



Optimization of chlorophyll bioactive compound and polysaccharide of *Enteromorpha intestinalis* algae in the Caspian Sea

Somayeh Rahaiee¹, Rashid Alijani Ardashir², Fatemeh Razaghi³

¹ Associate Professor, Department of Microbial biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technology, Amol, Iran.

² Assistant Professor, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technology, Amol, Iran.

³ Bachelor degree, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technology, Amol, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Green algae pigments and polysaccharides have economic importance and therapeutic applications. Considering the abundance of green algae *Enteromorpha intestinalis* on the shores of the Caspian Sea, this study tried to investigate the efficiency of polysaccharide extraction and the optimal conditions of chlorophyll extraction.

Materials & methods: After sampling the algae from the seashores in the autumn season and washing it, the samples were dried in an oven, and then ethanol was used as a solvent to extract chlorophyll. The surface-response method (RSM-CCD, Design Expert v 12 software) (factors including the solvent concentration (70-96%), extraction time (60-120 min), and temperature (30-70 °C) was used to determine the optimal conditions for chlorophyll extraction. The sample was first dried and suspended in ethanol to extract polysaccharides, and then solvents, including water, sodium hydroxide, and hydrochloric acid solvents were used.

Results: The surface-response method's results showed that the optimal conditions for maximum chlorophyll extraction were a solvent concentration of 96%, an extraction temperature of 61°C, and an extraction time of 84 min. After 24 h, the highest rate of polysaccharide extraction (82%) from green algae was obtained using a hydrochloric acid solvent.

Conclusion: This study's results generally showed that *Enteromorpha* green algae have a good potential for extracting chlorophyll pigment and polysaccharides.

Key words: Algae, Polysaccharides, Central composite design, Chlorophyll, Solvents.

Received: 29 February 2025

Revised: 18 April 2025

Accepted: 24 May 2025

Correspondence to: Somayeh Rahaiee

Tel: +98 09118675234

E-mail: S.rahaiee@ausmt.ac.ir

Journal of Microbial World 2025, 18 (1): 45 - 55

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2025.1216412>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال کلروفیل و پلی‌ساکارید از جلبک *انترومورفا اینتستینالیس* دریای خزر

سمیه رهایی^{۱*}، رشید علیجانی‌اردشیر^۲، فاطمه رزاقی‌شانی^۳

^۱ دانشیار، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

^۲ استادیار، گروه نانو زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

^۳ کارشناسی، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: جلبک‌های سبز به‌عنوان منبع غنی از رنگدانه‌ها و پلی‌ساکاریدهای زیست‌فعال با اهمیت اقتصادی و کاربردهای درمانی شناخته می‌شوند. نظر به فراوانی جلبک سبز *انترومورفا اینتستینالیس* (*Enteromorpha intestinalis*) در سواحل دریای خزر، هدف از این پژوهش بررسی بازده استخراج پلی‌ساکارید و شرایط بهینه استخراج کلروفیل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بعد از جمع‌آوری جلبک از سواحل دریا در فصل پاییز و شستشوی آن، نمونه‌ها در آون خشک گردید و سپس از اتانول به‌عنوان حلال به منظور استخراج کلروفیل استفاده شد و شرایط بهینه استخراج کلروفیل به روش سطح-پاسخ (CCD) با استفاده از نرم افزار Design-Expert v 12 و متغیرهای غلظت حلال (۹۶-۷۰٪)، زمان (۱۲۰-۶۰ دقیقه) و دمای استخراج (۷۰-۳۰ درجه سلسیوس) تعیین شد. به‌منظور استخراج پلی‌ساکارید، بعد از خشک کردن نمونه و غوطه‌ورسازی آن در اتانول، از حلال‌های آب، هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک استفاده شد.

یافته‌ها: روش سطح-پاسخ نشان داد که مقدار بهینه برای حداکثر میزان استخراج کلروفیل به ترتیب غلظت حلال اتانول ۹۶٪، دمای استخراج ۶۱ درجه سلسیوس و مدت زمان استخراج ۸۴ دقیقه بوده است. بیشترین میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید (۸۲٪) از این جلبک سبز با استفاده از حلال اسید کلریدریک و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه به‌طور کلی نشان داد که جلبک سبز *انترومورفا اینتستینالیس* از پتانسیل مناسبی جهت استحصال رنگدانه کلروفیل و پلی‌ساکارید برخوردار می‌باشد.

کلمات کلیدی: جلبک، پلی‌ساکاریدها، طرح مرکب مرکزی، کلروفیل، حلال‌ها.

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۱۱

ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۱/۲۹

پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۳/۳

مقدمه

زیستی و گونه‌های ارزشمند بومی غنی می‌باشند، پتانسیل بالایی را در مطالعات بنیادی و کاربردی-تجاری در حیطه زیست‌فناوری دریا (آبزیان) به منظور استحصال و حفاظت از این ثروت عظیم دارا می‌باشد. یکی از منابع زیستی ارزشمند، ترکیبات زیست‌فعال دریایی بوده که در حیطه زیست فناوری آبی قرار گرفته و به روش‌های نوین، قابل استحصال می‌باشند.

ایران با داشتن حوزه‌های دریایی گسترده در شمال (دریای خزر) و جنوب (خلیج فارس و دریای عمان) و وجود دریاچه‌ها، رودخانه‌ها و تالاب‌های متعدد که از نظر تنوع

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
پست الکترونیک: S.rahaiee@ausmt.ac.ir
تلفن: ۰۹۱۱۸۶۷۵۲۳۴



ارزش گذاری پلی‌ساکاریدهای جلبکی عمدتاً به دلیل پیچیدگی آن‌ها در ساختار و ابعاد باقی مانده است (۳). پلی‌ساکاریدهای استخراجی دارای چندین مزیت نسبت به سایر پلیمرهای مصنوعی است از جمله ایمنی، پایداری، آب دوستی، زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و تغییرپذیری شیمیایی. این خواص آن‌ها را قادر می‌سازد تا برای طیف وسیعی از اهداف، مانند تهیه مواد دارویی، عوامل آزاد کننده دارو و جایگزین‌های پلازما به کار برده شوند. جلبک‌های ماکرو تا حد زیادی به خاطر محتوای پلی‌ساکارید بالاتر برجسته شده‌اند و در طول دهه‌های گذشته برای چندین کاربرد صنعتی مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند (۴ و ۵). پلی‌ساکاریدهای جلبکی بسته به خصوصیات ساختاری آن مانند وزن مولکولی و گروه‌های عاملی از جمله گروه‌های کربوکسیل، هیدروکسیل، استیل و سولفات، فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از خود نشان می‌دهند. چندین مطالعه، زیست‌فعالی ترکیبات مشتق از جلبک را با کارایی بالا و سمیت کم گزارش کرده‌اند. آن‌ها دارای تأثیرات ضد تومور، آنتی‌اکسیدان، ضد انعقاد، و ضدباکتری می‌باشند. همچنین، اثرات ضدویروسی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، ضدالتهابی، ضد چربی خون و اثرات مرطوب کنندگی نیز از آن‌ها گزارش شده است که قابلیت گسترده آن‌ها را در زمینه‌های دارویی، غذایی و صنعتی منعکس می‌سازد (۶ و ۷). روش‌های مختلفی نیز برای استخراج ترکیبات پلی‌ساکاریدی از جلبک‌های سبز ارائه شده است که در این میان استفاده از حلال آب داغ، حلال‌های آلی نظیر اتانول، روش اسیدی، روش قلیایی و روش آنزیمی مرسوم می‌باشند (۸ و ۹). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که بازده ترکیبات استخراج شده از جلبک‌ها به شدت وابسته به نوع جلبک، شرایط استخراج (دما، زمان، pH، نوع حلال) و روش طراحی فرآیند است (۹). روش‌های بهینه‌سازی مانند روش سطح پاسخ (RSM) در مطالعات متعددی برای تعیین شرایط استخراج مؤثر از گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و بازده استخراج رنگدانه‌ها، پلی‌ساکاریدها و سایر متابولیت‌ها را بهبود بخشیدند (۱۰ و ۱۱). با این حال مطالعات اندکی با هدف بهینه‌سازی فرایند استخراج کلروفیل و

زیست‌فناوری آبی یک راه حل در حال ظهور برای کاهش نیاز جهان به ترکیبات مصنوعی به دست آمده از مواد خام تجدید ناپذیر است. از این نظر، توسعه پالایشگاه‌های زیستی پایدار و یکپارچه به منظور بهره‌برداری از زیست‌توده‌های دریایی فراوان که به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرند ضروری است (۱). ماکرو جلبک‌ها نمونه‌ای از چنین زیست‌توده‌هایی هستند که عمدتاً پتانسیل استخراج پلی‌ساکارید برای غذای انسانی، لوازم آرایشی و دارو را دارند. این نوع زیست‌توده با داشتن ترکیبات ارزشمند می‌تواند در رفع مشکلات مربوط به چالش‌های پالایشگاه‌های زیستی به عنوان خوراک، محرک‌های زیستی گیاهی یا حتی انرژی و پلاستیک‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرند (۲). دیواره سلولی جلبک‌ها حاوی ترکیبات پیچیده‌ای از پلی‌ساکاریدهای ساختاری و ذخیره‌ای است که نوع آن بسته به شاخه‌ی جلبکی (سبز، قرمز، قهوه‌ای) متفاوت می‌باشد (۳).

جلبک دریایی سبز *انترومورفا (Enteromorpha)*، منبعی غنی از رنگدانه‌ها، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی کمیاب و سایر ترکیبات فعال زیستی، به ویژه پلی‌ساکاریدهای سولفات است. *انترومورفا* متعلق به راسته *اولوالز (Ulvales)* از شاخه *کلروفیتا (Chlorophyta)* است. گونه‌های *انترومورفا* به عنوان محصول دارویی و منبع غذایی توسط انسان در چین و سایر کشورهای آسیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. جنس *انترومورفا* دارای چندین گونه می‌باشد که عمدتاً شامل پرولیفرا (*prolifera*)، لینزا (*linza*)، کمپرسا (*compressa*)، کلاتراتا (*clathrata*) و ایتستینالیس (*intestinalis*) است. در جلبک‌های سبز مانند *انترومورفا ایتستینالیس*، پلی‌ساکاریدهای اصلی دیواره شامل اولوان (*Ulvon*)، سلولز و پکتین‌های سولفات هستند. اولوان، یکی از مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای سولفات موجود در دیواره سلولی این جلبک‌ها، دارای خواص زیستی از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدویروسی، ضدالتهابی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی است. این پلی‌ساکاریدها معمولاً از مونوساکاریدهایی مانند رامنوز، گلوکورونیک اسید، گزیلوز، و سولفات‌ها تشکیل شده‌اند. علی‌رغم بازار بزرگ موجود در محصولات جلبکی، شکاف‌های علمی قابل توجهی در مورد

گرم) با هاون کاملاً خرد شده و در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس و با رطوبت ۱۲٪ به مدت ۳ ساعت خشک گردید. سپس جهت خالص سازی، نمونه پودر آماده شده در اتانول ۹۵٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق معلق شده تا قندهای آزاد، آمینواسیدها، و بعضی از فنول‌ها حذف شوند. بعد از فیلتراسیون، نمونه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت خشک شده و به کیسه‌های پلاستیکی منتقل شد. مقدار ۲۰ گرم از نمونه خشک شده جهت استخراج با روش‌های مختلف در معرض آب مقطر، هیدروکسید سدیم (۰/۱ نرمال)، و اسید کلریدریک (۰/۱ نرمال) با زمان‌های مختلف (۱، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) قرار گرفتند. نسبت نمونه جلبک به حلال ۱:۲۰ وزنی/حجمی بوده و دمای استخراج ۸۰ درجه سلسیوس بود. نمونه استخراج شده با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جداسازی گردید. بعد از خنثی کردن نمونه‌های اسیدی و قلیایی (به ترتیب با باز و قلیا)، مایع رویی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس توسط روتاری تحت خلا تبخیر شد و سپس در اتانول ۹۵ درصد قرار گرفت. ته نشست بدست آمده از سانتریفیوژ با اتانول ۹۵ درصد شستشو شد. بازده پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها استخراج شده با تقسیم وزن نمونه استخراجی به وزن خشک جلبک بدست آمد (۱۲).

د) تجزیه و تحلیل آماری: جهت تحلیل آماری داده‌های خام به‌دست آمده از نرم افزار SPSS 26 استفاده شد. اختلاف معنی‌دار توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) از طریق آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به صورت انحراف استاندارد $\pm$ میانگین (Mean $\pm$ SD) گزارش شد و از نظر آماری نیز مقدار P -value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید. تحلیل داده‌های حاصل از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM) با استفاده از نرم‌افزار تخصصی Design-Expert نسخه ۱۲ انجام گرفت. طرح مورد استفاده، طرح مرکب مرکزی (Central Composite Design – CCD) بود که به‌منظور بررسی اثر متقابل و بهینه‌سازی سه متغیر اصلی شامل غلظت حلال، دمای استخراج و زمان به‌کار گرفته شد. پارامترهای مدل شامل

پلی‌ساکارید از جلبک سبز *انترومورفا ایتستینالیس* صورت گرفته است. لذا نظر به فراوانی جلبک *انترومورفا ایتستینالیس* در سواحل دریای خزر، لازم است در خصوص ارزش بیولوژیک این گونه جلبکی آب‌های ایران تحقیقات وسیعی صورت گیرد. این پژوهش به بررسی بازده استخراج پلی‌ساکارید جلبک *انترومورفا ایتستینالیس* به کمک حلال‌های مختلف، همچنین شرایط بهینه استخراج رنگدانه کلروفیل به روش سطح پاسخ پرداخته است تا بتوان از پتانسیل کاربرد جلبک مذکور در تحقیقات آینده بهره جست.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری جلبک: جلبک سبز *انترومورفا ایتستینالیس* از سواحل صخره‌ای دریای خزر (36.9 N, 53.1 E) در فصل پاییز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در عمق نیم متری جمع‌آوری شد و به شکل خشک مورد ارزیابی قرار گرفت.

ب) استخراج کلروفیل: نمونه‌های تازه ماکرو جلبک چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قبل از استخراج، نمونه‌ها در داخل نیتروژن مایع قرار گرفته و سپس با هاون کاملاً خرد و به شکل پودری تبدیل شد. به منظور آماده سازی نمونه خشک جلبک، ابتدا نمونه با آب دریا شسته شده و سانتریفیوژ می‌گردد تا کاملاً آب آن حذف گردد. سپس نمونه جلبک در آون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با ۱۰ تا ۱۱ درصد رطوبت نهایی خشک شد و در نهایت به شکل پودر آماده شد. از اتانول به‌عنوان حلال کنترل برای استخراج رنگدانه استفاده شد. به منظور تعیین شرایط بهینه جهت استخراج کلروفیل از روش بهینه‌سازی سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی (CCD) استفاده شد. غلظت حلال (۷۰، ۸۳، ۹۶٪)، زمان استخراج (۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه) و دمای استخراج (۳۰، ۵۰، ۷۰ درجه سلسیوس) به عنوان متغیرهای مستقل و میزان جذب کلروفیل در طول موج ۶۶۷ نانومتر به عنوان متغیر وابسته (پاسخ سامانه) مورد بررسی قرار گرفتند (۱).

ج) استخراج پلی‌ساکارید خام: نمونه خشک جلبکی (۱۰۰

شد. غلظت حلال (۷۰، ۸۳، ۹۶٪)، زمان استخراج (۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه) و دمای استخراج (۳۰، ۵۰، ۷۰ درجه سلسیوس) به عنوان متغیرهای مستقل و میزان جذب کلروفیل در طول موج ۶۶۷ نانومتر به عنوان متغیر وابسته (پاسخ سامانه) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). براساس نتایج آزمایش‌های انجام شده، میزان جذب کلروفیل که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانش شد ۲/۳۱ بوده است.

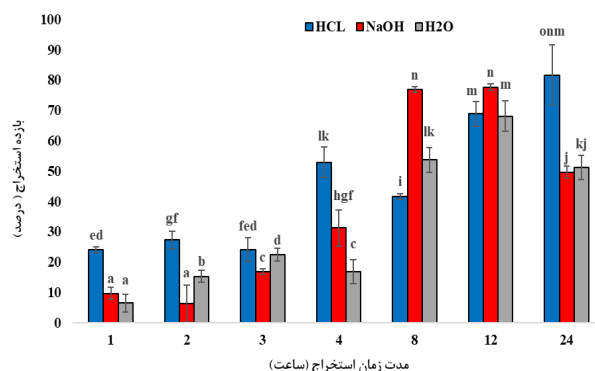
جدول ۱: طرح مرکب مرکزی (CCD) در تیمارهای مختلف و متغیرهای وابسته برای *انترومورفا/ایتستینالیس*.

تیمار	متغیرهای مستقل			
	X1	X2	X3	Y1
	غلظت حلال (%)	دمای استخراج (°C)	زمان استخراج (دقیقه)	میزان جذب کلروفیل
۱	۷۰	۷۰	۹۰	۱/۸۵
۲	۹۶	۳۰	۹۰	۲/۰۵۸
۳	۸۳	۳۰	۶۰	۰/۴۴۶
۴	۷۳	۵۰	۹۰	۱/۶۷۸
۵	۹۶	۷۰	۹۰	۲/۱۰۸
۶	۸۳	۵۰	۹۰	۱/۸۴۸
۷	۸۳	۵۰	۹۰	۱/۴۰۸
۸	۷۰	۵۰	۱۲۰	۱/۷۹
۹	۸۳	۵۰	۹۰	۱/۸۶۸
۱۰	۹۶	۵۰	۶۰	۲/۲۶۷
۱۱	۹۶	۵۰	۱۲۰	۱/۹۷۳
۱۲	۸۳	۷۰	۶۰	۱/۸۷۳
۱۳	۸۳	۵۰	۹۰	۱/۲۴
۱۴	۸۳	۷۰	۱۲۰	۰/۹۵۱
۱۵	۸۳	۳۰	۱۲۰	۱/۱۹۷
۱۶	۷۰	۵۰	۶۰	۱/۱۵۱
۱۷	۷۰	۳۰	۹۰	۰/۵۰۲

اثرات خطی، متقاطع و درجه دوم با تحلیل واریانس (ANOVA) و مقادیر F و P ارزیابی شدند. برازش مدل با استفاده از ضرایب تعیین (R^2) و بررسی معنی‌داری Lack of Fit سنجیده شد.

یافته‌ها

الف) بازده استخراج پلی‌ساکارید: نتایج مربوط به بازده استخراج پلی‌ساکارید در نمودار (۱) نشان داده شده است. بیشترین میزان بازده استخراج پلی‌ساکارید (۸۲٪ وزنی/ وزنی) از جلبک سبز با استفاده از حلال اسید کلریدریک بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت به دست آمد. بعد از آن، حلال هیدروکسید سدیم (۷۸٪ وزنی/ وزنی) و آب (۶۸٪ وزنی/ وزنی) بعد از طی مدت زمان ۱۲ ساعت، بیشترین میزان استخراج پلی‌ساکارید را نشان داده‌اند. هرچند، با افزایش مدت زمان استخراج به ۲۴ ساعت، کاهش معنی‌دار در بازده استخراج با حلال‌های هیدروکسید سدیم و آب وجود داشته است ($P\text{-value} < 0.05$).



نمودار ۱: بازده استخراج پلی‌ساکارید از *انترومورفا/ایتستینالیس* با استفاده از حلال‌ها و زمان‌های مختلف.

ب) بهینه‌سازی استخراج کلروفیل از جلبک خشک شده به روش سطح پاسخ: طبق مطالعات انجام شده، عوامل مختلفی مانند pH، درجه حرارت استخراج، میزان همزنی، نوع حلال و غلظت حلال کاربردی بر مقدار استخراج کلروفیل از گونه‌های گیاهی و جلبک‌ها تاثیرگذار هستند. بنابراین در این پژوهش، به منظور تعیین شرایط بهینه جهت استخراج کلروفیل از روش بهینه‌سازی سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی (CCD) بهره گرفته

علاوه بر توافق مناسب بین داده‌های مشاهده شده با داده‌های پیش‌بینی شده توسط معادله، میزان $R^2 = 92/0$ برای پاسخ اعتبار آماری و معنی‌داری مدل برای بهینه‌سازی استخراج کلروفیل را نشان می‌دهد.

در نمودارهای سه بعدی (3D) اثرات ترکیبی غلظت حلال، دمای استخراج و زمان استخراج بر متغیر پاسخ مقدار کلروفیل نشان داده شده است. همان گونه که در شکل (۲ الف) مشاهده می‌شود، وقتی غلظت حلال و یا دمای استخراج افزایش می‌یابد مقدار استخراج کلروفیل افزایش می‌یابد و به علت برهم کنش بین آن‌ها، پاسخ و فاکتورها رابطه خطی ندارند. اثر خطی زمان استخراج بر میزان کلروفیل معنی‌دار نیست اما اثر متقابل آن با غلظت حلال و یا دمای استخراج بر پاسخ مقدار کلروفیل از نظر آماری معنی‌دار ($p < 0/05$) است در حالی که اثر درجه دوم این متغیر معنی‌دار نیست.

شکل (۲) نمودارهای سطح پاسخ اثر سه متغیر مستقل بر میزان جذب کلروفیل را نشان می‌دهد. چنانچه در شکل‌های مذکور مشاهده می‌شود، برهم‌کنش معنی‌دار بین غلظت حلال و دما و زمان استخراج وجود دارد. حالت تحذب در نمودار نشان می‌دهد که ما می‌توانیم میزان بهینه (حداکثر مقدار) برای پاسخ در محدوده مطالعه شده متغیرها را تعیین کنیم. وقتی دما و زمان استخراج افزایش می‌یابد، میزان جذب کلروفیل تا حدی افزایش یافته و سپس به صورت غیرخطی کاهش می‌یابد. همچنین با افزایش همزمان غلظت حلال و زمان استخراج، میزان جذب کلروفیل نیز زیاد می‌شود.

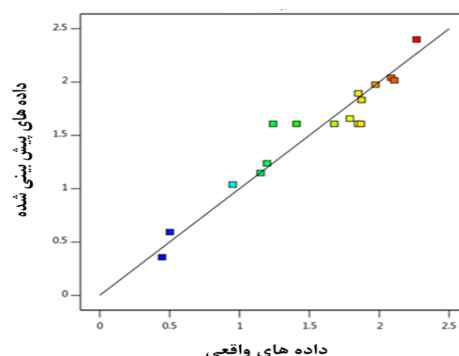
در این بهینه‌سازی، هدف مطلوب بیشینه‌سازی میزان استخراج کلروفیل بود. بنابراین با آنالیز نمودارهای سطح پاسخ حاصل از نرم افزار و حل عددی معادله، میزان بهینه برای متغیرهای مستقل در واحدهای واقعی جهت حداکثر میزان کلروفیل به ترتیب غلظت حلال ۹۶٪ حجمی/ حجمی، دمای استخراج ۶۱ درجه سلسیوس و مدت زمان استخراج برابر با ۸۴ دقیقه بدست آمد. بر اساس این شرایط، میزان جذب کلروفیل توسط مدل به میزان ۳۱/۲ به دست آمد. نتایج این بهینه‌سازی غیر خطی در شکل (۳) ترسیم شده است. از این نقاط بهینه جهت استخراج

جهت انتخاب بهترین مدل برازنده داده‌های آزمایشی، آنالیز واریانس با محاسبه میزان F بکار رفته است. در نتیجه برای پاسخ میزان جذب، اثرات خطی، درجه دوم و متقاطع ($X_n X_m$) پارامترهای غیر وابسته به صورت معادله ۱ به طور مناسبی با داده‌های تجربی برازش یافته است.

$$Y_1 = 1.61 + 0.392 X_1 + 0.319 X_2 + 0.02 X_3 - 0.33 X_1 X_2 - 0.23 X_1 X_3 - 0.42 X_2 X_3 - 0.352 X_1^2 - 0.32 X_2^2 - 0.16 X_3^2 \quad (\text{معادله ۱})$$

به‌طوری که، Y_1 میزان استخراج کلروفیل بوده و X_1 غلظت حلال، X_2 دمای استخراج و X_3 زمان استخراج را نشان می‌دهند. برای ارزیابی برازش و تناسب مدل‌های پیشنهاد شده و شناسایی فاکتورهای معنی‌دار، آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد. اهمیت آماری، اثرهای خطی و درجه دوم و اثر متقابل سه فاکتور موردنظر را برای میزان جذب کلروفیل بررسی شد. عدم برازش مقدار واگرایی مدل‌های پیشنهادی را نسبت به مقادیر تجربی متناظر نشان می‌دهد و با استفاده از آن می‌توان میزان خطا را بدون توجه به درستی مدل پیشنهادی برآورد کرد. عدم برازش بی معنی ($p > 0/05$) تناسب مدل را برای داده‌های تجربی تایید می‌کند. براساس آنالیز آماری و محاسبه عدم برازش ($p = 0/085$)، مدل‌های پیشنهاد شده به‌طور معنی‌داری برای پیش‌بینی متغیر پاسخ مربوطه مناسب هستند.

کنترل دقیق مدل کاربردی قسمتی مهم از آنالیز آزمایش به شمار می‌رود. یک مدل مناسب باید بتواند تخمین مناسبی از شرایط واقعی باشد. برای اعتبار مدل، ۵ آزمایش انجام گرفت و داده‌های واقعی و پیش‌بینی شده با یکدیگر مقایسه شد (شکل ۱).



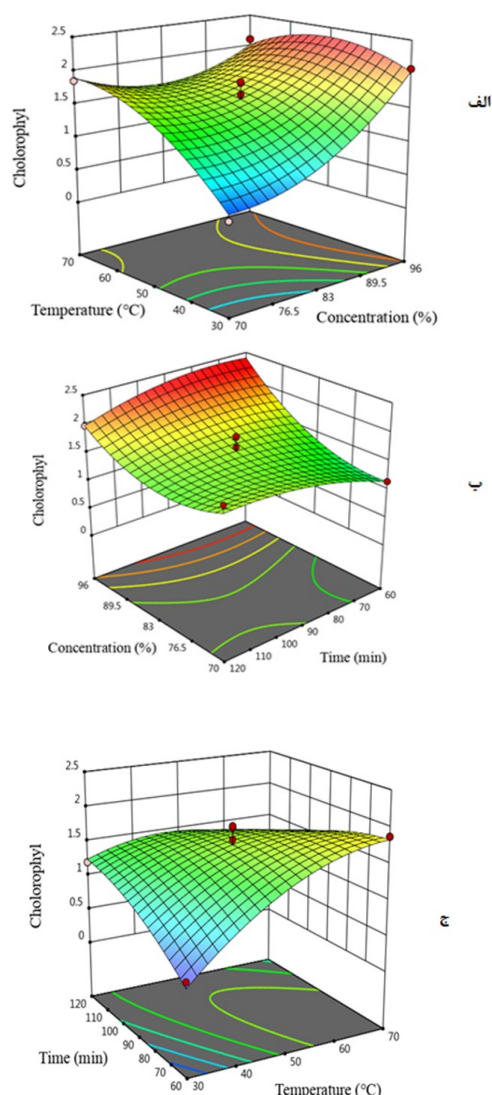
شکل ۱: نمودار داده‌های واقعی در مقابل داده‌های پیش‌بینی شده برای متغیر وابسته میزان جذب.

بحث

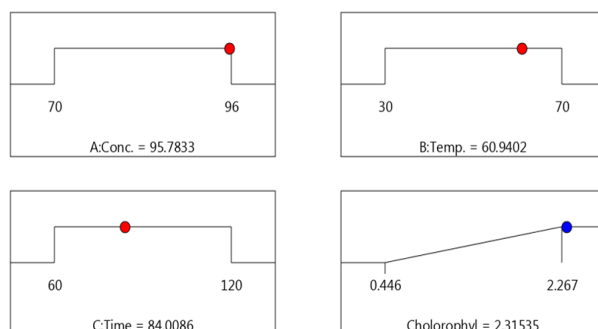
استخراج کلروفیل و بهینه‌سازی شرایط استخراج آن باتوجه به اهمیتی که این ترکیب طبیعی می‌تواند به‌عنوان جایگزین رنگ‌های سنتزی موجود در بازار داشته باشد، یکی از اهدافی است که این مطالعه بر روی آن تمرکز کرده است. کلروفیل دارای فعالیت کلاته‌کنندگی می‌باشد لذا می‌تواند در پماد ترمیم زخم، بهبود عملکرد کبد، کلیه و روده‌ها استفاده شود. علاوه بر این، سلول‌ها را ترمیم می‌کند، هموگلوبین خون را افزایش می‌دهد و رشد سلولی را سریعتر می‌کند. استفاده از کلروفیل به‌عنوان منبع رنگدانه در لوازم آرایشی از اهمیت بالایی برخوردار است. علاوه بر این، در صنایع غذایی، کلروفیل به عنوان ماده رنگدانه طبیعی در غذاهای فرآوری شده استفاده می‌شود. مزایای کلروفیل برای سلامت انسان با توجه به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، و ضد تومور گزارش شده است (۱۳).

در مطالعه کنونی از حلال آلی اتانول به‌منظور استخراج کلروفیل استفاده گردید. اگرچه استخراج کلروفیل از بیومس زنده جدید نیست، با این حال روش‌های گزارش شده در اکثریت قریب به اتفاق آن‌ها مبتنی بر استفاده از حلال‌های آلی خطرناک و فرار یا تیمارهای مکانیکی است که منجر به افزایش دما و تخریب جزئی حرارتی می‌شود. استفاده از حلال‌های مبتنی بر آب در دمای اتاق به‌عنوان یک رویکرد پایدارتر و زیست سازگارتر به نظر می‌رسد. با وجود اینکه استفاده از آب به‌عنوان حلال جهت بازیابی ترکیبات آب‌دوست آسان است، خاصیت آب‌گریزی کلروفیل استفاده از آب برای استخراج آن را به یک چالش بدل کرده است (۱). نشان داده شده است که استفاده از اتانول به عنوان حلال منجر به استخراج ۱۰۰ درصدی کلروفیل از جلبک سبز اولوا شده است زیرا به طور کلی کلروفیل موجود در گیاهان، جلبک‌ها، فیتوپلانکتون‌ها، و بعضی از باکتری‌ها و قارچ‌ها به صورت محلول در چربی تولید می‌شوند (۱۴). در کنار اتانول، استخراج کلروفیل با استفاده از متانول نیز نتایج جالبی داشته است اما به دلیل سمی بودن آن در این مطالعه مورد استفاده قرار نگرفته است. نتایج مطالعه قبلی نشان داد که

استخراج کلروفیل برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.



شکل ۲: نمودار سه بعدی به‌دست آمده بر اساس طرح CCD برای متغیر وابسته میزان جذب کلروفیل.



شکل ۳: طرح شماتیک نقاط بهینه متغیرها، پاسخ و سطوح مرتبط بر اساس مدل پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار.

مطالعه آن‌ها نشان داد که میزان پاسخ با افزایش زمان و غلظت حلال افزایش می‌یابد. این روش در مطالعه دیگر به منظور بهینه‌سازی استخراج کلروفیل از جلبک *کلرلا* نیز استفاده شده است به‌طوری‌که شرایط بهینه برای استخراج کلروفیل از این جلبک در دمای استخراج ۶۱ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۷۸ دقیقه، درصد حلال (اتانول) ۷۹/۴٪ و توان اولتراسوند ۲۰۰ وات تعیین شد (۱۹). در مطالعه کنونی با وجود عدم استفاده از اولتراسوند، شرایط بهینه برای استخراج کلروفیل از جلبک *انترومورفا* در غلظت حلال اتانول ۹۶٪، دمای استخراج ۶۱ درجه سلسیوس، مدت زمان استخراج ۸۴ دقیقه بوده است که با مقادیر گزارش شده در مطالعه فوق‌الذکر قرابت دارد.

در مطالعه حاضر به‌منظور استخراج پلی‌ساکارید، ابتدا نمونه‌ها توسط اتانول از قندهای آزاد، آمینواسیدها و فنول‌ها زدایش شدند و سپس تحت حلال‌های اسیدی، بازی و آب قرار گرفته تا استخراج انجام شود. پلی‌ساکاریدها را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف از جمله آب گرم، قلیایی، اسیدی، آنزیمی و مایکروویو از ماکرو جلبک سبز استخراج کرد. گزارش شده است که روش‌ها و شرایط استخراج می‌تواند ترکیب، عملکرد و وزن مولکولی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده را تغییر دهد (۸). جدای از تکنیک‌های استخراج، شرایط استخراج مانند زمان، دما، pH، نسبت مقدار زیست‌توده به حلال و نوع حلال شستشو می‌تواند بر ترکیب شیمیایی و عملکرد پلی‌ساکاریدها تأثیر بگذارد (۲۰). در تکنیک‌های استخراج قلیایی، از هیدروکسید سدیم برای جداسازی پلی‌ساکاریدها از جلبک استفاده می‌شود. اصل این روش این است که یون‌های هیدروکسید پایه با پیوندهای هیدروژنی در پلی‌ساکاریدها تداخل می‌کند تا آن را در حلال آزاد کنند. مطالعه قبلی نشان داده است که بازده استخراج پلی‌ساکارید با این روش ۱۰/۷ درصد پلی‌ساکارید خام با وزن مولکولی متوسط ۴۷/۷ کیلو دالتون می‌باشد (۱۲). در مطالعه کنونی این بازده بعد از یک ساعت استخراج با روش قلیایی بدست آمده است. در روش اسیدی، جز اسیدی به جزء سلول جلبک نفوذ می‌کند و سپس H^+ اسید با پیوندهای هیدروژنی پلی‌ساکارید تداخل می‌کند تا

اتانول به‌اندازه متانول برای استخراج کلروفیل کارآمد است (۱۵). وراپراساد و همکاران (۲۰۱۹) متانول را به جای استون برای نمونه‌های معمول دریایی توصیه کردند (۱۶). واسموند و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد کردند که بازده استخراج کلروفیل با حلال‌های مختلف به عوامل دیگری مانند جایگاه تاکسونومیکی جامعه جلبکی بستگی دارد (۱۷).

در مطالعه حاضر از جلبک تازه به جای جلبک خشک (جلبکی که در زیر آفتاب خشک شده باشد) به‌منظور استخراج کلروفیل استفاده شده است. این استراتژی در مطالعه کنونی به این دلیل بوده است که در هر شرایطی بازده استخراج کلروفیل از بیومس تازه بیشتر از بیومس خشک می‌باشد. علاوه براین، اتانول ظرفیت کمتری جهت نفوذ به بافت خشک دارد (۱). در واقع وقتی بیومس خشک برای استخراج کلروفیل استفاده می‌شود به منظور رسیدن به حداکثر بازده استخراج، حجم بالاتری از حلال مورد نیاز است و هزینه استخراج افزایش می‌یابد. فرایند خشک کردن منجر به تأثیرات ساختاری بر روی غشاهای کلروپلاست و تیلاکوئید می‌شود، همچنین دارای تأثیرات منفی بر روی ساختار کلروفیل می‌باشد (۱۸).

در مطالعه کنونی از طریق روش سطح پاسخ- طرح مرکب مرکزی مشخص شد که وقتی غلظت حلال و یا دمای استخراج افزایش می‌یابد میزان استخراج کلروفیل نیز با افزایش همراه است و به علت برهم کنش بین آن‌ها، پاسخ و فاکتورها رابطه خطی نداشتند. روش سطح پاسخ، یک استراتژی تجربی برای جستجوی شرایط بهینه برای یک سیستم چند متغیره، و یک تکنیک بسیار کارآمد برای بهینه‌سازی است. در مطالعه‌ای که به بررسی بهینه‌سازی استخراج رنگدانه‌های فوکوگزانتین و کاروتنوئید از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم به روش سطح پاسخ پرداختند به طوریکه فاکتورهای غلظت حلال اتانول، زمان استخراج، و توان اولتراسوند به‌عنوان متغیرها در نظر گرفته شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که بالاترین بازده استخراج رنگدانه‌ها در غلظت ۷۵٪ اتانول، زمان استخراج ۲۰ دقیقه و توان ۲۴۰ وات به‌دست آمد و مقادیر به‌دست آمده دارای رابطه منطقی با مقادیر پیش‌بینی شده توسط نرم افزار بودند (۱۲).

می‌کنند، بلکه مسیرهای نوینی را برای تحقیقات بیشتر در مورد کاربردهای درمانی آن‌ها می‌گشایند. با افزایش علاقه به منابع پایدار و طبیعی، استفاده از جلبک سبز *انترومورفا ایتستینالیس* می‌تواند نقش مهمی در توسعه افزودنی‌های غذایی کاربردی و استفاده از ترکیبات زیست‌فعال مفید برای سلامت انسان ایفا نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل تامین مالی گردیده است. نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی از قبیل عدم سرقت ادبی، انتشار همزمان، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را رعایت نموده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

آن را در حلال آزاد کند. مشخص شد که روش استخراج اسیدی بازده ۷/۲۴ درصد با میانگین وزن مولکولی ۴۱/۱ کیلو دالتون را در ماکروجلبک سبز *انترومورفا پرولیفرا* ایجاد می‌کند (۸) که در مطالعه کنونی این بازده نیز بعد از یک ساعت با روش اسیدی به دست آمد. لیو و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که بازده استخراج و وزن مولکولی پلی‌ساکارید به دست آمده با این روش از ماکروجلبک سبز *انترومورفا پرولیفرا* به ترتیب ۳۶ درصد و ۱۷/۳ کیلو دالتون بود (۲۱). در مقایسه با روش‌های استخراج آب گرم و قلیایی، روش استخراج اسیدی بازده بهتری دارد (۸) که این نتایج تایید کننده نتایج مطالعه کنونی می‌باشد. لازم به ذکر است که شرایط استخراج به کار رفته در این مطالعه با هدف دستیابی به حداکثر بازده کلروفیل و پلی‌ساکارید طراحی شده‌اند، نه الزاماً حفظ ساختار زیستی اولیه آن‌ها. اگرچه استفاده از دماهای بالا (تا ۶۱ درجه سلسیوس) و تیمارهای اسیدی (۰.۱ نرمال) در منابع متعدد برای استخراج این ترکیبات گزارش شده است، اما تأثیر احتمالی این شرایط بر ساختار سوم و فعالیت زیستی مولکول‌های حاصل قابل انکار نیست. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به بررسی دقیق‌تر خواص ساختاری و زیستی ترکیبات استخراج‌شده با استفاده از روش‌های خفیف‌تر مانند استخراج آنزیمی یا فراصوتی نیز پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه جهت بررسی شرایط بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال جلبک *انترومورفا ایتستینالیس* به عنوان یک منبع ارزشمند از رنگدانه‌های کلروفیل و پلی‌ساکاریدها برنامه‌ریزی گردید. شرایط بهینه استخراج از طریق روش سطح-پاسخ با توجه به متغیرهای حلال، زمان و دمای استخراج تعیین شد. نتایج به دست آمده کارایی بالای استخراج کلروفیل را در غلظت حلال اتانولی ۹۶ درصد با زمان استخراج ۸۴ دقیقه نشان داد، در حالی که پلی‌ساکاریدها با استفاده از حلال اسید کلریدریک پس از ۲۴ ساعت بهترین استخراج را داشتند. این یافته‌ها نه تنها بر اهمیت اقتصادی جلبک‌های سبز در صنایع مختلف تأکید

References

1. Adzitey F, Ekli R, Aduah M. Incidence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat meats in the environs of Bolgatanga Municipality of Ghana. *Cogent Environmental Science*. 2020;6(1):1791463.
2. Alhumaid S, Al Mutair A, Al Alawi Z, Alzahrani AJ, Tobaiqy M, Alresasi AM, Bu-Shehab I, Al-Hadary I, Alhmeed N, Alismail M. Antimicrobial susceptibility of gram-positive and gram-negative bacteria: a 5-year retrospective analysis at a multi-hospital healthcare system in Saudi Arabia. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2021;20(1):43.
3. Patel AK, Vadrle AP, Singhanian RR, Michaud P, Pandey A, Chen S-J, Chen C-W, Dong C-D. Algal polysaccharides: current status and future prospects. *Phytochemistry Reviews*. 2023;22(4):1167-96.
4. García-Vaquero M, Rajauria G, O'Doherty JV, Sweeney T. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food research international*. 2017;99: 1011-20.
5. Zarrin V, Taherizadeh M, Tanideh N, Talaei-Khozani T. The effect of *Sargassum muticum* hot water and ethanolic extracts on intestinal microbiota in obese male rats. *Journal of microbial world*. 2022; 15(2): 134-146.
6. Alijani Ardeshtir R, Owrang M. The synergistic effect of sulfated polysaccharides of green algae with antibiotics on quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbial Biology*. 2024;13(50):27-40.
7. Jafari M, Babaie SH, Motamedi A, Anvar SAA, Nowruzi B, *Spirulina*: A healthy green sun with bioactive properties. *Journal of microbial world*. 2021; 13(4): 322-348.
8. Khazaei M, Ardeshtir RA. Protective effects of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis* on oxidative stress, liver iron overload and Ferroptosis in Zebra fish exposed to ethanol. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;181:117715.
79. Carpena M, Caleja C, Pereira E, Pereira C, Ćirić A, Soković M, Soria-Lopez A, Fraga-Corral M, Simal-Gandara J, Ferreira IC. Red seaweeds as a source of nutrients and bioactive compounds: Optimization of the extraction. *Chemosensors*. 2021;9(6):132.
10. Toan TQ, Phong TD, Tien DD, Linh NM, Mai Anh NT, Hong Minh PT, Duy LX, Nghi DH, Pham Thi HH, Nhut PT. Optimization of microwave-assisted extraction of phlorotannin from *Sargassum swartzii* (Turn.) C. Ag. with ethanol/water. *Natural Product Communications*. 2021;16(2):1934578X21996184.
11. Zhu X, Healy L, Wanigasekara J, Zhao M, Padamati RB, Karuppusamy S, Curtin JF, Sivagnanam SP, Rai DK, Sun D-W. Characterisation of laminarin extracted from brown seaweed *Laminaria digitata*, using optimized ultrasound-and ultrafiltration-assisted extraction method. *Algal Research*. 2023;75:103277.
12. Eliuz E, Börekeçi NS, Ayas D. The antimicrobial activity of *Enteromorpha sp.* methanolic extract and gelatin film solution against on some pathogens. *Marine Science and Technology Bulletin*. 2019;8(2):58-63.
13. Ghanbarzadeh M, Moazami N, Mirdamadi S, Shahavi MH, Moshaei MR, Kiadeh SGH. A study on some phytochemicals in *Arthrospira platensis* MGH-1 fortified with calcium and magnesium. *Phycologia*. 2024;63(4):390-8.
14. Gebreyohannes AY, Mazzei R, Poerio T, Aimar P, Vankelecom IF, Giorno L. Pectinases immobilization on magnetic nanoparticles and their anti-fouling performance in a biocatalytic membrane reactor. *RSC Advances*. 2016;6(101):98737-47.
15. Cvitković D, Dragović-Uzelac V, Dobrinčić A, Čož-Rakovac R, Balbino S. The effect of solvent and extraction method on the recovery of lipid fraction from Adriatic Sea macroalgae. *Algal research*. 2021;56:102291.

16. Varaprasad D, Raga Sudha N, Nazaneen Parveen S, Chandrasekhar T. Effect of various solvents on chlorophyll and carotenoid extraction in green algae: *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. Annals of Plant and Soil Research. 2019;21(4):341-5.
17. Wasmund N, Topp I, Schories D. Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. Oceanologia. 2006;48(1).
18. Hethzerington S, Smillie R, Hallam N. In vivo Changes in Chloroplast Thylakoid Membrane Activity during Viable and Non-viable Dehydration of a Drought-tolerant Plant, *Borya nitida*. Functional Plant Biology. 1982;9(5):611-21.
19. Zulqarnain A, Durrani AI, Saleem H, Rubab S. Development of an ultrasonic-assisted extraction technique for the extraction of natural coloring substance chlorophyll from leaves of *carica papaya*. Journal of Oleo Science. 2021;70(10):1367-72.
20. Humphrey A. Chlorophyll as a color and functional ingredient. Journal of food science. 2004;69(5):C422-C5.
21. Jespersen A. Measurements of chlorophyll a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. Arch Hydrobiol. 1987;109:445-54.