2015). این ویژگی‌های زیستی، جلبک‌های نمک‌دوست را به گزینه‌های مناسبی برای پژوهش‌های علمی و کاربردهای بیوتکنولوژیکی تبدیل کرده است. از طرفی، امکان کشت این ریزجلبک‌ها در مناطقی که برای کشاورزی سنتی مناسب نیستند، فراهم است. خطر آلودگی با میکروارگانیسم‌های دیگر در آنها نسبتاً کمتر است که این امر به تولید زی‌توده خالص‌تر منجر می‌شود. پرورش این ریزجلبک‌ها در شرایط کمبود آب شیرین بسیار

حائز اهمیت است، زیرا می‌تواند به کاهش فشار بر منابع آب شیرین کمک کند. ریزجلبک سبز آبی *Cyanothece sp.* یکی از سویه‌های نمک‌دوست است که گزارش‌های متعددی در مورد توان اکولوژیکی و ویژگی‌های زیست‌فناورانه آن صورت گرفته است. در متون قدیمی این جنس به طور سنتی با نام علمی *Synechococcus* Nag, 1849 نیز نام‌گذاری و طبقه‌بندی شده است، اما در حال حاضر این طبقه‌بندی تحت بازبینی مجدد قرار گرفته (Rosen and Mares, 2016) و نام *Cyanothece sp.* برای آن استفاده شده است. این ریزجلبک سبز آبی یکی از تولیدکنندگان اولیه و حیاتی است و نقش کلیدی در چرخه کربن دارد (Komarek and Cepak, 1998). سویه‌های مختلف این جنس از زیستگاه‌های مختلفی جداسازی شده‌اند. پراکنش آن از زمین‌های کشاورزی آب شیرین تا شوره‌زارهای نمکی است. بنابراین به نظر می‌رسد این سویه از نظر اکولوژیکی توان بالایی داشته و دامنه تحمل قابل ملاحظه‌ای در برابر شرایط محیطی داشته باشد (Ohki et al., 2014). در پژوهش حاضر برای جدایه نمک‌دوست *Cyanothece sp.* که از کشندان پشت سدی

دارای خواص زیستی و دارویی منحصر به فردی هستند که آنها را برای کاربردهای پزشکی مناسب می‌سازد. بنابراین، بررسی و استخراج پلی ساکاریدها از جلبک‌ها نه تنها از نظر علمی ارزشمند است، بلکه می‌تواند منافع اقتصادی و زیست‌محیطی قابل توجهی نیز داشته باشد (Madsen et al., 2023).

پلی ساکاریدهای تولید شده توسط ریزجلبک‌ها معمولاً در دسته متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات زیست‌فعال دسته‌بندی می‌شوند. این ترکیبات تنها برای رشد و بقای سلول ضروری نیستند، بلکه نقش‌های ثانویه مانند محافظت در برابر استرس‌های محیطی را ایفا می‌کنند. تولید این ترکیبات اغلب در پاسخ به شرایط محیطی خاص یا در مراحل خاصی از رشد سلولی افزایش می‌یابد. برخلاف پلی ساکاریدهای گیاهی، تولید این پلی ساکاریدها وابسته به فصل، مرحله رسیدگی یا رشد گیاه نیست. پلی ساکاریدهای استحصال‌ی از ریزجلبک‌های نمک‌دوست دارای ساختارهای متنوع و پیچیده‌ای هستند و گروه‌های عاملی فعال در آنها وجود دارد که باعث می‌شود در برابر تغییرات pH، دما و شوری پایداری بیشتری از خود نشان دهند. برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که وجود تنوع در ساختار پلی ساکاریدها منجر

فوق اشباع نمک لیپار در سواحل چابهار جداسازی شده است، مورد مطالعه قرار گرفت (Aminikhoei et al., 2022). مطالعات قبلی نشان داده‌اند سویه‌های مختلف *Cyanotheca* sp. پیش از این از منابع آب شیرین تا شور و بسیار شور جداسازی شده است. برای مثال De Philippis و همکاران (۱۹۹۳) یک سویه نمک‌دوست *Cyanotheca* sp. را از زمین‌های فوق اشباع نمک Somaliland در نزدیکی Getzira جداسازی کردند. Ohki و همکاران (۲۰۱۴) یک سویه *Cyanotheca* sp. آب شیرین را از مزارع کشت برنج در ویتنام جداسازی کردند.

در حقیقت، پلی ساکاریدها دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند که آنها را برای کاربردهای مختلف مناسب می‌سازد. این ترکیبات در صنایع مختلفی از جمله غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی کاربرد دارند (Oren, 2015). پلی ساکاریدها منبع مهمی برای تامین انرژی در موجودات زنده هستند. با توجه به ماهیت باارزش پلی ساکارید، شناخت منابع طبیعی مناسب که حاوی پلی ساکاریدهای فعال زیستی باشد، ضرورت دارد. مطالعات نشان داده‌اند که جلبک‌ها منبع غنی و متنوعی از پلی ساکاریدها هستند. پلی ساکاریدهای جلبکی

می‌تواند منجر به تخریب یا تغییر ساختار پلی‌ساکاریدها شود. بنابراین یافتن مدت زمان مناسب استخراج برای فرایند استحصال غیرقابل اجتناب است (Prybylski et al., 2020).

با توجه به ارزش زیستی ریزجلبک، مطالعه حاضر با هدف استخراج، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی پلی‌ساکارید ریزجلبک *Cyanotheca* sp. طراحی و اجرا شده است. این مطالعه شامل بهینه‌سازی شرایط استخراج، تعیین وزن مولکولی و بررسی ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده و همچنین بررسی اثرات ضدباکتریایی آن بر روی باکتری‌های بیماری‌زا است.

مواد و روش‌ها

تهیه استوک اولیه و کشت ریزجلبک *Cyanotheca* sp. به منظور تولید زی‌توده خام در این مطالعه جدایه نمک‌دوست *Cyanotheca* sp. که از کشندان پشت سدی لیپار (سواحل دریای عمان) جداسازی شده بود، برای کشت زی‌توده مورد استفاده قرار گرفت (Amininkhoei et al., 2022). ریزجلبک *Cyanotheca* sp. در شرایط استریل کنترل شده آزمایشگاهی در آزمایشگاه جلبک‌شناسی مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور چابهار

به شکل‌گیری فعالیت‌های ایمنی‌زایی خاص از جمله فعالیت‌های ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، و ضدالتهابی در آنها شده است. همچنین ریزجلبک‌ها حاوی اسیدهای اورونیک هستند که به حفظ آب در آنها کمک می‌کند (Bandyopadhyay et al., 2011; Ben et al., 2017; Laroche, 2022).

در فرایند استخراج پلی‌ساکارید از ریزجلبک‌ها، شاخص‌های متعددی مانند دمای استخراج و مدت زمان استخراج تاثیرگذار هستند و افزایش بازده استحصال منوط به بهینه‌سازی تاثیر هر یک از این عوامل است. برای مثال، شکستن پیوندهای بین پلی‌ساکاریدها و سرعت انتشار آنها از دیواره سلولی به محلول استخراج و حلالیت آنها تحت تاثیر مستقیم دمای واکنش است. دمای بیش از حد باعث تخریب یا تغییر ساختار پلی‌ساکاریدها شده و منجر به استخراج ناخواسته ترکیبات دیگر (مانند پروتئین‌ها) می‌شود که می‌تواند خلوص محصول نهایی را کاهش دهد (Liberma et al., 2016; Madsen et al., 2023). بنابراین یافتن دمای بهینه برای افزایش بازده و حفظ کیفیت پلی‌ساکارید ضروری است. زمان استخراج نیز نقش بسیار مهمی در بازده استحصال دارد. زمان بیش از حد طولانی

حرارت استخراج (۶۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه سانتی گراد) و مدت زمان استخراج در سه بازه زمانی (۶۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ دقیقه) بر بازده استحصال صورت گرفت.

استخراج پلی ساکارید خام زی توده ریزجلبک *Cyanotheca* sp.

به منظور حذف چربی ها، رنگدانه ها و غیرفعال سازی آنزیمی، زی توده خشک *Cyanotheca* sp. ابتدا با اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۲ ساعت (در ۴ نوبت ۳ ساعته) شستشو شد. پس از خشک شدن تفاله در دمای اتاق، پلی ساکاریدهای محلول با آب مقطر و با نسبت ۱:۱۰ (وزن/حجم) در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸۰ دقیقه استخراج شد (بر اساس شاخص های بهینه سازی شده). فاز آبی به دست آمده پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۰ دقیقه در خلاء تا یک سوم حجم اولیه تغلیظ شد. سپس، پروتئین زدایی با استفاده از روش سواگ (مخلوط ۱- بوتانول و کلروفرم با نسبت ۱:۴) انجام گرفت. فاز آبی حاوی پلی ساکارید با ۳ حجم اتانول ۹۶ درصد رسوب داده شد (شکل ۱) و پس از سانتریفیوژ، پلی ساکارید خام جمع آوری (شکل ۲) و خشک شد. این ماده خام برای مراحل تخلیص بعدی

کشت داده شد. ریزجلبک در ارلن های شیشه ای ۲ لیتری در دمای 27 ± 1 درجه سانتی گراد و با استفاده از محیط کشت BG11 در pH ۸/۲ کشت داده شد. برای حفظ تعلیق یکنواخت سلول ها و جلوگیری از ته نشینی، سیستم هوادهی ملایم با تزریق هوای فیلتر شده به صورت مداوم اعمال شد. پس از رسیدن به فاز رشد زی توده برداشت شد. فرایند برداشت با استفاده از سانتریفیوژ آزمایشگاهی (Heraeus, Labofuge 200، آلمان) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سوسپانسیون جلبکی اولیه (۲ لیتر) تغلیظ شد تا خمیر سلولی به دست آمد. سپس خمیر سلولی با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (ژال طب، ایران) خشک شد. پودر زی توده خشک شده نهایی با ترازوی دقیق (HR-200، AND، ژاپن) وزن شد و برای جلوگیری از تخریب ترکیبات آن، در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام مراحل استخراج نگهداری شد (Su et al., 2007).

تاثیر دما و مدت زمان استخراج بر بازده استحصال پلی ساکارید زی توده ریزجلبک *Cyanotheca* sp.

به منظور بهینه سازی فرایند استخراج پلی ساکارید، آزمون های تاثیر دما در سه درجه

مورد استفاده قرار گرفت (Jahanbin et al., 2017).



شکل ۱: پلی ساکارید با سه حجم اتانول ۹۶ درصد



شکل ۲: پلی ساکاریدهای استخراج شده

دی اتیل آمینواتیل سلولز مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ابتدا دی اتیل آمینواتیل سلولز خشک به ترتیب همراه با اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال و سود ۰/۵ نرمال در داخل بشر ریخته شد. سپس در یک دسیکاتور قرار گرفت تا ته نشین شود و حباب های هوای به دام افتاده در بین مواد سلولزی از آن خارج شوند. در هر مرحله محلول کدر رویی جدا دی اتیل آمینواتیل سلولز با آب مقطر شستشو داده شد. در پایان این مرحله، دی اتیل آمینواتیل سلولز در محلول سود ۰/۱ نرمال به صورت معلق درآمد و به شکل یک لایه نازک وارد ستون کروماتوگرافی (۳۰×۲/۶ سانتی متر) شد. شستشوی ستون کروماتوگرافی با آب مقطر چندین بار تکرار و پس از متراکم شدن مواد سلولزی در داخل ستون، برای خالص سازی پلی ساکارید آماده شد (Xu et al., 2009). سپس پلی ساکاریدها وارد ستون شده و در مرحله بعد پلی ساکاریدها با آب مقطر شسته شدند. در پایان پلی ساکارید محلول در آب که رنگ سفید و کاملاً خالص داشت جمع آوری و خشک شد و برای مطالعات شناسایی و تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت.

تخلیص پلی ساکاریدهای محلول در آب

برای خالص سازی بیشتر پلی ساکاریدهای خام به دست آمده از مرحله قبل از ستون کروماتوگرافی استفاده شد. ستون کروماتوگرافی

شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکاریدهای محلول در آب ریزجلبک *Cyanothece* sp.

برای تعیین کمی و کیفی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید از کروماتوگرافی گازی (Varian, 9366، آمریکا) استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع موئینه (DM) و آشکارساز مورد استفاده از نوع یونش شعله‌ای بود. دمای ستون در ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند، سپس تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد (با نرخ ۸ درجه سانتی گراد در دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در همین دما نگه داشته شد. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ و ۳۰۰ درجه سانتی گراد بود. برای آماده سازی نمونه برای تزریق به دستگاه، ابتدا ۲ میلی لیتر از محلول ۲ مولار اسید تری فلوروآستیک به ۱۵ میلی گرم پلی ساکارید در داخل لوله آزمایش اضافه شد. سپس لوله‌ها به صورت درب بسته در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت گرما داده شدند. اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب ۴۰ درجه سانتی گراد حذف شد و نمونه هیدرولیز شده توسط ۵۰ میلی گرم

بوروهیدرید سدیم خنثی شد. اسیدی کردن نمونه‌ها با استفاده از اسید استیک انجام گرفت و اسید بوریک اضافی با استفاده از متانول حذف شد. آلدیتول‌های به دست آمده با استفاده از مخلوط پیریدین-انیدرید استیک در حمام ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت استیله شده و به استات‌های آلدیتول موبوطه تبدیل شدند. مونوساکاریدهای استاندارد (د-گلوکز، د-گالاکتوز، ال-رامنوز، د-مانوز، ال-آرابینوز، د-زایلوز و ال-گالاکتورونیک) همراه با ۲ میلی گرم میواینوزیتول (به عنوان استاندارد داخلی) همانند روش یاد شده در بالا تهیه و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد (Chen et al., 2011).

تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید غالب به دست آمده از ریزجلبک *Cyanothece* sp.

همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب توسط روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (روی ستون Sephadex G100، Sigma، آمریکا) و کروماتوگرافی ژل تراوا با کارایی بالا، با مشخصات سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) همراه با ستون Tosoh، TSKgel G3000SWxl، ژاپن؛ ۷/۸×۳۰۰ میلی لیتر) انجام شد. شستشوی

شاهد مثبت) آغشته شدند و روی سطح آگار قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از دوره انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد (Sukhikh et al., 2022).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و رسم نمودارها با استفاده Microsoft Excel 2016 انجام شد. برای بررسی اثر دما و زمان استخراج و تاثیر متقابل آنها بر بازده پلی‌ساکارید در قالب آزمایش فاکتوریل دو عاملی با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه فعالیت ضدباکتریایی پلی‌ساکارید علیه دو گونه باکتری بررسی شده از آزمون T مستقل استفاده شد.

نتایج

ریزجلبک *Cyanothece* sp. (شکل ۳) در شرایط مطلوب رشد آن کشت داده شد و

ستون توسط محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه صورت گرفت و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور بود. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران با وزن‌های مولکولی مشخص (۱۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۷۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰۰ دالتون) به دست آمد و دمای ستون ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود. وزن مولکولی پلی‌ساکارید محلول در آب با استفاده از منحنی کالیبراسیون یاد شده در بالا محاسبه شد (Sun et al., 2010).

سنجش فعالیت ضدباکتریایی

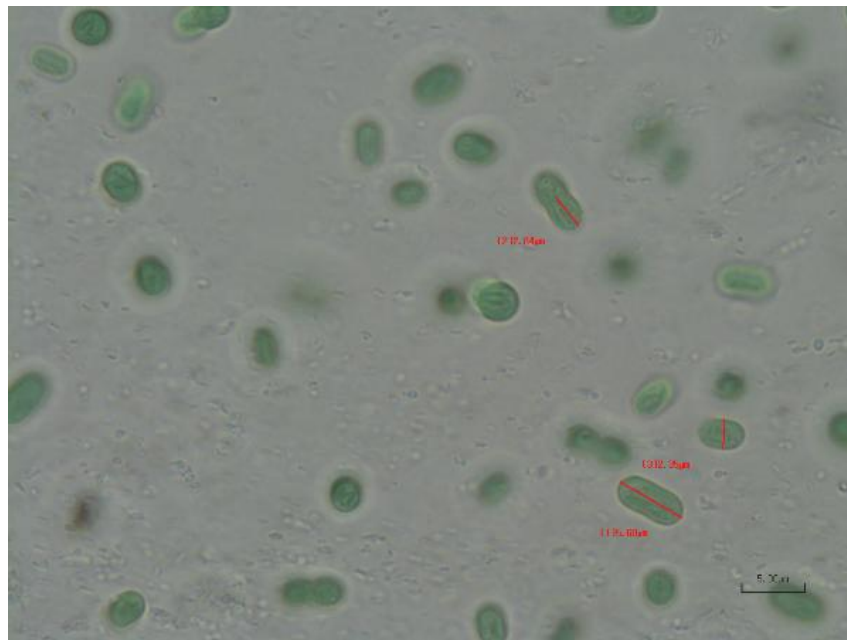
فعالیت ضدباکتریایی پلی‌ساکارید استخراج شده علیه سویه‌های گرم منفی *Escherichia coli* و گرم مثبت *Staphylococcus aureus* ارزیابی شد. کشت‌های باکتریایی مورد نظر با استفاده از محیط کشت جامد، احیا و با تعلیق در سرم فیزیولوژی تا سطح استاندارد معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های کاغذی استریل (قطر ۶ میلی‌متر) با ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت پلی‌ساکارید ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و همچنین آمپی‌سیلین (به عنوان

زی توده به دست آمده در فاز نمایی رشد برداشت شد. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد با افزایش طول دوره پرورش یک ماده ژلاتینی اطراف کلنی های سلولی شکل گرفته بود که باعث تشکیل محیط نسبتا چگال تر شد.

تاثیر زمان و دمای استخراج بر بازده استخراج پلی ساکارید

در جدول ۱ تاثیر دما و مدت زمان استخراج بر بازده تولید پلی ساکارید در ریزجلبک

Cyanothece sp. نشان داده شده است. بررسی داده های این مطالعه نشان داد که دمای به کار برده شده برای فرایند عصاره گیری و استخراج پلی ساکارید و همچنین مدت زمان عصاره گیری تاثیر معنی داری بر بازده استحصال پلی ساکارید داشت. افزایش دما از ۴۰ تا ۸۰ درجه و سانتی گراد همچنین افزایش زمان از ۶۰ تا ۱۸۰ دقیقه سبب افزایش بازده استخراج از ۳۱ تا ۵۳ درصد شد.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپی ریزجلبک *Cyanothece* sp.

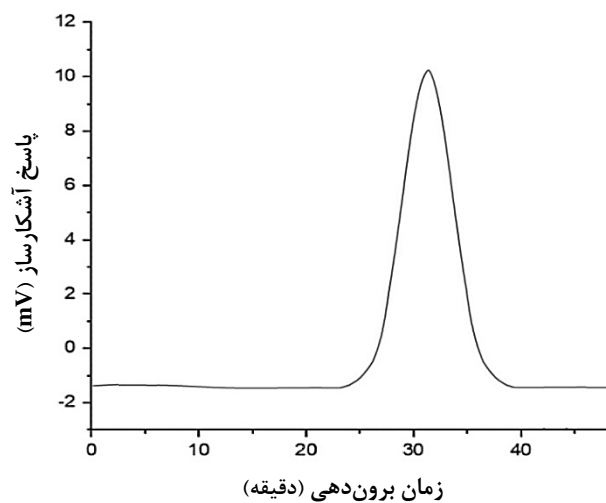
جدول ۱: تاثیر دما و مدت زمان استخراج بر بازده استخراج پلی ساکارید ریز جلبک *Cyanothece* sp. (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

بازده (درصد)	مدت زمان استخراج (دقیقه)	دمای استخراج (درجه سانتی گراد)
31 ± 0.6^c	۶۰	۴۰
35 ± 0.2^{bc}	۱۲۰	
39 ± 0.4^e	۱۸۰	
36 ± 0.3^f	۶۰	۶۰
48 ± 0.4^c	۱۲۰	
51 ± 0.5^b	۱۸۰	
42 ± 0.3^d	۶۰	۸۰
49 ± 0.3^c	۱۲۰	
53 ± 0.2^a	۱۸۰	

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

ارزیابی خلوص پلی ساکارید استخراج شده
نتایج نشان داد که در طول موج ۲۸۰ نانومتر
(نشانه گر جذب پروتئین) و همچنین ۲۶۰ نانومتر
(نشانه گر جذب اسیدهای نوکلئیک) هیچ جذبی
در نمونه پلی ساکارید مشاهده نشد که نشان
دهنده عدم حضور پروتئین ها و اسیدهای
نوکلئیک در طیف پلی ساکارید استخراجی است.

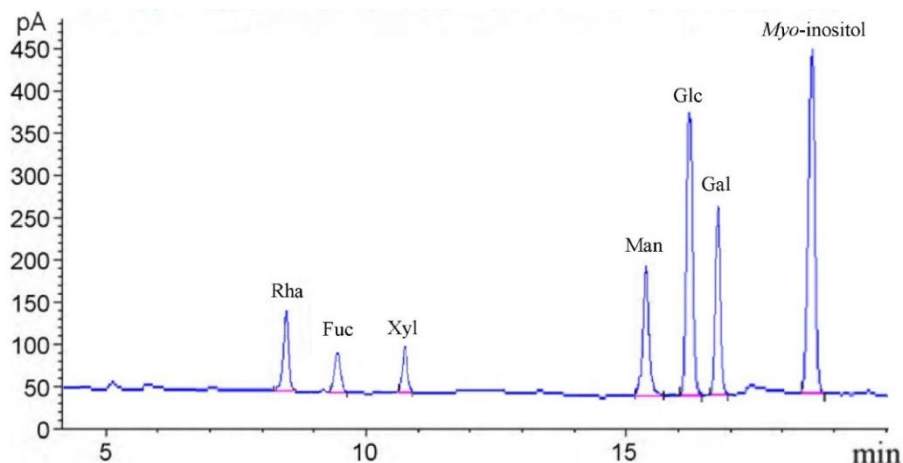
تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید
خالص
منحنی کروماتوگرام پلی ساکارید به دست
آمده از ریز جلبک *Cyanothece* sp. (شکل ۴)
بیانگر همگنی پلی ساکارید استخراج شده است.
میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ۱۰۳
کیلودالتون محاسبه شد.



شکل ۴: کروماتوگرام پلی ساکارید خالص به دست آمده از ریزجلبک *Cyanotheca* sp. با استفاده از HPGPC روی ستون TSK-GEL G 3000 PWXL

تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی
مقدار قند کل پلی ساکارید خالص پس از اندازه گیری با روش فنل- اسید سولفوریک، ۹۷ درصد تعیین شد. ۳ درصد ناخالصی می تواند مربوط به وجود لایه آب تک لایه در نمونه باشد که قابل ملاحظه نبوده و میزان خلوص ۹۷ درصد قابل ملاحظه و مناسب برای سنجش است. نتایج به دست آمده از طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج

اندازه گیری نشان داد که پلی ساکارید به دست آمده از ریزجلبک *Cyanotheca* sp. واحدهای مونومری رامنوز، فوکوز، گزایلوز، مانوز، گلوکز، گالاکتوز، اسید گلوکورونیک و اسید گالاکتورونیک به ترتیب با نسبت های مولی ۱/۷، ۰/۸، ۱/۰، ۳/۲، ۶/۱، ۴/۵، ۵ و ۶ درصد تشکیل شده است. نسبت های مولی به دست آمده نشان می دهد که گلوکز و پس از آن اسید گالاکتورونیک واحدهای مونومری اصلی سازنده پلی ساکارید خالص بودند.



شکل ۵: طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید ریزجلبک *Cyanothece sp.*

فعالیت ضدباکتریایی پلی ساکارید استخراج شده
 معنی داری بر روی هر دو گونه باکتری *E. coli* و *S. aureus* بود. هاله عدم رشد برای باکتری *E. coli* به میزان ۱۳/۲ میلی متر و برای *S. aureus* به میزان ۱۲/۵ میلی متر مشاهده شد.
 نتایج به دست آمده از بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره پلی ساکارید ریزجلبک *Cyanothece sp.* که در جدول ۲ آمده است، نشان داد که این پلی ساکارید دارای اثرات مهاری

جدول ۲: فعالیت ضدباکتریایی عصاره پلی ساکارید ریزجلبک *Cyanothece sp.* (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

غلظت عصاره پلی ساکارید (میلی گرم در میلی لیتر)	شاهد			باکتری
	۱۰۰	۱۰	۱	(آمپلی سیلین)
۱۲/۵ $\pm$ ۰/۹*	۸/۲ $\pm$ ۰/۹	۸/۱ $\pm$ ۰/۵	۱۳/۰ $\pm$ ۱/۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱۳/۲ $\pm$ ۱/۰*	۹/۳ $\pm$ ۰/۱	۸/۹ $\pm$ ۰/۴	۱۳/۵ $\pm$ ۰/۱	<i>Escherichia coli</i>

در هر ردیف، علامت «*» نشان دهنده اختلاف معنی دار با بقیه تیمارها است ($P < 0.05$).

بحث

تاثیر معنی‌داری بر بازده استخراج نشان داد. بنابراین بهینه‌سازی همزمان دما و زمان استخراج می‌تواند منجر به بهبود قابل توجه بازده و کیفیت پلی‌ساکاریدهای قابل استخراج شود. در مطالعه حاضر، مدت زمان مطلوب استخراج برای ریز جلبک *Cyanothece* sp. حدود ۱۸۰ دقیقه تشخیص داده شد. یکی از چالش‌های مهم استخراج، وجود ترکیبات مختلف در زیست‌توده جلبکی است که جداسازی پلی‌ساکاریدها را پیچیده کرده است. زیست‌توده حاوی لیپیدها، پروتئین‌ها و دیگر مولکول‌های آبریز است که باید به طور موثر از پلی‌ساکاریدها تفکیک شوند. بنابراین، تشخیص دقیق مدت زمان استخراج اهمیت زیادی دارد. بر اساس مطالعات مختلف، وزن مولکولی پلی‌ساکاریدها بر خواص عملکردی، زیست‌فعالی و کاربردهای بالقوه آنها در زمینه‌های مختلف از جمله مواد غذایی، داروسازی و بیوتکنولوژی تاثیرگذار است. منحنی کروماتوگرام پلی‌ساکارید (شکل ۴) نشان داد که پلی‌ساکارید استخراج شده همگن بوده و میانگین وزن مولکولی آن در حدود ۱۰۳ کیلودالتون بود. بر اساس مطالعاتی که تاکنون انجام شده است، پلی‌ساکاریدهای جلبک‌ها می‌توانند وزن مولکولی متغیر بین چند هزار تا ده‌ها هزار دالتون داشته باشند

استخراج پلی‌ساکاریدها از ریز جلبک‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار دارد. دو عامل مهم در این فرایند، دمای استخراج و مدت زمان استخراج است. بر اساس نتایج به دست آمده از مرحله اول این مطالعه، افزایش دما تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد و افزایش مدت زمان استخراج تا ۱۸۰ دقیقه سبب بالا بردن بازده استخراج پلی‌ساکارید در ریز جلبک *Cyanothece* sp. شد. افزایش دما تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد احتمالاً سبب تسریع شکستن دیواره سلولی ریز جلبک و افزایش حلالیت پلی‌ساکاریدها آن شده است. در مطالعه حاضر، افزایش بازده استخراج از دمای ۶۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد نشان دهنده آن است که دماهای متوسط موثرتر از دماهای پایین‌تر بوده و کارایی بیشتری داشت. به این دلیل که در دمای پایین ممکن است پلی‌ساکاریدها به طور کامل حل نشوند. بر اساس یافته‌های مطالعات مختلف، گونه‌های مختلف ریز جلبک و نوع پلی‌ساکاریدهای تشکیل دهنده آنها می‌تواند بر دمای استخراج بهینه اثرگذار باشد (Costa et al., 2021). بنابراین انتخاب دمای متناسب برای استخراج پلی‌ساکارید در هر ریز جلبک به طور اختصاصی ضرورت و اهمیت ویژه دارد. علاوه بر دما، مدت زمان استخراج نیز

- گالاکتورونیک واحدهای مونومری اصلی سازنده پلی ساکارید استخراجی بودند. بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی سویه‌های مختلف ریز جلبک، پروفایل مونوساکاریدهای به طور قابل توجهی در بین گروه‌های مختلف ریز جلبک متفاوت است. برای مثال، در ریز جلبک *Arthrospira platensis* مونوساکارید گلوکز بالاترین سهم را داشت، در دیاتومه *Isochrysis galbana* و جلبک سبز *Nannochloropsis oculata* نیز گلوکز به عنوان مونوساکارید اصلی شناخته شده است (Ben et al., 2017).
- طبقه‌بندی مونوساکاریدهای غالب در شاخه‌های اصلی ریز جلبک‌ها نشان داده است که در شاخه Rhodophyta زایلوز به عنوان مونوساکارید غالب شناسایی شده است. در شاخه Charophyta فوکوز و اسیدهای اورونیک بالاتری در مقایسه با شاخه Chlorophyta گزارش شده است. محتوای فوکوز در شاخه Ochrophyta بالاتر تشخیص داده شد و در شاخه Haptophyta سطوح بالاتر آرابینوز مشاهده شده است. بر این اساس احتمالاً تغییرات در ترکیبات مونوساکارید در میان سویه‌های مختلف تحت تاثیر عواملی مانند تاکسونومی، شرایط محیطی، و فرایندهای متابولیکی است که منجر به تنوع در
- (Miranda-Arizmendi et al., 2022)، مشابه آنچه که در منابع زیستی دیگر گزارش شده است. برای مثال، وزن مولکولی پلی ساکاریدهای ماکرو جلبک‌ها، مانند آلزینات‌ها، کاراگینان‌ها و آگار، معمولاً بالاتر از ۱۰۰ کیلودالتون گزارش شده است. این در حالی است که وزن مولکولی پلی ساکارید ریز جلبک *Chaetoceros muelleri* در حدود ۴/۱۳ کیلودالتون تشخیص داده شد (Moreira et al., 2022). وزن مولکولی پلی ساکارید *Synechococcus* sp. در حدود ۱۹۰/۹۴ کیلودالتون و *Navicula* sp. به میزان ۱۶۵۰ کیلودالتون گزارش شد (Miranda-Arizmendi et al., 2022).
- در این مطالعه ترکیبات مونوساکاریدهای تشکیل دهنده پلی ساکاریدها ریز جلبک *Cyanothece* sp. بررسی شد. نتایج سنجش دستگاهی نشان داد که پلی ساکارید استحصال شده از ریز جلبک *Cyanothece* sp. از واحدهای مونومری رامنوز، فوکوز، گزایلوز، مانوز، گلوکز، گالاکتوز، اسید گلوکورونیک و اسید گالاکتورونیک به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱/۷، ۰/۸، ۱/۰، ۳/۲، ۶/۱، ۴/۵، ۵ و ۶ درصد تشکیل شده است. نسبت‌های مولی به دست آمده نشان می‌دهد که گلوکز و پس از آن اسید

مونوساکاریدهای گونه‌های مختلف ریزجلبک و ریزجلبک شده است (Moreira et al., 2022). نتایج این مطالعه نشان داده است که پلی ساکاریدهای استخراج شده از ریزجلبک *Cyanothece* sp. به طور معنی‌داری قادر به مهار رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* بودند ($P < 0.05$). با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به داروهای موجود، جستجو برای مواد طبیعی با فعالیت ضدباکتریایی بالا یکی از راهکارهای موثر برای مقابله با این مشکل پیشنهاد شده است. مطالعات دیگر روی پلی ساکاریدهای مشتق شده از جلبک‌ها نشان داده است که این ترکیبات ظرفیت مناسبی برای مهار باکتری‌های بیماری‌زا دارند. برای مثال، Ben و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند که عصاره آبی حاوی پلی ساکارید دو ریزجلبک *Isochrysis galbana* و *Nannochloropsis oculata* توان مناسبی برای مهار باکتری‌های گرم منفی و مثبت دارد. بر اساس مطالعات صورت گرفته تاکنون، گونه‌های مختلف ریزجلبک‌ها پتانسیل ضدباکتریایی متفاوتی از خود نشان داده‌اند. نتایج برخی مطالعات مشخص کرده است که ساختار و ترکیب پلی ساکاریدها ممکن است نقش مهمی در فعالیت ضدباکتری داشته باشد.

مکانیسم ضدباکتریایی پلی ساکاریدها تا حدود زیادی نامشخص است، اما ممکن است مربوط به برهم‌کنش این ترکیبات با دیواره سلولی باکتری و غشای سیتوپلاسمی باشد که منجر به افزایش نفوذپذیری غشا، نشت پروتئین و اتصال با DNA باکتری می‌شود. ویژگی‌های ساختاری پلی ساکاریدها، مانند الگوهای انشعاب و انواع پیوند، می‌تواند بر نحوه واکنش این ترکیبات با سلول‌های باکتریایی تاثیر بگذارد. برخی از پلی ساکاریدها ممکن است ساختاری داشته باشند که به آنها اجازه دهد به طور موثر به سطوح باکتریایی متصل شوند یا فرایندهای سلولی آنها را مختل کنند، در حالی که برخی دیگر ممکن است کارایی یکسانی نداشته باشند (Prybylski et al., 2020). از طرفی گونه‌های مختلف با شرایط محیطی مختلفی سازگار شده‌اند که می‌تواند بر مسیرهای متابولیکی و انواع ترکیبات زیست‌فعال که تولید می‌کنند تاثیر بگذارد. برای مثال، گونه‌هایی که در محیط‌های پراسترس رشد می‌کنند، ممکن است عوامل ضدباکتری قوی‌تری را به عنوان مکانیزم دفاعی در برابر تهدیدات میکروبی تولید کنند (Madsen et al., 2023).

در مجموع، بر اساس یافته‌های این پژوهش، بالاترین بازده استخراج پلی ساکارید کل از

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران از پروژه شماره ۴۰۰۰۷۲۸ صورت گرفته است.

ریز جلبک *Cyanothece* sp. در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۸۰ دقیقه قابل دستیابی است. همچنین پلی ساکارید استحصال شده حاوی مونوساکاریدهای زیست فعال بوده و خواص ضدباکتریایی از خود نشان داده است که می تواند به عنوان یک ترکیب ضدباکتری، جایگزین ترکیبات شیمیایی رایج باشد.

منابع

- Aminikhoei Z., Erfanifar E., Azhdari A. and Abir S. 2022.** Investigation the effects of different salinities on valuable pigments of halophyte microalgae *Cyanothece* sp. isolated from back barrier Lipar (Chabahar) in laboratory conditions. Iranian Scientific Fisheries Journal, 30(5): 121–133. doi: 10.22092/isfj
- Bandyopadhyay A., Elvitigala T., Welsh E., Stockel J., Liberton M., Min H., Sherman L.A. and Pakrasi H.B. 2011.** Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria. MBio, 2(5): 1–10 (e00214-11). doi: 10.1128/mbio.00214-11
- Ben H.M., Ben I.M., Garrab M., Aly R., Gagnon J. and Naghmouchi K. 2017.** Antimicrobial, anti-oxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. Journal of the Serbian Chemical Society, 82(5): 509–522. doi: 10.2298/JSC161016036B
- Chen Jin J., Tang J., Wang Z., Wang Z., Wang J.L. and Lu J. 2011.** Extraction purification characterization and hypoglycemic activity of polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicas*. Carbohydrate Polymer, 83(2): 749–754. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.08.050
- Costa J.A.V., Lucas B.F., Alvarenga A.G.P., Moreira J.B. and de Moraes M.G. 2021.** Microalgae polysaccharides: An overview of production, characterization, and potential applications. Polysaccharides, 2(4): 759–772. doi: 10.3390/polysaccharides2040046
- De Philippis R., Margheri M.C., Pelosi E. and Ventura S. 1993.** Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. Journal of Applied Phycology, 5: 387–394.
- Jahanbin K., Abbasian A. and Ahang M. 2017.** Isolation, purification and structural characterization of a new water-soluble polysaccharide from *Eremurus stenophyllus* (Boiss. & Buhse) Baker roots. Carbohydrate Polymers, 178: 386–393. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.09.058
- Komarek J. and Cepak V. 1998.** Cytomorphological characters supporting the taxonomic validity of *Cyanothece* (Cyanoprokaryota). Plant Systematics and Evolution, 210: 25–39. doi: 10.1007/BF00984725
- Laroche C. 2022.** Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: Diversity of strains,

- production strategies, and applications. *Marine Drugs*, 20(5): 1–43 (336). doi: 10.3390/md20050336
- Lieberman G.N., Ochbaum G., Arad S.M. and Bitton R. 2016.** The sulfated polysaccharide from a marine red microalga as a platform for the incorporation of zinc ions. *Carbohydrate Polymers*, 152: 658–664. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.025
- Madsen M.A., Semerdzhiev S., Twigg J.D., Moss C., Bavington C.D. and Amtmann A. 2023.** Environmental modulation of exopolysaccharide production in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(19): 6121–6134. doi: 10.1007/s00253-023-12697-9
- Miranda-Arizmendi V., Fimbres-Olivarria D., Miranda-Baeza A., Martinez-Robinson K., Rascon-Chu A., De Anda-Flores Y., Lizardi-Mendoza J., Mendez-Encinas M.A., Brown-Bojorquez F. and Canett-Romero R. 2022.** Sulfated polysaccharides from *Chaetoceros muelleri*: macromolecular characteristics and bioactive properties. *Biology*, 11(10): 1–13 (1476). doi: 10.3390/biology11101476
- Moreira J.B., Da Silva Vaz B., Cardias B.B., Cruz C.G., De Almeida A.C.A., Costa J.A.V. and De Morais M.G. 2022.** Microalgae polysaccharides: An alternative source for food production and sustainable agriculture. *Polysaccharides*, 3(2): 441–457. doi: 10.3390/polysaccharides3020027
- Ohki K., Le N.Q.T., Yoshikawa S., Kanasaki Y., Okajima M., Kaneko T. and Thi T.H. 2014.** Exopolysaccharide production by a unicellular freshwater cyanobacterium *Cyanothece* sp. isolated from a rice field in Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 26: 265–272. doi: 10.1007/s10811-013-0094-4
- Oren A. 2015.** Cyanobacteria in hyper saline environments: Biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24: 781–798. doi: 10.1007/s10531-015-0882-z
- Prybylski N., Toucheteau C., El Alaoui H., Bridiau N., Maugard T., Abdelkafi S., Fendri I., Delattre C., Dubessay P. and Pierre G. 2020.** Bioactive polysaccharides from microalgae. P: 533–571. In: Jacob-Lopes E., Maroneze M.M., Queiroz M.I. and Zepka L.Q. (Eds.). *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Academic Press, USA. doi: 10.1016/B978-0-12-818536-0.00020-8
- Rosen B.H. and Mares J. 2016.** Catalog of microscopic organisms of the Everglades, Part 1- The cyanobacteria. Open-File Report-

1114. U.S. Geological Survey, USA. 108P. doi: 10.3133/ofr20161114
- Su C., Chi Z. and Lu W. 2007.** Optimization of medium and cultivation conditions for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 25: 411–417. doi: 10.1007/s00343-007-0411-3
- Sukhikh S., Prosekov A., Ivanova S., Maslennikov P., Andreeva A., Budenkova E., Kashirskikh E., Tcibulnikova A., Zemliakova E. and Samusev I. 2022.** Identification of metabolites with antibacterial activities by analyzing the FTIR spectra of microalgae. Life, 12(9): 1–18 (1359). doi: 10.3390/life12091395
- Xu H., Yao L., Sun H. and Wu Y. 2009.** Chemical composition and antitumor activity of different polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*. Carbohydrate Polymers, 78: 316–322. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.04.007



Research Paper

Extraction, purification and structural identification of the halophilic microalgae *Cyanothece* sp. and evaluation of its antibacterial activity

Zahra Amini Khoei^{1*}, Ashkan Ajdari², Elmira Erfanifar³, Sajad Pourmozafar⁴

DOI: 10.22124/japb.2024.28244.1551

Received: September 2024

Accepted: October 2024

Abstract

This study aimed to extract, characterize and evaluate the antibacterial activity of the polysaccharide derived from the halophilic microalga *Cyanothece* sp. The strain was cultivated under laboratory conditions, and the resulting biomass was harvested. The polysaccharide extraction process was optimized by investigating the effects of extraction temperature (40, 60 and 80°C) and time (60, 120 and 180 minutes). Following initial extraction, the crude polysaccharide was purified using chromatographic techniques, specifically gel filtration chromatography. Physicochemical characteristics, including homogeneity, molecular weight and monosaccharide composition, were determined. Antibacterial efficacy was assessed *in vitro* using the disk diffusion method. The results indicated that the optimal extraction yield was achieved at 80°C over a duration of 180 minutes. The purified polysaccharide exhibited a molecular weight of 103kD. The monosaccharide profiling revealed a complex structure comprising rhamnose, fucose, xylose, mannose, glucose, galactose, glucuronic acid and galacturonic acid, present in the following molar ratios: 1.7, 0.8, 1.0, 3.2, 6.1, 4.5, 5.0 and 6.0%, respectively. Also, the extracted polysaccharide significantly inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria ($P < 0.05$). Based on these findings, the polysaccharide derived from *Cyanothece* sp. possesses promising antimicrobial properties and warrants further investigation as a potential candidate for pharmaceutical and nutraceutical applications.

Key words: *Microalga*, *Cyanothece* sp., *Halophilic*, *Polysaccharide*, *Antibacterial Activity*.

1- Assistant Professor in Department of Biotechnology, Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.

2- Ph.D. in Aquatic Health, Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.

3- M.Sc. in Department of Ecology, Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.

4- Assistant Professor in Department of Aquaculture, Persian Gulf Mollusks Research Station, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Lengeh, Iran.

*Corresponding Author: zamini.41@gmail.com