

ارزیابی رسوب دهی پله‌ای بر ویژگی‌های شیمیایی، مولکولی و ضد اکسایشی فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای

Nizamuddiniazanardinii

معصومه قنبری کیاسرا^۱، مهدی طبرسا^{۲*}، حسن احمدی گاولیقی^۳، امین مخلصی^۴

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

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

۳- گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دارویی و زیست‌فناوری، دانشگاه هاینریش هاینه، دوسلدورف، آلمان

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

*نویسنده مسول:

m.tabarsa@modares.ac.ir

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی رسوب-دهی پله-ای فوکوئیدان استخراج شده از جلبک *Nizamuddiniazanardinii* و بررسی رابطه محتوای سولفات و وزن مولکولی با فعالیت ضد اکسایشی آن بود. پس از حذف رنگدانه-ها و ترکیبات با وزن مولکولی پایین، فوکوئیدان استخراج شده با حلال آبی، در سه مرحله با سطوح متفاوت اتانول (۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد) رسوب-دهی شدند. سه فراکسیون *Fuc30*، *Fuc50* و *Fuc70* به ترتیب با وزن مولکولی $۷۳۱/۶۲$ ، $۶۵۵/۷۶$ و $۱۰۴/۴۱$ گرم/مول به دست آمدند. محتوای استرهای سولفات در فراکسیون-های به دست آمده بین $۶/۴۹-۲۵/۰۳$ درصد اندازه-گیری شد. سنجش رنگ فوکوئیدان-های تولید شده توسط دستگاه رنگ-سنج دیجیتال حاکی از بیشترین شاخص سفیدی در فراکسیون *Fuc50* بود. نتایج فعالیت ضد-اکسایشی فراکسیون-ها در مهار رادیکال آزاد DPPH ($۴۳/۹۳$ تا $۸۹/۴۰$ درصد)، رادیکال ABTS ($۲۵/۰۵$ تا $۹۶/۱۰$ درصد) و احیای یون Fe^{3+} (جذب $۰/۱۴۲$ تا $۰/۲۵۹$) متغیر بود. به-طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد، رسوب-دهی پله-ای فوکوئیدان گونه *N. zanardinii* منجر به تولید فراکسیون-هایی با ترکیب مولکولی و شیمیایی و فعالیت ضد اکسایشی مختلف می-شود. همچنین، اگرچه تمامی فراکسیون-های فوکوئیدان استخراج شده به عنوان ترکیباتی واجد فعالیت ضد اکسایشی معرفی می-شوند اما در مهار رادیکال آزاد ABTS و احیای یون Fe^{3+} ، پلیمرهای با وزن مولکولی بالاتر (*Fuc30*)، فعالیت ضد اکسایشی بیشتری را از خود نشان می-دهند.

کلید واژه‌ها: فوکوئیدان، *Nizamuddiniazanardinii*، استخراج، وزن مولکولی، ضد اکسایشی

مقدمه

استفاده از جلبک‌های دریایی در بسیاری از کشورها سابقه‌ای طولانی دارد، به ویژه در شرق آسیا جلبک‌های دریایی قرن‌هاست در غذاهای محلی و به عنوان دارو استفاده می‌شوند. پژوهش‌های مختلف گزارش کرده‌اند که بروز بیماری‌های مزمن مانند بیماری قلبی، دیابت و سرطان در ژاپن و کره کمتر از کشورهای غربی است که ممکن است به تفاوت در سبک زندگی و رژیم غذایی نسبت داده شود [۱]. این امر منجر به آن شد که دانشمندان درباره ترکیبات مختلف موجود در جلبک‌ها و فعالیت زیستی آنها بیشتر مطالعه کنند، به طوری که در ۵۰ سال گذشته، بیش از ۳۰۰۰ ترکیب مشتق شده از جلبک‌ها معرفی شده است [۲].

از مهمترین ترکیبات موجود در جلبک‌های دریایی که توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند پلی ساکاریدها هستند. پلی ساکارید پلیمری از قندهای ساده می‌باشد که توسط پیوند گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند و از هیدرولیز آنها مونوساکاریدهای گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فروکتوز، گزیلوز، فوکوز و آرابینوز به دست می‌آید [۳، ۴]. معمولاً پلی ساکارید با توجه به نوع گونه جلبک بین ۴ تا ۷۶ درصد وزن خشک جلبک را شامل می‌شود [۵].

جلبک‌های قهوه‌ای به سبب داشتن پلی‌ساکاریدهایی نظیر آلژینات، لامینارین و فوکوئیدان گزینه مناسبی جهت مطالعه این ترکیبات هستند. در این میان جلبک *Nizamuddinina zanardinii* گونه‌ای مستعد از نظر فراوانی و سهولت در دسترسی می‌باشد که به طور گسترده در سواحل عمان به ویژه سواحل جنوب شرقی ایران پراکنده شده است و از نظر تغذیه‌ای به دلیل داشتن اسیدهای چرب (PUFA)، پروتئین و مواد معدنی بسیار ارزشمند است [۶]. طبق مطالعه‌ای که اخیراً صورت گرفته، فوکوئیدان خام و تخلیص شده از این جلبک قابلیت تحریک سیستم ایمنی انسان از طریق فعال‌سازی سلول‌های ماکروفاژ RAW264.7 و سلول‌های کشنده NK-92 با استفاده از مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B و MAPKs را دارا می‌باشد [۷].

فوکوئیدان‌ها نوعی پلی‌ساکارید سولفات هستند که برای اولین بار در ۱۹۱۳ از دیواره سلولی جلبک‌های قهوه‌ای جدا شده‌اند [۸]. این پلی‌ساکارید که از مولکول‌های L-فوکوز ساخته شده است، حدود ۵ تا ۲۰ درصد وزن خشک جلبک‌های قهوه‌ای را تشکیل می‌دهد. طبق قوانین آیوپاک نام این پلی‌ساکارید فوکوئیدان است، اما نام‌های دیگر مورد استفاده از جمله: فوکوز، فوکان و فوکوزان سولفات نیز گزارش شده است [۹]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که ترکیب شیمیایی و ساختار فوکوئیدان‌ها می‌تواند بسیار متنوع باشد اما ساختمان اصلی فوکوئیدان‌ها شامل پیوندهای فوکوز و سولفات است و گاهی اوقات شامل گالاکتوز، مانوز، زایلوز و یورونیک‌اسید است [۹]. در سال‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری درباره خواص زیست‌فعال فوکوئیدان انجام شده است و موارد گسترده‌ای از جمله فعالیت‌های ضد انعقادی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد اکسایشی از فوکوئیدان گزارش شده است [۱۰-۱۳]. در حال حاضر استفاده از فوکوئیدان در درمان بیماری‌ها همچنان بر روی مصرف فوکوئیدان خوراکی به عنوان یک مکمل در افزایش اثربخشی درمان‌های مرسوم و جلوگیری از عوارض جانبی آنها متمرکز شده است. پژوهش‌های متقنی وجود دارد که نشان می‌دهند فوکوئیدان می‌تواند از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کند و به نظر می‌رسد هیچ عارضه جانبی روی سلول‌های سالم ندارد در حالی که می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر سرکوب بسیاری از انواع سرطان نشان دهد [۱۴-۱۵]. بنابراین، فوکوئیدان یک گزینه بسیار امیدوارکننده برای درمان بیماری‌ها به ویژه سرطان در آینده است [۱۶].

انواع رادیکال‌های آزاد در نتیجه واکنش‌های سوخت و ساز طبیعی سلول، بعد از بروز بیماری‌های التهابی، آلودگی‌های محیطی و برخی داروها تشکیل می‌شوند. اگر این رادیکال‌ها غیرفعال نشوند، با بسیاری از ترکیبات سلولی واکنش می‌دهند و ساختمان و عملکرد آنها را دچار اختلال کرده و در نتیجه باعث بروز بیماری‌هایی چون سرطان، بیماری‌های قلبی و پارکینسون می‌شوند [۱۷]. از آنجایی که برخی داروهای ضد اکسیدان مصنوعی مشکلاتی از قبیل اثرات جانبی احتمالی، هزینه ساخت بالا و کارایی درمانی کمتر نسبت به ضد اکسیدان‌های طبیعی دارند، شناسایی ضد اکسیدان‌های طبیعی و کشف عوامل موثر بر این خاصیت اهمیت زیادی پیدا کرده است. در همین راستا، مطالعه حاضر در پی آن است تا با هدف معرفی یک ضد اکسیدان طبیعی اقدام به ارزیابی فرآیند استخراج فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* و بررسی ارتباط احتمالی ساختار شیمیایی و مولکولی با فعالیت ضد اکسیدانی نماید. تاکنون روش‌های استخراج مختلفی اعم از روش‌های سنتی و مدرن به منظور استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات و سنجش فعالیت زیستی یا ویژگی‌های شیمیایی آنها مورد بررسی قرار گرفته‌اند که هر کدام فعالیت زیستی مختلفی را از فوکوئیدان استخراج شده گزارش نموده‌اند [۱۸-۲۱]. روش استخراج استفاده شده در مطالعه حاضر به عنوان یکی از روش‌های استخراج ساده و در دسترس مورد استفاده قرار گرفته است و در عین حال به علت استفاده چند مرحله‌ای از غلظت‌های مختلف اتانول، فرایندی نوین و غیر تکراری در استخراج فوکوئیدان گونه *N. zanardinii* محسوب می‌شود. همچنین از مزایای این روش استخراج، سهولت انجام کار و کم هزینه بودن فرایند استخراج است که این امر می‌تواند برای به کارگیری در مقیاس صنعتی جالب توجه باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی نمونه

جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* در فصل پاییز، از سواحل دریای عمان منطقه چابهار و در زمان جزر کامل به صورت دستی جمع‌آوری شد و پس از شست‌وشو، در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه خشک شده توسط آسیاب برقی پودر شده و پس از الک شدن، با ترازوی دیجیتال توزین شد. در نهایت درون کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۲].

استخراج فوکوئیدان

ابتدا ۵۰ گرم پودر خشک جلبک به نسبت ۱ به ۲۰ با اتانول (۸۵٪) به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا رنگدانه‌ها، ترکیبات ثانویه و چربی‌ها از نمونه جلبکی حذف شوند. بعد از گذشت این زمان، به وسیله سانتریفیوژ (UNIVERSAL 320 R, Hettich, Germany)، (rpm ۸۰۰۰، ۱۰ دقیقه، ۱۰ درجه سانتی‌گراد)، فاز مایع جدا شده و این عمل تا زمان بی‌رنگ شدن اتانول اضافی تکرار شد. سپس فاز جامد به منظور خشک شدن، در چندین نوبت با اتانول و استون شست‌وشو شد. برای استخراج پلی‌ساکاریدهای فوکوئیدان، ۲۰ گرم از نمونه جلبک رنگ‌بری شده با آب مقطر مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مجدداً سانتریفیوژ (rpm ۸۰۰۰، ۱۰ دقیقه، ۱۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد و پس از جمع‌آوری رسوب، فاز مایع جدا شده توسط دستگاه روتاری (model Heidolph, Germany) تغلیظ شد. سپس، پودر کلسیم کلراید ۱٪ (وزن/حجم) به مایع تغلیظ شده افزوده شد و ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در ادامه، سانتریفیوژ انجام شد و به این ترتیب رسوب آلزینات کلسیم جداسازی شد [۲۳]. در نهایت، به فاز مایع باقی‌مانده، اتانول ۹۶٪ تا رسیدن به غلظت نهایی ۳۰٪ افزوده شد و نخستین فراکسیون فوکوئیدان در این مرحله طی سانتریفیوژ جداسازی و استخراج گردید (Fuc30). سپس، دو مرحله رسوب‌دهی متوالی دیگر به همین شکل تا رسیدن به غلظت نهایی ۵۰٪ و ۷۰٪ اتانول ادامه یافت و بازیابی فوکوئیدان‌های استخراج شده به صورت پله‌ای انجام شد. بازده استخراج فوکوئیدان مطابق فرمول زیر محاسبه گردید: [۷]

$$100 \times (\text{گرم جلبک استفاده شده} / \text{گرم پلی‌ساکارید}) = \text{بازده}(\%)$$

ارزیابی ویژگی‌های رنگی فوکوئیدان

جهت تعیین رنگ نمونه‌های پلی‌ساکاریدی با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج دیجیتالی هانتربل (CR-400 Chroma Meter, Minolta, Japan) مقادیر جزء روشنایی L از صفر تا ۱۰۰، جزء رنگی a واجد طیف رنگی سبز تا قرمز از ۱۲۰- تا ۱۲۰+ و جزء رنگی b واجد طیف رنگی آبی تا زرد از ۱۲۰- تا ۱۲۰+ تعیین شدند.

سنجش میزان سولفات

به این منظور، نمونه‌های فوکوئیدان در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ویال‌های شیشه‌ای آماده شد. پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ مولار اسید هیدروکلریک به هر نمونه، نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در آونی با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان، ۳/۸ میلی‌لیتر TCA (۳٪) با ۰/۲ میلی‌لیتر از هر نمونه ترکیب و ۱ میلی‌لیتر ژلاتین-کلرید باریوم به آن اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سرانجام جذب نمونه در ۳۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد نیز از نمک سولفات پتاسیم استفاده شد [۲۴].

ارزیابی پراکنش مولکولی

در ابتدا نمونه فوکوئیدان در آب مقطر (۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) حل شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها به وسیله یک غشای سلولزی فیلتر شدند. به منظور تجزیه و تحلیل ویژگی‌های مولکولی از سیستم آشکار کننده ضریب شکست (RefractoMax 521, Thermo Scientific) متصل به سیستم کروماتوگرافی با کارایی بالا (UHPLC, Dionex UltiMate 3000) و ستون TSK G5000 PW (7.5 × 600 mm; Toso Biosep, Montgomeryville, PA, US) استفاده شد. همچنین از فاز متحرکی، با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر/دقیقه و یک محلول آبی متشکل از ۰/۱۵ مولار NaNO_3 و ۰/۲۰ درصد NaN_3 استفاده شد [۲۵].

قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

بررسی میزان فعالیت ضد اکسیدانی فوکوئیدان با استفاده از رادیکال‌های ناپایدار ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید (۱-۲۵/۰ میلی گرم / میلی لیتر) با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی ۰/۰۶ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH ترکیب شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت تا رنگ آن تغییر کند. سپس جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه نتایج، از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مطابق فرمول زیر محاسبه گردید: [۲۶، ۲۷]

$$\text{درصد فعالیت خنثی کننده رادیکال آزاد} = \frac{(A - A_s)}{A} \times 100$$

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

قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS

ابتدا ۷ میکرولیتر ABTS در آب مقطر حل و با اتانول رقیق شده، تا جذب آن به میزان ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد. سپس ۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید (۱-۲۵/۰ میلی گرم / میلی لیتر) به ۱ میلی لیتر از محلول ABTS اضافه شد. محلول به مدت ۲۰ دقیقه در محیط فاقد نور و در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور مقایسه نتایج، از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۸]. درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد فعالیت خنثی کننده رادیکال آزاد} = \frac{(A - A_s)}{A} \times 100$$

که A جذب کنترل (۱۰۰ میکرولیتر اتانول با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ABTS) و A_s جذب نمونه می باشد.

قدرت کاهندگی یون آهن (Reducing power)

قدرت کاهندگی یون آهن با استفاده از روش Oyaizu اندازه‌گیری شد [۲۹]. بدین منظور، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۱/۰ میلی گرم / میلی لیتر با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار، pH برابر ۶/۶ و ۵۰۰ میکرولیتر از فری سیانات پتاسیم ۱٪ ترکیب شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر از TCA (۱۰٪)، مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ rpm) شد. سپس ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱٪، به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در نهایت جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش، ابتدا نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس به کمک تحلیل واریانس یک‌طرفه، تاثیر غلظت‌های متفاوت فوکوئیدان بر فعالیت زیستی بررسی شده و در صورت معنی‌دار بودن، جهت مقایسه میانگین‌ها و انتخاب بهترین غلظت، از آزمون Duncan استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و به منظور رسم نمودارها و گراف‌ها از نرم افزار Sigmaplot استفاده شد.

نتایج**بازده استخراج و محتوای سولفات فوکوئیدان**

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، بازده استخراج فراکسیون‌های فوکوئیدان جدا شده از *N. zanardinii* متفاوت و به ترتیب ۵/۳۳ درصد در Fuc30، ۲/۷۰ درصد در Fuc50 و ۱/۵۴ درصد در Fuc70 بود. اندازه‌گیری میزان سولفات نشان داد که محتوای استرهای سولفات بین ۶/۴۹ و ۲۵/۰۳ متغیر و بالاترین محتوای سولفات با عدد ۲۵/۰۳ درصد متعلق به فوکوئیدان‌های با وزن مولکولی متوسط (Fuc50) بود. این در حالی است که بزرگترین پلیمرهای فوکوئیدان (Fuc30) با ۶/۴۹ درصد از کمترین میزان سولفات برخوردار بودند.

جدول ۱. بازده استخراج و محتوای سولفات فراکسیون‌های فوکوئیدان به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii*

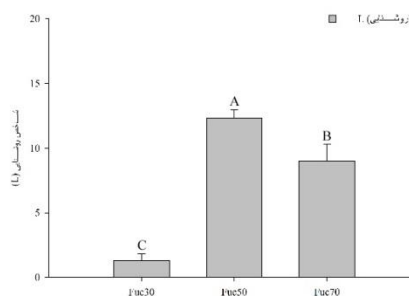
سولفات (درصد)	بازده (درصد)	فراکسیون‌های فوکوئیدان
6.49 ± 1.54	5.33	Fuc30
25.03 ± 1.16	2.70	Fuc50
14.92 ± 0.93	1.54	Fuc70

(الف)

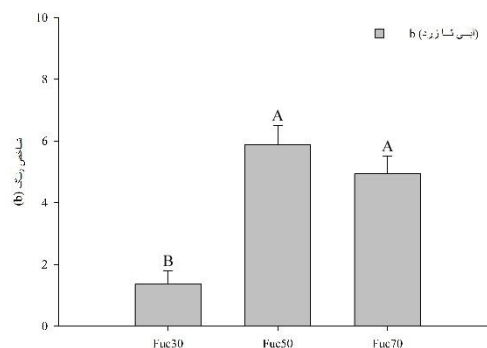
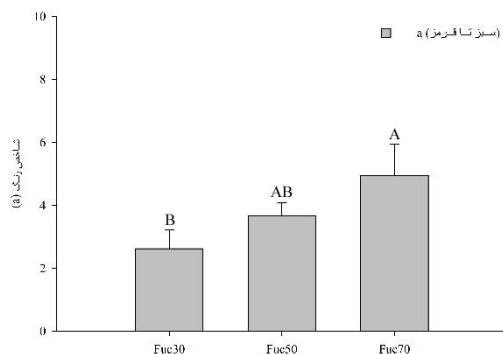


(ج)

(ب)



(د)



شکل ۱- (الف) فراکسیون‌های فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii*. (ب) نمودار شاخص روشنایی (L) در فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان (Fuc). (ج) نمودار شاخص رنگ سبز تا قرمز (a) در فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان (Fuc). (د) نمودار شاخص رنگ آبی تا زرد (b) در فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان (Fuc). حروف بزرگ نشانگر وجود اختلاف معنادار برون‌گروهی در فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان است ($p < 0.05$).

سنجش رنگ

تصاویر فوکوئیدان‌های استخراج شده در مطالعه حاضر در شکل (۱، الف) نشان داده شده است. همچنین، ویژگی‌های روشنایی و رنگ سه فراکسیون مختلف فوکوئیدان نیز مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در اشکال (۱، ب) تا (۱، د) نمایش داده شده است. از بین سه فراکسیون حاضر بیشترین روشنایی و بیشترین زردی مربوط به فراکسیون Fuc50 بود ($p < 0.05$). این در حالی است که فراکسیون Fuc30 دارای رنگی تیره‌تر و در نتیجه پایین‌ترین میزان روشنایی بود ($p < 0.05$). مثبت بودن شاخص a و b در تمامی فراکسیون‌ها نشان دهنده این است که طیف رنگی سبز یا آبی در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشده است.

پراکنش و وزن مولکولی فوکوئیدان

شکل ۲ نمودار شویس فوکوئیدان‌های مختلف بر روی ستون کروماتوگرافی TSK G5000 PW را نشان می‌دهد که حاکی از متفاوت بودن پراکنش وزن مولکولی در پلیمرهای مختلف می‌باشد. همانطور که نمودار شویس Fuc30 نشان می‌دهد، مولکول‌های بزرگتر فوکوئیدان (Fuc30) از دقیقه ۱۳/۴ شروع به خروج از ستون کروماتوگرافی نمودند و هرچه غلظت اتانول در طی فرایند بازیابی افزایش یافت، نقطه شروع شویس‌ها نیز به تأخیر افتاد. سپس، نمودار به سمت زمان‌های بالاتر تغییر جهت داده، به طوری که کوچکترین مولکول‌ها (Fuc70) در دقیقه ۱۹/۶ از ستون خارج شدند. به بیان بهتر، تغییرات قابل توجهی در نمودار شویس انواع فراکسیون‌ها مشاهده شد و کوچکتر شدن اندازه پلیمرها در فراکسیون‌های با غلظت بالاتر اتانول کاملاً مشهود بود. به طور کلی در ستون کروماتوگرافی اندازه‌طردی (SEC) یا ژل تراوشی (GPC) جداسازی مولکولی بر اساس اندازه صورت می‌گیرد و مولکول‌های با اندازه بزرگتر ابتدا و مولکول‌های با اندازه کوچکتر با تأخیر از ستون خارج می‌شوند. نتایج اندازه‌گیری نیز نشان داد که وزن مولکولی فوکوئیدان‌ها از $۷۳۱/۶۲۶ \times ۱۰^۳$ گرم/مول در Fuc30، به $۶۵۵/۷۶۹ \times ۱۰^۳$ گرم/مول در Fuc50 و $۱۰/۴۱۱ \times ۱۰^۳$ گرم/مول در Fuc70 تغییر یافت.

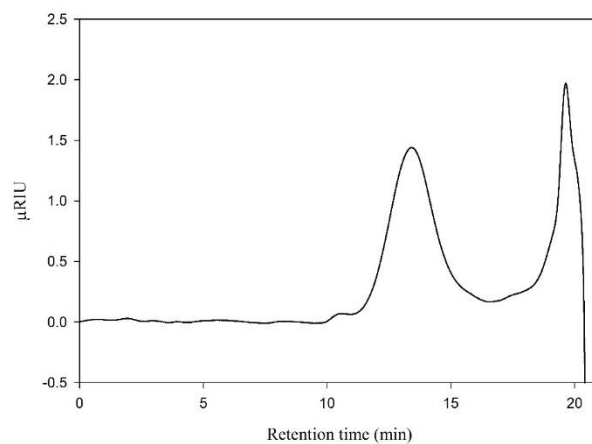
جدول ۲. وزن مولکولی فراکسیون‌های فوکوئیدان به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii*

فراکسیون‌های فوکوئیدان	وزن مولکولی ($10^3 \times$ g/mol)	
	پیک ۱	پیک ۲
Fuc30	731.626 ± 12.585	-
Fuc50	655.769 ± 12.784	88.754 ± 5.087
Fuc70	10.411 ± 0.101	-

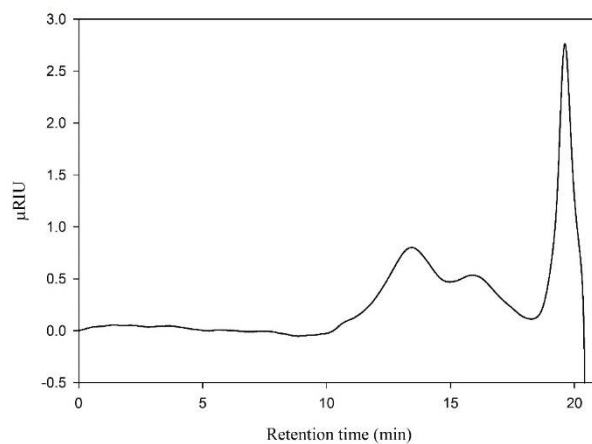
¹ - Size Exclusion chromatography

² - Gel permeation chromatography

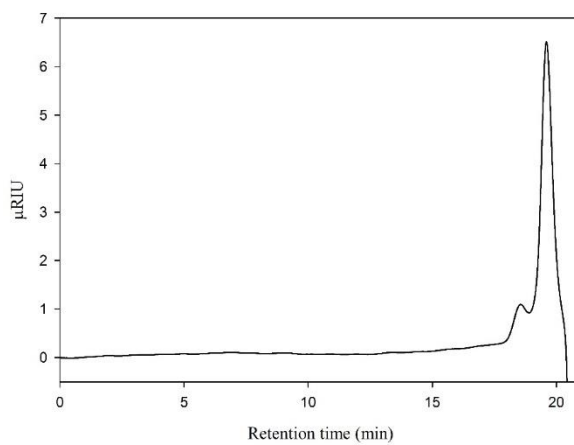
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۲. (الف) نمودار شویش Fuc30 بر روی ستون TSK G5000PW. (ب) نمودار شویش Fuc50 بر روی ستون TSK G5000PW. (ج) نمودار شویش Fuc70 بر روی ستون TSK G5000PW.

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدانی در شکل (۳، الف) نشان داده شده است. بررسی مهار رادیکال‌های آزاد در فراکسیون‌های مختلف نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر دارای بالاترین اثر ضد اکسیدانی بوده است ($p < 0.05$). همچنین میزان مهار رادیکال آزاد به طور کلی وابسته به غلظت بود و بین افزایش غلظت با درصد مهارکنندگی ارتباط مستقیمی وجود داشت. فراکسیون تولید شده با اتانول ۷۰ درصد در غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نسبت به سایر فراکسیون‌ها قابلیت مهارکنندگی بیشتری (۸۹/۴۰ درصد) نشان داد ($p < 0.05$). پایین‌ترین میزان (۴۳/۹۳ درصد) مهار رادیکال آزاد نیز متعلق به غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در همین فراکسیون (Fuc70) بود ($p < 0.05$). میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط اسید آسکوربیک در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ۷۱/۰۹ درصد بود.

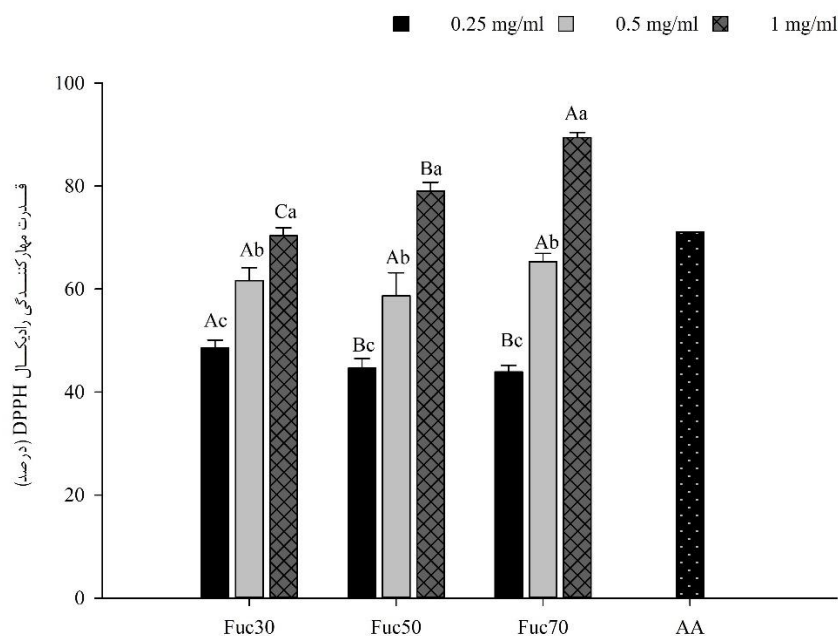
قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS

همانطور که در شکل (۳، ب) مشاهده می‌شود، در تمامی فراکسیون‌های به دست آمده با افزایش غلظت فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS نیز افزایش یافته است. قدرت مهارکنندگی فراکسیون‌ها در محدوده ۹۶/۱۰-۲۵/۰۵ درصد سنجش شد. با توجه به نتایج به دست آمده مشابه DPPH، غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در تمامی فراکسیون‌ها دارای بالاترین اثر ضد اکسیدانی بوده است. بالاترین اثر مهارکنندگی (۹۶/۱۰) مربوط به غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر فراکسیون Fuc30 و کمترین میزان (۲۵/۰۵) مربوط به غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر فراکسیون Fuc50 بود ($p < 0.05$).

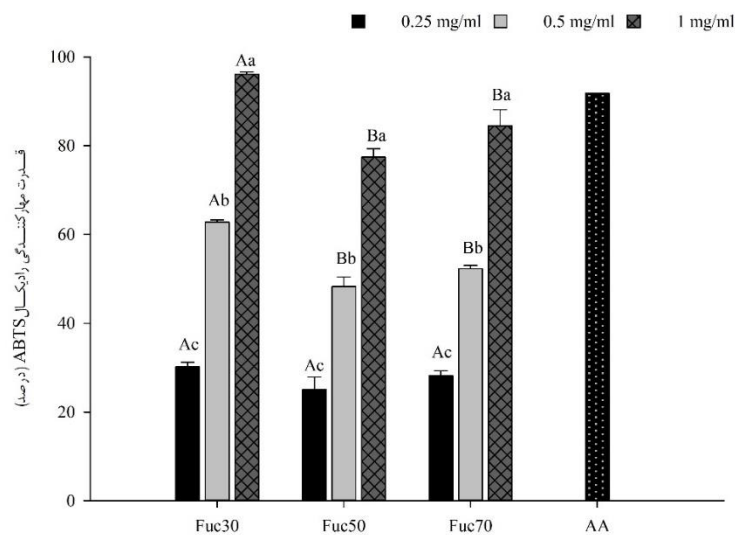
قدرت کاهندگی یون آهن

همانطور که در شکل (۳، ج) مشاهده می‌شود پتانسیل کاهندگی یون Fe^{3+} در تمامی فراکسیون‌های فوکوئیدان با افزایش غلظت اندکی افزایش یافته است ($p < 0.05$). غلظت ۱/۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در همه تیمارها دارای بالاترین اثر کاهندگی یون Fe^{3+} بوده است. در بین فراکسیون‌های مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر قابلیت کاهش یون Fe^{3+} مشاهده نشد ($p < 0.05$). استفاده از اسید آسکوربیک در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نیز در مقایسه با پلی‌ساکاریدهای مورد مطالعه بیشترین میزان کاهندگی آهن را نشان داد.

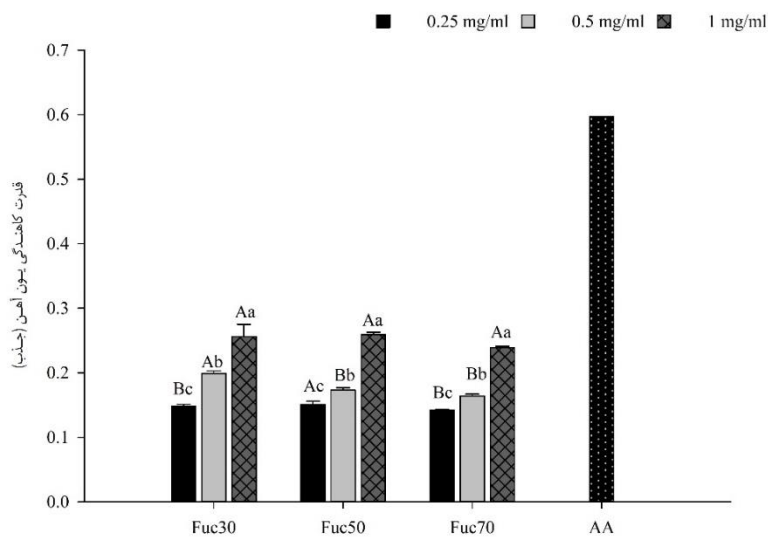
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۳- (الف) قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان (Fuc). (ب) قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS توسط فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان (Fuc). (ج) قدرت کاهندگی یون آهن (Fuc). حروف بزرگ نشانگر وجود اختلاف معنادار برون گروهی هر غلظت در فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان است ($p < 0.05$). حروف کوچک نشانگر اختلاف معنادار درون گروهی بین غلظت‌های مختلف در هر فراکسیون فوکوئیدان است ($p < 0.05$). اسید آسکوربیک (AA) با غلظت ۱/ میلی گرم / میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

بحث

در مطالعه فوکوئیدان جلبک‌های قهوه‌ای شاهد عوامل تاثیرگذار بسیاری بر میزان بازده استخراج و ویژگی‌های ترکیب شیمیایی آن هستیم. از جمله این عوامل می‌توان به روش استخراج، نوع گونه جلبکی، شرایط رشد جلبک و فصل برداشت اشاره کرد [۳۰]. در پژوهش حاضر که بر روی جلبک *N. zanardinii* انجام شد، بازده استخراج فوکوئیدان بین ۱/۵۴ تا ۵/۳۳ درصد متغیر بود که این اعداد مشابه درصدهایی است که قبلاً از فوکوئیدان جلبک‌های *Laminaria japonica* (۱/۸ درصد)، *Cystoseira indica* (۵/۷ درصد) گزارش شده است [۳۱، ۳۲]. نتایج مرتبط با رسوب‌دهی پله‌ای در غلظت‌های مختلف اتانول بیانگر آن بود که فوکوئیدان استخراج شده توسط حلال آبی از گونه *N. zanardinii* بیشتر حاوی پلیمرهایی با وزن‌های مولکولی بالاتر می‌باشد، به طوری که بازده آن از مجموع بازده دو سطح دیگر بیشتر بود. این در حالی است که وزن‌های مولکولی پایین‌تر همان گونه که انتظار می‌رفت در غلظت‌های بالاتر اتانول رسوب نمودند که البته میزان آن نیز نسبتاً پایین‌تر بود. در مطالعه دیگری که روی جلبک *N. zanardinii* انجام شد بازده استخراج فوکوئیدان با روش‌های مختلف در محدوده ۳/۶ تا ۱۳/۱۵ درصد متغیر بود [۳۳]. تصاویر پودر فوکوئیدان‌های به دست آمده به همراه نتایج ارزیابی رنگ نیز به وضوح نشان می‌دهد که علیرغم انجام فرآیند رنگ‌بری، همچنان رنگدانه‌هایی همراه با حلال آبی استخراج می‌شوند که با فوکوئیدان‌های با وزن مولکولی بالاتر رسوب می‌نمایند و به احتمال زیاد با یکدیگر دارای پیوندهایی در سطح مولکولی می‌باشند که این فرضیه نیازمند تحقیقات بیشتر است.

بر طبق گزارش‌ها، گروه‌های عاملی پلی‌ساکاریدها مانند گروه سولفات بر فعالیت ضد اکسیدانی این ترکیبات تاثیر قابل توجهی دارد. بر این اساس میزان سولفات در فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان جلبک *N. zanardinii* مورد اندازه‌گیری قرار گرفت که مقادیر متنوعی از ۶/۴۹ تا ۲۵/۰۳ درصد را نشان داد. این میزان در مقایسه با محتوای سولفات موجود در فوکوئیدان جلبک *Ascophyllum nodosum* (بین ۶/۱۰ تا ۲۹/۳۳ درصد) به میزان مشابهی بوده است [۳۴]. وزن مولکولی فراکسیون‌های فوکوئیدان در مطالعه حاضر بین ۱۰/۴۱۱ تا ۷۳۱/۶۲۶ کیلودالتون متغیر بود. در پژوهشی که بر روی جلبک *N. zanardinii* انجام گرفت وزن مولکولی فوکوئیدان خام استخراج شده با حلال آبی ۱۲۵۴ کیلودالتون گزارش شد که نشان می‌دهد نوع گونه جلبکی، شرایط رشد و نوع روش استخراج اثر زیادی بر وزن مولکولی پلی‌ساکاریدها دارد [۷]. یافته‌های بالا بیانگر آن است که در این گونه می‌توان به منظور دستیابی به فوکوئیدان‌هایی با ترکیب شیمیایی، ویژگی‌های مولکولی و رنگ متفاوت از سطوح مختلف اتانول جهت بازیابی پس از استخراج استفاده نمود.

فعالیت ضد اکسایشی فوکوئیدان مانند سایر ترکیبات دارای خواص مشابه، شامل مکانیسم‌های متنوعی است؛ از جمله مهار رادیکال‌های آزاد، فعال یا مسدودسازی مسیرهای آنزیمی مرتبط با استرس اکسیداتیو و اتصال به یون‌های فلزی. به منظور مقایسه نتایج حاصل از آزمایش‌های ضد اکسایشی مختلف و سنجش اعتبار آنها، نیاز به یک آزمایش استاندارد می‌باشد. ارزیابی قابلیت مهار رادیکال آزاد ناپایدار DPPH روشی است که به عنوان شاخصی برای بررسی عملکرد ترکیبات ضد اکسایشی اهداکننده هیدروژن استفاده می‌شود و طی این واکنش DPPH یک اتم هیدروژن دریافت کرده و رنگ بنفش خود را از دست می‌دهد [۳۵، ۳۶]. در مطالعه پیشین بر روی جلبک *N. zanardinii* درصد مهارکنندگی فوکوئیدان خام استخراج شده با حلال آبی در غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ۶۳/۴۱ درصد گزارش شد که پایین‌تر از مقادیر مطالعه حاضر می‌باشد [۳۷]. استفاده از رادیکال آزاد ABTS روشی دیگر است که به طور گسترده جهت ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی استفاده می‌شود. مولکول بی‌رنگ ABTS به واسطه اکسیدان‌های مختلف نظیر پتاسیم پرسولفات به رادیکال $ABTS^{+}$ تبدیل شده و رنگ سبز آبی به خود می‌گیرد [۳۸]. در این آزمایش شدت بی‌رنگ شدن محلول که ناشی از حضور ضد اکسیدان می‌باشد، میزان مهار رادیکال ABTS را نشان می‌دهد [۲۸]. در پژوهشی که اخیراً بر روی فوکوئیدان جلبک *N. zanardinii* انجام شد قدرت مهارکنندگی این رادیکال توسط فوکوئیدان خام و سایر فراکسیون‌ها در محدوده ۵/۱ تا ۸۸/۴۰ درصد گزارش شده است، در پژوهش حاضر این بازه بین ۲۵/۰۵ تا ۹۶/۱۰ درصد مشاهده شد که بیانگر قدرت مهارکنندگی بیشتر در تمامی غلظت‌ها است [۳۷]. مقایسه عملکرد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS در مطالعه ذکر شده و مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هرچند گونه مورد استفاده در هر دو پژوهش یکسان بوده‌اند اما روش استخراج بر روی خواص ضد اکسایشی فوکوئیدان‌های استخراج شده تاثیر

قابل توجهی داشته است. ارزیابی کاهندگی آهن، آزمونی است که به طور گسترده جهت اندازه‌گیری فعالیت ضداکسایشی به کار می‌رود و در طی آن حضور عوامل کاهنده در حلال باعث احیای کمپلکس Fe^{3+} / فری‌سیانید به Fe^{2+} / فروس می‌شود. قدرت احیاکنندگی در حقیقت توانایی الکترون‌دهی یک ترکیب ضداکسایشی را نشان می‌دهد. از آنجایی که یون آهن به عنوان یک ترکیب حد واسط در مسیر اکسیداسیون چربی‌ها حضور دارد، ترکیباتی با توانایی احیای یون آهن در واقع به فعالیت ضداکسایشی درون سلول کمک می‌کنند و با شکستن زنجیره واکنش به عنوان آنتی‌اکسیدان اولیه و ثانویه عمل می‌کنند [۳۹، ۴۰]. در مطالعه حاضر فراکسیون‌های مختلف فوکوئیدان اگرچه دارای پتانسیل احیاکنندگی یون آهن بودند ولی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری از نظر سطح فعالیت نداشتند.

ارزیابی رابطه ویژگی‌های ساختاری و مولکولی نیز در مطالعه حاضر بیانگر آن است که وزن‌های مولکولی پایین‌تر که دارای سولفات بیشتری نیز می‌باشند از نظر قابلیت اهدای الکترون و مهار رادیکال‌های آزاد دارای پتانسیل بیشتری می‌باشند. البته، در مهار رادیکال آزاد ABTS میزان مهارکنندگی فراکسیون با وزن مولکولی بیشتر و سولفات کمتر به میزان قابل توجهی بیشتر از فراکسیون‌های دیگر بود که این خود می‌تواند به دلیل حضور رنگدانه‌ها و ترکیبات احتمالی فنولی متصل به آن باشد که این خود نیازمند آزمایشات دقیق‌تری است. در ارتباط با همین گونه، مطالعه پیشین گروه حاضر نشان داد که فوکوئیدان استخراج شده با حلال آبی در شرایط یکسان که به صورت یکجا بوسیله اتانول ۷۰ درصد بازیابی شده است و حاوی کلیه پلیمرها با وزن‌های مولکولی مختلف است دارای فعالیت ضداکسایشی قابل توجه اما کمتری نسبت به مطالعه کنونی می‌باشد [۳۷]. همچنین، کاهش وزن مولکولی در شرایط دمایی و اسیدی مختلف در این فوکوئیدان از ۹۵۶ کیلودالتون در فوکوئیدان مادر به ۴۱۱ کیلودالتون در هیدرولیز به دست آمده توانست مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را به ترتیب تا ۸۴/۵ و ۸۸/۵ درصد افزایش دهد [۳۷]. در مطالعه‌ای مشابه که بر روی هیدرولیز اسیدی فوکوئیدان جلبک *Padina pavonica* نیز صورت گرفت کاهش وزن مولکولی از ۳۷۸۱ کیلودالتون تا ۲۰۵۹ کیلودالتون سبب افزایش چشمگیر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهش یون Fe^{3+} به ترتیب تا ۴۷/۹ درصد و جذب ۰/۴۷ شد [۴۱]. یافته‌ها بیانگر این است که کاهش وزن مولکولی و افزایش سولفات می‌تواند با بالا بردن دسترسی گروه‌های عاملی به رادیکال‌های آزاد و یون‌های فلزی سبب تسهیل فرآیند الکترون‌دهندگی و در نتیجه توقف واکنش‌های اکسیداسیونی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که با استفاده از رسوب‌دهی پله‌ای فوکوئیدان پس از استخراج آبی می‌توان پلیمرهای فوکوئیدانی با ویژگی‌های مختلف شیمیایی و مولکولی به دست آورد. همچنین، تمامی فراکسیون‌های فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* در سطح قابل قبولی واجد فعالیت ضداکسایشی هستند و همگی در غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بیشترین پتانسیل ضداکسایشی را در هر سه سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH، ABTS و احیای یون Fe^{3+} نشان دادند. بنابراین، رسوب‌دهی پله‌ای فوکوئیدان توانست پلیمرهایی تولید نماید که روی مهار واکنش‌های ضداکسایشی اثر مثبتی نشان دهند. به طور کلی با مقایسه نتایج پژوهش حاضر و مطالعات قبلی می‌توان اظهار داشت که وزن مولکولی، فعالیت زیستی و رنگ فوکوئیدان‌ها به طور قابل توجهی با نوع گونه و روش استخراج مرتبط است. از آنجا که در فرآیند استخراج مطالعه حاضر، به جز جلبک بومی ایران سایر مواد شامل آب‌مقطر، استون، اتانول و کلسیم کلراید است که به راحتی در دسترس می‌باشند؛ می‌توان روش استخراج رسوب‌دهی پله‌ای را جهت تولید فراکسیون‌های اثربخش فوکوئیدان بدون انجام فرآیندهای طولانی و هزینه‌بر در مقیاس صنعتی پیشنهاد نمود. همچنین با توجه به این نکته که نتایج پژوهش حاضر نشان داد وزن مولکولی پایین لزوماً ارتباط مستقیمی با افزایش خواص ضداکسایشی ندارد، بررسی اثر این روش استخراج بر سایر ویژگی‌های فوکوئیدان گونه *N. zanardinii* و یا مقایسه این روش استخراج در سایر گونه‌های مورد استفاده در صنعت می‌تواند برای مطالعات آینده جالب توجه باشد.

منابع

1. Iso H. Lifestyle and cardiovascular disease in Japan. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2011; 1102040343.
2. Leal MC, Munro MH, Blunt JW, Puga J, Jesus B, Calado R, Rosa R, Madeira C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Natural product reports*. 2013; 30(11): 1380-90.
3. McHugh DJ. Production, properties and uses of alginates. *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. FAO. Fish. Tech. Pap. 1987; 288: 58-115.
4. Tseng CK. Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology*. 2001; 13(4): 375-80.
5. Holdt SL, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*. 2011; 23(3): 543-97.
6. Gharanjik BM, Rohani Ghadikolaei K. Atlas of the sea algae of the Persian Gulf and Oman sea coasts. Fisheries Research Publication. 2009.
7. Tabarsa M, Dabaghian EH, You S, Yelithao K, Cao R, Rezaei M, Alboofetileh M, Bitá S. The activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways of RAW264. 7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddinina zanardinii*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020; 148: 56-67.
8. Kylin H. Biochemistry of sea algae. *HZ Physiol. Chem*. 1913; 83: 171-197.
9. Hosseinpouri A, Mohammadi M, Obeidi N. Fucoidan, Multifunctional Polysaccharide. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2019; 9(2).
10. Li B, Zhao RX, Wei XJ. Anticoagulant activity of fucoidan from *Hizikia fusiforme*. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 2008; 19(1): 22.
11. Fan L, Tongchun T, Yanchun S, Yang L, Shaolun Z. Study on anti-virus effect of fucoidan in vitro. *Baiqiuen Yike Daxue Xuebao*. 1995; 21(3): 255-7.
12. Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*. 2007; 17(5): 541-52.
13. Qu G, Liu X, Wang D, Yuan YI, Han L. Isolation and characterization of fucoidans from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Ocean University of China*. 2014; 13(5): 851-6.
14. Kwak JY. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Marine drugs*. 2014; 12(2): 851-70.
15. Xue M, Tian Y, Sui Y, Zhao H, Gao H, Liang H, Qiu X, Sun Z, Zhang Y, Qin Y. Protective effect of fucoidan against iron overload and ferroptosis-induced liver injury in rats exposed to alcohol. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 153:113402.

16. Andrade EL, Bento AF, Cavalli J, Oliveira SK, Freitas CS, Marcon R, Schwanke RC, Siqueira JM, Calixto JB. Non-clinical studies required for new drug development-Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016; 49.
17. Blomhoff R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology*. 2005; 16(1): 47-54.
18. Alboofetileh M, Rezaei M, Tabarsa M, Rittà M, Donalisio M, Mariatti F, You S, Lembo D, Cravotto G. Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinina zanardinii*. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 124:131-7.
19. Dobrinčić A, Balbino S, Zorić Z, Pedisić S, Bursać Kovačević D, Elez Garofulić I, Dragović-Uzelac V. Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Marine drugs*. 2020; 18(3):168.
20. Zayed A, Ulber R. Fucoidans: Downstream processes and recent applications. *Marine drugs*. 2020; 18(3):170.
21. Gan A, Baroutian S. Subcritical water extraction for recovery of phenolics and fucoidan from New Zealand Wakame (*Undaria pinnatifida*) seaweed. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2022; 190:105732.
22. Karnjanapratum S, Tabarsa M, Cho M, You S. Characterization and immunomodulatory activities of sulfated polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens*. *International journal of biological macromolecules*. 2012; 51(5): 720-9.
23. Yang, C, Chung D, Shin I.S, Lee H, Kim J, Lee Y, & You S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008; 43(5), 433–437.
24. Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*. 1962; 84(1): 106.
25. You S, Lim ST. Molecular characterization of corn starch using an aqueous HPSEC-MALLS-RI system under various dissolution and analytical conditions. *Cereal chemistry*. 2000; 77(3): 303-8.
26. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995; 28(1): 25-30.
27. 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; 101: 703-11.
28. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999; 26(9-10): 1231-7.

29. Oyaizu M. Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*. 1986; 44: 307-315.
30. Wijesinghe WA, Jeon YJ. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2012; 88(1): 13-20.
31. Bahramzadeh S, Tabarsa M, You S, Li C, Bitá S. Purification, structural analysis and mechanism of murine macrophage cell activation by sulfated polysaccharides from *Cystoseira indica*. *Carbohydrate polymers*. 2019; 205: 261-70.
32. Lee SH, Ko CI, Ahn G, You S, Kim JS, Heu MS, Kim J, Jee Y, Jeon YJ. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydrate polymers*. 2012; 89(2): 599-606.
33. Alboofetileh M, Jeddi S. Extraction process of sulfate polysaccharide (fucoidan) from brown seaweeds. *Advanced Aquaculture Sciences Journal*. 2022; 6(1):23-33.
34. Yuan Y, Macquarrie D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate polymers*. 2015; 129: 101-7.
35. Kumar SP, Kekuda TP, Vinayaka KS, Sudharshan SJ. Anthelmintic and antioxidant efficacy of two macrolichens of Ramalinaceae. *Pharmacognosy Journal*. 2009; 1(4): 238-42.
36. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology (SJST)*. 2004; 26(2): 211-9.
37. Mousavi NS, Tabarsa M, Ahmadi H. Evaluation of relationship between molecular weight and antioxidant properties of hydrolyzed fucoidan from brown seaweed *Nizamuddinina zanardinii*. *Fisheries Science and Technology*. 2022; 11(2): 153-64.
38. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004; 37(4): 277-85.
39. Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food chemistry*. 2008; 107(2): 707-13.
40. Hong-Yu L, Bin W, Chun-Guang Y, You-le Q, Chuan-ling S. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010; 4(23): 2557-65.
41. Khajavi S, Tabarsa M, Ahmadi Gavligi H, Rezaie M. 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. *Fisheries Science and Technology*. 2021; 10(1): 31-45.

Evaluation of stepwise precipitation of fucoidan from brown seaweed *Nizamuddinina zanardinii* on its chemical, molecular and antioxidant properties

Masoumeh Ghanbari Kiasara¹, Mehdi Tabarsa^{2*}, Hassan Ahmadi Gavlighi³, Amin Mokhlesi⁴

1- Department of Marine Biology, Tarbiat Modares University, Nur, Iran

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

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

4- Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Heinrich Heine University, Dusseldorf, Germany

ABSTRACT

The aim of the current study was the evaluation of stepwise precipitation of fucoidan extracted from seaweed *Nizamuddinina zanardinii* and the assessment of relationship between sulfate content and molecular weight with its antioxidant activity. After the removal of pigments and low molecular weight compounds, fucoidan extracted with water was precipitated using different concentrations of ethanol at three levels (30, 50 and 70%). Three fractions of Fuc30, Fuc50 and Fuc70 showed molecular weights of 731.62, 655.76 and 10.41×10^3 g/mol, respectively. The content of sulfate esters in the obtained fractions were measured between 6.49-25.03%. The color evaluation of produced fucoidans by a digital chroma meter indicated the highest lightness index for Fuc50 fraction. Antioxidant results were varying in DPPH radical (43.93-89.40%) and ABTS radical (25.05-96.10%) scavenging activities as well as Fe^{3+} reducing power (Abs of 0.142-0.259). Overall, the findings of the present study indicated that stepwise precipitation of fucoidan from *N. zanardinii* leads to production of fractions with different chemical and molecular weight characteristics and antioxidant activities. Besides, although all isolated fucoidan fractions are introduced as potent antioxidant compounds, but in ABTS radical scavenging activities and Fe^{3+} reducing power, polymers possessing higher molecular weight (Fuc30) exert higher antioxidant activities.

KEYWORDS: Fucoidan, *Nizamuddinina zanardinii*, Extraction, Molecular Weight, Antioxidant

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 11 Aug 2022

Accepted: 6 Dec 2022

ePublished: 21 Dec 2022

* Corresponding Author:

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

© Published by Tarbiat Modares University