فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

# تاثیر حلال بر خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های قرمز *Gracilaria arcuata*، *Gracilaria textorri* و *Leveillea jungermannioides*

سلیم شریفیان[1]*، مهران لقمانی[2]

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

**چکیده**

در مطالعه حاضر تاثیر حلال‌های مختلف (متانول ۱۰۰ درصد، متانول ۶۰ درصد، متانول ۲۰ درصد و آب ۱۰۰ درصد) در میزان استخراج عصاره و خاصیت آنتی‌اکسیدانی سه گونه از جلبک‌های قرمز سواحل چابهار شامل *Gracilaria arcuata*، *Gracilaria textorri* و *Leveillea jungermannioides* مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف با استفاده از شاخص‌های بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH، توانایی احیا و جذب آهن سنجیده شد. میزان عصاره در میان جلبک‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌داری بود و بالاترین میزان عصاره در حلال متانول ۱۰۰ درصد در جلبک *L. jungermannioides* به میزان ۶/۰۲ گرم در ۱۰۰ گرم جلبک به دست آمد (P<۰/۰۵). بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به شاخص‌های مختلف در حلال متانول ۶۰ درصد جلبک *G. arcuata* مشاهده شد که به میزان قابل توجهی نسبت به دیگر گونه‌ها بالاتر بود (P<۰/۰۵). میزان استخراج عصاره و خواص آنتی‌اکسیدانی بسته به نسبت حلال و نوع گونه جلبک تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف داشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جلبک *G. arcuata* می‌تواند به عنوان منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفته شود.

**واژگان کلیدی:** *جلبک قرمز، آنتی‌اکسیدان، رادیکال آزاد، عصاره، حلال.*

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
* نویسنده مسئول: sharifian.salim@hotmail.com

**مقدمه**

حدود ۳۹۰۰ گونه در ۴۰۰ جنس از جلبک‌های قرمز شناخته شده‌اند که اکثر آن‌ها دریازی هستند. از مهم‌ترین موارد کاربرد این جلبک‌ها می‌توان به تولید اسید آراشیدونیک، رنگدانه‌ها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی مانند آگار و کاراگینان اشاره کرد (شریفیان و همکاران، ۱۳۹۸). جلبک‌های دریایی از جمله منابع غنی ترکیبات زیست‌فعال هستند که متابولیت‌های تولید شده توسط آنها دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی است. این پتانسیل امکان استفاده از آن‌ها به عنوان ترکیبات دارویی و بهداشتی را فراهم ساخته است. تاکنون ترکیبات زیستی متعدد با کاربردهای متنوعی همچون اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های مختلف شناسایی و جداسازی شده است (قره‌خان تقرتپه و همکاران، ۱۳۹۸). آنها تنوع وسیعی از متابولیت‌های شیمیایی، با کارکرد اصلی دفاع در برابر ارگانیسم‌های خارجی را تولید می‌کنند. این متابولیت‌های فعال به عنوان ترکیبات شیمیایی بیوژنینک شناخته می‌شوند.

به هر اتم یا مولکولی که در اوربیتال اتمی یا مولکولی خود یک یا دو الکترون پیوندی داشته باشد، رادیکال آزاد گویند. این ترکیبات معمولا ناپایدار، کاملا واکنش‌پذیر و با انرژی بالا هستند و به علت ایجاد آسیب اکسیداتیو در لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ممکن است منجر به ایجاد بیماری‌های فرساینده مختلفی در انسان شوند (حیدری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Blomhoff, 2005). گونه‌های اکسیژن فعال از جمله رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و رادیکال‌های پروکسیل نقش مهمی در عملکرد سلول دارند. با این حال تشکیل بیش از حد مجاز آنها ممکن است باعث اکسیداسیون بیومولکولی و متعاقبا آسیب سلولی شود. رادیکال‌های آزاد از طریق واکنش‌های طبیعی بدن در طی تنفس سلولی در موجودات هوازی، بویژه مهره‌داران و انسان تشکیل می‌شوند. رادیکال‌های آزادی که به صورت فیزیولوژیکی تولید می‌شوند، می‌توانند عملکردهای گوناگونی شبیه وظایف انتقال پیام و وظایف دفاعی در برابر عفونت‌ها را از خود بروز دهند (طاهری و مرادی، ۱۳۹۷). آنتی‌اکسیدان‌ها برای حفاظت موجودات زنده در برابر صدمات اکسیداسیون ایجاد شده از طریق رادیکال‌های آزاد موثر هستند، در نتیجه محافظ بدن در برابر آسیب‌های اکسیداتیو هستند. بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال از جمله

آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی جلوگیری از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی را دارند و مانع فساد اکسیداسیونی چربی‌ها و پروتئین‌ها می‌شوند. در حال حاضر به دلیل ایجاد مشکلات سلامتی ناشی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، تمایل زیادی برای جایگزینی و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی در جهان وجود دارد (Amarowicz et al., 2000). جلبک‌های دریایی یکی از مهم‌ترین منابع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و تاکنون فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلفی از جلبک‌های قرمز، قهوه‌ای و سبز در دنیا مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک‌های دریایی مختلف با هم تفاوت دارند و متناسب با محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است (شریفیان و همکاران، ۱۳۹۸). از طرف دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها به میزان زیادی در ارتباط با روش استخراج است. عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات زیست‌فعال از جلبک‌های دریایی را می‌توان به دو گروه سنتی و نوین تقسیم‌بندی کرد. در روش معمول و سنتی، استخراج به کمک حلال‌های آلی و آب صورت می‌گیرد؛ درحالی که در روش‌های نوین از آنزیم، مایکروویو، مایع فوق بحرانی و فشار در فرایند استخراج استفاده می‌شود (Gall et al., 2015). جلبک‌های دریایی در سواحل صخره‌ای جنوب کشور بویژه سواحل استان سیستان و بلوچستان به وفور یافت می‌شوند. پژوهش‌های قبلی درباره تاثیر حلال بر استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی نشان داده است که خواص آنتی‌اکسیدانی، بسته به نوع جلبک و نوع حلال متفاوت است (شریفیان و همکاران، ۱۳۹۸؛ Taheri, 2016). در میان انواع مختلف گونه‌های جلبک‌های قرمز در سواحل جنوب کشور، گونه‌های *Gracilaria arcuata*، *Gracilaria textorri* و *Leveillea jungermannioides* در سواحل دریای مکران و خلیج فارس به وفور یافت می‌شوند. با این حال، اطلاعات کاملی در زمینه خواص آنتی‌اکسیدانی این گونه‌ها و تاثیر نسبت حلال بر میزان استخراج وجود ندارد و عمده پژوهش‌های این حیطه مرتبط با جلبک‌های قهوه‌ای است. از این رو هدف از انجام این پژوهش بررسی سنجش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه گونه از جلبک‌های قرمز سواحل چابهار و تعیین بهترین نسبت حلال برای استخراج عصاره دارای ترکیبات زیست‌فعال است.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری جلبک

گونه‌های جلبک قرمز شامل *Gracilaria arcuata*، *Gracilaria textorri* و *Leveillea jungermannioides* از ناحیه بین جزر و مدی ساحل خلیج چابهار (شهر چابهار، ۲۵°۱۶′۳۷/۳″N و ۶۰°۴۰′۶/۸″E) در زمان حداکثر جزر در فصل زمستان در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و شناسایی گونه (در موزه دریایی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار)، برای حذف گل و لای و دیگر مواد زاید با آب شیرین شستشو و سپس در سایه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌ها پس از پودر شدن با خردکن خانگی در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار بسته‌بندی و تا هنگام عصاره‌گیری در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

### عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری، از حلال‌های متانول و آب با نسبت‌های مختلف شامل متانول ۱۰۰ درصد (حلال ۱: ۱۰ گرم جلبک + ۷۰ میلی‌لیتر متانول)، متانول ۶۰ درصد (حلال ۲: ۱۰ گرم جلبک + ۴۲ میلی‌لیتر متانول + ۲۸ میلی‌لیتر آب)، متانول ۲۰ درصد (حلال ۳: ۱۰ گرم جلبک + ۱۴ میلی‌لیتر متانول + ۵۶ میلی‌لیتر آب) و آب ۱۰۰ درصد (حلال ۴: ۱۰ گرم جلبک + ۷۰ میلی‌لیتر آب) استفاده شد. در هر تیمار ۱۰ گرم جلبک خشک و پودر شده، توزین و با نسبت ۱ به ۷ (وزنی- حجمی) با حلال مربوطه در ظروف شیشه‌ای دارای درب مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق شیک (Shake) شد. برای جلوگیری از تاثیر احتمالی نور، در طی عصاره‌گیری ظروف محتوی جلبک و حلال با فویل آلومینیومی پوشانده شد. در ادامه، مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف و عصاره‌گیری با نسبت حلال‌های قبلی تکرار شد. در انتها، عصاره به دست آمده از هر دو مرحله برای هر جلبک با یکدیگر مخلوط شد. برای حلال‌زدایی از عصاره، از تبخیر کننده تحت خلأ (روتاری) در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. عصاره‌های تغلیظ شده هر جلبک تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در ظروف سربسته تیره نگهداری شدند (Sharifian et al., 2019).

### فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) بر اساس روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲)

انجام گرفت. به طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۷۵ میکرومولار) با ۱ میلی‌لیتر عصاره (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مخلوط و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر (UNICO 2100، آمریکا) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد فعالیت مهاری ($I_{DPPH}$) رادیکال آزاد DPPH از رابطه ۱ محاسبه شد (Shimada et al., 1992). برای مقایسه از آلفا- توکوفرول به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

**رابطه ۱:**

$$I_{DPPH} = 1 - [(A_0 - A_1) / A_0]$$

$A_0$: جذب شاهد (محلول DPPH بدون عصاره)؛ $A_1$: جذب عصاره.

**فعالیت جذب یون آهن II**

فعالیت جذب یون آهن II ($Fe^{+2}$) با استفاده از روش Dinis و همکاران (۱۹۹۴) انجام گرفت. در این روش ۱ میلی‌لیتر عصاره (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۳/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر $FeCl_2$ مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین (Ferrozine) به آن اضافه شد و اجازه داده شد تا واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شود. پس از آن جذب نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. برای محاسبه فعالیت جذب فلزی (MB) از رابطه ۲ استفاده شد (Dinis et al., 1994). از EDTA به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

**رابطه ۲:**

$$MB = (A_0 - A_1) / A_0$$

$A_0$: جذب شاهد؛ $A_1$: جذب عصاره.

**قدرت احیای یون آهن III**

برای اندازه‌گیری قدرت احیای یون آهن III ($Fe^{+3}$) از روش Yen و Chen (۱۹۹۵) استفاده شد. به این ترتیب که ۱ میلی‌لیتر محلول آزمایش (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار مخلوط و در ادامه ۱ میلی‌لیتر هگزاسیانوفرات به آن اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آبی به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. با افزودن ۱ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد واکنش متوقف و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (PIT320، Universal، ایران) شد. پس از سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتر از بخش شناور جدا و با ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر با

استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. برای محاسبه قدرت احیا ($R_{Fe}$) از رابطه ۳ استفاده شد (Yen and Chen, 1995). از هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار (BHT) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

**رابطه ۳:**

$$R_{Fe} = (A_0 - A_1) / A_0$$

$A_0$: جذب شاهد؛ $A_1$: جذب عصاره.

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت. برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف و برای بررسی همگنی داده‌ها از آزمون Leven استفاده شد. برای بررسی اثرهای معنی‌دار بین سه گونه و مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<۰/۰۵$) توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷) استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد.

**نتایج**

میزان عصاره استخراج شده (گرم در ۱۰۰ گرم جلبک) در حلال‌های مختلف و در گونه‌های مختلف جلبک قرمز به تفکیک در جدول ۱ نشان داده شده است که بر این اساس بیشترین میزان عصاره در گونه *G. arcuata* در حلال ۲ (متانول ۶۰ درصد) و در گونه‌های *G. textorri* و *L. jungermannioides* در حلال ۱ (متانول ۱۰۰ درصد) به دست آمد و به دنبال آن کمترین میزان عصاره اولیه استخراج شده در هر سه گونه مربوطه به حلال ۴ (آب ۱۰۰ درصد) بود. در میان گونه‌ها و حلال‌های مختلف، بیشترین میزان عصاره در حلال ۱ (متانول ۱۰۰ درصد) در گونه *L. jungermannioides* به میزان ۶/۰۲ گرم وجود داشت. آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری را بین گونه‌ها و نیز میان حلال‌ها نشان داد ($P<۰/۰۵$).

مقایسه میانگین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در بین گونه‌های مختلف جلبک قرمز و حلال‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. بالاترین میزان بازدارندگی در گونه *G. arcuata* در حلال ۲ (۷۶/۳۹ درصد) یعنی متانول ۶۰ درصد بود و بعد از آن به ترتیب حلال‌های شماره ۱، ۳ و ۴ بیشترین مقادیر را داشتند. در گونه *G. textorri* بالاترین مقدار بازدارندگی در حلال متانول ۱۰۰ درصد (۴۳/۶۸ درصد) به دست آمد و پس از آن به ترتیب حلال‌های متانول ۶۰ درصد، متانول ۲۰ درصد و آب ۱۰۰ درصد بیشترین میزان را

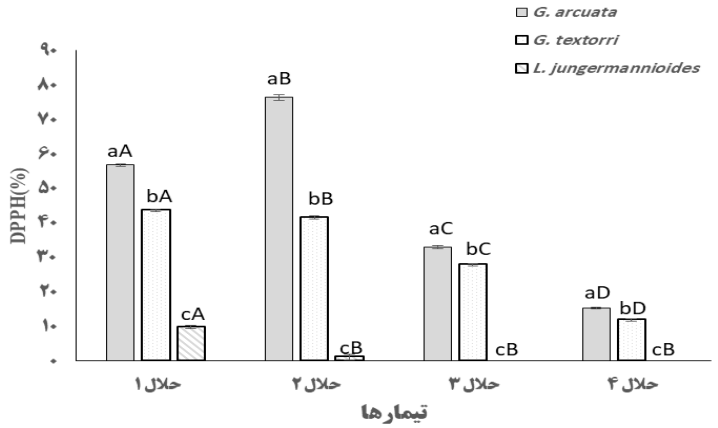
داشتند. در گونه *L. jungermannioides* بالاترین مقدار بازدارندگی در حلال متانول ۱۰۰ درصد (۹/۸۱ درصد) به دست آمد و در ادامه به ترتیب حلال‌های متانول ۶۰ درصد، متانول ۲۰ درصد و آب ۱۰۰ درصد بیشترین میزان را داشتند. آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را در هر حلال بین سه گونه نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین میان نسبت حلال‌های مختلف در هر گونه نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵) که در شکل ۱ مشخص است.

**جدول ۱: میزان عصاره در سه گونه جلبک قرمز با استفاده از نسبت‌های مختلف حلال (میانگین ± انحراف معیار)**

| نام گونه | میزان عصاره (گرم در ۱۰۰ گرم جلبک) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | حلال ۱ | حلال ۲ | حلال ۳ | حلال ۴ |
| ***Gracilaria arcuata*** | ۱/۳۲±۰/۱$^{aB}$ | ۲/۴۲±۰/۳۳$^{aC}$ | ۱/۳۹±۰/۱۳$^{aB}$ | ۰/۳۹±۰/۰۴$^{aA}$ |
| ***Gracilaria textorri*** | ۲/۴۵±۰/۲۳$^{bC}$ | ۲/۰۵±۰/۱۱$^{aBC}$ | ۱/۶۹±۰/۲۸$^{aB}$ | ۰/۸۹±۰/۰۸$^{aA}$ |
| ***Leveillea jungermannioides*** | ۶/۰۲±۰/۲۶$^{cC}$ | ۴/۷۲±۰/۲۸$^{bB}$ | ۳/۴۳±۰/۳۴$^{bA}$ | ۲/۶۲±۰/۲۳$^{bA}$ |

حروف بزرگ در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین حلال‌ها در هر گونه و حروف کوچک در هر ستون نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین سه گونه است (P<۰/۰۵).

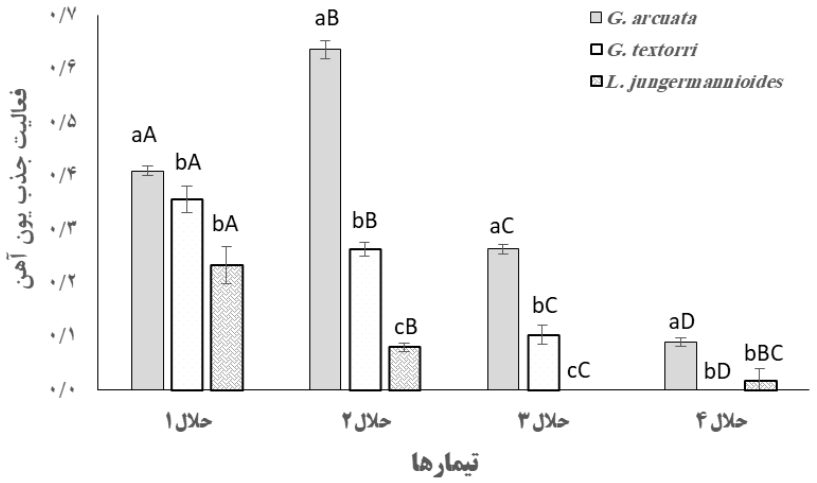
حلال ۱: متانول ۱۰۰ درصد؛ حلال ۲: متانول ۶۰ درصد؛ حلال ۳: متانول ۲۰ درصد؛ حلال ۴: آب ۱۰۰ درصد.




**شکل ۱: مقایسه میزان بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در عصاره به دست آمده با نسبت‌های مختلف حلال از سه گونه جلبک قرمز (میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار متغیر بین**

**حلال‌ها است و حروف کوچک اختلاف معنی‌دار را بین سه گونه نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). حلال ۱: متانول ۱۰۰ درصد؛ حلال ۲: متانول ۶۰ درصد؛ حلال ۳: متانول ۲۰ درصد؛ حلال ۴: آب ۱۰۰ درصد.**

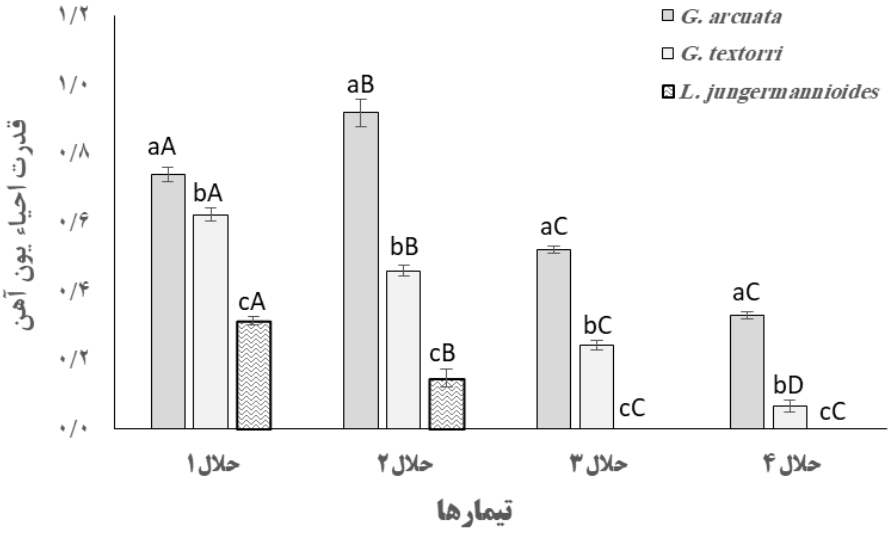
مقایسه میانگین میزان جذب یون آهن II (جذب در ۵۶۱ نانومتر) در میان سه گونه جلبک قرمز و در بین نسبت‌های مختلف حلال در شکل ۲ قابل مشاهده است که بر این اساس در گونه *G. arcuata* تغییرات میزان جذب بین ۰/۰۹ تا ۰/۶۴ بود و بالاترین میزان در حلال متانول ۶۰ درصد و کمترین مقدار در حلال آب ۱۰۰ درصد به دست آمد. در گونه *G. textorri* تغییرات میزان جذب بین ۰/۰۰ تا ۰/۳۶ بود که بالاترین میزان در حلال متانول ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار در حلال آب ۱۰۰ درصد مشاهده شد. در گونه سوم، *L. jungermannioides*، تغییرات میزان جذب بین ۰/۰۰ تا ۰/۲۳ بود که بالاترین میزان در حلال متانول ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار در حلال متانول ۲۰ درصد بود. آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را در هر حلال بین سه گونه نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین میان حلال‌های مختلف در هر گونه نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵) که در شکل ۲ مشخص است.




**شکل ۲: مقایسه میزان فعالیت جذب یون آهن در عصاره به دست آمده با نسبت حلال‌های مختلف از سه گونه جلبک قرمز (میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار متغیر بین حلال‌ها**

**است و حروف کوچک اختلاف معنی‌دار را بین سه گونه نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). حلال ۱: متانول ۱۰۰ درصد؛ حلال ۲: متانول ۶۰ درصد؛ حلال ۳: متانول ۲۰ درصد؛ حلال ۴: آب ۱۰۰ درصد.**

مقایسه میانگین قدرت احیای یون آهن ($Fe^{+3}$، جذب در ۷۰۰ نانومتر) در میان سه گونه جلبک قرمز و در بین نسبت حلال‌های مختلف در شکل ۳ قابل مشاهده است که بر این اساس در گونه *G. arcuata* تغییرات میزان احیای آهن بین ۰/۳۳ تا ۰/۹۲ متغیر بود و بالاترین میزان در حلال متانول ۶۰ درصد و کمترین مقدار در حلال آب ۱۰۰ درصد به دست آمد. در گونه *G. textorri* تغییرات میزان احیای آهن بین ۰/۰۶ تا ۰/۶۳ بود که بالاترین میزان در حلال متانول ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار در حلال آب ۱۰۰ درصد مشاهده شد. در گونه *L. jungermannioides* تغییرات میزان جذب بین ۰/۰۰ تا ۰/۳۱ متغیر بود که بالاترین میزان در حلال متانول ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار در حلال‌های متانول ۲۰ درصد و آب ۱۰۰ درصد بود. آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را در هر حلال بین سه گونه نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین میان حلال‌های مختلف در هر گونه نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵).




**شکل ۳: مقایسه میزان فعالیت احیای یون آهن در عصاره به دست آمده با نسبت حلال‌های مختلف از سه گونه جلبک قرمز (میانگین ± انحراف معیار). حروف بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار متغیر بین حلال‌ها**

**است و حروف کوچک اختلاف معنی‌دار را بین سه گونه نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). حلال ۱: متانول ۱۰۰ درصد؛ حلال ۲: متانول ۶۰ درصد؛ حلال ۳: متانول ۲۰ درصد؛ حلال ۴: آب ۱۰۰ درصد.**

**بحث**

در سال‌های اخیر ترکیبات زیست‌فعال جدید زیادی، به ویژه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، از جانداران مختلف دریازی شامل جلبک‌های دریایی سبز، قرمز و قهوه‌ای جداسازی شده است (ناظمی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Kalaiselvan et al., 2016). جلبک‌ها به طور طبیعی برای مقابله با استرس‌های محیطی دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند و ترکیبات زیست‌فعالی مانند پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها، ترپن‌ها، فیکوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها و آنزیم‌های مختلفی را تولید می‌کنند (Maharana et al., 2015). در مطالعه حاضر تاثیر استفاده از حلال‌های مختلف (متانول و آب) بر میزان استحصال عصاره و خواص آنتی‌اکسیدانی سه گونه از جلبک‌های قرمز شامل *G. arcuata*، *G. textorri* و *L. jungermannioides* مورد بررسی قرار گرفت. از نظر میزان استخراج عصاره در بین سه گونه جلبک تفاوت معنی‌داری وجود داشت و بالاترین میزان عصاره در جلبک قرمز *L. jungermannioides* وجود داشت. از نقطه نظر حلال، حلال ۱ یعنی متانول ۱۰۰ درصد در مقایسه با ترکیب متانول و آب کارایی بالاتری در استحصال عصاره داشت و با کاهش میزان متانول در حلال (افزایش نسبت آب)، میزان عصاره در هر سه گونه جلبک کاهش یافت. نتایج مطالعات پیشین نشان داده است که تعیین یک روش و حلال مناسب و یکسان برای استخراج ترکیبات طبیعی از جلبک‌های طبیعی مشکل بوده، میزان عصاره بسته به نوع حلال و نوع جلبک متفاوت است (لشکان و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج مطالعه حاضر با مطالعه شریفیان و همکارن (۱۳۹۸) قابل مقایسه است که نشان دادند میزان استحصال عصاره در جلبک‌های قهوه‌ای *Padina australis* و *Nizamuddinia zanardinii* بسته به نوع حلال (متانول ۱۰۰ درصد، متانول ۷۰ درصد، استون ۱۰۰ درصد و استون ۷۰ درصد) و گونه جلبک متقاوت بود و متانول ۱۰۰ درصد کارایی بیشتری در استحصال عصاره داشت. بالاتر بودن میزان عصاره در حلال متانولی نسبت به دیگر حلال‌ها همچنین می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که اغلب ترکیبات محلول موجود در جلبک‌ها دارای قطبیت بالا هستند (Wang et al., 2009).

آنتی‌اکسیدان‌ها از نظر شیمیایی و فیزیکی دارای خواص مختلفی هستند و ممکن است با

مکانیسم‌های مختلفی در سیستم‌های متفاوت کارایی داشته باشند و عمل کنند. تاکنون روش‌های مختلفی برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسعه یافته و مورد استفاده قرار گرفته است (Ganesan et al., 2008). با این وجود هنوز اختلاف نظرهای عمیقی در آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی وجود داشته، هیچ آزمونی به تنهایی توانایی نشان دادن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی یک سیستم را ندارد و همواره استفاده از چند نوع آزمون توصیه می‌شود (حیدری و همکاران، ۱۳۹۶). در مطالعه حاضر برای بررسی جامع خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده با حلال‌های مختلف از جلبک‌های قرمز *G. arcuata*، *G. textorri* و *L. jungermannioides* از سه آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیا و جذب یون آهن استفاده شد. رادیکال پایدار DPPH، رادیکالی آزاد است که اغلب تخمین مناسبی از فعالیت جذب رادیکال عصاره می‌دهد (Ganesan et al., 2008). این رادیکال ارغوانی رنگ در حضور یک دهنده هیدروژن (آنتی‌اکسیدان) احیا می‌شود و رنگ زرد را در محلول ایجاد می‌کند (Ganesan et al., 2008). در مطالعه حاضر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره استخراج شده با حلال ۲ (متانول ۶۰ درصد) از جلبک *G. arcuata* به طور معنی‌داری نسبت به دیگر گونه‌ها و حلال‌ها بالاتر و برابر با ۷۶/۳۹ درصد بود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Hidayati و همکاران (۲۰۲۰) قابل مقایسه است که توانایی مهار رادیکال آزاد در عصاره استخراج شده از جلبک *G. arcuata* با استفاده از حلال متانول ۱۰۰ درصد را ۴۶/۲ درصد گزارش کردند. تفاوت در میزان مهار رادیکال آزاد در دو مطالعه می‌تواند به دلیل تفاوت در غلظت مورد استفاده در آزمایش و همچنین نوع حلال باشد (شریفیان و همکاران، ۱۳۹۸). در مقایسه نسبت حلال‌های مختلف در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که نسبت‌های بالاتر حلال‌های آلی کارایی بهتری در جذب مهار رادیکال آزاد در مقایسه با آب دارند. نتایج پژوهشگران دیگر نیز نشان می‌دهد که تغییر در قطبیت حلال، کارایی آن در استخراج گروه خاصی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد و بر روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره تاثیر می‌گذارد (Zhou and Yu, 2004). Praveen و Chakraborty (۲۰۱۳) میزان بازدارندگی در عصاره‌های آبی (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) دو گونه از جلبک‌های *Padina* سواحل هند، شامل *P. gymnospora* و *P. tetrastromatica* را

بین ۴۵ تا ۴۷ درصد گزارش کردند. Foon و همکاران (۲۰۱۳) خاصیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های خوراکی *Eucheuma cottonii* و *Padina* sp. سواحل مالزی را مورد بررسی قرار دادند و میزان بازدارندگی DPPH در عصاره متانولی (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را بین ۳۲-۲۹ درصد گزارش کردند. علاوه بر متفاوت بودن گونه و حلال، تفاوت در میزان ترکیبات زیست‌فعال و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است ناشی از عوامل خارجی (فشار، عمق، شوری، مواد مغذی) و عوامل ذاتی (نوع، سن، مرحله تولیدمثل) باشد (Ganesan et al., 2008).

مشابه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، در مطالعه حاضر، قدرت احیا و فعالیت جذب یون آهن در عصاره استخراج شده با حلال متانول ۶۰ درصد در هر سه گونه جلبک قرمز در مقایسه با دیگر حلال‌ها بالاتر بود. به طور کلی جاذب‌های فلزی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شوند، زیرا پتانسیل احیا را کاهش داده، باعث پایداری فرم اکسید شده یون فلزی می‌شوند. در مطالعه‌ای Chakraborty و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که فعالیت جذب فلزی در عصاره حلال آلی جلبک‌های *Hypnea musciformis* و *Jania rubens* در مقایسه با دیگر عصاره‌ها بالاتر بود. Ye و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که فراکشن اتیل‌استاتی و بوتانولی در جلبک قهوه‌ای *Sargassum pallidum* دارای قدرت احیای بالاتری نسبت به دیگر فراکشن‌ها است. مطالعات قبلی نشان داده است که ترکیبات با ساختارهای دارای گروه‌های عاملی OH–، SH–، COOH–، $PO_3H_2$–، $NR_2$–، S–، و O– در صورت وجود شرایط بهینه محیطی دارای فعالیت جذب فلزی خواهند بود و آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه کارآمدی هستند (Lindsay, 1996). همچنین در مطالعه حاضر در هر سه گونه جلبک میزان متفاوتی از جذب فلزی در هر تیمار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). از این رو به نظر می‌رسد که تفاوت در خاصیت احیا بین تیمارهای مختلف در این مطالعه ناشی از تفاوت در ترکیب استخراج شده بسته به نسبت حلال و گونه باشد (Taheri, 2016).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های قرمز *G. arcuata*، *G. textorri* و *L. jungermannioides* بسته به نوع گونه و نسبت حلال مورد استفاده برای استخراج عصاره متفاوت است. بالاترین میزان عصاره با استفاده از متانول ۱۰۰ درصد در

*L. jungermannioides* به دست آمد، در حالی که بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی در عصاره استخراج شده با متانول ۶۰ درصد در جلبک *G. arcuata* وجود داشت. از این رو به نظر می‌رسد که میزان خواص آنتی‌اکسیدانی در هر جلبک، بسته به نوع جلبک و نسبت حلال مورد استفاده می‌تواند متفاوت باشد. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که جلبک قرمز *G. arcuata* می‌تواند به عنوان یکی از گونه‌های جلبکی مناسب برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال در نظر گرفته شود.

**تشکر و قدردانی**

از تمامی کارشناسان آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

**حیدری م.، موحدنیا ا. و حسینی س. ۱۳۹۶.** بررسی توان ضدرادیکالی و ضداکسیدانی دو گونه جلبکی قرمز و قهوه‌ای سواحل خلیج فارس در استان بوشهر در مقایسه با برگ درخت حرا (*Avicennia mari*). فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۱۹(۵): ۱۸۹-۱۷۹.

**شریفیان س.، شعبان‌پور ب.، طاهری ع. و کردجزی م. ۱۳۹۸.** تاثیر حلال‌های متفاوت در استخراج ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های قهوه‌ای *Padina australis* Hauck و *Nizimuddinia zanardinii* (Schiffner) P.C. Silva. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۸(۴): ۸۶-۷۶.

**طاهری ع. و مرادی س. ۱۳۹۷.** بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آلی جلبک دریایی *Colpomenia sinousa*. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۸(۱۶۰): ۱۵۵-۱۵۱.

**قره‌خان تقرتپه ر.، کردجزی م.، احمد نصرالهی س.، شعبانپور ب. و عادلی ا. ۱۳۹۸.** بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی آلژینات و فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum boveanum* جمع‌آوری شده از سواحل خلیج فارس. دو فصلنامه علوم آبزی پروری، ۷(۲): ۷۶-۶۴.

**لشکان ا.ب.، رضایی م.، رضایی ک. و سیف‌آبادی س.ج. ۱۳۹۱.** بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* خلیج فارس به روش استخراج به کمک مایکروویو. فصلنامه شیلات، ۶۵(۳): ۲۵۵-۲۴۳.

**ناظمی م.، پیشه‌ورزاد ف.، مطلبی ع.ع. و احمدزاده ا. ۱۳۹۱.** بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های اسفنج *Axinella sinoxea* از جزیره لارک خلیج فارس. مجله بوم شناسی آبزیان، ۱(۴): ۶۵-۵۴.

**Amarowicz R., Naczk M. and Shahidi F. 2000.** Antioxidant activity of various fractions of non tannin phenolics of canola hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2755–2759.

**Blomhoff R. 2005.** Dietary antioxidants and cardiovascular disease. Current Opinion in Lipidology, 16: 47–54.

**Chakraborty K., Joseph D. and Praveen N.K. 2013.** Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. Journal of Food Science and Technology, 52(4): 1924–1935.

**Dinis T.C.P., Madeira V.M.C. and Almeidam L.M. 1994.** Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and

as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315: 161–169.

**Foon T.S., Ai L.A., Kuppusamy P., Yusoff M.M. and Govindan N. 2013.** Studies on in-vitro antioxidant activity of marine edible seaweeds from the east coastal region of Peninsular Malaysia using different extraction methods. Journal of Coastal Life Medicine, 1(3): 193–198.

**Gall A.A., Lelchat F., Hupel M., Jegou C. and Stiger-Pouvreau V. 2015.** Extraction and purification of phlorotannins from brown algae. P: 146–159. In: Stengel D.B. and Connan S. (Eds.). Natural Products from Marine Algae: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer Science and Business Media, USA.

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

**Hidayati J.R., Yudiati E., Pringgenies D., Oktaviyanti D.T. and Kusuma A.P. 2020.** Comparative study on antioxidant activities, total phenolic compound and pigment contents of tropical *Spirulina platensis*, *Gracilaria arcuata* and *Ulva lactuca* extracted in different solvents polarity. The 3rd International Symposium on Marine and Fisheries Research, Indonesia, E3S Web of Conferences, 147: 1–9 (03012).

**Kalaiselvan I., Senthamarai M. and Kasi P.D. 2016.** 2,3,7,8-TCDDmediated toxicity in peripheral blood mononuclear cells is alleviated by the antioxidants present in *Gelidiella acerosa*: An in vitro study. Environmental Science and Pollution Research International, 23: 5111–5121.

**Lindsay R.C. 1996.** Food additives. P: 778–780. In: Fennema O.R. (Ed.). Food Chemistry. Marcel Dekker, USA.

**Maharana D., Das P.B., Verlecar X.N., Pise N.M. and Gauns M. 2015.** Oxidative stress tolerance in intertidal red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) in relation to environmental components. Environmental Science and Pollution Research International, 22: 18741–18749.

**Praveen N.K. and Chakraborty K. 2013.** Antioxidant and anti-inflammatory potential of the aqueous extract and polysaccharide fraction from brown marine macroalgae *Padina* sp. from Gulf of Mannar of Peninsular India. Journal of Coastal Life Medicine, 1(1): 39–49.

**Sharifian S., Shahbanpour B., Taheri A. and Kordjazi M. 2019.** Effect of phlorotannins on melanosis and quality changes of

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. Food Chemistry, 298: 1–9 (124980).

**Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. and Nakamura T. 1992.** Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 40: 945–948.

**Taheri A. 2016.** Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 15(2): 802–817.

**Wang T., Jonsdottit R. and Olafsdottir G. 2009.** Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry, 116: 240–248.

**Ye H., Zhou C., Sun Y., Zhang X., Liu J., Hu Q. and Zeng X. 2009.** Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. European Food Research and Technology, 230(1): 101–109.

**Yen G.C. and Chen H.Y. 1995.** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1): 27–32.

**Zhou K. and Yu L. 2004.** Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. Food Science and Technology (LWT), 37: 717–721.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 1, Spring 2022

Research Paper

# Effect of solvent on the antioxidant properties of *Gracilaria arcuata*, *Gracilaria textorri* and *Leveillea jungermannioides*

**Salim Sharifian[1]*, Mehran Loghmani[2]**

Received: June 2021 Accepted: October 2021

## Abstract

In the present study, effect of different solvents (methanol 100%, methanol 60%, methanol 20% and water 100%) were evaluated on the extract yield and antioxidant properties of three red seaweed species including *Gracilaria arcuata*, *Gracilaria textorri* and *Leveillea jungermannioides*) from Chabahar coasts. Antioxidant activities of different extract were measured by DPPH free radical scavenging activity, reduction power and iron chelating activity methods. There was a significant difference between the extract yield of different seaweed and the highest amount of the extract (6.02g/100g seaweed) was obtained from *L. jungermannioides* with methanol 100% as solvent. The most antioxidant activities, measured by different assay were observed in methanol 60% extract of *G. arcuata* which was significantly higher than other species. The amount of the extract and antioxidant properties were significantly different between different treatments depending on the solvent ratio and the type of seaweed species. The results of the present study showed *G. arcuata* can be considered as potential sources of natural antioxidants.

**Key words:** *Red Seaweed, Antioxidant, Free Radical, Extract, Solvent*.

1- Assistant Professor in Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
2- Associate Professor in Marine Biology Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

*Corresponding Author: sharifian.salim@hotmail.com