مقاله علمی – پژوهشی:

خواص آنتی‌اکسیدانی و میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در عصاره‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای

سلیم شریفیان*[۱]، بهاره شعبان‌پور[۲]

*sharifian.salim@hotmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۲- گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۹

چکیده

در مطالعه حاضر میزان فلوروتانین، خواص آنتی‌اکسیدانی (بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاء یون آهن) و میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در عصاره‌های مختلف (اولیه و اتیل استاتی) استخراج شده با حلال‌های متانول ۱۰۰٪ و ۷۰٪ از جلبک‌های قهوه‌ای *Nizimuddinia zanardinii*، *Sargassum ilicifolium*، *Sargassum cristaefolium* و *Stoechospermum marginatum* مورد بررسی قرار گرفت. در میان گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای بالاترین میزان فلوروتانین (۱۳/۲۱ میلی‌گرم فلوروگلوسینول/ گرم)، بازدارندگی DPPH (۷۲/۶۴ ٪) و قدرت احیاء یون آهن (۰/۹۶) در عصاره اتیل‌استاتی جلبک *N. zanardinii* با حلال متانول ۱۰۰٪ وجود داشت. با استفاده از TLC، در عصاره اتیل استاتی جلبک ترکیبات فلوروتانینی شامل فلوروگلوسینول، اِکول، دی‌اِکول و بی‌اِکول شناسایی گردید. نتایج نشان داد که میزان فلوروتانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلف بسته به نوع جلبک، نوع عصاره و نوع حلال استخراجی متفاوت می‌باشد. میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز میگوی وانامی در میان عصاره‌ها و گونه‌های مختلف جلبک، متفاوت بود و بالاترین میزان بازدارندگی (۷۱/۱۱ ٪) در عصاره اتیل‌استاتی جلبک *N. zanardinii* اندازه‌گیری گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های جلبکی با میزان فلوروتانین بالا دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند و می‌توانند به عنوان بازدارنده‌های طبیعی و سالم آنزیم پلی‌فنول اکسیداز مطرح باشند.

لغات کلیدی: جلبک قهوه‌ای، خواص آنتی‌اکسیدانی، بازدارندگی آنزیم پلی فنول اکسیداز، میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

مقدمه

آبزیان از تولیدات اقتصادی مهم بسیاری از کشورها از جمله ایران می‌باشند. میگو از جمله آبزیانی است که ارزش تغذیه‌ای زیادی دارد. این آبزی منبع خوبی از پروتئین، اسیدهای چرب غیراشباع، آهن، سلنیوم، ویتامین B_{12} و D است و در عین حال مقدار کالری اندکی دارد. با این وجود، این محصول پس از برداشت به‌شدت در معرض ملانوزیس قرار دارد و به‌سرعت فاسد می‌شود. ملانوزیس در میگو در اثر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز می‌باشد. این آنزیم عمدتاً در کاراپاس سفالوتوراکس میگو وجود دارد و فعال شدن آن پس از مرگ منجر به تشکیل رنگدانه تیره رنگ و نامحلول در آب ملانین و بروز ملانوزیس (لکه های سیاه) در میگو می‌شود. این لکه‌های سیاه تغییری در طعم میگو ایجاد نمی‌کنند و هیچ گزارشی مبتنی بر بیماری‌زا بودن آنها وجود ندارد، اما به دلیل ایجاد تغییرات رنگی نامطلوب سطحی، مشتری‌پسندی محصول را کاهش می‌دهند (Nirmal and Benjakul, 2009a).

ماکروجلبک‌های دریایی معمولاً بر اساس رنگدانه‌های موجود در آنها به سه گروه جلبک‌های قهوه‌ای[1]، قرمز[2] و سبز[3] طبقه‌بندی می‌گردند. جلبک‌های قهوه‌ای تقریباً به طور کامل در تمام زیستگاه‌های دریایی یافت می‌شوند. این جلبک‌ها غنی از ویتامین، مواد معدنی و پروتئین هستند. علاوه بر این ترکیبات، تحقیقات نشان داده است که جلبک‌ها قادر به تولید نوعی از متابولیت‌های ثانویه با نام فلوروتانین‌ها هستند که در گیاهان خشکی یافت نمی‌شود. این ترکیبات زیستی فعال دارای خواص دارویی، بهداشتی و غذایی می‌باشند. تحقیقات متعددی بر جلبک‌های دریایی قهوه‌ای به‌واسطه دارا بودن ترکیبات زیست فعال سودمند برای سلامتی انسان از قبیل فلوروتانین‌ها و پلی ساکاریدهایی از قبیل اسید گالیک، فوکوئیدان، پیروفئوفیتین، تری پپتیدها و ... انجام شده است (Kang *et al.*, 2004). فنول‌ها ترکیباتی با حلقه آروماتیک دارای یک یا چند استخلاف هیدروکسیل (OH-) و شامل فنول‌های ساده، کومارین، فلاوونید، تانن‌های قابل هیدرولیز و غیر قابل هیدرولیز (متراکم) و فلوروتانین‌ها می باشد. فنول‌ها نقش اصلی به عنوان اجزاء ساختاری دیواره سلول بازی می‌کنند و ممکن است نقش ثانویه در ارسال سیگنال‌های دفاعی یا در پاسخ به استرس‌های محیطی داشته باشند. فلوروتانین‌ها در بسیاری از جلبک‌های قهوه‌ای به طریق متابولیسم ثانویه تولید می‌گردد. اما تاکنون در گیاهان خشکی‌زی یافت نشده است (Kang *et al.*, 2004).

طی سال‌های گذشته به شکل گسترده از ترکیبات سولفیتی، به‌ویژه متا بی سولفیت سدیم به عنوان مهارکننده‌های ملانوزیس استفاده شده است. به رغم قابلیت زیاد این ترکیبات در کنترل لکه سیاه میگو، تشدید بروز حساسیت و ایجاد مشکل در افراد مبتلا به آسم منجر به ایجاد محدودیت در استفاده آنها در بسیاری از کشورها شده است (Nirmal and Benjakul, 2009a). در نتیجه، یافتن جایگزین‌های طبیعی و مؤثر برای این ترکیبات ضروری است و همواره از دغدغه‌های محققین صنایع غذایی بوده است. امروزه خاصیت مهارکنندگی آنزیم پلی فنول اکسیداز در بسیاری از ترکیبات فنولی طبیعی همچون کاتکین، فرولیک اسید، عصاره چای سبز و چای مالبری، عصاره رزماری، عصاره هسته انگور و اسانس آویشن شیرازی به اثبات رسیده است (نصیری و همکاران، ۱۳۹۳؛ Nirmal and Benjakul, 2009a, b; Zakipour Rahimabadi *et al.*, 2016). با این وجود، تاکنون تحقیقات اندکی در زمینه استخراج ترکیبات طبیعی با قابلیت بازدارندگی آنزیمی به‌خصوص در زمینه آبزیان انجام شده است. از این‌رو، هدف تحقیق حاضر اندازه‌گیری و استخراج ترکیبات فلوروتانین از جلبک‌های قهوه‌ای و پتانسیل استفاده از آنها به عنوان بازدارنده‌های طبیعی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز بوده است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری جلبک و عصاره‌گیری

گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای از محدوده جزر و مدی ساحل چابهار در فصل زمستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌های جلبک در آزمایشگاه،

[1] Phaeophycea
[2] Rhodophyceae
[3] Chlorophyceae

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

تعیین گونه شده و سپس در سایه خشک گردیدند. گونه‌های جمع‌آوری شده شامل *Nizimuddinia zanardinii*، *Sargassum ilicifolium*، *Sargassum cristaefolium* و *Stoechospermum marginatum* بودند. جلبک‌های خشک شده با استفاده خردکن خانگی تا حد ممکن پودر و تا هنگام عصاره‌گیری در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار در فریزر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. عصاره‌گیری از جلبک‌ها با حلال‌های متانول ۱۰۰٪ و متانول ۷۰٪ (با آب) انجام شد. ۱۰۰گرم پودر جلبک با نسبت ۱ به ۴ (وزنی/حجمی) با حلال مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی به‌هم زده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. عصاره به‌دست آمده از این مرحله "عصاره اولیه" نامیده شد. در ادامه، عصاره اولیه به‌ترتیب با حلال کلروفرم و اتیل استات با نسبت ۱ به ۲ (حجمی/ حجمی) شستشو داده شد. محلول حاصل از شستشوی عصاره اولیه با اتیل‌استات، پس از جداسازی و جمع‌آوری به عنوان "عصاره اتیل‌استاتی" در نظر گرفته شد (Liu, 2015).

استخراج و شناسایی ترکیبات فلوروتانین

ترکیبات فلوروتانین عصاره اتیل‌استاتی به‌دست آمده از جلبک *N. zanardinii* در ابتدا با استفاده از ستون سیلیکاژل خالص‌سازی و سپس روی کاغذهای TLC بارگذاری گردیدند. ۱۰۰ گرم سیلیکا با متانول مخلوط و به دقت وارد ستون شیشه‌ای (۲/۵ cm×۶۰) گردید. ۵ گرم عصاره روی ستون بارگذاری و شستشو با اِن-هگزان ۱۰۰٪ و در ادامه با نسبت‌های مختلف اتیل‌استات/متانول (۱۰:۰، ۹:۱، ۸:۲، ۷:۳، ۶:۴، ۵:۵، ۴:۶، ۳:۷، ۲:۸، ۱:۹ و ۰:۱۰) انجام گرفت. پس از جمع‌آوری فراکشن‌ها، برای شناسایی ترکیبات مشابه در هر فراکشن از TLC (60F254, Merck Co, Germany) بر اساس روش توسعه داده شده Nakamura و همکاران (۱۹۹۶) استفاده گردید. آشکارسازی لکه‌ها با استفاده از کابینت UV و زیر نور ماوراء بنفش انجام گرفت.

سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی

میزان فلوروتانین بر اساس استاندارد فلوروگلوسینول (Phloroglucinol, PHG) و با استفاده از شناساگر فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) به روش Chakraborty و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید. سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاء یون آهن (Fe^{+3}) بر اساس روش Taheri (۲۰۱۶) انجام گرفت.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز

سفالوتراکس ۲۰ عدد میگوی تازه به صورت دستی از بدن میگو جدا و همراه با نیتروژن مایع در خردکن تجاری وارینگ (Waring Co., USA) پودر گردید. به مخلوط حاصله، ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج کننده (بافر فسفات سدیم، pH ۲/۷، محتوی NaCl ۱ M و ۰/۲٪ بریج-۳۵). اضافه و در ادامه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا و پس از اشباع نمودن با سولفات آمونیوم وارد کیسه دیالیز شد. پس از دیالیز و سانتریفیوژ، فاز شفاف بالایی به عنوان عصاره آنزیم پلی‌فنول اکسیداز جمع‌آوری گردید. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از روش Nirmal و Benjakul (۲۰۰۹ الف) به صورت رنگ‌سنجی پیوسته با استفاده از ترکیب L-DOPA[1] به عنوان سوبسترا با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت. برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و برای بررسی همگنی از آزمون Leven استفاده شد. برای بررسی اثرهای معنی‌دار شاخص بین گونه‌ها از آنالیز چند متغیره و مقایسه میانگین داده‌ها و آزمون دانکن (در سطح ۵ درصد) از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۷) استفاده شد.

نتایج

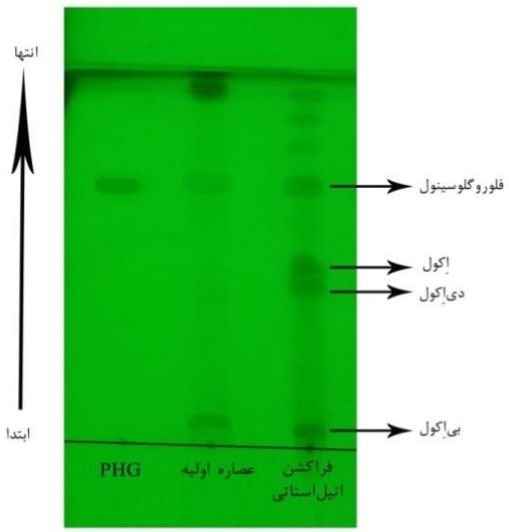
میزان فلوروتانین استخراج شده توسط حلال‌های متانول ۱۰۰٪ و ۷۰٪ در عصاره‌های اولیه و اتیل استاتی

[1] L-3, 4-dihydroxylphenyl alanine (L-DOPA)

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

جلبک‌های قهوه‌ای *S. marginatum*، *S. illicifolium*، *S. cristaefolium* و *N. zanardinii* در شکل ۱ نشان داده شده است. بالاترین میزان فلوروتانین (میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره، mg PHG/g) در میان تیمارهای مختلف در عصاره اتیل استاتی جلبک *N. zanardinii* به میزان ۱۳/۲۱ mg PHG/g وجود داشت. در مقایسه گونه‌های مختلف جلبکی، در هر دو تیمار متانول ۱۰۰٪ و ۷۰٪، میزان فلوروتانین در *N. zanardinii* به طور معنی‌داری نسبت به سایر گونه‌ها بالاتر بود ($p<0/05$). در مقایسه دو حلال متانول ۱۰۰٪ و ۷۰٪، در تمامی موارد، به‌جز عصاره اتیل استاتی جلبک‌های *S. marginatum* و *S. illicifolium*، میزان فلوروتانین در حلال متانول ۱۰۰٪ نسبت به ۷۰٪ بالاتر بود ($p<0/05$). در هر دو حلال، در تمامی جلبک‌ها میزان فلوروتانین‌ها در عصاره‌های اتیل‌استاتی نسبت به عصاره‌های اولیه بالاتر بود ($p<0/05$).



شکل ۱: ترکیبات فلوروتانین‌های مختلف موجود در فراکشن اتیل‌استاتی جلبک *N. zanardinii* (PHG: فلوروگلوسینول)

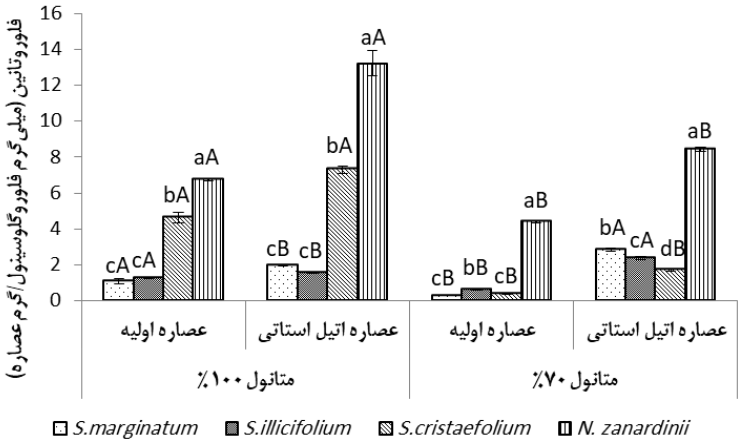
Figure 1: The various phlorotannins compounds present in the ethyl-acetate fraction of *N. zanardinii* (PHG: Phloroglucinol)

ترکیبات فلوروتانین‌های موجود در عصاره اتیل‌استاتی و عصاره اولیه تیمار متانول ۱۰۰٪ جلبک *N. zanardinii* در شکل ۲ نشان داده شده است. ترکیبات جداسازی شده از این جلبک شامل فلوروگلوسینول، اِکول، دی‌اِکول و بی‌اِکول بود.

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های متفاوت گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای سواحل چابهار در شکل ۳ نشان داده شده است. بالاترین میزان مهار DPPH به میزان ۷۲/۶۴٪ در عصاره اتیل استاتی به‌دست آمده از حلال متانول ۱۰۰٪ در جلبک *N. zanardinii* وجود داشت. از نظر نوع حلال، در بیش‌تر موارد (به‌جز عصاره اتیل استاتی جلبک‌های *S. marginatum* و *S. illicifolium*) میزان مهار رادیکال آزاد در عصاره‌های حلال ۱۰۰٪ نسبت به ۷۰٪ به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<0/05$). در مقایسه گونه‌های مختلف جلبکی، توانایی مهار DPPH تقریباً در تمامی موارد (به‌جز عصاره اولیه متانول ۱۰۰٪) در *N. zanardinii* نسبت به سایر گونه‌ها به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<0/05$). در مقایسه دو عصاره اولیه و اتیل‌استاتی، در تمامی گونه‌ها میزان بالاتری از مهار در عصاره اتیل استاتی نسبت به عصاره اولیه مشاهده گردید.

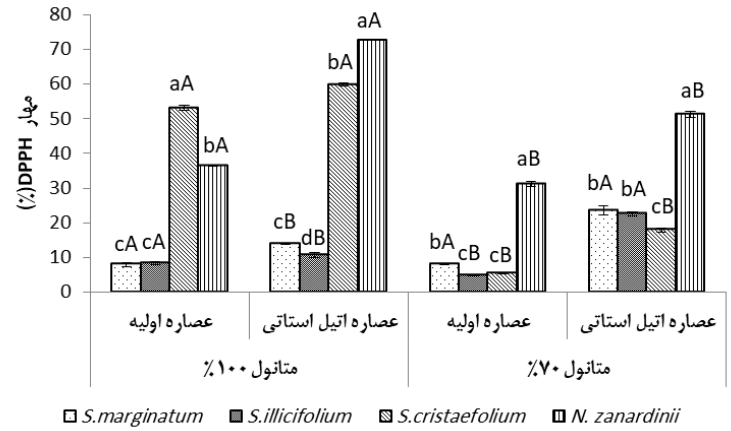
[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]



شکل ۲: میزان فلوروتانین در عصاره‌های اولیه و اتیل‌استاتی جلبک‌های قهوه‌ای (حروف متفاوت انگلیسی کوچک بیانگر تفاوت معنی‌دار شاخص بین گونه‌های مختلف جلبکی می‌باشد. حروف متفاوت انگلیسی بزرگ بیانگر تفاوت معنی‌دار شاخص در هر عصاره بین دو نوع حلال متانول ۱۰۰٪ و ۷۰٪ می‌باشد)

Figure 2: Phlorotannins content of first and ethyl-acetate extracts of brown seaweeds (Different small English letters show significant difference of index between various seaweeds. Different large English letters shows significant difference of index between two solvents i.e. methanol 100% and 70%)



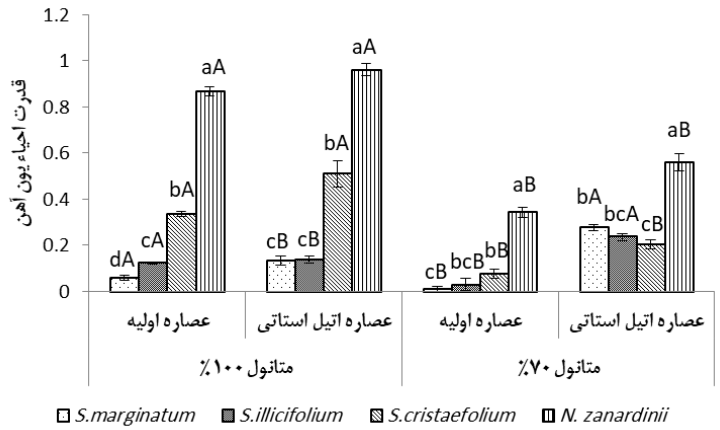
شکل ۳: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های اولیه و اتیل استاتی (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) جلبک‌های قهوه‌ای (توضیحات حروف معنی‌داری در شکل ۱ ذکر شده است)

Figure 3: DPPH free-radical scavenging of first and ethyl-acetate extracts (1 mg/ ml) of brown seaweeds (more explanation about significant letters are listed in the caption of Figure 1)

میزان قدرت احیاء یون آهن در عصاره‌های اولیه و اتیل استاتی جلبک‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. بالاترین میزان احیاء در عصاره اتیل استاتی حلال متانول ۱۰۰٪ جلبک *N. zanardinii* و برابر با ۰/۹۶ بود. در مقایسه گونه‌های مختلف جلبکی در بیش‌تر موارد میزان قدرت احیاء به صورت *N. zanardinii* > *S. cristaefolium* > *S. illicifolium* > *S. marginatum* بود. در مقایسه دو حلال، در تمامی موارد به‌جز عصاره اتیل استاتی *S. marginatum* و *S. illicifolium* میزان احیاء در متانول ۱۰۰٪ نسبت به متانول ۷۰٪ بالاتر بود. مقایسه عصاره‌های نشان داد که در تمامی موارد قدرت احیاء در عصاره‌های اتیل استاتی نسبت به عصاره اولیه به طور معنی‌داری بالاتر بوده است ($p<0/05$).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

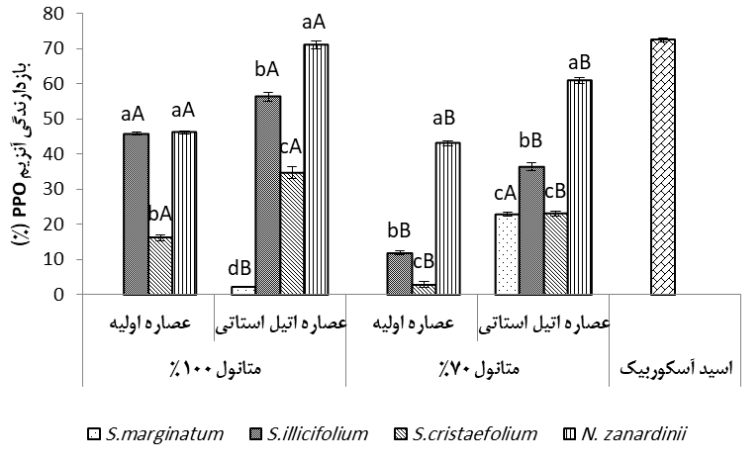
[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]



شکل ۴: میزان قدرت احیاء یون آهن (جذب در ۷۰۰ نانومتر) در عصاره‌های اولیه و اتیل استاتی (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) جلبک‌های قهوه‌ای (توضیحات در شکل ۱ ذکر شده است)

Figure 4: Ferric reducing power (Abs at 700 nm) of first and ethyl-acetate extracts (1 mg/ml) of brown seaweeds (more explanation about significant letters are listed in the caption of Figure 1)

تأثیر عصاره‌های مختلف به‌دست آمده از جلبک‌های قهوه‌ای در بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز استخراجی از میگوی وانامی در شکل ۵ نشان داده شده است. بالاترین میزان بازدارندگی در عصاره اتیل استاتی حلال متانول ۱۰۰٪ جلبک *N. zanardinii* و برابر با ۷۱/۱۱٪ به‌دست آمد که قابل مقایسه با اسید آسکوربیک با بازدارندگی برابر با ۷۲/۵۴ بود. در مقایسه دو حلال، در تمامی موارد به‌جز عصاره اتیل استاتی جلبک *S. marginatum*، میزان بازدارندگی آنزیمی در تمامی گونه‌های جلبکی در عصاره‌های حلال متانول ۱۰۰٪ به طور معنی‌داری نسبت به متانول ۷۰٪ بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). در مقایسه گونه‌های مختلف جلبکی، میزان بازدارندگی در تمامی موارد به صورت *N. zanardinii* > *S. illicifolium* > *S. cristaefolium* > *S. marginatum* بود. در مقایسه دو عصاره، در تمامی جلبک‌ها میزان بازدارندگی در عصاره اتیل‌استاتی نسبت عصاره اولیه به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$).



شکل ۵: میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در عصاره‌های اولیه و اتیل استاتی (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) جلبک‌های قهوه‌ای (توضیحات معنی‌داری در شکل ۱ ذکر شده است)

Figure 5: Polyphenol oxidase inhibition of first and ethyl-acetate extracts of brown seaweeds (more explanation about significant letters are listed in the caption of Figure 1)

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

بحث

میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی به میزان زیادی در ارتباط با روش استخراج می‌باشد. به طور مرسوم از حلال‌های آلی متانول یا اتانول برای استخراج پلی‌فنول‌ها در جلبک‌های دریایی استفاده می‌گردد، زیرا کارایی بهتری نسبت به آب در استخراج ترکیبات فنولی، به ویژه فلوروتانین‌ها دارند (Shibata *et al*., 2008). مقایسه میزان فنول استخراج شده در ۴ گونه جلبکی با استفاده از دو حلال متانول ۱۰۰٪ و متانول ۷۰٪ در مطالعه حاضر نشان داد که متانول ۱۰۰٪ کارایی بالاتری در استخراج این گروه از ترکیبات در مقایسه با ترکیب متانول و آب داشته است (شکل ۱). از آن‌جایی‌که فلوروتانین‌ها بخش اعظمی از ترکیبات فنولی موجود در جلبک‌های قهوه‌ای را تشکیل می‌دهند، به‌نظر می‌رسد که دلیل کارایی بالاتر متانول ۱۰۰٪، نیز قابلیت بالای حل شدن فلوروتانین‌ها در این حلال در مقایسه با سایر حلال‌ها باشد. Cho و همکاران (۲۰۰۷) در مقایسه کارایی حلال‌های اتانول، آب و کلروفرم در استخراج ترکیبات فنولی از جلبک قهوه‌ای *Sargassum siliquastrum* ذکر نمودند که میزان فنول در عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی و کلروفرمی به طور معنی‌داری بالاتر بوده است. به طور کلی، هنگام استفاده از حلال‌های غیرقطبی، ترکیبات فنولی، ترپنوئیدها و آلکالوئیدهایی که قطبیت پایینی دارند، استخراج می‌گردد در حالی‌که در حلال‌های قطبی، بیش‌تر ترکیبات قطبی متصل به قندها یا پروتئین‌ها، گلیکوزیدها، تانن‌ها و نمک‌ها در عصاره می‌آید (Cho *et al*., 2007). در مطالعه حاضر میزان فلوروتانین در فراکشن اتیل استاتی در تمامی جلبک‌ها در مقایسه با عصاره اولیه به طور معنی‌داری بالاتر بود. معمولاً فلورتانین‌ها را می‌توان با متانول، آب یا اتانول و در ادامه با هگزان، کلروفرم، بوتانول، اتیل استات یا استون از پودر جلبکی استخراج نمود. فراکشن اتیل استات و استون محتوی فلورتانین و سایر فراکشن‌ها برای حذف ترکیبات غیرفنولیک می‌باشد (Liu, 2015). Shibata و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که ۸۲٪ از عصاره خام فنولی موجود در فراکشن با میزان فنول کل بالا، فلوروتانین‌ها هستند.

نتایج پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که میزان فنل کل در فراکشن‌های مختلف با افزایش قطبیت حلال، افزایش می‌یابد (Chakraborty *et al*., 2013; Taheri, 2016) و عموماً فراکشن اتیل استاتی دارای میزان فلوروتانین بالاتری نسبت به دیگر فراکشن‌ها در بیش‌تر جلبک‌های قهوه‌ای می‌باشد (Chakraborty *et al*., 2013).

مقایسه میزان فلوروتانین در گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای در این مطالعه نشان داد که بین گونه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین بالاترین میزان فلوروتانین در جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* (۱۳/۲۱ میلی‌گرم فلوروگلوسینول در گرم عصاره) وجود داشت. Taheri (۲۰۱۶) میزان فنول کل در عصاره اولیه متانولی این جلبک را ۲/۱۴ (میلی گرم/ گرم عصاره) اندازه گیری نمود که پایین‌تر از عصاره اولیه در تیمار متانولی مطالعه حاضر (۶/۷۵ میلی گرم/ گرم عصاره) می‌باشد. مقایسه میزان فنل کل در عصاره‌های جلبکی مشابه بین مطالعات مختلف، به دلیل تفاوت در فاکتورهای متغیر استخراج عصاره، سنجش آن و تنوع بیولوژیک، حتی در گونه‌های مشابه مشکل است، زیرا متغیرهای فرایند استخراج از قبیل نوع حلال و قطبیت آن، درجه حرارت و زمان استخراج، نسبت نمونه به حلال و خصوصیات فیزیکی و شیمایی نمونه‌ها، بر میزان استخراج فلوروتانین و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره تأثیرگذار است. از سوی دیگر، چنین تفاوت‌هایی ممکن است به دلایل فصول، تیمار، فاکتورهای محیطی یا ژنتیکی نیز باشد (Taheri, 2016).

در مطالعه حاضر، بررسی لکه‌های عصاره‌های اتیل استاتی روی کاغذ TLC و مقایسه آن با ترکیب استاندارد (فلوروگلوسینول) نشان داد که عصاره فلوروتانینی جلبک *N. zanardinii* عمدتاً از فلوروگلوسینول، اِکول، دی‌اِکول و بی‌اِکول تشکیل شده است. با توجه به اطلاع مؤلفین و جستجو در مقالات منتشره، در هیچ پژوهشی تاکنون ترکیبات فلوروتانین‌های جلبک *N. zanardinii* شناسایی نشده است و داده حاضر اولین گزارش از نوع ترکیبات فلوروتانین در این جلبک می‌باشد. با این وجود در دهه اخیر انواع مختلفی از فلوروتانین در گونه‌های متفاوتی از

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

جلبک قهوه‌ای استخراج و مورد بررسی قرار گرفته است. Shibata و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فلوروگلوسینول، اِکول، فلوروفوکوفوراِکول اِی، دی‌اِکول و ۸، ۸- بی‌اِکول را از عصاره اتیل‌استاتی جلبک قهوه‌ای *Ecklonia cava* جداسازی نمودند. Nakamura و همکاران (۱۹۹۶) فراکشن پلی‌فنولی جلبک قهوه‌ای *Eisenia bicyclis* را خالص‌سازی و ترکیبات فلوروتانینی از قبیل فلوروگلوسینول و پلیمرهای آن شامل اِکول، فلوروفوکوفوراِکول اِی، دی‌اِکول و ۸، ۸- بی‌اِکول را استخراج و شناسایی کردند. Kang و همکاران (۲۰۰۴) عصاره اتیل استاتی به‌دست آمده از جلبک قهوه‌ای *Ecklonia stolonifera* خالص‌سازی شده و ترکیبات فلوروگلوسینول، اِکول، فلوروفوکوفوراِکول اِی، دی‌اِکول و اِک‌اِستولونول با استفاده از TLC شناسایی گردید. نوع و میزان فلوروتانین موجود در هر جلبک قهوه‌ای با توجه به نوع گونه، زیستگاه، بلوغ، شرایط استخراج، روش‌های شناسایی و سایر فاکتورها می‌تواند متغیر باشد (Kang *et al*., 2004; Chowdhury *et al*., 2014).

سنجش میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از پرکاربردترین روش‌های اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ترکیبات فنولی و ترکیبات آروماتیک آمینی می‌باشد (Cho *et al*., 2007). در مطالعه حاضر، بالاترین میزان تغییر رنگ یا خاصیت آنتی‌اکسیدانی (۷۲/۶۴٪) در عصاره‌های اتیل استاتی تیمار متانول ۱۰۰٪ جلبک *N. zanardinii* مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین فراکشن‌های اتیل استات در این تمامی گونه‌ها در مقایسه با عصاره‌های اولیه میزان بالاتری را از مهار رادیکال آزاد DPPH نشان دادند. از سوی دیگر، فراکشن‌های اتیل استاتی دارای میزان بالاتری از فنول نیز بودند. از اینرو، به‌نظر می‌رسد که جذب رادیکال آزاد به دلیل وجود فنول‌ها بوده است. Wang و همکاران (۲۰۰۹) نیز ارتباط مشابهی بین میزان بالای فلوروتانین‌ها و میزان باردارندگی در فراکشن‌های اتیل استاتی گزارش نمودند. ترکیبات فنولی دارای گروه‌های هیدورکسیل هستند که با اتصالی ضعیف به حلقه‌های آروماتیک فنول متصل می‌باشد. از این‌رو، به‌راحتی می‌توانند یک اتم هیدروژن یا الکترون را برای غیرفعال سازی رادیکال‌های آزاد به اشتراک بگذارند (Liu, 2015). در مقایسه حلال‌های مختلف در این پژوهش، نتایج نشان داد که حلال‌های آلی به‌تنهایی کارایی بهتری در جذب مهار رادیکال آزاد در مقایسه با حلال در ترکیب با آب دارند. نتایج سایر محققین نیز نشان می‌دهد که تغییر در قطبیت حلال، کارایی آن را در استخراج گروه خاصی از ترکیبات آنتی اکسیدانی کاهش می‌دهد و بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره تأثیر می‌گذارد (Zhou and Yu, 2004).

احیاء آهن (III) اغلب به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی به‌کار می‌رود. این مسئله مکانیسم مهمی را در فرایند اکسیداسیون ترکیب‌های فنولی تشکیل می‌دهد (Ganesan *et al*., 2008). در مطالعه حاضر، بالاترین قدرت احیاء کنندگی در عصاره‌های اتیل استاتی تیمار متانول ۱۰۰٪ جلبک *N. zanardinii* مشاهده گردید که منطبق با میزان فلوروتانین در این گونه بود. نتایج این مطالعه با نتایج Wang و همکاران (۲۰۰۹) قابل مقایسه است که میزان بالایی قدرت احیاء کنندگی (معادل اسید آسکوربیک ۴۲۶ mg/g) در فراکشن اتیل استاتی جلبک *Rhodomela confervoides* را در مقایسه با سایر فراکشن‌های عصاره گزارش نمودند. Chakraborty و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که قدرت احیاء عصاره اتیل استاتی در جلبک‌های قرمز نسبت به عصاره‌های ان-هگزانی و دی‌کلرومتانی بالاتر بوده است. توانایی احیاء یک عصاره به میزان زیادی ناشی از وجود احیاء کننده‌ها در آن می‌باشد. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد که بالاتر بودن قابلیت احیاء در فراکشن اتیل استاتی نسبت به عصاره اولیه به دلیل وجود مقادیر بالاتر ترکیبات فنولی در این فراکشن بوده است (Ganesan *et al*., 2008). ارتباط خطی بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از عصاره‌های جلبکی به اثبات رسیده است (Wang *et al*., 2009; Taheri, 2016).

نتایج میزان بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در عصاره‌های اولیه و اتیل استاتی جلبک‌های قهوه‌ای نشان داد که بالاترین میزان بازدارندگی در عصاره فراکشن اتیل‌استاتی جلبک *N. zanardinii* وجود داشته است. تطابق شکل ۵ (میزان بازدارندگی آنزیم PPO) با

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

شکل‌های ۱، ۳ و ۴ (میزان فلوروتانین و خاصیت آنتی‌اکسیدانی) نشان داد که در فراکشن اتیل‌استاتی *N. zanardinii* که میزان بالاتری از فلوروتانین و مهار رادیکال DPPH وجود داشته است، میزان بازدارندگی آنزیمی نیز بالاتر بوده است. به عبارت دیگر، بین میزان بازدارندگی آنزیمی با میزان فلوروتانین و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها رابطه‌ای خطی وجود دارد. این نتیجه‌گیری با پژوهش Kang و همکاران (۲۰۰۴) در تطابق است که عصاره‌های ۱۷ گونه مختلف جلبک را بررسی نمودند و نشان دادند که فلوروتانین‌های جداسازی شده از جلبک قهوه‌ای *Ecklonia stolonifera* دارای توانایی مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز قارچ با استفاده از سوبسترای اِل-تیروزین می‌باشند. آنها نتیجه‌گیری نمودند که برخی از مشتقات فلوروتانین از قبیل اِکول و دی‌اِکول بازدارنده‌های غیر رقابتی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز هستند در حالی‌که سایر فلوروتانین‌ها مانند فلوروگلوسینول و اِک‌اِستولونول[1] بازدارنده‌های رقابتی می‌باشند. Cha و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت بازدارندگی آنزیم تیروزیناز با استفاده از عصاره‌های ۴۳ گونه مختلف از جلبک‌های دریایی، نشان دادند که عصاره آبی جلبک *Ecklonia cava* و *Sargassum silquastrum* دارای بالاترین میزان بازدارندگی و قابل مقایسه با کوجیک اسید می‌باشند. آنها نتیجه‌گیری نمودند که میزان بالای بازدارندگی در این دو گونه جلبک احتمالاً به دلیل وجود میزان بالای ترکیبات پیچیده پلی‌فنولی در آنهاست. Li و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند که عصاره پلی‌فنولی به‌دست آمده از جلبک *Porphyra yezoensis* توانایی مهار آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در میگوی وانامی را طی نگهداری در یخچال دارد. پژوهش‌ها نشان داده است که وجود استخلاف رزورسینول در ساختار مولکولی ترکیب بازدارنده، یکی از پیش شرط‌های اصلی در مکانیسم بازدارندگی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز می‌باشد (Loizzo *et al.*, 2012). از سوی دیگر، اغلب فلوروتانین‌های جداسازی شده از جلبک‌های قهوه‌ای دارای استخلاف‌های متعدد رزورسینول در ساختار خود می‌باشند (Shibata *et al.*, 2008). از این‌رو، دلیل بازدارندگی آنزیمی ترکیبات فلوروتانینی می‌تواند وجود استخلاف‌های رزورسینول در ساختار آنهاست. به‌علاوه، نتایج بخش قبلی مطالعه حاضر نشان داد که فراکشن اتیل‌استاتی جلبک‌های *N. zanardinii* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند (شکل‌های ۳ و ۴). از این‌رو، به‌نظر می‌رسد که بخشی از خاصیت بازدارندگی بالای این جلبک به دلیل توانایی آنتی‌اکسیدانی بالای آن است.

جلبک‌های دریایی یکی از منابع غنی ترکیبات زیست‌فعال طبیعی می‌باشند. پژوهش حاضر نشان داد که میزان این ترکیبات در گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای با توجه به نوع گونه و حلال استخراجی متفاوت است و متانول و در ادامه اتیل‌استات حلال‌های مناسبی جهت استخراج فلوروتانین‌ها از جلبک‌های قهوه‌ای به‌ویژه در جلبک *N. zanardinii* می‌باشند. فلورتانین‌های موجود در جلبک *N. zanardinii* شامل گستره‌ای از ترکیبات فنولی شامل فلوروگلوسینول، اِکول، دی‌اِکول و بی‌اِکول با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و توانایی بازدارندگی آنزیم پلی فنول اکسیداز می‌باشند. با توجه به پراکنش بالای این جلبک در سواحل جنوبی ایران، استخراج و خالص‌سازی فلورتانین‌ها و استفاده از این ترکیبات در محصولات مختلف می‌تواند به عنوان راهکاری در جهت افزایش بهره‌وری از جلبک‌های سواحل جنوبی کشور و ایجاد ارزش افزوده مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان آزمایشگاه کروماتوگرافی دانشگاه هرمزگان و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

نصیری، ا.، موسوی نسب، م.، شکر فروش، س.ش. و گلمکانی، م.ت.، ۱۳۹۳. بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) بر مهار آنزیم پلی فنول اکسیداز و روند ملانوزیس در میگو پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۳(۳): ۱۱۸-۱۰۹.

[1] Eckstolonol

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

Cha, S.H., Ko, S.C., Kim, D. and Jeon, Y.J., 2011. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: Those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish. *The Journal of Dermatology*, 38(4): 354-363. DOI:10.1111/j.1346-8138.2010.00983.x

Chakraborty, K., Joseph, D. and Praveen, N.K., 2013. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4): 1924-1935. DOI: 10.1007/s13197-013-1189-2

Chowdhury, M.T.H., Bangoura, I., Kang, J.Y., Park, N.G., Ahn, D.H. and Hong, Y.K., 2011. Distribution of phlorotannins in the brown alga *Ecklonia cava* and comparison of pretreatments for extraction. *Fisheries and Aquatic Science*, 14(3): 198-204. DOI:10.5657/FAS.2011.0198

Cho, S.H., Kang, S.E., Cho, J.Y., Kim, A.R., Park, S.M., Hong, Y.K. and Ahn, D.H., 2007. The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum siliquastrum*) extracts. *Journal of Medicinal Food*, 10(3): 479–85. DOI: 10.1089/jmf.2006.099

Ganesan, P., Kumar, C.S. and Bhaskar, N., 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8): 2717-2723. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.07.005

Kang, H.S., Kim, H.R., Byun, D.S., Son, B.W., Nam, T.J. and Choi, J.S., 2004. Tyrosinase Inhibitors Isolated from the Edible Brown Alga *Ecklonia stolonifera*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(12): 1226-1232. DOI: 10.1007/BF02975886

Li, Y., Yang, Z. and Li, J., 2017. Shelf-life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1): 291-298. DOI:10.1002/jsfa.7730

Liu, X., 2015. Extraction and Antioxidant Activity of Phlorotannins from Edible Brown Algae. Master thesis, North Carolina State University. 127 P.

Loizzo, M. R., Tundis, R. and Menichini, F., 2012. Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4): 378-398. DOI:10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x

Nakamura, T., Nagavama, K., Uchida, K. and Tanaka, R., 1996. Antioxidant Activity of Phlorotannins Isolated from the Brown Alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science*, 62(6): 923-926. DOI: 10.2331/fishsci.62.923

Nirmal, N.P. and Benjakul, S., 2011. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4): 924-932. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.12.007

Nirmal, N.P. and Benjakul, S., 2009a. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chemistry*, 116: 323–331. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.054

Nirmal, N.P. and Benjakul, S., 2009b. Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9): 3578-3586. DOI:10.1021/jf900051e

Nirmal, N.P. and Benjakul, S., 2012. Effect of Green Tea Extract in Combination with Ascorbic Acid on the Retardation of Melanosis and Quality Changes of Pacific White Shrimp during Iced Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8): 2941–2951. DOI: 10.1007/s11947-010-0483-5

Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K. and Nakamura, T., 2004. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16(4): 291–296. DOI: 10.1023/B:JAPH.0000047781.24993.0a

Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H. and Hama, Y., 2008. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *Journal of Applied Phycology*, 20: 705-711. DOI: 10.1007/s10811-007-9254-8

Taheri, A., 2016. Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2): 802-817. DOI: 20.1001.1.15622916.2016.15.2.14.0

Wang, T., Jonsdottit, R. and Olafsdottir, G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116: 240–248. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.041

Zakipour Rahimabadi, E., Zarrin, K., Zarei, M., Gaffari, M. and Rahnama, M., 2016. Effects of genistein on melanosis and microbial quality of *Litopenaeus vannamei* during ice storage. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(1): 436-445. DOI: 20.1001.1.15622916.2016.15.1.34.8

Zhou, K. and Yu, L., 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Food Science and Technology (LWT)*, 37: 717-721. DOI:10.1016/j.lwt.2004.02.008

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]

Antioxidant properties and Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) polyphenoloxidase inhibitory activity of different brown seaweeds extracts

Sharifian S.[1*]; Shahbanpour B.[2]

[*] sharifian.salim@hotmail.com

1- Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

2- Seafood Processing Group, Department of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

At the present study, phlorotannin content, antioxidant properties (DPPH free-radical scavenging and ferric reducing power) and inhibitory of polyphenoloxidase enzyme from Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different extracts (first and ethyl-acetate) extracted from brown seaweeds *Nizimuddinia zanardinii*, *Sargassum ilicifolium*, *Sargassum cristaefolium* and *Stoechospermum marginatum* with methanol 100% and 70% were investigated. Among different seaweeds species, the highest amount of phlorotannin (13.21 mg PHG/g), DPPH scavenging (72.64%) and reducing power (0.96) were measured in the ethyl-acetate extract of *N. zanardinii* in methanol 100% treatment. Phlorotannin compounds including Eckol, Dieckol, Bieckol were identified by using of TLC in the ethyl acetate extract of *N. zanardinii*. The results showed that phlorotannin content and antioxidant activity varies in different species depending on seaweed specie, type of extract and type of extraction solvent. The amount of Vannamei shrimp polyphenoloxidase inhibition was different between various extract and seaweeds; and the highest amount of inhibition (71.11%) was measured in the ethyl-acetate extract of *N. zanardinii*. The results of present study showed that seaweed extracts with high amount of phlorotannins content could be considered as natural and safe polyphenoloxidase enzyme inhibitor.

Keywords: Brown seaweed, Antioxidant properties, Polyphenoloxidase inhibition, Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.2.9.6]