



## فعالیت زیستی عصاره جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا و زیست توده تیمار شده آن‌ها قبل و بعد از پروتئولیز

طیبه هادی توران پشته<sup>۱</sup>، \*فخری سادات حسینی<sup>۲</sup>، فاطمه صفاخواه<sup>۱</sup>

### چکیده

**مقدمه:** میکروجلبک‌ها ارگانسیم‌هایی با متابولیت‌های متنوع و با ارزش هستند و دو میکروجلبک اسپیرولینا و کلرلا به دلیل دارا بودن مقادیر بالای پروتئین بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

**روش کار:** در این مطالعه پس از کشت میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا، از آن‌ها عصاره‌گیری شد و همچنین به وسیله سونیکاتور پروتئین آن‌ها استخراج شده و تحت هیدرولیز آنزیمی با دو آنزیم آلکالین پروتئاز و پپسین قرار گرفتند و با استفاده از DPPH خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت. همچنین خاصیت ضد تکثیری پروتئین‌های میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی با دو لاین سلولی سرطانی MCF-7 و Caco-2 و خاصیت ضد میکروبی با دو باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد سنجش قرار گرفت.

**نتیجه:** میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب ۲۱/۶۰ درصد و ۳۷/۶۵ درصد و این میزان برای سلول سرطانی Caco-2 به ترتیب ۲۳/۶۳ درصد و ۲۶/۴۸ درصد کاهش یافته است. همچنین نتایج نشان داد که هیدرولیز پروتئین در بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد تکثیری و ضد میکروبی تأثیر مثبت داشته است.

**واژه‌های کلیدی:** آلکالین پروتئاز، آنتی‌اکسیدانی، پپسین، ضد تکثیر سلولی، ضد سرطان، ضد میکروبی

۱- کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء

۲- استادیار گروه زیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء \* نویسنده مسئول: (F.hosseini@alzahra.ac.ir)

## مقدمه

ارگانسیم‌های دریایی منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی بوده و همچنین ساختارهای مولکولی متنوع و فعالیت‌های زیستی مختلفی را دارا هستند. ایمنی نسبی آن‌ها از دلایل اصلی استفاده در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی است. جلبک‌های دریایی یکی از مهم‌ترین منابع در این زمینه هستند (Lopes *et al.*, 2016). به طور کلی، جلبک‌های دریایی ارگانسیم‌هایی هستند که در دریا یا آب‌های شور زندگی می‌کنند و به دلیل وجود کلروفیل قادر به فتوسنتز هستند. جلبک‌های دریایی برای حفظ فشار اسمزی خود از مکانیسم‌های تنظیم اسمزی (osmoregulation) استفاده می‌کنند تا از اثرات تورژانس ناشی از نوسانات شوری زیستگاه خود جلوگیری کنند. متابولیت‌های حاصل از جلبک‌های دریایی می‌توانند برای تولید داروهای جدید مفید باشد، زیرا چندین مولکول داخل سلولی را هدف قرار می‌دهد که مسیرهای علامت‌دهی را اصلاح می‌کند، از مسیرهای علامت‌دهی شده اصلی توسط عصاره‌ها و ترکیبات مشتق شده از جلبک‌های دریایی، می‌توان به  $\text{TNF-}\alpha$ ، MAPKs، mTOR، PI3K/AKT/GSK اشاره کرد (Juárez-Portilla *et al.*, 2019).

میکروجلبک‌ها یکی از اولین شکل‌های زندگی روی زمین هستند که دارای تنوع گسترده‌ای است (Sathasivam *et al.*, 2019). این جلبک‌ها دارای متابولیت‌های مهم دارویی با ارزش مانند کاروتنوئیدها، پلی فنول‌ها، اسیدهای چرب، فیکوبیلی پروتئین‌ها و ویتامین‌ها هستند که جزء استراتژی‌های دفاعی میکروجلبک‌ها در برابر عوامل تنش‌زا محسوب می‌شوند (Chu, 2012). دو میکروجلبک اسپیرولینا (*Arthrospira platensis (Spirulina)*) و کلرلا (*Chlorella vulgaris*) فرآورده‌های غذایی-دارویی هستند که معمولاً به شکل پودر، قرص یا کپسول مصرف می‌شوند (Ferdous & Yusof, 2021). اسپیرولینا دارای پروتئین بالایی است که حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد وزن خشک آن را تشکیل می‌دهد، همچنین تمام اسیدهای آمینه ضروری، مواد معدنی، ویتامین‌ها و پیگمان‌های فتوسنتزی را داراست (Lee *et al.*, 2017, Yüçetepe & Özçelik, 2016). علاوه بر این، مقدار قابل توجهی اسیدهای چرب و لینولنیک اسید دارد (Sathasivam *et al.*, 2019). این جلبک دارای اثرات کاهنده چربی خون، محافظت از کبد و اثرات آنتی‌اکسیدانی است و به عنوان یک ماده غذایی کاربردی و برای کنترل بیماری‌های مزمن مانند دیابت، آرتروز، کم خونی و سرطان کاربرد دارد (Gargouri *et al.*, 2016). ریزجلبک کلرلا سرشار از کلروفیل، پروتئین، پلی ساکارید، ویتامین، مواد معدنی و اسیدهای آمینه ضروری است و به دلیل محتوای پروتئینی آن که معمولاً تا ۶۰ درصد است بسیار جالب توجه است (Enyidi, 2017). آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند لوتئین، آلفا کاروتن، بتا کاروتن، اسید اسکوربیک و آلفا توکوفرول که در برابر رادیکال‌های آزاد فعال هستند، در کلرلا شناسایی شدند. همه ارگانسیم‌های هوازی گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species (ROS)) را به عنوان نتیجه اکسیداسیون و تنفس هوازی تولید می‌کنند (Juárez-Portilla *et al.*, 2019)، که تجمع آن برای طولانی مدت می‌تواند به تنش اکسیداتیو مزمن منجر شود. ROS می‌تواند به طور مستقیم به

لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب برساند و همچنین در مسیرهای علامت دهی درون سلولی اختلال ایجاد کرده و باعث ایجاد تغییر در بیان پروتئین می‌شود (Lopes *et al.*, 2016). مهم‌ترین ترکیب زیست فعال در کلرلا  $\beta$ -۱ و ۳ گلوکان، یک محرک ایمنی فعال است که رادیکال‌های آزاد و کلسترول خون را کاهش می‌دهد (de Moraes *et al.*, 2015).

هیدرولیز پروتئین‌های ریز جلبک می‌تواند چندین ویژگی جالب دیگر را افزایش دهد، زیرا منجر به آزاد شدن پپتیدهای فعال زیستی با چندین فعالیت زیستی، ممکن می‌شود (Cunha & Pintado, 2022). پپتیدهای فعال زیستی معمولاً شامل تقریباً ۳-۴۰ باقی مانده اسید آمینه در هر مولکول هستند، ترکیب اسید آمینه و توالی آن‌ها عوامل مهمی برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن‌ها است (Ngo *et al.*, 2012). اخیراً پپتیدهای فعال زیستی به دست آمده از اسپیرولینا پلاتنسیس به دلیل اثر ضد فشار خون، آنتی اکسیدان، ضد تومور، ضد تکثیر و ضد میکروبی این پپتیدها مورد توجه قرار گرفته است (Yüce-tepe & Özçelik, 2016). چندین پپتید فعال زیستی از کلرلا تولید شده است که خواص جالبی مانند آنتی اکسیدان، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد سرطان و ضد میکروبی را نشان می‌دهد (Cunha & Pintado, 2022). در بین انواع روش‌های هیدرولیز، هیدرولیز آنزیمی روش ارجح است زیرا شرایط فرآیند ملایم‌تری را ارائه کرده و محصولات با ارزش بالاتری تولید می‌کند (Tejano *et al.*, 2019). روش‌های مورد استفاده عبارتند از: پروتئولیز در موجود زنده با آنزیم‌های گوارشی، پروتئولیز در شرایط آزمایشگاهی با آنزیم‌های تجاری مشتق شده از گیاهان، حیوانات یا منابع میکروبی و پروتئولیز با تخمیر میکروبی. به منظور به حداکثر رساندن بازده (درجه هیدرولیز)، فعالیت آنزیم پروتئولیتیک و زیست فعالی هدف، انتخاب آنزیم پروتئولیتیک مناسب و جستجوی شرایط فیزیوشیمیایی بهینه مهم است. (Ovando *et al.*, 2018).

در مطالعه پیش رو جلبک کلرلا و اسپیرولینا تحت تیمار آنزیمی قرار گرفته و فرآورده‌های هیدرولیز حاصل از نظر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی، مهار تکثیر سلولی و ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت و در ادامه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره جلبک‌ها بدون هر گونه تیماری مقایسه شد.

## مواد و روش

### کشت ریز جلبک‌ها

کشت ذخیره ریز جلبک اسپیرولینا با شماره abdf2224 و کشت ذخیره ریز جلبک کلرلا با شماره Abdf21144 از شرکت گیل فوگا واقع در مرکز رشد واحدهای فناور دانشگاه آزاد استان گیلان خریداری شد. به منظور کشت ریز جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب از محیط کشت Zarrouk (Rajasekaran *et al.*, 2015) و محیط کشت Sorokin & Sorokin and Krauss (Sorokin & Sorokin and Krauss, 1958) استفاده شد. به منظور افزایش توده زیستی، جلبک اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب با تراکم سلولی متوسط در هر

میلی لیتر  $2/4 \times 10^5$  سلول و  $3 \times 10^5$  سلول به محیط کشت اصلی هر یک تلقیح شد. کشت اسپیرولینا در محدوده دمایی  $25 \pm 1$  درجه سانتی گراد و pH برابر با  $9 \pm 1$  و کشت کلرلا در دمای  $20 \pm 1$  درجه سانتی گراد و در pH برابر  $6 \pm 1$  صورت گرفت. نوردهی به میزان ۲۰۰۰ لوکس به مدت ۲۴ ساعت، و هوادهی به طور مداوم انجام شد.

به منظور بررسی میزان رشد ریز جلبک اسپیرولینا و کلرلا هر ۳ روز یکبار از ارلن‌ها تحت شرایط سترون نمونه برداری شده و شمارش سلولی با لام نئوبار انجام شد. تعداد سلول‌های اسپیرولینا (فرمول ۱) و کلرلا (فرمول ۲) در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول‌های ارائه شده در زیر محاسبه شد (Bagheri & Masoumizadeh, 2015, Choonawala, 2007).

$$K = \ln N_1 - \ln N_0/t \quad \text{فرمول ۱}$$

تعداد سلول در هر میلی لیتر = تعداد کل سلول‌های شمارش شده / تعداد بلوک‌های شمارش شده فرمول ۲

بعد از ورود به سیر نزولی کشت، زیست توده میکرو جلبک اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب با استفاده از مش ۲۵ میکرون و سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شده، سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خشک شدند (Safi et al., 2014). بخشی از زیست توده خشک جهت انجام آزمایشات بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بخش دیگر برای تهیه عصاره آبی استفاده شد. بدین منظور، ۵ گرم پودر خشک ریز جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بعد نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شده و عصاره جلبکی لیوفیلیزه شدند (Thiagarajan et al., 2019).

## هیدرولیز آنزیمی

زیست توده خشک جلبک اسپیرولینا و کلرلا به نسبت ۱ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده و با استفاده از سونیکاتور ۱۰۰ وات در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۲۰ دقیقه بر روی ظرف حاوی یخ شکست سلولی انجام شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ ۴۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سوپ رویی جمع آوری شده و با آنزیم آلکالین پروتئاز و پپسین تحت هیدرولیز قرار گرفت. بدین منظور پروتئین جلبک (۱۰٪ وزنی/حجمی) با آنزیم آلکالین پروتئاز و پپسین در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ به ۱۰ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH برابر ۱۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در pH برابر ۳ به ترتیب برای آلکالین پروتئاز و پپسین به مدت ۱۸۰ دقیقه هضم شد. در پایان واکنش، pH بر روی ۷ تنظیم شد تا آنزیم غیرفعال شود. سپس فرآورده‌های هیدرولیز حاصل جمع آوری شده و خشک شد (Sheih et al., 2009).

## بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

به منظور انجام این آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH ۰/۵ مولار به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه در غلظت‌های مختلف اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد از فرمول زیر استفاده شد (Safafar *et al.*, 2015):

$$\text{Percent inhibition (I \%)} = ((\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}) \times 100$$

Abs control میزان جذب محلول DPPH و متانول و Abs sample میزان جذب نمونه مورد آزمایش است.

## بررسی مهار تکثیر سلولی

رده سلولی سرطان روده بزرگ Caco-2 و رده سلول سرطان سینه MCF-7 انسانی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی ۲۵cm<sup>2</sup> و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد کشت داده شدند (Mirzaei *et al.*, 2020). به منظور بررسی تأثیر فرآورده‌های هیدرولیز حاصل از آنزیم بر تکثیر سلولی از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. برای انجام این آزمایش، تعداد ۴×۱۰<sup>۳</sup> سلول CaCO-2 در هر خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای با حجم ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شدند. به‌عنوان شاهد از ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS استفاده شد. به علت این که هدف بررسی هیدرولیز بدون وابستگی زمانی بوده است، بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی تیمار شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT در هر خانه افزوده شد. بعد از ۳/۵ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پس از حذف محلول رویی، ۱۵۰ میکرولیتر حلال MTT اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در ۵۱۲ نانومتر با دستگاه الیزا خوانش شد (Khazraei-Moradian *et al.*, 2014).

## بررسی فعالیت ضد میکروبی

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی از روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن) و چاهک آگار استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند) سویه‌های میکروبی استاندارد شامل باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشریشیا کلی تهیه شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه میکروبی استاندارد بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و با اسپریدر استریل پخش گردید. دیسک‌های کاغذی به مدت نیم ساعت درون غلظت‌های مختلف پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز خیسانده شد، و سپس درون هر پلیت با رعایت فاصله از یکدیگر، دیسک‌ها در سطح پتری‌دیش قرار گرفتند. در روش چاهک آگار، از چاهک‌های حفر شده درون پتری‌دیش استفاده

شد. سپس پتريدیش‌های کشت داده شده در هر دو روش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد، با خطکش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Zanganeh et al., 2019). از جنتامیسین با غلظت ۵ میکروگرم در لیتر بعنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

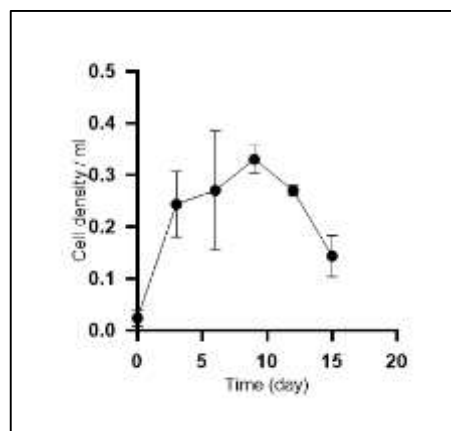
## آنالیزهای آماری

تمامی آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق با ۳ بار تکرار گرفته است و برای نمایش توزیع داده‌ها و همچنین جمع‌بندی آن‌ها از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار استفاده شد. نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۸ تجزیه و تحلیل شد و سطح معنی داری در  $P\text{-value} < 0.05$  ارزیابی شد.

## نتایج

### رشد میکروجلبک‌ها

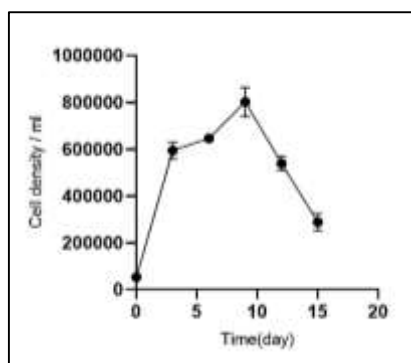
نتیجه حاصل از شمارش سلول و رسم منحنی رشد میکروجلبک اسپیرولینا در شکل ۱ آمده است. شکل ۱ نشان دهنده این است که در روزهای ۰-۱۰ رشد به صورت صعودی بوده و از روز ۱۱ تا ۱۵ رشد به صورت نزولی و با شیب ملایمی صورت گرفته است.



شکل ۱- نمودار رشد میکروجلبک اسپیرولینا بر اساس شمارش سلول. هر نقطه نشان دهنده مقدار میانگین سه تکرار است. میله‌ها انحرافات استاندارد را نشان می‌دهند.

**Figure 1. Growth curve of *S.platensis* based on cell count.** Each point represents the mean value of three replicates. Bars represent standard deviations.

نتیجه حاصل از شمارش سلول و رسم منحنی رشد میکروجلبک کلرلا در شکل ۲ آمده است. شکل ۲ نشان دهنده این است که در روزهای ۰-۱۰ رشد به صورت صعودی بوده و از روز ۱۱ تا ۱۵ رشد به صورت نزولی و با شیب بیشتری صورت گرفته است.

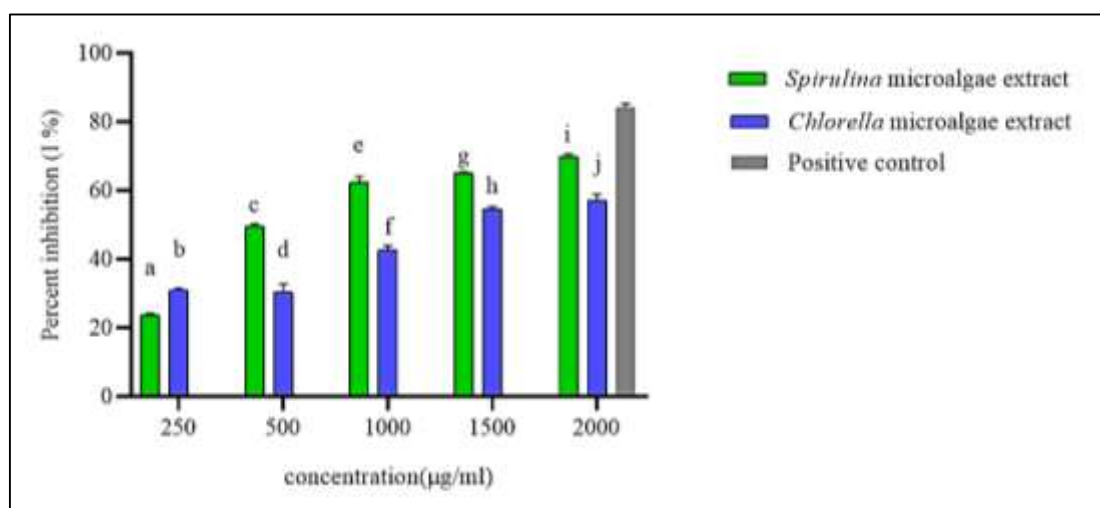


شکل ۲- نمودار رشد میکروجلبک کلرلا بر اساس شمارش سلول. هر نقطه نشان دهنده مقدار میانگین سه تکرار است. میله‌ها انحرافات استاندارد را نشان می‌دهند.

**Figure 2. Growth curve of *C.vulgaris* based on cell count.** Each point represents the mean value of three replicates. Bars represent standard deviations.

### فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین میکروجلبک‌ها قبل و بعد از هیدرولیز و عصاره آبی

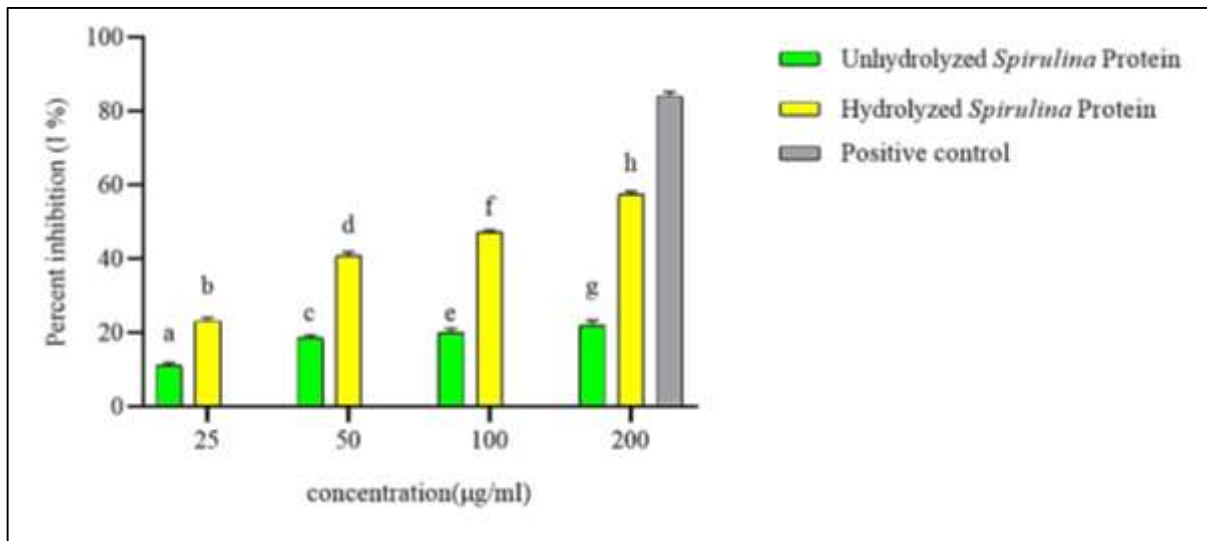
فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا بر اساس آزمون DPPH در غلظت‌های ۲۵۰-۵۰۰-۱۰۰۰-۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شکل ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده است و غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی میکروجلبک اسپیرولینا، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بوده است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هر غلظت مشخص عصاره آبی میکروجلبک اسپیرولینا خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره آبی میکروجلبک کلرلا در همان غلظت دارد.



شکل ۳- توانایی مهار رادیکال DPPH در عصاره‌های آبی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا. حروف انگلیسی تفاوت معنی‌دار یک غلظت مشخص در عصاره آبی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 3. Ability to inhibit DPPH radical in aqueous extracts of *S.platensis* and *C.vulgaris* microalgae.** The English letters show the significant difference of a certain concentration in the aqueous extract of *S.platensis* and *C.vulgaris* microalgae (P-value < 0.05). The results are reported as mean ± standard deviation.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز بر اساس آزمون DPPH در غلظت‌های ۲۵-۵۰ و ۱۰۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شکل ۴ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده است و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در هر عصاره دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هر غلظت مشخص پروتئین هیدرولیز شده میکروجلبک اسپیرولینا خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده در همان غلظت دارد.

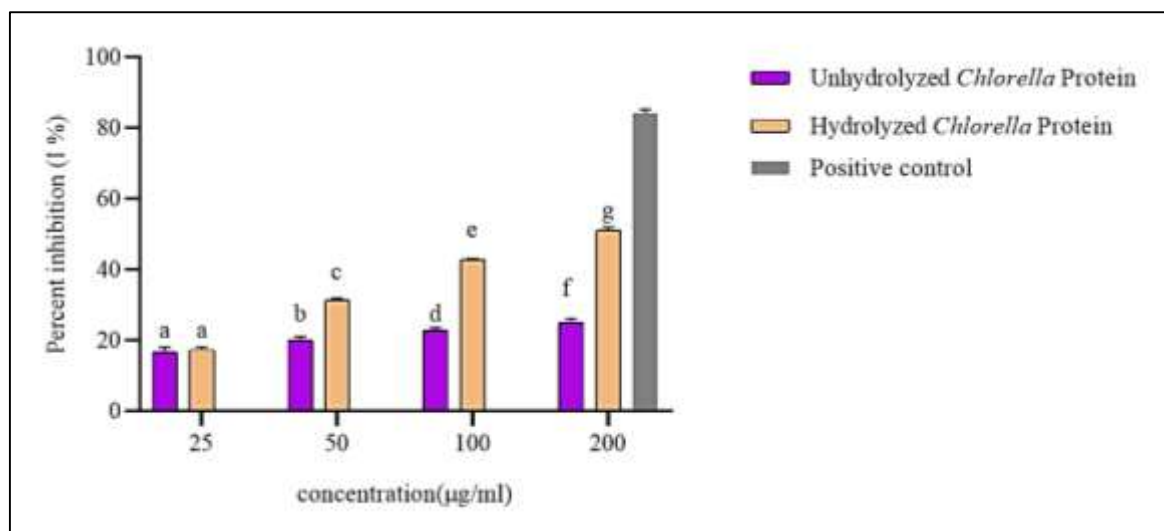


شکل ۴- توانایی مهار رادیکال DPPH در پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی. حروف انگلیسی تفاوت معنی‌دار یک غلظت مشخص در پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز را نشان می‌دهد ( $P\text{-value} < 0.05$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 4. Ability to inhibit DPPH radical in *S. platensis* microalgae protein before and after enzymatic hydrolysis.** The English letters indicate the significant difference of a certain concentration in the microalgae protein of *S. platensis* before and after hydrolysis ( $P\text{-value} < 0.05$ ). The results are reported as mean  $\pm$  standard deviation.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز بر اساس آزمون DPPH در غلظت‌های ۲۵-۵۰ و ۱۰۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شکل ۵ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده است و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در هر عصاره دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هر غلظت مشخص پروتئین هیدرولیز شده میکروجلبک کلرلا خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده در همان غلظت دارد.



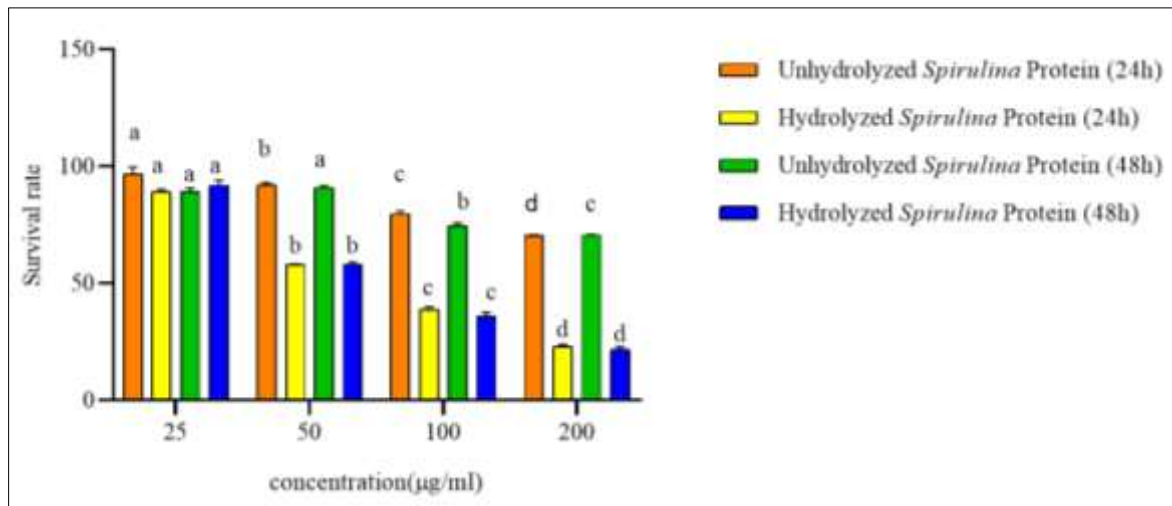


شکل ۵- توانایی مهار رادیکال DPPH در پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار یک غلظت مشخص در پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 5. Ability to inhibit DPPH radical in *C.vulgaris* microalgae protein before and after enzymatic hydrolysis.** The English letters indicate the significant difference of a certain concentration in the microalgae protein of *C.vulgaris* before and after hydrolysis (P-value < 0.05). The results are reported as mean  $\pm$  standard deviation.

### درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 بعد از گذشت تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۶ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک اسپیرولینا در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی دار بوده است، همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است.

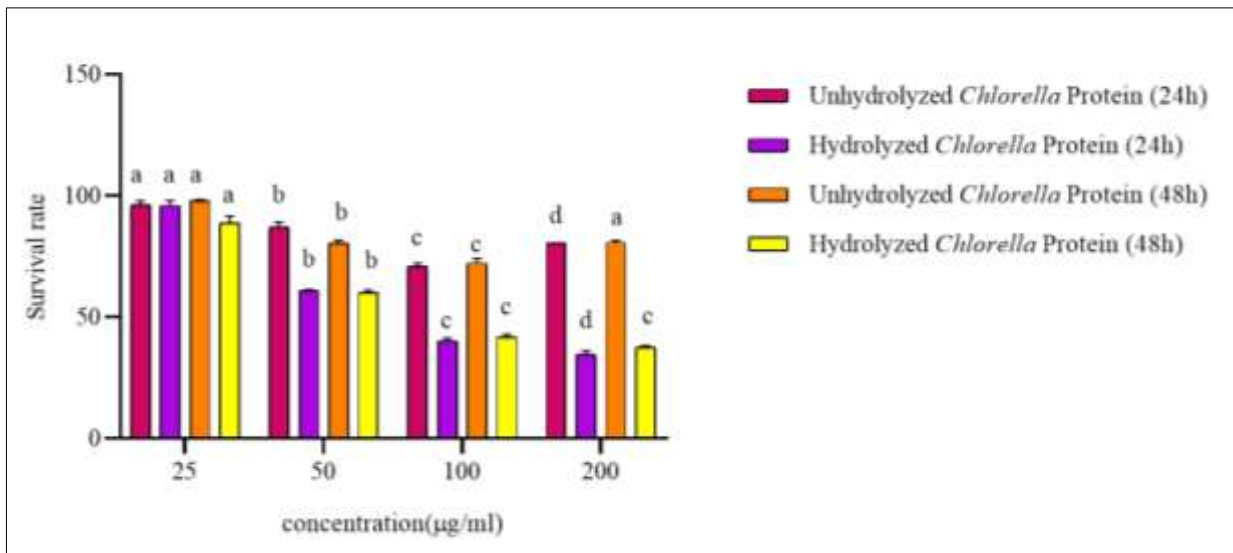


شکل ۶- درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 6. Survival percentage of MCF-7 cells treated with *S.platensis* and microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours.** English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract (P-value < 0.05). The results are reported as mean ± standard deviation.

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۷ نشان داده شده است.

این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک کلرلا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک کلرلا در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است، همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی دار بوده است.

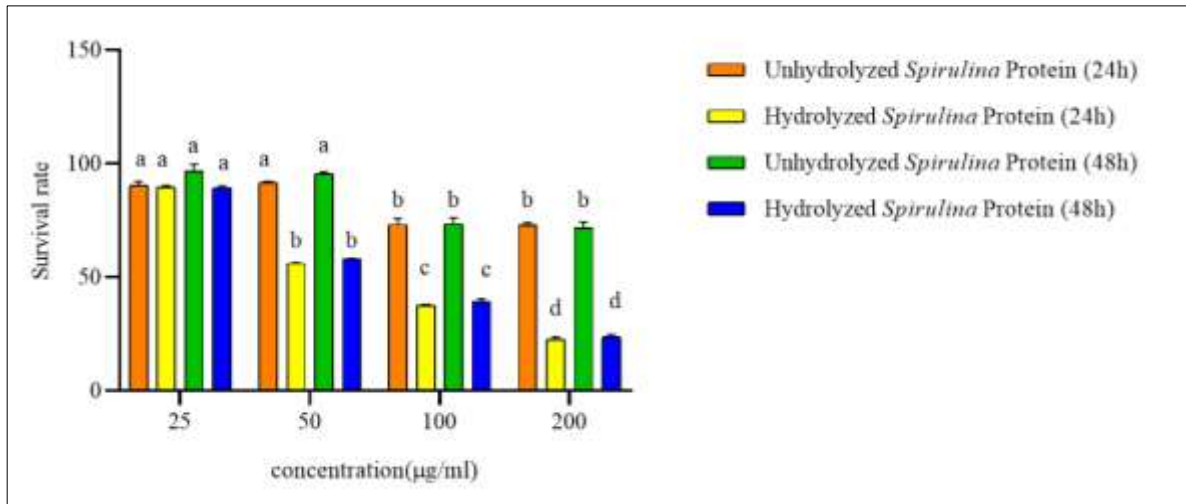


شکل ۷- درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 7. Survival percentage of MCF-7 cells treated with *C.vulgaris* microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours.** English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract (P-value < 0.05). The results are reported as mean  $\pm$  standard deviation.

### درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 بعد از گذشت تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی Caco-2 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۸ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک اسپیرولینا در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است، همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی دار بوده است.

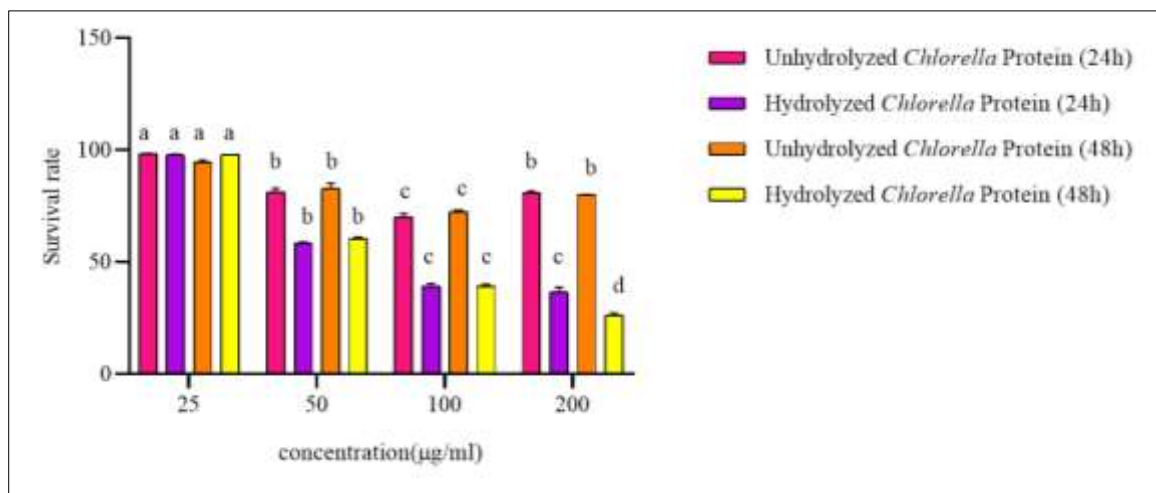


شکل ۸- درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تحت تیمار پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 8. Survival percentage of Caco-2 cells treated with *S.platensis* microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours.** English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract (P-value < 0.05). The results are reported as mean ± standard deviation.

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی Caco-2 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۹ نشان داده شده است.

این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک کلرلا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک کلرلا در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است. همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است.



شکل ۹- درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تحت تیمار پروتئین میکرو جلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

**Figure 9.** Survival percentage of Caco-2 cells treated with *C.vulgaris* microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours. English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract (P-value < 0.05). The results are reported as mean ± standard deviation.

### فعالیت ضد میکروبی پروتئین میکرو جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز

نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی پروتئین میکرو جلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز در جدول ۱ آورده شده است. قطر هاله عدم رشد مربوط به جنتامیسین برای باکتری اش‌ریشیا کلی ۲۶ و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۸ میلی متر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بیشتر است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است.

جدول ۱- مقادیر قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتری‌های مورد آزمایش در مقابل عصاره‌ی آبی پروتئولیز شده‌ی جلبک اسپیرولینا

**Table 1- The values of the diameter of the growth inhibition halo (mm) of the tested bacteria against the proteolyzed aqueous extract of *S.platensis***

Concentration (mg/ml)	0.125	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00
Unhydrolyzed protein ( <i>E.coli</i> )	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	6.50 ± 0.70
Hydrolyzed protein ( <i>E.coli</i> )	5.50 ± 0.70	4.75 ± 0.35	7.83 ± 0.76	11.33 ± 1.52	13.66 ± 1.52	13.33 ± 2.30
Unhydrolyzed protein ( <i>S.aureus</i> )	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	6.33 ± 0.57	6.66 ± 1.15
Hydrolyzed protein ( <i>S.aureus</i> )	6.33 ± 1.52	7.33 ± 1.52	11.66 ± 0.57	15.33 ± 1.15	16.33 ± 0.57	15.33 ± 0.57

نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی پروتئین میکرو جلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز در جدول ۲ آورده شده است. قطر هاله عدم رشد مربوط به جنتامیسین برای باکتری اش‌ریشیا کلی ۲۶ و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۸ میلی متر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بیشتر است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است.

جدول ۲- مقادیر قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتری‌های مورد آزمایش در مقابل عصاره‌ی آبی پروتئولیز شده‌ی جلبک کلرلا

**Table 2- The values of the diameter of the growth inhibition halo (mm) of the tested bacteria against the proteolyzed aqueous extract of *C.vulgaris***

Concentration (mg/ml)	0.125	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00
Unhydrolyzed protein (E.coli)	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo
Hydrolyzed protein (E.coli)	5.50 ± 0.70	5.83 ± 0.28	8.50 ± 0.50	11.66 ± 1.15	13.33 ± 0.57	12.33 ± 0.57
Unhydrolyzed protein (S.aureus)	Without halo	Without halo	5.66 ± 0.57	6.00 ± 0	7.33 ± 0.57	6.33 ± 0.57
Hydrolyzed protein (S.aureus)	5.66 ± 0.57	7.33 ± 1.52	10.33 ± 0.57	14.66 ± 1.15	16.66 ± 1.15	15.33 ± 0.57

## بحث

با توجه به شکل ۳ افزایش غلظت عصاره‌های آبی میکروجلبک‌ها، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. به صورتی که غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. تکیار و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های الکلی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (Tagvi Takyar *et al.*, 2017). نتایج به دست آمده از این پژوهش مؤید نتایج مطالعه فوق می‌باشد.

با توجه به شکل‌های ۴ و ۵ افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک‌ها، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. به صورتی که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده در هر دو میکروجلبک، بیشتر است و هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی شده است. Gad و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی حاوی پروتئین فیکوسیاینین اسپیرولینا پلاتنسیس را در شرایط آزمایشگاهی و اثرات محافظتی کبدی آن را در داخل بدن ارزیابی کردند. در این مطالعه نشان داده شد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره آبی این میکروجلبک وجود دارد و در جلوگیری از آسیب کبدی موفق بوده است (Gad *et al.*, 2011). به طور مشابه، Bermejo و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس را ثابت کرد (Bermejo *et al.*, 2008). همچنین یو و همکاران با هیدرولیز آنزیمی پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس، پپتیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده کردند (Yu *et al.*, 2016). Tejano و همکاران ایزوله‌های پروتئین کلرلا سوروکینینا با استفاده از پپسین، بروملین و ترمولیزین به صورت آنزیمی هیدرولیز کردند و ویژگی‌های مولکولی و زیست‌فعالی آن‌ها را تعیین کردند. آن‌ها مشاهده کردند که پپتیدهای حاصل دارای خاصیت مهار رادیکال DPPH هستند (Tejano *et al.*, 2019). Forutan و همکاران پروتئین استخراج شده از اسپیرولینا پلاتنسیس را توسط آنزیم آلکالاز هیدرولیز کردند و مشاهده کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی

پروتئین با افزایش درجه هیدرولیز و غلظت آن افزایش می‌یابد (Forutan et al., 2023). همچنین ایروانی و همکاران نشان دادند که هیدرولیز پروتئین ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به وسیله آنزیم‌های پپسین و کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم باعث تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌شود (Irvani Mohajeri et al., 1398). نتایج مطالعات مطرح شده با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر همسو است.

با توجه به نتایج به دست آمده از درصد زنده مانده سلول‌های سرطانی روده و سینه، مشخص شد که پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای فعالیت ضد سرطانی هستند. صدیقی و همکاران اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی پپتیدهای پروتئین کلرلا ولگاریس هیدرولیز شده با پپسین را بررسی کردند. اثر مهارتی پپتیدهای تولید شده بر روی سلول‌های اشیریشیا کلی و رده‌های سلولی سرطان پستان مورد سنجش قرار گرفت. پپتیدهای هیدرولیز شده باعث کاهش رشد اشیریشیا کلی شدند و پپتیدهای حاصل تأثیر قوی بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه داشتند (Sedighi et al., 2016). صادقی و همکاران اثرات ضد سرطانی و ضد باکتریایی پروتئین غالب اسپیرولینا پلاتنسیس پس از هیدرولیز توسط آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین بر روی سلول‌های آدنوکارسینوما کولون انسانی و اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند که پروتئین ۲۲ کیلو دالتون و پپتیدهای مشتق از آن رشد باکتری را کاهش می‌دهد و کسر پپتیدی کمتر از ۳ کیلو دالتون توانست زنده ماندن سلول SW480 را به طور قابل توجهی کاهش دهد (Sadeghi et al., 2018). نتایج مطالعات مطرح شده مؤید نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است.

با توجه به نتایج جداول ۱ و ۲، هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های هر دو میکروجلبک موجب خاصیت ضد میکروبی آن‌ها شده است. سان و همکاران یک پپتید ضد باکتری از اسپیرولینا پلاتنسیس با هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های آلکالین پروتئاز و پاپائین به دست آوردند. آن‌ها نشان دادند که حداقل غلظت بازدارنده پپتید ضد باکتری از اسپیرولینا پلاتنسیس ۸ میلی گرم در میلی لیتر برای اشیریشیا کلی و ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس بود و بیان کردند بر اساس تمام این ویژگی‌ها، پپتیدهای اسپیرولینا را می‌توان به عنوان عوامل ضد میکروبی امیدوارکننده بالقوه در نظر گرفت (Sun et al., 2016).

## نتیجه گیری کلی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۶۹/۸۲ درصد و ۵۷/۱۵ درصد بوده است. همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب ۵۷/۴۶ درصد و ۵۱/۰۳ درصد بوده است. میزان زنده مانده سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب ۲۱/۶۰ درصد و ۳۷/۶۵ درصد و این میزان برای سلول سرطانی Caco-2 به ترتیب ۲۳/۶۳ درصد و

۲۶/۴۸ درصد کاهش یافته است. همچنین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های اشريشيا کلي و استافيلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بیشتر است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است. به طور کلی هیدرولیز آنزیمی پروتئین موجب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد باکتریایی و ضد سرطانی می‌شود و دو میکروجلبک اسپیرولینا و کلرلا کاندیدهای خوبی در این زمینه هستند و می‌توانند به عنوان مکمل غذایی-دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه الزهراء انجام شده است.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

### Reference

- Bagheri, Shabnam, and Masoumizadeh, Sayeda Zahra. (2015). Investigating the growth of *Chlorella* sp microalgae in Conway and TMRL culture medium in different waters. *Wetland Ecobiology*, 8(30), 95-104. SID. <https://sid.ir/paper/505646/fa> . (In Persian)
- Bermejo, P., Piñero, E., & Villar, Á. M. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food chemistry*, 110(2), 436-445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.021>
- Chu, W. L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education (IeJSME)*, 6(1), S24-S37. DOI:10.56026/imu.6.Supp11.S24
- Choonawala, B. B. (2007). *Spirulina production in brine effluent from cooling towers* (Doctoral dissertation). <https://doi.org/10.51415/10321/134>
- Cunha, S. A., & Pintado, M. E. (2022). Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 348-370. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.017>
- de Moraes, M. G., Vaz, B. D. S., de Moraes, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Enyidi, U. D. (2017). *Chlorella vulgaris* as protein source in the diets of African catfish *Clarias gariepinus*. *Fishes*, 2(4), 17. <https://doi.org/10.3390/fishes2040017>
- Ferdous, U. T., & Yusof, Z. N. B. (2021). Medicinal prospects of antioxidants from algal sources in cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.593116>
- Forutan, M., Hasani, M., Hasani, S., & Salehi, N. (2023). Antioxidative Activity and Functional Properties of Enzymatic Protein Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 13(1), 75-89. DOI:10.30495/jfbt.2022.63017.10281
- Gargouri, M., Magné, C., & el Feki, A. (2016). Hyperglycemia, oxidative stress, liver damage and dysfunction in alloxan-induced diabetic rat are prevented by *Spirulina* supplementation. *Nutrition Research*, 36(11), 1255-1268. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.09.011>



- Gad, A. S., Khadrawy, Y. A., El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hassan, N. S., & Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition*, 27(5), 582-589. DOI: 10.1016/j.nut.2010.04.002
- Irvani Mohajeri, Rahela, Mirzaei, Mehta, and Hazari, Hamida. (2018). Investigating the effect of enzyme type and hydrolysis time of Bertolide antioxidant peptides from Spirulina platensis protein. *New technologies in the food industry*, 6(4), 581-597. SID. <https://sid.ir/paper/258688/fa>. (In Persian)
- Juárez-Portilla, C., Olivares-Bañuelos, T., Molina-Jiménez, T., Sánchez-Salcedo, J. A., Del Moral, D. I., Meza-Menchaca, T., ... & Zepeda, R. C. (2019). Seaweeds-derived compounds modulating effects on signal transduction pathways: A systematic review. *Phytomedicine*, 63, 153016. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153016>
- Khazraei-Moradian, S., Andalib, A., Ganjalikhani-Hakemi, M., Safari, Z., Zare, A., & Kardar, G. A. (2014). The effect of protein extract of licorice root in proliferation of HT-29 and CT26 cancer cell lines. *Journal of Isfahan Medical School*, 32(298), 1338-1346.
- Lee, J., Park, A., Kim, M. J., Lim, H. J., Rha, Y. A., & Kang, H. G. (2017). Spirulina extract enhanced a protective effect in type 1 diabetes by anti-apoptosis and anti-ROS production. *Nutrients*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nu9121363>
- Lopes, G., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2016). Phlorotannins: Towards new pharmacological interventions for diabetes mellitus type 2. *Molecules*, 22(1), 56. <https://doi.org/10.3390/molecules22010056>
- Mirzaei, N., Kolahi, M., & Mokhtari, B. (2020). A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of Citrullus Colocynthis Extracts on Colon Cancer Cells Caco-2. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 14(5), 1-11.[in Persian]
- Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Wijesekara, I., & Kim, S. K. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International journal of biological macromolecules*, 51(4), 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001>
- Ovando, C. A., Carvalho, J. C. D., Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2018). Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review. *Food reviews international*, 34(1), 34-51.
- Rajasekaran C., Ajeesh C., Balaji S., Shalini M., Siva R., Das R., Fulzele D and Kalaivani T. 2015. Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different Spirulina Strains, *Agriculture Technology and Biological Sciences*, 13(1): 67-75.
- Safafar, H., Van Wageningen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine drugs*, 13(12), 7339-7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd\_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 26, Issue 4, pp. 709–722). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 35, pp. 265–278). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Sadeghi, S., Jalili, H., Ranaei Siadat, S. O., & Sedighi, M. (2018). Anticancer and antibacterial properties in peptide fractions from hydrolyzed spirulina protein. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(4), 673-683.

Sun, Y., Chang, R., Li, Q., & Li, B. (2016). Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 242, 685-692. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2576-x>

Sedighi, M., Jalili, H., RANA EI, S. S. O., & Amrane, A. (2016). Potential health effects of enzymatic protein hydrolysates from *Chlorella vulgaris*.

Sorokin, Constantine, and Robert W. Krauss. "The Effects of Light Intensity on the Growth Rates of Green Algae." *Plant physiology* 33, no. 2 (1958): 109. doi: 10.1104/pp.33.2.109

Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*, 100(13), 3419-3425. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.014>

Thiagarajan, S. K., Rama Krishnan, K., Ei, T., Husna Shafie, N., Arapoc, D. J., & Bahari, H. (2019). Evaluation of the Effect of Aqueous *Momordica charantia* Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9152757>

Tejano, L. A., Peralta, J. P., Yap, E. E. S., & Chang, Y. W. (2019). Bioactivities of enzymatic protein hydrolysates derived from *Chlorella sorokiniana*. *Food science & nutrition*, 7(7), 2381-2390. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1097>

Tagvi Takyar, M. B., Mir Babak, Hachit Khajovi, Safari. (2017) Comparison of the antioxidant properties of alcoholic extracts of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina Platensis* in laboratory conditions. *Caspian Sea Aquatic Journal*, 2 (Winter 1996). 11-18

Yüce tepe, A., & Özçelik, B. Bioactive Peptides Isolated from Microalgae *Spirulina platensis* and their Biofunctional Activities. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*. [Internet] 2016 [citado: 1 de mayo de 2020]; 14 (4).

Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., ... & Zhao, S. (2016). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1216-1223. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1601.01033>

Zanganeh, Negin, Barzegar, Hassan, Alizadeh Behbahani, Behrouz, & Mehrania, Mohammadamin. (2019). Investigating the effect of different levels of *Spirulina platensis* microalgae on nutritional, physicochemical and sensory characteristics of sponge cake. *Iran Journal of Food Science and Industry Research*, 16(2), 207-220. doi: 10.22067/ifstrj.v16i2.81859. (In Persian)

## Comparison of biological activity in extracts from *Chlorella* and *Spirulina* algae the related algal biomass before and after proteolysis

Tayeabeh Hadi Toranposhti<sup>1</sup>, Fakhri Sadat Hosseini<sup>2\*</sup>, Fatemeh Safakhah<sup>1</sup>

Received date: 11/4/2023

Acceptance date: 18//6/2023

### Abstract

**Introduction:** Microalgae are organisms with diverse and valuable metabolites, and two microalgae, spirulina and chlorella, have received much attention due to their high protein content.

**Methods:** In this study, after the cultivation of spirulina and chlorella microalgae, they were extracted and their protein was extracted by sonicator and subjected to enzymatic hydrolysis with two enzymes, alkaline protease and pepsin, and using the test DPPH and their antioxidant properties were measured. Also, antiproliferative property with two cancer cell lines MCF-7 and Caco-2 and antimicrobial property with two bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, proteins of spirulina and chlorella microalgae were measured before and after enzymatic hydrolysis.

**Results:** The survival rate of MCF-7 cancer cells after 48-hour treatment with a concentration of 200 µg/ml hydrolyzed protein of *S.platensis* and *C.vulgaris* was 21.60% and 37.65%, respectively, and this amount has decreased for Caco-2 cancer cells by 23.63% and 26.48%, respectively.. Also, the results showed that protein hydrolysis had a positive effect on improving antioxidant, antiproliferative and antimicrobial properties.

**Key words:** alkaline protease, anticancer, anti-cell proliferation, antimicrobial, antioxidant, pepsin

---

1- Master's Degree in Microbial Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al Zahra University

2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University

(\*Corresponding author:F.hosseini@alzahra.ac.ir)