



مقاله پژوهشی

فلوروتانن استخراج شده از ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای به عنوان یک منبع جدید آنتی‌اکسیدانی

سپیده بابائی ماهانی نژاد^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۲،۳*}، سولماز سلیمانی^۴

تاریخ دریافت: دی ۹۷

تاریخ پذیرش: اسفند ۹۷

چکیده

بهره‌گیری‌های صنعتی از جلبک‌های دریایی در دهه‌های گذشته رشد نمایی را نشان می‌دهد. کاربردهای غذایی به ویژه در ترکیبات غذای انسان و کاربردهای درمانی از مهم‌ترین این بهره‌مندی‌ها به شمار می‌آید. هدف مطالعه حاضر ارزیابی فعالیت زیستی فراکشن آلی، آبی و اتیل‌استاتی از دو گونه ماکرو جلبک قهوه‌ای *Padina sp.* و *Polycladia myrica* از سواحل جزیره قشم بود. در مطالعه تجربی حاضر، به منظور شناسایی گونه برتر، خواص زیستی شامل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی، از یک گرادیان غلظتی با روش‌های سنجش توان احیاکنندگی آهن، FRAP و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS، تعیین ترکیبات فنلی و فلوروتانن و نیز سنجش فعالیت ضدباکتریایی به روش دیسک انتشار استفاده شد. فراکشن اتیل‌استاتی در هر دو گونه ماکرو جلبکی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در تمامی روش‌های مورد آزمایش داشت. تنها فراکشن اتیل‌استاتی ماکرو جلبک *Padina sp.* فعالیت ضدباکتریایی نسبت به همه سویه‌های مورد مطالعه نشان داد. هر دو گونه ماکرو جلبک قهوه‌ای *Padina sp.* و *Polycladia myrica* خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی داشتند، اما ماکرو جلبک گونه *Padina sp.* به دلیل داشتن مقادیر زیادی فنل و فلوروتانن و قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا، می‌تواند به عنوان گونه‌ای با ارجحیت خواص زیستی معرفی شود.

واژگان کلیدی: فلوروتانن، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتریایی، ماکرو جلبک قهوه‌ای.

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران.
- ۴- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

* نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه

گیاهان منبع اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها در طبیعت هستند. مواد اصلی دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی شامل ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها و توکوفرول هستند (Mendiola et al., 2008). مطالعات زیادی بر روی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که از گیاهان خشکی‌زی استخراج شده‌اند صورت گرفته، کاربردهای آن‌ها نیز در سیستم‌های غذایی مورد آزمایش قرار گرفته است و گزارش‌هایی مبنی بر این که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قوی‌تر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هستند، وجود دارد (Wanasundara and Shahidi, 1998; Tang et al., 2001; Devi et al., 2008). جلبک‌های دریایی یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان در محیط‌های آبی هستند که به واسطه داشتن پلی‌ساکاریدهای ارزشمندی مانند آگار، کاراژینان، آلژینات و غیره ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی دارند (Taskin et al., 2007). جلبک‌ها حاوی مقادیر بالایی از ویتامین‌ها، مواد معدنی، پروتئین‌ها، کاروتنوئیدها، فیبرهای خوراکی و اسیدهای چرب ضروری هستند و به طور گسترده در صنایع مختلف غذایی، آرایشی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kotnala et al., 2009). علاوه بر آن

جلبک‌های دریایی نیز به عنوان منبع آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنلی مورد توجه قرار گرفته‌اند. فنل‌ها گروه مهمی از ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و دیگر خواص زیستی هستند (Onofrejova et al., 2010). مطالعاتی درباره پتانسیل‌های دارویی، درمانی و سلامتی ترکیبات مختلف زیست‌فعال موجود در گیاهان دریایی به ویژه جلبک قهوه‌ای انجام شده است (Gupta and Abu-Ghannam, 2011). ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های موثر در جلبک‌های قهوه‌ای بین ۳۰-۲۰ درصد وزن خشک گیاه را به خود اختصاص می‌دهند (Ragan, 1986; Nagai and Yukimoto, 2003). Nyska و Kohen در سال ۲۰۰۲ به این نکته اشاره کردند که ترکیبات زیست‌فعال با عملکرد آنتی‌اکسیدانی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله گرفتگی رگ‌های خونی، التهاب مزمن، بی‌نظمی‌های قلبی عروقی، سرطان و فرآیند پیر شدن به ایفای نقش می‌پردازند (Kohen and Nyska, 2002). همچنین جلبک‌های قهوه‌ای به دلیل محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی مانند آسکوربیک اسید، گلوکاتیون، فنل و فلاونوئیدها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند و در

برابر اکسیداسیون چربی مواد غذایی و استرس اکسیداتیو بافت‌ها اثر محافظتی ارائه می‌دهند (Yang et al., 2008; Wu et al., 2010). ترکیبات بالقوه آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌ها شامل برخی رنگدانه‌ها (فوکوگزانتین، آستاگزانتین، کاروتنوئیدها و غیره) و پلی‌فنل‌ها هستند (Souza et al., 2011).

ترکیبات فنلی یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که میزان و تنوع آن‌ها در هنگام رشد گیاهان تحت تاثیر ژنتیک، شرایط رشد، پرورش و عوامل آب و هوایی است. دمای بالا و اشعه‌های خورشیدی زیاد در عرض‌های جغرافیایی بالا سبب می‌شود که گیاهان این مناطق برای مقابله با اشعه‌های فرابنفش و رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری تولید کنند (Lopez et al., 2011).

فلوروتانن‌ها ترکیبات پلی‌فنولی هستند که منحصر در جلبک‌های قهوه‌ای وجود دارند. این نوع خاص از پلی‌فنل‌ها شامل یک گروه از ترکیبات پلیمری ناهمگن با تغییرات شیمیایی بالا هستند و ساختارهای شیمیایی مختلفی دارند. این ترکیبات، طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان، ضدالتهاب، ضداسه ماورای بنفش، ضدآلزیمر، ضد میکروبی و ضد دیابت را نشان می‌دهند (Montero et al., 2016).

خلیج فارس نیز در عرض‌های جغرافیایی پایین قرار گرفته است و گونه‌های جلبکی متنوعی دارد. یک گروه از این جلبک‌ها از جنس *Padina* هستند که تاکنون حدود ۸۰ گونه از این جنس در سطح دنیا شناسایی شده است. محل زیست این جلبک‌های دریایی در مناطق بین جزر و مدی عمق صفر تا ۱۰ متری آب‌های گرم گزارش شده است. این جلبک‌ها به دلیل شکل برگ، اندازه و رنگ خاص آن‌ها به راحتی از جلبک‌های دریایی دیگر قابل شناسایی هستند (Basson, 1992; Abbas and Shameel, 2013).

گونه دیگری از جلبک‌های قهوه‌ای هستند. گونه *P. myrica* تقریباً به طور کامل در زیستگاه‌های دریایی یافت می‌شوند. تعداد دیگری از گونه‌های این جنس نیز به آب‌های لب شور نفوذ کرده‌اند. گونه *P. myrica* بر بسترهای صخره‌ای در ناحیه جزر و مدی و آب‌های کم عمق ساحلی یافت می‌شود (یوسف‌زادی و کوبی، ۱۳۹۵).

اطلاعات اندک علوم مربوط به گیاهان دریایی در ایران به ویژه از لحاظ ترکیبات فعال زیستی، انگیزه انجام این پروژه بر روی گونه‌های *Padina sp.* و *Polycladia myrica* سواحل خلیج فارس شد. تنوع و ماهیت شیمیایی

برابر اکسیداسیون چربی مواد غذایی و استرس اکسیداتیو بافت‌ها اثر محافظتی ارائه می‌دهند (Yang et al., 2008; Wu et al., 2010). ترکیبات بالقوه آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌ها شامل برخی رنگدانه‌ها (فوکوگزانتین، آستاگزانتین، کاروتنوئیدها و غیره) و پلی‌فنل‌ها هستند (Souza et al., 2011).

ترکیبات فنلی یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که میزان و تنوع آن‌ها در هنگام رشد گیاهان تحت تاثیر ژنتیک، شرایط رشد، پرورش و عوامل آب و هوایی است. دمای بالا و اشعه‌های خورشیدی زیاد در عرض‌های جغرافیایی بالا سبب می‌شود که گیاهان این مناطق برای مقابله با اشعه‌های فرابنفش و رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری تولید کنند (Lopez et al., 2011).

فلوروتانن‌ها ترکیبات پلی‌فنولی هستند که منحصر در جلبک‌های قهوه‌ای وجود دارند. این نوع خاص از پلی‌فنل‌ها شامل یک گروه از ترکیبات پلیمری ناهمگن با تغییرات شیمیایی بالا هستند و ساختارهای شیمیایی مختلفی دارند. این ترکیبات، طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان، ضدالتهاب، ضداسه ماورای بنفش، ضدآلزیمر، ضد میکروبی و ضد دیابت را نشان می‌دهند

هر یک از نمونه‌ها با کلیدهای شناسایی معتبر (Basson, 1979; Kokabi and Yousefzadi, 2015)، اطلس و چک‌لیست‌های موجود از ماکرو جلبک‌های منطقه خلیج فارس (Sohrabipour et al., 2004;) (Sohrabipour and Rabiei, 2007)، جستجو در پایگاه علمی بانک جلبک (www.algaebase.org) و نیز بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی تا سطح جنس و گونه شناسایی شدند. برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی نمونه‌ها از میکروسکوپ نوری (Olympus، SQF 301، CX 21، ژاپن) استفاده شد.

عصاره‌گیری

عصاره خام و فرآیند خالص‌سازی مایع- مایع طبق این فرآیند دو فراکشن (یک فراکشن اتیل استاتی و یک فراکشن آبی) از خالص‌سازی فراکشن هیدروآتانولی به دست آمد.

عصاره خام

۳۰ گرم پودر هر یک از جلبک‌های قهوه‌ای *Polycladia myrica* و *Padina sp.* به طور جداگانه در ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول اتانول- آب (۵۰/۵۰، حجمی/حجمی) ریخته شد و مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در

آنتی‌اکسیدان‌ها باعث می‌شود که جداسازی و اندازه‌گیری آن‌ها در نمونه‌های مختلف جلبکی با یک نوع آزمایش امکان‌پذیر نباشد، بنابراین طراحی مجموعه‌ای از آزمایش‌هایی که بتوانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را اندازه‌گیری کنند، ضروری است. اطلاعاتی که در این پژوهش به دست می‌آید می‌تواند به افزایش و پویایی بهره‌گیری اقتصادی از این گیاهان دریایی بومی کشور کمک کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی

در مطالعه تجربی حاضر عملیات نمونه‌برداری ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای از ساحل جزیره قشم در اوایل تابستان ۱۳۹۶، هنگام پیشینه جزر صورت گرفت. ماکرو جلبک‌های جمع‌آوری شده از آب دریا، در محیط ابتدا برای زدودن شن، ماسه و جانداران اپی‌فیت شسته و سپس درون کیسه‌های پلاستیکی برچسب‌دار، درون جعبه یونولیتی حاوی یخ، سریعاً به آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه هرمزگان منتقل شدند. در آزمایشگاه ماکرو جلبک‌ها دوباره با آب معمولی و نهایتاً با آب مقطر شسته و سپس به منظور خشک شدن روی پارچه تمیزی در سایه قرار داده شدند.

اتیل‌استات ریخته شد و عصاره‌های اتیل‌استاتی و آبی جدا شد. همه سنجش‌ها بر روی این دو فراکشن صورت گرفت (Stiger-Pouvreau et al., 2014).

اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی فراکشن‌ها با روش فولین-سیوکالتو که از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی است، با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. اساس کار در این روش، احیا معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۵ نانومتر نشان می‌دهد.

در این آزمایش، ابتدا غلظت‌های مختلفی از اسید گالیک (۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به عنوان استاندارد تهیه شد. به طور خلاصه، ۰/۱۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر عصاره با ۰/۷۵ میلی‌لیتر محلول فولین-سیوکالتو (۱ به ۱۰ رقیق شده با آب مقطر) مخلوط شد. بعد از گذشت ۳ دقیقه، ۰/۶ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات (۷/۵ درصد) به آن‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها ورتکس (IKA، آلمان) شدند و ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه

تاریکی بر روی هم‌زن مغناطیسی (IKA، آلمان) با دور ۲۰۰ rpm قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Sigma، آلمان) شدند و محلول رویی آن‌ها جمع‌آوری شد. این عملیات سه بار تکرار شد و در نهایت ۹۰۰ میلی‌لیتر محلول جمع‌آوری شد. این محلول تحت شرایط خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد روتاری (JISICO، کره جنوبی) شد تا به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد (Stiger-Pouvreau et al., 2014).

فرآیند خالص‌سازی مایع-مایع

ترکیبات فنلی طبق روش Stiger-Pouvreau و همکاران (۲۰۱۴) نیمه خالص شد. به طور خلاصه، این فرآیند شامل سه مرحله بود. در مرحله اول عصاره خام سه مرتبه با دی‌کلرومتان شسته شد. سپس فاز محتوی فلوروتانن به کمک روتاری در شرایط خلا و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس در آب حل شد. در مرحله دوم استون و سپس اتانول بر روی آن ریخته شد. محلول به دست آمده به کمک روتاری در شرایط خلا و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس در آب حل شد. در مرحله آخر، بر روی محلول قبلی

میکرولیتر از غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر فراکشن‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر از محلول DMBA در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد و در دمای اتاق برای ۶۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از الیزا ریدر (Biotek، آمریکا) خوانده شد. لازم به ذکر است، از آب به عنوان بلانک و برای شاهد از نمونه بدون محلول DMBA استفاده شد. در نهایت، میزان فلوروتانن فراکشن‌ها بر حسب میلی گرم فلوروگلوکوسینول در گرم فراکشن خشک شده محاسبه شد (Lopes et al., 2012).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش توان احیاکنندگی

این آزمایش بر مبنای احیا کردن کلرید آهن III (سه ظرفیتی) به کلرید آهن II (دو ظرفیتی) توسط فراکشنی که دارای قدرت احیاکنندگی (Reducing Power: RP) بود، انجام شد. تبدیل رنگ زرد به آبی مبنای سنجش است. توانایی فراکشنی برای احیا آهن سه ظرفیتی طبق روش Soleimani و همکاران (۲۰۱۶) تعیین شد. در این روش، ۰/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) با ۱/۲۵ میلی لیتر بافر

(۲۵ درجه سانتی‌گراد) در تاریکی قرار داده شدند. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنلی (C) موجود در عصاره طبق رابطه ۱ محاسبه شد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴).

رابطه ۱:

$$C \text{ (mg/g)} = c \times V / m'$$

c: غلظت معادل اسید گالیک که از منحنی استاندارد به دست می‌آید (میلی گرم در میلی لیتر)؛ V: حجمی عصاره مورد استفاده (میلی لیتر)؛ m': میزان فراکشن به دست آمده از یک گرم جلبک خشک (گرم).

اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فلوروتانن فراکشن‌ها

محتوی فلوروتانن کل عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی DMBA (7,12 Dimethylbenz(a)anthracene تخمین زده شد. محلول DMBA با ترکیب برابری از معرف DMBA ۲ درصد در اسید استیک (وزنی/حجمی) و هیدروکلریک اسید ۶ درصد در اسید استیک (حجمی/حجمی) آماده شد. در این آزمایش، ابتدا غلظت‌های مختلفی از فلوروگلوکوسینول (PG) (۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۲۵، ۱/۵۶ و ۰/۷۸ میکروگرم در میلی لیتر) به عنوان استاندارد تهیه شد. به طور خلاصه، ۵۰

تریازین (TPTZ) ۱۰ میلی‌مولار (حل شده در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مول) و ۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۲۰ میلی‌مولار به صورت روزانه تهیه شد. در این آزمایش به ۰/۲ میلی‌لیتر محلول فراکشن‌ها با غلظت‌های مختلف (۳، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) یا محلول استاندارد آسکوربیک اسید، ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه و مخلوط شد. مخلوط در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد (Benzie and Strain, 1996). از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد. فعالیت احیاکنندگی نمونه‌های فراکشن با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول آهن در گرم عصاره محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH (Di Phenyl Picryl Hydrazil) یک رادیکال آزاد است که در حضور مواد دارای خواص آنتی‌اکسیدان و با گرفتن الکترون تغییر رنگ می‌دهد. تغییر رنگ آن از بنفش به زرد مبنای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. توانایی مهار رادیکال آزاد طبق روش Soleimani و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد. به طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول فراکشن‌ها

فسفات (۰/۱ مولار، pH ۶/۶) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر فری‌ساینیدپتاسیم (۱ درصد) مخلوط شد و برای ۲۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط را برداشته، به آن ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰ درصد) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و در نهایت ۰/۲۵ میلی‌لیتر کلروفریک (۱ درصد) اضافه شد. بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instrument، انگلستان) خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به معنی افزایش توان احیاکنندگی نمونه‌ها است. آب مقطر به عنوان بلانک، و آسکوربیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده شد (Soleimani et al., 2017).

اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی از طریق آزمون توان آنتی‌اکسیدانی احیای یون فریک برای آزمون اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیای یون فریک (Ferric Reducing Power: FRAP) از روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) با اندکی تغییر استفاده شد. محلول معرف FRAP به وسیله مخلوط کردن ۵۰ میلی‌لیتر بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار (pH ۳/۶)، ۵ میلی‌لیتر ۶۴ و ۲ تری ۲- پیریدیل -S-

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکشن‌های جلبکی با روش Re و همکاران (۲۰۰۵) و به وسیله رادیکال آزینو بیس اتیل تیازولین سولفونیک ($ABTS^{++}$) یا پتانسیل آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شد. به منظور تهیه محلول $ABTS^{++}$ ، ۷ میلی‌مول $ABTS^{++}$ و ۲/۴۵ میلی‌مول پرسولفات پتاسیم در آب مقطر حل شد و به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در دمای محیط و در تاریکی نگه داشته شد. محلول $ABTS^{++}$ با اتانول ۹۶ درصد تا حدی رقیق شد که جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر به 0.02 ± 0.07 برسد. سپس به 0.02 میلی‌لیتر از محلول فراکشن‌ها با غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ۵ و ۲۵ 0.025 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) $1/8$ میلی‌لیتر محلول اتانولی $ABTS^{++}$ اضافه و مخلوط شد. همچنین محلول $ABTS^{++}$ به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. بعد از ۶ دقیقه قرار دادن نمونه‌ها در دمای محیط جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد (Re et al., 2005). لازم به ذکر است که در شاهد از (Dimethyl sulfoxide) DMSO به جای محلول فراکشن و از اتانول ۹۶ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. برای رسم نمودار منحنی استاندارد از BHT با غلظت ۱، ۲، ۳، ۵ و 0.025 میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد.

با غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ۵ و 0.025 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با 0.1 میلی‌لیتر محلول 0.5 میلی‌مولار DPPH حل شده در متانول، مخلوط شد. بعد از ورتکس، مخلوط نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی نگهداری شد. جذب نمونه در دستگاه الیزاریدر و در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه شاهد منفی از متانول به جای محلول فراکشن و در بلانک از متانول به جای DPPH استفاده شد در نهایت، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH (I_{DPPH}) طبق رابطه ۲ محاسبه شد (Soleimani et al., 2016).

رابطه ۲:

$$I_{DPPH} (\%) = [1 - ((A_s - A_0) / A)] \times 100$$

A_s : جذب مخلوط واکنش؛ A_0 : جذب بلانک؛ A : جذب شاهد منفی.

از (Butylated Hydroxy) BHT (Toluene) نیز به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله رادیکال آزینو بیس اتیل تیازولین سولفونیک

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس یک لوپ از کلنی باکتری به یک میلی‌لیتر محیط نوترینت برات انتقال یافت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. همچنین غلظت سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک‌فارلند ($1/5 \times 10^8$ باکتری در میلی‌لیتر) تعیین شد. برای بررسی اثر ضدباکتریایی در روش انتشار دیسک محلول حاوی سوسپانسیون میکروبی بر روی پلیت‌های مولر هینتون آگار با سواب استریل شده در کنار شعله به صورت یکنواخت کشت داده شد. دیسک‌های آماده استریل (پادتن طب) توسط پنس استریل روی محیط کشت باکتریایی قرار داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از هر یک از فراکشن‌های تهیه شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (وزنی/حجمی) به صورت سه بار تکرار به دقت به دیسک‌های بلانک (با قطر ۶ میلی‌متری) تزریق شد. در ادامه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و با کمک خط‌کش Hi Antibiotic Zone Scale قطر هاله ممانعتی رشد در باکتری‌های مختلف بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است به منظور کنترل نتایج آزمون انتشار دیسک و مقایسه نتایج آن‌ها از آنتی‌بیوتیک

درصد فعالیت مهار رادیکالی فراکشن‌ها ($I_{ABTS^{+}}$) بر اساس رابطه ۳ به دست آمد (Re et al., 2005).

رابطه ۳:

$$I_{ABTS^{+}}(\%) = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

A_s : جذب مخلوط واکنش پس از ۶ دقیقه؛ A_c : جذب شاهد در زمان صفر.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول BHT در گرم وزن خشک عصاره (میکرومول در گرم) بیان شد.

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با روش انتشار دیسک

در این مطالعه سویه‌های باکتریایی استاندارد که باکتری‌های بیماری‌زای انسانی محسوب می‌شوند شامل باکتری‌های گرم مثبت *Micrococcus luteus* ATCC 9341 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و باکترهای گرم منفی *Vibrio alginolyticus* ATCC 25922 و *Escherichia coli* ATCC 17749 از موسسه پاستور تهران تهیه شدند. برای تهیه کشت تازه از این باکتری‌ها، یک کلنی باکتری بر روی محیط جامد مولر هینتون آگار منتقل شد و در ادامه به مدت ۲۴

آمپی سیلین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. دیسک‌هایی نیز به DMSO خالص به عنوان شاهد منفی، آغشته شد (آرمان و همکاران، ۱۳۹۴).

نمودار با نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 صورت گرفت.

نتایج

شکل ۱ تصویر ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای *Padina sp.* و *Polycladia myrica* را نشان می‌دهد.

جدول ۱ میزان فراکشن‌های به دست آمده از دو گونه ماکرو جلبک قهوه‌ای *Polycladia myrica* و *Padina sp.* را نشان می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود، میزان ترکیبات قطبی (فراکشن آبی) در هر دو ماکرو جلبک بیشتر از ترکیبات نیمه قطبی (فراکشن اتیل استاتی) است.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و چگونگی همسان بودن پراش و پیروی داده‌ها از توزیع طبیعی توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و همچنین مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS 21 انجام شد. همچنین رسم



شکل ۱: ماکرو جلبک‌های مورد مطالعه. سمت راست: *Polycladia myrica* و سمت چپ: *Padina sp.*

جدول ۱: بازده فراکشن‌های مختلف به دست آمده از دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای

گونه	وزن خشک ماکروجلبک (گرم)	وزن فراکشن‌های مختلف (گرم)	
		اتیل‌استاتی	آبی
<i>Polycladia myrica</i>	۳۰	۰/۰۱۵	۲/۳۶۱۸
<i>Padina sp.</i>	۳۰	۰/۰۹۹۹	۳/۷۲۳

اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فنل و فلوروتانن

مقادیر فنل کل در نمونه‌های فراکشن که با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک به دست آمد، در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس این جدول، بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فنلی به ترتیب در فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی ماکروجلبک گونه *Padina sp.* دیده شد.

مقادیر فلوروتانن کل در نمونه‌های فراکشن که با استفاده از منحنی استاندارد فلوروگلوکوسینول به دست آمد، در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس این جدول، بیشترین و کمترین میزان فلوروتانن به ترتیب در فراکشن‌های اتیل‌استاتی و آبی ماکروجلبک *Padina sp.* دیده شد.

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

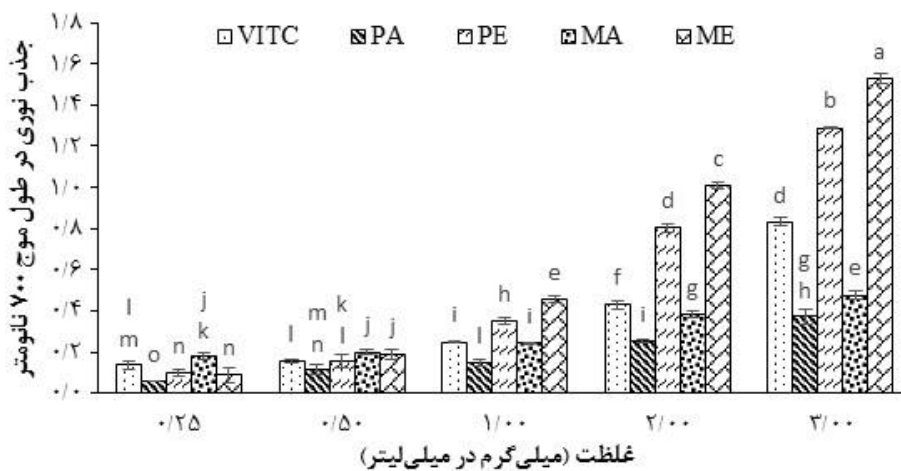
اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش توان احیاکنندگی

توان احیاکنندگی (RP) فراکشن‌های آبی و اتیل‌استاتی دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای در احیای کلرید آهن سه ظرفیتی به کلرید آهن دو ظرفیتی در شکل ۲ قابل مشاهده است. مقایسه فراکشن‌های ماکروجلبک‌های قهوه‌ای مورد مطالعه، نشان داد که فراکشن اتیل‌استاتی *P. myrica* با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعالیت احیاکنندگی بیشتری نسبت به آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد داشت. در حالی که، کمترین توان احیاکنندگی در فراکشن آبی جلبک قهوه‌ای *Padina sp.* با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

جدول ۲: میزان کل ترکیبات فنلی و فلوروتانن فراکشن‌های ماکروجلبک‌های قهوه‌ای مورد مطالعه (میانگین \pm انحراف معیار)

گونه	فراکشن	فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم فراکشن)	فلوروتانن کل (میلی‌گرم فلوروگلوکوسینول در گرم فراکشن)
<i>Polycladia myrica</i>	اتیل‌استاتی	$12/0 \pm 149/014^b$	$6/0 \pm 711/597^b$
	آبی	$0/0 \pm 271/019^c$	$1/0 \pm 211/599^c$
<i>Padina sp.</i>	اتیل‌استاتی	$14/0 \pm 203/611^a$	$8/0 \pm 998/141^a$
	آبی	$0/0 \pm 116/030^d$	-

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین فراکشن‌ها است ($P < 0/05$). علامت «-» نشان دهنده عدم حضور ترکیب در فراکشن است.

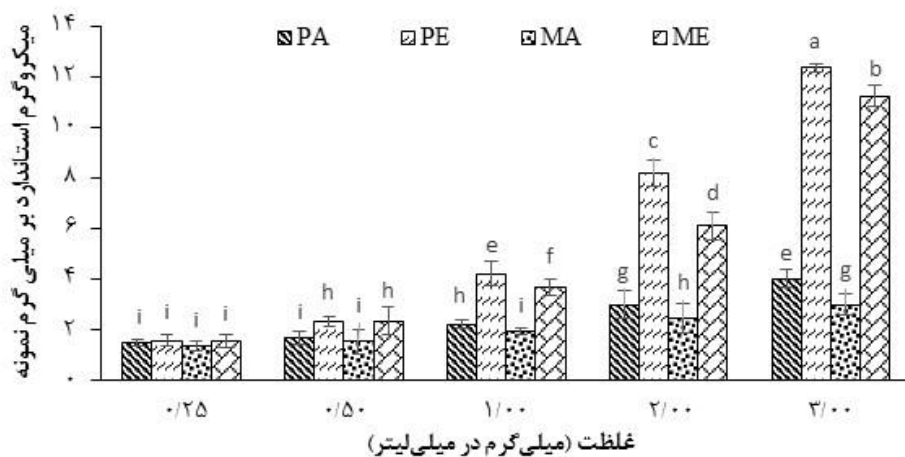


شکل ۲: مقایسه توان احیاکنندگی فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف با آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین فراکشن‌ها است ($P \leq 0/05$). VITC: آسکوربیک اسید؛ ME: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Polycladia myrica*; MA: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica*; PA: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.*; PE: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.*

همان‌طور که از نمودار (شکل ۲) برمی‌آید، *Padina sp.* با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای نیز دارای فعالیت احیاکنندگی قابل توجهی بود.

قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. قابل ذکر است که بین فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.* با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فراکشن آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.* با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و فراکشن آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی به روش آزمون توان آنتی‌اکسیدانی احیای یون فریک نتایج به دست آمده از بررسی توانایی احیای آهن سه ظرفیتی به آهن دو ظرفیتی (FRAP) در فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای، حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری بین فراکشن‌ها و غلظت‌های مختلف مورد آزمایش، وجود دارد ($P \leq 0/05$; شکل ۳). فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.* با غلظت ۳ میلی‌لیتر دارای بیشترین فعالیت احیاکنندگی بود. کمترین میزان فعالیت احیاکنندگی مربوط به فراکشن آبی ماکروجلبک



شکل ۳: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای مورد مطالعه با روش آزمون توان آنتی‌اکسیدانی احیای یون فریک (FRAP) (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری بین فراکشن‌ها است ($P \leq 0/05$). ME: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Polycladia*

MA *myrica*: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica*؛ PA: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای
 PE: *Padina* sp.؛ عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* sp.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله رادیکال آزیانو بیس اتیل تیازولین سولفونیک توان مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS در فراکشن‌های آبی و اتیل‌استاتی دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای به غلظت آن‌ها (۰/۲۵-۳) میلی‌گرم در میلی‌لیتر) وابسته است. شکل ۴ نشان می‌دهد که فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مهار رادیکال آزاد ABTS از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد ضعیف‌تر بودند. مقایسه بین فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای نیز نشان می‌دهد که فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای بیشترین خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS بود. همچنین، شکل ۴ نشان می‌دهد که فراکشن اتیل‌استاتی با غلظت ۳ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و فراکشن آبی با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* sp. و فراکشن آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز دارای خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS قابل ملاحظه‌ای بودند. در حالی که فراکشن آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای کمترین خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS بود.

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH میزان کاهش جذب محلول DPPH فراکشن‌های آبی و اتیل‌استاتی دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای در غلظت‌های مختلف، در شکل ۵ مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، اسید آسکوربیک با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌گرم) دارای بالاترین میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بود. همچنین از بین فراکشن‌های مورد مطالعه، فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای بالاترین میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بود. در حالی که فراکشن آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* sp. با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای پایین‌ترین میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بود. همچنین، فراکشن آبی و اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* sp. با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و

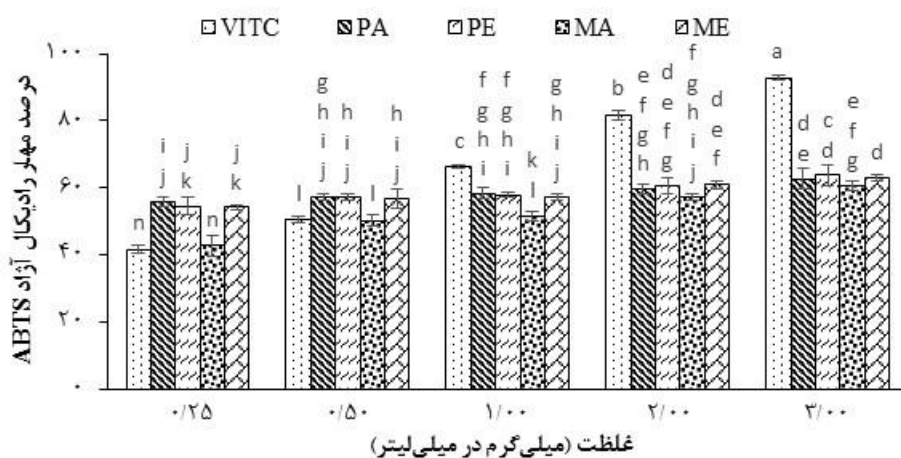
فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای میزان قابل توجهی خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بودند.

فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* و *Padina sp.* در جدول ۳ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.* به ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضدباکتریایی را بر روی باکتری‌های گرم منفی *E. coli* و گرم مثبت *S. aureus* نشان داد.

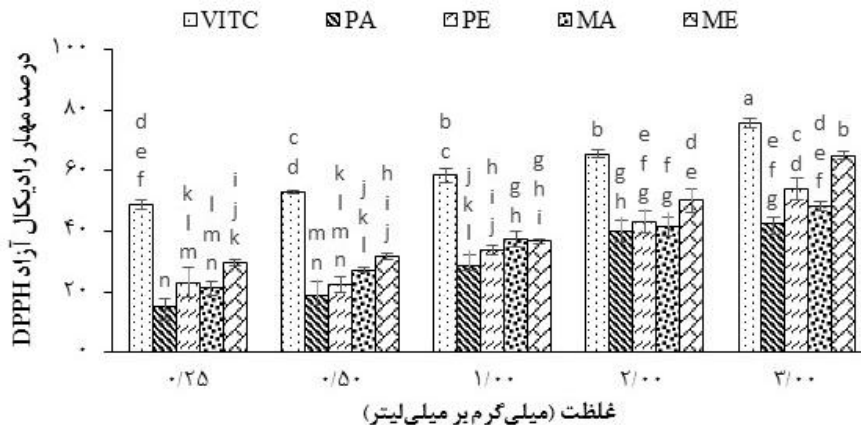
ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با روش انتشار دیسک

نتایج آزمون حساسیت به روش انتشار

دیسک در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر



شکل ۴: مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد ABTS فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف با آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین فراکشن‌ها است ($P \leq 0.05$). VITC: آسکوربیک اسید، ME: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Polycladia myrica*; MA: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica*; PA: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.*; PE: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.*



شکل ۵: مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد DPPH فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف با آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین فراکشن‌ها است ($P \leq 0.05$). VITC: آسکوربیک اسید، ME: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Polycladia myrica*: MA: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica*: PA: عصاره اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.*: PE: عصاره آبی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina sp.*

جدول ۳: مقایسه قطر هاله عدم رشد فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای بر روی باکتری‌های مورد مطالعه (میانگین \pm انحراف معیار)

قطر هاله* (میلی‌متر)				تیماها
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	
-	-	-	-	آبی <i>Polycladia myrica</i>
-	-	-	0.8 ± 0.4	اتیل‌استاتی <i>myrica</i>
-	-	-	-	آبی <i>Padina sp.</i>
8.0 ± 5.3	0.5 ± 1.0	6.0 ± 5.7	0.4 ± 0.9	اتیل‌استاتی
0.5 ± 1.3	0.5 ± 1.2	0.4 ± 1.3	0.5 ± 1.1	آمی سیلین**

(-) : عدم فعالیت؛ ۱۴-۷: فعالیت متوسط؛ >14 : فعالیت بالا (Yousefzadi et al., 2013).

*: قطر هاله عدم رشد شامل قطر دیسک (۶ میلی‌متر) است.

** : آنتی‌بیوتیک آمی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر دیسک مورد آزمایش قرار گرفت.

2003). در این میان ماکروجلبک‌ها یکی از گروه‌های متنوع موجودات زنده با سازگاری‌های بسیار برای زیست در محیط‌های پراسترس دریایی از نظر شوری، دما و نور هستند و از منابع طبیعی واجد پتانسیل اقتصادی به عنوان منابع از آگار، کاراژینان، آلژینات، پروتئین، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین و مواد معدنی شناخته شده‌اند که از اهمیت ویژه‌ای در توسعه صنعت دارویی برخوردار هستند (Holdt and Kraan, 2015; Stengel and Connan, 2011). این موجودات زنده برای حفاظت از خود و سازش در چنین محیط‌هایی انواع بسیار زیادی از ترکیبات زیست‌فعال و متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند (Holdt and Kraan, 2011). تاکنون گزارش‌های متعددی از استخراج ترکیبات زیست‌فعال از ماکروجلبک‌ها با طیف وسیع فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدسرطانی منتشر شده است (Kim et al., 2016; Mashjoor et al., 2011). نتایج این مطالعه نشان داد که فراکشن‌های اتیل‌استاتی هر دو ماکروجلبک مورد مطالعه دارای مقدار بیشتری ترکیبات فنلی و فلوروتانن نسبت به فراکشن‌های آبی بودند. اصولاً با افزایش ترکیبات فنلی ویژگی آنتی‌اکسیدانی

فراکشن آبی ماکروجلبک‌های قهوه‌ای *P. myrica* و *Padina* sp. بر روی باکتری‌های مورد آزمایش هیچ‌گونه خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان نداد. طبق نتایج به دست آمده، فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *P. myrica* تنها بر روی باکتری گرم مثبت *M. luteus* خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان داد. در حالی که فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* sp. بر روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان داد. در کل نتایج نشان داد که ماکروجلبک‌های قهوه‌ای مورد مطالعه دارای فعالیت ضدباکتریایی متوسطی نسبت به آمپی‌سیلین بودند.

بحث

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی فراکشن‌های دو گونه ماکروجلبک قهوه‌ای *Padina* sp. و *Polycladia myrica* خلیج فارس انجام شد. تولیدات طبیعی دریایی، ترکیباتی آلی هستند که توسط اموجودات زنده دریایی مانند میکروب‌ها، اسفنج‌ها، علف‌های دریایی، جلبک‌ها و دیگر موجودات تولید و به سه دسته شامل متابولیت‌های اولیه، ثانویه و مواد پلیمری با وزن مولکولی بالا تقسیم می‌شوند (Hanson, 2011).

فراکشن اتیل استاتی گونه *Padina sp.* دارای بیشترین فعالیت احیاکنندگی آهن (FRAP) و درصد مهار رادیکال آزاد ABTS بود. نتایج مطالعات Ye و همکاران (۲۰۰۹) و Yan و همکاران (۱۹۹۸) با نتایج مطالعه حاضر کاملا همپوشانی دارد. نوع حلال ها با pHهای مختلف، قطبیت، زمان، درجه حرارت و مکانیسم استخراج در میزان ترکیبات شیمیایی با خواص آنتی اکسیدانی و توان مهار رادیکال های آزاد، اثرات قابل توجهی دارد (Yuan and Walsh, 2009; Ye et al., 2006). توان احیاکنندگی آهن در فراکشن ها نشان دهنده این است که فلوروتانن به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانی می تواند نقش الکترون دهنده را ایفا کند و فرآیند اکسیداسیون لیپیدی را به واسطه تولیدات فرعی با توان اکسایشی بالا کاهش دهد. بنابراین این ترکیب نقش مهار کننده اکسیداسیون اولیه و ثانویه را ایفا می کند (Benzie and Szeto, 1999).

DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه های فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد است. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می دهد. رادیکال های

بیشتر می شود. ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالا توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکال های آزاد دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه های آروماتیک دارد (Lagouri and Boskou, 1996).

ترکیبات فنلی به عنوان دهنده الکترون عمل می کنند و می توانند واکنش های ناخواسته ایجاد شده با رادیکال های آزاد را در بدن خنثی کنند (Manian et al., 2008). مقدار و نوع ترکیبات فنلی در جلبک های دریایی به فعالیت آنتی اکسیدانی، حلال و همچنین گونه جلبکی وابسته است که برای عصاره گیری استفاده می شود (Horincar et al., 2011). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که فراکشن هایی که دارای میزان فنل و فلوروتانن بیشتری بودند فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نشان دادند. مطالعات زارعی جلیانی و همکاران (۱۳۹۶) بر روی ماکرو جلبک ها نشان داد عصاره هایی که دارای میزان فنل بیشتری بودند فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نشان دادند.

نتایج مطالعه حاضر ارتباط فعالیت آنتی اکسیدانی را در یک روند وابسته به غلظت نشان داد، همچنین فراکشن اتیل استاتی گونه *P. myrica* دارای بیشترین توان احیاکنندگی (RP) و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بود و

آزاد موجود در DPPH، در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن‌ها با میزان ماده آنتی‌اکسیدان رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده آنتی‌اکسیدان افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف می‌شود و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد میل می‌کند. آزمون آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس و DPPH هر دو رادیکال آزاد سنتزی هستند که کاربرد آن‌ها مشابه است، هر چند که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس را می‌توان در اندازه‌گیری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات قطبی و غیرقطبی استفاده کرد (Arnao, 2000). مطالعه حاضر نشان داد که ماکروجلبک‌های قهوه‌ای دارای پتانسیل بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد هستند. همچنین، Le Lann و همکاران در سال ۲۰۱۶ و Tanniou همکاران در سال ۲۰۱۴ طی آزمایشی مشابه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلوروتانن ماکروجلبک‌های قهوه‌ای *Halidrys siliquosa* و *Sargassum muticum* را مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند که ماکروجلبک‌های قهوه‌ای به دلیل حضور فلوروتانن دارای پتانسیل مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH هستند (Tanniou et al., 2014; Le Lann et al., 2016).

توسعه ایمن و موثر داروهای ضد میکروبی از ۷۰ سال پیش تاکنون رواج یافته است (Franklin and Snow, 2005). اگرچه با استفاده همه‌گیر از آنتی‌بیوتیک‌ها، احتمال مقاومت عوامل بیماری‌زا در مقابل آنتی‌بیوتیک افزایش یافته است (Normark and Normark, 2002). توسعه و رواج استفاده از داروهای مقاوم در مقابل عوامل بیماری‌زای انسانی، اهمیت پژوهش و بررسی در زمینه تولید داروهای ضد میکروبی جدید را از منابع دیگر مانند منابع طبیعی از هر منبعی و یا منابع دریایی بیش از پیش نمایان می‌کند (Blunt et al., 2008).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراکشن اتیل‌استاتی ماکروجلبک‌های *Padina sp.* و *myrica* دارای فعالیت ضدباکتریایی بودند و فراکشن آبی این دو جلبک هیچ فعالیت ضدباکتریایی نشان ندادند. در مطالعه‌ای که بر ماکروجلبک قهوه‌ای *Sargassum muticum* انجام شد، بیشترین خاصیت ضدباکتریایی به فراکشن اتیل‌استاتی نسبت داده شد (Tanniou et al., 2014; Montero et al., 2016). Soleimani و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ فعالیت ضدباکتریایی سه عصاره متانولی، اتیل‌استاتی و آن‌هگزانی ماکروجلبک قهوه‌ای *P.*

ترکیباتی با قطبیت کم و چربی دوست باشند (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰).

به طور کلی، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و فلوروتانن و بهترین فعالیت ضدباکتریایی با آزمون‌های مذکور را ماکروجلبک قهوه‌ای گونه *Padina sp.* و بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را ماکروجلبک قهوه‌ای گونه *P. myrica* داشت. هیچ یک از فراکشن‌های آبی هر دو گونه ماکروجلبکی مورد مطالعه فعالیت ضدباکتریایی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان ندادند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۶۰۰۳۶۳۹ انجام پذیرفت. بدین وسیله نویسندگان از همکاری و مساعدت بی‌دریغ ایشان و تمامی عزیزانی که در مراحل انجام کار ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

myrica را مطالعه کردند که نتایج این مطالعه نشان داد عصاره اتیل‌استاتی این گونه بهترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت.

نسبت مواد فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی در قیاس با فراکشن‌ها با قطبیت بیشتر کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که باکتری گرم منفی در مقابل بیشتر فراکشن‌های جلبکی از خود مقاومت نشان می‌دهد که با مطالعه حاضر تا حدودی همپوشانی داشت. از طرفی مطالعات نشان دادند که باکتری‌های گرم مثبت در مقابل عصاره‌های خام جلبکی حساس تر هستند (Kandhasamy and Arunachalam, 2008). اصلی‌ترین و بیشترین ترکیبات جلبک‌های دریایی را ترکیبات سولفاتی و مواد قندی تشکیل می‌دهند (Al-Amoudi et al., 2009). با توجه به این نتایج اجزای فعال زیستی مورد نظر باید

منابع

- آرمان م.، سلیمانی س.، زارعی ز.، سهرابی پور ج. و اسدزاده م. ۱۳۹۴. ارزیابی اثرات ضدباکتریایی برخی از ماکروجلبک‌های دریایی علیه پاتوژن‌های انسانی. بوم‌شناسی آبزیان، ۵(۲): ۱۳۹-۱۴۴.
- درخشش ب.، یوسفزادی م.، افشارنسب م.، یگانه و.، و دشتیان‌نسب ع. ۱۳۹۰. بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Sargassum* و *Laurencia snyderiae angustifolium* علیه پاتوژن‌های انسانی. فصلنامه طب جنوب، ۱۴(۱): ۱۷-۲۲.
- زارعی جلیانی ز.، مشجور س.، سلیمانی س.، پیریان ک.، صداقت ف. و یوسفزادی م. Science and Technology, 11(11): 419-421.
- Abbas A. and Shameel M. 2013.** Morpho-anatomical studies on the genus *Padina* (Dictyotales, Phaeophycota) from the Coast of Karachi, Pakistan. Pakistan Academy of Sciences, 50: 21-36.
- Basson P. 1979.** Marine algae of the Arabian Gulf coast of Saudi Arabia (first half). *Botanica Marina*, 22(1): 47-64.
- Al-Amoudi O.A., Mutawie H.H., Patel A.V. and Blunden G. 2009.** Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah cornice algae, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16(1): 23-29.
- Basson P.W. 1992.** Checklist of marine algae of the Arabian Gulf. *Journal of the University of Kuwait (Science)*. Kuwait, 19(2): 217-229.
- Arnao M.B. 2000.** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11(11): 419-421.
- Benzie I.F. and Strain J.J. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
۱۳۹۶. فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی عصاره‌های آلی حاصل از سه گونه ماکروجلبک سبز از خانواده Ulvaceae از خلیج فارس. زیست فناوری تربیت مدرس، ۹(۱): ۵۹-۶۷.
- سلیمانی س.، یوسفزادی م.، معین س.، امراللهی بیوکی ن.، کشاورز م. و اصلیان ح. ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای پلی‌فنلی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* خلیج فارس. زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، ۶(۲): ۸۲-۷۱.
- یوسفزادی م. و کوکبی م. ۱۳۹۵. ماکروجلبک‌های دریایی ایران. انتشارات دانشگاه هرمزگان. ۲۶۷ص.

- Benzie I.F. and Szeto Y. 1999.** Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2): 633–636.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H., Northcote P.T. and Prinsep M.R. 2008.** Marine natural products. *Natural Product Reports*, 25(1): 35–94.
- Devi K.P., Suganthy N., Kesika P. and Pandian S.K. 2008.** Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(1): 27–38.
- Franklin T.J. and Snow G.A. 2005.** Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action. Springer Science and Business Media. 175P.
- Gupta S. and Abu-Ghannam N. 2011.** Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(4): 600–609.
- Hanson J.R. 2003.** Natural products: The secondary metabolites. Royal Society of Chemistry, UK. 154P.
- Holdt S.L. and Kraan S. 2011.** Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3): 543–597.
- Horincar V.B., Parfene G. and Bahrim G. 2011.** Evaluation of bioactive compounds in extracts obtained from three Romanian marine algae species. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6): 71–78.
- Kandhasamy M. and Arunachalam K. 2008.** Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology*, 12(7): 23–30.
- Kim S.K., Thomas N.V. and Li X. 2011.** Anticancer compounds from marine macroalgae and their application as medicinal foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 64: 213–224.
- Kohen R. and Nyska A. 2002.** Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6): 620–650.
- Kokabi M. and Yousefzadi M. 2015.** Checklist of the marine macroalgae of Iran. *Botanica Marina*, 58(4): 307–320.
- Kotnala S., Garg A. and Chatterji A. 2009.** Screening for the presence of antimicrobial activity in few Indian seaweeds. *Pertanika*

- Journal of Tropical Agricultural Science, 32(1): 69–75.
- Lagouri V. and Boskou D. 1996.** Nutrient antioxidants in oregano. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 47(6): 493–497.
- Le Lann K., Surget G., Couteau C., Coiffard L., Cerantola S., Gaillard F. and Poupart N. 2016.** Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. Journal of Applied Phycology, 28(6): 3547–3559.
- Lopes G., Sousa C., Silva L.R., Pinto E., Andrade P.B., Bernardo J. and Valentao P. 2012.** Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions? PLOS One, 7(2): 1–9 (e31145).
- Lopez A., Rico M., Rivero A. and De Tangil M.S. 2011.** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry, 125(3): 1104–1109.
- Manian R., Anusuya N., Siddhuraju P. and Manian S. 2008.** The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. Food Chemistry, 107(3): 1000–1007.
- Mashjoor S., Yousefzadi M., Esmaeili M.A. and Rafiee R. 2016.** Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. Cytotechnology, 68(5): 1717–1726.
- Mendiola J., Rodriguez-Meizoso I., Senorans F., Reglero G., Cifuentes A. and Ibanez E. 2008.** Antioxidants in plant foods and microalgae extracted using compressed fluids. Electronic Journal of Environment, Agricultural and Food Chemistry, 7: 3301–3309.
- Montero L., Sanchez-Camargo A. P., Garcia-Canas V., Tanniou A., Stiger-Pouvreau V., Russo M., Rastrelli L., Cifuentes A., Herrero M. and Ibanez E. 2016.** Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. Journal of Chromatography A, 1428(4): 115–125.
- Nagai T. and Yukimoto T. 2003.** Preparation and functional properties of beverages made from

- sea algae. *Food Chemistry*, 81(3): 327–332.
- Normark B.H. and Normark S. 2002.** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2): 91–106.
- Onofrejova L., Vasickova J., Klejduš B., Stratil P., Misurcova L., Kracmar S. and Vacek J. 2010.** Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2): 464–470.
- Ragan M.A. 1986.** Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research*, 4: 177–241.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. 2005.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10): 1231–1237.
- Sohrabipour J. and Rabiei R. 2007.** The checklist of green algae of the Iranian coastal lines of the Persian Gulf and Gulf of Oman. *The Iranian Journal of Botany*, 13(2): 146–149.
- Sohrabipour J., Nejdastari T., Asadi M. and Rabei R. 2004.** The marine algae of the southern coast of Iran, Persian Gulf, Lengeh Area, *The Iranian Journal of Botany*, 10(2): 83–93.
- Soleimani S., Moein S., Yousefzadi M. and Bioki N.A. 2017.** Determination of in vitro antioxidant properties, anti-inflammatory effects and α -amylase inhibition of purple sea urchin extract of *Echinometra mathaei* from the Persian Gulf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(3): 1–7 (e36547).
- Soleimani S., Pirian K., Jeliani Z.Z., Arman M. and Yousefzadi M. 2018.** Bioactivity assessment of selected seaweeds from the Persian Gulf, Iran. *Journal of Aquatic Ecology*, 7(3): 25–38.
- Soleimani S., Yousefzadi M., Rezadoost H. and Bioki N.A. 2016.** Identification and antioxidant of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from sea urchin pigments of *Echinometra mathaei*. *Medicinal Chemistry Research*, 25(7): 1476–1483.
- Souza B.W., Cerqueira M.A., Martins J.T., Quintas M.A., Ferreira A.C., Teixeira J.A. and Vicente A.A. 2011.** Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10): 5589–5594.
- Stengel D.B. and Connan S. 2015.** *Natural Products from Marine Algae, Methods and Protocols*. Humana Press, USA. 435P.

- Stiger-Pouvreau V., Jegou C., Cerantola S., Guerard F. and Le Lann K. 2014.** Phlorotannins in Sargassaceae species from Brittany (France): Interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes. *Advances in Botanical Research*, 71: 379–411.
- Tang S., Kerry J. P., Sheehan D., Buckley D. J. and Morrissey P. A. 2001.** Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, 34(8): 651–657.
- Tanniou A., Vandanon L., Incera M., Leon E.S., Husa V., Le Grand J. and Engelen A. 2014.** Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *Journal of Applied Phycology*, 26(2): 1215–1230.
- Taskin E., Ozturk M. and Kurt O. 2007.** Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 6(24): 2746–2751.
- Wanasundara U.N. and Shahidi F. 1998.** Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3): 335–342.
- Wu S.C., Wang F.J. and Pan C.L. 2010.** The comparison of antioxidative properties of seaweed oligosaccharides fermented by two lactic acid bacteria. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(4): 537–545.
- Yang J.I., Ho H.Y., Chu Y.J. and Chow C.J. 2008.** Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110(1): 128–136.
- Ye H., Zhou C., Sun Y., Zhang X., Liu J., Hu Q. and Zeng X. 2009.** Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. *European Food Research and Technology*, 230(1): 101–109.
- Yousefzadi M., Riahi-Madvar A., Hadian J., Rezaee F., Rafiee R. and Biniiaz M. 2013.** Toxicity of essential oil *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and antimicrobial activity. *Journal of Immunotoxicology*, 16(5): 1–6.
- Yuan Y.V. and Walsh N.A. 2006.** Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7): 1144–1150.



Research Paper

Phlorotannins extracted from brown macroalgae as a new antioxidant source

Sepideh Babaei Mahani Nezhad¹, Morteza Yousefzadi^{2,3*}, Soolmaz Soleimani⁴

Received: January 2019

Accepted: March 2019

Abstract

Industrial usage of different macroalgae has grown exponentially during the last decade. Nutritional applications for human feeding and multiple therapeutic are their main important exploitation. This study aimed to investigate the biological activities of the organic, water and ethyl acetate fractions of two brown algae *Polycladia myrica* and *Padina* sp., collected from the coast of Qeshm Island. In this experimental study, for identification of the superior species, the tested biological activities included antioxidant assay at gradient concentrations by ferric reducing power assay, FRAP, inhibition free radicals DPPH and ABTS, total phenolic and phlorotannins content, and antibacterial assay by disk diffusion. The more effective algal fractions by maximum antioxidant capacity in all tested methods were recorded for ethyl acetate fractions in both macroalgae. Only ethyl acetate fraction of *Padina* sp. had an antibacterial effect on all studied strains. Both brown algae, *Polycladia myrica* and *Padina* sp., had antioxidant and antibacterial activities, but *Padina* sp. due to the high amount of phenol and phlorotannins and high antioxidant and antibacterial power can be introduced as a priority species for biological properties.

Key words: *Phlorotannins, Antioxidant, Antibacterial, Brown Macroalgae.*

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran.

4- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: morteza110110@gmail.com