شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحات ۲۳۴-۲۲۳

استخراج، تخلیص، ویژگی‌های ضددیابتی و ضداکسایشی فوکوئیدان حاصل از جلبک قهوه‌ای *Sargassum ilicifolium*

کیمیا صحراگرد[۱]، مهدی طبرسا[۲*]، حسن احمدی گاولیقی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فرآوری آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲. دانشیار گروه فرآوری آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۳. دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس،تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

چکیده

در مطالعه حاضر ویژگی‌های ضددیابتی و ضداکسایشی فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای *S. ilicifolium* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا رنگدانه‌ها، ترکیبات فنولی و پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین با اتانول ۸۰ درصد حذف و استخراج فوکوئیدان در آب مقطر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از بازیابی فوکوئیدان با اتانول ۷۰ درصد، تخلیص با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل آنیونی با ژل DEAE Sepharose FF صورت گرفت. از بین فوکوئیدان خام و فراکسیون های تهیه شده (F_1 و F_2)، فراکسیون F1 در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین قابلیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۸۱/۲۸ درصد)، ABTS (۹۳/۶۸ درصد) و کاهندگی آهن (۰/۱۱۹ جذب) را در تمامی آزمون‌ها از خود نشان داد. همچنین، فراکسیون F1 با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قابلیت مهارکنندگی آنزیم α- آمیلازی (۸۶/۱۶۳ درصد) بیشتری را نسبت به دیگر فراکسیون‌ها نشان داد. به‌طور کلی، طبق نتایج حاضر، فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای *S. ilicifolium* می‌تواند به عنوان ترکیب ضداکسایشی و ضددیابتی در غذاهای عملگرا مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: فوکوئیدان، جلبک قهوه‌ای، *Sargassum ilicifolium*، ضددیابتی، ضداکسیدانی

* نویسنده مسئول: مهدی طبرسا
Email: m.tabarsa@modares.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 2, Summer 2021
pp. 223-234

Isolation, purification, anti-diabetic and antioxidant properties of fucoidan from brown seaweed *Sargassum ilicifolium*

Kimia Sahragard[1], Mehdi Tabarsa[2*], Hassan Ahmadi Gavlighi[3]

1. M.Sc. Student, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
2. Associate Professor, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 27-Feb-2021 **Accepted: 16-May-2021**

Abstract

In the present study, anti-diabetic and antioxidant properties of fucoidan in brown seaweed *S. ilicifolium* were examined. Initially, pigments, phenolic compounds and low-molecular weight proteins were removed using 80% ethanol and then fucoidan extracted by distilled water at 60 °C for 2h. After fucoidan recovery using 70% ethanol, the fractionation of crude fucoidan was performed by anion-exchange chromatography using DEAE Sepharose FF column. Among crude fucoidan and fractions (F_1 and F_2), F1 fraction exhibited the highest DPPH radical scavenging (81.28%), ABTS radical scavenging (93.68%) and reducing power activities (0.119 Abs) at 2mg/mL. Besides, F1 fraction exerted the greatest ability to inhibit α-amylase activity (86.16%) at 2mg/mL. Overall, the current findings revealed that fucoidan from *S. ilicifolium* could be utilized in functional foods as anti-diabetic and antioxidant compounds.

Keywords: Fucoidan, Brown Seaweed, *Sargassum ilicifolium*, Anti-diabetic, Antioxidant

Corresponding author: Mehdi Tabarsa Email: m.tabarsa@modares.ac.ir

۱. مقدمه

شاید اولین تغییری که در زندگی بشر در قرن بیستم میلادی به وضوح دیده شد، تغییر در الگوی غذایی جوامع انسانی باشد. به این صورت که مصرف زیاد غذاهای با کالری بالا که حاوی مقادیر فراوان شکر و چربی‌های اشباع هستند به تدریج افزایش و سبب بروز بیماری‌های مزمن بسیاری شد. از اینرو، تقاضا برای استفاده از ترکیبات غذا-دارو[1] که شامل ویتامین ها، پروبیوتیک ها، پپتید های زیست فعال و ضداکسایندهها بوده، افزایش یافت (Chen *et al*., 2006). مواد زیست فعال گیاهی نیز که همراه با واژه‌ی نوین غذا-دارو بکار می‌روند، علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای، نقش مهمی در رشد و نمو انسان، کاهش خطر بیماری‌ها و در نهایت سلامت و ایمنی جامعه ایفا می‌کنند. این ترکیبات در میوه‌ها، سبزی‌ها و گیاهان دریایی وجود داشته و در مبارزه با بیماری های قلبی، سرطان، چاقی، اختلال در دستگاه گوارش و دیابت موثرند (Ghanbari *et al*., 2016). دیابت بعد از بیماری های قلبی- عروقی و سرطان جایگاه سوم عامل مرگ و میر افراد در جهان را دارد (Park *et al*., 2011). بیماری دیابت نوعی نقص متابولیکی است که در اثر اختلال در عملکرد و ترشح انسولین و به دنبال آن افزایش قند خون ایجاد می‌شود. در دیابت نوع دو که عموماً با یک دوره قبل از دیابتی[2] شروع می شود، حذف کامل گلوکز مصرفی از خون به خوبی انجام نمی‌شود (Schwartz *et al*., 2006). در درمان دیابت داروهایی از قبیل Sulfonylureas و Biguanid تجویز می‌شود که متاسفانه مصرف طولانی مدت این داروها عوارض جانبی بسیاری برای بیماران به همراه دارد (Sugiwati *et al*., 2006). از جمله این عوارض جانبی می‌توان به آسیب و مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان اشاره کرد (Youn *et al*., 2004). همچنین طبق مطالعات صورت‌گرفته، بالا بودن قند خون به طور دائم در بیماران دیابتی باعث افزایش استرس‌اکسیداتیو و در نهایت اختلال در سیستم دفاعی ضداکسیدانی طبیعی بدن و افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن خواهد شد (Mellor *et al*., 2010). البته، رادیکال های آزاد تولید شده می‌توانند بوسیله ترکیبات ضداکسیدانی از بدن حذف شوند (Kohen *et al*., 1996). به همین علت استفاده از منابع جدید با خاصیت ضداکسایشی و ضددیابتی مانند ترکیبات طبیعی موجود در جلبک‌های دریایی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Gharekhan Taghar Tapeh *et al*., 2020). از آنجا که دریاها و اقیانوس‌ها حدود ۷۰ درصد از سطح زمین را پوشش می‌دهند و ۹۵ درصد تنوع زیستی جهان را شامل می‌شوند (Appeltans *et al*., 2012)، توجه محققان در چند دهه گذشته به سمت تولید محصولات طبیعی با منشا دریایی معطوف گشته است (Chen *et al*., 2006). از میان ترکیبات دریایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، عصاره‌ها و ترکیبات جدا شده از جلبک های دریایی بسیار قابل توجه بوده‌است (Gutiérrez-Rodríguez *et al*., 2018) همچنین وجود فیبر های غذایی، مواد معدنی، اسید های چرب چند غیراشباع، پروتئین‌ها و مقادیر پایین چربی‌های اشباع و نیز ویژگی های زیستی مانند خواص ضدباکتریایی، ضداکسیدانی، ضدویروسی و ضدقارچی جلبک‌های دریایی (Rodriguez-Bernaldo de Quiros *et al*., 2010) باعث شده که جایگاه مناسبی در صنایع غذایی، بهداشتی، آرایشی و به ویژه داروسازی دارا باشند (Zhang *et al*., 2007). در این میان، پلی‌ساکاریدهای دریایی شامل اولوان و گالاکتان های جلبک های سبز، کاراگینان و آگار جلبک های قرمز و فوکوئیدان و آلژینات جلبک های قهوه‌ای با تأثیر بر روی تکثیر، چرخه سلولی و تنظیم مسیرهای متابولیک مختلف نیز فعالیت‌های درمانی قابل توجهی را نشان داده‌اند (Senthilkumar *et al*., 2013; Hossein Pouri *et al*., 2019). فوکوئیدان‌ها پلی‌ساکاریدهای با پایه فوکوز هستند که واجد مقادیر

[1] Nutraceuticals
[2] pre-diabetes

قابل توجهی از استرهای سولفات، گالاکتوز، مانوز، زایلوز، رامنوز، گلوکورونیک اسید و گروه‌های استیل می‌باشند (Xue *et al*., 2012; Shao *et al*., 2014; Hu *et al*., 2014). فعالیت زیستی فوکوئیدان ها معمولاً به موقعیت و مقدار گروه‌های سولفات، وزن مولکولی، ترکیب مونوساکاریدی، محتوای گلوکورونیک اسید و فوکوز بستگی دارد (Zhao *et al*., 2008; Ale *et al*., 2011; Thuy *et al*., 2015). از آنجا که تاکنون مطالعه دقیقی بر روی خواص زیست فعال فراکسیون‌های فوکوئیدان جلبک قهوه‌ای *Sargassum ilicifolium* انجام نشده است، هدف از این پژوهش ارزیابی پتانسیل ضد اکسیدانی و ضددیابتی فوکوئیدان جلبک موردنظر به عنوان یک ترکیب زیست فعال طبیعی و بی‌خطر بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

جلبک *S. ilicifolium* از سواحل دریای عمان در منطقه چابهار جمع‌آوری شد. بلافاصله بعد از جمع‌آوری جلبک، نمونه‌ها ابتدا با آب دریا و سپس در آزمایشگاه مجددا با آب شیر شسته شدند. نمونه‌ها بعد از گرفتن آب اضافه در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز قرار گرفتند تا کاملا خشک شوند. سپس، نمونه‌ها توسط آسیاب پودر گردید و در کیسه‌های پلاستیکی جهت استخراج فوکوئیدان و تجزیه های شیمیایی مدنظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Cho *et al*., 2011).

۲.۲. استخراج فوکوئیدان

در ابتدا به‌منظور حذف رنگدانه‌ها، متابولیت‌های ثانویه و چربی‌ها از جلبک، ۵۰ گرم از نمونه آسیاب شد و در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت قرارگرفت. سپس فاز جامد با استفاده از سانتریفوژ (UNIVERSAL 320 R, Hettich, Germany) از فاز مایع جدا گردید (۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۲۴ درجه سانتی‌گراد). جهت استخراج پلی‌ساکاریدها، نمونه رنگبری شده در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت تحت استخراج قرار گرفت. سپس، فاز مایع پس از سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور/دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۲۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری و با استفاده از دستگاه روتاری (model Heidolph, Germany) تغلیظ شد. بمنظور بازیابی فوکوئیدان، با استفاده از اتانول ۹۵ درصد پلی‌ساکاریدهای استخراج شده رسوب داده شد (Borazjani *et al*., 2018). پلی‌ساکاریدهای به دست آمده با اتانول و استون آبگیری و در دمای اتاق خشک گردید.

۲.۳. فراکسیون گیری و جدا سازی فوکوئیدان

جهت جدا سازی فوکوئیدان خام و دستیابی به پلیمرهای هموژن‌تر، از سیستم کروماتوگرافی تبادل آنیونی با ژل DEAE Sepharose Fast flow استفاده شد و از سطوح مختلف نمک NaCl در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲/۰ مولار جهت شستشوی پلیمرها استفاده شد. در نهایت به کمک کیسه دیالیز ۳۵۰۰ دالتون، نمونه های به دست‌آمده از نمک و بقیه ناخالصی ها جدا شد (Cho *et al*., 2011).

۲.۴. قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

جهت انجام این آزمایش، از رادیکال های پایدار ۲ و ۲-دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر محلول اتانولی ۰/۱ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH با ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت های مختلف ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در میکروپلیت های ۹۶ تایی باهم مخلوط شدند. برای کنترل واکنش نیز به‌جای ۱۰۰ میکرولیتر نمونه، اتانول اضافه شد و از اسیدآسکوربیک نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در انتها تمامی نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در شرایط تاریکی نگهداری شد و جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (ELISA Reader Epock، آمریکا) در طول

موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Brand-Williams *et al.*, 1995). درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط فراکسیون‌ها نیز مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

RSA=(A کنترل - A نمونه) / A کنترل × ۱۰۰٪

در فرمول فوق RSA عبارت است از: درصد مهار رادیکال‌های آزاد

A کنترل: جذب کنترل واکنش پس از زمان ۳۰ دقیقه

A نمونه: جذب نمونه و محلول DPPH پس از زمان ۳۰ دقیقه

۲.۵. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS

به‌منظور بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال های آزاد ABTS پلی‌ساکاریدها، از روش Re و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. برای تهیه رادیکال پایدار ABTS، ابتدا یک محلول ۷ مولار ABTS در آب مقطر تهیه شد و جهت تشکیل کاتیون رادیکال سبز-آبی، محلول حاضر با پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار اکسید شد و محلول در مکان تاریکی به مدت ۱۶ ساعت، قرار گرفت. سپس محلول نهایی با اتانول تا حدی که جذب آن به ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد، رقیق شد. در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف نمونه ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده‌ی ABTS افزوده شد. در این آزمایش از مخلوط ABTS و اتانول به عنوان کنترل واکنش و از اسیدآسکوربیک نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

درصد مهارکنندگی رادیکال های آزاد ABTS پلی‌ساکاریدها، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

RSA=(A کنترل - A نمونه) / A کنترل × ۱۰۰٪

در فرمول RSA: درصد خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد

Aکنترل: جذب کنترل پس از ۲۰ دقیقه

Aنمونه: جذب نمونه پس از ۲۰ دقیقه

۲.۶. قدرت کاهندگی آهن

برای انجام این آزمایش از روش Chew و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. در ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه‌های پلی‌ساکاریدی با غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محلول بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار با pH ۶/۶ به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر افزوده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانات‌پتاسیم ۱درصد افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت، به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند و در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآهن (FeCl3) ۰/۱ درصد مخلوط گردید. سپس محلول حاضر در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد تا تغییر رنگ صورت گیرد. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در میکروپلیت ریخته شد و جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (ELISA Reader Epock، آمریکا) خوانده شد.

۲.۷. سنجش فعالیت بازدارندگی آنزیم α-آمیلازی

بررسی فعالیت بازدارندگی پلی‌ساکاریدها نسبت به آنزیم α-آمیلاز بر اساس روش کریمی و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد. ابتدا غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پلی‌ساکارید در بافر فسفات (۰/۰۲ مول برلیتر که حاوی ۰/۰۰۷ مول بر لیتر NaCl و ۶/۸ =pH) تهیه شد. در مرحله‌ی اول، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم (۰/۵ U/ml) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (حمام آب گرم) گرمخانه گذاری شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته ۰/۵ درصد به آن اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، جهت غیر فعال سازی آنزیم، نمونه‌ها به همراه کنترل منفی (بافر جایگزین نمونه) در دستگاه بلوک اختلاط (دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت

۱۰ دقیقه) قرارگرفتند. پس از خنک شدن، به‌منظور جداسازی نشاسته هضم نشده، نمونه‌ها سانتریفوژ شدند (۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) و روماند به‌عنوان نمونه برای مرحله دوم موردا ستفاده قرار گرفت. در مرحله دوم، نمونه ها رقیق و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگی (PAHBAH) مخلوط و در دستگاه بلوک اختلاط (دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه) حرارت‌دهی شد. پس از خنک شدن جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد.

درصد مهارکنندگی از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{جذب کنترل- (جذب پیش زمینه-جذب نمونه)}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

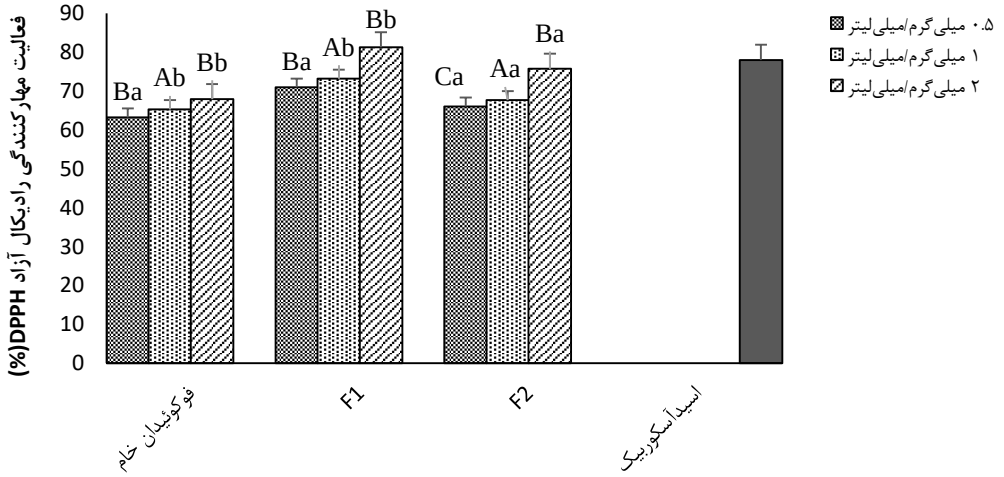
۲.۸. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش تمامی اندازه‌گیری‌ها با سه تکرار برای هر نمونه انجام شد و نتایج به‌دست آمده به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۴) انجام شد. پس‌از بررسی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA برای تشخیص وجود یا عدم وجود تفاوت معنادار بین نمونه ها و برای بررسی فعالیت ضداکسایشی و ضددیابتی داده‌ها از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۶) استفاده گردید.

۳. نتایج

۳.۱. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در فوکوئیدان خام و فراکسیون‌های *S. ilicifolium* در شکل ۱ نشان داده شده است. هریک از نمونه های پلی‌ساکاریدی فعالیت ضداکسیدانی متفاوتی را نشان دادند. همانطورکه مشاهده می‌شود، قدرت مهارکنندگی فوکوئیدان خام و دیگر فراکسیون‌ها در محدوده ۶۳/۲۷ – ۸۱/۲۸ درصد سنجش شد. بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در فراکسیون‌های مختلف نشان داد که افزایش غلظت ارتباط مستقیمی با درصد مهارکنندگی دارد ($P<0.05$) به‌طوری که فراکسیون F1 با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین اثر ضداکسایشی (۸۱/۲۸ درصد) بود که البته در مقابل اسید آسکوربیک فعالیت مهارکنندگی کمتری را نشان داد.



شکل ۱- نمودار فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH فوکوئیدان خام و فراکسیون‌های F1 و F2 جلبک *S. ilicifolium*

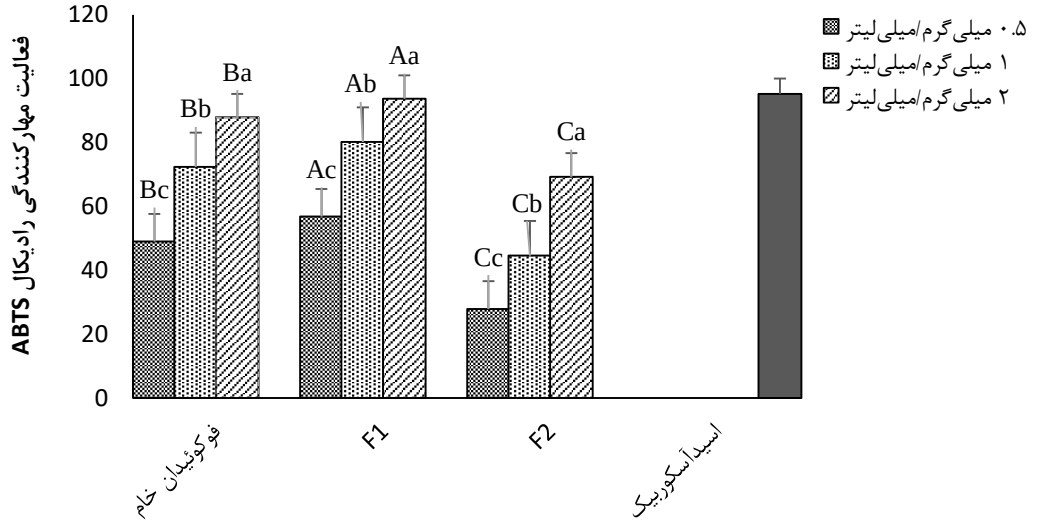
(A, B, C) نشان‌گر وجود اختلاف معنادار بین غلظت‌های فوکوئیدان خام و فراکسیون‌ها ست ($P<0.05$).

(a, b, c) نشانگر اختلاف معنادار بین فوکوئیدان خام و فراکسیون‌ها در هر غلظت است ($P<0.05$).

اسید آسکوربیک با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

۳.۲. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS

همانطورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در تمامی فراکسیون‌های به‌دست آمده فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS با افزایش غلظت، افزایش یافت ($P<0.05$). قدرت مهارکنندگی فوکوئیدان خام و دیگر فراکسیون ها در محدوده ۲۷/۹– ۹۳/۶۸ درصد سنجش شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، F1 با مهار ۹۳/۶۸ درصد رادیکال آزاد فعالیت ضداکسیدانی بیشتری را نسبت به دیگر فراکسیون‌ها نشان داد اما در مقابل اسید آسکوربیک فعالیت مهارکنندگی کمتری را به نمایش گذاشت.



شکل ۲- نمودار فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS فوکوئیدان خام و فراکسیون‌های F1 و F2 جلبک *S. ilicifolium*

(A, B, C) نشان‌گر وجود اختلاف معنادار بین غلظت‌های فوکوئیدان خام و فراکسیون‌ها ست ($P<0.05$).

(a, b, c) نشان‌گر اختلاف معنادار بین فوکوئیدان خام و فراکسیون‌ها در هر غلظت است ($P<0.05$).

اسید آسکوربیک با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

۳.۳. قابلیت کاهندگی آهن

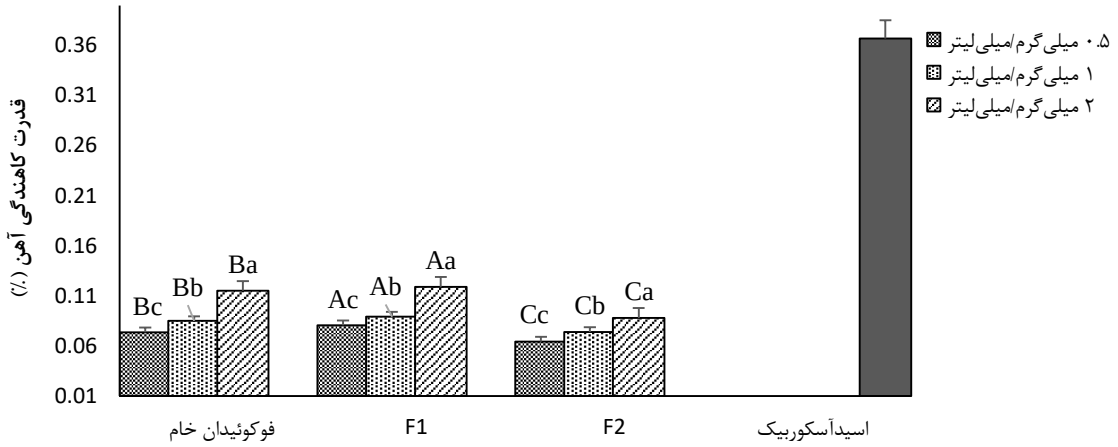
همانطورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تمامی فراکسیون‌ها با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد به‌طوری که ظرفیت کاهندگی آهن به‌طور معناداری افزایش یافت ($P<0.05$). قدرت کاهندگی فوکوئیدان خام و دیگر فراکسیون‌ها در محدوده ۰/۰۶۴ – ۰/۱۱۹ به‌دست آمد. در میان فراکسیون‌های سنجش شده، فراکسیون F1 قدرت کاهندگی بیشتری با میزان ۰/۱۱۹ درصد نسبت به دیگر فراکسیون‌ها نشان داد.

۳.۴. سنجش فعالیت بازدارندگی نسبت به آنزیم α– آمیلازی

همانطورکه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، فعالیت مهارکنندگی آنزیم با افزایش غلظت تمامی فراکسیون‌ها رابطه مستقیم داشته به‌طوری که قابلیت مهارکنندگی α-آمیلاز به طور معناداری افزایش یافت. در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد ممانعت کنندگی به ترتیب در نمونه F1 (۸۶/۱۶۳ درصد)، F2 (۷۹/۱۴۳درصد) و فوکوئیدان خام (۷۸/۸۶۳درصد) مشاهده شد.

۴. بحث

در پژوهش حاضر پلی‌ساکارید حاصل از جلبک قهوه‌ای *S. ilicifolium* و فراکسیون‌های آن اثر ضداکسایشی و ضددیابتی مختلفی را بر اساس تست‌های قدرت کاهندگی آهن، DPPH، ABTS و فعالیت بازدارندگی نسبت به

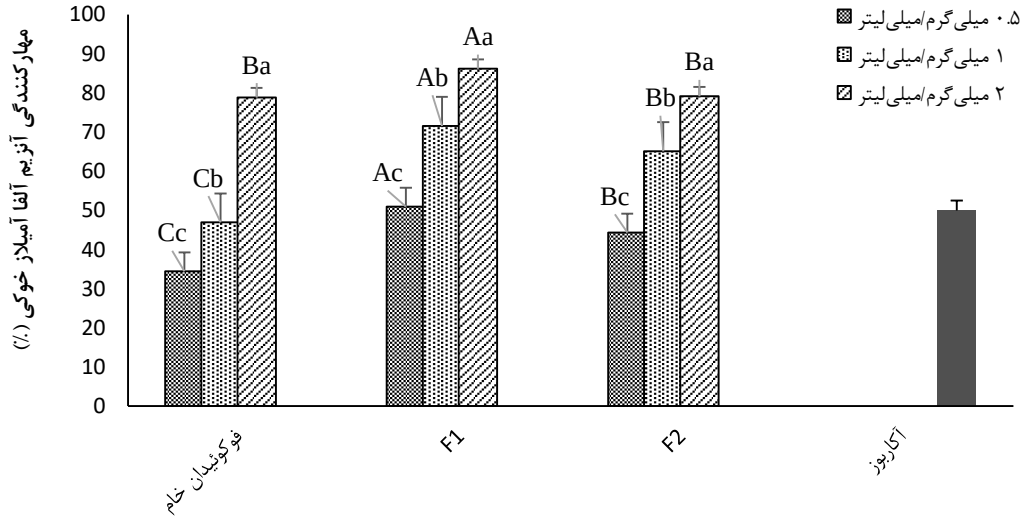


شکل ۳- نمودار قدرت کاهندگی آهن فوکوئیدان خام و فراکسیون‌های F1 و F2 جلبک *S. ilicifolium*

(A, B, C) نشان گر وجود اختلاف معنادار بین غلظت های فوکوئیدان خام و فراکسیون‌هاست ($P<0.05$).

(a, b, c) نشانگر اختلاف معنادار بین فوکوئیدان خام و فراکسیون ها در هر غلظت است ($P<0.05$).

اسید آسکوربیک با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.



شکل ۴- نمودار قدرت مهارکنندگی آنزیم α-آمیلازی فوکوئیدان خام و فراکسیون‌های F1 و F2 جلبک *S. ilicifolium*.

(A, B, C) نشان‌گر وجود اختلاف معنادار بین غلظت‌های فوکوئیدان خام و فراکسیون‌ها ست ($P<0.05$).

(a, b, c) نشان‌گر اختلاف معنادار بین فوکوئیدان خام و فراکسیون‌ها در هر غلظت است ($P<0.05$).

آکاربوز با غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

آنزیم α-آمیلاز نشان دادند. فعالیت ضداکسایشی شامل مکانیسم‌های مختلفی از جمله جلوگیری از شروع فرایند اکسیداسیون، اتصال به یون‌های فلزی، تجزیه آب اکسیژنه، جلوگیری از جدا شدن هیدروژن و قدرت کاهش و مهار رادیکال های آزاد می باشد (Yipdirim *et al*., 2000; Siriwardhana *et al*., 2003). DPPH یک ترکیب رادیکال

آزاد است که به طور گسترده برای تعیین ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hatano *et al*., 1988; Amarowicz *et al*., 2004). رادیکال DPPH به عنوان یک رادیکال آزاد پایدار اغلب تخمین مناسبی از فعالیت جذب رادیکال عصاره می‌دهد و در ۵۱۷ نانومتر بالاترین جذب را دارد و به رنگ ارغوانی است. این رادیکال در حضور یک ضداکسیدان یا به عبارتی دهنده هیدروژن، کاهش یافته و رنگ زرد ایجاد شده باعث کاهش جذب عصاره‌ها می‌گردد (Mosmann, 1983). در پژوهش حاضر نیز تمام فراکسیون‌های به‌دست آمده از فوکوئیدان جلبک *S. ilicifolium* نشان دادند که به خوبی توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را دارند و در این میان فراکسیون F1 (۸۱/۲۸ درصد) بیشترین فعالیت را نشان داد. در گذشته نیز توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در گونه های مختلف جلبک قهوه‌ای بررسی شده‌است. در مطالعه‌ای که توسط Sharifian و همکاران (۲۰۱۹) روی دو جلبک قهوه‌ای انجام شد، میزان بازدارندگی در جلبک *Padina australis* (حداکثر ۱۴/۲۷٪) به میزان قابل توجهی کمتر از جلبک *Nizimuddinia zanardini* (حداکثر ۷۲/۶۴٪) بود. Palanisamy و همکاران (2017) نیز میزان بازدارندگی DPPHرا در فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum polycytum* را (61.2 ± 0.33%) گزارش نمودند. روش دیگری که برای ارزیابی فعالیت ضداکسایشی استفاده می‌شود، ارزیابی مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS است. به این صورت که مولکول بی‌رنگ ABTS توسط اکسیدان‌های مختلف نظیر پتاسیم پرسولفات به رادیکال $ABTS^{+}$ تبدیل شده و رنگ سبز-آبی به خود می‌گیرد (Erel, 2004). در مطالعه حاضر قابلیت فراکسیون F1 در مهار رادیکال آزاد ABTS نسبت به سایر فراکسیون‌ها بیشترین فعالیت مهارکنندگی (۹۳/۶۸ درصد) را دارا بود. طبق مطالعات Rostami و همکاران (2018) که بر روی جلبک قهوه‌ای *Colpomenia peregrine* انجام شد، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS در حلال آبی ۹۹/۷۱ و حلال اتیل استات ۹۶/۳۰ درصد سنجش شد. قابلیت کاهندگی آهن نیز شاخص مناسبی برای اندازه‌گیری فعالیت ضداکسیدانی است. در این آزمایش حضور کاهنده‌ها در حلال باعث کاهش کمپلکس Fe^{3+} فری‌سیانید به شکل Fe^{2+} فروس می‌گردد و میزان Fe^{2+} در جذب ۷۰۰ نانومتر خوانده می‌شود. طی این فرایند رنگ زرد محلول به رنگ‌های مختلف سبز و آبی تغییر می‌کند که این به قدرت کاهندگی هر یک از ترکیبات بستگی دارد (Luo *et al*., 2010). در مطالعه حاضر بیشترین قابلیت کاهندگی در فراکسیون F1 (۰/۱۱۹ درصد) مشاهده شد. در بیماران دیابتی نوع ۲ مهم‌ترین مرحله‌ی درمانی، کنترل سطح گلوکز در پلاسما است که بدین منظور ممانعت از عملکرد آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها یکی از راه های درمانی محسوب می شود و مانع افزایش گلوکز ناشی از هضم و جذب غذا است (Kurihara *et al*., 1999). α-آمیلاز از جمله آنزیم‌های مهم در تجزیه‌ی کربوهیدرات‌ها است که با هیدرولیز نشاسته از جایگاه α-(4-1) و تبدیل آن به مالتوز و گلوکز، در نهایت موجب افزایش سطح گلوکز خون می‌شود (Brayer *et al*., 2000). در این مطالعه اثر مهارکنندگی آنزیم α-آمیلاز در جلبک قهوه‌ای *S. ilicifolium* در غلظت‌های مختلف ۰،۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بررسی گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت پلی‌ساکاریدها میزان مهار آنزیمی نیز افزایش می‌یابد که این روند با نتایج Nwosu و همکاران (2011) مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، فراکسیون F1 در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر مهارکنندگی α- آمیلازی (۸۶/۱۶۳ درصد) را از خود نشان داد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعات Senthil و همکاران (2013) روی جلبک های قرمز *Gracilaria corticate*و *Gracilaria edulis*، جلبک سبز *Ulva lactuca* و جلبک قهوه‌ای *S. polycystum* قابل مقایسه است و IC50 مهار آنزیم α- آمیلاز را بین میکروگرم بر میلی لیتر ۶۰ -۸۳ گزارش کرده‌اند.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج به دست‌آمده در این تحقیق نشان داد که فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. ilicifolium* دارای فعالیت ضداکسایشی وضددیابتی قابل توجهی است. فوکوئیدان خام استخراج شده از نظر توزیع بارالکتریکی ناهمگن بوده و واجد دو فراکسیون مختلف است. در این میان، فراکسیون F1 دارای بالاترین قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و کاهش یون‌های سه ظرفیتی آهن را دارد. همچنین در مقایسه با فوکوئیدان خام و فراکسیون F2، فراکسیون F1 توانست به میزان قابل توجهی سبب کاهش فعالیت آنزیم α–آمیلاز شود. در مجموع، یافته‌های مطالعه کنونی نشان داد که فوکوئیدان استخراج شده از این گونه جلبک قهوه‌ای واجد ویژگی‌های ضداکسایشی و ضددیابتی قابل قبولی است و می‌تواند پس از انجام مطالعات تکمیلی در سیستم‌های غذایی با ویژگی‌های عملکردی اش مورد استفاده قرار گیرد.

۶. منابع

References

Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S., 2011. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *International journal of biological macromolecules*, 331-336.

Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A., 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of sepected Plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 551-562.

Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., ... & Costello, M. J., 2012. The magnitude of gpobap marine species diversity. *Current biopogy*, 2189-2202.

Babakhani Lashkan, A., Rezaei, M., Rezaei, K., Seifabadi, S. J., 2012. Optimization of Extraction of Antioxidant Compounds in Microwave-Assisted Extracts of Brown Algae *Sargassum angustifolium*. *Journal of Fisheries*, 243-255.

Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S., Rezaei, M., 2018. Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water-soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*. *International journal of biological macromolecules*, 793-802.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. P. W. T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *PWT-Food science and Technology*, 25-30.

Brayer, G.D., Sidhu, G., Maurus, R., Rydberg, E.H., Braun, C., Wang, Y., Withers, S.G., 2000. Subsite mapping of the human pancreatic alphaamylase active site through structural, kinetic and mutagenesis techniques. *Biochemistry*, 4778-4791.

Chen, L., Remondetto, G. E., Subirade, M., 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 272-283.

Chew, Y. P., Pim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K. S., 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *PWT-Food Science and Technology*, 1067-1072.

Cho, M., Pee, H. S., Kang, I. J., Won, M. H., You, S., 2011. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha propifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*, 999-1006.

De Quiros, A. R. B., Page-Yusty, M. A., Pópez-Hernández, J., 2010. Determination of phenopic compounds in macroapgae for human consumption. *Food Chemistry*, 634-638.

Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Cpinical biochemistry*, 277-285.

Fujita, H., Yamagami, T., Ohshima, K., 2001. Fermented soybean–derived water-sopubpe Touchi extract inhibits α-gpucosidase and is antigpycemic in rats and humans after singpe orap treatments. *The Journap of nutrition*, 1211-1213.

Ganapathi, K., Subramanian, V., Mathan, S., 2013. Bioactive potentials of brown seaweeds, *Sargassum myriocystum* J. Agardh *S. plagiophyllum* C. Agardh and *S. ilicifolium* (Turner) J. Agardh. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 105-111.

Ghanbari, M., Saeedi, M., Mortazavian, A. M., 2016. Nutraceuticals and Functional Foods production. *Clinical Excellence*, 1-15.

Gharekhan Taghar Tapeh, R., Kordjazi, M., Ahmad Nasrollahi, S., Shabanpour, B., Adeli, A., 2020. Investigation of antioxidant properties and antibacterial activity of alginate and fucoidan extracted from *Sargassum boveanum* algae collected from the Persian Gulf coast. *Aquaculture Sciences*, 64-76.

Gutiérrez-Rodríguez, A. G., Juárez-Portilla, C., Olivares-Bañuelos, T., Zepeda, R. C., 2018. Anticancer activity of seaweeds. *Drug discovery today*, 434-447.

Hatano, T., KAGAWA, H., YASUHARA, T., OKUDA, T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 2090-2097.

Hosseinpouri, A., Mohammadi, M., Obeidi, N., 2019. Fucoidan, Multifunctional Polysaccharide. *J Fasa Univ Med Sci*, 1368-1383.

Hu, P., Xue, R., Li, Z., Chen, M., Sun, Z., Jiang, J., Huang, C., 2014. Structural investigation and immunological activity of a heteropolysaccharide from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrate research*, 28-32.

Karimi, A., Azizi, M. H., Ahmadi Gavlighi, H., 2020. Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: In vitro antidiabetic and antioxidant activity. *Food science & nutrition*, 2395-2405.

Kohen, R., Chevion, S., Schwartz, R., Berry, E. M., 1996. Evaluation of the total low molecular weight antioxidant activity of plasma in health and diseases: a new approach. *Cellular Pharmacology*, 355-360.

Kurihara, H., Mitani, T., Kawabata, J., Takahashi, K., 1999. Two new bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *Journal of natural products*, 882-884.

luo, H. Y., Wang, B., Yu, C. G., Su, C. P., 2010. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2557-2565.

Mellor, K. M., Ritchie, R. H., Delbridge, L. M., 2010. Reactive oxygen species and insulin-resistant cardiomyopathy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 222-228.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunopogicalmethods*, 55-63.

Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H. A., McDougall, G. J., 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food chemistry*, 1006-1012.

Palanisamy, S., Vinosha, M., Marudhupandi, T., Rajasekar, P., 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*, 405-412.

Park, M. K., Jung, U., Roh, C., 2011. Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. *Marine drugs*, 1359-1367.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity apppling an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1231-1237.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A. M., López-Hernández, J., 2010 Antioxidant compounds in edible brown. *seaweedsEuropean Food Research and Technology*, 495–498.

Rostami, Z., Tabarsa, M., Rezaei, M., 2018. Antioxidant properties of by-products of polysaccharide extraction from brown seaweed. *Colpomenia peregrina*. *Food Processing and Preservation*, 151-158.

Schwartz, S., 2006. Is there a rationale for insulin therapy in pre-diabetic individuals?. *Treatments in endocrinology*, 385-393.

Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., Kim, S. K., 2013. Brown seaweed fucoidan: biopogical activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International journal of biological macromolecules*, 366-374.

Shao, P., Chen, X., Sun, P., 2014. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. *Carbohydrate Polymers*, 260-269.

Sharifian, S., Shahbanpour, B., Taheri, A., Kordjazi, M., 2019. Effect of different solvents on the extraction of phenolic compounds and antioxidant properties Brown algae *Nizimuddinia zanardinii* and *Padina australis Hauck* (Schiffner) P.C. Silva. *Journal of Aquatic Ecology*, 76-86.

Siriwardhana, N., Pee, K. W., Jeon, Y. J., Kim, S. H., Haw, J. W., 2003. Antioxidant activity of Hizikia fusiformis on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Science and Technology International*, 339-346.

Sugiwati, S., Kardono, P., Bintang, M., 2006. a-Gpucosidase inhibitory activity and hypogpycemic effect of Phaperia macrocarpa fruit pericarp extracts by *orap administration* to rats. *Journal of Applied Sciences*, 2312-2316.

Suhitha, S., Gunasekaran, K., Velmurugan, D., 2012. Structure based design of compounds from natural sources for diabetes and inflammation. *Bioinformation*, 1125–1131.

Thuy, T. T. T., Ly, B. M., Van, T. T. T., Van Quang, N., Tu, H. C., Zheng, Y., Ai, U., 2015. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. *Carbohydrate polymers*, 122-128.

Udani, J., Hardy, M., Madsen, D. C., 2004. Blocking carbohydrate Absorbtion and weight loss: A clinical Trial using phase2 Brand proprietary fractionated white Bean Extract. *Alternative Medicine Review*, 63-9

Vijayabaskar, P., Shiyamapa, V., 2012. Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pacific Journap of Tropical Biomedicine*, 90-98.

Xue, M., Ge, Y., Zhang, J., Wang, Q., Hou, L., Liu, Y., Li, Q., 2012. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS one*.

Yipdirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Apgur, Ö. F., Bipapoğpu, V., 2000. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (*Tilia Argentea Desf Ex DC*), Sage (*Salvia Triloba L.*), and Black Tea (*Camellia Sinensis*) Extracts. *Journap of Agricupturap and food chemistry*, 5030-5034.

Youn, J. Y., Park, H. Y., Cho, K. H., 2004. Anti-hyperglycemic activity of Commelina communis L.: inhibition of α-glucosidase. *Diabetes research and clinical practice*, 149-155.

Zhang, J., Tiller, C., Shen, J., Wang, C., Girouard, G. S., Dennis, D., Ewart, H. S., 2007. Antidiabetic properties of polysaccharide-and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1116-1123.

Zhao, X., Xue, C. H., Li, B. F., 2008. Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 431-436.