



تأثیر حلال‌های متفاوت در استخراج ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های قهوه‌ای *Padina australis* Hauck و *Nizimuddinia zanardinii* (Schiffner) P.C. Silva

سلیم شریفیان^{۱،۲}، بهاره شعبان‌پور^{۱*}، علی طاهری^۲، معظمه کردجری^۱

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

| نوع مقاله: | چکیده |
|---|---|
| پژوهشی | جلبک‌های دریایی یکی از منابع مهم برای استخراج ترکیبات زیست فعال می‌باشند. در مطالعه حاضر تأثیر حلال‌های مختلف (متانول ۱۰۰٪، متانول ۷۰٪، استون ۱۰۰٪، استون ۷۰٪) در استخراج ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دو گونه از جلبک‌های قهوه‌ای سواحل چابهار شامل <i>Padina australis</i> Hauck و <i>Nizimuddinia zanardinii</i> (Schiffner) P.C.Silva مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اولیه و فراکشن‌های آن شامل کلروفرمی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و آبی با استفاده از شاخص‌های میزان فنول کل، بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH، توانایی احیاء و جذب فلزی سنجیده شد. در هر دو جلبک، میزان فنول و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی ۱۰۰٪ در مقایسه با دیگر تیمارها بالاتر بود. بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در فراکشن اتیل استاتی جلبک <i>N. zanardinii</i> مشاهده گردید. همچنین، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک <i>N. zanardinii</i> به میزان قابل توجهی نسبت به <i>P. australis</i> بالاتر بود. نتایج نشان داد که جلبک <i>N. zanardinii</i> می‌تواند به عنوان منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفته شود. |
| تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۷/۰۳/۱۸ اصلاح: ۹۷/۱۰/۲۱ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۵ | |
| کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان ترکیبات فنولی جلبک قهوه‌ای دریای عمان | |

مقدمه

بشر از دیرباز به اهمیت جلبک‌ها و کاربرد آن‌ها در زمینه‌های گوناگون پی برده است. استفاده از جلبک‌ها به عنوان غذا و دارو، بیش از جنبه‌های دیگر آن، نظر انسان را متوجه خود ساخته است (Hafezieh et al., 2017). در سال‌های اخیر ترکیبات جدید زیست فعال زیادی، به‌ویژه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، از جانداران مختلف دریایی شامل جلبک‌های دریایی سبز، قرمز و قهوه‌ای جداسازی شده است (Kalaiselvan et al., 2016; Nazemi et al., 2012). جلبک‌ها به‌طور طبیعی برای مقابله با استرس‌های محیطی دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند که ترکیبات زیست فعالی از قبیل پلی فنول‌ها، آلکالوئیدها، تریپن‌ها، فیکوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها و آنزیم‌های مختلفی را تولید می‌نمایند (Maharana et al., 2015). پلی فنول‌های تولید شده توسط جلبک‌ها نسبت به فنول‌های مشابه در گیاهان خشکی قطبی‌تر بوده و با توجه به تعدد حلقه‌های فنولی در آن‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری را نشان می‌دهند (Fernando et al., 2016).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: b_shabanpour@yahoo.com

واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد منجر به اکسیداسیون چربی‌های غیر اشباع در مواد غذایی و کاهش ارزش تغذیه‌ای و تولید بو و طعم نامطلوب می‌گردد. بسیاری از ترکیبات زیست فعال از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی جلوگیری از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی را داشته و مانع از فساد اکسیداسیونی چربی‌ها و پروتئین‌ها می‌گردند. در حال حاضر به دلیل ایجاد مشکلات سلامتی ناشی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، تمایل زیادی برای جایگزینی و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی در جهان وجود دارد (Amarowicz et al., 2000).

میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی به میزان زیادی در ارتباط با روش استخراج می‌باشد. روش‌های استخراج ترکیبات فنولی از جلبک‌های دریایی را می‌توان به دو گروه سنتی و نوین تقسیم‌بندی نمود. در روش معمول و سنتی، استخراج به کمک حلال‌های آلی و آب صورت می‌گیرد؛ در حالی که در روش‌های نوین از آنزیم، مایکروویو، مایع فوق بحرانی و فشار در فرایند استخراج استفاده می‌گردد. هر کدام از این روش‌ها با توجه به هزینه، زمان و بازده مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشد. با توجه به میزان دسترسی پایین و هزینه‌های بالای روش‌های نوین، تاکنون مرسوم‌ترین روش استخراج ترکیبات فنولی از جلبک‌های دریایی، استخراج این ترکیبات با کمک حلال‌های آلی به صورت خالص یا در ترکیب با آب بوده است (Gall et al., 2015). به‌طور مرسوم از متانول یا اتانول برای استخراج پلی فنول‌ها در جلبک‌های دریایی استفاده می‌گردد، چرا که کارایی بهتری نسبت به آب به‌ویژه در استخراج فلوروتانین‌ها دارند (Maqsood et al., 2013).

طی تحقیقات انجام شده تاکنون بیش از ۲۵۰ گونه جلبک در سواحل جنوب کشور شناسایی شده است. جلبک‌های *Padina australis* Hauck و *Nizimuddinina zanardinii* (Schiffner) P.C.Silva از گونه‌های جلبکی قهوه‌ای با پراکنش خوب در سواحل جنوبی ایران می‌باشد که عموماً از آن‌ها در تهیه سوپ و برخی دیگر از فرآورده‌های دریایی استفاده می‌گردد (Taheri, 2016). این دو گونه جلبک با توجه به پراکنشی که در جنوب ایران، به‌ویژه در سواحل دریای عمان دارند، می‌توانند به عنوان گزینه‌های بالقوه برای بررسی وجود ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی مطرح باشند. از این‌رو هدف از انجام این پژوهش بررسی شیوه‌های مختلف استخراج ترکیبات فنولی در جلبک‌های *P. australis* و *N. zanardinii* و سنجش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها و تعیین بهترین حلال برای استخراج این ترکیبات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جلبک

جلبک‌ها از ناحیه بین جزر و مدی ساحل خلیج چابهار (شهر چابهار، سیستان و بلوچستان) در زمان حداکثر جزر در فصل زمستان در سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و شناسایی گونه (در موزه دریایی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار)، برای حذف گل و لای و دیگر مواد زائد با آب شیرین شستشو و سپس در سایه در دمای اتاق (۲۵ °C) خشک شدند. نمونه‌ها پس از پودر شدن با خردکن خانگی در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار بسته‌بندی و تا هنگام عصاره‌گیری در فریزر (۲۰ °C-) نگهداری گردید.

عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری از حلال‌های متانول ۱۰۰٪، متانول ۷۰٪، استون ۱۰۰٪ و استون ۷۰٪ استفاده گردید. صد گرم جلبک توزین و با نسبت ۱ به ۵ با حلال مورد نظر مخلوط گردید و به مدت ۲ ساعت در تاریکی در شیکر قرار داده شد. در ادامه عصاره با کمک کاغذ صافی از مواد جلبکی جدا گردید (عصاره اولیه). برای خالص‌سازی ترکیبات فنولی، ابتدا به عصاره اولیه به میزان ۱/۴ حجم محلول، آب مقطر دوبار تقطیر اضافه گردید، سپس به ترتیب با کلروفرم، دی کلرومتان و اتیل استات (هر حلال سه بار) شستشو داده شد. محلول‌های حاصل از هر بار شستشو به کمک قیف جداکننده از هم جدا گردید. محلول انتهایی به عنوان محلول آبی در نظر گرفته شد. عصاره‌های حاصل از هر محلول پس از تبخیر حلال، جمع‌آوری و تا هنگام آزمایش در ۸۰ °C - نگهداری گردید (Liu, 2015).

فنول کل

میزان فنول کل بر اساس استاندارد فلوروگلوکوسینول (Phloroglucinol, PHG) و با استفاده از شناساگر فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) به روش Singleton و همکاران (۱۹۹۹)، با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه (۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر شناساگر فولین سیوکالتو (۱۰٪ در آب مقطر) در لوله‌های پوشیده درب‌دار مخلوط و پس از ۳ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر بیکربنات سدیم ۱٪ اضافه و همگن گردید. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در تاریکی انکوبه گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر ثبت شد؛ چرا که بالاترین جذب مخلوط ترکیبات فنولی و شناساگر فولین سیوکالتو در این طول موج می‌باشد (Blainski *et al.*, 2013). برای کالیبراسیون و رسم منحنی استاندارد از محلول فلوروگلوکوسینول (غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر با سه تکرار) استفاده شد. میزان فنول کل عصاره‌ها بر اساس معادله رگرسیون منحنی استاندارد ($y = 0.012x - 0.0104$) محاسبه و به صورت میلی‌گرم فلوروگلوکوسینول در هر گرم عصاره (mg PHG/g) بیان گردید. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بر اساس روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۷۵ میکرومولار) با ۱ میلی‌لیتر عصاره (۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) مخلوط و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه در 25°C انکوبه شد و پس از ۳۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به صورت معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{DPPH} = 1 - (A_0 - A_1/A_0)$$

که در آن A_0 و A_1 به ترتیب جذب کنترل محلول و جذب عصاره می‌باشد. برای مقایسه از آلفا-توکوفرول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

فعالیت جذب یون آهن (Fe^{+2})

فعالیت جذب یون آهن (Fe^{+2}) با استفاده از روش Dinis و همکاران (۱۹۹۴) انجام گرفت. در این روش ۱ میلی‌لیتر عصاره (۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) با ۳/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر FeCl_2 مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین اضافه و اجازه داده شد تا واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شود. پس از آن جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای محاسبه فعالیت جذب فلزی از معادله زیر استفاده شد:

$$\text{Fe}^{+2} = (A_0 - A_1/A_0)$$

که در آن A_0 و A_1 به ترتیب جذب کنترل و جذب عصاره می‌باشد. از EDTA به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

قدرت احیاء یون آهن (Fe^{+3})

برای اندازه‌گیری قدرت احیاء یون آهن (Fe^{+3}) از روش Oyaizu (۱۹۹۸) استفاده گردید. یک میلی‌لیتر محلول آزمایش (۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر بافر سولفات مخلوط و در ادامه ۱ میلی‌لیتر هگزاسیانوفرات اضافه و در دمای 50°C در حمام آبی به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ واکنش متوقف، سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. پس از سانتیفریوژ بخش شناور جدا و با ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول فریک کلرید مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای محاسبه قدرت احیاء از معادله زیر استفاده شد:

$$\text{Fe}^{+3} = (A_0 - A_1/A_0)$$

که در آن A_0 و A_1 به ترتیب جذب کنترل و جذب عصاره می‌باشد. از هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار (BHT) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

آنالیز آماری

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 بین دو گونه از آنالیز Student T-test استفاده گردید. برای مقایسه میانگین داده‌ها در میان فراکشن‌های مختلف از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (در سطح ۵ درصد) توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷) استفاده شد. برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار Excell (Microsoft office 2010) استفاده گردید.

نتایج

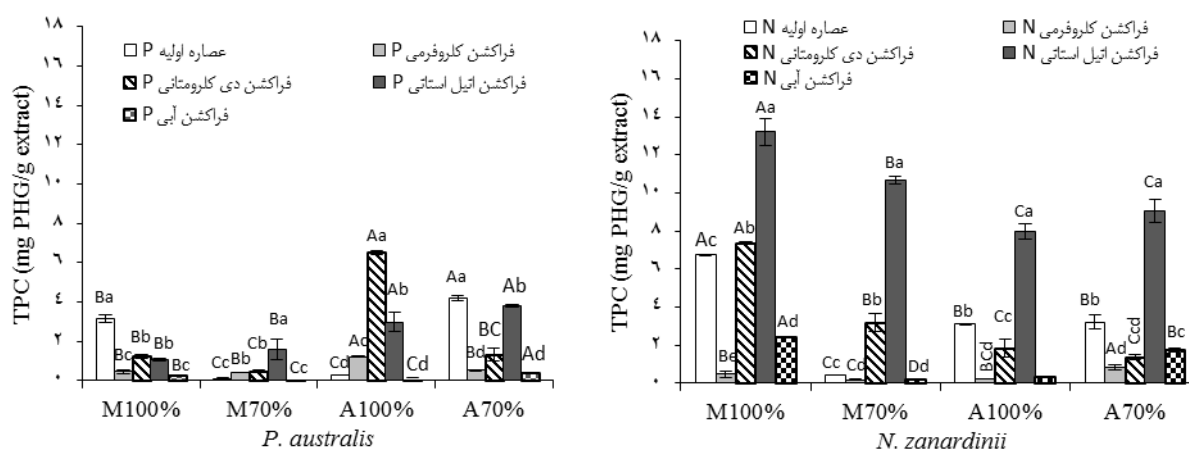
میزان عصاره اولیه استخراج شده توسط حلال‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. در هر دو گونه جلبک، بالاترین مقدار عصاره در تیمار متانول ۱۰۰٪ و کمترین آن در تیمار استون ۱۰۰٪ به دست آمد. در جلبک *N. zanardinii* در بین تمامی حلال‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$)، در حالی که در *P. australis* بین تیمار متانول ۷۰٪ و استون ۱۰۰٪ وجود نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۱. میزان عصاره اولیه (گرم/۱۰۰ گرم جلبک) دو گونه جلبک *N. zanardinii* و *P. australis*

| حلال | | | | گونه |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|
| استون ۷۰٪ | استون ۱۰۰٪ | متانول ۷۰٪ | متانول ۱۰۰٪ | |
| ۱/۷۸ ± ۰/۱۸ ^{Bb} | ۰/۸۶ ± ۰/۰۴ ^{Bc} | ۱/۱۰ ± ۰/۰۴ ^{Bc} | ۲/۶۲ ± ۰/۰۸ ^{Ba*} | <i>P. australis</i> |
| ۴/۱۱ ± ۰/۱۰ ^{Ac} | ۲/۵۳ ± ۰/۰۸ ^{Ad} | ۴/۴۹ ± ۰/۰۷ ^{Ab} | ۶/۷۱ ± ۰/۰۷ ^{Aa} | <i>N. zanardinii</i> |

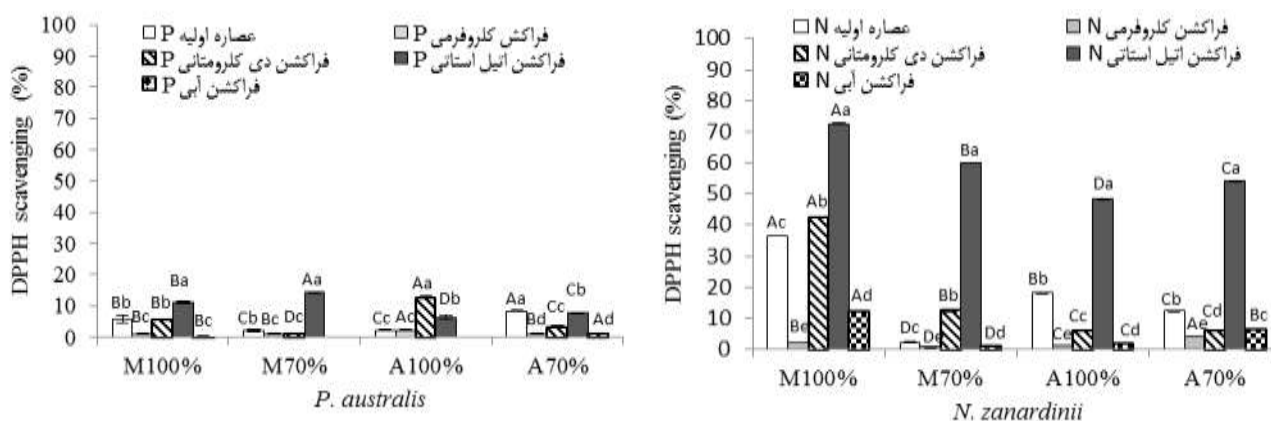
* حروف بزرگ A-B و حروف کوچک a-d، به ترتیب بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین دو گونه و بین حلال در هر گونه است ($P < 0.05$).

میانگین (\pm انحراف معیار) میزان فنول کل در عصاره‌های اولیه جلبک *N. zanardinii* و *P. australis* در شکل ۱ نشان داده شده است. در جلبک *N. zanardinii* بالاترین میزان فلورتانین در تیمار حلال متانول ۱۰۰٪ و فراکشن اتیل استاتی آن به مقدار ۱۳/۲۱ mg PHG/g اندازه‌گیری گردید. در این جلبک در تمامی حلال‌ها، به ترتیب فراکشن‌های اتیل استاتی، دی کلرومتانی، آبی و کلروفرمی کارایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی داشت. بیشترین میزان فنول در جلبک *P. australis* در فراکشن اتیل استاتی تیمار استون ۱۰۰٪ به میزان ۶/۵۳ mg PHG/g وجود داشت. در این تیمار به ترتیب فراکشن اتیل استاتی، دی کلرومتانی، کلروفرمی و آبی دارای فنول بالاتری بودند ($P < 0.05$). در مقایسه بین حلال‌ها، برخلاف جلبک *P. australis*، در جلبک *N. zanardinii* در فراکشن‌های تیمارهای متانولی، میزان فلورتانین بالاتری نسبت به استونی وجود داشت ($P < 0.05$).



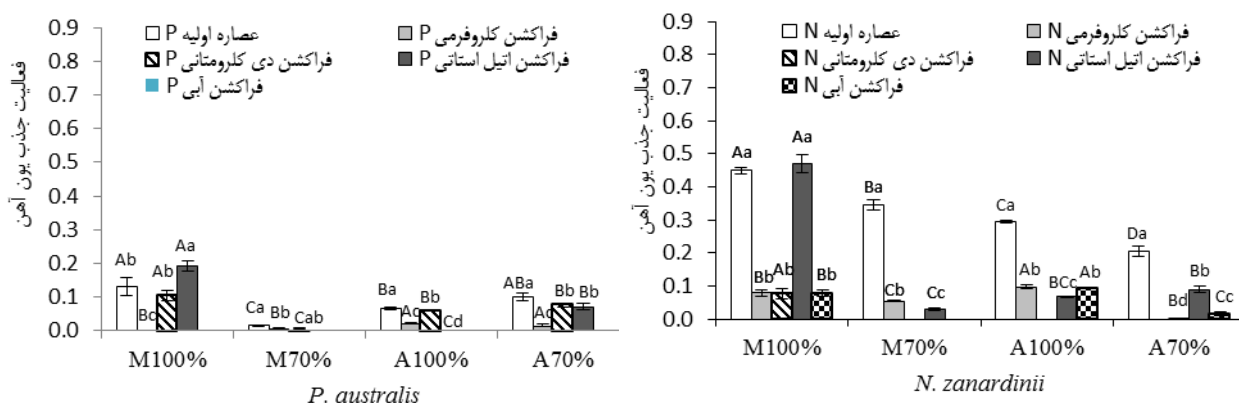
شکل ۱. میانگین (\pm انحراف معیار) میزان فنول کل در فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanardinii* و *P. australis*. حروف بزرگ (A تا D) بیانگر اختلاف معنی‌دار متغیر بین حلال و حروف کوچک (a تا d) در هر حلال می‌باشد.

میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) در عصاره اولیه و فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanzardinii* و *P. australis* در شکل ۲ نشان داده شده است. در *N. zanzardinii* بالاترین میزان بازدارندگی (۷۲/۶۴٪) در فراکشن اتیل استاتی تیمار متانول ۱۰۰٪ و کمترین (۰/۷۴٪) در فراکشن کلروفومی تیمار متانول ۷۰٪ وجود داشت. در این جلبک در تمامی تیمارها، میزان بازدارندگی در فراکشن اتیل استاتی نسبت به دیگر فراکشن به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$). در مقایسه حلال‌ها، فراکشن‌های تیمار متانول ۱۰۰٪ نسبت به دیگر حلال‌ها بازدارندگی بیشتری را نشان دادند ($P < 0.05$). بالاترین میزان بازدارندگی *P. australis* در فراکشن اتیل استاتی تیمار متانول ۷۰٪ به میزان ۱۴/۲۷٪ بود. در تمامی حلال‌ها، معمولاً میزان بازدارندگی در فراکشن‌های اتیل استاتی و دی کلرومتانی نسبت به دیگر فراکشن‌ها بالاتر بود. در تمامی تیمارها بین فراکشن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). میزان بازدارندگی در این جلبک در تیمارهای متانولی نسبت به استونی بالاتر بود ($P < 0.05$).



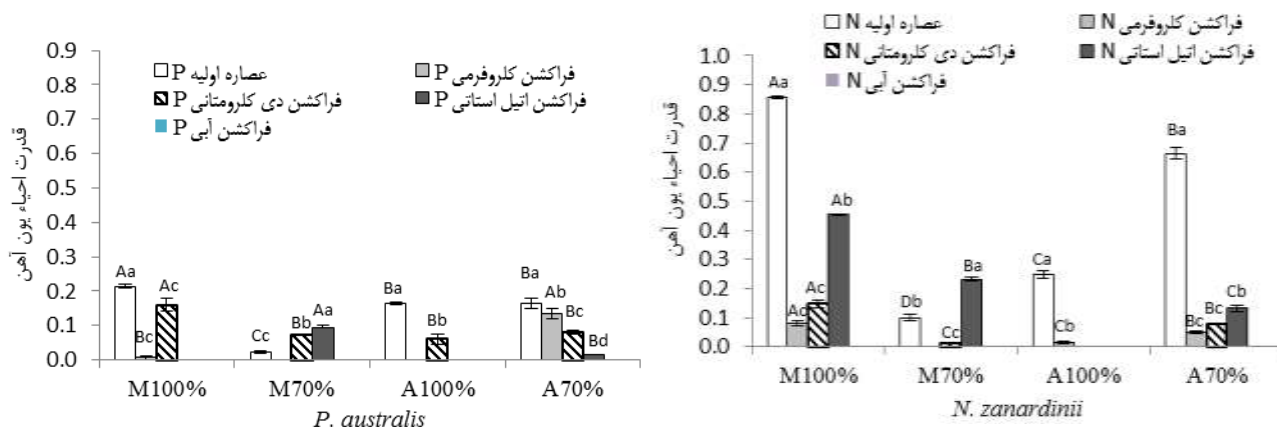
شکل ۲. میانگین (\pm انحراف معیار) میزان بازدارندگی DPPH در فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanzardinii* و *P. australis*. حروف بزرگ (A تا D) بیانگر اختلاف معنی‌دار متغیر بین حلال و حروف کوچک (a تا d) در هر حلال می‌باشد.

میانگین میزان جذب یون آهن (جذب در ۵۶۲ نانومتر) در فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanzardinii* و *P. australis* در شکل ۳ نشان داده شده است. در هر دو جلبک بالاترین میزان جذب فلز در فراکشن اتیل استاتی تیمار متانول ۱۰۰٪ مشاهده گردید. این مقدار در *N. zanzardinii* برابر با ۰/۴۷ و در *P. australis* برابر با ۰/۱۹ بود ($P < 0.05$). در هر دو جلبک در تیمار متانولی ۱۰۰٪، فراکشن‌های اتیل استاتی و عصاره اولیه به ترتیب توانایی بیشتری در جذب یون آهن در مقایسه با دیگر فراکشن‌ها داشتند ($P < 0.05$).



شکل ۳. میانگین (\pm انحراف معیار) فعالیت جذب یون آهن در فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanzardinii* و *P. australis*. حروف بزرگ (A تا D) بیانگر اختلاف معنی‌دار متغیر بین حلال و حروف کوچک (a تا d) در هر حلال می‌باشد.

قدرت احیاء یون آهن (Fe^{+3}) در عصاره اولیه و فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanardinii* و *P. australis* در شکل ۴ نشان داده شده است. بالاترین میزان احیاء (جذب در ۷۰۰ نانومتر) در هر دو جلبک *N. zanardinii* و *P. australis* در عصاره اولیه تیمار متانول ۱۰۰٪ به ترتیب برابر ۰/۸۶ و ۰/۲۱ بود. در هر دو جلبک، میزان بالاتری از احیاء در عصاره اولیه نسبت به دیگر فراکشن‌ها وجود داشت ($P < 0.05$). قدرت احیاء آهن در تمامی تیمارها در جلبک *N. zanardinii* بسیار بالاتر از جلبک *P. australis* بود ($P < 0.05$).



شکل ۴. میانگین (± انحراف معیار) قدرت احیاء یون آهن در فراکشن‌های مختلف جلبک *N. zanardinii* و *P. australis* (حروف بزرگ (A تا D) بیانگر اختلاف معنی‌دار متغیر بین حلال و حروف کوچک (a تا d) در هر حلال می‌باشد).

بحث

نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که تعیین یک روش و حلال مناسب و یکسان برای استخراج ترکیبات طبیعی، به‌ویژه پلی‌فنول‌ها از جلبک‌های دریایی مشکل می‌باشد (Lashkan et al., 2012). در مطالعه حاضر نیز، مشابه دیگر پژوهش‌ها، میزان عصاره استخراج شده، بسته به نوع حلال متفاوت بود و در هر دو جلبک در حلال متانول ۱۰۰٪، میزان عصاره بیش‌تری در مقایسه با دیگر حلال‌ها به دست آمد. بالاتر بودن میزان عصاره در حلال متانولی نسبت به استونی بیانگر این موضوع است که اغلب ترکیبات محلول موجود در جلبک‌ها دارای قطبیت بالا هستند (Wang et al., 2009). در مقایسه دو گونه، میزان عصاره اولیه در جلبک *N. zanardinii* در تمامی حلال‌ها تقریباً سه برابر جلبک *P. australis* بود، که نشان‌دهنده بالاتر بودن ترکیبات با قطبیت بالا از قبیل پلی‌فنول‌ها در این جلبک می‌باشد. هم‌چنین جلبک‌های *N. zanardinii* دارای ترکیبات فوکوئیدان بوده که می‌تواند در طی فرایند عصاره‌گیری استخراج شده باشد. فوکوئیدان‌ها ترکیباتی پلی‌ساکاریدی محلول در آب هستند که به میزان زیادی در جلبک‌های راسته Fucals (شامل *N. zanardinii*) یافت می‌شوند (Baba et al., 2018). عصاره اولیه به دست آمده از جلبک *N. zanardinii* در این مطالعه (۶/۷۱٪) تقریباً برابر با میزان عصاره به دست آمده با حلال متانول در مطالعه Taheri (۲۰۱۶)، به میزان ۶/۴۴ گرم / ۱۰۰ گرم جلبک بود. بالاترین میزان عصاره در جلبک *P. australis* (۲/۶۲٪) نسبت به میزان عصاره متانولی *Padina sp.* گزارش شده توسط Foon و همکاران (۲۰۱۳) یعنی ۱/۲۱٪، بالاتر بود.

ترکیبات فنولی به‌طور معمول در گیاهان وجود دارند و دارای چندین فعالیت زیستی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی، از جمله آن‌هاست. خاصیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها با محتوای پلی‌فنولی آن‌ها و به‌ویژه فلوروتانین‌ها و فوکوگزانتین‌ها در ارتباط می‌باشند (Ganesan et al., 2008). در پژوهش حاضر میزان فنول در جلبک *N. zanardinii* به میزان قابل‌توجهی در تمامی تیمارها از جلبک *P. australis* بالاتر بود ($P < 0.05$). علاوه بر متفاوت بودن گونه (Connan et al., 2006)، احتمالاً یکی دیگر از دلایل پایین بودن میزان فنول در *Padina sp.* وجود آلژینات است. زیرا که ترکیبات پلی‌فنولی به‌ویژه فلوروتانین‌ها در دیواره سلولی جلبک به صورت متصل به آلژینیک اسید می‌باشد (Arnold and Target, 2003). Attarn Fariman و همکاران (۲۰۱۵) میزان فنول کل در عصاره اولیه آبی جلبک *N. zanardinii* جمع‌آوری شده از سواحل چابهار در ماه‌های مختلف سال را بین

۱-۱/۵ (میلی‌گرم/گرم وزن خشک) گزارش نمودند. در مطالعه دیگری Taheri (۲۰۱۶) میزان فنول کل در عصاره اولیه متانولی این جلبک را ۲/۱۴ (میلی‌گرم/گرم عصاره) اندازه‌گیری نمود که پایین‌تر از تیمار متانولی مطالعه حاضر (۶/۷۵ میلی‌گرم/گرم عصاره) می‌باشد. مقایسه شاخص‌های اندازه‌گیری ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف، از قبیل میزان فنول کل در عصاره‌های جلبکی مشابه بین مطالعات مختلف، به دلیل تفاوت در فاکتورهای متغیر استخراج عصاره، سنجش آن و تنوع بیولوژیکی، حتی در گونه‌های مشابه مشکل است. چنین تفاوت‌هایی می‌تواند به دلیل فصل، تیمار، فاکتورهای محیطی یا ژنتیک باشد (Moon and Shibamoto, 2009). هم‌چنین در هر دو مطالعه یاد شده از اسید گالیک به عنوان استاندارد برای سنجش فنول استفاده شده که متفاوت با استاندارد استفاده شده در این مطالعه یعنی فلوروگلوکوسینول است. فلوروگلوکوسینول واحدهای سازنده ترکیبات فلوروتانیینی در جلبک‌های قهوه‌ای می‌باشد (Wang et al., 2009).

مقایسه میزان فنول در میان فراکشن‌های مختلف در جلبک *N. zanardinii* نشان داد که میزان فلوروتانیین در فراکشن اتیل استاتی نسبت به دیگر فراکشن‌ها بالاتر بود. معمولاً فلوروتانیین‌ها 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 فلوروتانیین و دیگر فراکشن‌ها برای حذف ترکیبات غیرفنولی می‌باشد (Liu, 2015; Shibata, 2004) و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که ۸۲٪ از عصاره خام فنولی موجود در فراکشن با میزان فنول کل بالا، فلوروتانیین‌ها هستند. نتایج پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که میزان فنول کل در فراکشن‌های مختلف با افزایش قطبیت حلال، افزایش می‌یابد (Taheri, 2016; Chakraborty et al., 2013; Chandini et al., 2008) و عموماً فراکشن اتیل استاتی دارای میزان فلوروتانیین بالاتری نسبت به دیگر فراکشن‌ها در بیش‌تر جلبک‌های قهوه‌ای می‌باشد (Liu, 2015; Chakraborty et al., 2013). برخلاف جلبک *N. zanardinii* در جلبک *P. australis* بالاترین میزان فنول در فراکشن دی‌کلرومتانی وجود داشت. این نشان می‌دهد این جلبک ممکن است دارای ترکیبات غیرفنولی باشد که با شناساگر فولین-سیوکالتو واکنش داده و در سنجش فنول کل آمده باشد (Liu, 2015). پایین‌ترین میزان فلوروتانیین در هر دو جلبک عموماً در فراکشن کلروفرمی وجود داشت. پایین بودن میزان ترکیبات فنولی در این فراکشن، بیانگر وجود ترکیبات غیرقطبی از قبیل ترکیبات چربی‌دوست و رنگدانه‌ها در آن می‌باشد. عموماً در طی فرایند خالص‌سازی فلوروتانیین در گیاهان دریایی، از کلروفرم یا ان هگزان برای حذف رنگدانه‌ها و لپیدها استفاده می‌گردد (Liu, 2015; Koivikko et al., 2007). تأثیرگذاری حلال‌های آلی قطبی در استخراج فلوروتانیین نسبت به آب و حلال‌های غیرقطبی بالاتر می‌باشد (Wang et al., 2009).

در مقایسه حلال‌های مختلف، در این مطالعه میزان فلوروتانیین در جلبک تیمار متانول ۱۰۰٪ *N. zanardinii* نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود. به عبارتی دیگر، متانول ۱۰۰٪ کارایی بهتری در استخراج فلوروتانیین‌ها در این جلبک داشته است. برخلاف جلبک *N. zanardinii* در جلبک *P. australis* تیمارهای استونی کارایی بهتری در استخراج ترکیبات فنولی داشتند. Airanthi و همکاران (۲۰۱۱) میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های استخراج‌شده با حلال‌های آلی مختلف (متانول، اتانول، استون، کلروفرم، اتیل استات و ان-هگزان) در گونه‌های مختلف جلبک قهوه‌ای را مورد سنجش قرار دادند و نتیجه‌گیری نمودند که متانول، بهترین حلال از نظر میزان فنول می‌باشد. در مطالعه دیگری Jormalainen و همکاران (۲۰۰۵) میزان استخراج پلی‌فنول‌های محلول (عمدتاً فلوروتانیین‌ها) از جلبک *Fucus vesiculosus* توسط حلال‌های با قطبیت متفاوت را بررسی و نتیجه‌گیری کردند که استون ۷۰٪ بهترین حلال می‌باشد، چرا که مانع از شکل‌گیری کمپلکس پروتئین-پلی‌فنول در طی استخراج می‌گردد. متغیرهای فرایند استخراج از قبیل نوع حلال و قطبیت آن، درجه حرارت و زمان استخراج، نسبت نمونه به حلال و هم‌چنین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه‌ها بر میزان استخراج فلوروتانیین و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیرگذار است (Lopez et al., 2011). از این رو به نظر می‌رسد، با توجه به گستره ترکیبات فنولی، نوع حلال مناسب بسته به گونه جلبک متفاوت خواهد بود.

رادیکال پایدار DPPH، رادیکالی آزاد است که اغلب تخمین مناسبی از فعالیت جذب رادیکال عصاره می‌دهد. این رادیکال ارغوانی رنگ، در حضور یک دهنده هیدروژن (آنتی‌اکسیدان) احیاء شده و رنگ زرد را در محلول ایجاد می‌نماید (Ganesan et al., 2008). در این پژوهش نتایج نشان داد که فراکشن اتیل استاتی عصاره متانولی ۱۰۰٪ جلبک *N. zanardinii* بالاترین

درصد جذب رادیکال‌های آزاد با میزان ۷۲/۶۴٪ را داراست. میزان بازدارندگی در تمام تیمارها نسبت به آلفا-توکوفرول (۹۴±۰/۱۶) پایین‌تر بود ($P < 0.05$). همچنین فراکشن‌های اتیل استات در این جلبک در مقایسه با دیگر فراکشن‌ها و عصاره‌های اولیه میزان بالاتری از بازدارندگی را نشان دادند. از طرفی دیگر، فراکشن‌های اتیل استاتی دارای میزان بالاتری از فنول نیز بودند. از این رو به نظر می‌رسد که جذب رادیکال آزاد به دلیل وجود فنول‌ها بوده است. Wang و همکاران (۲۰۰۹) نیز ارتباط مشابهی بین میزان بالای فلوروتانین‌ها و میزان بازدارندگی در فراکشن‌های اتیل استاتی عصاره‌های جلبکی را گزارش نمودند. ترکیبات فنولی دارای گروه‌های هیدروکسیل هستند که با اتصالاتی ضعیف به حلقه‌های آروماتیک فنول متصل می‌باشد. از این رو به راحتی 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 به تنهایی کارایی بهتری در جذب مهار رادیکال آزاد در مقایسه با حلال در ترکیب با آب دارند. نتایج محققین دیگر نیز نشان می‌دهد که تغییر در قطبیت حلال، کارایی آن در استخراج گروه خاصی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را کاهش داده و بر روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره تأثیر می‌گذارد (Zhou and Yu, 2004). در این مطالعه، نتایج مقایسه بازدارندگی بین عصاره اولیه و فراکشن‌ها، بیانگر بازدارندگی بالاتر در فراکشن‌ها بود. فعالیت بالاتر بازدارندگی در فراکشن‌ها احتمالاً به دلیل وجود ترکیباتی در عصاره اولیه هست که با آنتی‌اکسیدان‌ها برهم‌کنش دارند (Chandini et al., 2008). مقایسه میزان بازدارندگی در جلبک‌های مطالعه شده در این پژوهش با دیگر پژوهش‌ها، به دلیل روش‌های مختلف استخراج، اندازه‌گیری و واحدهای متفاوت استفاده شده برای برآورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌های دریایی کار مشکلی خواهد بود. در این مطالعه میزان بازدارندگی در جلبک *P. australis* (حداکثر ۱۴/۲۷٪) به میزان قابل‌توجهی پایین‌تر از *N. zanardinii* (حداکثر ۷۲/۶۴٪) بود. Praveen و Chakraborty (۲۰۱۳) میزان بازدارندگی در عصاره‌های آبی (۰/۵ mg/ml) دو گونه از جلبک‌های *Padina* سواحل هند، شامل *P. gymnospora* و *P. tetrastratica* را بین ۴۵ تا ۴۷٪ گزارش نمودند. Foon و همکاران (۲۰۱۳) خاصیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های خوراکی *Eucheuma cottonii* و *Padina* sp. سواحل مالزی را مورد بررسی قرار داده و میزان بازدارندگی DPPH در عصاره متانولی (۱ mg/ml) *Padina* sp. را بین ۳۲-۲۹٪ گزارش نمودند. Taheri (۲۰۱۶) میزان بازدارندگی در عصاره اولیه متانولی و فراکشن اتیل استاتی جلبک *N. zanardinii* را به ترتیب ۱۵/۲۲٪ و ۱۱/۲۱٪ گزارش نمود که پایین‌تر از مقدار اندازه‌گیری شده در این پژوهش می‌باشد. همان‌گونه که پیش‌تر توضیح داده شد، این تفاوت احتمالاً به دلیل بالاتر بودن میزان فنول در عصاره جلبکی در پژوهش حاضر می‌باشد. تفاوت در میزان فنول ممکن است ناشی از عوامل خارجی (فشار، عمق، شوری، مواد مغذی) و عوامل ذاتی (نوع، سن، مرحله تولید مثل) باشد (Ganesan et al., 2011).

به‌طور کلی جاذب‌های فلزی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شوند، زیرا پتانسیل احیاء را کاهش داده و باعث پایداری فرم اکسید شده یون فلزی می‌شوند. در مطالعه حاضر بالاترین فعالیت جذب یون آهن در هر دو جلبک *P. australis* و *N. zanardinii* در فراکشن اتیل استاتی تیمار متانول ۱۰۰٪ مشاهده گردید. در هر دو جلبک میزان جذب یون فلزی در مقایسه با ترکیب استاندارد استفاده شده در این آزمایش یعنی EDTA (۰/۹۱±۰/۱۲) پایین‌تر بود ($P < 0.05$). نتایج مشابهی در مطالعه Chakraborty و همکاران (۲۰۱۳) گزارش گردید که در آن فعالیت جذب فلزی عصاره اتیل استاتی *Hypnea musciformis* و *Jania rubens* در مقایسه با دیگر عصاره‌ها بالاتر بود. Ye و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند که فراکشن اتیل استاتی و بوتانولی در جلبک قهوه‌ای *Sargassum pallidum* دارای قدرت احیاء بالاتری نسبت به دیگر فراکشن‌ها می‌باشد. بر اساس گزارش Lindsay (۱۹۹۶)، ترکیبات با ساختارهای دارای گروه‌های عاملی -OH، -SH، -COOH، -NR₂، PO₃H₂، -S- و -O- در صورت وجود شرایط بهینه محیطی دارای فعالیت جذب فلزی خواهند بود و آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه کارآمدی می‌باشند. در مطالعه حاضر در هر دو گونه جلبک میزان متفاوتی از جذب فلزی در هر تیمار مشاهده گردید ($P < 0.05$). از این رو به نظر می‌رسد که تفاوت در خاصیت احیاء بین تیمارهای مختلف در این مطالعه ناشی از تفاوت در ترکیب استخراج شده بسته به نوع حلال می‌باشد (Taheri, 2016).

قدرت احیاء یون آهن در هر دو جلبک *P. australis* و *N. zanardinii* عموماً در عصاره اولیه و فراکشن اتیل استاتی تیمار متانولی نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود. در هر دو جلبک، بالاترین میزان احیاء نسبت به BHT (۰/۹۲±۰/۱۶) در غلظت

مشابه، پایین‌تر بود ($P < 0.05$). نتایج مشابهی در مطالعه Chakraborty و همکاران مشاهده شد که قدرت احیاء عصاره اتیل استاتی *H. musciformis* را بالاتر از عصاره ان-هگزانی و دی‌کلرومتانی گزارش نمودند. هم‌چنین Kumar و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که قدرت احیاء (جذب در ۷۰۰ نانومتر، ۵-۵ mg/ml) عصاره متانولی (۰/۷۴-۰/۰۷) و اتیل استاتی (۰/۴۷۶-۰/۱۳) جلبک *Kappaphycus alvarezii* بالاتر از عصاره ان-هگزانی (۰/۱۶-۰/۰۱) می‌باشد. علاوه بر این، Wang و همکاران (۲۰۰۹) نیز میزان بالای قدرت احیاء کنندگی (معادل اسید آسکوربیک ۴۲۶ mg/g) در فراکشن اتیل استاتی جلبک *Rhodomela confervoides* را گزارش نمودند. توانایی احیاء یک عصاره به میزان زیادی ناشی از وجود احیاء کننده‌ها در آن می‌باشد. وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی احیاء کننده‌ها بر اساس شکست زنجیره رادیکال آزاد به وسیله یک اتم هیدروژن است. احیاء کننده‌ها با پیش‌سازهای خاصی از پراکسید واکنش می‌دهند و در نتیجه از تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند. ترکیبات جلبکی نیز ممکن است به شیوه مشابهی همانند احیاء کننده‌ها، از طریق اهداء الکترون و واکنش با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به محصولات پایدار و پایان بخشیدن به واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد عمل کنند (Ganesan et al., 2011).

جلبک‌های دریایی می‌توانند به عنوان منبع مناسبی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی استفاده شوند. این مطالعه نشان داد میزان استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های جلبکی بسته به نوع حلال متفاوت بوده و متانول و در ادامه اتیل استات حلال‌های مناسبی جهت استخراج و خالص‌سازی ترکیبات طبیعی از جلبک قهوه‌ای *N. zanardinii* می‌باشد. اگرچه میزان فنول و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در جلبک *N. zanardinii* به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به *P. australis* بالاتر بود، اما در غلظت مشابه در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی (BHT، آلفاتوکوفرول و EDTA) فعالیت کمتری را نشان داد. با این وجود میزان فنول بالا و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مناسب در جلبک *N. zanardinii* نشان می‌دهد که این جلبک می‌تواند با توجه به پراکنش بالای آن در سواحل جنوبی ایران، به عنوان یکی از منابع بالقوه ترکیبات طبیعی دریایی در نظر گرفته شود. در انتها لازم به ذکر است که پژوهش‌های بیشتری در زمینه شناسایی ساختار و تلخیص ترکیبات فنولی در جلبک‌های دریایی باید صورت گیرد تا بتواند کاربری مناسبی در مصارف آینده دارویی و آرایشی داشته باشد.

تقدیر و تشکر

از کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

- Airanthi, M., Hosokawa, M., Miyashita, K. 2011. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science*. 76: 104-111.
- Amarowicz, R., Naczka, M., Shahidi, F. 2000. Antioxidant activity of various fractions of non tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2755-2759.
- Arnold, T.M., Targett, N.M. 2003. To grow and defend: lack of trade offs for brown algal phlorotannins. *Oikos*. 2: 406-408.
- Attarn Fariman, G., Jangizehi Shastan, S., Zahedi, M.M. 2015. Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (*Nizamuddinina zanardinii* and *Cystoseira indica*) from Iran. *Journal of Applied Phycology*. 28: 1323.
- Baba, B.M., Wan Mustapha, W.A., Seng Joe, L. 2018. Effect of extraction methods on the yield, fucose content and purity of fucoidan from *Sargassum* sp. obtained from Pulau Lonkawi, Malaysia. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 22(1): 87-94.
- Blainski, A., Lopes, G.C., Palazzo de Mello, J.C. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu Method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 18(6): 6852-6865.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E., Gall, E.A. 2006. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica Marina*. 49(1): 39-46.

- Chakraborty, K., Joseph, D., 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.
- Chandini, S.K., Ganesan, P., Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*. 107: 707-713.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315: 161-169.
- Fernando, I.P., Kim, M., Son, K.T., Jeong, Y., Jeon, Y.J. 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: A mechanistic approach. *Journal of Medicinal Food*. 19(7): 615-28.
- Foon, T.S., Ai, L.A., Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Govindan, N. 2013. Studies on in-vitro antioxidant activity of marine edible seaweeds from the east coastal region of Peninsular Malaysia using different extraction methods. *Journal of Coastal Life Medicine*. 1(3): 193-198.
- Gall, A.A., Lechat, F., Hupel, M., Jegou, C., Stiger-Pouvreau, V. 2015. Extraction and purification of phlorotannins from brown algae. In: Stengel, D.B., Connan, S. (eds.). *Natural products from marine algae: Methods and Protocols, Methods in molecular biology*. Springer Science+Business Media New York. pp. 146-159.
- 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.
- Ganesan, P., Suresh Kumar, K., Subba Rao, P.V. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 73-78.
- Hafezieh, M., Moradi, Y., Pourkazemi, M., Dadgar, S., Sharifian, M. 2017. Determination of proximal and chemical composition of Sistan and Baluchistan province geographical beaches strain of *Sargassum ilicifolium*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 25(4): 133-144. (in Persian)
- Jormalainen, V., Honkanen, T., Vesakoski, O., Koivikko, R. 2005. Polar extracts of the brown alga *Fucus vesiculosus* (L.) reduce assimilation efficiency but do not deter the herbivorous isopod *Idotea baltica* (Pallas). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 317(2): 143-157.
- Kalaiselvan, I., Senthamarai, M., Kasi, P.D. 2016. 2,3,7,8-TCDD mediated toxicity in peripheral blood mononuclear cells is alleviated by the antioxidants present in *Gelidiella acerosa*: an in vitro study. *Environmental Science and Pollution Research International*. 23: 5111-5121.
- Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K., Jormalainen, V. 2007. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochemical Analysis*. 18: 326-332.
- Kumar, S.K., Ganesan, K., Rao, P.V.S. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii*, an edible seaweed. *Food Chemistry*. 107: 289-295.
- Lashkan, A.B., Rezaei, M., Rezaei, K., Seifabadi, S.J. 2012. Optimization of extraction of antioxidant compounds in microwave-assisted extracts of brown algae *Sargassum angustifolium*. *Journal of Fisheries*. 65(30): 243-255. (in Persian)
- Lindsay, R.C. 1996. Food additives. In: Fennema, O.R. (ed.). *Food Chemistry*. Marcel Dekker: New York. pp. 778-780.
- Liu, X. 2015. Extraction and antioxidant activity of phlorotannins from edible brown algae. Master thesis, North Carolina State University. 127 p.
- Lopez, A., Rico, M., Rivero, A., Tangil, M.S. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. 125: 1104-1109.
- Maharana, D., Das, P.B., Verlecar, X.N., Pise, N.M., Gauns, M. 2015. Oxidative stress tolerance in intertidal red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) in relation to environmental components. *Environmental Science and Pollution Research International*. 22: 18741-18749.
- Maqsood, S., Benjakul, S., Shahidi, F. 2013. Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 53: 162-79.
- Moon, J.K., Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 1655-1666.

- Nazemi, M., Pishavarzad, F., Motalebi, A.A., Ahmadzadeh, O. 2012. Investigation of antibacterial activities of sponge *Axinella sinoxea*'s extracts from Larak Island, Persian Gulf. *Journal of Aquatic Ecology*. 1(4): 65-54. (in Persian)
- Oyaizu, M. 1998. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 46: 571-575.
- Praveen, N.K., Chakraborty, K. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory potential of the aqueous extract and polysaccharide fraction from brown marine macroalgae *Padina* sp. from Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Coastal Life Medicine*. 1(1): 39-49.
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T. 2004. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*. 16(4): 291-296.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40: 945-948.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Taheri, A. 2016. Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 15(2): 802-817.
- Wang, T., Jonsdottir, R., Olafsdottir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 116: 240-248.
- Ye, H., Zhou, C., Sun, Y., Zhang, X., Liu, J., Hu, Q., Zeng, X. 2009. Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. *European Food Research and Technology*. 230(1): 101-109.
- Zhou, K., Yu, L. 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Food Science and Technology (LWT)*. 37: 717-721.