

بررسی ویژگی‌های فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای پادینا (*Padina sp.*) و سارگاسوم (*Sargassum sp.*)

فرزانه وردی‌زاده^۱، صدیقه بابایی^{۱*}، محمود ناصری^۱، محمد تقی گلمکانی^۲، مینا اسمعیلی^۳

۱- بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲- بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۳

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۳۹۹/۹/۲۸

* نویسنده مسول:

s-babaei@shirazu.ac.ir

آدرس: فارس، شیراز، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، بخش

مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست

کد پستی: ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶

در مطالعه حاضر خصوصیات ساختاری و پاداکسندگی فوکوئیدان استخراج شده از دو ماکرو جلبک سارگاسوم و پادینا از سواحل خلیج فارس مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. فوکوئیدان خام به کمک اتانول و آب داغ استخراج و پس از محاسبه بازده استخراج، قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، توانایی کاهندگی آهن، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت گرفت. در نهایت محتوای مونوساکاریدهای آن با دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت. میانگین بازده فوکوئیدان در جلبک سارگاسوم (0.42 ± 0.00 ٪) بیشتر از پادینا (0.28 ± 0.98 ٪) بود ($P < 0.05$). میزان IC_{50} مهار رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان استخراج شده جلبک سارگاسوم و پادینا به ترتیب برابر با 0.1 و 0.14 mg/ml بود که این مقادیر بیشتر از پاداکسندگی صنعتی بوتیل هیدروکسی تولوئن بود ($P < 0.05$). میزان کاهندگی آهن هر دو نمونه فوکوئیدان، با افزایش غلظت افزایش یافت. نتایج حاصل از عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی نشان داد فوکوئیدان هر دو جلبک دارای سطحی نامنظم هستند درحالیکه انسجام ساختاری دارند و جلبک پادینا دارای برجستگی‌های بیشتر در سطح بود. محتوای مونوساکاریدی شامل قندهای گلوکز، مانوز و زایلوز بود. میزان قند گلوکز و زایلوز در فوکوئیدان جلبک سارگاسوم بیشتر از پادینا بود ($P < 0.05$). با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، پلی ساکاریدهای استخراج شده از دو جلبک سارگاسوم و پادینا توانایی پاداکسندگی قوی داشته و می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزینی پاداکسندگی‌های صنعتی در مواد غذایی باشند.

کلید واژه‌ها: پلی ساکارید سولفات، خلیج فارس، پاداکسندگی طبیعی، SEM، FRAP

مقدمه

در دهه‌های اخیر نگرانی زیادی در خصوص اثرات سمی پاداکسندگی‌های مصنوعی و اثرات جانبی آن‌ها بر سلامت انسان وجود دارد، بطوریکه بسیاری از کشورها استفاده از ترکیبات پاداکسندگی مصنوعی در محصولات غذایی را محدود کرده‌اند [۱]. از سوی دیگر رویکرد استفاده از پاداکسندگی طبیعی مانند ترکیبات زیست فعال حاصل از ماکرو جلبک‌های دریایی با اقبال روبرو شده است.

ماکروجلبک‌ها (Seaweed) با توجه به دارا بودن تنوع گونه‌ای زیاد، پراکندگی گسترده، اختصاصی بودن و بسیاری از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیستی دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای هستند و در سال ۲۰۱۹ حدود ۳۰ میلیون تن تولید جهانی آنها ثبت شده است [۲]. این حجم بالای آبی‌زی پروری در دهه اخیر نشان‌دهنده توجه ویژه به این گروه از آبزیان می‌باشد.

وجود ترکیباتی موثر علیه استرس‌های اکسیداتیو در جلبک‌ها، که طی مراحل مختلف زندگی در برابر عوامل اکسایاری از جمله دمای بالا، مقادیر بالای اکسیژن و نور قرار گرفته‌اند، سبب شده این منابع دارای قدرت بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد در برابر شرایط سخت زیست‌گاهشان باشند؛ لذا در دهه‌های اخیر محصولات متنوع ضد تومور، ضد ویروس و غیره از آنها استخراج شده است [۳]. ماکروجلبک‌ها می‌توانند منبع غنی از متابولیت‌های عملکردی مثل پلی‌ساکاریدها، پپتیدها، چربی‌ها، اسیدهای آمینه، پلی‌فنول‌ها و نمک‌های معدنی باشند بنابراین قابلیت استفاده در صنایع غذایی، آرایشی، افزودنی‌های خوراک دام و تهیه‌ی کود را دارند [۴].

دیواره‌ی سلولی جلبک‌ها دارای ساختاری پیچیده و ناهمگون شامل یک اسکلت فیبری و یک ماتریکس آمورف می‌باشد. پلی‌ساکاریدها از ماکرومولکول‌های زیستی هستند که به عنوان اجزاء سازنده‌ی دیواره‌ی سلولی جلبک به شمار می‌روند. این ترکیبات خنثی، اسیدی، خطی و یا ترکیبی می‌باشند. پلی‌ساکاریدها، پلیمرهایی هستند که با حذف یک مولکول آب بین هر جفت واحدهای منوساکارید به وجود آمده و باعث ایجاد یک پیوند گلیکوزیدی می‌شوند. ویژگی‌های ساختاری یک پلی‌ساکارید مانند گروه‌های هیدروکسیل، نوع و ماهیت پیوندهای گلیکوزیدی (آلفا یا بتا)، وضعیت گروه‌های سولفات، طول زنجیره، موقعیت شاخه‌ها و در نهایت وزن مولکولی، باعث تفاوت در عملکرد بیولوژیکی آنها می‌گردد [۵]. عمده‌ترین پلی‌ساکاریدهای سولفات‌های استخراج شده از جلبک‌ها شامل گالاکتان از جلبک‌های قرمز (Rhodophyceae)، الوان از جلبک‌های سبز (Chlorophyceae) و فوکوئیدان از جلبک‌های قهوه‌ای (Phaeophyceae) می‌باشد [۶].

کشور ایران به لحاظ موقعیت جغرافیایی و بهره‌مندی از منابع آبی شمال و جنوب کشور، از وجود گونه‌های مختلف جلبکی بهره‌مند است، در این میان، خلیج فارس با دما و شوری بالا، زیستگاه منحصر به فردی به لحاظ تنوع ماکروجلبک‌ها می‌باشد. جنس‌های سارگاسوم، گراسیلاریا، آکانتوفورا، لورنسیا، پادینا، کالریا، هیپنئا و اینترومورفا از جمله جلبک‌های خلیج فارس می‌باشند [۷]. در این مطالعه ابتدا فوکوئیدان از دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای سارگاسوم و پادینا از سواحل خلیج فارس استخراج و سپس خواص پاداکسندگی و ساختاری آنها مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی جلبک

جلبک‌های *Sargassum sp.* و *Padina sp.* از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک (از سواحل بوشهر) تهیه گردید. ماکروجلبک‌ها تمیز و سپس چند مرحله با آب شیرین شستشو و در آون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد خشک شدند [۸]. سپس با آسیاب (یا مخلوط کن) پودر و در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

استخراج فوکوئیدان و بازده استخراج

ابتدا ۳۰ گرم پودر خشک هر جلبک به طور جداگانه به نسبت ۱ به ۲۰ با اتانول (۸۰٪) به مدت یک شب در دمای اتاق جهت حذف رنگدانه‌ها، ترکیبات ثانویه و چربی قرار گرفت و سوپرناتانت به کمک قیف بوخنر و پمپ خلا جدا سازی شد. رسوب جلبکی جهت حذف رنگدانه‌ها و چربی‌های باقی مانده سه الی چهار مرتبه با استون شست و شو گردید. بعد از آخرین مرحله شست و شو، به مدت ۲۴ ساعت زیر هود جهت حلال‌پرانی و خشک شدن قرار داده شد. در ادامه جلبک رنگ‌زدایی شده به نسبت ۱ به ۲۰ وزنی- حجمی با آب مقطر مخلوط و روی استیرر

(RHB2 IKA، آلمان) به مدت سه ساعت در دمای ۶۵ الی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از این مرحله، جهت جداسازی سوپرناتانت، سانتریفیوژ (United Kingdom, Benchtop Centrifuges, K241R) به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm، و دمای اتاق انجام شد. سوپرناتانت جمع‌آوری شده، جهت تغلیظ روی حمام آبی با دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و حدود ۱۰ الی ۱۵ درصد حجم مایع نهایی تبخیر شد. پس از این مرحله سوپرناتانت به نسبت ۱٪ وزنی/وزنی با کلسیم کلرید مخلوط شد (جهت حذف آلزینات). بعد از یک شب در یخچال (JTCL)، ژال تجهیز، ایران)، کلسیم کلرید به همراه آلزینات به کمک سانتریفیوژ (۵۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه، دمای اتاق) جداسازی شد. به سوپرناتانت حاصل از این مرحله سه برابر حجمی - حجمی اتانول افزوده شد و به مدت یک شب در یخچال نگهداری شد. سپس پلی‌ساکاریدهای سولفات‌های رسوب داده شده با سانتریفیوژ (۵۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه، دمای اتاق) جداسازی و سه مرتبه با اتانول ۹۶٪ و دو مرتبه با استون شست و شو داده شدند. سپس رسوب فوکوئیدان خشک شد [۹ و ۱۰].

وزن خشک جلبک / ۱۰۰ × وزن خشک فوکوئیدان (گرم) = بازده (%)

ارزیابی فعالیت پاداکسندگی فوکوئیدان

قدرت پاداکسندگی فوکوئیدان با سنجش توانایی آن در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت احیای آهن به ترتیب زیر اندازه‌گیری شد.

سنجش مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH) ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. هر چه بر مقدار ماده آنتی‌اکسیدان افزوده شود، DPPH بیش‌تری مصرف شده و رنگ بنفش بیش‌تر به سمت زرد میل می‌کند [۱۶]. توانایی فوکوئیدان در مهار رادیکال آزاد DPPH بر اساس روش Wang و همکاران اندازه‌گیری شد. ابتدا ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره مورد نظر در حلال مربوطه تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۵ میلی‌مولار DPPH به نمونه و شاهد اضافه گردید. محلول حاصله، ورتکس و به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه در تاریکی نگه داری شد. در نهایت جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر در دستگاه الیزا (Cytation 3 imaging، ویرژن راهکار شناخت یافته، ایران) قرائت گردید و درصد مهارکنندگی از رابطه زیر به دست آمد. از BHT به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده گردید [۱۲].

۱۰۰ × (جذب نمونه شاهد / جذب نمونه - جذب نمونه شاهد) = مهارکنندگی رادیکال آزاد (%)

قدرت احیای آهن FRAP

برای اندازه‌گیری قدرت احیای آهن روش وانگ و همکاران بکار گرفته شد. بر این اساس برای اندازه‌گیری قدرت احیای آهن، ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (6.6 pH) ترکیب شد. سپس به آن ۲۵۰ میکرولیتر فری‌سیانید پتاسیم ۱٪ اضافه شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به آن ۲۵۰ میکرولیتر TCA ۱۰٪ اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ، ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با ۵۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰۰ میکرولیتر از کلرید آهن مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا قرائت شد [۱۳].

آماده‌سازی و تزریق نمونه به HPLC

ابتدا حدود ۲۵ میلی‌گرم نمونه به طور جداگانه در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به طور کامل حل شد، سپس ۲ میلی‌لیتر تری‌فلئورواستیک اسید (TFA) به آن‌ها اضافه شد. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از این محلول جهت هیدرولیز به مدت ۳ ساعت درون آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از اتمام زمان لازم نمونه‌ها از آون خارج و پس از خنک شدن از فیلتر سرنگی نایلون ۴۵ میکرون عبور داده شد. نمونه تولید شده با حجم تزریق ۳۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز (KNAUER/AZURA system، آلمان) مجهز به ستون *C18, 4.6 250 mm, 5 μm و با نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه با حلال آب و استونیتریل (۷۰:۳۰ حجمی- حجمی)، در مدت زمان ۲۰ دقیقه و در دمای محیط تزریق شد. به منظور تشخیص پیک تشکیل شده در زمان‌های اختصاصی، مونوساکارید-های گلوکز، مانوز و زایلوز به عنوان استاندارد به دستگاه تزریق شدند [۱۴].

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy)

برای تصویربرداری، نمونه‌ها به صورت پودر به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز منتقل شدند، نمونه‌ها ابتدا توسط دستگاه پوشش دهنده طلا با مشخصات (Quorum Technologies, R- ES۱۵۰Q، انگلستان) پوشش و سپس به کمک دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی با مشخصات (TESCAN, TESCANA-Vega 3، جمهوری چک) عکس‌برداری شد [۱۵].

نتایج

بازده استخراج و نتایج HPLC

طبق جدول ۱، نتایج حاصل از آنالیز آماری مربوط به بازده فوکوئیدان نشان داد که بین بازده دو جلبک اختلاف معنادار وجود دارد و میانگین بازده فوکوئیدان در جلبک سارگاسوم ($0.4 \pm 0.10\%$) بیشتر از پادینا ($0.28 \pm 0.28\%$) است ($P < 0.05$). همچنین طبق جدول ۱ مونوساکاریدهای گلوکز، مانوز و زایلوز در فوکوئیدان حاصل از هر دو جلبک شناسایی و مقادیر آن‌ها به صورت درصد محاسبه شد، که در فوکوئیدان جلبک سارگاسوم مقادیر سه مونوساکارید بیشتر از جلبک پادینا بود. بین میزان گلوکز و زایلوز در سارگاسوم و پادینا اختلاف معنادار مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۱) بازده استخراج و مونوساکاریدهای موجود در فوکوئیدان دو جلبک سارگاسوم و پادینا

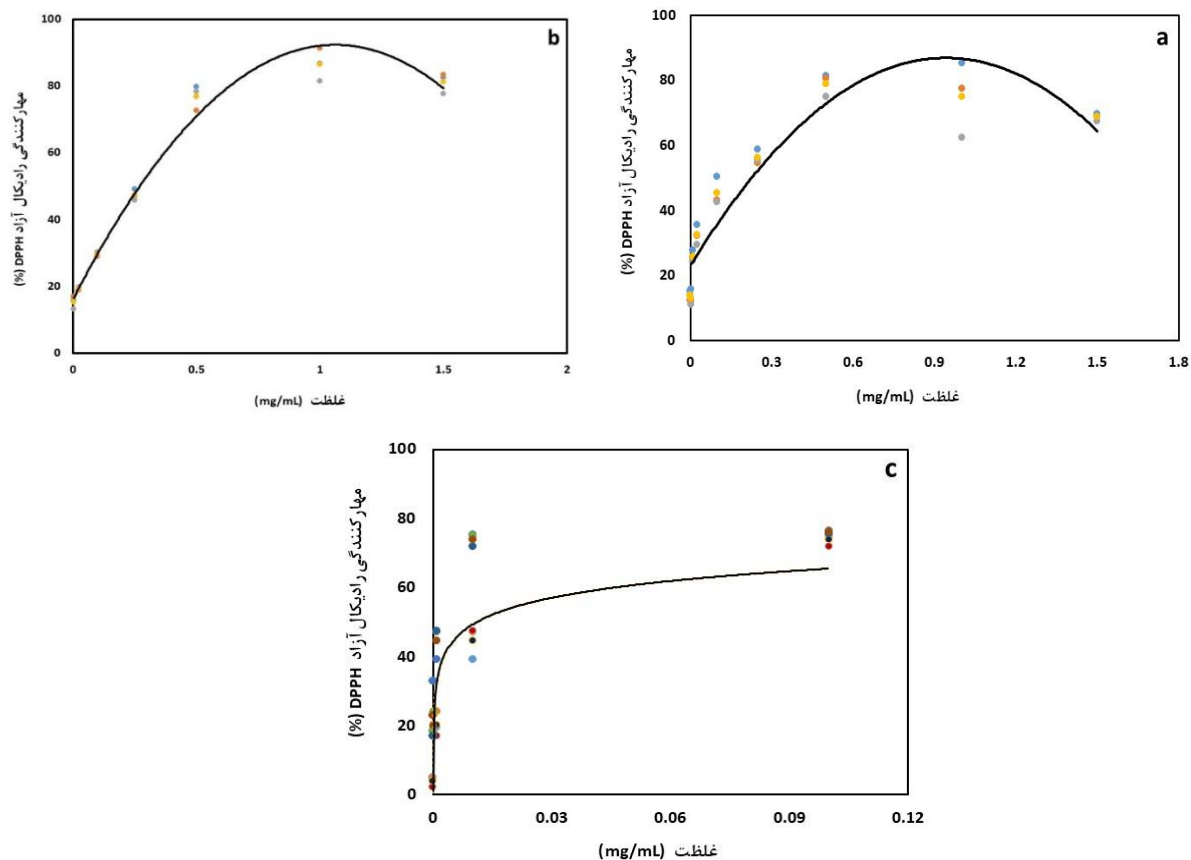
جلبک	بازده (%)			مونوساکاریدها (%)	
	سارگاسوم	پادینا	گلوکز	زایلوز	مانوز
سارگاسوم	$0.4 \pm 0.10^*$	0.28 ± 0.28	$18.15 \pm 2.31^*$	$2.3 \pm 0.49^*$	0.83 ± 0.02
پادینا	0.28 ± 0.28	0.4 ± 0.10	6.5 ± 2.21	0.4 ± 0.06	0.6 ± 0.08

* نشان‌دهنده معناداری در ستون می‌باشد ($P < 0.05$). نتایج میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشد.

مهار رادیکال آزاد DPPH

با توجه به شکل ۱، با افزایش غلظت فوکوئیدان، میزان مهار رادیکال آزاد افزایش یافت بطوریکه بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد در غلظت ۰/۵ mg/ml در نمونه سارگاسوم (a) و پادینا (b) به ترتیب برابر با $0.79 \pm 0.03\%$ و $0.76 \pm 0.03\%$ بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت فوکوئیدان، درصد مهار رادیکال آزاد ثابت شده یا روند نزولی در پیش می‌گیرد. در شکل 1c، منحنی استاندارد BHT به عنوان پاداکسنده صنعتی در غلظت‌های

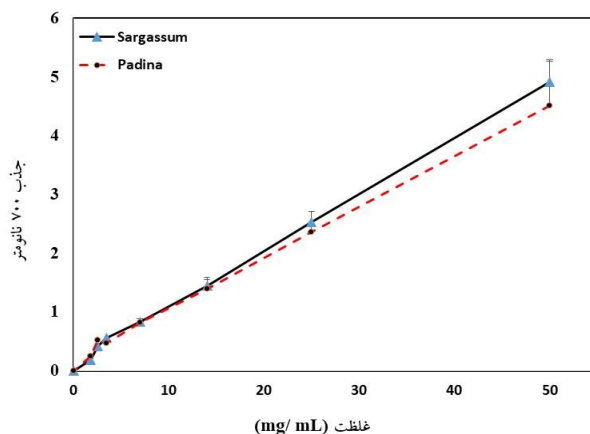
مختلف قابل مشاهده است. IC_{50} مهار رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان استخراج شده جلبک سارگاسوم و پادینا به ترتیب برابر با 0.05 ± 0.04 و 0.14 ± 0.1 mg/ml بود ($P \geq 0.05$) که این مقادیر بیشتر از پاداکسنده صنعتی BHT، با میزان $11 \mu\text{g/ml}$ بود ($P < 0.05$).



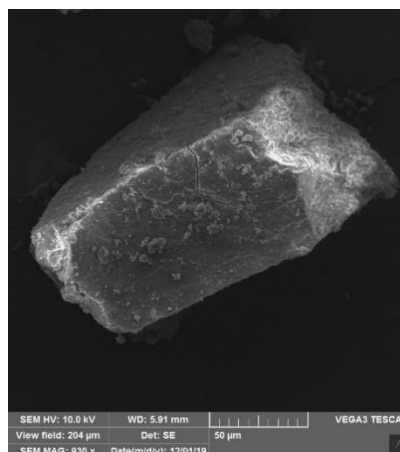
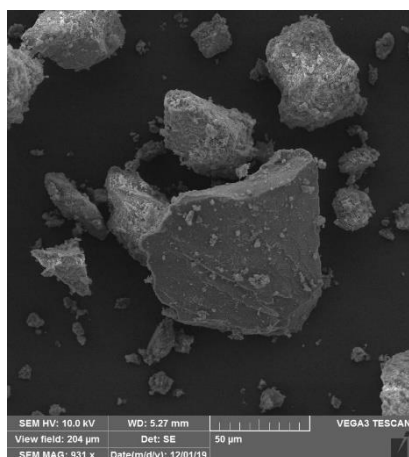
شکل ۱) مهار رادیکال آزاد DPPH توسط فوکوئیدان استخراج شده از (a) جلبک سارگاسوم، (b) جلبک پادینا و (c) BHT

کاهندگی آهن (FRAP) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy)

طبق شکل ۲ در پلی ساکارید سولفات حاصل از جلبک سارگاسوم و پادینا با افزایش غلظت، میزان جذب یا مقدار کاهندگی آهن نیز در طول موج 700 نانومتر افزایش یافت که تقریباً روند افزایش در هر دو نمونه یکسان بود. در شکل ۳ نیز تصاویر حاصل از SEM مربوط به پلی ساکارید سولفات هر دو جلبک نشان داده شده است. هر دو نمونه دارای برجستگی‌هایی در سطح می‌باشند و همچنین انسجام ساختاری قوی نشان دادند. فوکوئیدان جلبک پادینا دارای برجستگی‌ها و حفره‌های بیشتری در سطح بود.



شکل ۲) کاهندگی آهن در غلظت‌های مختلف فوکوئیدان استخراج شده از جلبک‌های سارگاسوم و پادینا



شکل ۳) میکروسکوپ الکترونی روبشی: تصویر سمت راست: فوکوئیدان جلبک سارگاسوم. تصویر سمت چپ: فوکوئیدان جلبک پادینا (بزرگنمایی ۹۳۰)

بحث

بازده فوکوئیدان

در مطالعات مختلف بازده استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها از جلبک‌های قهوه‌ای پادینا؛ *P. tetrastromatica* و *Padina gymnospora* به ترتیب ۳/۶ و ۴٪ [۱۶] و در *P. boergesenii* و *P. tetrastromatica* به ترتیب ۴/۵ و ۱۰٪ [۱۷] و در گونه‌های مختلف سارگاسوم مانند؛ *Sargassum angustifolium*، *S. fusiforme*، *S. mcclureis* و *S. henslowianum* به ترتیب ۶/۳۵، ۲/۷، ۱/۵۳ و ۷٪ [۱۰]، ۱۸، ۱۹ و ۲۰٪ و در *S. siliquosum* ۳/۳٪ [۲۱] و *S. wightii* ۴/۲۱٪ بود [۲۲]. در فصل تابستان به دلیل دمای بالا و شرایط نامساعد، جلبک‌ها برای مراقبت از خود اقدام به افزایش ضخامت دیواره‌ی سلولی پیکر خود می‌کنند و چون پلی‌ساکاریدها در دیواره‌ی سلولی قرار دارند، به طبع افزایش یافته و این امر منجر به افزایش بازده پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها در جلبک‌ها خواهد شد [۲۳]. روش استخراج و نوع جلبک نیز بر روی میزان

بازده پلی ساکاریدهای سولفات موثر گزارش شده است [۲۴، ۲۵]. به طور کلی بازده فوکوئیدان در جلبک‌های قهوه‌ای بیشتر از جلبک‌های سبز است اگرچه عواملی مانند فصل، گونه‌ی جلبک و روش استخراج می‌توانند در این نتایج موثر باشند.

شناسایی مونوساکاریدها با HPLC

پلی ساکارید، یک ماکرومولکول است که، از پلیمریزاسیون تعداد زیادی از مونوساکاریدها تشکیل می‌شود. بنابراین، نوع و نسبت مونوساکاریدها می‌تواند بر فعالیت بیولوژیکی پلی ساکاریدها موثر باشد [۳۵]. مونوساکاریدهای گلوکز، مانوز و زایلوز در فوکوئیدان جلبک سارگاسوم بیشتر از جلبک پادینا بود. در مطالعات مختلف انواع مونوساکاریدهای فوکوز، گلوکز، رامنوز، گالاکتوز، زایلوز، مانوز و آرابینوز از پلی ساکاریدهای سولفات شناسایی شدند که در مقادیر با یکدیگر متفاوت بودند. در بررسی پلی ساکاریدهای سولفات در جلبک *P. gymnospora* میزان مونوساکاریدهای مانوز ۴/۴۸٪، آرابینوز ۷/۲۷٪ و گالاکتوز ۱/۱۴٪ گزارش شد [۳۶]. در پلی ساکاریدهای سولفات جلبک *Ulva pertusa* میزان مونوساکارید رامنوز ۳/۳۳٪، زایلوز ۶/۲۴ و گلوکز ۳/۶ درصد بود [۳۷]. در جلبک *S. pallidum* میزان گلوکز ۱۶/۴۵ - ۰/۸۱٪، زایلوز ۱/۹۰ - ۱/۳۲٪ و مانوز ۶/۷۶ - ۵/۹۷٪ بود که تحت تیمارهای مختلف به دست آمد [۳۵]. همچنین در جلبک‌های قهوه‌ای *P. gymnospora* [۳۶] و *S. tenerrimum* [۳۳] مونوساکاریدهای فوکوز، گالاکتوز، زایلوز، مانوز و آرابینوز شناسایی شدند. در مطالعات متعددی عنوان شده است که خواص شیمیایی و نوع و مقدار مونوساکاریدها در پلی ساکاریدهای سولفات تابع شرایطی مانند نوع گونه، شرایط استخراج، موقعیت جغرافیایی و شرایط آب و هوایی است [۳۸].

مهار رادیکال آزاد DPPH

رادیکال آزاد DPPH، یک رادیکال آزاد پایدار است، که به طور گسترده ای برای تعیین فعالیت مهار رادیکال آزاد ترکیبات طبیعی استفاده می‌شود، این روش بر پایه‌ی کاهش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر است که با تغییر رنگ بنفش رادیکال DPPH به رنگ زرد در نمونه همراه است. گروه‌های اهدا کننده پروتون مثل COOH و SO_3H موجود در پلی ساکارید سولفات می‌توانند به افزایش ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط نمونه کمک کنند [۲۶]. در این تحقیق با افزایش غلظت فوکوئیدان، درصد مهار رادیکال آزاد ثابت شده یا روند نزولی در پیش می‌گیرد که نشان از وجود یک نقطه بهینه است و بیانگر آن است که در غلظت‌های بالا، درصد مهار رادیکال آزاد این نوع ترکیب، وابسته به غلظت نبوده و می‌توان روی بهینه‌سازی غلظت‌های مورد آزمایش تحقیقات بیشتری انجام داد. نتایج مشابهی پیش‌تر در تحقیقات طاهری و همکاران (۱۳۹۶) در رابطه با عصاره کلروفومی جلبک *Cystoseira trinodis* گزارش شده است [۲۷]. IC_{50} مهار رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان استخراج شده جلبک سارگاسوم و پادینا به ترتیب برابر با $0.1 \pm 0.04 \text{ mg/ml}$ و $0.14 \pm 0.01 \text{ mg/ml}$ بود. در مطالعات پیشین IC_{50} مهار رادیکال DPPH تحت اثر پلی ساکاریدهای سولفات حاصل از جلبک *S. thunbergii*، استخراج شده توسط آنزیم‌های کربوکسیلاز و پروتئیناز بین $1 \mu\text{g/ml}$ تا $39.71 - 26.9 \mu\text{g/ml}$ بود [۲۸]. IC_{50} مهار رادیکال آزاد DPPH در جلبک *S. fulvellum* نیز برابر با 6.90 mg/ml بود [۲۹]. در جلبک *P. gymnospora* بهترین مهار رادیکال آزاد در غلظت $125 \mu\text{g/ml}$ برابر با 52.70% بود [۳۰]. در دو جلبک سبز *Pavlova viridis* و *Sarcinochrysis marina Geitler* بیشترین مهار رادیکال آزاد در غلظت 1 mg/ml بود [۲۹]. موجودات فتوسنتز کننده مکانیسم‌های متفاوتی را برای سازگاری با نوسانات محیط‌های ساحلی و فصلی و برای حفاظت خود در برابر عواملی چون پرتو فرابنفش، شوری، اکسیژن محیط، عناصر سنگین، سطح مواد غذایی و نوع بستر به کار می‌گیرند که شامل تنظیم فعالیت‌های آنزیمی و مولکول‌های پاداکسنده مانند آلفاتوکوفرول، کاروتنوئیدها، گلوکاتینون پراکسیداز و دیواره سلولی ضخیم است. این تغییرات بر بیوشیمی و فعالیت پاداکسندگی آن‌ها اثر گذاشته و سبب تفاوت در افراد مختلف حتی یک گونه که در زمان‌ها و مکان‌های متفاوت جمع‌آوری شده‌اند، می‌شود [۳۱]. نتایج این آزمون نشان داد فوکوئیدان حاصل از این دو جلبک می‌تواند در مقادیر بالاتر گزینه مناسبی برای جایگزینی پاداکسنده‌های صنعتی باشد.

کاهندگی آهن

این شاخص برای اندازه‌گیری فعالیت پاداکسندگی به کار می‌رود. در این تست حضور کاهنده‌ها در حلال باعث کاهش کمپلکس Fe^{3+} فری سیانید به شکل فروس Fe^{2+} می‌شود که میزان Fe^{2+} به صورت جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر به دست می‌آید و در این روش افزایش جذب به معنای افزایش فعالیت پاداکسندگی است [۳۲]. میزان کاهندگی آهن در فوکوئیدان استخراج شده از هر دو جلبک روند افزایشی نشان می‌دهد. در مطالعات پیشین میزان پتانسیل کاهندگی آهن در پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها مورد سنجش قرار گرفته است که در گونه‌های مختلف جلبک سارگاسوم و پادینا مانند *S. tenerrimu* [۳۳] و *P. tetrastrumatica* [۳۴] با افزایش غلظت پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها میزان کاهندگی آهن نیز افزایش می‌یابد. تفاوت در میزان کاهندگی آهن پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها جلبک‌های مختلف می‌تواند ناشی از طبیعت شیمیایی، موقعیت و تعداد گروه‌های سولفات‌ها و تفاوت‌های ساختاری باشد [۳۴]، مانند آنچه که در خصوص خاصیت پاداکسندگی مطرح شده است. همانطور که در مهار رادیکال آزاد DPPH مشاهده گردید فوکوئیدان حاصل از هر دو ماکرو جلبک قهوه‌ای قدرت مهار بالایی در جذب رادیکال آزاد داشته‌اند و می‌توانند بعنوان یک پاداکسندنده طبیعی مورد توجه قرار گیرند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی

میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM یکی از روش‌های توصیف مورفولوژی ظاهری پلی‌ساکاریدها است [۳۹]. فوکوئیدان استخراج شده در هر دو جلبک دارای انسجام مشابهی هستند اما فوکوئیدان جلبک پادینا دارای برجستگی‌های بیشتری در سطح است. در مطالعات متعددی از SEM جهت مشاهده ویژگی‌های ظاهری فیلم‌ها و مواد گوناگون استفاده شده است. در مطالعه‌ای که بر روی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها جلبک *Sargassum pallidum* انجام گرفت تصاویر SEM آن نشان داد که دارای سطوح خشن و منسجم است که با مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت [۳۵]. در مطالعه‌ای دیگر نیز به مورفولوژی نامنظم ذرات پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها و همچنین به تاثیر شرایط واکنش بر مورفولوژی اشاره شده است [۴۰]. شرایط استخراج مانند درجه حرارت، وجود مواد اسیدی در روند استخراج و نوع جلبک، روی مورفولوژی پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها موثر هستند [۳۹].

نتیجه‌گیری

برخی از ماکرو جلبک‌ها در زیستگاه‌های پیچیده با شرایطی که منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و دیگر عوامل اکسید کننده می‌شود، زندگی می‌کنند. با این حال، عدم وجود آسیب ناشی از شرایط محیطی نشان می‌دهد که، سلول‌های آن‌ها دارای مکانیزمی جهت سازگاری سریع و تولید متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنول‌ها، رنگدانه‌ها و پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها است که آن‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. مطالعه‌ی حاضر نشان داد ترکیبات استخراج شده از دو جلبک پادینا و سارگاسوم همان پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها فوکوئیدان هستند و از نظر قدرت پاداکسندگی هر دو جلبک عملکرد مناسبی داشته، بعنوان یک پاداکسندنده طبیعی در نگهداری مواد غذایی و ترکیبات دارویی پیشنهاد می‌گردند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، نویسندگان از همکاری پرسنل محترم آزمایشگاه شیلات و علوم صنایع غذایی دانشکده کشاورزی و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی

تمامی نویسندگان در انتشار مقاله حاضر اتفاق نظر دارند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان این تحقیق وجود ندارد.

سهام نویسندگان

فرزانه وردی زاده (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی / نگارنده مقاله (۳۰٪)؛ صدیقه بابایی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی / نگارنده مقاله / روش شناس (۲۵٪)؛ محمود ناصری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی / تحلیل گر آماری (۱۵٪)؛ محمد تقی گلمکانی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی / روش شناس (۱۵٪)؛ مینا اسمعیلی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی / نگارنده بحث (۱۵٪).

منابع مالی / حمایت‌ها

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شیراز و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در قالب طرح ۹۷۰۲۴۶۷۷، اجرا شده است.

منابع

- 1- Ramdani M, Elasri O, Saidi N, Elkhiaati N, Taybi FA, Mostareh M, Zaraali O, Haloui B, Ramdani M. Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization. Chemical and Biological Technologies in Agriculture. 2017;4(1): 1-7.
- 2- Food and Agriculture Organization (FAO). Global aquaculture production. retrieved from. Food Chemistry. 2019;12(1): 12-28.
- 3- Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. Food chemistry. 2013;138(2-3):1764-1785.
- 4- Mchugh DJ, A Guide to the Seaweed Industry. FAO Fisheries Technical Paper No 441. 2003; 441(21):125- 142.
- 5- Tabarsa M. Chemical structure and biological effects of sulfated polysaccharides extracted from green seaweeds. Journal of Fisheries Science and Technology. 2016;5(1):97-116, (in Persian).
- 6- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. Marine Drugs. 2011;9(2): 196-233.
- 7- Zandi K, Bahmanyar M, Sartavi K. The effect of antiviral activity of a green seaweed from the Persian Gulf, *Caulerpa sertularioides* on Herpes Simplex Virus Type 1. ISMJ. 2006;9(1): 1-8.
- 8- Hamed I, Özogul F, Özogul Y, Regenstein JM. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2015;14(4):446-65.
- 9- 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: 261-270.
- 10- Borazjani NJ, Tabarsa M, You S, Rezaei M. Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;109: 793-802.
- 11- Dodgson K, Price R. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochemical Journal. 1962;84(1): 106-110.
- 12- Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science and Technology. 2000;11(11): 419-421.
- 13- Wang T, Jonsdottir R, Ólafsdóttir G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry. 2009;116(1):240-248.

- 14- Farvin KHS, Jacobsen C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*. 2013;138(2-3): 1670-1681.
- 15- Park JK, Jin YB, Chang HN. Reusable biosorbents in capsules from *Zoogloea ramigera* cells for cadmium removal. *Biotechnology and bioengineering*. 1999;63(1): 116-121.
- 16- Vasantharaja R, Abraham LS, Gopinath V, Hariharan D, Smita KM. Attenuation of oxidative stress induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in fibroblast cells by sulfated polysaccharide from *Padina gymnospora*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;124: 50-59.
- 17- Kordjazi M, Shabanpour B, Zabihi E, Faramarzi MA, Feizi F, Gavlighi HA. Sulfated polysaccharides purified from two species of *Padina* improve collagen and epidermis formation in the rat. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2013;2(4): 156.
- 18- Thinh PD, Menshova RV, Ermakova SP, Anastyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Marine Drugs*. 2013;11(5): 1456-1476.
- 19- Jin W, Zhang W, Wang J, Ren S, Song N, Duan D. Characterization of laminaran and a highly sulfated polysaccharide from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrate Research*. 2014;38(5): 58-64.
- 20- Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from *Sargassum* sp. *Journal of applied phycology*. 2012;24(4): 715-723.
- 21- Ross V, Joven A, Donnie RJ, Marianne M, Katherine P, Carla P, Charm P, Jose P. Hepatoprotective effects of aqueous sulfated polysaccharide extract from *Sargassum siliquosum* JG Agardh on paracetamol-induced oxidative liver toxicity and antioxidant properties. *IJPFR*. 2012;2(1): 15-27.
- 22- Marudhupandi T, Kumar TT. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2013;2(10): 156-158.
- 23- Choi HG, Lee KH, Yoo HI, Kang PJ, Kim YS, Nam KW. Physiological differences in the growth of *Sargassum horneri* between the germling and adult stages. In *Nineteenth International Seaweed Symposium*. 2007; 279-285. Springer, Dordrecht.
- 24- Rodrigues JA, Araújo IW, Paula GA, Brito Lima T, Bessa ÉF, Benevides NM. Carragennan from *Hypnea musciformis* epiphyte obtained from *Solieria filiformis* experimental culture at Flecheiras, Ceará State, Brazil. *Acta Scientiarum. Technology*. 2011; 33(2): 137-144.
- 25- Wilkie, KCB. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. *Food Chemistry*. 1968; 283-285.
- 26- Jose GM, Anitha R, Muraleedhara Kurup G. Antioxidant and antimitotic activities of sulfated polysaccharide from marine brown algae *Padina tetrastromatica*. *Journal of Phytology*. 2015;12(8): 39-51.
- 27- Taheri A, Ghaffari M, Bagher pour NS, Attaran GF. Study the antioxidative properties of the marine algae *cystoseira trinodis* extracts from chabahar coastal water. *Journal of shahid sadoughi university of medical sciences and health services*. 2017;25(8): 669- 658.

- 28- Kang M, Lee H, Choi H, Jeon Y. Antioxidant properties of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Sargassum thunbergii*. International Journal of Biological Macromolecules. 2019;13(2): 142-149.
- 29- Wang L, Oh JY, Hwang J, Ko JY, Jeon Y, Ryu B. In vitro and in vivo antioxidant activities of polysaccharides isolated from celluclast-assisted extract of an edible brown seaweed, *Sargassum fulvellum*. Antioxidant. 2019;32(8): 12-39.
- 30- Gomes DL, Melo KRT, Queiroz MF, Batista LANC, Santos PC, Costa MSSP, Rocha HAO. In vitro studies reveal antiurolithic effect of antioxidant sulfated polysaccharides from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* var flabellate. Marine Drugs. 2019;17(6), 1-16.
- 31- Babakhani A, Farvin KS, Jacobsen C. Antioxidative effect of seaweed extracts in chilled storage of minced Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): effect on lipid and protein oxidation. Food and Bioprocess Technology. 2016;9(2): 352-364.
- 32- Du B, Xu B. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of β -glucans from different sources with various molecular weight. Bioact Carbohydrates Diet Fibre. 2014;3(1): 6-11.
- 33- Mohan MS, Achary A, Mani V, Cicinskas E, Kalitnik AA, Khotimchenko M. Purification and characterization of fucose-containing sulphated polysaccharides from *Sargassum tenerrimum* and their biological activity. Journal of Applied Phycology. 2019;31(5): 3101-3113.
- 34- Raghu G, Shakila RJ, Jeyasekaran G, Padmavathy P, Veeresh B. Antioxidative properties of fucoidan extracted from brown seaweed, *Padina tetrastratica* available along Gulf of Mannar Coast. Journal of Experimental Zoology. 2016;19(2): 723-730.
- 35- Xiao H, Fu X, Cao C, Li C, Chen C, Huang Q. International Journal of Biological Macromolecules Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*. International Journal Biol Macromol. 2019;40(7):114-121.
- 36- Vasantharaja R, Abraham LS, Gopinath V, Hariharan D, Smita KM. Attenuation of oxidative stress induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in fibroblast cells by sulfated polysaccharide from *Padina gymnospora*. International Journal of Biological Macromolecules. 2019;124: 50-59.
- 37- Li B, Xu H, Wang X, Wan Y, Jiang N, Qi H, Liu X. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of high sulfate content purified polysaccharide from *Ulva pertusa*. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;146: 756-762.
- 38- Mak W, Hamid N, Liu T, Lu J, White W. Extraction fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: monthly variations and determination of antioxidant activities. International Journal Carbohydr Polymer. 2013;95(2): 606-614.
- 39- Wang Z, Xie J, Kan L, Wang J, Shen M, Li W. Sulfated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* reduce H₂O₂ -induced oxidative stress in RAW264. 7 cells. International Journal of Biological Macromolecules. 2015;4(10): 80-87.
- 40- Yu W, Xu B, Fan B, Zhang Y, Wang X. Effects of saturated steam treatment on the cell-wall mechanics and moisture sorption properties of kenaf fibers. Bioresources. 2020;15(1): 159-171.

Characterization of fucoidan extracted from brown macroalgae *Padina* sp. and *Sargassum* sp.

Farzaneh Vardizadeh¹, Sedigheh Babaei^{1*}, Mahmood Naseri¹, Mohammad-Taghi Golmakani², Mina Esmaeili³

1- Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2- Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3- Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

ABSTRACT

In the present study, the structural and antioxidant properties of fucoidan extracted from macroalgae (*Sargassum* and *Padina*) from the Persian Gulf coast were evaluated. The fucoidan was extracted by ethanol and hot water and after calculating the extraction yield, DPPH radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), scanning electron microscopy (SEM), and its monosaccharides by HPLC method were examined. The yield of fucoidan in *Sargassum* ($4.2 \pm 0.00\%$) was higher than *Padina* ($2.98 \pm 0.28\%$) ($P < 0.05$). The IC₅₀ of DPPH free radical scavenging in fucoidan extracted from *Sargassum* and *Padina* were 0.1 and 0.14 mg/ml, respectively, which were higher than BHT as a commercial antioxidant ($P < 0.05$). The rate of FRAP in both samples increased with an increase in the concentration of fucoidan. The SEM results showed that fucoidan from both macroalgae had strong structural cohesion and irregular surfaces, but *Padina* had more surface protrusions. The glucose, mannose and xylose sugars in different amounts were detected by the HPLC method, in which the amount of glucose and xylose sugars were higher in the fucoidan derived-*Sargassum* ($P < 0.05$). According to the results of the present study, the fucoidan extracted from the *Sargassum* and *Padina* can be a good alternative to an industrial antioxidant in food.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 14 Aug 2020

Accepted: 23 Nov 2020

ePublished: 18 Dec 2020

KEYWORDS: Sulfated Polysaccharide, Persian Gulf, Natural antioxidant, FRAP, SEM.

* Corresponding Author:

Email address: s-babaei@shirazu.ac.ir

Tel: +(98) 7136138172

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513