



## فعالیت ضد اکسایشی فراکسیون‌های به‌دست آمده از فراپالایش غشایی فو کوئیدان هیدرولیز شده جلیک قهوه‌ای *Nizamuddinina zanardinii*

نفیسه سادات موسوی<sup>۱</sup>، مهدی طبرسا<sup>۲\*</sup>، حسن احمدی گاولیقی<sup>۳،۴</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

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

۳. دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۴. مرکز تحقیقات مواد طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۶

### چکیده

پلی‌ساکاریدها از جمله درشت مولکول‌های زیستی هستند که علاوه بر ویژگی‌های فیزیکو-شیمیایی منحصر به فرد، توانایی بروز خواص زیست‌فعالیت امیدوارکننده‌ای با توجه به ساختار شیمیایی خود دارند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تأثیر وزن مولکولی تولیدی با استفاده از سیستم فراپالایش غشایی بر ویژگی‌های ضد اکسایشی فوکوئیدان هیدرولیز شده جلیک قهوه‌ای *Nizamuddinina zanardinii* بود. پس از حذف رنگدانه‌ها و ترکیبات با وزن مولکولی پایین، فوکوئیدان خام استخراج شده در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه (FH20) توسط ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلریک تحت هیدرولیز قرار گرفت. سپس FH20 با استفاده از سیستم فراپالایش غشایی با غشای ۲، ۱۰، ۳۰، ۱۰۰ کیلودالتون فراکسیون‌گیری شد. میانگین وزن مولکولی فراکسیون‌ها به ترتیب ۵۵۳/۷، ۳۹/۲، ۱۲/۴ و ۴/۶ × ۱۰<sup>۲</sup> گرم/مول در  $KDa < 100$ ، ۱۰۰-۳۰ KDa، ۳۰-۱۰ KDa و ۱۰-۲ KDa بود. پس از تفکیک براساس وزن مولکولی، فراکسیون‌های به‌دست آمده نسبت به FH20، به میزان قابل توجهی قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH (۳۷/۶۹-۸۵/۰۵ درصد)، رادیکال آزاد کاتیونی ABTS (۵۵/۴۳-۸۹/۶۵ درصد) و احیاء یون  $Fe^{3+}$  (جذب ۰/۰۷-۰/۷۲) بود. در این میان، فراکسیون KDa ۱۰-۲ بیشترین پتانسیل را در مهار رادیکال آزاد DPPH (۷۴/۱۲-۸۵/۰۵ درصد)، رادیکال آزاد کاتیونی ABTS (۷۵/۱۶-۸۹/۶۵ درصد) و احیاء یون آهن  $Fe^{3+}$  (جذب ۰/۲۱-۰/۷۲) دارا بود. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد تغییر وزن مولکولی فوکوئیدان می‌تواند سبب افزایش قابل توجه فعالیت ضد اکسایشی شود.

واژگان کلیدی: فراپالایش، وزن مولکولی، ضد اکسایشی، ترکیبات غذا-دارو، *Nizamuddinina zanardinii*، هیدرولیز



## **Antioxidant activity of purified fractions obtained from membrane ultrafiltration of hydrolysed fucoidan from brown seaweed *Nizamuddinina zanardinii***

**Nafiseh Sadat Mousavi<sup>1</sup>, Mehdi Tabarsa<sup>2,4\*</sup>, Hassan Ahmadi Gavlighi<sup>3,4</sup>**

1. M.Sc. Student, Department of Seafood Processing, Tarbiat Modares University, Nur, Iran

2. Associate Professor, Department of Seafood Processing, Tarbiat Modares University, Nur, Iran

3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4. Institute for Natural Products and Medicinal Plants, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Received: 17-Jul-2022**

**Accepted: 28-Sept-2022**

### **Abstract**

Polysaccharides are one of the biomacromolecules that, in addition to their peculiar physicochemical properties, possess promising biological capabilities depend on chemical structure. The purpose of the present study was to evaluate the effect of membrane ultrafiltration on antioxidant properties of hydrolysed fucoidan from brown seaweed *Nizamuddinina zanardinii*. After removing pigments and low molecular weight compounds, the extracted crude fucoidan, was hydrolysed by 0.01N hydrochloric acid at 100°C for 20 minutes (FH20). Then, FH20 was fractionated using ultrafiltration with 2, 10, 30, 100 kDa membranes. The average molecular weight of fractions was 553.7, 39.2, 12.4 and  $4.6 \times 10^3$  g/mol in KDa $>100$ , 100-30 KDa, 30-10 KDa and 2-10 KDa, respectively. After separation based on molecular weight, the obtained fractions, compared to FH20, which were significantly capable of inhibiting DPPH free radicals (85.05-37.69%), ABTS radicals (89.65-55.43%) and reduction Fe<sup>3+</sup> ions (absorption of 0.72-0.07). In the meantime, 2-10 KDa fraction had the greatest potential in inhibiting DPPH free radicals (85.05-74.12%), ABTS free radicals (89.65-75.16%) and reducing Fe<sup>3+</sup> ions (absorption of 0.21-0.72). Overall, the results of this study showed that reducing the molecular weight of fucoidan to a specific range could lead to significant increase of antioxidant activity.

**Keywords:** Ultrafiltration, Molecular weight, Antioxidant, Nutraceuticals, *Nizamuddinina zanardinii*, Hydrolysis

## ۱. مقدمه

امروزه بشر دریافته است که برای رشد و توسعه پایدار نیازمند توجه بیشتری به منابع طبیعی تجدیدپذیر در تولید فرآورده‌های غذایی است. علاوه بر این با توجه به افزایش جمعیت و نگرانی‌های ناشی از تهیه غذای مناسب اهمیت منابع غذایی پایدار بیش از پیش نمایان شده است (Bishop et al., 2012). در تعریف جدید تغذیه، علاوه بر پوشش تمام نیازهای جسمی به منظور جلوگیری از کمبودهای تغذیه‌ای و انرژی، پیشگیری از بیماری‌های مزمن نیز در نظر گرفته می‌شود (Norheim et al., 2012). همچنین پژوهش‌های قابل توجهی نقش مهم رژیم غذایی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن و چاقی را نشان می‌دهد (Story et al., 2008). روند روبه‌رشد مبتلایان به بیماری‌های مزمن و همچنین ارتباط مستقیم و شناخته‌شده بین رژیم غذایی و سلامت مصرف‌کنندگان، سازمان‌های جهانی مسئول و پژوهشگران را بر آن داشته تا نسبت به جست‌وجو، استخراج و شناسایی ترکیبات جدید کارکردی با منشأ طبیعی اقدام کنند (Plaza et al., 2008). غذاهای عملگر<sup>۱</sup> به عنوان فرآورده‌هایی مشابه غذاهای متعارف اما با مزایای فیزیولوژیکی بیشتر تعریف می‌شوند (Shahidi, 2009).

تنوع گسترده موجودات دریایی، منبعی غنی از ترکیبات عملگر را در اختیار بشر گذاشته است که از این منابع می‌توان اسیدهای چرب غیراشباع، پلی‌ساکاریدها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، ضداکسیدان‌ها و غیره را نام برد (Pomponi, 1999; Kim and Wijesekara, 2010). در میان موجودات دریایی، جلبک‌ها منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال با فعالیت زیستی مختلف محسوب می‌گردند (Barrow and Shahidi, 2007; Wijesekara et al., 2011). گونه‌های مختلفی از آن‌ها تاکنون شناسایی و در گروه‌های متفاوت جلبک‌های سبز، قهوه‌ای و قرمز طبقه‌بندی شده‌اند (Chandini et al., 2008; Mohamed et al., 2012).

پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها از اجزای ساختاری دیواره

سلولی جلبک‌ها محسوب می‌شوند و از ترکیبات زیست‌فعال هستند که به تازگی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (Wijesekara et al., 2011). از مهم‌ترین پلی‌ساکاریدها در گونه‌های مختلف جلبکی می‌توان به زایلان و اولوان در جلبک‌های سبز، آلژینات، فوکوئیدان و لامینارین در جلبک‌های قهوه‌ای و کاراژینان و آگار در جلبک‌های قرمز اشاره نمود (Murata et al., 2001; Kumar et al., 2008). فوکوئیدان به‌عنوان شناخته‌شده‌ترین پلی‌ساکارید در جلبک‌های قهوه‌ای، یک نام کلی برای پلی‌ساکاریدهای حاوی فوکوز است و حاوی مقادیر قابل توجهی از گروه‌های استرسولفات است. این پلی‌ساکارید به دلیل خواص زیستی مختلف مانند جلوگیری از انعقاد خون، کنترل فرآیند التهاب، سرکوب رشد تومور، کاهش تکثیر و پراکندگی سلول‌های سرطانی، تنظیم سیستم ایمنی و ضد ویروسی شناخته می‌شوند. همچنین پژوهش‌های متعدد نشان داده است که ترکیب شیمیایی فوکوئیدان در جلبک‌های قهوه‌ای مختلف متفاوت است (Costa et al., 2010; Rodriguez-Jasso et al., 2012; Wijesinghe et al., 2011). این تفاوت در سطح مونومرهای تشکیل‌دهنده، پیوندهای گلیکوزیدی، محتوای سولفات و وزن مولکولی می‌تواند بروز نماید که تأثیر قابل توجهی بر فعالیت زیستی آن‌ها دارد. از این رو تحقیقات متعددی روی اصلاح ساختار جهت بهبود فعالیت زیستی پلی‌ساکاریدها صورت گرفته است تا درک بهتری از رابطه بین ساختار و فعالیت زیستی حاصل شود (Zhou et al., 2004; Wu et al., 2016).

وزن مولکولی فوکوئیدان به‌عنوان یکی از چندین عاملی است که خواص عملکردی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یک فوکوئیدان طبیعی وزن مولکولی بالایی دارد که منجر به نفوذپذیری کم غشاء سلولی، کاهش زیست‌فراهمی، کارایی و از دست دادن پتانسیل بالینی می‌شود. بنابراین طبق مطالعات صورت‌گرفته، یک فوکوئیدان با وزن مولکولی پایین در مقایسه با فوکوئیدان با وزن مولکولی بالا، قابلیت حلالیت بیشتری دارد و به نفوذ آن در سلول‌ها

<sup>1</sup>Functional foods

ارتقاء خواص ضد اکسایشی آن پرداخته شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. تهیه و آماده‌سازی نمونه

جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* از سواحل دریای عمان در فصل پاییز به صورت دستی در زمان جزر کامل جمع‌آوری و با آب دریا شسته شد تا باقیمانده اپی‌فیت‌ها، شن، ماسه و نمک از جلبک‌ها جدا شود. سپس نمونه‌ها با آب شیرین شستشو شدند. نمونه‌ها جهت خشک کردن به مدت ۴ روز در آن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز قرار گرفتند. نمونه‌های خشک شده جلبک با آسیاب برقی پودر، از الک عبور داده و توسط ترازوی دیجیتال توزین شدند. نمونه پودر شده در نهایت درون کیسه‌های پلاستیکی زیپ کیپ جهت استخراج فوکوئیدان و تجزیه‌های شیمیایی مدنظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mousavi et al., 2022).

### ۲.۲. استخراج فوکوئیدان

جهت استخراج فوکوئیدان ابتدا ۵۰ گرم پودر خشک جلبک به نسبت ۱ به ۴ با اتانول (۸۰٪) به مدت ۲ ساعت ثانویه و چربی قرار گرفت. جداسازی فاز جامد از مایع به وسیله سانتریفیوژ (UNIVERSAL 320 R, Hettich, Germany) (۸۰۰۰ rpm، ۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه) انجام و این مرحله تا زمان بی‌رنگ شدن با اتانول تازه تکرار شد. در نهایت فاز جامد چندین نوبت با اتانول استون شستشو و در دمای اتاق خشک شد. سپس به منظور استخراج فوکوئیدان خام، ۲۰ گرم از نمونه جلبک رنگ‌بری شده در آب مقطر و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. در نهایت، جداسازی فاز مایع به وسیله سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm، ۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه) انجام شد. به میزان ۱ درصد کلرید کلسیم (وزن/حجم) به مایع‌رویی اضافه شد و پس از

کمک کرده و سبب سهولت در جذب فوکوئیدان خواهد شد. در نتیجه به طور قابل توجهی فعالیت زیستی بهتری را از خود نشان خواهد داد (Hwang et al., 2016). با خالص‌سازی این پلی‌ساکاریدها می‌توان اثرات مفید و یا مضر آن‌ها را روی فعالیت‌های زیستی مورد بررسی قرارداد. معمولاً با استفاده از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی و بهینه‌سازی آن، مولکول‌های خالص‌تری به دست می‌آید (Babaie, 2020). در حال حاضر، به دلیل هزینه‌های بالای استفاده از سیستم‌های کروماتوگرافی به منظور تخلیص فوکوئیدان، در نتیجه مکمل‌های خوراکی موجود در بازار که حاوی فوکوئیدان خام هستند با اثر بخشی کمتر عرضه می‌شوند. در این راستا بکارگیری سیستم فرآیلایش غشایی<sup>۱</sup> روی هیدرولیز به دست آمده از پلی‌ساکاریدها، می‌تواند به عنوان روشی نوین و کارآمد جهت جداسازی فوکوئیدان و ارتقاء خواص زیست‌فعالی این پلی‌ساکارید مورد توجه قرار گیرد.

مطالعات پیشین گروه حاضر نشان داد که جلبک قهوه‌ای *Nizamuddinina zanardinii* حاوی فوکوئیدانی است که به میزان قابل توجهی دارای فوکوز و گروه‌های عاملی سولفات است (Tabarsa et al., 2020). این پلیمر در حالت طبیعی خود فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن قابل قبولی را دارا است. نتایج نشان داده است که هیدرولیز اسیدی با استفاده از اسید هیدروکلریک ۰/۱۰۱ نرمال می‌تواند هیدرولیزهایی با وزن‌های مولکولی پایین‌تر تولید نماید که این ترکیبات جدید تأثیرات مثبت و افزایشی را روی مهار واکنش‌های ضد اکسایشی نشان می‌دهند. در میان هیدرولیزهای تولیدی، فوکوئیدان هیدرولیز شده در ۲۰ دقیقه (FH20) بیشترین پتانسیل را در مهار رادیکال آزاد DPPH، ABTS و احیاء یون آهن  $Fe^{3+}$  دارد (Mousavi et al., 2022). در نتیجه با توجه به مطالب بیان شده در بالا، در مطالعه حاضر به بررسی تخلیص فوکوئیدان هیدرولیز شده جلبک قهوه‌ای *N. Zanardinii* با استفاده از سیستم فرآیلایش غشایی، به عنوان روشی نوین و کارآمد جهت

<sup>1</sup>Membrane ultrafiltration

کارایی بالا (UHPLC, Dionex UltiMate 3000) و ستون (TSK G5000 PW, Toso Biosep, 7.5×600mm; Montgomeryville, PA, US) برای تجزیه و تحلیل ویژگی‌های مولکولی استفاده شد. همچنین از فاز متحرکی، با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و یک محلول آبی متشکل از ۰/۱۵ مولار  $\text{NaNO}_3$  و ۰/۰۲ درصد  $\text{NaN}_3$  استفاده شد.

## ۵.۲. قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد

### دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) صورت گرفت. بدین ترتیب که فوکوئیدان هیدرولیز شده و فراکسیون‌ها در غلظت‌های مختلف به ۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۰/۰۶ میلی‌مولار رادیکال‌های آزاد DPPH افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد تا تغییر رنگ در آن صورت گیرد. در انتها، جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر (ELISA Reader Epock, آمریکا) خوانده شد. در صد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مطابق رابطه زیر محاسبه گردید (Borazjani et al., 2018):

$$\text{فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH} = \frac{(AS - A)}{A} \times 100$$

که A: جذب کنترل (۱۰۰ میکرولیتر اتانول با ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH) و AS: جذب نمونه اند.

## ۶.۲. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد کاتیونی

### (ABTS)

به منظور بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های 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

۲ ساعت قرارگیری در دمای اتاق مجدد سانتریفیوژ شد و پس از جمع‌آوری و تغلیظ با روتاری (model Heidolph, Germany) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با افزودن اتانول ۹۶ درصد تا رسیدن به غلظت نهایی ۷۰ درصد اتانول، فوکوئیدان استخراج‌شده بازیابی گردید (Mousavi et al., 2022). بازده فراکسیون‌های فوکوئیدان به نسبت میزان پلی‌ساکارید هیدرولیز شده و فراکسیون به‌دست آمده پس از دیالیز با استفاده از کیسه دیالیز kDa ۱۰۰-۵۰۰ به مدت ۷۲ ساعت در ظرف حاوی آب مقطر، مطابق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{بازده (\%)} = \frac{\text{گرم فراکسیون پس از دیالیز}}{\text{گرم فوکوئیدان هیدرولیز شده}} \times 100$$

## ۳.۲. تولید هیدرولیز و جداسازی با استفاده از

### سیستم فراپالایش غشایی

در ابتدا ۳ گرم از فوکوئیدان در ۶۰۰ میلی‌لیتر از ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلریک به منظور تولید پلی‌ساکاریدهای با وزن‌های مولکولی متفاوت، حل شد و سپس هیدرولیز در آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. واکنش‌دهنده بلافاصله خنک و با سود ۰/۰۵ نرمال خنثی شد (Khajavi et al., 2021). سپس، فوکوئیدان هیدرولیز شده در مدت زمان ۲۰ دقیقه با استفاده از یک سیستم فراپالایش غشایی (Masterflex, Germany) جداسازی شد. در این روش، فشار برابر با ۲ بار و جداسازی براساس اندازه وزن مولکولی با غشاء ۲، ۱۰، ۳۰، ۱۰۰، کیلودالتونی انجام شد.

## ۴.۲. ارزیابی پراکنش مولکولی

فوکوئیدان در آب مقطر (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حل شد و قبل از اندازه‌گیری پراکنش مولکولی به میزان ۱۵ دقیقه در دمای جوش حرارت داده شد. نمونه‌ها بلافاصله از طریق یک غشای سلولزی فیلتر شد و سیستم آشکارکننده ضریب شکست (RefractoMax 521, Thermo Scientific) متصل به سیستم کروماتوگرافی با

غلظت‌های متفاوت فوکوئیدان بر فعالیت زیستی بررسی شد، و در صورت معنی‌دار بودن، جهت مقایسه میانگین‌ها و انتخاب بهترین غلظت، از آزمون دانکن استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Sigmaplot نسخه ۱۴ استفاده شد.

### ۳. نتایج

#### ۳.۱. وزن مولکولی فراکسیون‌های به‌دست آمده از FH20

میزان بازده فراکسیون‌های تولیدشده از FH20 با استفاده از سیستم فراپالایش غشایی، به ترتیب ۴۰/۳۷ درصد در  $100 < KDa$ ، ۱۳/۰۴ درصد در  $30 - 100$  KDa، ۹/۳۱ درصد در  $10 - 30$  KDa، ۲۴/۸۴ درصد در  $2 - 10$  KDa و ۱۲/۴۲ درصد  $2 < KDa$  بود (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، تغییرات قابل توجهی در نمودار شویب فوکوئیدان خام و هیدرولیزات آن‌ها به‌وقوع پیوست و کوچکتر شدن اندازه پلیمرها مشهود بود. به‌طورکلی در ستون کروماتوگرافی اندازه‌طردی (۱ SEC) یا ژل تراوشی (۲ GPC) جدا سازی مولکولی براساس اندازه صورت می‌گیرد و مولکول‌های با اندازه بزرگتر ابتدا و مولکولی‌های با اندازه کوچکتر با تأخیر از ستون خارج می‌شوند. شکل ۱ نشان می‌دهد که مولکول‌های  $100 < KDa$  از دقیقه ۱۳/۶۶ شروع به خروج از ستون کروماتوگرافی نمودند و هرچه وزن مولکولی کاهش یافت نقطه شروع شویب به تأخیر افتاد و نمودار به سمت زمان‌های بالاتر تغییر جهت داد. براساس نتایج به‌دست آمده، وزن مولکولی فراکسیون‌ها به ترتیب ۵، ۵۵۳/۷، ۳۹/۲، ۱۲/۴ و  $4/6 \times 10^3$  گرم/مول در  $100 < KDa$ ،  $30 - 100$  KDa،  $2 - 10$  KDa و  $2 < KDa$  محاسبه شد.

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 ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده ABTS افزوده شد. در این آزمایش از مخلوط ABTS و اتانول به‌عنوان کنترل واکنش و از اسیدآسکوربیک نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

$$100 \times \frac{(\text{کنترل-نمونه})}{\text{کنترل}} = \text{فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد}$$

که A: جذب کنترل (۱۰۰ میکرولیتر اتانول با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ABTS) و AS: جذب نمونه می‌باشد.

#### ۷.۲. قدرت کاهندگی یون آهن $Fe^{3+}$

قدرت کاهندگی آهن با استفاده از روش Oyaizu (۱۹۸۶) اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر را با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار، pH برابر ۶/۶ و ۵۰۰ میکرولیتر از فری سیانات پتاسیم ۱٪ ترکیب شد. از آسکوربیک اسید به‌عنوان ضداکسیدان تجاری استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از TCA، ۱۰ درصد افزوده شد و مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. در ادامه، به ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد افزوده شد، سپس به مدت ده دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در نهایت میزان جذب در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد.

#### ۸.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

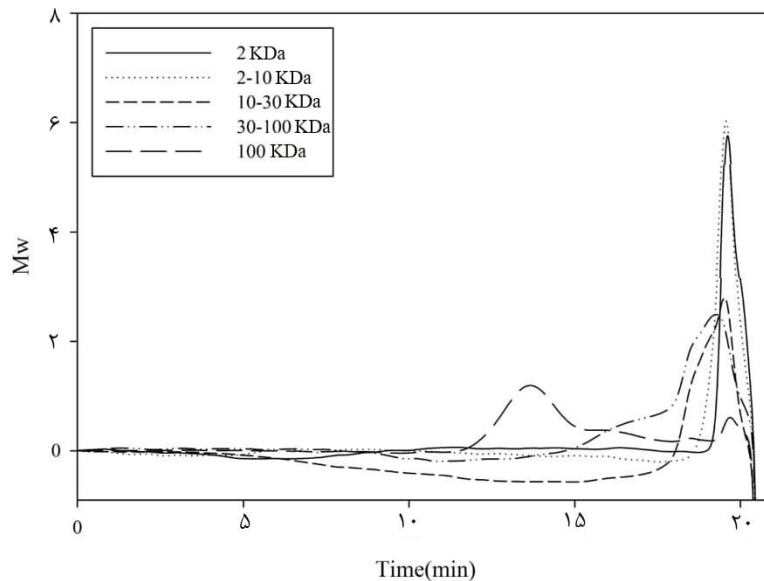
به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، در ابتدا پس از بررسی نرمال بودن به کمک تجزیه واریانس یک‌طرفه تأثیر

<sup>1</sup>Size Exclusion chromatography

<sup>2</sup>Gel permeation chromatography

جدول ۱- بازده و وزن مولکولی فراکسیون‌های به‌دست آمده از FH<sub>2</sub>O

پیک ۲	بازده (درصد)	پیک ۱	وزن مولکولی ( $\times 10^2$ g/mol)
$100 < \text{KDa}$	۴۰/۳۷	$552/7 \pm 5/4$	$127/4 \pm 2/9$
$100 - 30 \text{ KDa}$	۱۳/۰۴	$39/2 \pm 11$	$5/9 \pm 0/0$
$30 - 10 \text{ KDa}$	۹/۳۱	$12/4 \pm 0/1$	$4/7 \pm 0/1$
$10 - 2 \text{ KDa}$	۲۴/۸۴	$4/6 \pm 0/1$	-
$2 > \text{KDa}$	۱۲/۴۲	-	-



شکل ۱- نمودار شویس فوکوئیدان هیدرولیز شده در ۲۰ دقیقه (FH<sub>2</sub>O) و فراکسیون‌های آن  
 TSK G5000PW بر روی ستون (2 > KDa, 2-10 KDa, 10-30 KDa, 30-100 KDa, 100 < KDa)

درصد مهارکنندگی مشاهده شد. فراکسیون ۲ KDa - ۱۰ بیشترین و فراکسیون بیش از ۱۰۰ KDa کمترین قابلیت مهار رادیکال آزاد را به نمایش گذاشتند. میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط آسکوربیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر ۸۶/۷۴ درصد بود.

### ۳.۳. قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS

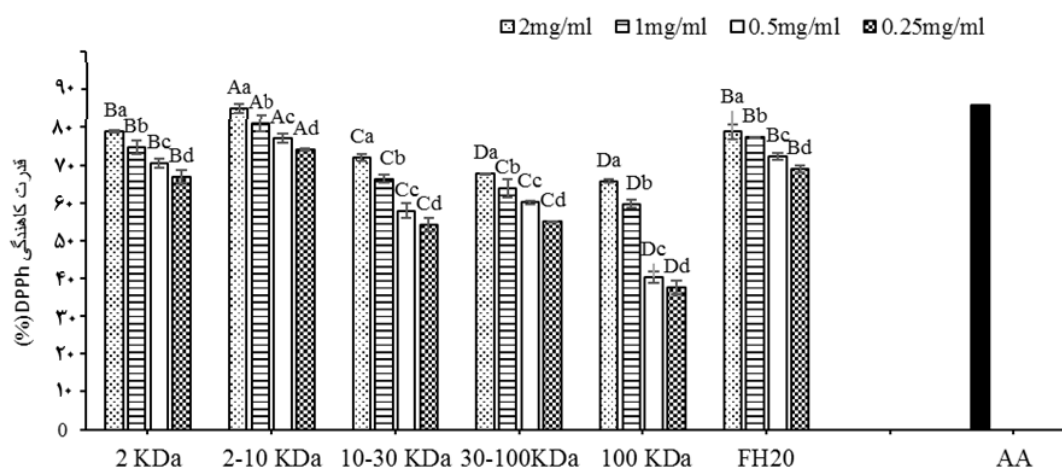
همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، قدرت مهارکنندگی FH<sub>2</sub>O و دیگر فراکسیون‌ها در محدوده ۴۲/۵۹ - ۸۹/۶۵ درصد سنجش شد. در این میان، در حالی که فراکسیون ۱۰۰ KDa کمترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS را دارا بود ( $P < 0/05$ )، قابلیت مهار رادیکال

### ۲.۳. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

قابلیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط FH<sub>2</sub>O و فراکسیون‌های آن در شکل ۲ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود قدرت مهارکنندگی FH<sub>2</sub>O در محدوده ۶۹/۰۸ - ۷۸/۷۹ درصد سنجش شد که این میزان در فراکسیون‌های به‌دست آمده بین ۳۷/۶۹ - ۸۵/۰۵ درصد بود. بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد در بین فراکسیون‌های مختلف نشان داد که غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر دارای بالاترین اثر ضدکسایشی بوده است. همچنین میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد با کاهش وزن مولکولی در فراکسیون ۱۰-۲ KDa وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت ارتباط مستقیمی با

درصد رادیکال آزاد ABTS بیشترین قابلیت مهار رادیکال آزاد را نشان داد. براساس نتایج، تفاوت وزن مولکولی در بین فراکسیون‌ها اختلاف معنی‌داری با مهارکنندگی رادیکال آزاد ایجاد کرد ( $P < 0.05$ ).

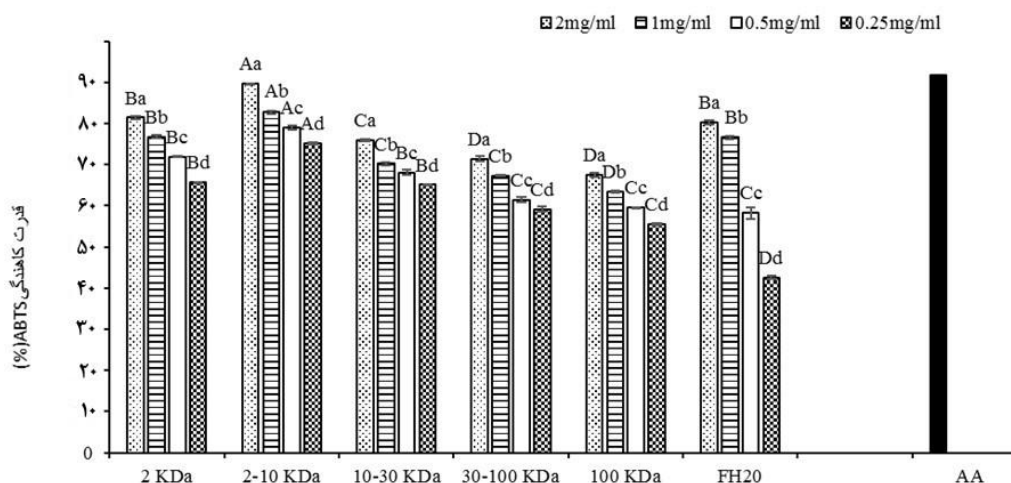
آزاد در فراکسیون‌های با وزن مولکولی کمتر به میزان معنی‌داری بهبود یافت ( $P < 0.05$ ). قابلیت مهار رادیکال آزاد در تمامی نمونه‌ها وابسته به غلظت بود و با افزایش میزان پلی‌ساکاریدها به میزان قابل توجهی افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). فراکسیون ۲-۱۰ KDa با مهار ۷۵/۱۶-۸۹/۶۵



شکل ۲- فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط فوکوئیدان هیدرولیزشده در ۲۰ دقیقه (FH20)

و فراکسیون‌های آن ( $2 > \text{KDa}$ , 2-10 KDa, 10-30 KDa, 30-100 KDa,  $100 < \text{KDa}$ )

حروف بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار برون‌گروهی هر غلظت در FH20 و فراکسیون‌های آن در زمان‌های مختلف است ( $P < 0.05$ )  
حروف کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار درون‌گروهی بین غلظت‌های FH20 و فراکسیون‌های آن در هر تیمار زمانی است ( $P < 0.05$ )  
اسید آسکوربیک (AA) با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.



شکل ۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS توسط فوکوئیدان هیدرولیزشده در ۲۰ دقیقه (FH20)

و فراکسیون‌های آن ( $2 > \text{KDa}$ , 2-10 KDa, 10-30 KDa, 30-100 KDa,  $100 < \text{KDa}$ )

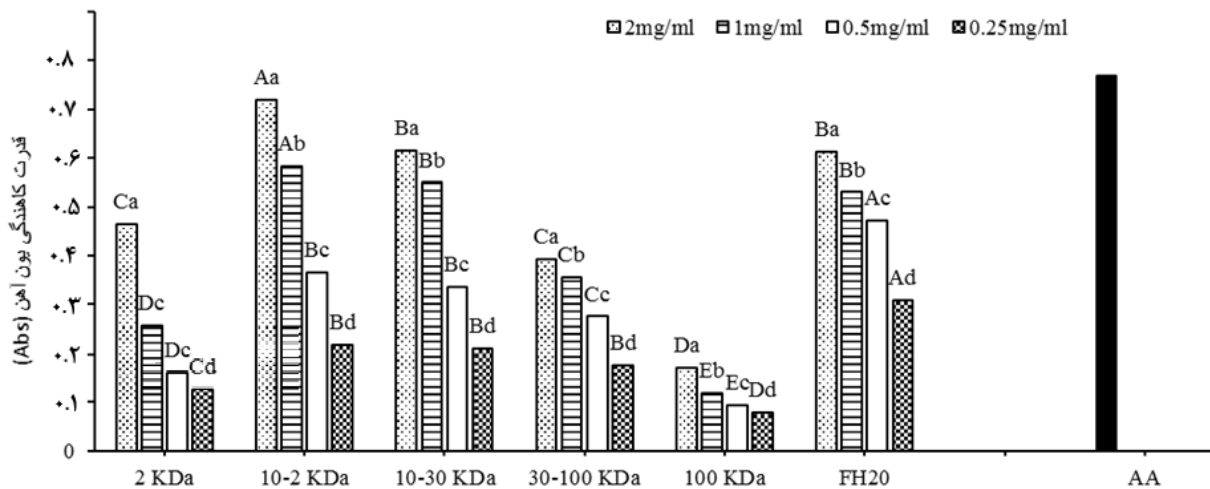
حروف بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار برون‌گروهی هر غلظت در FH20 و فراکسیون‌های آن در زمان‌های مختلف است ( $P < 0.05$ )  
حروف کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار درون‌گروهی بین غلظت‌های FH20 و فراکسیون‌های آن در هر تیمار زمانی است ( $P < 0.05$ )  
اسید آسکوربیک (AA) با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.



میلی‌لیتر، فراکسیون ۲-۱۰ KDa با جذب ۰/۲۱-۰/۷۲ بیشترین و فراکسیون بیش از ۱۰۰ KDa دالتون با جذب ۰/۰۷-۰/۱۷ کمترین میزان کاهندگی آهن  $Fe^{3+}$  را نشان دادند. استفاده از آسکوربیک‌اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز توانست در مقایسه با FH20 و فراکسیون‌های آن میزان کاهندگی آهن  $Fe^{3+}$  بیشتری (جذب ۰/۷۶) را نشان دهد.

### ۴.۳. قدرت کاهندگی یون آهن $Fe^{3+}$

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، پتانسیل کاهندگی یون آهن  $Fe^{3+}$  در FH20 و فراکسیون‌های آن با افزایش غلظت افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. همچنین تفاوت وزن مولکولی در بین فراکسیون‌ها اختلاف معنی‌داری با قدرت کاهندگی یون آهن ایجاد کرد ( $P < 0.05$ ). در این میان در غلظت ۲ میلی‌گرم بر



شکل ۴- قدرت کاهندگی یون آهن توسط فوکوئیدان هیدرولیزشده در ۲۰ دقیقه (FH20) و فراکسیون‌های آن

(2> KDa, 2-10 KDa, 10-30 KDa, 30-100 KDa, 100< KDa)

حروف بزرگ بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار برون‌گروهی هر غلظت در FH20 و فراکسیون‌های آن در زمان‌های مختلف است ( $P < 0.05$ )  
حروف کوچک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار درون‌گروهی بین غلظت‌های FH20 و فراکسیون‌های آن در هر تیمار زمانی است ( $P < 0.05$ )  
اسید آسکوربیک (AA) با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، رادیکال DPPH، توانایی احیاکنندگی و شلاته‌کنندگی ترکیبات آهن‌دار اشاره کرد (Costa et al., 2010). رادیکال‌های آزاد فعال مانند OH، COO- و O<sup>2</sup> سیستم‌های زنده همواره موضوع تحقیقات فراوانی بوده است. این ترکیبات بسیار ناپایدار و فعال هستند و از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای آثار مخربی بر سلول‌های زنده، DNA و غشاهای سلولی دارند که از آن جمله می‌توان به جهش‌های منجر به مرگ سلولی یا سرطان، دیابت، عملکرد غیرعادی ریوی، دیستروفی

### ۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

پلی‌ساکاریدهای جلبکی، اگرچه تا چندی پیش به‌عنوان یک منبع بالقوه برای مقابله با واکنش‌های اکسیداسیونی مطرح نبودند، اما مطالعات انجام‌شده در سال‌های اخیر توانسته‌اند توجه بسیاری از دانشمندان را به این دسته از درشت‌مولکول‌های طبیعی جلب کند. پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه‌استخراج‌شده از جلبک‌های دریایی اثرات ضدکسایشی قابل‌توجهی را نشان دادند که از جمله می‌توان به مهار کردن

مولکولی ۱۵۱/۷-۲۸/۲ و ۴۴۶/۵-۳/۱ کیلودالتون هستند، فعالیت ضد اکسایشی بیشتری نسبت به پلی ساکاریدهای سولفات هیدرولیز نشده نشان دادند. Shan و همکاران (۲۰۱۶) طی پژوهش خود نشان دادند که وزن مولکولی فوکوئیدان می تواند به میزان قابل توجهی ویژگی های ضد اکسایشی آن ها به خصوص قابلیت کاهندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل را نیز تحت تأثیر قرار دهد. در تحقیقاتی که روی فوکوئیدان *Fucus vesiculosus* توسط Lim و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، هیدرولیزات با وزن مولکولی کمتر با دو روش تابش اشعه گاما و هیدرولیز اسیدی تولید شد که در طی آن با کاهش وزن مولکولی قابلیت مهارکنندگی قابلیت کاهش یون آهن افزایش یافت. در طی یک بررسی، Yuan و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به استخراج فوکوئیدان از گونه *Ascophyllum nodosum* با استفاده از امواج مایکروویو در دما و زمان های مختلف نمودند. نتایج بیانگر آن بود که بیشترین فعالیت ضد اکسایشی در مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهش یون های آهن در فوکوئیدان استخراج شده در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد اتفاق افتاد. در همین راستا، یافته های حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی نشان داد که با افزایش دمای استخراج میزان وزن مولکولی (۴۰ به ۱/۳ کیلو دالتون) پلیمرهای استخراج شده کاهش یافت و در نتیجه فعالیت ضد اکسایشی نیز دچار کاهش شد (Yuan et al., 2015). طی مطالعه ای که توسط Khajavi و همکاران (۲۰۲۱) بر روی ارزیابی ویژگی های ضد اکسایشی و ضد دیابتی پلی ساکاریدهایی با منشأ دریایی و خشکی و بررسی رابطه وزن مولکولی با فعالیت زیستی انجام شد، نتایج نشان داد کاهش وزن مولکولی سبب افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن در فوکوئیدان (۴۷/۹-۲۷/۸ درصد، ۰/۴۷-۰/۳۷ جذب) و رازیانه (۳۹-۱۲/۷ در صد، جذب ۰/۳۴-۰/۱۶) می شود. در پژوهشی که پیش تر توسط Hou و همکاران (۲۰۱۲) بر روی فوکوئیدان حاصل از *Laminaria japonica* صورت گرفت، جهت بررسی رابطه متقابل وزن مولکولی و فعالیت ضد اکسایشی اقدام به هیدرولیز پلیمرهای به دست آمده

عضلانی، آب مروارید، ورم مفاصل، تصلب شرائین، آسیب های بافتی و بعضی عوارض و اختلالات عصبی مانند آلزایمر اشاره کرد (Kumar et al., 2008).

مطالعات نشان داده است که در پلی ساکاریدها ارتباط تنگاتنگی بین ویژگی های ساختاری شامل نوع مونوساکاریدها، چگونگی اتصال پیوندهای گلیکوزیدی، خطی یا منشعب بودن پلیمرها، میزان سولفات، حضور گروه های کربوکسیل و وزن مولکولی با نوع و قدرت فعالیت زیستی آن ها وجود دارد. بررسی گزارش های مرتبط بیانگر آن است که میزان سولفات، نسبت مولی سولفات به فوکوز، نسبت مولی سولفات به میزان قند کل و وزن مولکولی فوکوئیدان عوامل تعیین کننده در قدرت و نوع فعالیت زیستی آن است (Wang et al., 2010). در این میان، اندازه مولکولی ترکیبات پلی ساکاریدی از جمله فوکوئیدان از اهمیت ویژه ای در فراهم کردن امکان مداخله مثبت این ترکیبات در واکنش های شیمیایی و بیوشیمیایی برخوردار بوده و در پلی ساکاریدهای مختلف تعیین کننده می باشد. البته نتایج نشان داده است که در صورت اثرگذاری، نوع تغییر فعالیت زیستی بسته به ساختار شیمیایی پلی ساکارید و واکنش بیوشیمیایی می تواند متفاوت باشد (Bi et al., 2018). در مطالعه حاضر، بکارگیری هیدرولیز اسیدی با استفاده از اسید هیدروکلریک در دمای بالا و استفاده از سیستم فرآیند غشایی توانست منجر به تولید فوکوئیدان هایی با وزن مولکولی کوچک تر شود که امکان ارزیابی تأثیر وزن مولکولی بر فعالیت ضد اکسایشی را فراهم ساخت.

Qi و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که خواص ضد اکسایشی اولون ها مربوط به محتوای سولفات آن ها است. نتایج به دست آمده نشان داد که فعالیت های ضد اکسایشی پلی ساکاریدهای سولفات می تواند از طریق کاهش وزن مولکولی آن ها افزایش یابد. برای مثال، محصولات با وزن مولکولی پایین که از هیدرولیز پلی ساکاریدهای *Enteromorpha prolifera* و *Ulva pertusa* به دست آمده اند و دارای محدوده وزن

داد. براساس مطالعه قبلی گروه حاضر، تیمار FH20 بیشترین پتانسیل را در مهار رادیکال آزاد ABTS, DPPH و احیاء یون آهن  $Fe^{3+}$  دارا بود. پس از استفاده از سیستم فراپالایش غشایی پلیمرهایی با وزن مولکولی و بازدهی متفاوت به دست آمده، نتایج نشان داد فوکوئیدان با وزن مولکولی ۱۰-۲ دالتون نسبت به FH20، می‌تواند به دلیل کاهش وزن مولکولی قادر به مهار واکنش‌های ضداکسایشی بیشتری باشد. از طرف دیگر، هیدرولیز اسیدی و کاهش بیش از حد وزن مولکولی اثر منفی بر روی ویژگی ضداکسایشی فوکوئیدان داشت.

به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار نمود، کاهش وزن مولکولی اثربخشی فوکوئیدان را بدون انجام فرآیند هزینه‌بر و طولانی تخلیص و تنها با دستکاری شیمیایی و سیستم فراپالایش غشایی جهت تولید در مقیاس صنعتی افزایش دهد.

## ۶. تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ۴۰۰۵۵۴۵ تشکر و قدردانی می‌گردد.

توسط پراکسید هیدروژن در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت نمودند. نتایج نشان داد که پلیمرهای حاصل از هیدرولیز در عین حال که ساختار کلی خود را حفظ نمودند، وزن‌های مولکولی متفاوت داشتند و فعالیت ضداکسایشی آن‌ها به‌طور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت بوده و رابطه بین وزن مولکولی و فعالیت ضداکسایشی به‌صورت خطی نبود. کاهش وزن مولکولی در پلیمرهای فوکوئیدان به احتمال زیاد به دلیل تغییر پیکربندی فضایی، افزایش میزان دسترسی مولکولی، بهبود حلالیت و افزایش در دسترس بودن گروه‌های عاملی، سبب بهبود فعالیت زیستی این دسته از پلیمرهای طبیعی می‌شود.

## ۵. نتیجه‌گیری نهایی

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که جلبک قهوه‌ای *Nizamuddinina zanardinii* حاوی فوکوئیدانی است که در حالت طبیعی خود فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون آهن قابل‌قبولی را دارا است. هیدرولیز اسیدی با استفاده از اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال توانست پلیمرهایی با وزن‌های مولکولی پایین‌تر تولید نماید که اثرات مثبت و افزایشی را بر روی مهار واکنش‌های ضداکسایشی نشان

## ۷. منابع

## References

- Babaie, M., 2020. Proteins separation and purification methods with focus on chromatography: A review study. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 20(2), 151-175.
- Barrow, C., Shahidi, F., 2007. *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*: CRC Press.
- Bi, D., Yu, B., Han, Q., Lu, J., White, W. L., Lai, Q., Cai, N., Luo, W., Gu, L., Li, S., Xu, H., Hu, Z., Nie, S., Xu, X., 2018. Immune activation of RAW264. 7 macrophages by low molecular weight fucoidan extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(41), 10721-10728.
- Bishop, W.M., Zubeck, H.M., 2012. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Food and Nutrition Sciences* 2(5), 1-6.
- 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* 109(1), 793-802.

- Chandini, S.K., Ganesan, P., Bhaskar, N., 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry* 107(2), 707-713.
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Barison, A., Campos, F.R., Salvador, M.J., Maia, B.H., L.N.S., Cabral, E.C., Eberlin, M.N., 2010. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. *Natural Products* 73(6), 1180-1183.
- Costa, L.S., Fidelis, G.P., Cordeiro, S.L., Oliveira, R.M., Sabry, D.D.A., Câmara, R.B.G., Rocha, H.A.O., 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64(1), 21-28.
- Hou, Y., Wang, J., Jin, W., Zhang, H., Zhang, Q., 2012. Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights. *Carbohydrate Polymers* 87(1), 153-159.
- Hwang, P.A., Hung, Y.L., Phan, N.N., Hieu, B.T.N., Chang, P.M., Li, K.L., Lin Y.C., 2016. The in vitro and in vivo effects of the low molecular weight fucoidan on the boneosteogenic differentiation properties, *Cytotechnology* 68, 1349-1359.
- Khajavi, S., Tabarsa, M., Ahmadi, H., Rezaei, M., 2021. Relationship evaluation of molecular weight and antioxidant and alpha amylase inhibition properties of fucoidan and alginate from brown seaweed *Padina pavonica* in comparison with polysaccharides from Flixweed and Fennel. *Journal of Fisheries Science and Technology* 10(1), 31-45.
- pKim, S.K., Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods* 2(1), 1-9.
- Kumar, K.S., Ganesan, K., Rao, P.V.S., 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. *Food Chemistry* 107(1), 289-295.
- Kumar, C.S., Ganesan, P., Suresh, P., Bhaskar, N., 2008. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-A review. *Journal of Food Science and Technology* 45(1), 1-13.
- Lim, S., Choi, J.I., Park, H., 2015. Antioxidant activities of fucoidan degraded by gamma irradiation and acidic hydrolysis. *Radiation Physics and Chemistry* 109(1), 23-26.
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, H.A., 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology* 23(2), 83-96.
- Mousavi, N.S., Tabarsa, M., Ahmadi, H., 2022. Evaluation of relationship between molecular weight and antioxidant properties of hydrolyzed fucoidan from brown seaweed *Nizamuddinina zanardinii*. *Fisheries Science and Technology* 11(2), 153-164.
- Murata, M. Nakazoe, J.-I., 2001. Production and use of marine algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 35(4), 281-290.
- Norheim, F., Gjelstad, I.M., Hjorth, M., Vinknes, K.J., Langleite, T.M., Holen, T., Jensen, J., Dalen, K.T., Karlsen, A.S., Kielland, A., 2012. Molecular nutrition research-the modern way of performing nutritional science. *Nutrients* 4(12), 1898-1944.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44(6), 307-315.
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* 19(1), 31-39.
- Pomponi, S. A., 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology* 70(1), 5-13.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z. and Xing, R., 2005. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 17(7), 527-534.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical and Biology Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Rodriguez-Jasso, R.M., Mussatto, S.I., Pastrana, L., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., 2011. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (Fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers* 86(3), 1137-1144.
- Shahidi, F., 2009. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology* 20(9), 376-387.
- Shan, X., Liu, X., Hao, J., Cai, C., Fan, F., Dun, Y., Zhao X., Liu, X., Li, C. and Yu G., 2016. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *International Journal of Biological Macromolecules* 82(1), 249-255.
- Story, M., Kaphingst, K. M., Robinson-O'Brien, R., Glanz, K., 2008. Creating healthy food and eating environments: Policy and environmental approaches. *Annual Review of Public Health* 29(7), 253-272.
- Tabarsa, M., Dabaghian, E.H., You, S., Yelithao, K., Cao, R., Rezaei, M., Alboofetileh, M., Bitá, S., 2020. The activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways of RAW264. 7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddinina zanardinii*. *International Journal of Biological Macromolecules* 148(1), 56-67.
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., Li P., 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules* 46(1), 6-12.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., Kim, S.-K., 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84(1), 14-21.
- Wijesinghe, W., Jeon, Y.J., 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers* 88(1), 13-20.
- Wu, G.J., Shiu, S.M., Hsieh, M.C., Tsai, G. J., 2016. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum Cristaeifolium*. *Food Hydrocolloids* 53(2), 16-23.
- Yuan, Y., and Macquarrie, D. 2015. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers* 129(20), 101-107.
- Zhou, G., Sun, Y., Xin, H., Zhang, Y., Li, Z. And Xu, Z., 2004. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research* 50(1), 47-53.

