

تعیین ویژگی‌های ضداکسیدانی عصاره جلبک‌های قرمز گونه *Hypnea hamulosa* و *Gracilaria corticata* خلیج فارس

الهام گرمسیری^۱، مسعود رضائی^{۲*}، پروا سفری^۱، آریا باباخانی لشکان^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا

دریافت: ۹۴/۰۸/۰۵ پذیرش: ۹۵/۱۲/۰۷

*نویسنده مسئول مقاله: rezai_ma@modares.ac.ir

چکیده:

امروزه جایگزینی ضداکسیدان‌های مصنوعی با ضداکسیدان‌های طبیعی، از جمله در جلبک‌ها، در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه اثر استفاده از آب و حلال‌های آلی، از جمله استون، اتانول و متانول با غلظت ۵۰ درصد، بر میزان فنول کل و فعالیت ضداکسیدانی دو گونه جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* و *Gracilaria corticata* خلیج فارس بررسی شد. استخراج با استفاده از روش غوطه‌وری و با نسبت ۱:۲۰ جلبک به حلال صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که مخلوط آب و استن (۱:۱) دارای بیشترین ترکیبات فنولی (۰/۳۱ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی)، قدرت کاهندگی آهن (۰/۰۶ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی) و مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (۷۶/۱۱ درصد) بود ($p < ۰/۰۵$). فعالیت ضداکسیدانی کل این عصاره (۰/۰۴ میلی‌گرم اسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی) اختلاف معناداری با عصاره اتانولی ۵۰ درصد و عصاره آبی نداشت ($p > ۰/۰۵$). مقایسه دو گونه جلبکی نیز نشان داد که در تمامی شاخص‌ها به استثنای فعالیت ضداکسیدانی کل گونه جلبکی *G. corticata*، دارای فعالیت ضداکسیدانی بالاتری بود ($p < ۰/۰۵$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حلال‌ها با قطبیت‌های مختلف اثر معناداری بر میزان فنول کل و فعالیت ضداکسیدانی دارند.

کلید واژگان: ترکیبات فنولی، فعالیت ضداکسیدانی، خلیج فارس، *Gracilaria* *Hypnea hamulosa* *corticata*

مقدمه

برابر صدمات ناشی از اکسیداتیو و مشارکت در مسیر سیگنال‌های اصلی سلول‌ها یکی از عملکردهای عمده ضداکسیدان‌ها در سلول‌ها، جلوگیری از صدمات ناشی از

ضداکسیدان‌ها دارای عملکردهای متعددی در سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به دفاع در

In vitro می‌توان به‌طور مختصر به مطالعات انجام شده بر جلبک‌های سبز (El-Baky et al., 2009)، جلبک‌های قرمز (Kumar et al., 2006; Ganesan et al., 2008)؛ al., 2008، جلبک‌های قهوه‌ای (Chandini et al., 2005، Chkhikvishvili and Ramazanov, 2000) اشاره کرد. دو گونه جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* و *Gracilaria corticata* با توجه به پراکنشی که در سواحل ایران و به‌ویژه خلیج فارس دارند، می‌توانند به‌عنوان گزینه‌های بالقوه برای وجود ترکیباتی با خواص ضداکسیدانی بررسی شوند. هدف از انجام این تحقیق بررسی فعالیت ضداکسیدانی جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* و *Gracilaria corticata* خلیج فارس و تعیین بهترین حلال برای استخراج این ترکیبات می‌باشد. روش‌های بسیاری برای تعیین ظرفیت ضداکسیدانی وجود دارد که از لحاظ اصول و شرایط آزمایش با هم متفاوتند. در نتیجه روش‌های ضداکسیدانی مختلف دارای سهم متفاوتی در تعیین پتانسیل ضداکسیدانی می‌باشند. در این مطالعه میزان فنول کل و همچنین فعالیت ضداکسیدانی شامل فعالیت ضداکسیدانی کل، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی آهن آزمایش شد (Meenakshi et al., 2011).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

جلبک قرمز *H. hamulosa* و *G. corticata* از سواحل خلیج فارس در منطقه ساحل جنوبی شهر بوشهر جمع‌آوری و با آب دریا شستشو شدند تا باقیمانده اپی‌فیت‌ها، شن و ماسه و نمک از جلبک‌ها جدا شود. سپس نمونه‌ها با آب شیرین شستشو شده و در دمای محیط و در سایه به‌مدت ۳ تا ۴ روز قرار گرفته تا خشک شوند. نمونه‌ها پس از

فعالیت گونه‌های اکسیژنی فعال می‌باشد (et al., 2011). میزان بیش از حد گونه‌های اکسیژنی فعال ممکن است مضر باشند. آنها می‌توانند اکسیداسیون بیومولکولی را آغاز کنند که منجر به آسیب و مرگ سلولی و استرس‌های اکسیداتیو می‌گردد. اثرهای منفی استرس اکسیداتیو ممکن است به‌وسیله ضداکسیدان‌ها کاهش یابد (Yangthong et al., 2009). در حال حاضر علاقه به مصرف ضداکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی و دارویی به‌عنوان جایگزین ضداکسیدان‌های مصنوعی همانند بوتیل هیدروکسی تولوئن^۱، بوتیل هیدروکسی آنیزول^۲ و ترت بوتیل هیدروکینون^۳ با توجه به نگرانی‌هایی که درباره امنیت غذایی وجود دارد، افزایش یافته است (Hossain et al., 2012). بنابراین شناسایی منابع جدید ضداکسیدانی سالم و ارزان با منشأ طبیعی از اهمیت بالایی برخوردار است. گیاهان منبع اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها در طبیعت هستند (Mendiola et al., 2008). مطالعات زیادی بر روی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که از گیاهان خشکی‌زی استخراج شده‌اند انجام شده و کاربردهای آنها نیز در سیستم‌های غذایی آزمایش شده است. علاوه بر این جلبک‌ها نیز به‌عنوان منابع غنی از ضداکسیدان‌های طبیعی مورد توجه واقع شده‌اند (Cho et al., 2011). ترکیبات فنولی همانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی و تانن‌ها به‌عنوان تشکیل‌دهنده عمده ظرفیت ضداکسیدانی در نظر گرفته شده‌اند. فنول‌ها گروه مهمی از ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و دیگر خواص زیستی هستند (2010 Onofrejova et al.). از تحقیقات مهم انجام شده روی تعیین خاصیت ضداکسیدانی عصاره‌های جلبکی در شرایط

¹- Butylated hydroxytoluene

²- Butylated hydroxyanisole

³- tert Butylhydroquinone

تهیه نمونه شاهد ۲۰۰ میکرولیتر حلال به جای نمونه استفاده شد و بقیه مراحل مشابه با روش ذکر شده برای نمونه‌ها بود. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدتانیک از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج براساس میلی‌گرم اسیدتانیک بر گرم پودر جلبکی خشک گزارش شد ($Y=0.0138x$, $R^2=0.9946$).

فعالیت ضد اکسیدانی کل

فعالیت ضد اکسیدانی کل (TAC) عصاره‌های جلبکی با روش (Prieto et al., 1999) اندازه‌گیری شد. ۰/۶ میلی‌لیتر نمونه با ۰/۶ میلی‌لیتر محلول معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، سولفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) در لوله‌های آزمایش درب‌دار مخلوط شدند. محلول حاصل در حمام آبی (دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها با اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید آسکوربیک در غلظت‌های ۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و قدرت ضد اکسیدانی کل بر حسب میلی‌گرم اسید اسکوربیک بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد ($Y=0.0032x$, $R^2=0.99$).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل - هیدرازیل (DPPH)^۲ طبق روش (Brand-William et al., 1995) انجام شد. دو میلی‌لیتر از عصاره به دو میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس با دور ۲۵۰۰ rpm (IKA, MS 3b, آمریکا) به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط در

خشک شدن، به آزمایشگاه فراوری دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شده و در یک دستگاه خردکن (Mulinex, La Molinett, فرانسه) به صورت پودر درآمدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسه‌های پلاستیکی درب‌دار و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری

پنج گرم نمونه پودر شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (نسبت نمونه به حلال ۱:۲۰) (حلال شامل: ۱۰۰ درصد آب خالص، استون ۵۰ درصد، متانول ۵۰ درصد و اتانول ۵۰ درصد) افزوده شد و با استفاده از روش غوطه‌وری در حلال، به مدت ۲۴ ساعت در یک انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm در دمای اتاق (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) استخراج گردید. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ فیلتر شدند و پس از سانتریفیوژ (Z206A- HERMLE، آلمان) با دور ۶۰۰۰ rpm در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شدند.

تعیین میزان فنول کل

میزان فنول کل^۱ (TPC) عصاره با استفاده از روش (Taga et al., 1984) اندازه‌گیری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴ میلی‌لیتر (۲ درصد) Na_2CO_3 مخلوط شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) باقی ماند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین - سیوکالتو ۵۰ درصد به آن اضافه شد و پس از مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی باقی ماند. جذب نمونه‌ها با اسپکتوفتومتر (Lambda PerkinElmer precisely، آمریکا) در طول موج ۷۲۰ نانومتر در برابر شاهد خوانده شد. برای

^۲ Total antioxidant capacity

^۳ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

^۱ Total phenol content

حسب میلی گرم اسیدتانیک بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد ($Y=0.0117x$, $R^2=0.9954$).

آنالیز داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با کمک آزمون فاکتوریل انجام شد. برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و برای بررسی همگنی از آزمون Leven استفاده شد. برای بررسی اثرهای معنادار بین گونه‌ها و اثرهای حلال‌های مختلف از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷)، آنالیز چند متغیره و مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن (در سطح ۵ درصد) استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excell (Microsoft office, 2010) استفاده شد.

نتایج

انتخاب غلظت مناسب حلال برای استخراج

نتایج نشان داد که غلظت ۵۰ درصد حلال‌های آلی در گونه *H. hamulosa* و غلظت ۵۰ درصد و ۷۰ درصد حلال‌های آلی در گونه *G. corticata*، بالاترین میزان فنول کل را دارا بود (شکل ۱)، در حالی که غلظت ۱۰۰ درصد آنها کمترین میزان را نشان داد. بنابراین با توجه به این که اختلاف معناداری بین غلظت ۵۰ درصد و ۷۰ درصد حلال‌های آلی در گونه *G. corticata* وجود نداشت و با در نظر گرفتن مصرف حلال کمتر و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی، غلظت ۵۰ درصد برای انجام آزمایش‌های ضد اکسیدانی بعدی استفاده شد ($p < 0.05$).

تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه و به صورت درصد^۱ RSA بیان شد.

$$\text{RSA درصد} = \frac{[1 - (\text{Asample} - \text{Asample blank}) / \text{Acontrol}] * 100}{\text{جذب نمونه و محلول DPPH پس از زمان مورد نظر}}$$

$$\text{جذب محلول DPPH بدون نمونه} = \text{Acontrol}$$

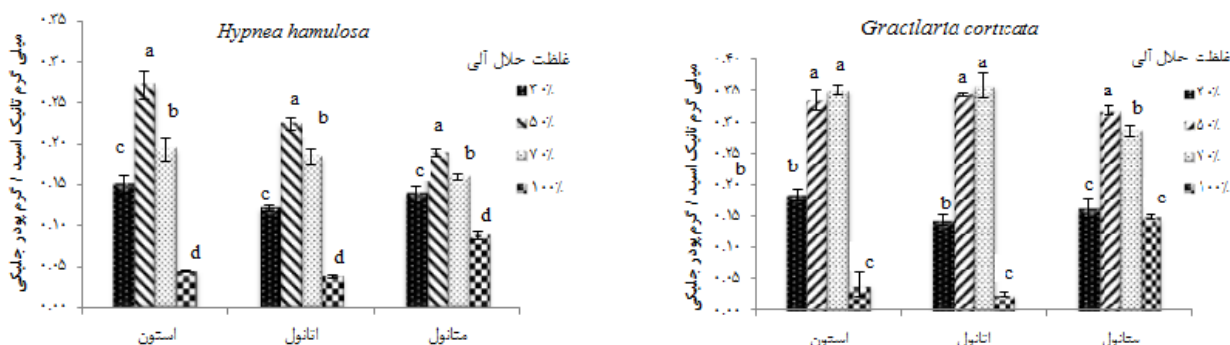
$$\text{جذب نمونه بدون محلول DPPH} = \text{Asample blank}$$

قدرت کاهندگی آهن

برای اندازه‌گیری قدرت کاهندگی آهن^۲ (FRAP) در عصاره‌های جلبکی، از روش Chew (et al., 2008) استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانات پتاسیم ۱ درصد با ۱ میلی‌لیتر از نمونه مخلوط شد. این محلول در حمام آبی با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس به این محلول ۲/۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. در ادامه، ۲/۵ میلی‌لیتر از آب و ۰/۵ میلی‌لیتر از کلرید آهن (FeCl₃) ۰/۱ درصد به ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط اضافه گردید. سپس این محلول در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده تا در آن ایجاد رنگ صورت پذیرد. جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدتانیک در غلظت‌های ۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و قدرت کاهندگی آهن بر

4. Radical scavenging activity

2. Ferric reducing antioxidant power



شکل ۱ انتخاب غلظت بهینه برای استخراج ترکیبات ضداکسیدانی از دو گونه جلبکی *G. corticata* و *H. hamulosa* براساس آزمایش میزان فنول کل. حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار بین تیمارها می‌باشد ($p < 0/05$).

آزمایش‌های ضداکسیدانی

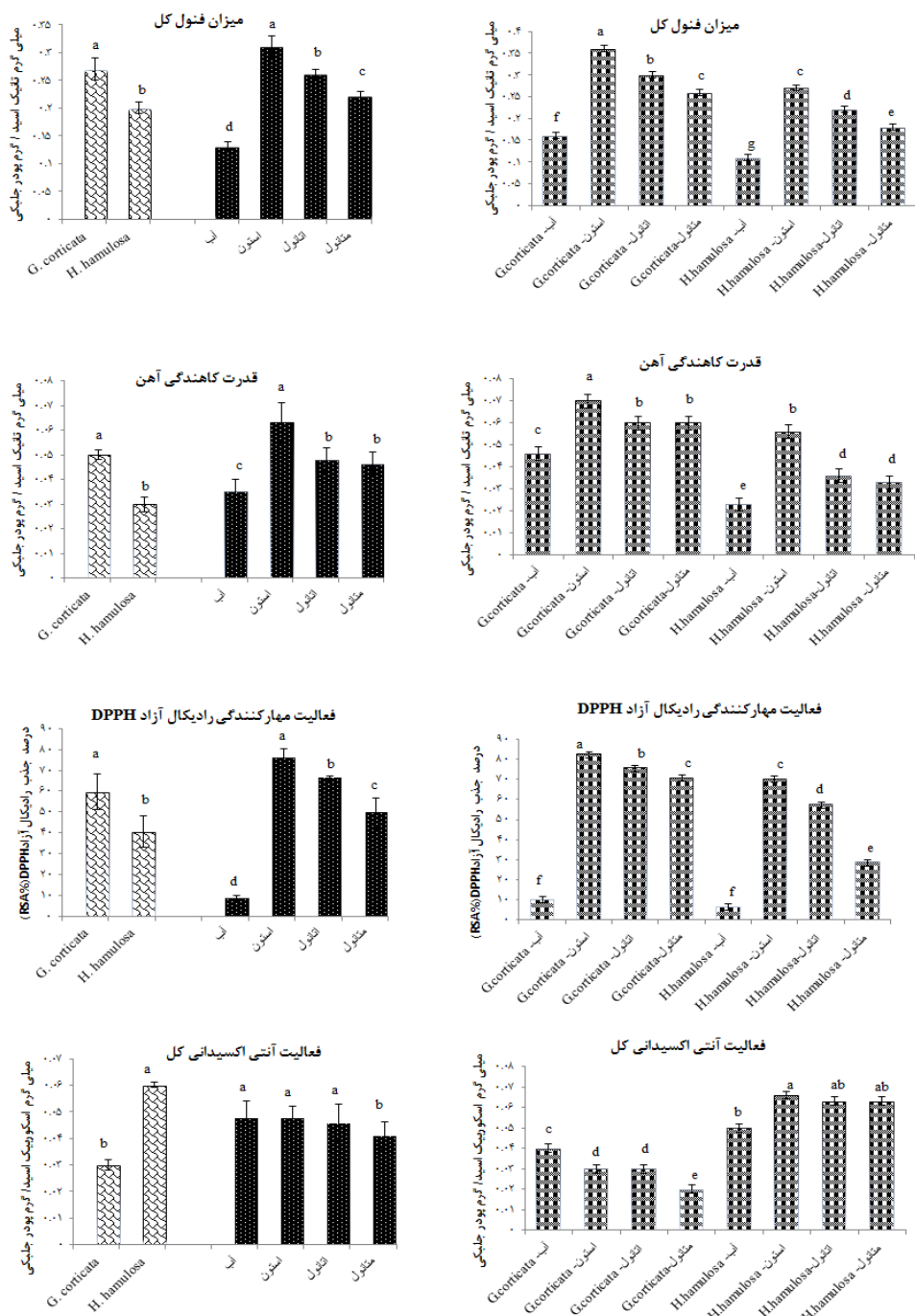
نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که میزان فنول کل در گونه *G. corticata* با میزان ۰/۲۷ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده به‌طور معناداری نسبت به گونه *H. hamulosa* با میزان ۰/۲۰ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیشتر بوده است ($p < 0/05$) (شکل ۱- a). در مقایسه بین حلال‌های مختلف استفاده شده برای استخراج ترکیبات ضداکسیدانی نیز عصاره استونی ۵۰ درصد، اتانولی ۵۰ درصد، متانولی ۵۰ درصد و آبی به‌ترتیب با میزان ۰/۳۱، ۰/۲۶، ۰/۲۲ و ۰/۱۳ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیشترین میزان فنول کل را استخراج کردند (شکل ۱- a). همچنین مقایسه اثر متقابل شاخص‌های نوع گونه و حلال به‌طور توأم نشان داد که عصاره استونی ۵۰ درصد گونه *G. corticata* با میزان ۰/۳۶ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیشترین میزان فنول کل را دارا بود (شکل ۱- b). درباره قدرت کاهندگی آهن، همان‌طور که در شکل ۲- a مشاهده می‌شود گونه *G. corticata* قدرت

کاهندگی آهن بالاتری نسبت به گونه *H. hamulosa* نشان داد ($p < 0/05$). همانند شاخص میزان فنول کل، عصاره استونی ۵۰ درصد در آزمایش قدرت کاهندگی آهن نیز بالاترین میزان (۰/۶۳ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده) را به خود اختصاص داد ($p < 0/05$). عصاره‌های اتانولی ۵۰ درصد، متانولی ۵۰ درصد و آبی در رده‌های بعدی قرار داشتند. هر چند که عصاره‌های اتانولی ۵۰ درصد و متانولی ۵۰ درصد با هم اختلاف معناداری نداشتند ($p > 0/05$). مقایسه اثر متقابل شاخص‌های نوع گونه و حلال نیز نشان داد که عصاره استونی ۵۰ درصد گونه *G. corticata* بالاترین میزان قدرت کاهندگی آهن (۰/۰۷ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده) را نسبت به سایر تیمارها دارا بود ($p < 0/05$) و حداقل قدرت کاهندگی آهن نیز در عصاره آبی گونه *H. hamulosa* (۰/۰۲۳ میلی گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده) مشاهده شد (شکل ۲- b). همچنین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله عصاره اتانولی ۵۰ درصد، متانولی ۵۰ درصد، استونی ۵۰ درصد و آبی دو گونه جلبک قرمز

مهارکنندگی نیز در عصاره آبی در هر دو گونه مشاهده شد (شکل ۳-۲ b).

درباره فعالیت ضد اکسیدانی کل نیز همان طور که در شکل ۴-۲ a مشاهده می‌گردد، گونه *H.hamulosa* با میزان ۰/۰۶ میلی گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده نسبت به گونه *G.corticata* بالاترین فعالیت ضد اکسیدانی کل را دارا بود. همچنین عصاره‌های استونی ۵۰ درصد، اتانولی ۵۰ درصد و آبی اختلاف معناداری در استخراج ترکیبات ضد اکسیدانی با یکدیگر نداشتند ($p > 0/05$). در بررسی اثر متقابل شاخص‌های نوع گونه و حلال بر خلاف سه فاکتور پیشین، عصاره استونی ۵۰ درصد گونه *H.hamulosa* بالاترین فعالیت ضد اکسیدانی کل را با میزان ۰/۰۶۶ میلی گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده نسبت به سایر تیمارها نشان داد. با این حال تفاوت معناداری در فعالیت ضد اکسیدانی عصاره‌های اتانولی ۵۰ درصد، متانولی ۵۰ درصد و استونی ۵۰ درصد جلبک *H.hamulosa* وجود نداشت ($p > 0/05$) (شکل ۴-۲ b).

H.hamulosa، *G.corticata* ارزیابی شد و نتایج در شکل (۳-۲ a و ۳-۲ b) به صورت درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (RSA درصد) بیان شد. نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH گونه *G.corticata* با میزان ۵۹/۶۳ درصد به طور معناداری ($p < 0/05$) نسبت به گونه *H.hamulosa* با فعالیت مهارکنندگی ۴۰/۵ درصد بیشتر بوده است (شکل ۳-۲ a). در مقایسه بین عصاره‌های حلالی مختلف نیز عصاره استونی ۵۰ درصد با فعالیت مهارکنندگی ۷۶/۱۱ درصد نسبت به دیگر عصاره‌ها عملکرد بهتری نشان داد. از نظر میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، عصاره‌های اتانولی ۵۰ درصد، متانولی ۵۰ درصد و آبی به ترتیب با میزان ۶۶/۳۱ درصد، ۴۹/۴۷ درصد و ۸/۳۸ درصد پس از عصاره استونی ۵۰ درصد قرار گرفتند (شکل ۳-۲ a). همچنین مقایسه اثر متقابل شاخص‌های نوع گونه و حلال به طور توأم نشان داد که عصاره استونی ۵۰ درصد گونه *G.corticata* بهترین کارایی را با فعالیت مهارکنندگی بالا (نزدیک به ۸۲/۲۴ درصد) نسبت به سایر تیمارها نشان داد و حداقل قدرت



شکل ۲ نمودارهای مقایسه‌ای اثر گونه (*G. corticata* و *H. hamulosa*) و حلال (متانول، اتانول، استون و آب) به‌طور جداگانه (a): میزان فنول کل (a-۱)، قدرت کاهش‌دهی آهن (a-۲)، فعالیت جذب رایکال آزاد (a-۳)، فعالیت ضداکسیدانی کل (a-۴). نمودارهای مقایسه‌ای اثر متقابل حلال و گونه به‌صورت توأم (b): میزان فنول کل (b-۱)، قدرت کاهش‌دهی آهن (b-۲)، فعالیت جذب رایکال آزاد (b-۳)، فعالیت ضداکسیدانی کل (b-۴).

حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار بین تیمارها می‌باشد ($p < 0.05$).

بحث

مغذی) و عوامل ذاتی (نوع، سن، مرحله تولید مثل) باشد (Pan et al., 2011). در مطالعه‌ای که Pan et al., (2003) بر استخراج پلی فنول‌ها و کافئین از برگ‌های چای سبز به کمک مایکروویو انجام دادند، استون توانست استخراج پلی فنول بیشتری را نسبت به متانول، آب و اتانول داشته باشد. بین فعالیت ضد اکسیدانی و قدرت کاهندگی نیز ارتباط مثبتی وجود دارد (Kumar et al., 2008). با توجه به شکل ۲-۲ a بیشترین قدرت کاهندگی آهن در عصاره استونی ۵۰ درصد مشاهده شد ($p < 0/05$). نتایج مشابهی در مطالعه (Ganesan et al., 2011) مشاهده شد. در مطالعه این محققان حداکثر و حداقل قدرت کاهندگی در *Entromorpha tubulosa* به ترتیب در عصاره استونی و آبی گزارش شد و در میان سه گونه آزمایش شده (*Entromorpha tubulosa*, *Entromorpha compressa*, *Entromorpha linza*) عصاره استونی *E. tubulosa* قدرت کاهندگی بهتری نسبت به دو گونه دیگر نشان داد ($p < 0/05$). آنها گزارش کردند که عمل ضد اکسیدانی کاهنده‌ها بر اساس شکست زنجیره رادیکال آزاد به وسیله اهدا یک اتم هیدروژن است. کاهنده‌ها با پیش‌سازهای خاصی از پراکسید واکنش می‌دهند و در نتیجه از تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند. ترکیبات جلبکی نیز ممکن است به شیوه مشابهی همانند کاهنده‌ها، از طریق اهدا الکترون و واکنش با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آنها به محصولات پایدار و پایان بخشیدن به واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد عمل کنند. در مطالعه‌ای که اثر حلال‌های مختلف بر فعالیت ضد اکسیدانی چند نوع جو بررسی شد، صرف نظر از واریته جو بالاترین قدرت کاهندگی به ترتیب در عصاره استونی ۸۰ درصد، متانولی ۸۰ درصد، اتانولی ۸۰ درصد و آبی مشاهده شد (Zhao et al., 2006).

فنول‌های گیاهی مهارکننده‌های رادیکال آزاد و ضد اکسیدان‌های مؤثری هستند و فعالیت ضد اکسیدانی میوه‌ها و چای به طور عمده از فنول‌ها و ترکیبات فنولی مشتق شده است. بنابراین ارتباط نزدیکی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت ضد اکسیدانی وجود دارد (Pan et al., 2008). همان‌طور که در شکل ۱-۲ a مشاهده می‌شود، استون مؤثرترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از جلبک‌های قرمز می‌باشد. معمولاً انتخاب حلال‌ها برای استخراج با توجه به هدفی که وجود دارد، طبیعت ترکیبات، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماده، قابل دسترس بودن مواد و تجهیزات انجام می‌شود (Rebey et al., 2011). محققان مختلفی استون را به عنوان حلال مؤثر برای استخراج ترکیبات فنولی گزارش کرده‌اند (et al., 2009; Wang et al., 2003; Turkmen et al., 2006). در استخراج ترکیبات فنولی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنول‌ها نقش بسیار مهمی دارند (Nazdk and Shahidi, 2006). به طور کلی ترکیبات فنولی در حلال‌های آلی قطبی نسبت به آب محلول‌ترند و حلال‌های استفاده شده برای استخراج هنگامی که با آب مخلوط شوند، تأثیر بیشتری خواهند داشت (Wang et al., 2009). به همین دلیل است که توصیه می‌شود مخلوط آب - حلال‌های آلی برای استخراج استفاده شوند. از طرفی مخلوط استون/آب برای استخراج پلی فنول‌ها از ماتریس‌های پروتئینی مؤثرتر است. زیرا استون دارای توانایی مهار کمپلکس پلی فنول- پروتئین تشکیل شده در طول استخراج یا حتی شکستن باندهای هیدروژنی تشکیل شده بین گروه‌های فنولی و گروه‌های کربوکسیل پروتئین می‌باشد (Suhaj, 2006). تفاوت در میزان فنول کل دو گونه جلبک قرمز ممکن است ناشی از عوامل خارجی (فشار، عمق، شوری، مواد

جلبک قرمز هنگامی که با استفاده از آب، اتانول و متانول استخراج می‌شوند، فعالیت مهارکنندگی ضعیفی دارند. در حالی که عصاره‌های استونی، کلروفرمی و اتیل استاتی چندین جلبک قرمز فعالیت مهارکنندگی قوی را از خود نشان داده‌اند. بنابراین حلال‌هایی که برای استخراج استفاده می‌شوند، تأثیر بسیار زیادی بر ترکیبات استخراج شده دارند (Cox et al., 2010). در مطالعه‌ای که بر روی عصاره‌های جلبکی ایسلند انجام شد نیز عصاره استونی ۷۰ درصد ترکیبات بیشتری با توانایی مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH نسبت به عصاره آبی استخراج کرد (Wang et al., 2009).

عصاره آبی اختلاف معناداری بر فعالیت ضداکسیدانی کل با عصاره‌های استونی ۵۰ درصد و اتانولی ۵۰ درصد ندارند ($p > 0.05$) (شکل ۴-۲ a). شاید یکی از دلایل ممکن این باشد که استفاده از آب به‌عنوان حلال در استخراج ترکیبات ضداکسیدانی، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پایین به میزان کمتری استخراج می‌شوند و علاوه بر این حضور ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول در عصاره آبی نیز باعث اختلال در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی می‌شوند. هر چند حضور ترکیبات فوق شاید دلیلی بر افزایش فعالیت ضداکسیدانی کل در آب خالص باشد (et al., 2007). در بررسی Cox و همکاران (2010) نیز تفاوت معناداری در فعالیت ضداکسیدانی عصاره‌های اتانولی، متانولی و استونی جلبک *P. palmata* وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد ترکیبات پلی‌فنولی جلبک‌ها به‌عنوان ضداکسیدان‌های طبیعی مؤثری برای

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان ابزاری برای تخمین مهار رادیکال آزاد توسط ضداکسیدان به‌کار برده می‌شود. در آزمایش DPPH ضداکسیدان قادر به کاهش رادیکال پایدار DPPH به دی فنیل پیکرازیل زرد رنگ می‌باشد. اثر ضداکسیدان بر مهار رادیکال DPPH مربوط به توانایی اهدای هیدروژن است (Zhang et al., 2011). همان‌طور که در شکل ۳-۲ a مشاهده می‌شود، حداقل فعالیت مهارکنندگی به عصاره آبی اختصاص دارد ($p < 0.05$). یکی از دلایل ممکن این است که افزودن بیشتر از حد معین حلال آلی/آب، بخشی از DPPH را منعقد کرده و آن را برای انجام واکنش با ضداکسیدان‌ها از دسترس خارج می‌کند و بدین ترتیب ظرفیت ضداکسیدانی را کاهش می‌دهد (Karadag et al., 2009). به‌طور کلی هنگامی که که میزان فنول کل نمونه‌ها زیاد بود درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH نیز افزایش معناداری داشت. این مهم می‌تواند به‌دلیل مقادیر بالای پلی‌فنول موجود در جلبک‌های دریایی باشد که قابلیت عملکرد به‌عنوان جاذب رادیکال آزاد را دارند (et al., 2008). پژوهشگران دیگری نیز همبستگی مثبت بین ترکیبات فنولی و قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد را بیان کرده‌اند (Souza et al., 2011, et al., 2011). فنول‌ها ضداکسیدان‌های مؤثری برای اسیدهای چرب چند غیراشباعی^۱ هستند. در واقع با دادن اتم هیدروژن به رادیکال‌های پروکسیل، آن را تبدیل به شکل آریلوکسیل^۲ می‌کنند که توانایی عملکرد به‌عنوان حامل زنجیره و جفت شدن با دیگر رادیکال‌ها را ندارد و در نتیجه سبب مهار واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد می‌گردد (siriwardhana et al., 2003). گزارش شده که عصاره‌های

¹ PUFA

² Aryloxy

compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. Separation and Purification Technology, 55(2): 217-225.

Chkhikvishvili, I. D. and Ramazanov, Z. M. 2000. Phenolic Substances of Brown Algae and Their Antioxidant Activity. Applied Biochemistry and Microbiology, 36(3): 289-291.

Cho, M. Lee, H. S. Kang, I. J. Won, M. H. and You, S. 2011. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. Food Chemistry, 127(3): 999-1006.

Cox, S. Abu-Ghannam, N. and Gupta, S. 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. International Food Research Journal, 17: 205-220.

Duan, X. J. Zhang, W. W. Li, X. M. and Wang, B. G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. Food chemistry, 95(1): 37-43.

El-Baky, A. El-Baz, H. H. and El-Baroty, F. K. 2009. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. International Journal of Food Science and Technology, 44(9): 1688-1695.

Ganesan, P. Kumar, C. S. and Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technology, 99(8): 2717-2723.

Ganesan, K. Kumar, K. S. and Rao, P. V. S. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12(1): 73-78.

Hossain, M. B. Brunton, N. P. Patras, A. Tiwari, B. O'Donnell, C. P. Martin-Diana, A. B. and Barry-Ryan, C. 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry, 19 (3): 582-590.

Karadag, A. B. Ozcelik, S. and Saner, S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. Food Analytical Methods, 2(1): 41-60.

Kuda, T. Tsunekawaa, M. Goto, H. and Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae

جلوگیری از فساد اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع و دفاع در برابر استرس اکسیداتیو عوامل اکسیدکننده و رادیکال‌های آزاد می‌باشند. همچنین آنها ظرفیت استفاده در صنایع غذایی و دارویی را دارند. در این مطالعه عصاره‌های گونه جلبک قرمز *G.corticata* دارای فعالیت ضد اکسیدانی بالاتری بود. این گونه دارای بالاترین میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بود. اما عصاره‌های گونه *H.hamulosa* دارای فعالیت ضد اکسیدانی کل بالاتری بودند که احتمالاً به دلیل شرکت دیگر ترکیبات (از جمله پلی‌ساکاریدها) علاوه بر ترکیبات فنولی بوده است. علاوه بر این نتایج ما نشان داد که استفاده از مخلوط آب - حلال‌های آلی در استخراج ترکیبات ضد اکسیدانی نسبت به سیستم حلالی تک جزیی کارآمدتر است. استفاده از حلال‌های مختلف نیز تأثیر معناداری در استخراج ترکیبات ضد اکسیدانی عصاره‌ها در هر دو گونه جلبکی نشان داد.

منابع

Brand-Williams, W. Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology, 28(1): 25-30.

Chandini, S. K. Ganesan, P. and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107(2): 707-713.

Chew, Y. L. Lim, Y. Y. Omar, M. and Khoo, K. S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT - Food Science and Technology, 41(6): 1067-1072.

Chirinos, R. Rogez, H. Campos, D. Pedreschi, R. and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic

- Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2): 337-341.
- Rebey, I. B. Bourgou, S. Debez, I. B. S. Karoui, I. J. Sellami, I. H. Msaada, K. Limam, F. and Marzouk, B. 2011.** Effects of Extraction Solvents and Provenances on Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum L.*) Seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7): 2827-2836.
- Siriwardhana, N. Lee, K. W. Jeon, Y. J. Kim, S. H. and Haw, J. W. 2003.** Antioxidant Activity of *Hizikia fusiformis* on Reactive Oxygen Species Scavenging and Lipid Peroxidation Inhibition. *Food Science and Technology International*, 9(5): 339-346.
- Souza, B. W. S. Cerqueira, M. A. Martins, J. T. Quintas, M. A. C. Ferreira, A. N. C. S. Teixeira, J. A. and Vicente, A. N. A. 2011.** Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10): 5589-5594.
- Suhaj, M. 2006.** Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6): 531-537.
- Taga, M. S. Miller, E. E. and Pratt, D. E. 1984.** Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 61(5): 928-931.
- Turkmen, N. Sari, F. and Velioglu, Y.S. 2006.** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4): 835-841.
- Wang, T. Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. 2009.** Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1): 240-248.
- Yangthong, M. N. Hutadilok-Towatana, T. and Phromkunthong, W. 2009.** Antioxidant Activities of Four Edible Seaweeds from the Southern Coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 64(3): 218-223.
- Zhao, H. Dong, J. Lu, J. Chen, J. Li, Y. Shan, L. Lin, Y. Fan, W. and Gu, G. 2006.** Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition Analytical*, 18(7): 625-633.
- Kumar, K. S. K. Ganesan, and Rao, P.V.S. 2008.** Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chemistry*, 107(1): 289-295.
- López, A. Rico, M. Rivero, A. and Suárez de Tangil, M. 2011.** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3): 1104-1109.
- Meenakshi, S. Umayaparvathi, S. Arumugam, M. and Balasubramanian, T. 2011.** In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1): 66-70.
- Mendiola, J.A. Rodríguez-Meizoso I. Señoráns F.J. Reglero G. Cifuentes, A. and Ibáñez, E. 2008.** Antioxidants in plant foods and microalgae extracted using compressed fluids. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistr*, 7: 3301-3309
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2006.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5): 1523-1542.
- Onofrejova, L. Vasickova, J.V. Klejdus, B. Stratil, P. Misurcova, L. Kracmar, S. Kopecky, J. and Vacek, J. 2010.** Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2): 464-470.
- Pan, X. Niu, G. and Liu, H. 2003.** Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(2): 129-133.
- Pan, Y. Wang, K. Huang, S. Wang, H. Mu, X. He, C. and Ji, X. 2008.** Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan Lour.*) peel. *Food Chemistry*, 106(3): 1264-1270.
- Prieto, P. Pineda, M. and Aguilar, M. 1999.** Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific

Prunella vulgaris L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12(1): 18-25.

(*Hordeum vulgare* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(19): 7277-7286.

Zhang, G. He, L. and Hu, M. 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from



Determination of Antioxidant activities of two red algae (*Hypnea hamulosa* and *Gracilaria corticata*) from Persian Gulf

Elham Garmsiri¹, Masoud Rezaei^{2*}, Parva Safari¹, Aria Babakhani²

1-Graduate Student, Dept. of Seafood Processing, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Nour

2-Professor, Dept. of Seafood processing, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Nour

3-Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of natural resources, Guilan University, Sowmeh Sara

Received:27.10.2015

Accepted: 25.02.2017

*Corresponding author: rezaei_ma@modares.ac.ir

Abstract:

Nowadays, replacement of the synthetic antioxidants with natural ones from such sources as seaweeds has been noticed in the food industry. In this study, the effect of water and three other organic solvents, including acetone, ethanol and methanol at concentration of 50%, on the total polyphenol content and antioxidant activity was assessed for two species of red algae, *Hypnea hamulosa* and *Gracilaria corticata*, of the Persian Gulf. Extraction was performed using conventional solvent extraction method and the ratio of 1:20 algae: solvent. The results indicated that acetone extracts had the highest values in the total phenol contents (0.31mg tannic acid/g algal powder), ferric reducing antioxidant power (0.06mg tannic acid/g algal powder), DPPH radical scavenging activity 76.11% ($p < 0.05$). Total antioxidant activity of this extract showed no significant difference with ethanolic and aqueous extracts ($p > 0.05$). Comparison of two algal species showed that in all factors, except total antioxidant activity, *G. corticata* had a higher antioxidant activity ($p < 0.05$). Therefore conclude that solvents with different polarities have a significant effect on total phenolic content and antioxidant activity.

Keywords: phenolic compounds, antioxidant activity, Persian Gulf, *Hypnea hamulosa*, *Gracilaria corticata*