

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* خلیج فارس با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

نیلوفر آقاجانپور سورکوهی^۱، آریا باباخانی^{۲*}، مهدی طبرسا^۲

^۱گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران.

^۲گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

*نویسنده مسئول: babakhani@guilan.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۸

چکیده

در این مطالعه، شرایط مطلوب به منظور استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک *Sargassum angustifolium* با استفاده از روش سطح پاسخ تعیین شد. طراحی شرایط بهینه با سه متغیر مستقل درصد غلظت اتانول (در ۵ سطح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد)، مدت زمان استخراج (در ۳ سطح ۲، ۴ و ۶ ساعت) و نسبت جامد-مایع (در ۳ سطح ۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۵) انجام گردید. خاصیت آنتی‌اکسیدانی با آزمایش‌های میزان فنول کل (TPC)، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان فنول کل در شرایط بهینه در آب مقطر، مدت زمان ۶ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۱۵، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در اتانول ۲۵ درصد، مدت زمان ۴ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۵ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در اتانول ۵۰ درصد، مدت زمان ۴ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۱۵ به دست آمد. در شرایط ذکر شده بیش‌ترین مقدار TPC ۶۹۸/۰۱ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم پودر جلبک خشک شده، مقدار TAC ۱/۷۶ میلی‌گرم اسید آسکوربیک بر گرم پودر جلبک خشک شده و مقدار DPPH ۸۶/۰۲ (%RSA) بود. نتایج نشان داد که عصاره جلبک *S. angustifolium* می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در صنعت غذا و همچنین مکمل‌های غذایی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: جلبک، *Sargassum angustifolium*، بهینه‌سازی، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

در سال‌های اخیر شمار زیادی از منابع دریایی توسط محققان به‌منظور یافتن ترکیبات زیست فعال جهت توسعه انواع داروها و غذاهای سالم جدید مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Huimin et al., 2005). در این میان، ماکرو جلبک‌ها به‌عنوان گزینه‌ای مناسب و غنی از متابولیت‌های زیست فعال بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. جلبک‌ها با توجه به دارا بودن تنوع گونه‌ای زیاد، پراکندگی گسترده و اختصاصی بودن بسیاری از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیستی دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای به‌منظور بررسی‌های علمی هستند. جلبک‌های دریایی به‌عنوان منابع تجدیدپذیر به‌صورت پرورشی و یا طبیعی مدت زمان زیادی است که در رژیم غذایی مردمان نواحی مختلف کره زمین به‌ویژه در کشورهای آسیایی مانند چین، ژاپن و کره استفاده

می‌شوند (Nahas et al., 2007; Wang et al., 2009).

طبق آمارهای سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید جهانی جلبک‌های دریایی پرورشی در سال ۲۰۱۶ بیش از ۳۰ میلیون تن بوده است (FAO, 2018). از نظر تغذیه‌ای، جلبک‌ها غذاهایی کم‌کالری، همراه با مقادیر بالای مواد معدنی، فیبرهای غذایی، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای چرب چند غیراشباع می‌باشند (Kuda et al., 2005; Quiros et al., 2010; Souza et al., 2011).

تاکنون ترکیبات زیستی متعددی همراه با اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌ها شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیت‌های ثانویه و اولیه این جانداران می‌توانند با تبدیل به مواد زیست فعال در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گیرند (Choudhury et al., 2005; Choudhury et al., 2005).

ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای در راسته Fucales طبقه-بندی می‌شوند. گونه‌های بسیاری از این جنس در مناطق دریایی معتدل و استوایی پراکنده شده‌اند، جایی که در نقاط کم‌عمق و صخره‌های مرجانی اسکان گزیده‌اند (Hogan and Michael, 2011). جلبک قهوه‌ای سارگاسوم آنگوستیفولیوم (*S. angustifolium*) متعلق به خانواده سارگاسه‌آ (Sargassaceae) و از جمله جلبک‌های دریایی مهم خلیج فارس محسوب می‌شود (طولابی دزفولی و همکاران، ۱۳۹۵). در ایران، پیش از این مطالعات مفیدی در رابطه با جلبک‌های دریایی صورت پذیرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از امواج میکروویو جهت استحصال ترکیبات آنتی-اکسیداسیونی از جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* (باباخانی و همکاران، ۱۳۹۱)، بکارگیری امواج میکروویو در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* (گرمسیری و همکاران، ۱۳۹۳)، بهینه‌سازی استخراج عصاره آنتی‌اکسیدانی از جلبک دریایی *Chaetomorpha* sp. با کمک میکروویو و اولتراسوند و با استفاده از روش سطح پاسخ (سفری و همکاران، ۱۳۹۴)، تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول کل دو گونه جلبک دریایی خلیج فارس *Chaetomorpha* sp. و *Colpomenia sinuosa* در شرایط آزمایشگاهی (سفری و همکاران، ۱۳۹۴) و استخراج اتانولی و جزءگیری حلال-حلال ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک سبز (*Enteromorpha intestinalis*) (هاشم دباغیان و همکاران، ۱۳۹۵) اشاره کرد.

روش سطح پاسخ (RSM= Response Surface Method) یک روش آماری است که به منظور بهینه‌سازی پارامترهای فرآیند پیچیده با به حداقل رساندن تعداد آزمایشات مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مقایسه با آنالیز تک فاکتور، روش سطح پاسخ زمان کمتری را صرف کرده و محاسبات آن بسیار دقیق است (Bezerra et al., 2008). این

(Tuney et al., 2006). امروزه در بسیاری از کشورها فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های قرمز، قهوه‌ای و سبز مورد مطالعه قرار می‌گیرد که متناسب با محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از قبیل فنول، گروه‌های سولفات و سایر گروه‌های عامل، این خواص متغیر است (Zubia et al., 2007). عصاره جلبک دریایی غنی از ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشد که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها ثابت شده است (Gupta and Abu-Ghannam, 2011).

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با مهار رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها، فرآیند اکسیداسیون را به تأخیر انداخته و نیز با کاهش جهش‌های احتمالی از بیماری‌های قلبی و سرطان جلوگیری می‌کنند (Yan et al., 1999; Samaraweera et al., 2012). بنابراین در طی دو دهه گذشته، طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی گیاهی به‌منظور محافظت از بافت‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از اکسیژن و همچنین کاهش خطرات ناشی از بیماری‌های مزمن در انسان مورد بررسی قرار گرفت (Halvorsen et al., 2006). نتایج تحقیقی بر روی جلبک قهوه‌ای *Stypocaulon scoparinum* نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراجی جلبک وجود دارد (Lopez et al., 2011). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها راه مؤثری برای کاهش یا جلوگیری از اکسیداسیون چربی در محصولات غذایی با به تأخیر انداختن تشکیل محصولات سمی ناشی از اکسیداسیون و حفظ کیفیت و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی است. با توجه به خواسته مصرف‌کنندگان برای غذاهای حاوی مواد نگهدارنده طبیعی، شناسایی و استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی که جایگزین مواد مصنوعی شوند و یا به‌عنوان آنتی‌اکسیدان ثانویه در سیستم‌های غذایی به کار گرفته شوند، ضروری است (Gupta and Abu-Ghannam, 2011).

جلبک‌های *Sargassum* به‌عنوان یک جنس از

عصاره‌گیری به روش غوطه‌وری: برای طراحی آزمایش‌ها از RSM استفاده گردید. استخراج با استفاده از حلال آب و اتانول (با ۵ غلظت ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد اتانول)، در ۳ مدت زمان استخراج (۲، ۴، ۶ ساعت) و ۳ نسبت جامد-مایع (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۵) انجام شد. محدوده متغیرها براساس نتایج آزمایش‌های اولیه تعیین گردید. برای انجام فرآیند استخراج، نمونه جلبک آسیاب شده، با توجه به نسبت‌ها و غلظت‌های گفته شده از هر حلال (اتانول و آب) به طور جداگانه، در حال هم‌زدن بر روی یک همزن مغناطیسی با آهنربایی به ابعاد $4 \times 3/6$ cm در مدت زمان‌های تعیین شده در تاریکی خیس‌انده شد. دمای استخراج ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (Bouras et al., 2015). برای جداسازی جلبک پودر شده، مخلوط با کاغذ صافی (واتمن ۴۲) صاف شد. ۳۰ دقیقه پس از استخراج، عصاره زیر صافی، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. عصاره‌ها قبل از اندازه‌گیری در بطری‌های تیره برای جلوگیری از تجزیه با نور نگهداری شدند (Sudhakar et al., 2013).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (*DPPH=1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*): بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، طبق روش (Brand-Williams et al., 1995) انجام شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی (Merck, Germany) ۰/۱۶ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (UV/Vis 2100) خوانده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره مطابق رابطه ۱

روش اغلب در توسعه پارامترهای مختلف استخراج پلی‌ساکاریدها، ترکیبات فنولی، رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها از بیوماس‌های مختلف استفاده شده است (Ge et al., 2002; Qiao et al., 2009; Hii et al., 2015).

این پژوهش با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* با کمک روش سطح پاسخ به اجرا درآمد. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از آزمایش‌های میزان فنول کل، فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل استفاده شد. ضمن این‌که شاخص‌های متعددی می‌توانستند به‌طور بالقوه کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهند که این عوامل با کمک طراحی‌های آماری آزمایشی با عنوان روش سطح پاسخ ارزیابی شدند و در نهایت شرایط بهینه استخراج تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه جلبک: نمونه‌های جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* به‌طور تازه از بندر بوشهر، اسکله جلالی، منطقه ریشهر (۸ کیلومتری جنوب شهر بوشهر) در نیمه دوم اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جلبک به آزمایشگاه فرآوری دانشکده منابع طبیعی صومعه‌سرا منتقل و پس از چند مرحله شستشو با آب دریا جهت حذف باقی‌مانده اپی‌فیت‌ها، شن، ماسه و نمک، دوباره با آب شیرین شست‌شو گردید. نمونه‌ها در آون (به‌داده، شرکت تولیدی تجهیزات پزشکی) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد (صادقی و همکاران، ۱۳۹۶). نمونه‌های خشک شده جلبک با استفاده از آسیاب برقی (هاردستون، مدل GCS2700W، ساخت انگلستان) پودر و با توری که اندازه منافذ آن $900 \mu\text{m}$ است، الک شدند. ذرات بزرگ‌تر از $900 \mu\text{m}$ در آزمایشات استفاده نشد. نمونه پودر شده در کیسه‌های پلاستیکی زیپ کیپ در یخچال برای استفاده در آزمایش‌های استخراج نگهداری گردید.

استخراجی با حجم معینی از همان حلال مورد استفاده برای استخراج، به حجم معینی رسانده شدند. مقدار یک دهم میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتر ریخته شده و مقدار نیم میلی‌لیتر معرف فولین‌سیوکالتو (Sigma-Aldrich, America) ۵۰ درصد به آن افزوده و مخلوط شد. سپس یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (Merck, Germany) ۲ درصد اشباع افزوده و با آب مقطر به حجم رسانده شد و پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/Vis 2100) در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. از اسید گالیک (Merck, Germany) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. برای رسم منحنی استاندارد گالیک اسید، در ابتدا یک محلول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از گالیک اسید ساخته شد. مقادیر صفر، دو، شش و هشت دهم میلی‌لیتر از این محلول به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتر اضافه کرده، سپس نیم میلی‌لیتر معرف فولین‌سیوکالتو به هر کدام از بالن‌ها افزوده و همگن گردید. بعد از آن یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به همه بالن‌ها اضافه شده و با آب مقطر به حجم رسانده شدند و بعد از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شدند. برای تهیه محلول شاهد نیز، بدون افزودن گالیک اسید تمامی مراحل بالا تکرار گردید. داده‌ها براساس میلی‌گرم گالیک اسید بر صد گرم ماده خشک گزارش شدند. معادله منحنی استاندارد برابر با رابطه ۳ است:

$$\text{رابطه ۳: } (Y=85.758x, R^2=0.9969)$$

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری: روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی برای توسعه، ارتقاء و بهینه‌سازی فرآیندهاست که برای ارزیابی معنی‌داری نسبی چند متغیر مؤثر حتی موقعی که روابط پیچیده‌ای موجود است، استفاده می‌شود (Myers and Montgomery, 2002). در این تحقیق از نرم‌افزار Design-Expert ورژن ۱۱ و

محاسبه و به‌صورت درصد (RSA Radical scavenging activity) بیان گردید.

رابطه ۱:

$$RSA\% = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] * 100$$

که در آن A_{sample} جذب نمونه و محلول DPPH بعد از زمان مورد نظر، A_{control} جذب محلول DPPH بدون نمونه و $A_{\text{sample blank}}$ جذب نمونه بدون محلول DPPH است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total Antioxidant Capacity): برای اندازه‌گیری فعالیت

آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های جلبکی؛ ۲ میلی‌لیتر از عصاره با ۲ میلی‌لیتر محلول معرف مخلوط شده و در لوله‌های درب‌دار قرار داده شد. محلول معرف شامل ۰/۶ مولار اسید سولفوریک (Merck KGaA, Darmstadt Germany 95-97% 64271)، ۲۸ میلی‌مولار سولفات سدیم (Merck, Germany) و ۴ میلی‌مولار آمونیوم مولیبدات (Merck, Germany) بود. لوله‌های شیشه‌ای درب‌دار به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آبی (دمای ۹۵ درجه سلسیوس) قرار داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/Vis 2100) در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید آسکوربیک (Merck, Germany) در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید و قدرت آنتی‌اکسیدانی کل برحسب میزان اکی‌والان اسید آسکوربیک (Merck, Germany) (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) بیان شد (Prieto et al., 1999). معادله منحنی استاندارد برابر با رابطه ۲ است:

$$\text{رابطه ۲: } (Y=0.1505x, R^2=0.9917)$$

تعیین میزان فنول کل (Total phenolic content): میزان فنول‌های کل جلبک براساس روش

فولین‌سیوکالتو اندازه‌گیری گردید (Singleton and Rossi, 1965). ابتدا هر یک از نمونه‌های عصاره

جدول ۱ - نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها در روش غوطه‌وری.

سطح مربوطه	نماد ریاضی	متغیر مستقل
۰ ۲۵ ۵۰ ۷۵ ۱۰۰	X ₁	غلظت اتانول به آب (درصد)
۲ ۴ ۶	X ₂	زمان (ساعت)
۱:۵ ۱:۱۰ ۱:۱۵	X ₃	نسبت جامد به مایع (گرم/میلی‌لیتر)

وری: تعداد ۲۰ آزمایش برای بهینه‌سازی شاخص‌های مورد بررسی به صورت تصادفی انجام شد و مقادیر پاسخ‌ها در ترکیب‌های متفاوت آزمایشی در جدول ۲ نشان داده شده‌است.

نرم‌افزار مدل‌های پیش‌بینی شده را به صورت معادلات رگرسیون حاصل از آنالیز واریانس (ANOVA) در مورد هر یک از پاسخ‌ها برای ما فراهم کرد که به صورت زیر است:

$$Y_{TAC} = -0.165420 - 0.002617X_1 + 0.000235X_2 + 0.080266X_3$$

$$Y_{TPC} = -450.54314 + 1.88487X_1 + 84.83917X_2 + 95.67131X_3 - 1.11979X_1X_2 - 0.357557X_1X_3 + 0.060181X_1^2 - 3.75180X_2^2$$

$$Y_{DPPH} = +83.47865 + 0.353233X_1 + 10.18496X_2 - 8.80043X_3 - 0.024439X_1X_2 - 0.037524X_1X_3 - 0.344045X_2X_3 - 0.004922X_1^2 - 0.424097X_2^2 + 0.512163X_3^2$$

اثبات مناسب بودن مدل: بهینه‌سازی فرآیند

استخراج با استفاده از معادله چند جمله‌ای مرتبه دوم انجام شد. داده‌های تجربی در جدول ۳ نشان داده شده‌است. نرم‌افزار برای اثبات کارایی و تناسب مدل ضریب تبیین (R^2)، ضریب تطابق یافته ($Adj.R^2$) و ضریب پیش‌بینی ($pre.R^2$) را نیز ارائه می‌دهد (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005) که حاصل از آنالیز واریانس ANOVA است. این مقادیر در واقع صحت مدل انتخاب شده برای پیش‌بینی پاسخ‌ها را مبنی بر مقادیر به‌دست آمده در شرایط واقعی توجیه می‌کند. ضرایب تبیین بالای ذکر شده برای هر پاسخ می‌تواند نشانه‌ای از توان و تناسب بالای مدل و نشان‌دهنده قابلیت پیش‌بینی پاسخ‌ها از طریق مدل باشد (Ballard et al., 2010). این ضرایب در ارتباط با هم هستند و مقادیر آن‌ها می‌بایست به هم نزدیک باشد. هم‌چنین، معنی‌داری مدل‌های انتخاب شده از نظر آماری به میزان P

از طرح (Optimal (Custom) با سه متغیر مستقل و پنج تکرار در نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) جهت بررسی شرایط استخراج و بهینه‌سازی فرآیند مذکور استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل غلظت اتانول (X_1) در ۵ سطح، زمان (X_2) و نسبت جامد-مایع (X_3) که در ۳ سطح کدگذاری شدند و متغیرهای وابسته (پاسخ‌ها) (میزان فنول کل، فعالیت جذب رادیکال آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) می‌باشند.

مدل مورد استفاده در RSM عموماً رابطه درجه دوم می‌باشد. در RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، برای سه فاکتور معادله چندجمله‌ای به صورت زیر است:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

در این تابع Y نشان‌دهنده مقدار پاسخ پیش‌بینی شده متغیرهای مورد آزمایش‌ها، β_0 عدد ثابت یا عرض از مبدأ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} ضرایب مدل رگرسیون و X_i و X_j متغیرهای مستقل اند. X_1^2 ، X_2^2 ، X_3^2 و $X_i X_j$ تأثیرات مجذور متغیرها و $X_i X_k$ و $X_i X_j$ و ... تأثیرات کنش متقابل بین متغیرها و K تعداد پارامترهای مستقل است. برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها از آنالیز ANOVA استفاده شد. معنی‌داری آماری تمامی اجزای مدل در سطوح احتمال (P) ۰/۰۵ بررسی شد. پس از بهینه‌سازی، کفایت معادله مدل برای پیش‌بینی مقادیر پاسخ مطلوب با نتایج تجربی تأیید و در نهایت شرایط بهینه تعیین گردید.

نتایج

بهینه‌سازی شرایط استخراج در روش غوطه‌-

جدول ۲ - طراحی آزمایشی متغیرهای مستقل و پاسخ‌های میزان فنول کل، فعالیت جذب رادیکال آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ردیف استاندارد	شماره آزمایش	فاکتور ۱ (درصد غلظت اتانول به آب)	فاکتور ۲ (زمان دقیقه)	فاکتور ۳ نسبت جامد به مایع (گرم/میلی-لیتر)	پاسخ ۱ میزان فنول کل (TPC) ^a	پاسخ ۲ فعالیت جذب رادیکال آزاد (DPPH) ^b	پاسخ ۳ ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل (TAC) ^c
۱۳	۱	۱۰۰	۶	۱۰	۳۸۸/۲۸	۱۱/۲۳	۰/۲۰
۱	۲	۰	۲	۵	۱۰۳/۲۵	۶۲/۶۰	۰/۰۳
۱۲	۳	۵۰	۶	۱۰	۲۱۲/۰۶	۵۸/۵۴	۰/۷۳
۳	۴	۲۵	۴	۵	۱۹۱/۲۴	۸۶/۰۲	۰/۴۴
۱۵	۵	۰	۲	۱۵	۳۱۳/۳۶	۸۴/۵۰	۰/۹۹
۷	۶	۵۰	۲	۱۰	۱۷۶/۱۱	۴۱/۵۳	۰/۹۴
۲۰	۷	۰	۶	۱۵	۶۹۸/۰۱	۷۸/۲۴	۰/۸۵
۸	۸	۰	۴	۱۰	۴۱۲/۰۵	۵۷/۷۸	۰/۴۴
۱۱	۹	۷۵	۴	۱۰	۴۸۰/۲۴	۳۴/۰۲	۰/۰۱
۴	۱۰	۱۰۰	۴	۵	۴۰۳/۸۲	۲۸/۳۱	۰/۰۲
۱۰	۱۱	۷۵	۴	۱۰	۲۸۰/۷۹	۲۹/۵۵	۰/۰۲
۲	۱۲	۷۵	۲	۵	۲۵۷/۱۷	۵۷/۷۸	۰/۰۱
۱۴	۱۳	۱۰۰	۶	۱۰	۴۵۷/۱۸	۰/۰۷	۰/۰۵
۱۹	۱۴	۵۰	۴	۱۵	۲۶۳/۳۶	۵۰/۶۹	۱/۷۶
۱۸	۱۵	۵۰	۴	۱۵	۲۶۱/۴۵	۵۲/۶۹	۱/۰۴
۹	۱۶	۰	۴	۱۰	۴۶۰/۹۸	۷۴/۷۲	۰/۴۶
۱۷	۱۷	۱۰۰	۲	۱۵	۳۱۸/۱۰	۴/۸۲	۱/۲۱
۶	۱۸	۵۰	۲	۱۰	۴۴۴/۲۳	۳۴/۷۸	۰/۵۶
۱۶	۱۹	۵۰	۲	۱۵	۱۱۱/۴۱	۴۰/۲۲	۰/۲۳
۵	۲۰	۲۵	۶	۵	۳۸۳/۲۸	۸۱/۴۷	۰/۶۰

^a همه داده‌ها برحسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم پودر جلبک خشک شده بیان شده.

^b همه داده‌ها برحسب درصد جذب رادیکال آزاد بیان شده.

^c همه داده‌ها برحسب میلی‌گرم اسید آسکوربیک بر گرم پودر جلبک شده بیان شده.

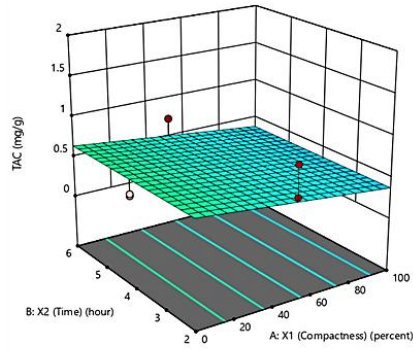
جدول ۳ - نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در روش استخراج غوطه‌وری.

ضرایب	TAC	TPC	DPPH
مدل	۰/۰۲	۰/۰۱	< ۰/۰۰۰۱
X ₁	۰/۳۱	۰/۵۴	۰/۲۴
X ₂	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۱
X ₃	۰/۰۰	۰/۰۳	۰/۰۶
X ₁ X ₂	-	۰/۰۲	۰/۵۵
X ₁ X ₃	-	۰/۰۵	۰/۰۴
X ₂ X ₃	-	-	۰/۳۹
X ₁ ²	-	۰/۰۱	۰/۰۳
X ₂ ²	-	-	۰/۷۰
X ₃ ²	-	۰/۰۷	۰/۰۲
مقادیر عدم برازش	۰/۱۲	۰/۷۴	۰/۱۸
ضرایب تبیین	۰/۴۴	۰/۷۲	۰/۹۴
ضرایب تطابق یافته	۰/۳۳	۰/۵۶	۰/۸۸
ضرایب پیش‌بینی شده	۰/۱۵	۰/۳۱	۰/۱۸

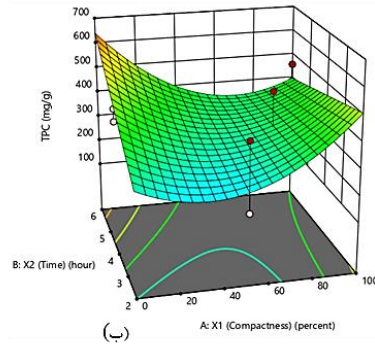
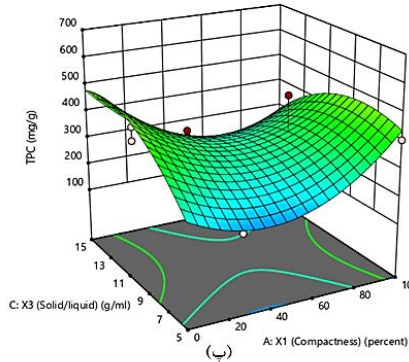
به دست آمده‌است که معنی‌داری این رگرسیون‌ها را نشان می‌دهد. از طرف دیگر نبود معنی‌داری مقادیر عدم برازش تأیید اعتبار مدل‌هاست (Wansundara and Shahidi, 1996).

علاوه بر این، مقادیر ضرایب تبیین تطابق یافته و ضرایب تبیین پیش‌بینی برای TAC به ترتیب بالای ۳۰ و ۳۳ درصد، برای TPC به ترتیب بالای ۵۶ و ۳۰

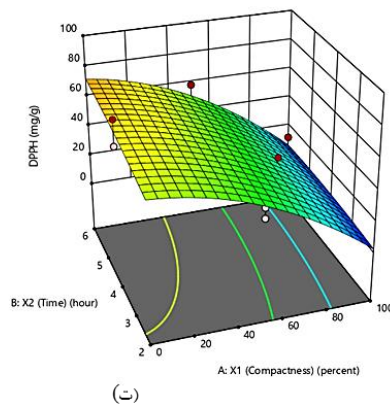
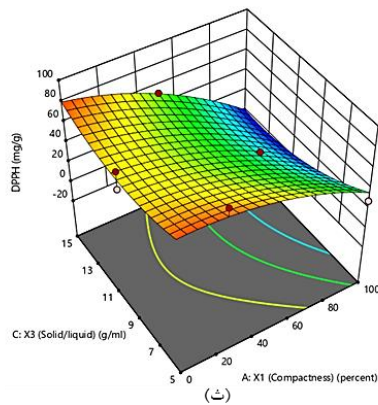
بستگی دارد و مدل‌هایی با میزان P کم‌تر نشان‌دهنده معنی‌داری بیش‌تر مدل به کار گرفته شده و پارامترهای دخیل در آن است (سفری و همکاران، ۱۳۹۴). این مدل با توجه به داده‌های به دست آمده بسیار مناسب بوده و دارای تغییرات کمی در میزان ضریب تبیین می‌باشد. همان‌طور که از جدول ۳ برمی‌آید مقادیر تمامی ضرایب تبیین بالای ۴۰ درصد



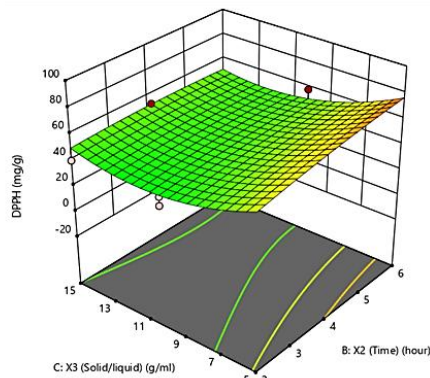
الف - نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج (TAC).



(ب) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع (TPC) و (ب) و مدت زمان استخراج (TPC)



(ت) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج (DPPH) و (ث) و نسبت جامد-مایع (DPPH)



(ج) نمودار اثر هم‌زمان مدت زمان استخراج و نسبت جامد-مایع (DPPH).

شکل ۱ - نمودارهای سطح پاسخ متغیرهای وابسته میزان TAC، TPC و DPPH در روش استخراج غوطه‌وری.

بینی شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* به‌خوبی عمل خواهند کرد.

درصد و برای DPPH به‌ترتیب بالای ۸۸ و ۱۸ درصد می‌باشد و در توافق منطقی با ضریب تبیین قرار دارند. نتایج نشان می‌دهد که این مدل‌ها برای پیش-

جدول ۴ - شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در روش غوطه‌وری.

مقادیر واقعی	مقادیر پیش‌بینی شده	روش غوطه‌وری	متغیرهای مستقل	
			۵۰	درصد اتانول به آب
۱/۷۶	۰/۹۱	TAC	۴	زمان
			۱:۱۵	نسبت جامد-مایع
۶۹۸/۰۱	۶۴۹/۴۱	TPC	۰	درصد اتانول به آب
			۶	زمان
			۱:۱۵	نسبت جامد-مایع
۸۶/۰۲	۷۷/۹۷	DPPH	۲۵	درصد غلظت اتانول
			۴	زمان
			۱:۵	نسبت جامد-مایع

پاسخ در اتانول ۵۰ درصد و مدت زمان ۴ ساعت به دست آمد.

نمودار (ب) مربوط به TPC در شکل ۱ اثر هم-زمان در درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ۴ ساعت نشان می‌دهد. با توجه به نمودار با افزایش نسبت جامد-مایع و کاهش درصد غلظت اتانول، میزان پاسخ افزایش می‌یابد. نمودار (پ) در نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ مربوط به TPC اثر متقابل درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج نشان داد که با کاهش درصد غلظت اتانول و افزایش مدت زمان استخراج، میزان TPC افزایش می‌یابد. بنابراین بیش‌ترین مقدار TPC در آب مقطر (اتانول صفر درصد)، مدت زمان ۶ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۱۵ به دست آمد.

در نمودار (ت) در نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ مربوط به DPPH اثر متقابل درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج نشان داد که با کاهش درصد غلظت اتانول و افزایش مدت زمان استخراج، میزان DPPH افزایش می‌یابد. در نمودار (ث) در مدت زمان ۴ ساعت مربوط به DPPH با کاهش درصد غلظت اتانول و افزایش نسبت جامد-مایع، میزان DPPH افزایش می‌یابد. در نمودار (ج) در اتانول ۵۰ درصد اثر متقابل مدت زمان استخراج و نسبت جامد-مایع بر مقدار DPPH نشان داد که با افزایش مدت زمان و کاهش نسبت جامد-مایع، میزان DPPH افزایش یافت. بنابراین بیش‌ترین میزان DPPH در اتانول ۲۵

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود نسبت جامد-مایع (X_3) بیش‌ترین تأثیر را در میزان پاسخ AC داشته است ($P < 0.05$). از میان فاکتورهای مورد بررسی، فاکتورهای زمان (X_2)، نسبت جامد-مایع (X_3)، اثر متقابل درصد غلظت اتانول و زمان (X_1X_2) و توان دوم درصد غلظت اتانول (X_1^2) در میزان پاسخ TPC دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$). فاکتورهای اثر متقابل درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع (X_1X_3)، توان دوم درصد غلظت اتانول (X_1^2) و توان دوم نسبت جامد-مایع (X_3^2) در میزان پاسخ DPPH اختلاف معنی‌داری نداشته‌است ($P < 0.05$).

تأثیر متغیرهای فرآیند: برای برآورد اثر هر پارامتر و تعامل آن با پاسخ، نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی به‌عنوان تابع هر دو متغیر ترسیم شد، در حالی‌که متغیر دیگر در نقطه مرکزی ثابت گردید. در شکل ۱ تأثیر شاخص‌های اولیه درصد غلظت اتانول، زمان و نسبت جامد-مایع در میزان پاسخ‌های TAC، TPC و DPPH نشان داده شده است.

در نمودار (الف) در نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ اثر هم‌زمان دو متغیر درصد غلظت اتانول و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) عصاره جلبک نشان داده شده‌است. براین اساس با کاهش درصد غلظت اتانول و افزایش مدت زمان استخراج، میزان پاسخ نیز افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان

درصد، مدت زمان ۴ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۵ به دست آمد.

آزمایش‌های اعتبارسنجی: اختلاف کم بین داده‌های پیش‌بینی شده از طریق نرم‌افزار و داده‌های به دست آمده در شرایط واقعی درستی عملکرد را در آزمایش‌های انجام شده تأیید می‌کند. از جمله اولویت‌های اصلی برای شرایط بهینه محدودیت‌های درصد غلظت اتانول، زمان و نسبت جامد-مایع بود. در روند بهینه‌سازی میزان مصرف حلال حداقل و میزان استخراج عصاره حداکثر در نظر گرفته شد. همچنین نسبت جامد-مایع و مدت زمان استخراج در محدوده تعریف شده در نظر گرفته شد تا بر این اساس بهینه‌سازی فاکتورهای تأثیرگذار انجام شود. استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به کمک روش غوطه‌وری از جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* با روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی شد. شرایط استخراج بهینه در روش مذکور در جدول ۴ ارائه شده است.

بحث

به‌طور کلی روش حلالی معمولی‌ترین روش مورد استفاده در استخراج از نمونه‌های گیاهی به‌شمار می‌رود (Souza et al., 2011). متغیرهای متعددی مانند مدت زمان استخراج، دما، نسبت جامد-مایع و نوع حلال می‌توانند فعالیت بیولوژیکی و عملکرد عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Yang et al., 2010). با توجه به پیچیدگی ساختار و خواص ترکیبات زیست فعال و ساختار مواد استخراج شده، پروتکل عمومی جهت استخراج موجود نیست (Thoo et al., 2010).

ماهیت حلال پارامتر بحث برانگیزی است که بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد (Nacz and Turkmen et al., 2006; Shahidi, 2004). حلالیت ترکیبات فنولی به‌شدت به نوع حلال مورد استفاده، درجه پلیمریزاسیون فنول‌ها و تعامل فنول‌ها با سایر مواد تشکیل دهنده و ساختار ترکیبات غیر محلول بستگی دارد (Djeridane et al., 2006).

استخراج ترکیبات فنولی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنول‌ها نقش بسیار مهمی دارد (Nazdk and Shahidi, 2006). در مطالعه‌ای که تأثیر حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، آب/متانول) بر ترکیبات فنولی یک گونه جلبک مورد آزمایش قرار گرفت، آب بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل را داشت و حلال آب/متانول نیز پس از آب دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود (Lopez et al., 2011). قدرت استخراج ترکیبات فنولی در عصاره‌های آبی چندین برابر عصاره‌های متانولی و اتانولی است که قطبی بودن بیش‌تر آب نسبت به دو حلال دیگر باعث این امر شده است. از دلایل دیگر مناسب‌تر بودن حلال آبی در استخراج ترکیبات فنولی، ویژگی‌های ساختاری گونه مورد مطالعه می‌باشد. شاخص‌های زیادی بر استخراج تأثیر می‌گذارد و قبل از انجام آزمایش نمی‌توان تصویری روشن از تفاوت‌های بین حلال‌ها و دیگر عوامل پیش‌بینی کرد (باباخانی و همکاران، ۱۳۹۱). براساس مطالعات متعدد، اضافه کردن درصد کم آب به حلال (به‌خصوص استون) باعث بهبود عملکرد استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Zhou and Yu, 2006; Zhao et al., 2004). سیستم‌های حلالی با قطبیت کم، مانند آب-اتانول و آب-متانول، معمولاً برای استخراج ترکیبات فنولی از مواد گیاهی خشکی (Thoo et al., 2010; Ghitescu et al., 2015; Li et al., 2016) و همچنین جلبک‌های دریایی (He et al., 2013; Fu et al., 2016) استفاده می‌شود. در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۰۹) نیز که بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی چندین گونه جلبک دریایی ایسند انجام شد، حلال استون در ترکیب با آب جهت استخراج ترکیبات فنولی از بیش‌تر گونه‌ها بالاترین تأثیر را از خود نشان داد. زیرا استون می‌تواند از تشکیل کمپلکس پروتئین-پلی‌فنول در طول استخراج جلوگیری کرده و حتی باندهای هیدروژنی تشکیل شده بین گروه‌های پلی‌فنول و گروه کربوکسیل پروتئین را بشکند و از این جهت می‌تواند

است، به طوری که در نسبت جامد-مایع ۱:۱۵ بیش-ترین میزان TAC و TPC و در نسبت جامد-مایع ۱:۵ بیش‌ترین میزان DPPH به دست آمد. عصاره‌گیری به زمان و دمای استخراج بستگی دارد. به طوری که عصاره‌گیری تا زمانی که استخراج به حداکثر برسد، افزایش می‌یابد (Bachir Bey et al., 2014). ترکیبات فنولی موجود در عصاره به شدت تحت تأثیر زمان استخراج می‌باشد (Rusak et al., 2008). Balavigneswaran و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی-ساکاریدهای استخراج شده میکروجلبک *Isocrysis galbana* با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. در این مطالعه ۳ فاکتور زمان (۳ تا ۴ ساعت)، دما (۶۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و نسبت آب به مواد خام (۱۰ تا ۳۰ درصد) را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها شرایط بهینه در این آزمایش را زمان ۳/۵ ساعت، دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت آب به مواد خام ۱۰ درصد گزارش نمودند. در مطالعه Elboughdiri (۲۰۱۸) بر روی تأثیر زمان، نسبت حلال-جامد، غلظت اتانول و دما در استخراج ترکیبات فنولی از برگ‌های زیتون کار شد. در این پژوهش زمان در ۴ سطح (۱۰ تا ۵۰ ساعت)، نسبت حلال به جامد در ۳ سطح (۲۰، ۲۵ و ۳۰)، درصد غلظت اتانول در ۴ سطح (۶۰، ۷۰ و ۸۰ درصد) و دما در ۳ سطح (۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شرایط مطلوب به منظور استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ‌های زیتون در مدت زمان ۲۰ ساعت، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال-جامد ۱:۳۰ و اتانول ۸۰ درصد بود. Dang و همکاران (۲۰۱۷) مطالعه‌ای بر روی بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک *Hormosira banksii* توسط امواج فراصوت با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. حلال مورد استفاده در این آزمایش اتانول ۷۰ درصد و نسبت جامد-مایع ۱:۵۰ در نظر گرفته شد. این محققین گزارش نمودند که دما و

مؤثرترین حلال برای استخراج این ترکیبات باشد. همانند دیگر تحقیقات انجام شده، در آزمایش حاضر نیز حلال نقش مؤثری در میزان ترکیبات آنتی-اکسیدانی داشت. به طوری که بیش‌ترین میزان TAC در اتانول ۵۰ درصد، TPC در آب مقطر و DPPH در اتانول ۲۵ درصد به دست آمد.

Liu و همکاران (۲۰۱۹) مطالعه‌ای در زمینه بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Ascophyllum nodosum* با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. در این تحقیق ۳ متغیر نسبت حلال به جامد (۳۰ تا ۷۰ میلی‌لیتر در گرم)، درصد غلظت اتانول (۴۰ تا ۸۰ درصد) و دمای استخراج (۲۰-۶۰°C) جهت بهینه‌سازی فرآیند استخراج مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین میزان آنتی‌اکسیدان در اتانول ۸۰ درصد، نسبت حلال-جامد ۷۰ میلی‌لیتر/گرم و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. هم‌چنین گزارش کردند، هنگامی که نسبت حلال به نمونه جامد نسبتاً کم است، به عنوان مثال بین ۳۰ و ۴۰ میلی‌لیتر بر گرم، افزایش غلظت اتانول باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌شود. هنگامی که غلظت اتانول بالا باشد، مثلاً بیش از ۶۵ درصد، افزایش نسبت حلال به نمونه جامد قطعاً می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. نتایج مشابهی نیز توسط Prasad و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده-است که افزایش غلظت اتانول و نسبت مایع-جامد می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی از عصاره پوست انبه سفید *Mangifera pajang* را افزایش دهد. در مطالعه‌ای Wani و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند که بیش‌ترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت بالای متانول و کم‌ترین نسبت حلال-نمونه می‌باشد. Ruperez و همکاران (۲۰۰۲) گزارش دادند که تنها مقدار کمی پلی‌فنول‌ها (کم‌تر از ۳ گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در عصاره آبی جلبک قهوه‌ای *Fucus vesiculosus* تشخیص داده شد. همانند مطالعات پیشین، در آزمایش حاضر نسبت جامد-مایع در میزان ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی تأثیر گذاشته-

زمان استخراج اثر مستقیم روی فعالیت آنتی-اکسیدانی داشته‌است. شرایط بهینه استخراج برای حداکثر مقادیر TPC و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان ۶۰ دقیقه و قدرت ۱۵۰ وات بود. Al-Dhabi و همکاران (۲۰۱۶) در زمینه تأثیر امواج فراصوت در استخراج جامد-مایع ترکیبات فنولی از تفاله قهوه تحقیق کردند. در این پژوهش عملکرد استخراج با افزایش مدت زمان استخراج (تا ۳۶ دقیقه) افزایش یافت، در حالی که بازده استخراج بعد از ۳۶ دقیقه به‌طور غیرمستقیم متناسب با زمان بود. مدت زمان طولانی باعث تخریب ساختاری ترکیبات فنولی شده و این امر منجر به کاهش بهره‌وری استخراج می‌گردد. از لحاظ اقتصادی، مدت زمان کم‌تر به صرفه‌تر می‌باشد (Sahin and Samli, 2013). هم‌چنین Al-Dhabi و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که نسبت جامد-مایع به‌طور قابل ملاحظه‌ای بر عملکرد ترکیبات فنولی تأثیر می‌گذارد. حجم حلال به‌طور غیرمستقیم متناسب با ویسکوزیته و غلظت حلال است. نسبت جامد-مایع (۱:۵) تا (۱:۳۰) گرم/میلی‌لیتر) و اثر آن در میزان پاسخ متفاوت بود. عملکرد استخراج در نسبت جامد-مایع (۱:۵) تا (۱:۲۵) گرم/میلی‌لیتر) افزایش یافت. در حالی که عملکرد استخراج در نسبت جامد-مایع بالاتر از (۱:۲۵) گرم/میلی‌لیتر، کاهش یافت. این امر به دلیل افزایش ناخالصی‌های محلول (پروتئین و پلی‌ساکارید) می‌باشد که مانع از انحلال ترکیبات فنولی می‌گردد (Maran et al., 2013). این پدیده در ارتباط با اصول انتقال جرم قرار دارد که بیان می‌کند، سرعت انتشار به‌طور مستقیم متناسب با شیب غلظت است که در نسبت جامد-مایع کم‌تر، افزایش می‌یابد (Al-Dhabi et al., 2016).

زمان (۳ تا ۵ ساعت) و نسبت آب به ماده خام (۲۰ تا ۳۰ میلی‌لیتر/گرم) با استفاده از طرح باکس بنکن بهینه‌سازی شد. شرایط بهینه استخراج در مدت زمان ۴/۳ ساعت، دمای استخراج ۸۴ درجه سانتی-گراد و نسبت آب به ماده خام ۲۷ میلی‌لیتر/گرم بود. تحت شرایط فوق میزان پلی‌ساکارید ناخالص به دست آمده $9/15 \pm 0/23\%$ ، میزان فنول کل پلی‌ساکارید ناخالص $2/11 \pm 0/04$ گالیک‌اسید/۱۰۰ میلی‌گرم و میزان DPPH $45/9$ درصد بود. طاهری و همکاران (۱۳۹۷) مطالعه‌ای در زمینه بهینه‌سازی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک قهوه‌ای (*Sargassum glaucescens*) در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. آن‌ها در این مطالعه ۳ فاکتور زمان (۱، ۳ و ۵ ساعت)، دما (۲۴، ۴۷ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و درصد غلظت متانول (۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد) را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی، غلظت حلال ۹۹/۳۹ درصد، دمای ۵۷/۶۶ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴/۳۲ ساعت به‌عنوان تیمار بهینه استخراج عصاره به‌دست آمد. همانند یافته‌های قبلی در آزمایش حاضر در مدت زمان ۴ ساعت بیش‌ترین میزان TAC و DPPH و در مدت زمان ۶ ساعت بیش‌ترین میزان TPC بود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق تفاوت‌های قابل ملاحظه در میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* ممکن است در نتیجه شرایط متنوع استخراج از قبیل تفاوت در درصد غلظت اتانول، مدت زمان استخراج و نسبت جامد-مایع باشد. مدل تجزیه و تحلیل آماری در روش سطح پاسخ، مدل چندجمله‌ای بود که با ضریب تبیین بالایی داده‌ها را برازش کرد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان و نسبت جامد-مایع میزان TAC، TPC افزایش می‌یابد. در صورتی که کاهش نسبت جامد-مایع و افزایش مدت زمان باعث افزایش DPPH می‌گردد. افزایش درصد غلظت اتانول باعث کاهش این ۳

intestinalis). نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی

ایران ۳، ۳۸۵-۳۹۶.

طاهری ع.، نصرتی ا.، خواجه امیری چ. ۱۳۹۷. بهینه-

سازی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک قهوه‌ای

در شرایط آزمایشگاهی با استفاده (*Sargassum*)

glaucescens) از روش سطح پاسخ. مجله علوم و

صنایع غذایی ۱۵ (۷۶)، ۲۴۲-۲۳۱.

طولایی دزفولی ز.، مصباح م.، پیغان ر.، فضل‌آرا ع.،

زارعی م. ۱۳۹۵. تأثیر مصرف خوراکی عصاره‌ی

الکلی جلبک *Laurencia snyderia* و

Sargassum angustifolium بر میزان رشد،

بازماندگی و رنگدانه‌های پوست ماهی ماکرو

(*Labidochromis caeruleus*). مجله

دامپزشکی ایران ۱، ۴۳-۵۲.

Al-Dhabi N.A., Pomurugan K., Maran P. 2016. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 206-213.

Ballard T.S., Mallikarjuna P., Zhou K., O'Keefe S. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry* 120, 1185-1192.

Balavigneswaran C.K., Jeba Kumara T.S., Packiaraja R.M., Veeraraja A., Prakasha S. 2013. Anti-oxidant activity of polysaccharides extracted from *Isocrysis galbana* using RSM optimized conditions. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 100-108.

Bachir Bey M., Meziant L., Benchikh Y., Louaileche H. 2014. Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry* 162, 277-282.

Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965-977.

Bouras M., Chadni M., Barba F.J., Grimi N., Bals O., Vorobiev E. 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of

فاکتور می‌شود. با توجه به نتایج جلبک قهوه‌ای

سارگاسوم منبع مناسبی برای استخراج ترکیبات

زیست فعال بوده و بهره‌برداری از آن به منزله

محصولاتی با ارزش افزوده در صنعت غذا و دارو امری

ضروری است.

منابع

باباخانی لشکان آ.، رضائی م.، رضایی ک.ا.، سیف

آبادی س.ج. ۱۳۹۱. بهینه‌سازی استخراج ترکیبات

آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum*

angustifolium خلیج فارس به روش استخراج به

کمک مایکروویو. نشریه شیلات، مجله منابع

طبیعی ایران ۳، ۲۴۳-۲۵۵.

سفری پ.، رضائی م.، شویک‌لو ا. ر.، باباخانی لشکان آ.

۱۳۹۴. بهینه‌سازی استخراج عصاره آنتی‌اکسیدانی

از جلبک دریایی خلیج فارس (*Chaetomorpha*)

(*sp*) با کمک مایکروویو و اولتراسوند و با استفاده از

روش پاسخ سطح. نشریه شیلات، مجله منابع

طبیعی ایران ۴، ۵۵۵-۵۷۵.

صادقی ن.، اجاق س. م.، حسنی ش. ۱۳۹۶. تولید

نانوکپسول‌های حاوی رنگدانه‌های جلبک دریایی

Sargassum sp. به روش خشک کردن انجمادی.

اولین کنفرانس بین‌المللی توسعه پایدار در

کشاورزی، محیط زیست، گردشگری و منابع

طبیعی، شهر شیراز: مؤسسه عالی علوم و فناوری

خوارزمی، ۱-۶.

گرمسیری ا.، رضائی م.، شویک‌لو ا. ر.، باباخانی لشکان

آ. ۱۳۹۳. بررسی کارآمدی امواج مایکروویو در

استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز

Hypena hamulosa و بهینه‌سازی شرایط

استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM).

نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران

۱۰ (۲)، ۱۵۵-۱۴۸.

هاشم دباغیان ا.، رضائی م.، طبرسا م. ۱۳۹۵.

استخراج اتانولی و جزءگیری حلال-حلال ترکیبات

ضداکسیدانی جلبک سبز (*Enteromorpha*)

- Ghitescu R.E., Volf I., Carausu C., Buhlmann A.M., Gilca I.A., Popa V.I., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry* 22, 535-541.
- Gupta S., 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 & Emerging Technologies* 12(4), 600-609.
- Halvorsen B.L., Carlsen M.H., Phillips K.M., Bhøen S.K., Holte K., Jacobs D.R.Jr., Blomhoff R. 2006. Content of redox-active compounds (i.e., antioxidants) in foods consumed in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 84(1), 95-135.
- He Z.Z., Chen Y.S., Chen Y.H., Liu H.H., Yuan G.F., Fan Y.M., Chen K. 2013. Optimization of the microwave-assisted extraction of phlorotannins from *Saccharina japonica* Aresh and evaluation of the inhibitory effects of phlorotannin-containing extracts on HepG2 cancer cells. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 31(5), 1045-1054.
- Hii S.L., Lip K.F., Loh Y.T., Wong C.L. 2015. Statistical optimization of fermentable sugar extraction from the Malaysian brown alga *Sargassum binderi*. *Journal of Applied Phycology* 27, 2089-2098.
- Hogan C., Michael. 2011. Washington DC: National Council for Science and the Environment, Monosson, E., Cleveland, C. J., eds. Algae-1.3 Brown_algae. Encyclopedia of Earth.
- Huimin Q.I., Zhang Q.B., Zhao T., Chen R., Zhang H., Niu X., Li Z.E. 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules* 37(4), 195-199.
- Kuda T., Tsunekawa M., Goto H., Araki Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* 18(7), 625-633.
- Liyana-Pathirana C., Shahidi F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93, 47-56.
- polyphenols from *Quercus bark*. *Industrial Crops and Products* 77, 590-601.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology* 28(1), 25-30.
- Chen L., Wang Y., Yang H., Li H., Xu W., Chen G., Zhu H. 2018. Physicochemical characterization, antioxidant and immunostimulatory activities of sulfated polysaccharides extracted from *Ascophyllum nodosum*. *Molecules* 23(8), 1912.
- Choudhury S., Sree A., Mukherjee S.C., Pattnaik P., Bapuji M. 2005. In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. *Asian Fisheries Science Journal* 18, 285-294.
- Dang T.T., Vuong Q.V., Schreider M.J., Bowyer M.C., Van Altna I.A., Scarlett C.J. 2017. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology* 29, 3161-3173.
- Djeridane M.B., Yousfi D., Nadjemi P., Boutassouna N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654-660.
- Elboughdiri N. 2018. effect of time, solvent-solid ratio, ethanol concentration and temperature on extraction yield of phenolic compounds from olive leaves, *Engineering, Technology & Applied Science Research* 8(2), 2805-2808.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture, Meeting the sustainable development goals. Rome. 358 p.
- Fu C.W.F., Ho C.W., Yong W.T.L., Abas F., Tan T.B., Tan C.P. 2016. Extraction of phenolic antioxidants from four selected seaweeds obtained from Sabah. *International Food Research Journal* 23(6), 2363-2369.
- Ge Y., Ni Y., Yan H., Chen Y., Cai T. 2002. Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using response surface methodology. *Journal of Food Science* 67, 239-243.

- 337-341.
- Qiao D., Ke C., Hu B., Luo J., Ye H., Sun Y., Zeng X. 2009. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate Polymers* 78, 199-204.
- Quirós M., Gonzalez-Ramos D., Tabera L., Gonzalez R. 2010. A new methodology to obtain wine yeast strains overproducing mannoproteins. *International Journal of Food Microbiology* 139(1-2), 9-14.
- Ruperez P., Ahrazem O., Leal J.A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 840-845.
- Rusak G., Komes D., Likic S., Horzic D., Kovac M. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry* 110, 852-858.
- Sahin S., Samli R. 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasoundassisted extraction with response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 595-602.
- Samaraweera A.M., Vidanarachchi J.K., Kurukulasuriya M.S. 2012. Industrial applications of macroalgae, S.K. Kim, (ed)., *Handbook of Marine Macroalgae Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex. UK. 592 p.
- Singleton V.L., Rossi J.A.J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Souza B.W.S., Cerqueira M.A., Martins J.T., Quintas M.A.C., Ferreira A.N.C.S., Teixeira J.A., Vicente A.N.A. 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 5589-5594.
- Souza C.M., Schwabe T.M., Pichler H., Ploier B., Leitner E., Guan X.L., Wenk M.R., Riezman I., Riezman H. 2011. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance, *Metabolic Engineering* 13(5), 555-569.
- Sudhakar M.P., Ananthalakshmi J.S., Beena Li Y., Lai P., Chen J., Shen H., Tang B., Wu L., Weng M. 2016. Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Purnus salicina* Lindl. *Food Science and Technology* 36(3), 520-525.
- Liu X., Luo G., Wang L., Yuan W. 2019. Optimization of antioxidant extraction from edible brown algae *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology, *Food and Bioproducts*. (In Press)
- López 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(3), 1104-1109.
- Maran J.P., Mekala V., Manikandan, S. 2013. Modeling and optimization of ultrasoundassisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*, *Carbohydrate Polymers* 92, 2018-2026.
- Myers R.H., Montgomery D.C. 2002. *Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York.
- Nahas Z., Teneback C., Chae J.H., Mu Q., Molnar C., Kozel F.A., Walker J., Anderson B., Koola J., Kose S., Lomarev M., Bohning D.E., George M.S. 2007. Serial vagus nerve stimulation functional MRI in treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology* 32(8), 1649-1660.
- Nacz M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, 95-111.
- Nacz M., Shahidi F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1523-1542.
- Prasad K.N., Hassan F.A., Yang B., Kong K.W., Ramanan R.N., Azlan A., Ismail A. 2011. Response surface optimization for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilized *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry* 128, 1121-1127.
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269(2),

- J., Zhu L. 2010. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Separation Science* 33, 1349-1355.
- Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., Lin Y., Fan W., Gu G. 2006. Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(19), 7277-7286.
- Zhou K., Yu L. 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 37, 717-721.
- Zubia M., Robledo D., Freile-Pelegri Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19(5), pp 449-458.
- B.N. 2013. Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5(7), 169-175.
- Thoo Y.Y., Ho S.K., Liang J.Y., Ho C.W., Tan C.P. 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry* 120, 290-295.
- Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant 1 activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry* 99, 835-841.
- Tuney I., Cadirci B.H., Unal D., Sukatar A. 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (izmir, Turkey). *Turkish Journal Biology* 30(3), 171-175.
- Wanasundara P.K.J.P.D., Shahidi F. 1996. Optimization of hexametaphosphate assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *Journal of Food Science* 61, 604-607.
- Wang T., Jónsdóttir R., Ólafsdóttir G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* 116, 240-248.
- Wang K., Tang D., Wang M., Lu J., Yu H., Liu J., Qian B., Gong Z., Wang X., Chen J., Gu M., Cheng Z. 2009. MER3 is required for normal meiotic crossover formation, but not for presynaptic alignment in rice. *Journal of Cell Science* 122(12), 2055-2063.
- Wani S.M., Jan N., Wani T.A., Ahmad M., Masoodi F.A., Gani A. 2017. Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L.) using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16, 119-126.
- Yan X., Chuda Y., Suzuki M., Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry Journal* 63(3), 605-607.
- Yang L., Cao Y.L., Jiang J.G., Lin Q.S., Chen

Optimization of the extraction of antioxidant compounds from brown algae *Sargassum angustifolium* in the Persian Gulf by response surface methodology (RSM)

Niloofar Aghajanpour Sorkouhi¹, Aria Babakhani^{*1}, Mehdi Tabarsa²

¹Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran.

²Department of Fisheries, Faculty of natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

*Corresponding author: babakhani@guilan.ac.ir

Received: 2019/5/18

Accepted: 2019/8/20

Abstract

In this study, optimum conditions for the antioxidant compounds extraction from *Sargassum angustifolium* algae were determined by response surface methodology. Optimal design with three independent variables: ethanol concentration (with five levels of 0, 25, 50, 75 and 100), extraction time (with three levels of 2, 4 and 6 hours) and solid-liquid ratio (with three levels of 1: 5, 1:10 and 1:15) was generated. Total phenolic content (TPC), free radical inhibitory activity (DPPH) and total antioxidant capacity (TAC) were used as responses. The results showed that the maximum TPC in optimal conditions was obtained in distilled water, 6 hours and a 1: 15 solid-liquid ratio, free radical inhibitory activity in ethanol 25%, 4 hours duration, and a solid-liquid ratio of 1: 5 and total antioxidant capacity in ethanol 50%, duration 4 hours and solid-liquid ratio 1:15. In terms of the above mentioned conditions, the highest amount of TPC was 698.01 mg gallic acid per gram of dried algae powder, TAC value was 76.1 mg ascorbic acid per gram of dried algae powder and DPPH value was 86.02 (RSA%). The results showed that the extract of *S. angustifolium* could be used as a natural antioxidant in the food industry, as well as food supplementation against oxidative damage.

Keywords: Algae, *Sargassum angustifolium*, Optimization, Antioxidant properties.