نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۱۵۵-۱۴۸

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 2, Suumer 2014, p. 148-155

بررسی کارآمدی امواج مایکروویو در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* و بهینه‌سازی شرایط استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

الهام گرمسیری [۱]- مسعود رضائی [۲*]- امیررضا شویک‌لو [۳]- آریا باباخانی لشکان [۴]

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱/۱۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۷/۲۰

چکیده

جلبک‌های دریایی از منابع جدید ترکیبات زیست فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی کارآمدی امواج مایکروویو در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* خلیج‌فارس و بهینه‌سازی شرایط استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ بود. متغیرهای مستقل مورد بررسی شامل زمان (۴، ۸ و ۱۲ دقیقه)، غلظت استون (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد استون) و قدرت مایکروویو (۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ وات) بودند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک قرمز با استفاده از آزمایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) سنجیده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد از۴/۱۹ تا ۷۲/۹۹درصد متغیر بود. شرایط بهینه استخراج شامل غلظت استون ۵۰درصد، زمان ۱۲ دقیقه و قدرت مایکروویو۲۰۰ وات بود. نتایج نشان داد که مقادیر واقعی آزمایش در تطابق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط معادله چند جمله‌ای بود.ضریب تبیین بدست آمده ۰/۹۹ بود که نشان دهنده مطلوبیت مدل مورد استفاده و موفقیت روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی شرایط استخراج است.

واژه‌های کلیدی: استخراج به کمک مایکروویو، ترکیبات فنولی، جلبک قرمز*Hypnea hamulosa*، روش سطح پاسخ، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

مقدمه

در چند دهه اخیر انواع اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد به دلیل نقش عمده ای که در صدمات سلولی و فرآیند پیری دارند، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Kim *et al* ., 2006). این ترکیبات باعث اکسایش چربی‌ها در مواد خوراکی و در نتیجه موجب تغییر بو، طعم، رنگ، بافت و کاهش ارزش تغذیه‌ای محصول می‌گردند (Sakanaka *et al.,* 2005) و یا حتی ممکن است منجر به ایجاد ترکیبات سمی در محصول گردند (Ruberto *et al.,* 2001). گونه‌های اکسیژن فعال که به شکل‌های آنیون سوپراکسید (O^{2-})، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) موجود هستند (Yangthong *et al.,*2009) به طور طبیعی توسط فرآیندهای متابولیکی بدن انسان و فاکتورهای خارجی همانند اشعه فرابنفش، دود و آلودگی هوا تولید می‌شوند. تنفس هوازی نرمال در سلول‌ها، آنتی-اکسیدان‌های طبیعی از جمله گلوتاتیون‌پراکسیدازها، کاتالازها را تولید می‌کند (رضوی شیرازی،۱۳۸۰) که توسط منابع غذایی همچون ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و غیره تکمیل می‌گردد. اثر سیستم آنتی‌اکسیدانی درونی با افزایش سن، کاهش می‌یابد. از این رو نیاز به گنجاندن مواد غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان در پیشگیری از بیماری‌ها وجود دارد (Krishnaswamy *et al.,* 2012). اما با این حال نگرانی‌هایی در مورد ایمنی و سلامت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد. بنابراین تحقیقات به سمت جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع طبیعی جلب شده است به خصوص در سال‌های اخیر که آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به کیفیت مواد غذایی و مسائل مربوط به ایمنی به طور چشمگیری افزایش یافته است (Souza *et al.,* 2011). بررسی‌ها نشان داده است که جلبک‌های دریایی منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی همانند ترکیبات فنولی می‌باشند که نقش مهمی در جلوگیری از اکسایش چربی ایفا می‌کنند (Plaza *et al.,* 2008). یک سری از پلی فنول‌ها مثل کاتچین (گالوکاتچین، اپی کاتچین وکاتچینگالات)، فلاونول وفلاونولگلیسرول در عصاره متانولی

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده‌ی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس
(* - نویسنده مسئول: Email: rezai_ma@modares.ac.ir)
۴- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان

جلبک‌های قهوه‌ای و قرمز نیز شناسایی شده‌اند. همچنین جلبک‌ها حاوی چندین ماده شیمیایی با ارزش اقتصادی مثل ویتامین‌ها، کارتنوئیدها، پیکوبیلی پروتئین‌ها، پلیول‌ها، پلی ساکاریدها و اسیدهای چرب می‌باشند که دارای خواص ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی ومواد محرک ایمنی می‌باشد (Hanna *et al.*, 2008). عوامل مختلفی از جمله عوامل فصلی، تولیدمثلی، شوری، موقعیت مکانی، میزان نور و نیز قسمت‌های مختلف بدنه جلبک بر میزان پلی‌فنول‌ها تأثیرگذار می‌باشد (Holdt *et al.*, 2011). ترکیبات فنولی از نظر ساختار و تعداد گروههای هیدورکسیل با هم تفاوت دارند که منجر به تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها می‌شود و از طریق مکانیسم‌هایی چون جذب رادیکال‌های آزاد، مهار انواع اکسیژن یگانه، مهار آنزیم‌های اکسایشی، چلاته کردن فلزات واسطه عمل می‌کنند. این ترکیبات ممکن است در مواد خوراکی مختلف بسته به قطبیت، ویژگی و خصوصیات مولکولی، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مختلفی را نشان دهند (Maqsood and Benjakul ,2010).

دمای بالا و اشعه‌های خورشیدی زیاد در عرض‌های پایین جغرافیایی سبب می‌شود که گیاهان این مناطق برای مقابله با اشعه‌های ماورای بنفش و رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتری تولید کنند (Lopez*et al.*, 2011). خلیج فارس نیز در عرض‌های پایین قرار گرفته و دارای گونه‌های جلبکی متنوعی می‌باشد. یک گروه از این جلبک‌ها خانواده Hypneacae می‌باشدکه به میزان بسیار زیادی در خلیج فارس وجود دارد که هیچ گونه استفاده‌ای از آن نمی‌شود. از این رو به دلیل ویژگی‌های چندکاربردی عصاره‌های جلبکی، استخراج آن‌ها می‌تواند به عنوان منبع آنتی-اکسیدانی طبیعی مورد توجه قرارگیرند (Wang *et al.*, 2009؛ Chew *et al.*, 2008). استخراج اولین مرحله اساسی را در تحقیقات گیاهان دارویی تشکیل می‌دهد. از همین رو روش‌های استخراج متفاوتی برای بدست آوردن ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های مرسوم استخراج همچون روش سوکسله نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیادی دارد (Wang and Weller, 2006). اما در سال‌های اخیر روش‌های استخراج نوین مختلفی جهت استخراج ترکیبات طبیعی از گیاهان توسعه پیدا کرده است از جمله استخراج به کمک مایکروویو، که از جمله مزایای این روش کاهش مصرف حلال، کوتاه کردن زمان استخراج، افزایش بازده استخراج و افزایش کیفیت عصاره‌ها می‌باشد Wang *et al.*, 2008. درتحقیقات اخیر برای استخراج ترکیبات بیولوژیکی فعال مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها از روش استخراج به کمک مایکروویو استفاده شده است (Ballard *et al.*, 2010 ، Hayat *et al.*, 2009 ، Faveri and Spingo, 2009؛ Pan *et al.*, 2011). مایکروویو یک تابش الکترومغناطیس است که می‌تواند موج را انتقال دهد. وقتی امواج مایکروویو از محیط می‌گذرد، انرژی ممکن است جذب شود و به انرژی حرارتی تبدیل گردد. گرمادهی با استفاده از انرژی مایکروویو بر دو اصل استوار است: هدایت یونی و چرخش دوقطبی. به طور معمول هدایت یونی و چرخش دوقطبی به طور همزمان اتفاق می‌افتد که به طور موثری انرژی مایکروویو را به نوع حرارتی تغییر می‌دهند (Zhang *et al.*, 2011) در مطالعه حاضر جهت سنجش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* از آزمایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) استفاده شد. همچنین از حلال استون به عنوان حلال مناسب استخراج جهت دستیابی به حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد (Wang *et al* ., 2009، Turkmen *et al.*, 2006) هدف از این پژوهش دستیابی به حداکثر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) از جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* با استفاده از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه فاکتورهای مورد بررسی بود.

مواد و روش‌ها

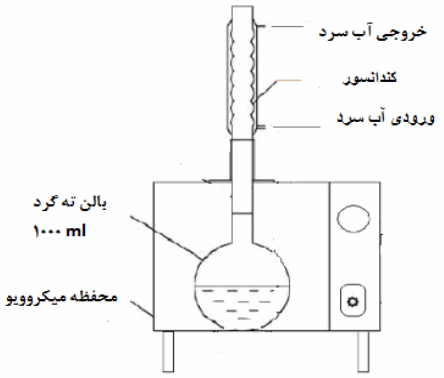
جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های جلبک از منطقه جنوبی شهر بوشهر در تابستان سال ۱۳۹۰ جمع آوری شدند. شستشوی نمونه‌ها ابتدا با آب دریا و سپس با آب شیرین صورت پذیرفت و گل ولای و همچنین اپی‌فیتهای متصل به آن‌ها نیز زدوده شدند. سپس نمونه‌ها در سایه و در دمای ۲۸ تا۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ تا۶ روز خشک شده و به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد. نمونه‌های خشک شده در دستگاه خردکن (Mulinex, La Molinett، فرانسه) به صورت پودر درآمدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌کیپ و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

عصاره‌گیری

ابتدا ۲/۵ گرم از نمونه‌های جلبکی پودر شده توزین شده و در ظرف شیشه‌ای (بالن شیشه‌ای) استخراج ریخته شدند. با توجه به طراحی آزمایش صورت گرفته به نمونه‌ها ۵۰ میلی‌لیتر حلال استون افزوده شد. از مایکروویو خانگی (Sumsung ME3410W) برای استخراج استفاده شد. استخراج با حلال استون (با سه غلظت۵۰، ۷۵ و۱۰۰ درصد استون)، در ۳ مدت زمان استخراج (۴ ،۸ و ۱۲ دقیقه) و ۳ قدرت مایکروویو (۲۰۰،۳۰۰ و۴۰۰ وات) انجام شد. محدوده متغیرها بر اساس نتایج آزمایش‌های اولیه تعیین شدند. برای طراحی

آزمایش‌ها از RSM[1] استفاده شد. حلال‌هایی از جمله استون، اتانول و متانول دمای جوش پایینی دارند و زود تبخیر می‌شوند. اگر بخارات حلال در داخل دستگاه مایکروویو باقی بمانند، خطر انفجار وجود داشته و میزان حلال مورد استفاده برای استخراج نیز کاهش می‌یابد (قره‌خانی و همکاران، ۱۳۸۸). برای حل این مسئله ظرف حاوی نمونه‌ها از بالا به یک مبرد آبی متصل شد تا بخارات متصاعد شده از عصاره پس از میعان در اثر برخورد با دیواره خنک مبرد، مجدداً به داخل ظرف اصلی بازگردد (شکل ۱)، پس از اتمام زمان استخراج عصاره‌ها با کاغذ صافی (واتمن شماره ۴۲) فیلتر شده و پس از سانتریفیوژ (مدل Z206A-HERMLE، آلمان) با ۶۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه تا هنگام انجام آزمایش‌های بعدی در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند.



شکل ۱- سیستم مایکروویو تغییر یافته

قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد[2](DPPH)

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رادیکال های پایدار ۲و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل- هیدرازیل (DPPH)، طبق روش Brand-Williamsو همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام گرفت. ۲ میلی لیتر از عصاره به ۲ میلی لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده وبه مدت یک دقیقه به صورت پیچشی تکان داده شد سپس ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد وجذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Lambda-PerkinElmer precisely، امریکا) خوانده شد. قدرت مهارکنندگی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.

RSA= [1-((Asample - Asample blank)/ Aconrol)]*100

Asample جذب نمونه بعد از زمان مورد نظر، Acontrol جذب محلول DPPH بدون نمونه، Asample blank جذب نمونه بدون محلول DPPH بعد از زمان مورد نظر می‌باشد.

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 موثر حتی موقعی که روابط پیچیده‌ای موجود است، استفاده می‌شود (Montgomery and Myers, 2002). در این تحقیق از طرح باکس بنکن با سه متغیر مستقل، سه سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) جهت بررسی شرایط استخراج و بهینه‌سازی فرآیند مذکور استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل غلظت استون (X_1)، زمان (X_2) و قدرت مایکروویو (X_3) که در سه سطح کد گذاری شدند و متغیر وابسته (پاسخ) فعایت مهار کنندگی رادیکال آزاد برحسب درصد بود (جدول ۱).

جدول۱-نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها

متغیر مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		+۱	۰	-۱
غلظت استون به آب(درصد)	X_1	۱۰۰	۷۵	۵۰
زمان(دقیقه)	X_2	۱۲	۸	۴
سطح قدرت(وات)	X_3	۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰

مدل مورد استفاده در RSM عموما 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، مدل چند متغیره به صورت معادله زیر می باشد:

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

که در آن Yمقدار پاسخ پیش‌بینی شده (DPPH)، β_0 عرض از مبدا، β_i(i= 1,2 ….k) اثرات خطی بین متغیرها، β_{ii}(i=1,2 ….k) اثرات مجذور بین متغیرها، β_{ij} (i= 1,2 k….k,j=1,2) اثرات و کنش متقابل بین متغیرها و ε خطای احتمالی است (Ghafoor *et al.*, 2009).به منظور تجزیه و تحلیل و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار Design-Expert نسخه ۷,۰,۰ (State- Ease, , MN, USA) Inc,Minneapolis استفاده شد.

نتایج و بحث

گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش یافته

مقادیر کدگذاری شده و کدگذاری نشده متغیرهای مستقل برای هر یک از تیمارها در جدول ۲ آورده شده است. همچنین مقادیر پاسخ (فعایت مهار کنندگی رادیکال آزاد، DPPH) نیز ارائه شده است.

1-Response surface methodology

2 -2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

همانطور که مشاهده می‌شود، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد از ۴/۱۹ تا ۷۲/۹۹ درصد متغیر بود.

جدول ۲- داده‌های کدگذاری شده و داده‌های کدگذاری نشده توسط نرم‌افزار برای سه متغیر مورد آزمایش در تعیین خاصیت آنتی-اکسیدانی (DPPH)

تیمار	غلظت استون(%)	زمان (دقیقه)	قدرت مایکروویو (وات)	DPPH(%)
۱	۱۰۰ (۱)	۱۲(۱)	۳۰۰(۰)	۱۴/۹۶
۲	۷۵ (۰)	۸(۰)	۳۰۰(۰)	۵۱/۰۰
۳	۱۰۰(۱)	۸(۰)	۴۰۰(۱)	۱۲/۹۴
۴	۷۵ (۰)	۸(۰)	۳۰۰(۰)	۵۱/۸۷
۵	۱۰۰(۱)	۴(-۱)	۳۰۰(۰)	۱۷/۷۱
۶	۵۰(-۱)	۸(۰)	۲۰۰(-۱)	۵۱/۷۲
۷	۷۵ (۰)	۸(۰)	۳۰۰(۰)	۵۲/۲۳
۸	۷۵(۰)	۸(۰)	۳۰۰(۰)	۵۰/۷۰
۹	۷۵(۰)	۴(-۱)	۴۰۰(۱)	۵۰/۸۰
۱۰	۱۰۰(۱)	۸(۰)	۲۰۰(-۱)	۴/۱۹
۱۱	۵۰(-۱)	۱۲(۱)	۳۰۰(۰)	۷۲/۹۹
۱۲	۷۵(۰)	۱۲(۱)	۲۰۰(-۱)	۵۱/۲۶
۱۳	۵۰(-۱)	۸(۰)	۴۰۰(۱)	۵۹/۰۶
۱۴	۵۰(-۱)	۴(-۱)	۳۰۰(۰)	۵۳/۶۴
۱۵	۷۵(۰)	۴(-۱)	۲۰۰(-۱)	۳۸/۷۳
۱۶	۷۵(۰)	۱۲(۱)	۴۰۰(۱)	۵۶/۹۸
۱۷	۷۵(۰)	۸(۰)	۳۰۰(۰)	۵۰/۱۷

جدول ۳ نتایج حاصل از تجزیه آماری را نشان می‌دهد. به طور معمول جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین (R^2)[1] و آزمون عدم برازش[2] استفاده می‌شود. معنی‌دار بودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند و نمی‌توان از مدل برای پیش‌گویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود. بنابراین با عدم معنی‌داری آزمون عدم برازش، می‌توان دریافت که مدل به خوبی می‌تواند بر داده‌های مورد بررسی برازش شود. نتایج آنالیزANOVA نشان داد، آزمون عدم برازش برای تمامی متغیرهای مورد بررسی معنی‌دار نبود، این نشان می‌دهد که تمام مدل‌ها به خوبی روند داده‌ها را نشان می‌دهند. همچنین پاسخ مورد نظر با ضریب اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار بود که این امر نشان دهنده این است که مدل به خوبی روند تغیر داده‌ها را نشان می‌دهد.

ضریب تبیین (R^2) به صورت نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه تناسب برازش می‌باشد. بنابراین هر چه مقدارR^2 به یک نزدیک‌تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر است اما همیشه مقادیر بالایR^2 نشان دهنده یک مدل رگرسیونی مناسب نیست. بنابراین بهتر است از ضریب تبیین تطابق یافته[3] برای ارزیابی مدل مناسب استفاده کرد (Myers and Montgomery, 2002). در این مطالعه مقادیر ضریب تبیین وضریب تبیین تطابق یافته به ترتیب ۰/۹۹۹۴ و ۰/۹۹۸۵ بود (جدول ۴) که بسیار به عدد یک نزدیک است که بیانگر قدرت بالای مدل در پیش-بینی بود.

ضریب واریانس[4] (CV) به عنوان نسبتی از خطای استاندارد به میانگین پاسخ‌های مشاهده شده، تکرارپذیری مدل را تعریف می‌کند.(Myers & Montgomery,2002). دقت مناسب[5] مقایسه طیف وسیعی از مقادیر پیش‌بینی شده در نقاط طراحی به متوسط خطای پیش‌بینی‌شده است. نسبت‌های بزرگتر از ۴ حداقل مدل مناسب را نشان می‌دهد (Ghafari *et al.,* 2009).

در جدول ۴ مقادیر ضریب واریانس و دقت مناسب مشاهده می-گردد. آنالیز رگرسیون بر روی داده‌های آزمایش انجام شد و ضریب مدل از لحاظ معنی‌داری بررسی شد، که با توجه به جدول ۳ مدل با$p<0/0001$ از لحاظ آماری معنی‌دار بود. برای پاسخ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (Y1) اثر پارامترهای خطی و درجه دوم غلظت استون، زمان و قدرت مایکروویو و عبارات مربوط به برهمکنش غلظت استون و زمان و نیز زمان و قدرت مایکروویو معنی‌دار بودند ($p<0/05$). مدل پیش‌بینی شده برای Y1در زیر آمده است:

$$Y1 = +\ 51/19 - 23/45X1 + 4/41\ X2 + 4/24\ X3 - 5/52\ X1X2 + 0/35X1X3 - 1/59\ X2X3 - 14/42\ X12 + 3/05\ X22 - 4/80\ X32$$

اثر متغیرهای فرآیند بر پاسخ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

شکل ۲ اثر همزمان دو متغیر بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) از عصاره جلبکی را نشان می‌دهد. در شکل ۱- الف اثر همزمان غلظت استون و زمان استخراج در سطح قدرت ثابت ۳۰۰ وات بر پاسخ DPPH نشان داده است. بالاترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) در حداقل غلظت استون و حداکثر زمان ممکن مشاهده شد. ترکیبات فنولی در حلال‌های آلی قطبی نسبت به آب محلول‌ترند. به همین دلیل است که توصیه می‌شود مخلوط آبی از حلال‌های آلی جهت استخراج مورد استفاده قرار بگیرند. از طرفی استون دارای توانایی مهار کمپلکس پلی‌فنول-پروتئین تشکیل شده در طول استخراج یا حتی شکستن باندهای هیدروژنی تشکیل شده بین گروههای فنولی و گروههای کربوسیل پروتئین می‌باشد (Wang *et al.,* 2009). در مطالعه‌ای که

1- R-squared
2- Lack of fitness

3- Adjusted R-squared
4- coefficient of variance
5- Adequate precision

توسط (Liyana-Pathiranaand &shahidi, 2005) انجام شد، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش حلال ارگانیک تا ۵۰ درصد افزایش یافت و سپس با افزایش میزان حلال ارگانیک با کاهش همراه شد که با مطالعه صورت گرفته مطابقت دارد.

در شکل ۲-ب در زمان ثابت ۸ دقیقه، اثر همزمان غلظت استون و قدرت مایکروویو نمایش داده شده است. بر این اساس غلظت‌های پایین‌تر استون تاثیر محسوسی بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) داشته است، چنانکه با افزایش سطح قدرت تا ۳۴۲ وات، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) به صورت خطی در محدوده تغییرات Xها افزایش می‌یابد. مواد گیاهی خشک که برای استخراج استفاده می‌شوند شامل مقادیر جزئی رطوبت بوده؛ همان طوری که انرژی مایکروویو جذب می‌شود و متعاقبا به انرژی گرمایی تبدیل می‌گردد، رطوبت شروع به تبخیر می‌کند. تبخیر آن موجب ایجاد فشار درون دیواره سلول و منجر به از هم گسیختگی سلول‌ها می‌گردد و در نهایت منجر به خروج مواد متشکله فعال به حلال اطراف آن می‌شود و بازده استخراج را افزایش می‌دهد. همچنین به کار بردن قدرت بالاتر مایکروویو برای یک زمان ممکن است راهکار موثرتری برای استخراج ترکیبات فنولی باشد (Ballard*et al.,* 2010).

شکل ۱-ج اثر همزمان قدرت مایکروویو و زمان استخراج در غلظت ثابت ۷۵درصد را نشان می‌دهد. بر اساس این نمودار بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH)، در حداکثر زمان و سطح قدرت ۳۷۷ وات مشاهده می‌گردد. افزایش زمان استخراج باعث تسهیل بیشتر تماس ماده حل شونده با حلال و انتشار بیشتر ترکیبات هدف می‌گردد (Hossain *et al.,* 2012). در مطالعه‌ای که توسط (Krishnaswamy *et al.,* 2012) جهت بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولی آنتی‌اکسیدانی از دانه انگور به کمک مایکروویو صورت پذیرفت، نتایج نشان داد که با افزایش زمان استخراج و کاهش غلظت حلال و قدرت مایکروویو فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در آزمایش DPPH افزایش یافت. همچنین مقایسه مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیش-بینی شده در شکل۳ آمده است، مشاهدات بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با نرم‌افزار است. تفاوت این داده‌ها نماینگر میزان خطا موجود در آزمایشات می‌باشد.

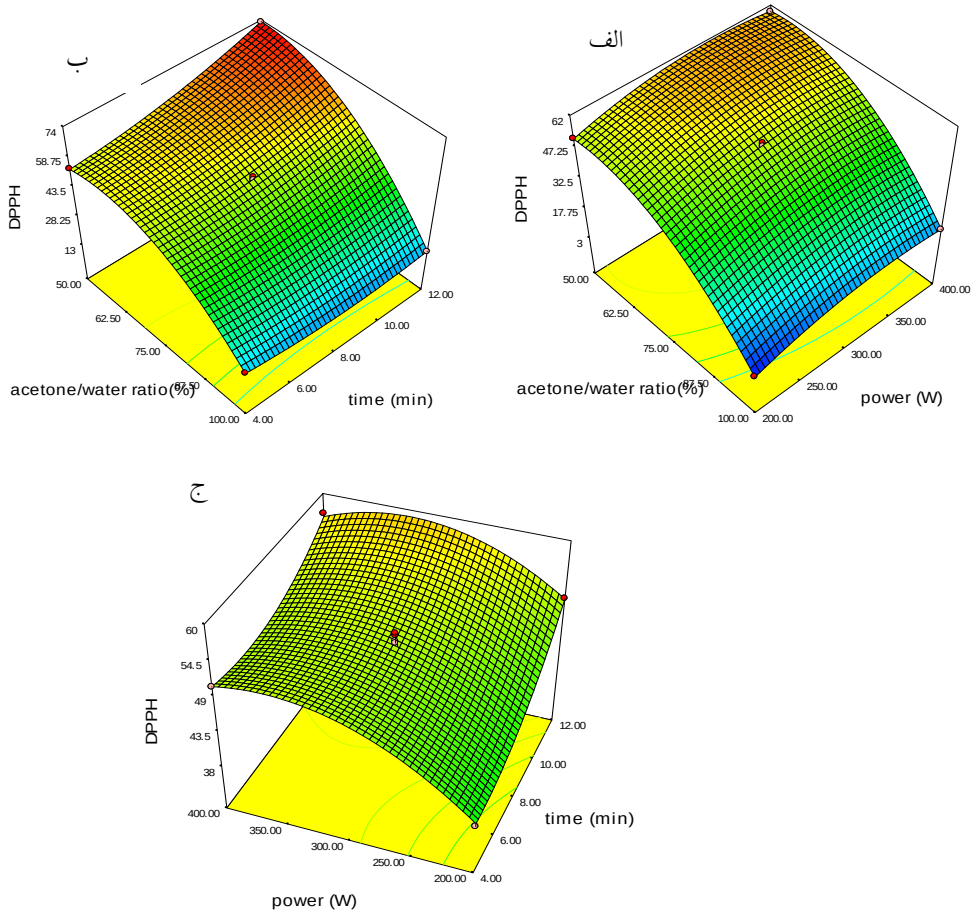
در مطالعه‌ای که باباخانی و همکاران (۱۳۹۱) بر روی بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* خلیج فارس به روش استخراج به کمک مایکروویو انجام دادند، میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) در تیمار بهینه (قدرت مایکروویو ۲۷۰ وات، زمان ۳۰ دقیقه، حلال: آب و با نسبت ۱:۲۰) ۲۶/۵۶ درصد بود که در مقایسه با جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* کمتر بود.

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس مدل برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۵۸۵۴/۴۷	۹	۶۵۰/۵	۱۲۰۱/۷۴	< ۰/۰۰۰۱
غلظت استون X1	۴۳۹۹/۹۶	۱	۴۳۹۹/۹۶	۸۱۲۸/۶	< ۰/۰۰۰۱
زمان X2	۱۵۵/۸۳	۱	۱۵۵/۸۳	۲۸۷/۸۹	< ۰/۰۰۰۱
قدرت مایکروویو X3	۱۴۳/۶۲	۱	۱۴۳/۶۲	۲۶۵/۳۳	< ۰/۰۰۰۱
X_1X_2	۱۲۲/۰۶	۱	۱۲۲/۰۶	۲۲۵/۵	< ۰/۰۰۰۱
X_1X_3	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۹۲	۰/۳۷۰۳
X_2X_3	۱۰/۰۷	۱	۱۰/۰۷	۱۸/۶۱	۰/۰۰۳۵
X_1^2	۸۷۵/۳	۱	۸۷۵/۳	۱۶۱۷/۰۵	< ۰/۰۰۰۱
X_2^2	۳۹/۱۴	۱	۳۹/۱۴	۷۲/۳۱	< ۰/۰۰۰۱
X_3^2	۹۷/۰۴	۱	۹۷/۰۴	۱۷۹/۲۷	< ۰/۰۰۰۱
باقیمانده	۳/۷۹	۷	۰/۵۴		
عدم برازش مدل	۰/۹۳	۳	۰/۳۱	۰/۴۴	۰/۷۳۹۹
خطای خالص	۲/۸۶	۴	۰/۷۱		

جدول٤ - نتایج آنالیز آماری مدل برازش یافته بر پاسخ

پاسخ	R^2	Adjusted R^2	Predicted R2	Adequate precision	SD	Mean	CV	PRESS
DPPH	۰/۹۹۹۴	۰/۹۹۸۵	۰/۹۹۶۷	۱۲۲/۷۷۷	۰/۷۴	۴۳/۵۸	۱/۶۹	۱۹/۳۸



شکل ۲- اثر برهمکنش متغیرها بر پاسخDPPH : اثر زمان و غلظت استون/آب بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH (الف)، اثر قدرت مایکروویو و غلظت استون/آب بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH (ب)، اثر زمان و قدرت مایکروویو بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH (ج)

بهینه‌سازی فرآیند

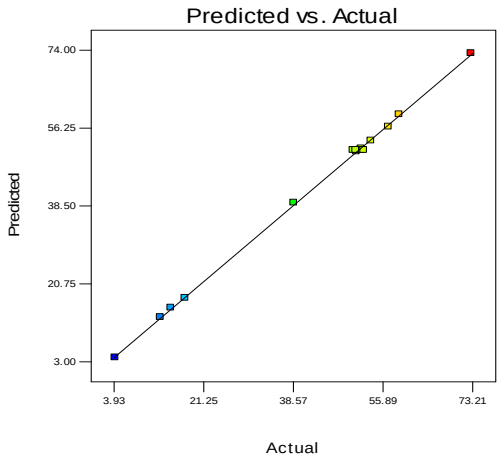
شرایط عملیاتی بهینه، با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی[1] جستجو شد. بدین منظور در ابتدا اهداف بهینه‌سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل تنظیم گردیدند. بدین منظور پاسخ (DPPH) بیشینه و نیز متغیرهای مستقل غلظت استون و قدرت مایکروویو به دلیل ایجاد آلودگی و مسائل زیست محیطی و نیز به دلیل صرفه جویی در مصرف انرژی کمینه و زمان در محدوده آزمایش در نظر گرفته شدند. شرایط بهینه استخراج شامل غلظت استون ۵۰ درصد، زمان ۱۲ دقیقه و قدرت مایکروویو۲۰۰ وات بود. پس از تنظیم تیمار بهینه توسط نرم‌افزار اطلاعات داده شده به صورت واقعی مورد آزمایش قرار گرفت و داده‌های مربوط به آن در مقابل داده‌های پیش‌بینی شده قرار گرفت، اختلاف کم بین داده‌های پیش‌بینی شده و مقادیر واقعی در آزمایشگاه نشان‌دهنده صحت آزمایشات و شرایط بهینه‌سازی می‌باشد (جدول۵).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه روش سطح پاسخ به طور موفقیت آمیزی جهت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز به کار برده شد. شناسایی و استخراج ترکیبات زیست فعال مختلف از اصلی ترین مراحل تولید و حصول ترکیبات طبیعی موجود در طبیعت به شمار می‌رود. روش‌های مختلف استخراج، اثرات کم و بیش متفاوتی بر ترکیبات استحصال شده بر جا می گذارند. همانگونه که در این مطالعه مشاهد شده روش استخراج به کمک مایکروویو به دلیل مزایایی همچون زمان استخراج کوتاهتر و مصرف حلال کمتر نسبت به روش‌های استخراج سنتی، عملکرد نسبتا مناسبی جهت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز داشت. با این وجود، امکان دارد

1-Numerical optimization

که این نتایج در گیاهان دیگر و حتی گونه های جلبکی دیگر به شکل دیگری باشد. بنابراین برای رسیدن به این امر تحقیقات بیشتر در زمینه پیدا کردن روش های استخراج مناسب برای هر گونه را بیش از پیش لازم می داند. از طرفی سواحل خلیج فارس دارای تنوع جلبکی مناسبی است که متاسفانه تاکنون مطالعه جامعی به منظور شناسایی دقیق پراکنش و بیومس هر گونه انجام نشده است. باتوجه به نتایج این تحقیق، می‌توان اظهار داشت که جلبک قرمز منبع مناسبی برای استخراج ترکیبات زیست فعال بوده و باتوجه به وفور این گونه در آب‌های خلیج فارس وعدم استفاده ازاین منبع، بهره برداری ازاین جلبک ودیگر جلبک‌های خلیج فارس امری مناسب وضروری به نظر می‌رسد.



شکل۳- مقادیر داده‌های واقعی و داده‌های پیش‌بینی‌شده در نرم‌افزار برای بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزادDPPH

جدول۵ - مقادیر بهینه پیشنهادی توسط نرم‌افزار و مقادیر واقعی برای کسب بالاترین میزانDPPH

غلظت استون	زمان	قدرت مایکروویو	مقدار پیش‌بینی شده	مقدار واقعی	مطلوبیت
۵۰	۱۲	۲۰۰	٪۶۶/۱۱	٪۷۰	٪۹۵

منابع

باباخانی، آ. ۱۳۹۱. استخراج عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی جلبک قهوه‌ای *Sargassumangustifolium*. خلیج فارس و اثر آنتی اکسیدانی عصاره‌هادر نگهداری روغن و گوشت چرخ شده ماهی کیلکا. رساله دکتری شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس.

رضوی شیرازی، ح.، ۱۳۸۰. تکنولوژی فرآورده‌های دریایی، اصول نگهداری و عمل‌آوری، نقش مهر، ۱۸۶-۱۸۷.

قره‌خانی، م.، رفیعی، ز.، قربانی، م.، جعفری، س.م.، ۱۳۸۸، سیستم محفظه باز برای استخراج ترکیبات موثره از گیاهان دارویی، ۵۹۳۲۱.

Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K. and O'Keefe, S. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. Food Chemistry, 120(4), 1185-1192.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology. 28:25-30.

Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., and Khoo, K. S., 2008, Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT - Food Science and Technology, 41(6), 1067-1072.

Ghafari, S., Aziz, H. A., Isa, M. H., and Zinatizadeh, A. A., 2009, Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation–flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. Journal of Hazardous Materials, 163(2–3), 650-656.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., and Jo, I. H., 2009, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (Vitisvinifera) Seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(11), 4988-4994.

Hanna, H., El-Baky, A., Hussein, M. M., El-Baroty, G., 2008, Algal extracts improve antioxidant defence abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food

Chemistry. 7, 2812-2832.

Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., 2009, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. Separation and Purification Technology, 70(1), 63-70.

Holdt, S. and Kraan, S., 2011, Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. Journal of Applied Phycology, 23(3), 543-597.

Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C. P., Martin-Diana, A. B. and Barry-Ryan, C., 2012, Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (Origanummajorana L.) using response surface methodology. UltrasonicsSonochemistry, 19(3), 582-590.

Kim, S. Y., Jeong, S. M., Park, W. P., Nam, K. C., Ahn, D. U. and Lee, S. C., 2006, Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. Food Chemistry, 97(3), 472-479.

Krishnaswamy, K., Orsat, V., Gariépy, Y., and Thangavel, K., 2012, Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (Vitisvinifera). Food and Bioprocess Technology, 1-15.

Liyana-Pathirana, C., and Shahidi, F., 2005, Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry, 93(1), 47-56.

López, A., Rico, M., Rivero, A., and Suárez de Tangil, M., 2011, The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of Stypocaulonscoparium algae extracts. Food Chemistry, 125(3), 1104-1109.

Maqsood, S., and Benjakul, S., 2010, Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. Food Chemistry, 119(1), 123-132.

Myers, R. H, Montgomery D. C., 2002, Response surface methodology: process andproduct optimization using designed experiments. Wiley. New York.

Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., 2008, Antioxidant activity of MICROWAVE-assisted extract of longan (Dimocarpus Longan Lour.) peel. Food Chemistry, 106(3), 1264-1270.

Plaza, M., Cifuentes, A., and Ibáñez, E., 2008, In the search of new functional food ingredients from algae.Trends in Food Science & Technology, 19(1), 31-39.

Ruberto, G., Baratta, M. T., Biondi, D. M., and Amico, V., 2001, Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus Cystoseira in a micellar model system. Journal of Applied Phycology, 13(5), 403-407.

Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y., 2005, Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). Food Chemistry, 89(4), 569-575.

Spigno, G., and De Faveri, D. M. 2009, Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. Journal of Food Engineering, 93(2), 210-217.

Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Quintas, M. A. C., Ferreira, A. N. C. S., Teixeira, J. A. and Vicente, A. N. A. 2011, Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(10), 5589-5594.

Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y. S., 2006, Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Food Chemistry, 99(4), 835-841.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. and Li, X., 2008, Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chemistry, 106(2), 804-810.

Wang, L., and Weller, C. L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology, 17(6), 300-312.

Wang, T., Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G., 2009, Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry, 116(1), 240-248.

Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W., 2009, Antioxidant Activities of Four Edible Seaweeds from the Southern Coast of Thailand. Plant Foods for Human Nutrition (Formerly QualitasPlantarum), 64(3), 218-223.

Zhang, H. F., Yang, X. H. and Wang, Y. 2011, Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. Trends in Food Science & Technology, 22(12), 672-688.