مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۹ شماره ۳ صفحات ۱۶۹-۱۵۶

عصاره‌گیری از جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* و ارزیابی میزان ترکیبات فلوروتانین و خواص آنتی‌اکسیدانی آن

علیرضا هدهدی[۱]، آریا باباخانی[۱*]، هانیه رستم‌زاد[۱]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان ، ایران

چکـــیده

جلبک‌های قهوه‌ای منبعی ارزشمند از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی به ویژه فلوروتانین‌ها می‌باشند. در این مطالعه تأثیر غلظت حلال (آب/ اتانول) بر میزان ترکیبات فلوروتانین و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* مورد بررسی قرار گرفت. استخراج به روش غوطه‌وری در دمای اتاق (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) توسط حلال آبی/ اتانولی با سه نسبت (۳۰:۷۰)، (۵۰:۵۰) و (۷۰:۳۰) صورت گرفت. میزان فلوروتانین، محتوای فنول کل، فعالیت کاهندگی آهن، فعالیت خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بازده استخراج فلوروتانین وابسته به غلظت حلال بوده و با افزایش قطبیت حلال، میزان آن افزایش یافت؛ به طوری که میزان آن در تیمار آبی/ اتانولی ۳۰:۷۰ به طور معنی‌داری بیش‌تر از دو تیمار دیگر بود ($P<0.05$). همچنین بالاترین میزان جذب رادیکال آزاد DPPH در تیمارهای آب/ اتانول ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ که حاوی فلوروتانین کمتری بودند به دست آمد و با تیمار آب/ اتانول ۳۰:۷۰ دارای اختلاف معنی دار بود ($P<0.05$). در نهایت مشخص گردید که عصاره آب/ اتانول ۳۰:۷۰ جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* گزینه مناسبی برای استخراج ترکیبات فلوروتانین به عنوان یک ترکیب زیست‌فعال طبیعی جهت اهداف غذایی و دارویی می‌باشد.

کـــلید واژه ها: استخراج حلالی، جلبک قهوه‌ای، DPPH، ترکیبات فنولی، آنتی-اکسیدان طبیعی

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۰

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۳۹۹/۶/۳۰

***نویسنده مسول:**

babakhani@guilan.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های اخیر جلبک‌ها به عنوان منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال، بسیار مورد توجه بوده و پتانسیل استفاده در صنایع غذایی و دارویی را نشان داده‌اند [۱]. استفاده از جلبک‌های دریایی به عنوان منبع غذایی در کشورهای آسیایی از سابقه‌ی طولانی‌مدت برخوردار می‌باشد. همچنین در اکثر فرهنگ‌های غربی، اگر چه جلبک دریایی رژیم نسبتاً جدیدی بوده، اما مصرف آن به طور پیوسته در حال افزایش می‌باشد [۲]. جلبک‌های قهوه‌ای غنی از ترکیباتی مانند فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و سایر ترکیبات با فعالیت‌های زیستی مختلف هستند [۳]. در طی سال‌های اخیر، بینش‌های امیدوارکننده در مورد زیست‌فعال بودن عصاره‌ها و ترکیبات جدا شده از ماکروجلبک‌های دریایی باعث شده که توسعه محصولات مشتق شده از جلبک دریایی با پتانسیل و دیدگاه تجاری، افزایش یابد [۴]. ضمن اینکه امکان پرورش این جلبک‌ها به صورت پایدار نباید نادیده گرفته شود [۵]. اهمیت ترکیبات زیست‌فعال به عنوان عناصر کاربردی در ارتقاء سلامت و کاهش خطر بیماری به خوبی شناخته شده است. به خصوص، مواد مغذی حاصل از جلبک‌ها به عنوان منبع غنی از مؤلفه‌های سلامتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بین جلبک‌های دریایی، جلبک‌های قهوه‌ای، منبعی ارزشمند از ترکیبات طبیعی زیست‌فعال به ویژه فلوروتانین‌ها می‌باشند. جلبک‌های دریایی این ترکیبات زیست‌فعال را برای محافظت از خود در برابر عوامل خارجی مانند اشعه‌ی ماوراء بنفش، استرس و گیاهخواران تولید

می‌کنند [۶]. این ماکروجلبک‌ها، متابولیت‌های ثانویه مختلفی از قبیل پروتئین‌های عملکردی، ترکیبات فنولی، پپتیدها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و سایر ترکیبات ناشناخته را تولید می‌کنند [۷].ترکیبات فنولی یکی از مهم‌ترین گروه‌های شیمیایی می‌باشند که به طور گسترده در گونه‌های مختلف گیاهان وجود دارند [۸]. فلوروتانین‌ها جزو ترکیبات پلی‌فنولی بوده که توسط جلبک قهوه‌ای به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شوند؛ آن‌ها از طریق پلیمریزاسیون واحدهای مونومری فلوروگلوسینول (۱،۳،۵–تری هیدروکسی بنزن) و همچنین بیوسنتز از طریق مسیر استات–مالونات و مسیر پلی‌کتید تولید می‌شوند [۹]. این جلبک‌ها منبعی ارزشمند از فلوروتانین‌ها بوده که این ترکیبات بیشتر در قشر اپیدرمی آن‌ها متمرکز هستند، هرچند در دیواره سلولی ماکروجلبک‌های دریایی نیز یافت شده‌اند [۱۰]. تحقیقات مختلف نشان داده است که فلوروتانین‌ها دارای فعالیت‌های زیستی مختلف از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروس، ضدانگل، ضدسرطان، ضددیابت، ضدفشارخون، ضدپرولیفراتیو، ضدالتهاب و ضدآلرژی هستند [۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵]. آن‌ها همچنین دارای اثر مهارکنندگی آنزیمی مانند مهار α–گلوکزیداز و α–آمیلاز، مهار استیل کولین استراز و بوتیل‌کولین‌استراز، مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین–۱، مهار متالوپروتئینازها (MMPs)، مهار هیالورونیدازها و مهار تیروزیناز می‌باشند [۱۶]. منطقه‌ی خلیج فارس که در عرض‌های پایین جغرافیایی قرار گرفته است، دارای گونه‌های جلبکی متفاوت و متنوعی می‌باشد. یک گروه از این جلبک‌ها، خانواده سارگاسوم‌ها می‌باشند که یکی از مهم‌ترین خانواده‌های رده‌ی جلبکی Phaeophyceae بوده که در سطح جهانی پراکنده هستند و شامل بیش از ۴۰۰ گونه می‌باشند [۱۷]. جلبک‌های موجود در منابع دریایی جنوب ایران یکی از ظرفیت‌های زیستی ارزشمند کشور هستند که توجه چندانی به آن‌ها نشده است و برنامه‌ریزی اصولی و مدونی برای بهره‌برداری از این ذخائر دریایی وجود ندارد. این جلبک‌ها با پراکنشی که در سواحل ایران دارند می‌توانند به عنـوان گونه‌ای بالقوه جهت بررسی وجود ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گیرند [۱۸]. هدف از این مطالعه، بررسی شرایط استخراج و اثر غلظت‌های مختلف حلال در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله فلوروتانین‌ها از جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* و تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

اتانول، متانول، فلوروگلوسینول، اسیدآسکوربیک، اسیدتانیک، فسفات‌سدیم، سدیم‌کربنات، آمونیوم‌مولیبدات، اسیدسولفوریک، فولین–سیوکالتو، ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل–هیدرازیل، بافر فسفات‌پتاسیم، پتاسیم فری‌سیانات، تری کلرواستیک اسید، کلریدآهن، ۲ و ۴ دی‌متوکسی بنزالدهید از نمایندگی‌های مجاز تهیه شدند. مواد مصرفی از نمایندگی‌های مرک و دکترمجللی تهیه گردید.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه جلبک

نمونه‌های جلبک قهوه‌ای *S.angustifolium* به صورت تازه از سواحل بندر بوشهر، اسکلهٔ جلالی، منطقه ریشهر (۸ کیلومتری جنوب شهر بوشهر)، شناسایی و جمع‌آوری شدند و با آب تمیز دریا شستشو شدند تا اپی‌فیت‌ها، شن و ماسه‌هایی که به سطح آن چسبیده‌اند، جدا شوند. سپس نمونه‌ها با آب شیرین شستشو داده شدند تا ناخالصی‌هایی مانند نمک از بین روند. سپس نمونه‌های جلبک، با استفاده از دستگاه آون (شرکت تولیدی تجهیزات پزشکی بهداد، مدل BM55E، ساخت ایران) در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شد و به آزمایشگاه فرآوری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان منتقل شدند. در آزمایشگاه، جلبک‌ها توسط آسیاب الکتریکی (هاردستون، مدل GCS2700W، ساخت انگلستان) به پودر تبدیل گردیدند. سپس نمونه جلبک پودر شده در داخل کیسه‌ی پلاستیکی زیپ‌کیپ قرار داده شد و تا آزمایشات بعدی در دمای یخچال نگهداری گردید.

عصاره‌گیری از جلبک با روش حلالی

در این روش، ۲ گرم پودر جلبک خشک‌شده در ۵۰ میلی‌لیتر حلال استخراج شامل آب/اتانول با نسبت‌های ۳۰:۷۰، ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ قرار داده شد. سپس توسط دستگاه شیکر (پرزان پژوه، مدل ۳۰۰۸، ساخت ایران) به مدت ۶ ساعت با دور ۲۰۰ rpm در دمای اتاق هم‌زده شد. نمونه‌ها از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده‌شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس حلال مورد استفاده توسط دستگاه روتاری (Buchi، مدل R-100، ساخت سوییس) حذف گردید. در نهایت عصاره به‌دست آمده توسط دستگاه سانتریفیوژ

(شرکت صنعت پرداز دنا، مدل FD-5005-BT، ساخت ایران) لیفولیزه شد و تا زمان ارزیابی‌های بعدی در داخل یخچال نگهداری گردید. هر استخراج در سه بار تکرار انجام شد [۱۰].

ارزیابی میزان فلوروتانین

برآورد مقدار کل فلوروتانین‌ها با استفاده از روش مونترو و همکاران [۱۹] اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ابتدا محلول HCL، ۶٪ با استفاده از اسیداستیک تهیه شد و سپس محلول 2,4-dimethoxybenzaldehyde (DMBA)، ۲٪ با استفاده از حلال اسیداستیک تهیه شد. سپس دو محلول ساخته شده با هم مخلوط شدند. در نهایت ۵۰µL از عصاره استخراج شده (غلظت ۴۰mg/ml ماده خشک در حلال اتانول) با ۲۵۰µL از محلول ساخته شده مخلوط گردید و در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. پس از این مدت، میزان جذب در طول موج ۵۱۵ نانومتر به وسیله دستگاه الایزاریدر (Winooski، مدل VT 05404-0998، ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. از ۵۰µL آب بدون نمونه به عنوان نمونه بلنک و همچنین از نمونه استخراج شده بدون محلول DMBA به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. کلیه نمونه‌ها در سه بار تکرار صورت گرفت. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول فلوروگلوسینول در محدوده غلظت‌های ۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم فلوروگلوسینول بر گرم پودر جلبکی خشک بیان گردید. معادله منحنی استاندارد به صورت زیر می‌باشد:

$(Y=0.018x, R_2=0.991)$

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های جلبکی با استفاده از روش پریتو و همکاران [۲۰] اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۲ میلی‌لیتر از عصاره (غلظت ۴۰mg/ml ماده خشک در حلال اتانول) با ۲ میلی‌لیتر محلول معرف (۰/۶ مولار اسید سولفوریک، ۲۸ میلی‌مولار فسفات‌سدیم و ۴ میلی‌مولار آمونیوم مولیبدات) مخلوط شد و در لوله‌های شیشه‌ای دربدار قرار داده شد. محلول حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آبی (دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، میزان جذب نمونه‌ها در دستگاه الایزاریدر در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. نمونه کنترل نیز با استفاده از ۲ میلی‌لیتر اتانول و ۲ میلی‌لیتر محلول معرف تهیه گردید و جذب آن در طول موج ذکر شده خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از آسکوربیک‌اسید در محدوده غلظت‌های ۰-۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج بر اساس میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی خشک بیان شد. معادله منحنی استاندارد به صورت زیر می‌باشد:

$(Y=0.003x, R_2=0.99)$

میزان فنول کل (TPC)

میزان فنول کل عصاره‌های جلبکی با استفاده از روش تاگا و همکاران [۲۱] اندازه‌گیری شد. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه (غلظت ۴۰mg/ml ماده خشک در حلال اتانول) با ۲ میلی‌لیتر Na_2Co_3 ، ۲٪ مخلوط شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده‌شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالتو ۵۰٪ به آن اضافه و مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی باقی ماند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر اندازه‌گیری شد. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول تانیک اسید در محدوده غلظت‌های ۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج بر حسب تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک بیان گردید. معادله منحنی استاندارد به صورت زیر می‌باشد:

$(Y= 0.013x, R_2= 0.994)$

قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH)

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، با استفاده از روش براند-ویلیامز و همکاران [۲۲] اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۲ میلی‌لیتر از عصاره (غلظت ۴۰mg/ml ماده خشک در حلال اتانول) به ۲ میلی لیتر

از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده شد و به خوبی مخلوط شد و سپس ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد. میزان جذب نمونه‌ها در دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد (DPHH) عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه شد و نتایج به صورت درصد RSA (Radical Scavening Activity) بیان گردید.

$RSA\% = [1-(A_{sample} - A_{sample\ blank})/A_{control})]*100$

A_{sample}= جذب نمونه و DPPH بعد از زمان مورد نظر

$A_{control}$= جذب محلول DPPH بدون نمونه

$A_{sample\ blank}$ = جذب نمونه بدون محلول DPPH

قدرت احیاءکنندگی آهن (FRAP)

برای اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی آهن در عصاره‌های جلبکی، از روش چو و همکاران [۲۳] استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا ۰/۱ مولار بافر فسفات پتاسیم (pH= ۶/۶) و ۱٪ فری سیانات پتاسیم با ۱ میلی‌لیتر از نمونه (غلظت ۴۰mg/ml ماده خشک در حلال اتانول) مخلوط شد. این محلول در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس به این محلول ۲/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرو-استیک اضافه شد. در ادامه، ۲/۵ میلی‌لیتر از آب و ۰/۵ میلی‌لیتر از کلرید آهن ($FeCl_3$) ۰/۱ درصد به ۲/۵ میلی لیتر از مخلوط اضافه شد. سپس این محلول در دمای ثابتی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا در آن ایجاد رنگ صورت پذیرفت. سپس جذب نمونه‌ها در دستگاه الایزاریدر در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول تانیک اسید در محدوده غلظت‌های ۰-۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک بیان گردید. معادله منحنی استاندارد به صورت زیر می‌باشد:

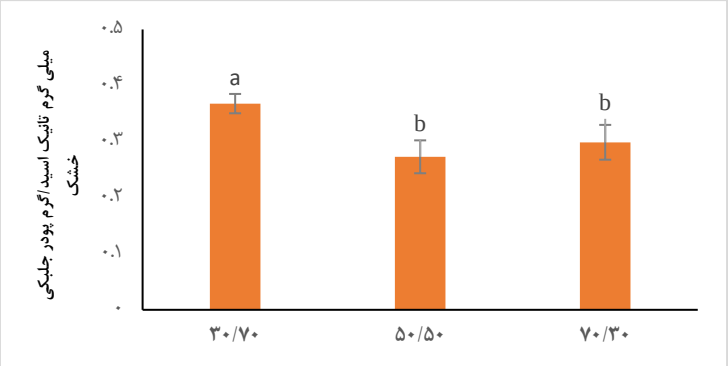
$(Y= 0.011x, R_2=0.995)$

آنالیز و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تحلیل به دست آمده بر اساس آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway ANOVA) و آزمون دانکن درسطح احتمال ($P<0.05$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و رسم نمودارها و شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excell (Microsoft office,2016) انجام شد.

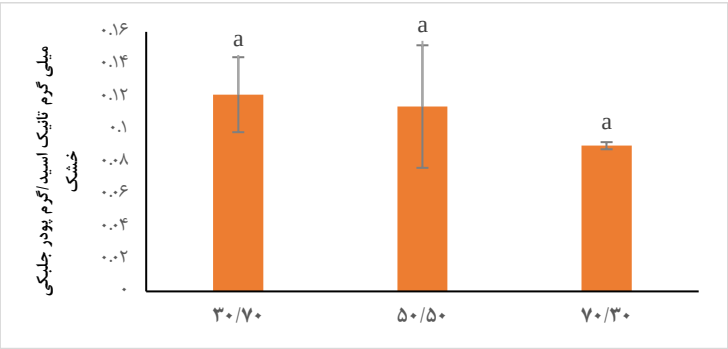
نتایج

داده‌های به‌دست آمده پس از سنجش نرمالیته ($P<0.05$) در تمامی پاسخ‌های سنجش شده شامل: میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، میزان جذب رادیکال آزاد DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فلوروتانین، با استفاده از روش آنالیز تجزیه واریانس یک‌طرفه مورد بررسی قرار گرفت. پس از آن، بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف حلال در استخراج، نشان داد که تمامی پاسخ‌های گرفته شده به غیر از فعالیت کاهندگی آهن تحت تأثیر نسبت‌های به کارگرفته شده بوده و این تأثیر معنی‌دار بوده است ($P<0.05$). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، میزان جذب رادیکال آزاد DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و میزان فلوروتانین در اشکال ۱ تا ۵ آورده شده است.

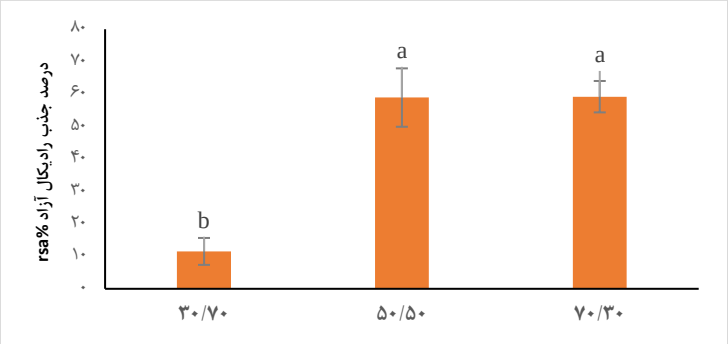


شکل ۱: مقایسه میزان فنول کل (TPC) عصاره آبی / اتانولی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* در سه غلظت مختلف.

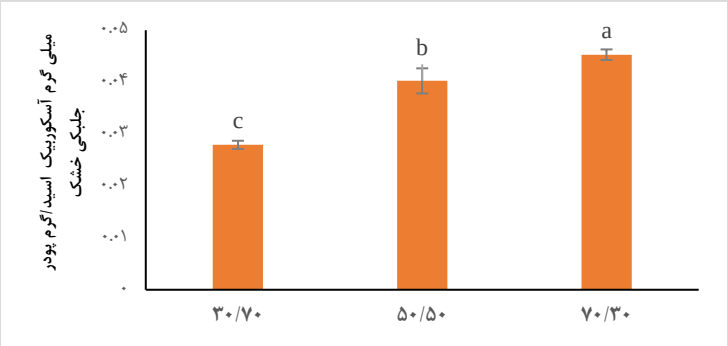
*حروف غیر هم‌نام نشان از اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد دارد.



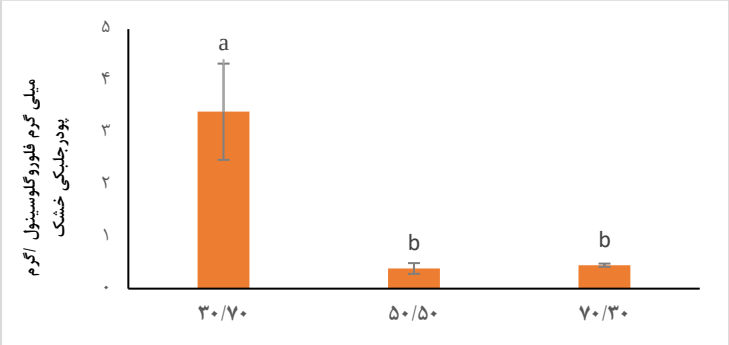
شکل ۲: مقایسه فعالیت کاهندگی آهن (FRAP) عصاره آبی/ اتانولی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* در سه غلظت مختلف.



شکل ۳: مقایسه فعالیت جذب رادیکال آزاد (DPPH) عصاره آبی/ اتانولی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* در سه غلظت مختلف.



شکل ۴: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) عصاره آبی/ اتانولی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* در سه غلظت مختلف.



شکل ۵: مقایسه میزان فلوروتانین (Phlorotannin) عصاره آبی/ اتانولی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* در سه غلظت مختلف.

در این مطالعه بیش‌ترین میزان فنول کل در ترکیب حلالی آب/ اتانول ۳۰:۷۰ به میزان ۰/۰۰۱±۰/۳۶۷ به دست آمد که با دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P<0.05$). در فعالیت کاهندگی آهن بین هیچ‌کدام از تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>0.05$). بیش‌ترین فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH در ترکیب حلالی آب/ اتانول ۷۰:۳۰ به میزان ۴/۸۳۸±۵۹/۲۱۶ به دست آمد که با ترکیب حلالی آب/ اتانول ۵۰:۵۰ اختلاف معنی‌دار نداشت ($P>0.05$)، اما با ترکیب حلالی آب/ اتانول ۳۰:۷۰ دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<0.05$). بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در ترکیب حلالی آب/ اتانول ۷۰:۳۰ به میزان ۰/۰۱۱±۰/۰۴۵ به دست آمد که با دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P<0.05$) و در نهایت بیش‌ترین میزان فلوروتانین در ترکیب حلالی آب/ اتانول ۳۰:۷۰ به میزان ۰/۰۰±۳/۴۰۸ به دست آمد که با دو تیمار دیگر به طور مشهودی دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<0.05$).

بحث

ترکیبات فنولی از جمله آنتی‌اکسیدان‌های بسیار مهم بوده که این امر به دلیل قابلیت آن‌ها در اهدای یک اتم هیدروژن یا الکترون برای تشکیل محصولات پایدار از رادیکال‌ها می‌باشد [۲۴]. فلوروتانین‌ها که جزو ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشند نیز به طور قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها نقش دارند [۱۶]. در مطالعه‌ی حاضر داده‌های حاصل از آنالیزها نشان داد که ترکیب حلالی آب/اتانول ۳۰:۷۰ بیش‌ترین کارایی را در استخراج ترکیبات فنولی داشته است. نتایج حاصل از مطالعه سفری و همکاران [۲۵] که بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی دو گونه جلبک دریایی *Chaetomorpha sp* و *Colpomenia sinuosa* انجام شد نشان داد که ترکیب حلالی آب/اتانول ۳۰:۷۰ کارایی بالاتری در استخراج ترکیبات فنولی داشت که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مشابه بود. این امر احتمالاً به دلیل قطبیت بالای ترکیبات فلوروتانین می‌باشد که قابلیت انحلال این ترکیبات را در محیط‌های قطبی فراهم می‌کند. ونگ و همکاران [۲۶]، ترکیبات فنول کل و فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH و فعالیت کاهندگی آهن عصاره‌ی جلبک‌های دریایی را در ایسلند بررسی کردند. نتایج نشان داد که بین ۱۰ گونه جلبک مورد بررسی، تفاوت‌های معنی‌داری بین TPC و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گونه‌های مختلف مشاهده شد. عصاره‌های استخراج شده با آب حاوی میزان فنول بیش‌تری بودند. همچنین اشاره شد که در این جلبک‌ها، فلوروتانین‌ها مهم‌ترین گروه‌های پلی‌فنولی بوده که عامل‌های اصلی جذب رادیکال هستند. همچنین در مطالعه‌ای که ژوو و همکاران [۲۷] بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه *Vigna radiata* انجام دادند، عصاره اتانولی با غلظت ۳۰ درصد بیش‌ترین میزان ترکیبات فنولی را به خود اختصاص داد که مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. نقدی و باباخانی [۲۸] مطالعه‌ای بر خواص آنتی‌اکسیدانی چهار گونه جلبک دریایی انجام دادند. در این مطالعه اقدام به استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با استفاده از سه حلال آب، آب/ اتانول ۵۰:۵۰ و اتانول شد که عصاره آب/ اتانول ۵۰:۵۰ جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* بیش‌ترین فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH را داشت ($P<0.05$) که با نتایج مطالعه حاضر همسو بود. در مطالعه‌ی حاضر، علی‌رقم بالا بودن میزان فنول کل و میزان فلوروتانین در عصاره آب/ اتانول ۳۰:۷۰، میزان فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های آب/ اتانول ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ بیش‌تر بود و اختلاف معنی‌داری با عصاره آب/ اتانول ۳۰:۷۰ داشت. کونان و همکاران [۲۹] گزارش کرده‌اند که عوامل مختلفی در میزان فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH دخالت دارند که از این عوامل می‌توان به نور و شوری اشاره کرد. در مطالعه‌ای که چاندینی و همکاران [۳۰] بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه جلبک دریایی قهوه‌ای منتخب در هندوستان انجام دادند به این نتیجه رسیدند که بالا بودن

میزان ترکیبات فنولی لزوماً فعالیت بالاتر در جذب رادیکال آزاد DPPH را ایجاب نمی‌کند. همچنین نتایج مطالعه نقدی و باباخانی [۲۸] نیز نشان داد که علاوه بر ترکیبات فنولی، احتمالاً ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیر قطبی دیگری نظیر فوکوزانتین در جلبک‌ها وجود دارند که باعث بروز فعالیت آنتی‌رادیکالی می‌شوند. مطالعه‌ای که طاهری و همکاران [۳۱] بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک دریایی *Colpomenia sinousa* انجام دادند نشان داد که بیش‌ترین قدرت کاهندگی آهن (FRAP) ۰/۰۱±۰/۰۶ میلی‌گرم تانیک اسید بر پودر جلبکی خشک بود؛ در حالی که در مطالعه حاضر بیش‌ترین قدرت کاهندگی آهن در تیمار آب/ اتانول ۳۰:۷۰ به میزان ۰/۰۲۳±۰/۱۲۱ میلی‌گرم تانیک اسید بر پودر جلبکی خشک بود. علت این امر می‌تواند تفاوت در نوع گونه‌های جلبکی مورد استفاده و ساختارهای آن‌ها باشد. در مطالعه‌ای که اوسولیوان و همکاران [۳۲] بر روی پنج گونه مختلف جلبک قهوه‌ای انجام دادند میزان فنول کل و خواص آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری وابسته به نوع گونه جلبکی بود. محتوای فنول کل حتی در گونه‌های مشابه نیز می‌تواند بسیار متفاوت باشد و وابسته به اقلیم، آب و هوا، میزان نور خورشید و جایگاهی که در ساحل دارند باشد؛ به عنوان مثال میزان فنول کل با افزایش دمای محیط در بعضی گونه‌ها افزایش پیدا می‌کند که این امر به دلیل مقابله با استرس وارد شده از طریق محیط می‌باشد [۳۳]. در مطالعه‌ای که چوو و همکاران [۲۳] روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه جلبک دریایی خوراکی از دو منطقه در جنوب شرقی آسیا انجام دادند، مشاهده شد که جلبک قهوه‌ای *Padina antillarum* نسبت به جلبک سبز *Caulerpa racemose* و جلبک قرمز *Kappaphycus alvarezii* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری می‌باشد. این نتیجه به احتمال زیاد به دلیل حضور ترکیبات فلوروتانین در جلبک قهوه‌ای می‌باشد. مطالعه‌ای که پتچیدورای و همکاران [۷] بر روی ۳۲ ماکروجلبک دریایی مختلف انجام دادند نیز نشان داد که فلوروتانین‌های محلول، در ۷۳٪ از جلبک‌های قهوه‌ای، ۵۸٪ از جلبک‌های سبز و ۳۳٪ از جلبک‌های قرمز وجود دارد. سیاهپوش و سوهانگیر [۳۴] مطالعه‌ای بر روی ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه موسیر انجام دادند که نتایج، خواص آنتی‌اکسیدانی کم‌تری را نسبت به مطالعه حاضر نشان داد. علت این امر را می‌توان به طور واضح، تفاوت گونه‌ها و نیز منشاء دریایی گیاه مورد استفاده در مطالعه حاضر دانست. فلوروتانین‌های موجود در جلبک‌های قهوه‌ای دارای حداکثر هشت حلقه می‌باشند که از داخل به هم مرتبط هستند؛ این ویژگی باعث می‌شود که این فلوروتانین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری (۱۰-۱۰۰ برابر) در مقایسه با پلی‌فنول‌هایی باشند که از گیاهان خشکی‌زی به‌دست می‌آیند و تنها دارای ۳ تا ۵ حلقه می‌باشند [۳۵]. لی و همکاران [۳۶] در تحقیقی شرایط بهینه‌ی استخراج فلوروتانین‌ها را از جلبک قهوه‌ای گونه *Sargassum fusiforme* با استفاده از حلال مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان فلوروتانین استخراج شده مربوط به تیمار آب/ اتانول ۳۰:۷۰ بود که با نتایج مطالعه حاضر همسو می‌باشد. هی و همکاران [۳۷] در تحقیقی شرایط بهینه استخراج فلوروتانین از جلبک قهوه‌ای گونه‌ی *Saccharina japonica* را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق، پارامترهای تأثیرگذار در استخراج، مانند غلظت اتانول، نسبت جامد به مایع، زمان استخراج و دمای استخراج ارزیابی شد. در نهایت حداکثر مقدار کل فلوروتانین معادل ۰/۶۴۴ میلی‌گرم از فلوروگلوسینول در هر گرم گیاه با وزن خشک بدست آمد که با استفاده از مدل بهینه‌سازی شده و حلال اتانولی ۵۵٪ بود. در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان فلوروتانین به دست آمده از عصاره‌های آب/ اتانول ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ به ترتیب ۰/۰۰۲±۰/۳۸۸ و ۰/۰۰۱±۰/۴۵۱ میلی‌گرم فلوروگلوسینول بر وزن خشک بود که مشابه و نزدیک مطالعه پیشین بود، اما حداکثر مقدار فلوروتانین در مطالعه حاضر، مربوط به عصاره آب/ اتانول ۳۰:۷۰ به میزان ۰/۰۰±۳/۴۰۸ میلی‌گرم فلوروگلوسینول بر وزن خشک بود که اختلاف معنی‌داری با دو تیمار دیگر و همچنین مطالعه پیشین دارد. علت این امر را می‌توان وابستگی قابل توجه ترکیبات فلوروتانین به غلظت حلال استخراجی دانست.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که بازده استخراج ترکیبات فلوروتانین وابسته به غلظت حلال بود و با افزایش قطبیت حلال، بازده استخراج نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت که دلیل آن قطبی بودن ترکیبات فلوروتانین می‌باشد. اما بالاترین میزان جذب رادیکال آزاد در تیمارهای آب/ اتانول ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ که حاوی فلوروتانین کمتری بودند به دست آمد. علت این امر احتمالاً به دلیل شرکت دیگر ترکیبات علاوه بر ترکیبات فنولی در جذب رادیکال آزاد می‌باشد که تمایل کمتری به حلال قطبی آب دارند. فلوروتانین‌های موجود در جلبک‌های قهوه‌ای دریایی دارای عناصر زیست‌فعال فراوانی بوده و می‌توانند نقش مهمی در سلامتی و تغذیه‌ی انسان ایفا نمایند. مطالعه‌ی پیش رو به عنوان یک بررسی اولیه

می‌تواند جهت استفاده از ترکیبات فلوروتانین به منظور غنی‌سازی محصولات غذایی و همچنین ساخت دارو مورد استفاده قرار گیرد. اما قطعاً این تحقیق کافی نبوده و نیاز این مهم به بررسی‌های بیشتر بر روی صنعتی‌سازی و پایدارنمودن ترکیبات استخراجی و آزمایشات تکمیلی جهت کاربردی نمودن آن را پیش روی دیگر محققان قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دکتر پروا سفری، دکتر مجید موسی‌پور، مهندس حسینعلی زمانی و مهندس رضا محسن‌پور که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند قدردانی می گردد.

تاییدیه‌های اخلاقی

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است

تعارض منافع

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است

سهم نویسندگان در مقاله

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است

منابع مالی/حمایت‌ها

این پژوهش با حمایت های مالی پایان نامه‌های دانشجویی دانشگاه گیلان صورت پذیرفته است.

منابع

1- Ibañez E, Cifuentes A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013 Mar 15;93(4):703-9.

2- Murray M, Dordevic AL, Ryan L, Bonham MP. An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: Marine algal polyphenols. Critical reviews in food science and nutrition. 2018 May 24;58(8):1342-58.

3- Liu X, Luo G, Wang L, Yuan W. Optimization of antioxidant extraction from edible brown algae Ascophyllum nodosum using response surface methodology. Food and bioproducts processing. 2019 Mar 1;114:205-15.

4- Barbosa M, Lopes G, Andrade PB, Valentão P. Bioprospecting of brown seaweeds for biotechnological applications: Phlorotannin actions in inflammation and allergy network. Trends in Food Science & Technology. 2019 Apr 1;86:153-71.

5- Wood D, Capuzzo E, Kirby D, Mooney-McAuley K, Kerrison P. UK macroalgae aquaculture: What are the key environmental and licensing considerations?. Marine policy. 2017 Sep 1;83:29-39.

6- Pinteus S, Silva J, Alves C, Horta A, Thomas OP, Pedrosa R. Antioxidant and cytoprotective activities of Fucus spiralis seaweed on a human cell in vitro model. International journal of molecular sciences. 2017 Feb;18(2):292.

7- Petchidurai G, Nagoth JA, John MS, Sahayaraj K, Murugesan N, Pucciarelli S. Standardization and quantification of total tannins, condensed tannin and soluble phlorotannins extracted from thirty-two drifted coastal macroalgae using high performance liquid chromatography. Bioresource Technology Reports. 2019 Sep 1;7:100273.

8- Safari P, Rezaei M, Shaviklo AR. The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian gulf green algae (Chaetomorpha sp.) using response surface methodology. Journal of Food Science and Technology. 2015 May 1;52(5):2974-81.

10- Meslet-Cladière L, Delage L, Leroux CJ, Goulitquer S, Leblanc C, Creis E, Gall EA, Stiger-Pouvreau V, Czjzek M, Potin P. Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga Ectocarpus siliculosus reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. The Plant Cell. 2013 Aug 1;25(8):3089-103.

11- Lopes G, Pinto E, Andrade PB, Valentao P. Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on Candida albicans virulence factor. PLoS One. 2013 Aug 12;8(8):e72203.
12- Kwon HJ, Ryu YB, Kim YM, Song N, Kim CY, Rho MC, Jeong JH, Cho KO, Lee WS, Park SJ. In vitro antiviral activity of phlorotannins isolated from Ecklonia cava against porcine epidemic diarrhea coronavirus infection and hemagglutination. Bioorganic & medicinal chemistry. 2013 Aug 1;21(15):4706-13.
13- Haavisto F, Koivikko R, Jormalainen V. Defensive role of macroalgal phlorotannins: benefits and trade-offs under natural herbivory. Marine Ecology Progress Series. 2017 Feb 27;566:79-90.
14- Imbs TI, Zvyagintseva TN. Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae. Russian Journal of Marine Biology. 2018 Jul 1;44(4):263-73.
15- Lee SH, Jeon YJ. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. Fitoterapia. 2013 Apr 1;86:129-36.
16- McFarlane SI, Kumar A, Sowers JR. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. The American journal of cardiology. 2003 Jun 19;91(12):30-7.
17- Babakhani LA, Rezaei M, Rezaei K, SEYFABADI SJ. Optimization of Extraction of Antioxidant Compounds in Microwave-Assisted Extracts of Brown Algae Sargassum Angustifolium. Iranian Journal of Natural Resources. 2012;65:243-255, (in Persian).
18- Ziaadini M, Baskaleh GH, Zahedi M. Optimization of extraction of total phenolic compounds of two types of seaweed Ulva sp. and lettuce Sargassum sp. in Chabahar coastal waters by ultrasonic method. Journal of Oceanography. 2018;38:1-10, (in Persian).
19- Montero L, Herrero M, Ibáñez E, Cifuentes A. Separation and characterization of phlorotannins from brown algae Cystoseira abies-marina by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Electrophoresis. 2014 Jun;35(11):1644-51.
20- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry. 1999 May 1;269(2):337-41.
21- Taga MS, Miller EE, Pratt DE. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1984 May 1;61(5):928-31.
22- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995 Jan 1;28(1):25-30.
23- Chew YL, Lim YY, Omar M, Khoo KS. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT-Food Science and Technology. 2008 Jul 1;41(6):1067-72.
24- Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Oveisi MR, Nafissi-Varcheh N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. Journal of Applied Phycology. 2010 Feb 1;22(1):43-50.
25- Safari P, Rezaei M, sheviklo AR, Garmsiri E, Babakhani LA. In vitro antioxidative activity and total phenolic content determination of two Persian Gulf seaweed species Chaetomorpha sp and Colpomenia sinuosa. Journal of Marine Science and Technology. 2015;14(1):64-77, (in Persian).
26- Wang T, Jonsdottir R, Ólafsdóttir G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food chemistry. 2009 Sep 1;116(1):240-8.
27- Zhou Y, Zheng J, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidants from the mung bean coat. Molecules. 2017 Apr;22(4):638.
28- Naghdi SH, Babakhani LA. Ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from four Persian Gulf seaweed. Journal of Aquaculture Sciences. 2018;9:29-38, (in Persian).
29- Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Gall EA. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. Botanica marina. 2004 Nov 1;47(5):410-6.
30- Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food chemistry. 2008 Mar 15;107(2):707-13.
31- Taheri A, Moradi S. Antioxidative Properties of Colpomenia sinuosa Organic Extract. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2018;20(160);151-155, (in Persian).

32- O'sullivan AM, O'callaghan YC, O'grady MN, Queguineur B, Hanniffy D, Troy DJ, Kerry JP, O'brien NM. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. Food Chemistry. 2011 Jun 1;126(3):1064-70.
33- Naczk M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2006 Aug 28;41(5):1523-42.
34- Siahpoosh A, Sohangir S. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of Moosir (allium hirtifolium boiss) Bulbs. Journal of Jundishapur Science Medical. 2013;11(6):625-634, (in Persian).
35- Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. Trends in Food Science & Technology. 2012 Feb 1;23(2):83-96.
36- Li Y, Fu X, Duan D, Liu X, Xu J, Gao X. Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, Sargassum fusiforme (Harvey) Setchell. Marine drugs. 2017 Feb;15(2):49.
37- He Z, Chen Y, Chen Y, Liu H, Yuan G, Fan Y, Chen K. Optimization of the microwave-assisted extraction of phlorotannins from Saccharina japonica Aresch and evaluation of the inhibitory effects of phlorotannin-containing extracts on HepG2 cancer cells. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 2013 Sep 1;31(5):1045-54.

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 9, Issue 3, Summer 2020
Pages: 156-169

Extraction of brown alga *Sargassum angustifolium* and evaluation of its phlorotannin compounds and antioxidant properties

Alireza Hodhodi[1], Aria Babakhani[1*], Haniyeh Rostamzad[1]

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran

A B S T R A C T

Brown algae are a valuable source of natural antioxidant compounds, especially Phlorotannins. In this study, the effect of solvent concentration (water / ethanol) on the the amount of Phlorotannin compounds and antioxidant properties of extracts from brown alga *Sargassum angustifolium* were investigated. The extraction was performed by solvent method at room temperature (28-26 °C) with ethanol/ water solvent with three ratios (30:70), (50:50) and (70:30). The amount of Phlorotannin, total phenolic content, ferric reducing antioxidant power, DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity of different extracts were evaluated. The results showed that the yield of Phlorotannin extraction was dependent on the solvent concentration and with increasing polarity of the solvent, its amount increased, So its amount in ethanol/ water treatment (30:70) is significantly more than the other two treatments ($P<0.05$). Also, the highest amount of DPPH radical scavenging activity was obtained in ethanol/ water treatments 50:50 and 70:30 which contained less Phlorotannin. Finally, it was found that the ethanol/ water treatment 30:70 of the brown alga *Sargassum angustifolium* was a good choice for extracting Phlorotannin compounds as a natural bioactive compound for food and medicine purposes.

ARTICLE TYPE
Original Research

ARTICLE HISTORY
Received: 21 June 2020
Accepted: 31 August 2020
ePublished: 20 September 2020

KEYWORDS
Solvent extraction, Brown algae, DPPH, Phenolic compounds, Natural antioxidant

* Corresponding Author:
Email address: babakhani@guilan.ac.ir
Tel: +98 9113348019
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513