

مقاله پژوهشی

خواص آنتی‌اکسیدانی فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum tenerrimum*) و توانایی آن در مهار آنزیم پلی فنول اکسیداز میگوی وانامی

سعید گرگیج^۱، سلیم شریفیان^{۲*}، مهران لقمانی^۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

فوکوئیدان یکی از پلی‌ساکاریدهای مهم تولید شده توسط جلبک‌های قهوه‌ای است. در مطالعه حاضر فوکوئیدان از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum tenerrimum*) استخراج و ویژگی‌های آن شامل میزان استخراج، کربوهیدرات، پروتئین، سولفات، اورونیک اسید، خواص آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد DPPH و احیای یون آهن) و توانایی آن در مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مورد سنجش قرار گرفت. میزان استخراج، کربوهیدرات، پروتئین، سولفات و اورونیک اسید فوکوئیدان استخراج شده به ترتیب ۷/۲۳، ۳۶/۵۱، ۵/۶۴، ۱۱/۵۷ و ۹/۲۲ درصد بود. میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان بسته به غلظت از ۳۵/۹۴ تا ۶۳/۹۴ درصد متغیر بود ($P < 0/05$). میزان احیای یون آهن از ۰/۲۳ در تیمار فوکوئیدان با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۰/۷۴ در تیمار ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فوکوئیدان متغیر بود. بالاترین میزان مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی در فوکوئیدان با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برابر با ۶۴/۷۲ درصد به دست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*S. tenerrimum*) منبعی غنی از فوکوئیدان با خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه است و پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از این جلبک می‌تواند به عنوان بازدارنده طبیعی و سالم آنزیم پلی‌فنول اکسیداز مطرح باشد.

واژگان کلیدی: جلبک قهوه‌ای، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، بازدارندگی پلی‌فنول اکسیداز، کیفیت میگو.

۱- کارشناس ارشد شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

* نویسنده مسئول: sharifian.salim@hotmail.com

مقدمه

بیماری‌ها را بودن آن‌ها وجود ندارد، اما به دلیل ایجاد تغییرات رنگی نامطلوب سطحی، مشتری پسندی محصول را به شدت کاهش می‌دهند (Sharifian et al., 2019). ملانوزیس در میگو در اثر فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز رخ می‌دهد. این آنزیم عمدتاً در کاراپاس سفالوتوراکس میگو وجود دارد و اورتو هیدروکسیلاسیون مونوهیدروکسی فنول‌ها (فعالیت مونوفنولاز یا کرسولاز) و اکسیداسیون اورتو دی‌هیدروکسی فنول‌ها را به ارتوکینون‌ها (فعالیت کاتکول اکسیداز یا دی‌فنولاز) کاتالیز می‌کند. پلیمریزاسیون غیرآنزیمی اورتوکینون‌ها منجر به تشکیل رنگدانه تیره رنگ و نامحلول در آب ملانین و بروز ملانوزیس (لکه‌های سیاه) در میگو می‌شود (شریفیان و شعبان‌پور، ۱۴۰۰).

ماکرو جلبک‌های دریایی معمولاً بر اساس رنگدانه‌های موجود در آنها به سه گروه جلبک‌های قهوه‌ای (Phaeophyceae)، قرمز (Rhodophyceae) و سبز (Chlorophyceae) طبقه‌بندی می‌شوند. جلبک‌های قهوه‌ای و قرمز تقریباً به طور کامل در تمام زیستگاه‌های دریایی یافت می‌شوند. اغلب ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای در کمربند جزرومدی و ناحیه بالای آن و بویژه در نیمکره شمالی رشد کرده، پوشش غالب را

در بین موجودات آبی میگو یکی از با ارزش‌ترین گونه‌ها است و استفاده از آن به عنوان غذا، همواره در میان ساحل‌نشینان مناطق گرمسیری مرسوم بوده است. بی‌شک میگو شناخته شده‌ترین و پرمصرف‌ترین غذای دریایی در دنیا است و صنایع وابسته به آن به صورت تجاری یکی از مهم‌ترین صنایع فرآورده‌های دریایی به شمار می‌رود، به طوری که بر اساس آخرین آمار منتشر شده توسط سازمان خوار و بار جهانی در سال ۲۰۱۸، میزان تولید آن به بیش از ۴/۱ میلیون تن در سال رسیده است. همچنین این کالا با اختصاص ۱۸ درصد از کل سهم تجارت آبزیان در دنیا، مهم‌ترین و اصلی‌ترین کالای شیلاتی است (FAO, 2020). در میان گونه‌های مختلف میگو، میگوی پارسفید غربی یا وانامی با نام علمی *Litopenaeus vannamei* گونه اصلی پرورشی در جهان و ایران است. همانند دیگر غذاهای دریایی، افت کیفیت سریع پس از صید یا برداشت، مهم‌ترین محدودیت در فرآوری محصولات دریایی است. علاوه بر افت کیفیت، میگو و دیگر سخت‌پوستان پس از صید در معرض ملانوزیس یا لکه سیاه نیز قرار دارند. این لکه‌های سیاه تغییری در طعم میگو ایجاد نمی‌کنند و هیچ گزارشی مبتنی بر

ترکیبات متنوعی از جمله گالاکتوز، زیلوز، فوکوز و گلوکورونیک اسید هستند (حسین‌پوری و همکاران، ۱۳۹۸). پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و کاربردی بالا، دارای کاربردهای تجاری متنوعی هستند و در صنعت غذایی به عنوان تثبیت کننده، قوام دهنده، امولسیفایر و همچنین در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها نیز استفاده می‌شوند (Rioux et al., 2009).

اهمیت کیفیت برای مصرف کنندگان و کارخانه‌های فرآوری محصولات دریایی باعث شده است که مطالعات گسترده‌ای در زمینه مهار ملانوزیس در میگو در سراسر دنیا انجام گیرد. به طور سنتی در بسیاری از کارخانه‌های فرآوری برای مهار ملانوزیس از ترکیبات سولفیتی و بویژه متابی‌سولفیت سدیم استفاده می‌شود. با این وجود استفاده از این ترکیبات ممکن است منجر به بروز حساسیت و ایجاد مشکل در افراد مبتلا به آسم شود (Montero et al., 2001). از این رو در طی سال‌های اخیر جستجو برای یافتن جایگزین‌های طبیعی و موثر برای این ترکیبات مورد توجه پژوهشگران و صنایع شیلاتی بوده است و امکان استفاده از بسیاری ترکیبات با منشا طبیعی از سیتریک اسید (Montero et al., 2001)، اگزالیک اسید

تشکیل می‌دهند. جلبک‌های قهوه‌ای جنس *Sargassum* یکی از جنس‌های مهم و با پراکنش بالا در سواحل جنوبی ایران با بیشترین فراوانی در اواسط زمستان است. تاکنون حدود ۱۵۰ گونه از این جنس در سراسر دنیا شناسایی شده است. برخی از گونه‌های این جنس مانند *S. natans* در اتصال به صخره و تکیه گاه رشد می‌کنند، در حالی که گونه‌های دیگر مانند *S. tenerrimum* به صورت شناور در محیط‌های دریایی یافت می‌شوند (جمیلی، ۱۳۹۴). از گذشته‌های دور استفاده از جلبک‌ها به عنوان منبع غذایی، خوراک جانوران، کود و غیره برای انسان شناخته شده بوده است. با این حال در طی قرن اخیر استفاده و بهره‌برداری از آن‌ها به عنوان تولید کننده ترکیبات زیست‌فعال مورد توجه پژوهشگران در سراسر جهان قرار گرفته است و تاکنون متابولیت‌های متنوع با کارکردهای گوناگون از این گروه از جلبک‌های دریایی استخراج شده است. فوکوئیدان یکی از ترکیبات با اهمیت موجود در جلبک‌های دریایی است. فوکوئیدان‌ها، پلی‌ساکاریدهای سولفات‌های هستند که انواع جلبک‌های دریایی قهوه‌ای آن‌ها را تولید می‌کنند و فعالیت‌های زیستی آن‌ها بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. فوکوئیدان‌ها پلی‌ساکاریدهای غنی از سولفات و حاوی

لای و دیگر آلودگی‌ها، جلبک‌ها با آب شیرین شستشو و سپس در سایه خشک شدند. جلبک خشک شده با استفاده از خردکن خانگی، پودر و تا هنگام عصاره‌گیری و استخراج فوکوئیدان در فریزر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

عصاره‌گیری و استخراج فوکوئیدان

استخراج فوکوئیدان با استفاده از آب داغ و از روش ذکر شده توسط Borazjani و همکاران (۲۰۱۸) با اندکی تغییرات انجام گرفت. به صورت خلاصه، ۱۰۰ گرم پودر جلبک با ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به هم زده شد. مخلوط به دست آمده توسط کاغذ صافی، صاف و تفاله یا جلبک به دست آمده با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (۶۰ درجه سانتی‌گراد) مخلوط و به مدت ۲ ساعت هم زده شد. مخلوط به دست آمده در دور ۶۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Universal, PIT320، ایران) و مایع رویی جداسازی شد. به منظور رسوب آلژینات، کلرید کلسیم به آن اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه به کمک سانتریفیوژ بخش مایع مخلوط، جمع‌آوری، با اتانول مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بخش جامد

(Son et al., 2000)، اسانس آویشن شیرازی (نصیری و همکاران، ۱۳۹۳) و فلوروتانین‌ها (Sharifian et al., 2019) به عنوان جایگزین‌های ترکیبات سولفیتی بررسی شده است. با این وجود بر اساس اطلاع مولفین تاکنون مطالعه‌ای در زمینه استفاده از فوکوئیدان به عنوان یک بازدارنده طبیعی برای مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در میگوی وانامی انجام نشده است. از این رو هدف مطالعه حاضر، استخراج فوکوئیدان از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم *Sargassum tenerrimum* و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی جلبک

نمونه‌های جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* به صورت تازه از ساحل تیس (چابهار) در دی ماه ۱۳۹۹ جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل شد. شناسایی گونه جلبک توسط موزه علوم دریایی دانشگاه چابهار در ابتدا با استفاده از ویژگی‌های ظاهری و سپس با کلیدهای شناسایی انجام شد. برای حذف گل و

رسوب کرده یعنی ترکیبات پلی‌ساکاریدی فوکوئیدان توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری و چندین بار با استون آب‌زدایی شد. نمونه‌های به دست آمده تا هنگام آزمایش در -18 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش ویژگی‌های فوکوئیدان

میزان سولفات فوکوئیدان پس از هیدرولیز آن در هیدروکلریک اسید $0/5$ مولار در 105 درجه سانتی‌گراد (به مدت 5 ساعت) بر اساس روش ذکر شده توسط Lee و همکاران (۲۰۱۲) و با استفاده از کلرید باریم ($BaCl_2$) و سولفات پتاسیم (K_2SO_4) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. سنجش میزان پروتئین بر اساس روش لوری و با استفاده از کیت سنجش پروتئین (تالی‌ژن پارس، ایران) انجام شد (Borazjani et al., 2018). اندازه‌گیری کربوهیدرات کل بر اساس روش ذکر شده توسط مشایخی و آتشی (۱۳۹۵) و با روش آنتروژن و اندازه‌گیری میزان جذب در 630 نانومتر صورت گرفت. میزان اورونیک اسید بر اساس روش ذکر شده توسط Filisetti-Cozzi و Carpita (۱۹۹۱) و با استفاده از گلوکورونیک اسید به عنوان استاندارد انجام شد. میزان مهار رادیکال

آزاد DPPH بر اساس روش ذکر شده توسط Taheri (۲۰۱۶) انجام گرفت. به طور خلاصه، 1 میلی‌لیتر محلول DPPH (75 میکرومولار) با 1 میلی‌لیتر عصاره (1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مخلوط و در تاریکی به مدت 30 دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از 30 دقیقه جذب در طول موج 517 نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (2100، UNICO، آمریکا) خوانده شد. برای اندازه‌گیری قدرت احیای یون آهن (Fe^{+3}) از روش ذکر شده توسط Taheri (۲۰۱۶) استفاده شد. 1 میلی‌لیتر محلول آزمایش (1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با 1 میلی‌لیتر بافر سولفات مخلوط و در ادامه 1 میلی‌لیتر هگزاسیانوفرات اضافه شد و در دمای 50 درجه سانتی‌گراد در حمام آبی به مدت 20 دقیقه انکوبه شد. با اضافه کردن 1 میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید 10 درصد واکنش متوقف و سپس به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ بخش شناور جدا و با $1/5$ میلی‌لیتر آب مقطر و $0/1$ میلی‌لیتر محلول کلرید فریک مخلوط شد و بعد از 10 دقیقه جذب آن در طول موج 700 نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد.

تغییرات اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان بازدارندگی آنزیمی، از فوکوئیدان استخراج شده در مرحله قبل، غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیم استخراج شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول فوکوئیدان مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از اضافه کردن بافر فسفات، به مخلوط ۶۰۰ میکرولیتر L-DOPA اضافه و میزان جذب به صورت پیوسته به مدت ۳ دقیقه در ۴۷۵ نانومتر ثبت شد. هر ۰/۰۱ افزایش در جذب در دقیقه به عنوان یک واحد فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد و میزان بازدارندگی به صورت درصد از تفاضل فعالیت آنزیمی تیمار شاهد با فعالیت آنزیمی تیمار حاوی فوکوئیدان محاسبه شد. برای نمونه‌های شاهد منفی و مثبت به ترتیب از آب مقطر و اسید آسکوربیک استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی نرمال و همگن بودن داده‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگراف-اسمیرنوف و Leven انجام شد. برای بررسی اثرهای معنی‌دار شاخص بین تیمارهای مختلف از آزمون تحلیل چند متغیره و مقایسه میانگین داده‌ها و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد)

استخراج آنزیم پلی‌فنول اکسیداز از میگوی وانامی و سنجش میزان بازدارندگی آنزیم

استخراج آنزیم پلی‌فنول اکسیداز از پوسته میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) و بر اساس روش Nirmal و Benjakul (۲۰۰۹) انجام گرفت. در ابتدا سفالوتراکس ۲۰ عدد میگوی تازه به صورت دستی جدا و همراه با نیتروژن مایع با استفاده از خردکن تجاری (Waring Co، آمریکا) پودر شد. به مخلوط به دست آمده، ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج کننده (بافر فسفات سدیم با pH ۷/۲، محتوی کلرید سدیم ۱ مولار و ۰/۲ درصد بریج-۳۵) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ (Hettrich, 420 R، آلمان) شد. در ادامه محلول رویی جدا و پس از اشباع شدن با سولفات آمونیوم ۴۰ درصد با استفاده از کیسه دیالیز به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد. مایع به دست آمده از دیالیز جمع‌آوری، سانتریفیوژ (۴ دقیقه با دور ۴۰۰۰g) و فاز شفاف بالایی به عنوان عصاره آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از روش Nirmal و Benjakul (۲۰۰۹) به صورت رنگ‌سنجی پیوسته با استفاده از ترکیب L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-) (phenylalanine) به عنوان سوبسترا با اندکی

حالی که میزان سولفات و اورونیک اسید آن به ترتیب برابر ۱۱/۵۷ و ۹/۲۲ درصد بود.

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره اولیه و غلظت‌های مختلف فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. tenerrimum* در شکل ۱ نشان داده شده است. در مقایسه غلظت‌های مختلف فوکوئیدان، کمترین میزان بازدارندگی با ۳۵/۹۴ درصد در غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر و بیشترین میزان بازدارندگی با ۶۳/۳۵ درصد در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد ($P < 0/05$). میزان مهار رادیکال آزاد در هر سه غلظت سنجش شده فوکوئیدان و عصاره اولیه نسبت به آسکوربیک اسید (۹۴/۵۸ درصد) کمتر بود ($P < 0/05$).

میزان قدرت احیای یون آهن (جذب در ۷۰۰ نانومتر) در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. tenerrimum* در شکل ۲ نشان داده شده است. بالاترین میزان احیا (۰/۷۴) در فوکوئیدان با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کمترین میزان احیا (۰/۲۳) در فوکوئیدان با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. میزان احیای یون آهن در فوکوئیدان در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به تیمار شاهد یعنی آسکوربیک اسید (۰/۵۲) بیشتر بود ($P < 0/05$). با این وجود در

توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷) استفاده شد. از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

ویژگی‌های مختلف فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* جمع‌آوری شده از ساحل چابهار در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ویژگی‌های فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* (میانگین \pm انحراف معیار)

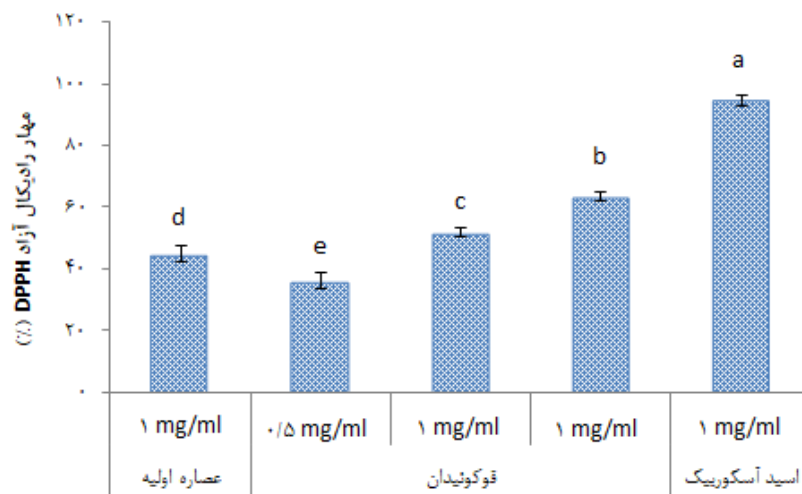
شاخص	مقدار (%)
میزان استخراج*	۷/۲۳ \pm ۰/۲۳
کربوهیدرات	۳۶/۵۱ \pm ۰/۷۸
پروتئین	۵/۶۴ \pm ۰/۱۱
میزان سولفات	۱۱/۵۷ \pm ۰/۴۸
اورونیک اسید	۹/۲۲ \pm ۰/۲۰

*: میزان استخراج بر اساس گرم فوکوئیدان استخراج شده از ۱۰۰ گرم جلبک خشک شده است.

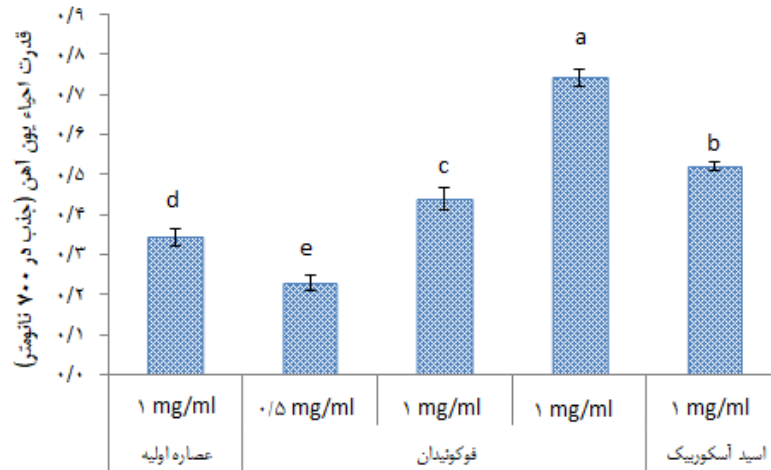
میزان استخراج این پلی‌ساکارید برابر با ۷/۲۳ \pm ۰/۲۳ درصد بود. میزان کربوهیدرات و پروتئین در فوکوئیدان استخراج شده به ترتیب برابر با ۳۶/۵۱ و ۵/۶۵ درصد به دست آمد، در

غلظت مشابه، یعنی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میزان احیای پایینتری در فوکوئیدان (۰/۴۴) نسبت به آسکوربیک اسید (۰/۵۲) به دست آمد ($P < ۰/۰۵$).

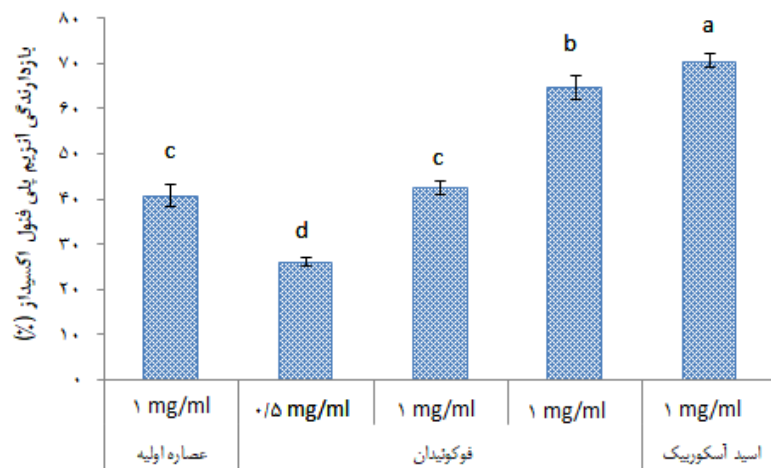
مقایسه میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی توسط غلظت‌های مختلف فوکوئیدان و عصاره اولیه جلبک قهوه‌ای *S. tenerrimum* با آسکوربیک اسید در شکل ۳ نشان داده شده است. در میان غلظت‌های مختلف فوکوئیدان، بالاترین بازدارندگی به میزان ۶۲/۷۴ درصد در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کمترین آن به میزان ۲۶/۱۸ درصد در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. میزان بازدارندگی در هر دو تیمار عصاره اولیه و غلظت‌های مختلف فوکوئیدان نسبت به آسکوربیک اسید (۷۰/۵۵ درصد) کمتر بود ($P < ۰/۰۵$).



شکل ۱: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$).



شکل ۲: میزان قدرت احیای یون آهن (جذب در ۷۰۰ نانومتر) در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۳: میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز (PPO) میگوی وانامی توسط فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

بحث

در مطالعه دیگری، Lee و همکاران (۲۰۱۲) بازده استخراج، کربوهیدرات کل، سولفات، اورونیک اسید و پروتئین فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Ecklonia cava* را به ترتیب ۱/۸، ۵۱/۸، ۲۰/۱، ۱۱/۳ و ۸/۷ درصد اعلام کردند. فوکوئیدان جداسازی شده از جلبک‌ها اغلب ترکیب پیچیده‌ای دارد و درصد اجزای آن بسته به گونه، روش استخراج و روش آزمایش متفاوت است (Yang et al., 2008).

سنجش میزان مهار رادیکال آزاد DPPH یکی از پرکاربردترین روش‌های اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره و ترکیبات طبیعی جداسازی شده از گیاهان دریایی است (Cho et al., 2007). محلول الکلی DPPH در دمای اتاق تشکیل رادیکالی پایدار می‌دهد. با افزودن عصاره جلبکی، رنگ آبی تا بنفش این محلول با جذب الکترون یا هیدروژن تبدیل به زرد می‌شود و اندازه‌گیری این تغییر رنگ، معیار اساسی این روش است (Cho et al., 2007). در مطالعه حاضر بالاترین خاصیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار فوکوئیدان با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. به بیان دیگر با افزایش غلظت فوکوئیدان میزان مهار رادیکال آزاد نیز افزایش یافت. نتایج مطالعه حاضر با

پلی‌ساکاریدهای جلبک‌ها ترکیبات طبیعی بسیار فعال با کاربردهای ارزشمند هستند. در میان منابع گوناگون، جلبک‌های قهوه‌ای، منبعی غنی و تجدیدپذیر از پلی‌ساکاریدهای مهم از لحاظ ساختاری و زیستی هستند (Foley et al., 2011). فوکوئیدان به عنوان یکی از پلی‌ساکاریدهای جلبکی موضوع مطالعات متعددی در سالیان اخیر بوده است. این پلی‌ساکارید از گونه‌های متعددی از جلبک‌های دریایی و با روش‌های مختلفی جداسازی شده است. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که ویژگی‌های فوکوئیدان و میزان آن علاوه بر نوع گونه و روش استخراج، متاثر از مختصات جغرافیایی، شرایط محیطی و فصل برداشت است. ویژگی‌های فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. tenerrimum* در مطالعه حاضر (جدول ۱) قابل مقایسه با فوکوئیدان به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum boveanum* در مطالعه قره‌خان تقریباً و همکاران (۱۳۹۸) است. در مطالعه یاد شده میزان کربوهیدرات کل، پروتئین کل و سولفات به ترتیب برابر با ۸۲/۹۵، ۷/۴۴ و ۳۳/۷۶ درصد گزارش شد (قره‌خان تقریباً و همکاران، ۱۳۹۸) که نسبت به شاخص‌های به دست آمده در مطالعه حاضر بالاتر بود.

موج حاکی از افزایش قابلیت احیاکنندگی است. در مطالعه حاضر بالاترین قدرت احیای آهن در فوکوئیدان با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد و میزان احیا با افزایش غلظت فوکوئیدان، افزایش یافت. مطالعات پیشین نیز نشان داده است که فوکوئیدان استخراج شده از منابع دریایی توانایی احیای یون آهن را دارد. اخیراً صحراگرد و همکاران (۱۴۰۰) میزان احیای یون آهن در فوکوئیدان به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *S. ilicifolium* و فراکشن‌های آن را بین ۰/۰۶۴ تا ۰/۱۱۹ گزارش کردند. نتایج مطالعه حاضر همچنین در تطابق با نتایج مطالعه انجام شده توسط قره‌خان تقرتپه و همکاران (۱۳۹۸) است که افزایش میزان احیای یون آهن را در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. boveanum* همگام با افزایش غلظت فوکوئیدان گزارش کردند.

مطالعه مهار آنزیم پلی فنول اکسیداز در میگو و دیگر جانوران با استفاده از ترکیبات طبیعی همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای در مطالعه حاضر بسته به غلظت، درجات متفاوتی از بازدارندگی آنزیم PPO را نشان داد و بالاترین میزان بازدارندگی (۶۴/۷۲ درصد) در بیشترین غلظت مورد آزمایش یعنی ۲ میلی گرم

نتایج صحراگرد و همکاران (۱۴۰۰) قابل مقایسه است که توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum ilicifolium* را در محدوده ۶۳/۲۷-۸۱/۲۸ درصد گزارش و ذکر کردند که درصد مهارکنندگی ارتباط مستقیمی با غلظت فوکوئیدان دارد. Palanisamy و همکاران (۲۰۱۷) توانایی مهار رادیکال آزاد در فوکوئیدان استخراج شده از *Sargassum polycystum* را ۶۱/۲ درصد گزارش کردند. در مطالعه دیگری، قره‌خان تقرتپه و همکاران (۱۳۹۸) میزان بازدارندگی DPPH را در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. boveanum* در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بین ۱۴/۵۸ تا ۲۵/۰۱ درصد گزارش کردند.

قابلیت کاهندگی آهن نیز یکی از شاخص‌های مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات طبیعی است. احیای آهن (III) اغلب به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی به کار می‌رود. سنجش قدرت احیاکنندگی (آنتی‌اکسیدان) در نمونه ناشی از احیای آهن II به آهن III با اهدای الکترون است. میزان کمپلکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل رنگ آبی فرس در ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش جذب در این طول

آنتی‌اکسیدانی بالایی است (شکل‌های ۱ و ۲). از این رو به نظر می‌رسد که بخشی از خاصیت بازدارندگی بالای این جلبک به دلیل توانایی آنتی‌اکسیدانی بالای آن باشد. این نتیجه‌گیری با یافته‌های Sharifian و همکاران (۲۰۱۹) و Kim و همکاران (۲۰۰۹) در تطابق است که نشان دادند مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات جداسازی شده از جلبک‌های دریایی نقش مهمی در بازدارندگی آنزیم تیروزیناز دارد و جلبک‌های با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر، توانایی بهتری در مهار آنزیم دارند.

در مجموع، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جلبک قهوه‌ای *Sargassum tenerrimum* جمع‌آوری شده از سواحل چابهار منبع غنی از پلی‌ساکارید فوکوئیدان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی قابل توجه آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی است. توانایی آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی آنزیمی فوکوئیدان استخراج شده در غلظت‌های مختلف متفاوت بود و با افزایش غلظت کارایی آن نیز بیشتر شد. به طور کلی یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که جلبک قهوه‌ای *S. tenerrimum* می‌تواند به عنوان منبعی تجدیدپذیر برای استخراج پلی‌ساکارید فوکوئیدان در نظر گرفته شود. همچنین با توجه به پراکنش بالای این جلبک

در میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر با پژوهش Wang و همکاران (۲۰۱۹) قابل مقایسه است که نشان دادند عصاره غنی از فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای *Undaria pinnatifida* بسته به غلظت مورد استفاده (۱۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، توانایی مهار آنزیم تیروزیناز (۱۹-۹ درصد) را داشت. توانایی مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی توسط عصاره‌های استخراج شده از جلبک‌های قهوه‌ای در مطالعات دیگری نیز به اثبات رسیده است. اخیراً شریفیان و شعبان‌پور (۱۴۰۰) نشان داده‌اند که عصاره‌های استخراج شده از جلبک‌های قهوه‌ای *Nizamuddiniazanardinii* *Stoechospermum* *Sargassum cristaeifolium marginatum* و *S. ilicifolium* و توانایی مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی را دارند. در پژوهش دیگری Li و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که عصاره پلی‌فنولی به دست آمده از جلبک *Porphyra yezoensis* توانایی مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز را در میگوی وانامی در طی نگهداری در یخچال دارد. علاوه بر خاصیت بازدارندگی آنزیمی فوکوئیدان، نتایج بخش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطالعه حاضر نشان داد که فوکوئیدان در غلظت‌های بالا دارای خاصیت

تشکر و قدردانی

در سواحل جنوبی ایران، استخراج و خالص‌سازی فوکوئیدان و استفاده از آن در صنایع مختلف می‌تواند به عنوان راهکاری در جهت افزایش بهره‌وری از جلبک‌های سواحل جنوبی کشور و ایجاد ارزش افزوده مطرح باشد.

پژوهش حاضر بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار است و از تمامی کارشناسان آزمایشگاه مرکزی این دانشگاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

- حسین پوری ا.، محمدی م. و عبیدی ن. ۱۳۹۸. فوکوئیدان، پلی ساکارید چند عملکردی. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، ۹(۲): ۱۳۸۳-۱۳۶۸.
- جمیلی ش. ۱۳۹۴. جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار استروئیدهای جلبک‌های *Padina boergesni* و *Sargassum glaucescens* دریای عمان. گزارش پروژه موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۴۳ص.
- شریفیان س. و شعبان پور ب. ۱۴۰۰. خواص آنتی اکسیدانی و میزان بازدارندگی آنزیم پلی فنول اکسیداز میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در عصاره‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای. مجله علمی شیلات ایران، ۳۰(۲): ۳۳-۲۳.
- صحراگرد ک.، طبرسا م. و احمدی گاولیقی ح. ۱۴۰۰. استخراج، تخلیص، ویژگی‌های ضددیابتی و ضداکسایشی فوکوئیدان حاصل از جلبک قهوه ای *Sargassum ilicifolium*. شیلات مجله منابع طبیعی ایران، ۷۴(۲): ۲۳۴-۲۳۲.
- قره‌خان تقرتپه ر.، کردجزی م.، احمد نصرالهی س.، شعبانپور ب. و عادل ا. ۱۳۹۸. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی آلژینات و فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum boveanum* جمع‌آوری شده از سواحل خلیج فارس. دوفصلنامه علوم آبی‌پروری، ۷(۲): ۶۴-۷۶.
- مشایخی ک. و آتشی ص. ۱۳۹۵. راهنمای آزمایشات فیزیولوژی گیاهی (بررسی‌های قبل و پس از برداشت گیاهان). تحقیقات آموزش کشاورزی. ۳۱۸ص.
- نصیری ا.، موسوی نسب م.، شکر فروش س. ش. و گلمکانی م. ت. ۱۳۹۳. بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) بر مهار آنزیم پلی فنول اکسیداز و روند ملانوزیس در میگو پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۳): ۱۱۸-۱۰۹.
- Borazjani N.J., Tabarsa M., You S. and Rezaei M. 2018. Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*. International Journal of Biological Macromolecules, 109: 793-802.
- Cho S.H., Kang S.E., Cho J.Y., Kim A.R., Park S.M., Hong Y.K. and Ahn D.H. 2007. The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum siliquastrum*) extracts. Journal of Medicinal Food, 10(3): 479-85.
- FAO. 2020. Food Outlook- Biannual Report on Global Food Markets.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italy. 165P.
- Filisetti-Cozzi T.M. and Carpita N.C. 1991.** Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197: 157–162.
- Foley S.A., Mulloy B. and Touhy M.G. 2011.** An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: Extraction, characterization, and apoptotic effects in vitro. *Journal of Natural Products*, 74: 1851–1861.
- Kim A.R., Shin T.S., Lee M.S., Park J.Y., Park K.E., Yoon N.Y., Kim J.S., Choi J.S., Jang B.C., Byun D.S., Park N.K. and Kim H.R. 2009.** Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3483–3489.
- Lee S.H., Ko C.I., Ahn G., You S., Kim J.S., Heu M.S., Kim J., Jee Y. and Jeon Y.J. 2012.** Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, 89: 599–606.
- Li Y., Yang Z. and Li J. 2017.** Shelf-life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1): 291–298.
- Montero P., Lopez-Caballero M.E. and Perez-Mateos M. 2001.** The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Science*, 66(8): 1201–1206.
- Nirmal N.P. and Benjakul S. 2009.** Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chemistry*, 116: 323–331.
- Palanisamy S., Vinosha M., Marudhupandi T., Rajasekar P. and Prabhu N.M. 2017.** Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 405–412.
- Rioux L.E., Turgeon S.L. and Beaulieu M. 2009.** Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry*, 70(8): 1069–1075.
- Sharifian S., Shahbanpour B., Taheri A. and Kordjazi M. 2019.** Effect of phlorotannins on melanosis and quality changes of Pacific whit shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chemistry*, 298: 1–8 (124980).

- Son S.M., Moon K.D. and Lee C.Y. 2000.** Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2071–2074.
- Taheri A. 2016.** Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2): 802–817.
- Wang L., Cui Y.R., Yang H.W., Lee H.G., Ko J.Y. and Jeon Y.J. 2019.** A mixture of seaweed extracts and glycosaminoglycans from sea squirts inhibits α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22 (11): 1–8.
- Yang C., Chung D., Shin I.S., Lee H.Y., Kim J.C. and Lee Y.J. 2008.** Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 433–437.



Research Paper

Antioxidant properties of fucoidan extracted from brown alga *Sargassum* (*Sargassum tenerrimum*) and its ability to inhibit vannamei shrimp polyphenol oxidase enzyme

Saeid Gorgij¹, Salim Sharifian^{2*}, Mehran Loghmani³

Received: August 2021

Accepted: September 2021

Abstract

Fucoidan is one of the most important polysaccharides produced by brown seaweeds. In the present study, fucoidan was extracted from brown seaweed *Sargassum tenerrimum* and its properties include the extraction yield, carbohydrates, protein, sulfate, uronic acid content, antioxidant properties (DPPH free-radical scavenging and ferric reducing power) and its ability to inhibit polyphenol oxidase enzyme from vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were assayed at concentrations of 0.5, 1 and 2mg/mL. The amount of the extraction yield, carbohydrate, protein, sulfates and uronic acid of the extracted fucoidan were 7.23, 36.51, 5.64, 11.57 and 9.22%, respectively. The rate of DPPH scavenging in fucoidan varied from 35.94 to 63.94% depending on the concentration ($P < 0.05$). The rate of iron reduction varied from 0.23 in fucoidan at a concentration of 0.5mg/mL to 0.74 in treatment of 2mg/mL fucoidan. The highest inhibition of vannamei shrimp polyphenol oxidase enzyme was obtained in fucoidan with a concentration of 2mg/mL and equal to 64.72%. The results of this study showed that brown seaweed *Sargassum tenerrimum* is a rich source of fucoidan with significant antioxidant properties and polysaccharides extracted from this alga can be a natural and healthy inhibitor of polyphenol oxidase.

Key words: *Brown Seaweed, Antioxidant Properties, Polyphenoloxidase Inhibition, Shrimp Quality.*

1- M.Sc. in Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

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

3- Associate Professor in Marine Biology Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

*Corresponding Author: sharifian.salim@hotmail.com

