

ارزیابی رابطه وزن مولکولی و ویژگی های ضد اکسایشی و مهار کنندگی فعالیت آلفا آمیلازی فوکوئیدان و آلزینات جلبک قهوه ای *Padina pavonica* در مقایسه با پلی ساکاریدهای خاکشیر و رازیانه

سعید خواجهی^۱، مهدی طبرسا^{۱*}، حسن احمدی گاولیقی^۲، مسعود رضائی^۱

۱- گروه فرآوری آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۳۹۹/۱۲/۲۰

* نویسنده مسؤل:

m.tabarsa@modares.ac.ir

پلی ساکاریدها به دلیل پیچیدگی ساختار شیمیایی و ناهمگنی وزن مولکولی دارای ویژگی های زیستی متنوع بوده که می تواند از طریق روش های مهندسی و اعمال اصلاحات ساختاری بهبود یابند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی ویژگی های ضد اکسایشی و ضد دیابتی پلی ساکاریدهای با منشأ دریایی و خشکی و بررسی رابطه وزن مولکولی با فعالیت زیستی می باشد. لذا، چهار پلی ساکارید با پراکندگی و میانگین متفاوت وزن مولکولی شامل فوکوئیدان و آلزینات جلبک قهوه ای پادینا (*Padina pavonica*) و پلی ساکاریدهای دانه خاکشیر (*Descurainia sophia*) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*) در سه سطح در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه توسط ۰/۰۵ نرمال اسید هیدروکلریک تحت هیدرولیز قرار گرفتند. میانگین وزن مولکولی در فوکوئیدان ۳۷۸۱/۸-۲۰۵۹/۵، آلزینات ۱۷۷۴/۴-۲۳۲۴/۹، پلی ساکارید خاکشیر ۷۲۰/۴-۱۳۷۳/۸ و پلی ساکارید رازیانه ۵۷۵۲/۶-۱۴۰۷۷/۵ × ۱۰^۳ گرم/مول بود. ارتباط کاهش وزن مولکولی با بازدارندگی فعالیت آنزیم α-آمیلاز در فوکوئیدان (۵۲/۱-۳۲/۸ درصد) و آلزینات (۶۷/۶-۳۲/۲ درصد) کاهش و در رازیانه (۶۱/۲-۴۵/۰ درصد) افزایشی بود. کاهش وزن مولکولی سبب افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن در فوکوئیدان (۴۷/۹-۲۷/۸ درصد؛ جذب ۰/۴۷-۰/۳۷) و رازیانه (۳۹/۰-۱۲/۷؛ جذب ۰/۳۴-۰/۱۶) شد. تاثیر کاهش وزن مولکولی در ویژگی های ضد اکسایشی آلزینات و خاکشیر بسیار محدود بود. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که وزن مولکولی عاملی تعیین کننده در بروز فعالیت زیستی پلی ساکاریدهای مورد مطالعه است و کاربرد آنها به عنوان ترکیبات واجد فعالیت ضد دیابتی و ضد اکسایشی می تواند در اشکال طبیعی و یا هیدرولیزات آنها صورت پذیرد.

کلید واژه ها: فوکوئیدان، آلزینات، ضد دیابتی، ضد اکسایشی

مقدمه

پلی ساکاریدها، پلیمرهایی از قندهای ساده هستند که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده و می توانند از نظر ساختار شیمیایی و مولکولی بسیار پیچیده باشند. این تنوع ساختاری سبب شده است که پلی ساکاریدها دارای خواص زیست فعالی و عملکردی متنوعی باشند و در نتیجه در صنایع مختلف غذایی، آرایشی-بهداشتی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند. از طرف دیگر، پلی ساکاریدها به عنوان بخشی از هیدروکلوئیدها کاربردهای گسترده ای در صنایع غذایی دارند. از نقطه نظر تکنولوژیکی، ظرفیت نگهداری آب بسیار بالا به آنها اجازه می دهد که به عنوان بافت دهنده، تثبیت کننده، امولسیفایر، کاهنده چربی، تشکیل دهنده فیلم، پایدار کننده، افزایش دهنده زمان ماندگاری و تغییر دهنده ویسکوزیته عمل نمایند [1]. از خواص زیستی پلی ساکاریدها میتوان به فعالیت ضد اکسایشی، ضد سرطانی، ضد ویروسی، تقویت سیستم ایمنی، ضد دیابتی، فعالیت هایپوگلیسمی، ضد التهاب، ضد میکروب، ضد HIV، ضد انعقاد اشاره نمود [2]. خواص بالای این ترکیبات باعث شده که به عنوان یک افزودنی

جهت به کار گرفته شدن در داروها و غذاهای عملکردی مطرح بوده و تحقیقات زیادی بر روی کشف پلی ساکاریدهای جدید با خواص زیستی جدید یا قوی تر صورت گیرد. فعالیت زیستی پلی ساکاریدها به طور مستقیم یا غیر مستقیم تحت تاثیر ساختار شیمیایی آن ها قرار دارد [3,4]. حلالیت در آب، وزن مولکولی، ترکیب مونوساکارید، پیوند گلیکوزید زنجیره اصلی و درجه جانشینی، نوع و درجه انشعاب و موقعیت ساختاری زنجیره اصلی بر روی فعالیت زیستی پلی ساکاریدها تاثیر گذار هستند [4,5]. به همین دلیل تحقیقات زیادی بر روی اصلاح ساختار جهت بهبود فعالیت زیستی پلی ساکاریدها صورت میگیرد که این تحقیقات به درک بهتری از رابطه بین ساختار و فعالیت زیستی نیز کمک می نماید. جهت اصلاح ساختار پلی ساکاریدها روش های فیزیکی و شیمیایی مختلفی پیشنهاد شده است [6]. روش های شیمیایی برای اصلاح ساختار پلی ساکارید شامل افزودن گروه های سولفات، فسفور، استیل، کربوکسی متیل، سلنیوم، سولفونیک اسید استر، کربوکسیلیک اسید استر و هیدرولیز اسیدی می باشد [5,6]. در این میان، پلی ساکاریدهای استخراج شده از جلبک های دریایی از اهمیت ویژه ای به دلیل پیچیدگی های ساختاری فراوان و لذا تنوع در بروز ویژگی های زیستی برخوردار هستند. فوکوئیدان نوعی پلی ساکارید سولفات با پایه فوکوز است که در جلبک های قهوه ای به فراوانی یافت می شود و نتایج پژوهش های صورت گرفته نشان دهنده خواص زیست فعالی بیشتر پلیمرهای فوکوئیدان با وزن مولکولی کمتر می باشد [4,7]. در گیاهان خشکی نیز پلی ساکاریدها یکی از فراوان ترین ترکیبات زیست فعال موجود در اندام های مختلف گیاه می باشند. پلی ساکاریدهای گیاهان خشکی از نظر ساختار شیمیایی و دامنه وزن مولکولی نسبت به پلی ساکاریدهای دریایی ساده تر و همگن تر می باشند. لذا در مطالعه حاضر، بمنظور فهم بهتر رابطه بین وزن مولکولی پلی ساکاریدها و ویژگی های زیست فعالی آنها از چهار نوع پلی ساکارید با منشأ دریایی و خشکی که واجد پراکندگی متفاوت وزن مولکولی می باشند استفاده شد و قابلیت آنها به عنوان ترکیبات ضد دیابت و ضد اکسایشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

نمونه های ماکرو جلبک پادینا (*Padina pavonica*) به میزان لازم برای انجام آزمایشات، از سواحل دریای عمان در منطقه چابهار در دی ماه ۱۳۹۵ جمع آوری شد و سپس با آب دریا شستشو داده شد تا باقی مانده شن، ماسه و ناخالصی های دیگر از جلبک ها حذف شود. گونه های گیاهی گونه ای رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و خاکشیر (*Descurainia sophia*) نیز از بازار محلی در شهرستان نور خریداری شد. سپس نمونه ها با آب شیرین شستشو داده و پس از آبکشی در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز قرار گرفت تا خشک شود [8]. نمونه های خشک شده به وسیله یک دستگاه آسیاب پودر شده و سپس به وسیله ترازوی دیجیتال توزین و تا زمان انجام آزمایش و استخراج پلی ساکاریدها از آن در کیسه های زیپ کیپ پلاستیکی و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج فوکوئیدان جلبکی و پلی ساکاریدهای گیاهی

ابتدا ۵۰ گرم نمونه آسیاب شده به منظور حذف رنگدانه ها، متابولیت های ثانویه و چربی در اتانول ۸۵٪ و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. فاز جامد با استفاده از سانتریفوژ (۸۰۰ rpm، ۱۰ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه) از فاز مایع جدا گردیده و این مرحله تا زمان بی رنگ شدن اتانول اضافی تکرار شد. در انتها نیز فاز جامد به منظور خشک شدن در چندین نوبت با اتانول و استون شستشو شد. در این مرحله ۲۰ گرم از نمونه در آب مقطر قرار داده تا فرآیند استخراج در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت صورت پذیرفت. پس از جدا سازی فاز مایع به وسیله سانتریفوژ (۸۰۰ rpm، ۱۰ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه) محلول رومان در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در دستگاه تبخیر کننده چرخشی تغلیظ شد. به منظور حذف اسید آلزینیک از عصاره جلبکی، از کلسیم کلرید ۱٪ استفاده و آلزینات کلسیم رسوبی توسط سانتریفوژ جدا شد. در انتها نیز جهت رسوب پلی ساکاریدهای مختلف از اتانول ۹۶٪ تا رسیدن به غلظت نهایی ۷۰٪ استفاده شد. پلی ساکارید رسوب کرده با استفاده از سانتریفوژ جداسازی و سپس به ترتیب با اتانول و استون شستشو داده شد تا رطوبت حذف گردد [7,9].

استخراج آلزینات سدیم

بمنظور جداسازی آلژینات از پسماند استخراج فوکوئیدان، فاز جامد جمع‌آوری شده با کربنات سدیم ۳٪ در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت تحت استخراج قرار گرفت. فاز مایع توسط سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm، ۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری و توسط تبخیرکننده چرخشی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. جهت بازیابی آلژینات سدیم از اتانول ۹۶٪ تا رسیدن به غلظت ۷۰٪ بکار گرفته و آلژینات سدیم به دست آمده با استفاده از سانتریفیوژ جداسازی و سپس به ترتیب با اتانول و استون شستشو داده شد [10].

آماده‌سازی هیدرولیزات پلی ساکاریدی

جهت تولید پلی ساکاریدهای با وزن‌های مولکولی متفاوت، در ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از پلی ساکارید خام در ۱ میلی‌گرم از ۰/۰۵ نرمال اسید هیدروکلریک حل شد و سپس هیدرولیز در آب جوش به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه انجام شد. واکنش‌دهنده‌ها بلافاصله خنک و با ۱ میلی‌لیتر از سود ۰/۰۵ نرمال خنثی شدند. سپس، هیدرولیزات به دست آمده در کیسه دیالیز با محدوده جداسازی ۱۰۰-۵۰۰ دالتون (#3247027, Spectrum Laboratories, Compton, CA, USA) با آب مقطر به مدت ۳ روز دیالیز و در نهایت لیوفیلیزه شد.

تعیین ویژگی‌های مولکولی

به طور خلاصه، غلظت ۲ میلی‌گرم/ میلی لیتر پلی ساکارید در آب مقطر حل شد و به مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو قرار گرفت تا حداکثر میزان حلالیت حاصل شود [9]. نمونه‌ها بلافاصله از طریق یک غشای سلولزی فیلتر و به دستگاه تزریق شد. سیستم تفرق نور لیزر ایستا چند زاویه‌ای (MALLS)، سیستم آشکار کننده ضریب شکست (RI) و ستون کروماتوگرافی (300 × BioSep-SEC-s2000 BioSep, ۷/۸ mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) برای تجزیه و تحلیل ویژگی‌های مولکولی استفاده شد. همچنین از یک محلول آبی متشکل از ۵/۳ASTRA و ۰/۱۵ مولار NaNO_3 و ۰/۰۲ درصد NaN_3 به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۰/۴ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. نرم افزار ۵/۳ASTRA برای محاسبه میانگین وزنی وزن مولکولی، میانگین عددی جرم مولکولی، شعاع چرخش، توزیع چندگانه بکارگرفته شد. حجم مخصوص چرخش با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$SV_g = 4/3 \times (R_g \times 10^8)^3 / (M_w/N) = 2/522 R_g^3 / M_w$$

که در آن N عدد آواگادرو و واحدهای SV_g ، M_w و R_g به ترتیب سانتیمتر مکعب/ گرم، گرم/ مول و نانومتر می‌باشد.

سنجش فعالیت بازدارندگی نسبت به آنزیم α -آمیلاز

بررسی فعالیت بازدارندگی پلی ساکاریدها نسبت به آنزیم α -آمیلاز بر اساس روش Apostolidis و همکاران [9] با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا محلول PAHBAH تهیه و ۵ گرم از پودر PAHBAH در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۵ مولار حل شد. برای تهیه محلول بیسموت نیز ۱/۴۱ گرم پتاسیم تارتارات با ۰/۶ گرم پودر سود و ۲/۴۲ گرم پودر بیسموت پتاهیدرات مخلوط و در ۵ میلی‌لیتر آب حل شد. به منظور تهیه محلول رنگی نیز ۵۰ میکرولیتر از محلول بیسموت با ۵ میلی‌لیتر محلول PAHBAH با ۴۴/۹۵ میلی‌لیتر سود ۰/۵ مولار مخلوط شد. به منظور انجام آزمایش، مقدار ۸۰ میکروگرم از نمونه پلی ساکاریدی به ۲۰ میکرولیتر از بافر فسفات (۰/۰۲ مول برلیتر که حاوی ۰/۰۰۷ مول برلیتر NaCl و pH=۶/۸) اضافه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم α -آمیلاز پانکراس خوک (فعالیت ۰/۵ واحد بر میلی‌لیتر) به مخلوط واکنش اضافه گردید. مخلوط واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس، در حدود ۱۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته (۰/۵ گرم در ۱۰۰) اضافه کرده و دوباره محلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس، آنزیم غیرفعال و به مدت ۵ دقیقه به وسیله سانتریفیوژ با دور $g \times 13000$ عصاره از پلت جدا شد. آنگاه ۲۰ میکرولیتر از عصاره با یک میلی‌لیتر از محلول رنگی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و در دمای اتاق خنک شد و جذب آن در ۴۱۰ نانومتر خوانده شد.

قدرت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد DPPH

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH از پلی ساکاریدهای اولیه و هیدرولیز شده بر طبق روش Brand-Williams و همکاران [10] با کمی تغییر انجام شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نمونه های پلی ساکارید (۱ تا ۳ میلی گرم بر میلی لیتر) یا اسید آسکوربیک (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲،۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) اضافه شد. به منظور کنترل واکنش ۱۰۰ میکرولیتر اتانول به ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید. همچنین از استاندارد ویتامین C استفاده شد. سپس مخلوط حاصل در میکروپلیت ۹۶ تایی در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب در ۵۱۷ نانومتر توسط طیف سنجی UV-Vis دستگاه الیزا ریدر (Epock، آمریکا) خوانده شد. درصد مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت خنثی کنندگی رادیکال آزاد} = (\text{کنترل} - \text{نمونه}) / \text{کنترل} \times 100$$

که A c جذب کنترل (۱۰۰ میکرولیتر اتانول با ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH) و A s جذب نمونه می باشد.

قدرت کاهندگی یون آهن (FRAP^۱)

برای اندازه گیری قدرت کاهندگی آهن نمونه های پلی ساکارید از روش Oyaizu [11] استفاده شد. نیمی از نمونه پلی ساکارید (۵۰۰ میکرولیتر) با غلظت های ۰/۲۵ تا ۱ میلی گرم/ میلی لیتر را با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار، PH برابر ۶/۶ و ۵۰۰ میکرولیتر از فری سیانات پتاسیم ۱٪ مخلوط شد. از آسکوربیک اسید به عنوان ضد اکسیدان تجاری استفاده شد. انکوباسیون نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور (Comecta-100-Spania) انجام شد، بعد از این مدت ۵۰۰ میکرولیتر از TCA، ۱۰٪ اضافه شد و مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه در دور (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. در ادامه، ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. و در نهایت جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. در پایان، قدرت کاهندگی یون آهن بر حسب فعالیت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اسید آسکوربیک گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش تمامی اندازه گیری ها برای هر یک از نمونه ها سه بار تکرار و نتایج به دست آمده به صورت میانگین و همراه با انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 20 انجام شد. برای مقایسه میانگین ها، از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. به منظور تشخیص وجود معناداری بین تیمارها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد.

نتایج

وزن مولکولی پلی ساکاریدها و هیدرولیزات

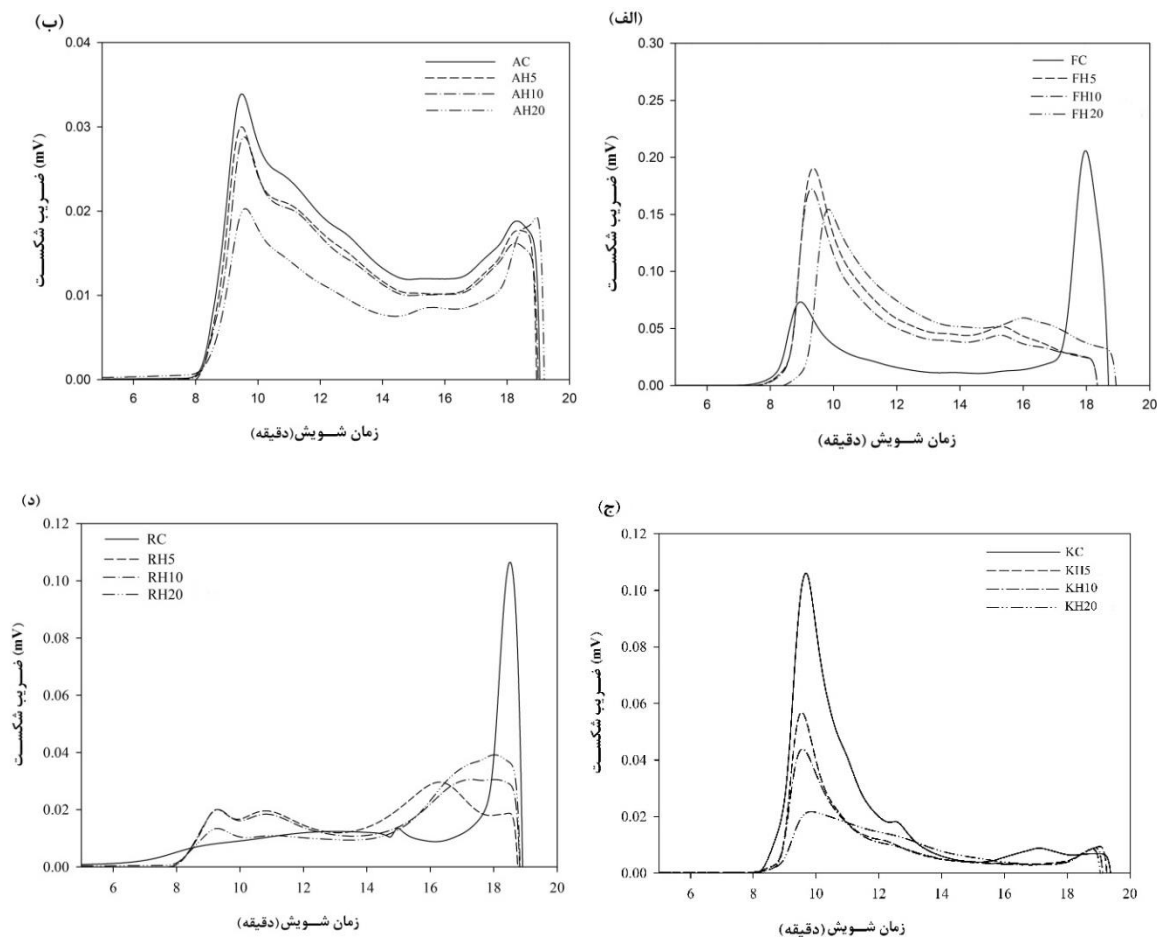
همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، تغییرات قابل توجهی در نمودار شویش پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات آن ها به وقوع پیوسته است. به طور کلی در ستون کروماتوگرافی اندازه پردی (SEC^۲) یا ژل تراوشی (GPC^۳) جداسازی مولکولی بر اساس اندازه صورت می گیرد و مولکول های با اندازه بزرگتر ابتدا و مولکولی های با اندازه کوچکتر با تاخیر از ستون خارج می شوند. شکل ۱-الف نشان می دهد که مولکول های فوکوئیدان خام (FC) از دقیقه ۸ شروع به خروج از ستون کروماتوگرافی نمودند و هرچه زمان هیدرولیز افزایش یافت نقطه شروع شویش به تاخیر افتاد و نمودار نیز به سمت زمان های بالاتر تغییر جهت داد. نتایج سیستم MALLS نیز نشان داد که وزن مولکولی فوکوئیدان خام به ترتیب از ۳۷۸۱/۸ × ۱۰^۳ گرم/مول به ۳۰۱۱/۰، ۲۵۷۵/۰ و ۲۰۵۹/۵ × ۱۰^۳ گرم/مول در HF5، HF10 و HF20 تغییر یافت (جدول ۱). در ارتباط با آلزینات نیز، نمودار شویش هیدرولیزات نسبت به پلی ساکارید خام دچار تغییرات قابل توجهی شد و کوچکتر شدن اندازه پلیمرها مشهود بود (شکل

¹ - Ferric- reducing antioxidant power

² Size Exclusion Chromatography

³ Gel Permeation Chromatography

۱-ب). وزن مولکولی آلزینات خام نیز با افزایش زمان هیدرولیز کاهش یافت و به ترتیب از $۲۳۲۴/۹ \times ۱۰^۳$ گرم/مول به $۲۰,۴/۲۸ \times ۱۰^۳$ و $۱۹۳۹/۲ \times ۱۰^۳$ گرم/مول تبدیل شد. تغییر نمودار شویش در پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات خاکشیر نیز مشاهده شد و کاهش وزن مولکولی به ترتیب از $۱۳۷۳/۸ \times ۱۰^۳$ گرم/مول به $۱۱۴۲/۰$ و $۷۲۰/۴ \times ۱۰^۳$ گرم/مول در KH5، KH10 و KH20 ثبت گردید (شکل ۱-ج). همچنین، هیدرولیز اسیدی منجر به کاهش معنی داری وزن مولکولی پلی ساکاریدهای رازیانه به ترتیب از $۱۴۰۷۷/۵ \times ۱۰^۳$ گرم/مول به $۱۴۰۴۷/۶$ ، $۸۸۲۳/۰$ و $۵۷۵۲/۶ \times ۱۰^۳$ گرم/مول شد (شکل ۱-د).



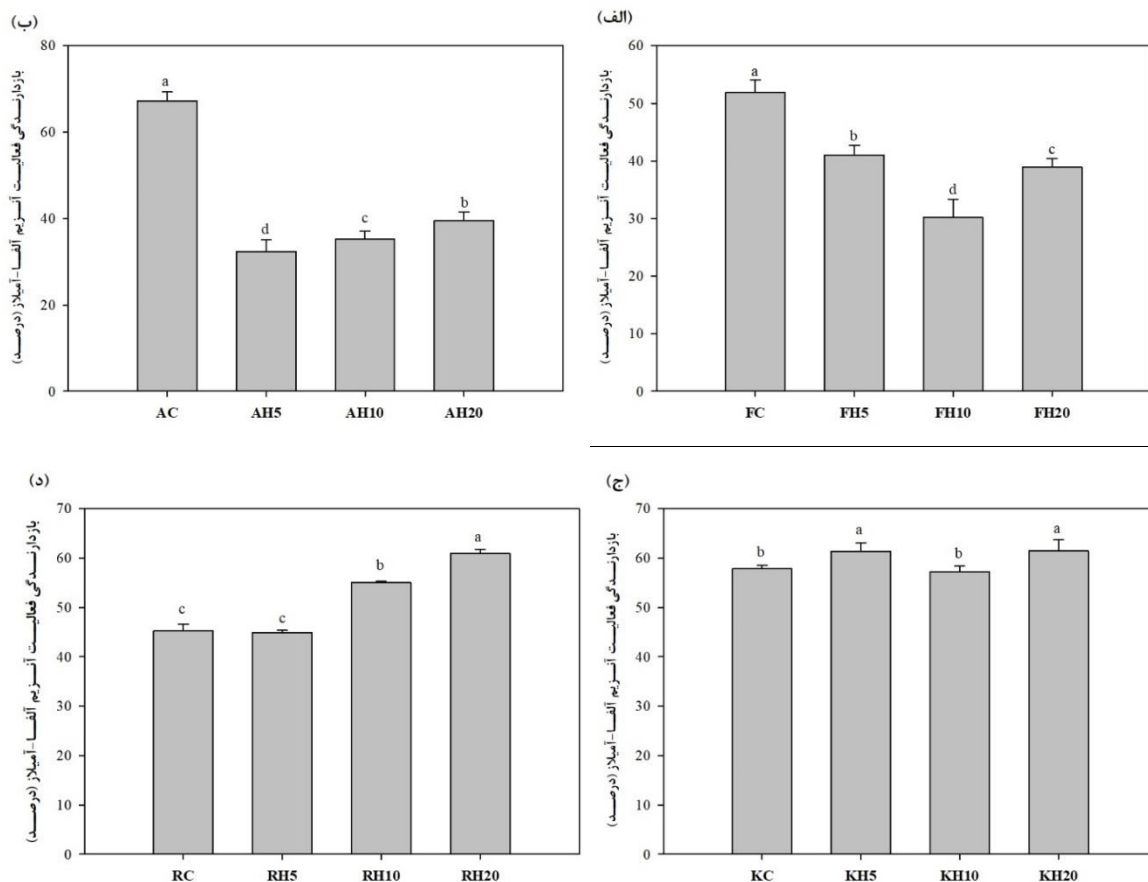
شکل ۱. نمودار شویش فوکوئیدان خام فوکوئیدان خام (FC) و هیدرولیزات (FH5, FH10, FH20)، آلزینات (AC) و هیدرولیزات (AH5, AH10, AH20)، پلی ساکارید خام خاکشیر (KC) و هیدرولیزات (KH5, KH10, KH20)، پلی ساکارید خام رازیانه (RC) و هیدرولیزات (RH5, RH10, RH20) از ستون کروماتوگرافی BioSep-SEC-s2000.

جدول ۱. شکل ۱. میانگین وزن مولکولی فوکوئیدان خام (FC) و هیدرولیزات (FH5, FH10, FH20)، آلزینات (AC) و هیدرولیزات (AH5, AH20)، پلی ساکارید خام خاکشیر (KC) و هیدرولیزات (KH5, KH10, KH20)، پلی ساکارید خام رازیانه (RC) و هیدرولیزات (RH5, RH20) اندازه گیری شده با سیستم MALLS.

نمونه	وزن مولکولی ($\times 10^3$ گرم/مول)	نمونه	وزن مولکولی ($\times 10^3$ گرم/مول)
FC	$3781/8 \pm 34/7$	KC	$1373/8 \pm 17/5$
FH5	$3011/0 \pm 64/1$	KH5	$1142/0 \pm 7/0$
FH10	$2575/0 \pm 23/5$	KH10	$1004/7 \pm 40/0$
FH20	$2059/5 \pm 11/31$	KH20	$720/4 \pm 3/1$
AC	$2324/9 \pm 13/4$	RC	$14077/5 \pm 28/1$
AH5	$204/28 \pm 21/3$	RH5	$10447/6 \pm 2/9$
AH10	$1939/2 \pm 21/6$	RH10	$8823/0 \pm 16/2$
AH20	$1774/4 \pm 35/6$	RH20	$5752/6 \pm 34/8$

بازدارندگی فعالیت آنزیم α -آمیلاز

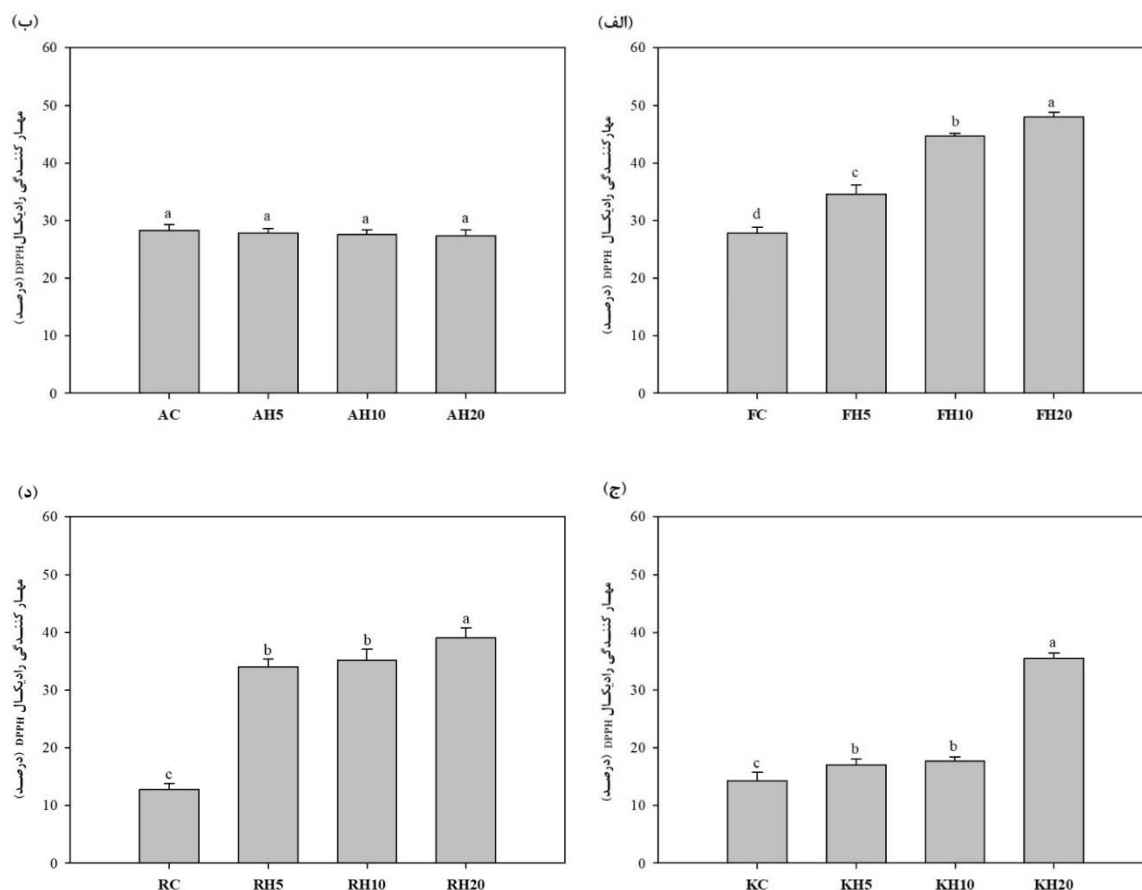
شکل ۲ نتایج حاصل از انکوباسیون پلی ساکاریدها و هیدرولیزات تولید شده با آنزیم α -آمیلاز در غلظت ۳ میلی گرم/ میلی لیتر را نشان می دهد. فوکوئیدان خام به میزان ۵۲/۱ درصد فعالیت آنزیم α -آمیلاز را کاهش داد که این میزان به طور معنی داری در هیدرولیزات FH5 (۴۴/۳ درصد)، FH10 (۳۲/۸ درصد) و FH20 (۳۸/۹ درصد) پایینتر بود ($P < 0.05$) (شکل ۲-الف). میزان بازدارندگی فعالیت آنزیم α -آمیلاز توسط آلزینات خام ۶۷/۶ درصد بود که پس از هیدرولیز اسیدی به شدت در هیدرولیزات AH5 (۳۲/۲ درصد)، AH10 (۳۵/۳ درصد) و AH20 (۳۹/۵ درصد) کاهش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۲-ب). برخلاف پلی ساکاریدهای بالا، سطح مهارکنندگی فعالیت آنزیم α -آمیلاز توسط پلی ساکارید خاکشیر ۵۷/۶ درصد بود که روند تغییرات آن در هیدرولیزات به دست آمده شامل KH5 (۶۱ درصد)، KH10 (۵۷ درصد) و KH20 (۶۱/۴ درصد) قابل توجه نبود (شکل ۲-ج). افزودن ۳ میلی گرم/ میلی لیتر از پلی ساکارید رازیانه به آنزیم α -آمیلاز توانست سبب کاهش فعالیت هیدرولیزی آن به میزان ۴۵ درصد شود که البته این میزان با کاهش وزن مولکولی پلیمرها افزایش معنی داری را در هیدرولیزات RH10 (۵۵/۴ درصد) و RH20 (۶۱/۲ درصد) از خود نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۲-د).



شکل ۲. بازدارندگی فعالیت آنزیم α -آمیلاز توسط فوکوئیدان خام (FC) و هیدرولیزات (FH5, FH10, FH20)، آلژینات (AC) و هیدرولیزات (AH5, AH10, AH20)، پلی ساکارید خام خاکشیر (KC) و هیدرولیزات (KH5, KH10, KH20)، پلی ساکارید خام رازیانه (RC) و هیدرولیزات (RH5, RH10, RH20).

مهار رادیکال های آزاد DPPH

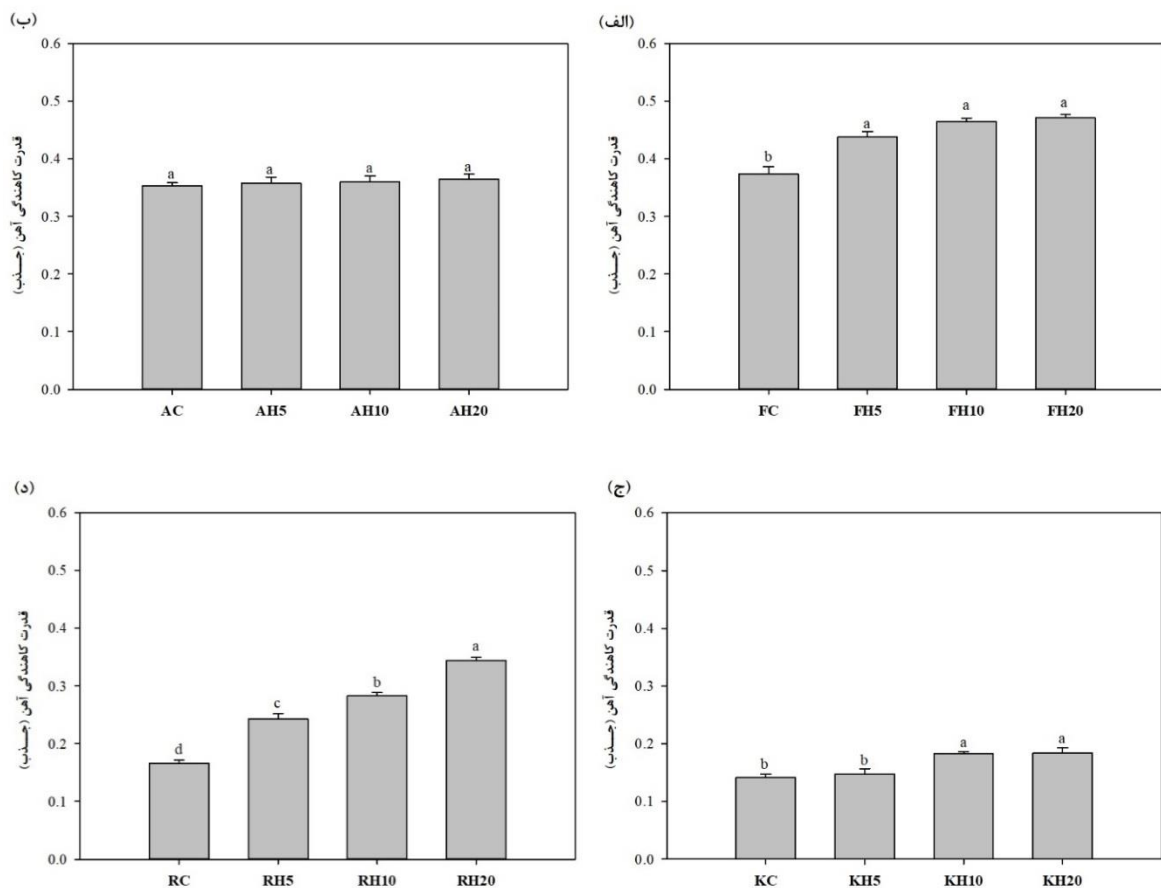
شکل ۳ قابلیت پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات تولید شده را در مهار رادیکال آزاد DPPH نشان می دهد. تغییر وزن مولکولی در فوکوئیدان جلبکی سبب افزایش پتانسیل این پلی ساکارید در مهار رادیکال DPPH از سطح ۲۷/۸ درصد در پلی ساکارید خام به ۳۴/۵، ۴۴/۶ درصد و ۴۷/۹ درصد در FH5، FH10 و FH20 شد ($P < 0.05$) (شکل ۳-الف). میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH در آلژینات و هیدرولیزات تولید شده بدون تغییر معنی داری بین ۲۷/۳ تا ۲۸/۲ درصد باقی ماند ($P > 0.05$) (شکل ۳-ب). مهار رادیکال DPPH در پلی ساکاریدهای خاکشیر نیز با کاهش وزن مولکولی افزایشی بود و از ۱۴/۳ درصد در پلیمر خام به ۳۵/۴ درصد در KH20 رسید ($P < 0.05$) (شکل ۳-ج). پلی ساکاریدهای رازیانه نیز پس از هیدرولیز واجد قابلیت بیشتری در مهار رادیکال های آزاد بودند و این میزان از ۱۲/۷ درصد در پلی ساکارید خام به ۳۴/۰، ۳۵/۲ و ۳۹/۱ درصد در RH5، RH10 و RH20 رسید ($P < 0.05$) (شکل ۳-د).



شکل ۳. مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط فوکوئیدان خام (FC) و هیدرولیزات (FH5, FH10, FH20)، آلژینات (AC) و هیدرولیزات (AH5, AH10, AH20)، پلی ساکارید خام خاکشیر (KC) و هیدرولیزات (KH5, KH10, KH20)، پلی ساکارید خام رازیانه (RC) و هیدرولیزات (RH5, RH10, RH20).

کاهندگی یون آهن

شکل ۴ نتایج قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی پلی ساکاریدها و هیدرولیزات تولید شده را در غلظت ۳ میلی گرم/ میلی لیتر نشان می دهد. همانطور که در شکل ۴-الف مشاهده می شود قدرت فوکوئیدان در کاهش یون های آهن پس از هیدرولیز اندکی افزایش یافت ولی در تمامی هیدرولیزاتها (جذب ۰/۴۳ تا ۰/۴۷) دارای تفاوت معنی داری نبود ($P > 0.05$). شکل ۴-ب نیز نشان می دهد که قابلیت کاهش یون آهن در آلژینات و هیدرولیزات (جذب ۰/۳۵ تا ۰/۳۶) به دست آمده از آن فاقد تفاوت معنی دار بود ($P > 0.05$). قدرت کاهندگی آهن در پلی ساکارید خام خاکشیر و هیدرولیز KH5 بدون تغییر (جذب ۰/۱۴) ولی در KH10 (جذب ۰/۱۸) و KH20 (جذب ۰/۱۸) اندکی افزایش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۴-ج). پلی ساکارید خام رازیانه (جذب ۰/۱۶) پس از هیدرولیز قابلیت بیشتری در کاهش یون آهن در RH5 (جذب ۰/۱۶)، RH10 (جذب ۰/۲۴) و RH20 (جذب ۰/۳۴) از خود نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۴-د).



شکل ۴. فوکوئیدان خام (FC) و هیدرولیزات (FH5, FH10, FH20)، آلژینات (AC) و هیدرولیزات (AH5, AH10, AH20)، پلی ساکارید خام خاکشیر (KC) و هیدرولیزات (KH5, KH10, KH20)، پلی ساکارید خام رازیانه (RC) و هیدرولیزات (RH5, RH10, RH20).

بحث

در مطالعه حاضر، بمنظور ارزیابی اثر وزن مولکولی پلی ساکاریدها بر قابلیت آن ها در جلوگیری از واکنش های اکسیداسیونی و فعالیت آنزیم های دخیل در هضم نشاسته و در نتیجه کاهش قند خون، فوکوئیدان و آلژینات جلبک قهوه ای پادینا و پلی ساکارید دانه رازیانه و خاکشیر تحت هیدرولیز اسیدی در شرایط مختلف قرار گرفتند تا هیدرولیزات با وزن های مختلف مولکولی به دست آید. تا کنون میانگین وزن مولکولی فوکوئیدان در یک دامنه وسیعی بین ۱۰۸۰۰-۴۷ × ۱۰^۲ گرم/مول در گونه های مختلف *Sargassum thunbergii*, *S. binderi*, *S. fusiforme* و *angustifolium* گزارش شده است [4,7,12,13,14]. متغیر بودن وزن مولکولی پلیمرهای فوکوئیدان یکی از عوامل تاثیرگذار در تفاوت های این پلی ساکاریدها در بروز ویژگی های زیستی آنها بویژه خواص ضد دیابتی است. در بیماران دیابتی، یکی از مهم ترین مراحل درمان، کنترل سطح گلوکز خون می باشد و مهار آنزیم های α -آمیلاز و α -گلوکوزیداز می تواند با تأخیر در هضم و جذب گلوکز روند درمانی بیماری دیابتی را بهبود بخشد [15]. در این راستا، فوکوئیدان توجه بسیاری را به عنوان یک ترکیب کاهنده قند خون در درمان دیابت به خود جلب نموده است [16]. در طی مطالعه ای که Pirian و همکاران [17] بر روی فوکوئیدان جلبک قهوه ای *S. angustifolium* انجام دادند، در غلظت ۱/۴۳ میلی گرم بر میلی لیتر به میزان ۵۰ درصد فعالیت آنزیم α -آمیلاز بر روی سوبسترا محدود شد. همچنین تحقیقات نشان داده است که

فوکوئیدان با وزن مولکولی پایین که از جلبک *F. vesiculosus* به دست آمده است می تواند به عنوان بازدارنده آنزیم α -گلوکوزیداز در درمان دیابت نوع ۲ مورد استفاده قرار گیرد [18]. در مطالعه حاضر، تمام پلی ساکاریدهای مورد بررسی واجد سطوح مختلفی از بازدارندگی آنزیم α -آمیلاز بودند که در این میان آلژینات و خاکشیر بازدارندگی بیشتر و فوکوئیدان و رازیانه بازدارندگی نسبتاً پایین تری از خود نشان دادند. تاثیر وزن مولکولی نیز در پلی ساکاریدهای مختلف متفاوت بود، به گونه ای که کاهش وزن مولکولی در فوکوئیدان و آلژینات سبب کاهش قابل توجه بازدارندگی، در خاکشیر بدون تغییر و در رازیانه افزایشی بود. براساس مطالعه ای که توسط Palanisamy و همکاران [19] صورت پذیرفت، میزان بازدارندگی DPPH در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه ای *S. polycytum* ۶۱/۲ درصد گزارش شد. همچنین، مطالعات پیشین نشان داده است که وزن مولکولی فوکوئیدان می تواند به میزان قابل توجهی ویژگی های ضد اکسایشی آنها به خصوص قابلیت کاهندگی آهن و مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل را نیز تحت تاثیر قرار دهد [20]. در مطالعه ای که بر روی فوکوئیدان *Fucus vesiculosus* انجام شد هیدرولیزات با وزن مولکولی کمتر با دو روش تابش اشعه گاما و هیدرولیز اسیدی تولید شد که در طی آن با کاهش وزن مولکولی قابلیت کاهش یون آهن افزایش یافت در حالی که آزمون بی رنگ شدن بتا-کاروتن بدون تغییر باقی ماند [21]. همچنین، نتایج نشان داد که در وزن های مولکولی مشابه، هیدرولیزات تولید شده بوسیله تابش اشعه گاما واجد قابلیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بیشتری نسبت به محصولات تولید شده توسط هیدرولیز اسیدی داشتند [21]. در مطالعه حاضر نیز کاهش وزن مولکولی در فوکوئیدان و پلی ساکارید رازیانه به میزان قابل توجهی سبب افزایش قابلیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و کاهش یون آهن در آنها شد. پیش از این کاهش یون آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH توسط آلژینات جلبک های قهوه ای *Turbinaria conoides* و *Dictyopteris polypodioides* گزارش شده است [22,23]. هیدرولیز اسیدی آلژینات استخراج شده از جلبک های *S. angustifolium* و *S. vulgare* نیز نشان داد که کاهش وزن مولکولی سبب افزایش توانایی هیدرولیزات به دست آمده در اهدای الکترون و در نتیجه خواص ضد اکسایشی قوی تر شود [7,24]. برخلاف مطالعات فوق، در پژوهش حاضر دیپلمیریزاسیون آلژینات نتوانست هیچگونه تغییر معنی داری در خواص ضد اکسایشی آن ایجاد نماید و پلی ساکارید خاکشیر نیز تنها در وزن مولکولی $10^3 \times 1774$ گرم/مول موثر بود.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که جلبک قهوه ای *P. pavonica* واجد پلی ساکاریدهایی است که در حالت طبیعی خود فعالیت مهارکنندگی آنزیم α -آمیلاز، رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن قابل قبولی را دارا هستند. همچنین، هیدرولیز اسیدی با استفاده از ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلریک توانست پلیمرهایی با وزن های مولکولی پایین تر تولید نماید که تاثیر این کاهش درجه پلیمریزاسیون در هر دو پلی ساکارید معکوس و کاهشی بر قابلیت جلوگیری از فعالیت آنزیم α -آمیلاز، مثبت و افزایشی بر ویژگی های ضد اکسایشی فوکوئیدان و غیر قابل تغییر در آلژینات بود. کاهش وزن مولکولی در پلی ساکاریدهای خاکشیر نیز بدون تغییر و یا نسبتاً بسیار ضعیف بر روی خواص زیست فعالی آن ظاهر شد. برخلاف نمونه های بالا، در پلی ساکاریدهای رازیانه کاهش وزن مولکولی توانست به صورت منظم و معنی دار سبب بهبود فعالیت های زیستی شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی ستاد توسعه زیست فناوری در غالب طرح تحقیقاتی با شماره 11/31590 و دانشگاه تربیت مدرس در غالب رساله دکتری تشکر و قدردانی می گردد.

تاییدیه های اخلاقی

مطالعه حاضر نیازمند دریافت تاییدیه های اخلاقی نبوده است.

تعارض منافع

مطالعه حاضر فاقد هرگونه تعارض منافع می باشد.

سهم نویسندگان در مقاله

سهم نویسندگان برابر می باشد.

منابع مالی / حمایت ها

مطالعه حاضر با حمایت مالی ستاد توسعه زیست فناوری در غالب طرح تحقیقاتی با شماره 11/31590 و دانشگاه تربیت مدرس در غالب رساله دکتری انجام شده است.

منابع

- 1- Yemenicioğlu A, Farris S, Turkyilmaz M, Gulec S. A review of current and future food applications of natural hydrocolloids. International Journal of Food Science & Technology. 2020 Apr;55(4):1389-406.
- 2- Ullah S, Khalil AA, Shaukat F, Song Y. Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. Foods. 2019 Aug;8(8):304.
- 3- Wang X, Wang J, Zhang J, Zhao B, Yao J, Wang Y. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. International journal of biological macromolecules. 2010 Jan 1;46(1):59-66.
- 4- Chen BJ, Shi MJ, Cui S, Hao SX, Hider RC, Zhou T. Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation. International journal of biological macromolecules. 2016 Nov 1;92:715-22.
- 5- Jiang J, Meng FY, He Z, Ning YL, Li XH, Song H, Wang J, Zhou R. Sulfated modification of longan polysaccharide and its immunomodulatory and antitumor activity in vitro. International journal of biological macromolecules. 2014 Jun 1;67:323-9.
- 6- Xu Y, Gao Y, Liu F, Niu X, Wang L, Li X, Chen H, Yang Y. Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and α -amylase inhibitory activities. International journal of biological macromolecules. 2018 Apr 1;109:1344-54.
- 7- Borazjani NJ, Tabarsa M, You S, Rezaei M. Improved immunomodulatory and antioxidant properties of unrefined fucoidans from *Sargassum angustifolium* by hydrolysis. Journal of food science and technology. 2017 Nov;54(12):4016-25.
- 8- Karnjanapratum S, Tabarsa M, Cho M, You S. Characterization and immunomodulatory activities of sulfated polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens*. International journal of biological macromolecules. 2012 Dec 1;51(5):720-9.
- 9- Salehi M, Tabarsa M, Amraie M, Anvari M, Rezaei M, Smith BM. Characterization of rheological and structural properties of a gum from Balangu seeds. International journal of biological macromolecules. 2018 Oct 1;117:294-300.
- 10- Borazjani NJ, Tabarsa M, You S, Rezaei M. Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. International journal of biological macromolecules. 2017 Aug 1;101:703-11.

- 11- Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2007 Mar 1;8(1):46-54.
- 12- 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.
- 13- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 1986;44(6):307-15.
- 14- Lim SJ, Aida WM, Maskat MY, Latip J, Badri KH, Hassan O, Yamin BM. Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food chemistry*. 2016 Oct 15;209:267-73.
- 15- Luo D, Yuan X, Zeng Y, Nie K, Li Z, Wang Z. Structure elucidation of a major fucopyranose-rich heteropolysaccharide (STP-II) from *Sargassum thunbergii*. *Carbohydrate polymers*. 2016 Jun 5;143:1-8.
- 16- Bahramzadeh S, Tabarsa M, You S, Li C, Bitra S. Purification, structural analysis and mechanism of murine macrophage cell activation by sulfated polysaccharides from *Cystoseira indica*. *Carbohydrate polymers*. 2019 Feb 1;205:261-70.
- 17- Kim KT, Rioux LE, Turgeon SL. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*. 2014 Feb 1;98:27-33.
- 18- Cui W, Zheng Y, Zhang Q, Wang J, Wang L, Yang W, Guo C, Gao W, Wang X, Luo D. Low-molecular-weight fucoidan protects endothelial function and ameliorates basal hypertension in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Laboratory investigation*. 2014 Apr;94(4):382-93.
- 19- Pirian K, Piri K. Evaluation of antioxidant and a-amylase inhibitory activity of two species *Sargassum angostifolium* and *Palisada perforata*. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2018 Jul 23;31(2):158-71.
- 20- Shan X, Liu X, Hao J, Cai C, Fan F, Dun Y, Zhao X, Liu X, Li C, Yu G. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *International journal of biological macromolecules*. 2016 Jan 1;82:249-55.
- 21- Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, Rajasekar P, Prabhu NM. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. *International journal of biological macromolecules*. 2017 Sep 1;102:405-12.
- 22- Zhang Z, Zhang Q, Wang J, Song H, Zhang H, Niu X. Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyran from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate polymers*. 2010 Jan 20;79(2):290-5.
- 23- Lim S, Choi JI, Park H. Antioxidant activities of fucoidan degraded by gamma irradiation and acidic hydrolysis. *Radiation physics and chemistry*. 2015 Apr 1;109:23-6.
- 24- Karaki N, Sebaaly C, Chahine N, Faour T, Zinchenko A, Rachid S, Kanaan H. The antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* growing on the Lebanese coast. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2013 Feb 1;3(2):43.

- 25- Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P, Ray B. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. Food Chemistry. 2010 Feb 1;118(3):823-9.
- 26- Sari-Chmayssem N, Taha S, Mawlawi H, Guégan JP, Jeftić J, Benvegnu T. Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: chemical, rheological, and antioxidant properties. Journal of applied phycology. 2016 Jun 1;28(3):1915-29.

Relationship evaluation of molecular weight and antioxidant and alpha amylase inhibition properties of fucoidan and alginate from brown seaweed *Padina pavonica* in comparison with polysaccharides from Flixweed and Fennel

Saeed Khajavi¹, Mehdi Tabarsa^{1*}, Hassan Ahmadi Gavlighi², Masoud Rezaei¹

1- Department of Seafood Processing, Tarbiat Modares University, Nur, Iran

2- Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Polysaccharides possess diverse biological properties due to complexity of chemical structure and heterogeneity of molecular weight which could be improved through engineering approaches and chemical modifications. The objective of the present study was to determine the antioxidant and anti-diabetic effects of marine and land originated polysaccharides and explore the correlation between molecular weight and biological activities. Hence, four polysaccharides with varying size distribution and average molecular weight including fucoidan and alginate from brown seaweed *Padina pavonica* and polysaccharides from Flixweed (*Descurainia sophia*) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) were subjected to hydrolysis in three levels using 0.05 N hydrochloric acid at 100 °C for 5, 10 and 20 minutes. The average molecular weight ranged between 2059.5-3781.8 in fucoidan, 1774.4-2324.9 in alginate, 720.4-1373.8 in Flixweed and 5752.6-14077.5 × 10³ g/mol in Fennel. The relation between molecular weight reduction and α-amylase activity inhibition was decreasing in fucoidan (52.1-32.8%) and alginate (67.6-32.2%) and increasing in Fennel (61.2-45.0%). Reduction of molecular weight enhanced the DPPH radical scavenging and ferric reducing power of fucoidan (47.9-27.8%; 0.47-0.37 Abs) and Fennel (39.0-12.7%; 0.34-0.16 Abs). The effect of molecular weight reduction was limited on antioxidant activities of alginate and Flixweed. Overall, the findings of the current study revealed that molecular weight is a determinant factor affecting bioactivities of the tested polysaccharides and thus their applications as ingredients having anti-diabetic and antioxidant functions could be possible in their native and/or hydrolyzed forms.

KEYWORDS: Fucoidan, Alginate, Anti-diabetic, Antioxidant

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 30
December 2020

Accepted: 5 March
2021

ePublished: 10 March
2021

* Corresponding Author:

Email address: m.tabarsa@modares.ac.ir

Tel: +98 (11) 44998151

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513