بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولی از جلبک *Caulerpa sertularioides* با روش مایکروویو

یاسمین فیاض[a]، مسعود هنرور[b*]، نرگس مورکی[c]

[a] *دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[b] *دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[c] *دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۲/۱۶
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1400.18.2.1.7

چکیده

مقدمه: گیاهان همواره یکی از مواد اولیه اصلی برای استفاده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی- بهداشتی محسوب می‌شده‌اند. جلبک دریایی منبعی غنی از ترکیبات زیست فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل کلروفیل a و b، کاروتنوئید و محتوای فنول کل از جلبک *Caulerpa sertularioides* با روش مایکروویو و براساس متغیرهای مستقل شامل زمان استخراج، قدرت مایکروویو، نوع حلال و نسبت حلال به نمونه انجام شده است. طراحی آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Design Expertبا ۲۵ اجرا صورت گرفت و مقدار ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: داده‌های حاصل از سنجش کلروفیل a و b حاکی از آن بود که از میان ۴ متغیر تحت بررسی، تنها نوع حلال اثر معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). طبق نتایج بدست آمده شرایط بهینه برای استخراج کلروفیل a و b در این جلبک شامل حلال متانول، توان ۱۸۰ وات، زمان ۲۰ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ۱۲/۵ بود. در رابطه با کاروتنوئید نیز حلال تنها فاکتور معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) و شرایط بهینه استخراج این ترکیب شامل حلال متانول، توان ۹۰ وات، زمان ۱۰ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ۵ بود. در رابطه با محتوای فنول کل، هیچ یک از ۴ پارامتر فرآیند استخراج اثر معنی داری بر استخراج آن نداشت ($P>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق جلبک *Caulerpa sertularioides* منبع مهمی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است و با بررسی اثر فاکتورهای استخراج بر روی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولی آن و تعیین شرایط بهینه استخراج هر ترکیب، می‌توان بهره‌برداری مناسبی از این جلبک نمود.

واژه‌های کلیدی: *استخراج، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، مایکروویو، Caulerpa sertularioides*

* نویسنده مسئول مکاتبات
email: m-honarvar@hotmail.com

مقدمه

گیاهان منبع اصلی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی محسوب شده و محدود به منابع خشکی نمی‌باشند. امروزه باتوجه به عوارض نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامتی انسان مانند افزایش احتمال جهش‌زایی و سرطانزایی میل به استفاده از آن‌ها رو به کاهش رفته و اکثر تولیدکنندگان به دنبال جایگزینی آن‌ها با افزودنی‌های طبیعی می‌باشند (Hwang *et al.*, 2001). از آنجایی که بیش از ۷۰ درصد سطح کره زمین توسط آب احاطه شده است و این محیط‌های آبی دارای تنوع زیستی گسترده‌ای می‌باشند، گیاهان آبزی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. جلبک‌ها به عنوان ترکیبی غنی از متابولیت‌های زیست فعال از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند. بیومس جلبک از بیومس گیاهان خشکی زی بیشتر بوده و دارای ترکیبات متنوعی است که در مقایسه با گیاهان خشکی‌زی مطالعات کمتری بر روی آن‌ها انجام شده است. مطالعه برروی جلبک‌ها به خصوص ماکروجلبک‌ها شاخه‌ای پراهمیت در رشته علوم و تکنولوژی مواد غذایی محسوب می‌شود (Dominguez, 2013). نتایج مطالعات و بررسی‌های مختلفی که برروی جلبک‌ها و ترکیبات موجود در آن‌ها انجام شده است حاکی از وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلف در آن‌ها می‌باشد. امروزه روش‌های مختلفی برای استخراج مواد مفید از جلبک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش‌های متداول وقت‌گیر بوده و به مقدار زیادی حلال نیاز دارند (Proestos and Komaitis, 2008). در سال‌های اخیر میل به روش‌های جدید استخراج که عملیات را با حداقل مقدار حلال و در کوتاه‌ترین زمان ممکن انجام دهند افزایش یافته است. استخراج بوسیله مایکروویو نوعی روش جدید بوده و در مقایسه با روش‌های مرسوم همچون سوکسله این شیوه دارای مزیت‌هایی از جمله نیاز به حلال کمتر و زمان کوتاه‌تر، هزینه پایین و نرخ استخراج بیشتر می‌باشد. نتایج تحقیق Nutcher و همکاران (۲۰۰۴) حاکی از آن بوده که استخراج با مایکروویو در مقایسه با روش‌های متداول ضمن صرفه‌جویی در انرژی، استخراج مؤثرتری در خصوص ترکیبات حساس به حرارت دارد. به‌طور کلی روش مایکروویو روشی مناسب برای استخراج ترکیبات ارزشمند زیست فعال از نمونه‌های گیاهی مختلف محسوب می‌شود. نتایج مطالعات انجام شده در زمینه استخراج ترکیبات زیست فعال از جلبک‌ها نشان دهنده وجود مقدار زیادی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلف در آن‌ها بوده است، به همین خاطر در رژیم‌های غذایی و اهداف دارویی کاربرد دارند (Darah *et al.*, 2014). در سال‌های اخیر مطالعات متعددی برروی خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها انجام شده است. برای مثال Senobari و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای به بررسی اثر غلظت‌های مختلف از نیکل و وجود اسیدیته بالا در محیط رشد جلبک *Cladophora glomerata* برروی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن پرداختند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد که مقدار فنول و فلاونوئید تام و خواص آنتی‌اکسیدانی به عوامل مختلفی همچون دما، pH، شوری و سایر عوامل موجود در محیط رشد گیاه بستگی دارد و این عوامل می‌توانند برروی فرآیندهای متابولیکی جلبک اثرگذار باشند. بررسی‌ها و مطالعات مختلف نشان داده که جلبک‌ها قادر هستند در برابر استرس‌های محیطی به روش‌های مختلفی از خود محافظت کنند. همانطور که در تحقیق Senobari و همکاران (۲۰۱۴)، وجود فلزات سنگین در محیط منجر به افزایش مقدار فنول و فلاونوئید جلبک می‌شود. علت این امر این بوده که ترکیبات فنول و فلاونوئید قادر به تشکیل کمپلکس با فلزات می‌باشند. همچنین عواملی همچون فاز رشد جلبک و زمان جمع آوری آن برروی مقدار سنتز ترکیبات مختلف آن اثرگذار می‌باشد (Orduna-Rojas *et al.*, 2002). پراکنش وسیع گونه‌های متنوع جلبک در خلیج فارس زمینه مطالعات گسترده ای را برای محققین به وجود آورده است. البته این منابع با ارزش تاکنون به اندازه کافی مورد توجه و بهره‌برداری قرار نگرفته اند. برای مثال جلبک *Caulerpa sertularioides* نوعی جلبک سبز است که به شکل بومی در خلیج فارس رشد می‌کند. این جلبک اوتوترف بوده و از طریق فتوسنتز انرژی خود را کسب می‌کند به همین خاطر در اعماق کم آب‌های گرم منطق استوایی و نیمه استوایی، نزدیک سواحل و برروی صخره‌های مرجانی که شدت نور خورشید تابیده شده در آن‌ها زیادتر است، یافت می‌شود (Schnetter & Bula-Meyer, 1982). مطالعات مختلفی حاکی از وجود توان آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌های دریایی از جمله جنس *Caulerpa* بوده‌اند (Sumathi & Krishnavenim, 2012). تنها پژوهشی که تا به امروز برروی خواص

آنتی‌اکسیدانی جلبک *Caulerpa sertularioides* در ایران صورت گرفته تحقیقFarasat و همکاران (۲۰۱۴) بوده است. در پروژه ایشان عصاره گیری از این جلبک با استفاده از دستگاه اولتراسونیک صورت گرفت و سپس مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئید و قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد جلبک *Caulerpa sertularioides* خواص آنتی‌اکسیدانی مورد توجهی داشته است. با توجه به نکات ذکر شده در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک *Caulerpa sertularioides* و همچنین مزایای روش استخراج با مایکروویو، در این پژوهش برای اولین بار در ایران به بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولی از جلبک *Caulerpa sertularioides* جمع آوری شده از سواحل خلیج فارس با روش مایکروویو پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

- آماده‌سازی نمونه

نمونه جلبک *Caulerpa sertularioides* در تیر ماه سال ۱۳۹۶ از مناطق ساحلی خلیج فارس در نزدیکی استان بوشهر با طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۴۸ دقیقه و ۴۸/۶۱۹ ثانیه و عرض جغرافیایی ۲۸ درجه و ۵۴ دقیقه و ۵۱/۷۰۶ ثانیه جمع آوری شد. پس از جمع آوری نمونه از دریا و شناسایی مولکولی آن، دو مرحله شست و شو با آب شیرین انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی قرار گرفته و خشک شدند. در نهایت نیز توسط آسیاب الکتریکی (برند IKA مدل M20 Universal ساخت کشور آلمان) کاملا ریز و خرد شده و از الک با شماره مش ۷ عبور داده شدند.

- استخراج با مایکروویو

به منظور استخراج عصاره جلبک مقدار مشخصی از پودر جلبک با حلال مخلوط شد. شرایط هر آزمون شامل زمان استخراج، نوع حلال، توان مایکروویو و نسبت حلال به نمونه با توجه به طراحی آزمایش صورت گرفته مطابق جدول ۲ در نظر گرفته شد. استخراج توسط مایکروویو آزمایشگاهی (برند Mileston ساخت کشور ایتالیا) انجام شد. در نهایت پس از انجام فرآیند استخراج با مایکروویو، عصاره‌ها از دستگاه مایکروویو خارج شد و از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. عصاره‌های بدست آمده در بطری‌های شیشه‌ای تیره در یخچال با دمای ۴- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون نگه داری گردید.

- سنجش کلروفیل a و b

پس از تهیه عصاره‌ها میزان کلروفیل b مطابق روش Lichtentaler و Wellburn که طی آن جذب عصاره‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (برند Shimadzu مدل UV-2700 ساخت کشور ژاپن) در دو طول موج 653 و 666 نانومتر قرائت شد مطابق معادله ۱ بدست آمد (Lichtentaler & Wellburn, 1985).

$$\text{Chlorophyll b}=27.05\ A_{653}-11.21\ A_{666} \quad (۱)$$

A_{653} = میزان جذب در طول موج ۶۵۳ نانومتر

A_{666} = میزان جذب در طول موج ۶۶۶ نانومتر

مقدار کلروفیل a عصاره‌ها با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد (Omar *et al.*, 2018).

$$\text{Chlorophyll a}=10.3\ A_{665}-0.918\ A_{650} \quad (۲)$$

A_{665} = میزان جذب در طول موج ۶۶۵ نانومتر

A_{650} = میزان جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر

- سنجش میزان کاروتنوئید

مقدار کاروتنوئید عصاره‌ها با استفاده از معادله ۳ اندازه‌گیری شد (Omar *et al.*, 2018).

$$\text{Carotenoids}=4.2\ A_{452}-0.0246\ \text{Chlorophyll a} \quad (۳)$$

A_{452} = میزان جذب در طول موج ۴۵۲ نانومتر

- سنجش محتوای فنول کل

به‌منظور سنجش فنول کل ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های جلبکی با ۴ میلی لیتر Na_2CO_3 ۲ درصد مخلوط شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. بعد از آن ۰/۲ سی‌سی معرف فولین- سیوکالتیو ۵۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب آن در ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Taga *et al.*, 1984). به منظور رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک در غلظت‌های

۰، ۰/۰۰۲، ۰/۰۱ و ۰/۰۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. معادله استاندارد اسید گالیک مطابق رابطه ۴ بود که در آن مقدار Y عبارت بود از عدد جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و مقدار X غلظت گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در نهایت مقدارترکیبات فنولی هر عصاره بر طبق رابطه ۴ و برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر حجم آن عصاره بیان شد.

$$Y=0.0053X-0.003(R^2 = 0.995) \quad (۴)$$

- **تجزیه و تحلیل آماری**

طراحی آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Design Expert با استفاده از روش آماری سطح پاسخ Box-Behnken و طراحی مدل درجه دوم (Quadratic) با ۲۵ اجرا انجام شد. در این تحقیق عصاره‌گیری هر دو جلبک به روش مایکروویو انجام شد. در انجام روش مایکروویو برای هر جلبک ۲۵ اجرا با لحاظ چهار فاکتور نوع حلال، زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه جلبک در نظر گرفته شد (جدول ۱). در طراحی آزمایش متغیر رتبه‌ای حلال با توجه به میزان قطبیت حلال‌ها با استفاده از روش کددهی Dummy (Dummy coding) مورد استفاده قرار گرفتند. روش سطح پاسخ در حقیقت از طراحی فاکتوریل به وجود آمده است و دارای دو گروه اصلی شامل طراحی فاکتوریل درجه دوم (Quadratic Factorial Design) به نام طراحی Box-Behnken و طراحی مرکب مرکزی (Central composite) است.

جدول ۱- متغیرهای هدف در استخراج عصاره به روش مایکروویو از جلبک *Caulerpa sertularioides*

متغیر	کد	حد بالا	حد پایین
حلال	A	*	*
زمان	B	۱۰ دقیقه	۳۰ دقیقه
قدرت	C	۹۰	۲۷۰
نسبت	D	۵	۲۰

* حلال ۱: آب (قطبیت قوی)، حلال ۲: متانول (قطبیت متوسط)، حلال ۳: اتانول (قطبیت ضعیف)

یافته‌ها

- **تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان کلروفیل a**

پراکنش داده‌های مربوط به کلروفیل با توجه به نمودار اولیه Box-Cox نرمال نبوده و از این رو از تبدیل داده‌ها (Transform) بر مبنای معادله توانی $Y'=Log_{10}(Y+K)^{Lambda}$ استفاده شد. پس از اجرای آنالیز، مدل جمع مربعات پیشنهادی، چند جمله‌ای درجه دوم (Quadratic) بود که در مقایسه با سایر معادلات ارائه شده probability>F(P-Value) کمتری معادل ۰/۰۰۰۲ را نشان داد. همچنین مقدار R-Squared و AdjustedR-Squared به ترتیب معادل ۰/۹۲۵ و ۰/۸۲۰ محاسبه شد که نشان دهنده معنی‌دار بودن مدل تعریف شده برای استخراج کلروفیل a از جلبک *Caulerpa sertularioides* با توجه به ۴ متغیر مستقل بود. نتایج تحلیل واریانس برای سطح پاسخ مدل درجه دوم به شرح جدول ۳ است. با توجه به جدول مقادیر P-Value کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده معنی‌داری و تأثیرگذاری متغیر در مدل هستند. در این معادله A و A^2 (نوع حلال) معنی‌دار هستند و مقادیر بالاتر از ۰/۱ نشان دهنده معنی دار نبودن متغیر در معادله است.

مقدار F (۸/۱۸) نشان‌دهنده معنی‌داری مدل است و فقط ۰/۰۷ درصد احتمال دارد که مقدار F به سبب Noise باشد. در دو نمودار ۱ و ۲ وضعیت پراکنش داده‌ها نمایش داده شده است (با توجه به نمودار ۱ تبدیل power صورت گرفت).

در نمودار همبستگی ۳ اثر فاکتور حلال بر میزان استخراج کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides* قابل ملاحظه می‌باشد. همانگونه که در این نمودار مشخص شده بیشترین مقدار کلروفیل a با استفاده از حلال شماره ۲ (متانول) بدست آمد.

فاکتورهای زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه همانطور که در جدول ۳ ارائه شده است اثر معنی‌داری بر میزان استخراج کلروفیل a نداشتند ($P>0/05$).

جدول ۲- طراحی آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و روش طراحی Box-Behnken برمبنای ٤ فاکتور قدرت مایکروویو، زمان استخراج، نوع حلال و نسبت حلال به نمونه برای جلبک *Caulerpa sertularioides*

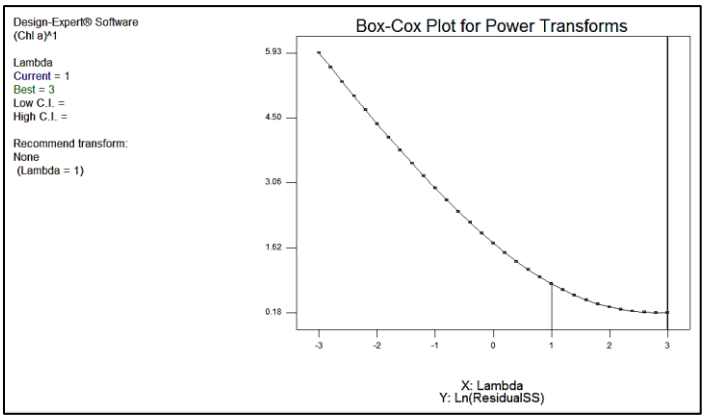
تیمار	نوع حلال	زمان (دقیقه)	قدرت مایکروویو (وات)	نسبت حلال به نمونه (w/v)
۱	۳	۲۰	۲۷۰	۱۲/۵
۲	۲	۲۰	۲۷۰	۲۰
۳	۳	۳۰	۱۸۰	۱۲/۵
۴	۲	۱۰	۲۷۰	۱۲/۵
۵	۲	۲۰	۲۷۰	۵
۶	۲	۱۰	۱۸۰	۲۰
۷	۳	۲۰	۹۰	۱۲/۵
۸	۱	۲۰	۱۸۰	۲۰
۹	۲	۳۰	۹۰	۱۲/۵
۱۰	۲	۱۰	۹۰	۱۲/۵
۱۱	۲	۱۰	۱۸۰	۵
۱۲	۱	۱۰	۱۸۰	۱۲/۵
۱۳	۲	۳۰	۱۸۰	۲۰
۱۴	۱	۲۰	۱۸۰	۵
۱۵	۲	۳۰	۱۸۰	۵
۱۶	۳	۲۰	۱۸۰	۲۰
۱۷	۲	۲۰	۱۸۰	۱۲/۵
۱۸	۱	۲۰	۲۷۰	۱۲/۵
۱۹	۲	۲۰	۹۰	۲۰
۲۰	۲	۲۰	۹۰	۵
۲۱	۱	۲۰	۹۰	۱۲/۵
۲۲	۳	۱۰	۱۸۰	۱۲/۵
۲۳	۲	۳۰	۲۷۰	۱۲/۵
۲۴	۳	۲۰	۱۸۰	۵
۲۵	۱	۳۰	۱۸۰	۱۲/۵

* حلال ۱: آب، حلال ۲: متانول، حلال ۳: اتانول

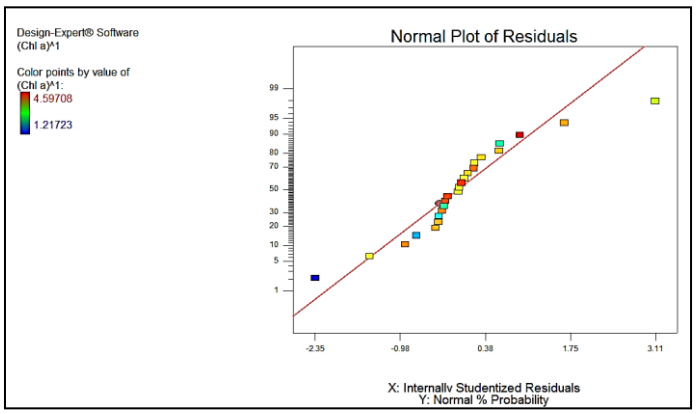
جدول ۳- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور C,B,A وD بر استخراج کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides*

منبع تغییرات	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F Value	p-value Prob > F
مدل	۱۸/۱۸	۱۴	۱/۳	۸/۸۱	۰/۰۰۰۷*
A- نوع حلال	۷/۸۳	۱	۷/۸۳	۵۳/۰۸	< ۰/۰۰۰۱
B- زمان استخراج	۰/۰۰۰۳	۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۹۶۱۲
C- قدرت مایکروویو	۰/۰۳۹	۱	۰/۰۳۹	۰/۲۶	۰/۶۱۸۴
D- نسبت حلال به نمونه	۰/۰۰۰۶	۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۴	۰/۹۴۸۱
AB	۰/۰۳۶	۱	۰/۰۳۶	۰/۲۵	۰/۶۳۰۲
AC	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۱/۶۷	۰/۲۲۴۸
AD	۰/۴۸	۱	۰/۴۸	۳/۲۴	۰/۱۰۱۹
BC	۰/۰۰۴	۱	۰/۰۰۴	۰/۰۲۹	۰/۸۶۸۷
BD	۰/۰۲۱	۱	۰/۰۲۱	۰/۱۴	۰/۷۱۳۶
CD	۰/۰۰۹	۱	۰/۰۰۹	۰/۰۶۶	۰/۸۰۲۹
A2	۴/۲۶	۱	۴/۲۶	۲۸/۸۷	۰/۰۰۰۳*
B2	۰/۰۶۸	۱	۰/۰۶۸	۰/۴۶	۰/۵۱۲۳
C2	۰/۳۵	۱	۰/۳۵	۲/۴	۰/۱۵۲۵
D2	۰/۱۳	۱	۰/۱۳	۰/۸۶	۰/۳۷۵۸
باقی مانده	۱/۴۷	۱۰	۰/۱۵		
هسته کل	۱۹/۶۶	۲۴			

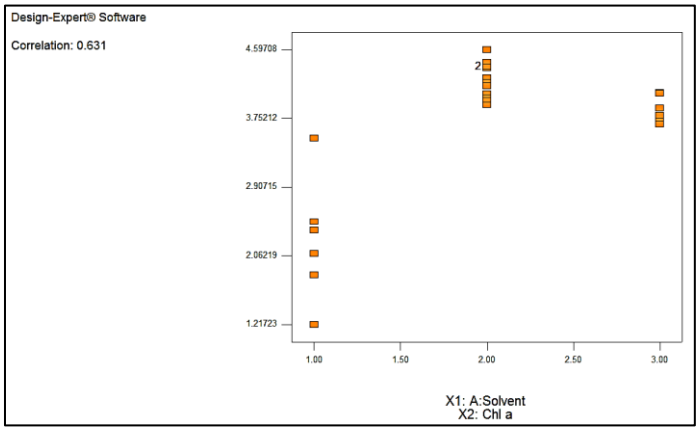
*: معنی‌داری در سطح P<۰/۰۵



نمودار ۱- نمودار Box-Cox کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۲- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده های کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides*

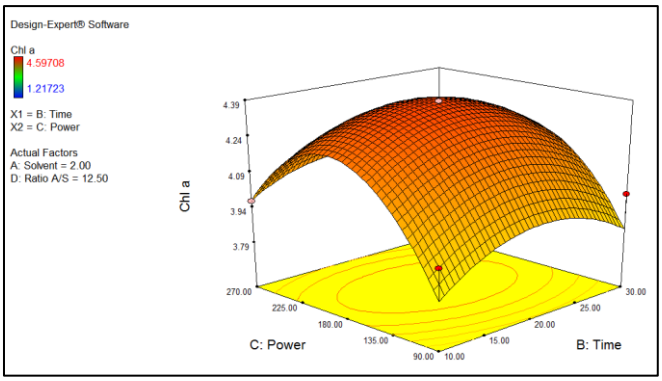


نمودار ۳- نمودار همبستگی اثر نوع حلال بر استخراج کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides*

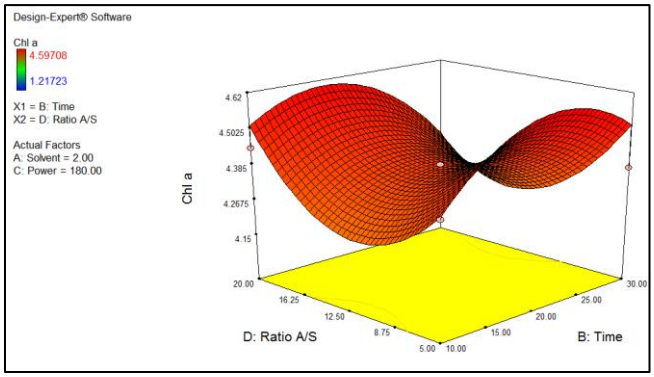
در سه نمودار ۴، ۵ و ۶ نمودارهای سه بعدی اثرات متقابل فاکتورهای قدرت مایکروویو، زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه ارائه شده است. به طور کلی با مشاهده نمودارها، توان ۱۸۰ وات، زمان ۲۰ دقیقه و نسبت حلال به نمونه برابر با ۱۲/۵ به عنوان شرایط استخراج بهینه کلروفیل a از جلبک *Caulerpa sertularioides* پیشنهاد می شود.

معادله نهایی استخراج کلروفیل a از جلبک *Caulerpa sertularioides* براساس متغیرهای کد شده با حذف اثرات متقابل فاکتورها با توجه به عدم معنی‌داری مطابق معادله ۵ می‌باشد.

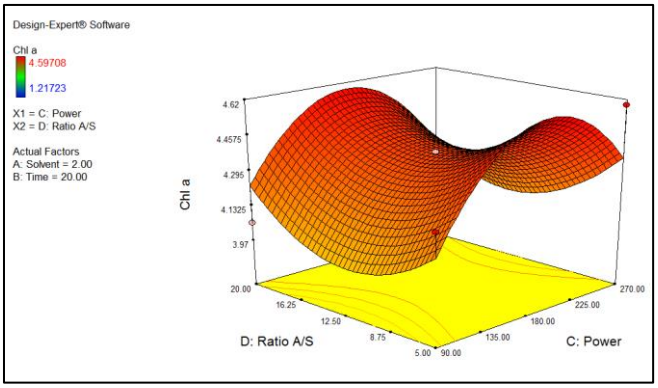
$$Chl\ a = 4.39+0.81A-0.005B+0.057C\ 0.007D-1.23A^2-0.16B^2-0.35C^2+0.21D^2 \quad (۵)$$



نمودار ٤- نمودار سه بعدی اثر متقابل زمان استخراج و قدرت مایکروویو بر استخراج کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioide*



نمودار ٥- نمودار سه بعدی اثر متقابل زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه بر استخراج کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ٦- نمودار سه بعدی اثر متقابل قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه بر استخراج کلروفیل a جلبک *Caulerpa sertularioides*

- تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان کلروفیل b

با توجه به نمودار Box-Cox و نمودار نرمال پراکنش داده های حاصل از استخراج کلروفیل b دارای پراکنش نرمال بود. بعد از اجرای آنالیز، مدل جمع مربعات پیشنهادی، چند جمله ای درجه دوم(Quadratic) بود که در مقایسه با سایر معادلات ارائه شده (P-Value)probability>F کمتر از ۰/۰۰۰۱ را نشان داد. همچنین مقدار R-Squared و Adjusted R-Squared به ترتیب معادل ۰/۹۸۳ و ۰/۹۶۱ محاسبه شد که نشان دهنده معنی‌دار بودن مدل تعریف شده برای استخراج کلروفیل b از جلبک *Caulerpa sertularioides* با توجه به ۴ متغیر مستقل بود. نتایج تحلیل واریانس برای سطح پاسخ مدل درجه دوم به شرح جدول ۴ است. با توجه به جدول مقادیر P-Value کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده

معنی‌داری و تأثیرگذاری متغیر در مدل هستند. در این معادله A و A^2 (نوع حلال) معنی‌دار هستند و مقادیر بالاتر از ۰/۱ نشان دهنده معنی‌دار نبودن متغیر در معادله است.

در دو نمودار ۷ و ۸ وضعیت پراکنش داده‌ها نمایش داده شده است.

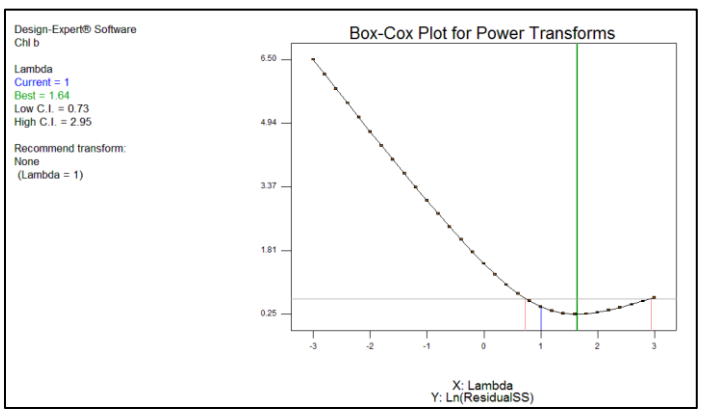
در نمودار همبستگی ۹ اثر فاکتور حلال بر میزان استخراج کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides* قابل‌ملاحظه می‌باشد. همان‌گونه که در این نمودار مشخص شده بیشترین مقدار کلروفیل b با استفاده از حلال شماره ۲ (متانول) بدست می‌آید.

در خصوص فاکتورهای زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه همانطور که در جدول ۴ مشخص شد اثر معنی‌داری بر میزان استخراج کلروفیل b نداشتند (P>۰/۰۵). در سه نمودار ۱۰، ۱۱ و ۱۲ نمودارهای سه بعدی اثرات متقابل فاکتورهای زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه ارائه شده است. به طور کلی با مشاهده نمودارها، توان ۱۸۰ وات، زمان ۲۰ دقیقه و نسبت حلال ۱۲/۵ به‌عنوان شرایط بهینه استخراج کلروفیل b از جلبک *Caulerpa sertularioides* معرفی می‌شود.

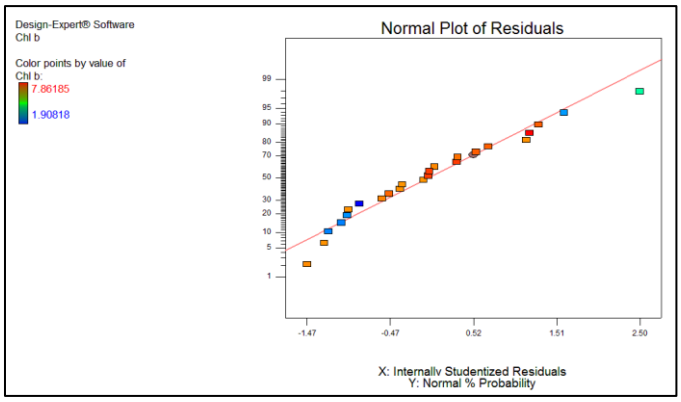
جدول ٤- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور C,B,A وD بر استخراج کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*

منبع تغییرات	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F Value	p-value Prob > F
مدل	۴/۹۵	۱۴	۰/۳۵	۳۴/۵۳	< ۰/۰۰۰۱
A- نوع حلال	۲/۹۶	۱	۲/۹۶	۲۸۹/۰۰	< ۰/۰۰۰۱
B- زمان استخراج	۰/۰۰۷	۱	۰/۰۰۷	۰/۷۸	۰/۳۹۸۲
C- قدرت مایکروویو	۰/۰۱۳	۱	۰/۰۱۳	۱/۳۱	۰/۲۷۸۷
D- نسبت حلال به نمونه	۰/۰۰۸	۱	۰/۰۰۸	۰/۸۶	۰/۳۷۵۵
AB	۰/۰۱۴	۱	۰/۰۱۴	۱/۴	۰/۲۶۳۸
AC	۰/۰۴	۱	۰/۰۴	۳/۹۴	۰/۰۷۵۳
AD	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۰۱	۰/۱۹	۰/۶۷۵۲
BC	۰/۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۲	۰/۹۱۳۴
BD	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۰۱	۰/۱۴	۰/۷۱۵۷
CD	۰/۰۰۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۹۹۹
A2	۰/۹۲	۱	۰/۹۲	۸۹/۵۲	< ۰/۰۰۰۱
B2	۰/۰۰۰۴	۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۹۴۸۶
C2	۰/۰۱۷	۱	۰/۰۱۷	۱/۶۸	۰/۲۲۴۵
D2	۰/۰۰۰۰۰۷	۱	۰/۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۷	۰/۹۷۹۲
باقی مانده	۰/۱	۱۰	۰/۰۱		
هسته کل	۵/۰۵	۲۴			

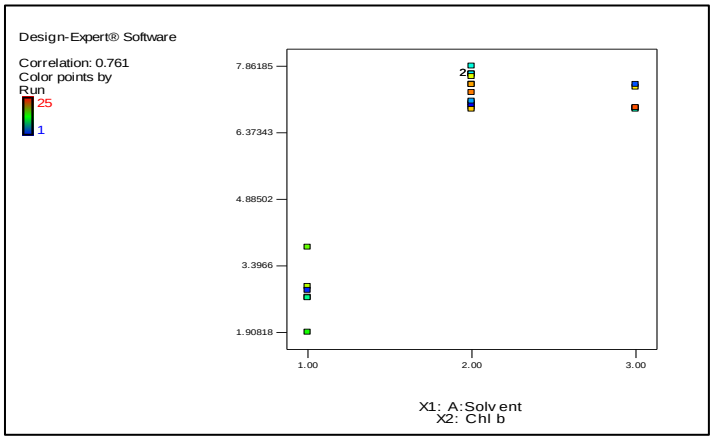
*: معنی داری در سطح P<۰/۰۵



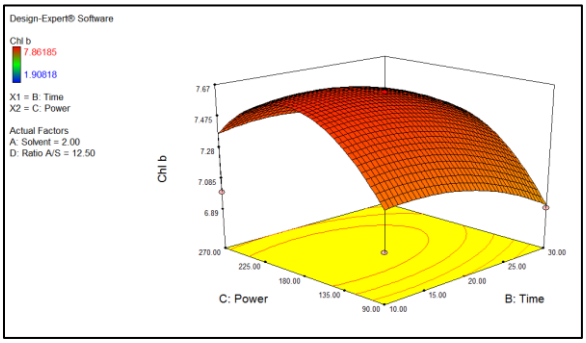
نمودار ۷- نمودار Box-Cox کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*



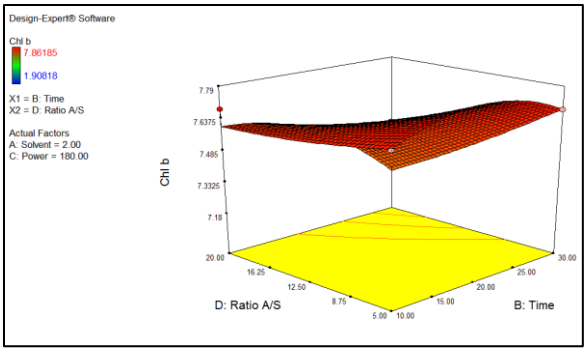
نمودار ۸- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده‌های کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*



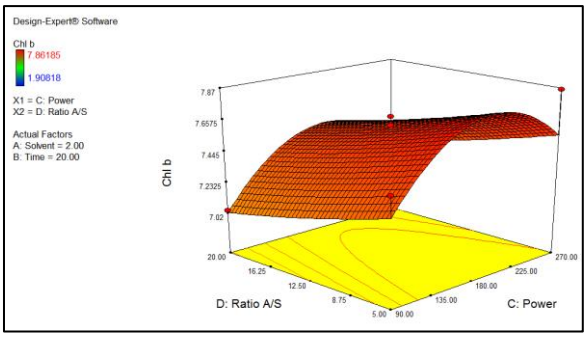
نمودار ۹- نمودار همبستگی اثر نوع حلال بر استخراج کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۱۰- نمودار سه بعدی اثر متقابل زمان استخراج و قدرت مایکروویو بر استخراج کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۱۱- نمودار سه بعدی اثر متقابل زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه بر استخراج کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۱۲- نمودار سه بعدی اثر متقابل قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه بر استخراج کلروفیل b جلبک *Caulerpa sertularioides*

معادله نهایی استخراج کلروفیل b از جلبک *Caulerpa sertularioides* براساس متغیرهای کد شده مطابق معادله ۶ می‌باشد.

$$Chl\ b = 7.62+2.14A-0.11B+0.12C-0.15D-2.53A^2-0.1B^2-0.35C^2+0.017D^2 \quad (۶)$$

- تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان کاروتنوئید

با توجه به نمودارهای ۱۳ و ۱۴ پراکنش داده‌های حاصل از اندازه‌گیری کاروتنوئید نرمال بود. بعد از اجرای آنالیز، مدل جمع مربعات پیشنهادی چند جمله‌ای درجه دوم (Quadratic) بود که در مقایسه با سایر معادلات ارائه شده (P-Value)probability>F کمتر از ۰/۰۰۰۱ را نشان داد. همچنین مقدار R-Squared و Adjusted R-Squared به ترتیب معادل ۰/۹۴۸ و ۰/۸۵۷ محاسبه شد که نشان دهنده معنی‌دار بودن مدل تعریف شده برای استخراج کاروتنوئید از جلبک *Caulerpa sertularioides* با توجه به ۴ متغیر مستقل بود. نتایج تحلیل واریانس برای سطح پاسخ مدل درجه دوم به شرح جدول ۵ است. با توجه به جدول مقادیر P-Value کمتر از ۰/۰۵ نشان دهنده معنی‌داری و تأثیرگذاری متغیر در مدل هستند. در این معادله A و A^2 (حلال) معنی‌دار هستند و مقادیر بالاتر از ۰/۱ نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن متغیر در معادله است.

در دو نمودار ۱۳ و ۱۴ وضعیت پراکنش داده‌ها نمایش داده شده است. در نمودار همبستگی ۱۵ اثر فاکتور حلال بر میزان استخراج کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides* قابل ملاحظه می‌باشد. همان گونه که در این نمودار مشخص شده است بیشترین مقدار کاروتنوئید با استفاده از حلال شماره ۲ (متانول) بدست آمد. فاکتورهای زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه همانطور که در جدول ۵ مشخص شد اثر معنی‌داری بر میزان استخراج کاروتنوئید نداشتند (P>۰/۰۵). در سه نمودار ۱۶، ۱۷ و ۱۸ نمودارهای سه بعدی اثرات متقابل فاکتورهای زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه ارائه شده است. به طور کلی با مشاهده نمودارها، توان ۹۰ وات، زمان ۱۰ دقیقه و نسبت ۵ حلال به نمونه شرایط بهینه استخراج کاروتنوئید از جلبک *Caulerpa sertularioides* می‌باشد.

معادله نهایی براساس متغییرهای کدشده مطابق معادله ۷ می باشد.

$$Carotenoid = 4.09+1.1A-0.001B-0.15C-0.17D-1.74A2+0.2B2-0.14C-0.046D2 \quad (۷)$$

- تأثیر پارامترهای استخراج بر محتوای فنول کل

در خصوص استخراج ترکیبات فنولی از جلبک *Caulerpa sertularioides* با توجه به نمودارهای ۱۹ و ۲۰ مشخص می‌شود داده‌های مربوط به استخراج فنول دارای توزیع نرمال می‌باشد. همچنین مشخص شد که ۴ فاکتور نوع حلال، زمان استخراج، قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه تأثیر معنی‌داری بر فرآیند نداشتند (P>۰/۰۵) و مدل ریاضی درجه دوم تعریف شده معنی‌دار نبود و P=۰/۰۸۱ بود.

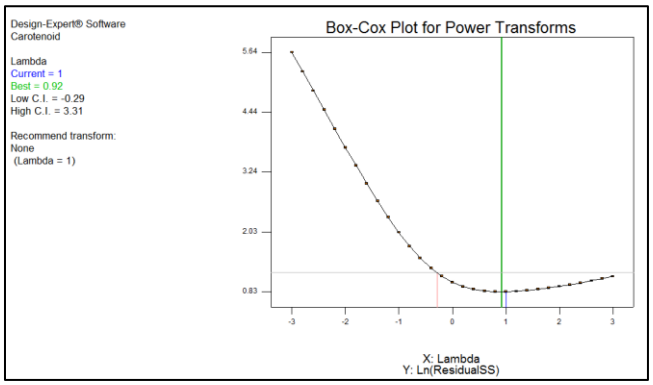
طبق نتایج بدست آمده حلال متانول با نسبت ۱۲/۵، زمان ۲۰ دقیقه و توان مایکروویو برابر با ۱۸۰ وات به عنوان شرایط بهینه استخراج فنول از جلبک *Caulerpa sertularioides* تعریف شده است.

در نمودار ۲۱ منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره‌های تهیه شده قابل مشاهده می‌باشد.

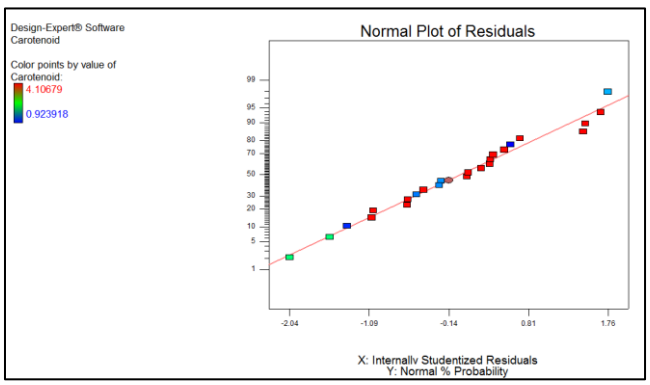
جدول ۵- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور C,B,A وD بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*

منبع تغییرات	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F Value	p-value Prob > F
مدل	۳۶/۵۵	۱۴	۲/۶۱	۱۱/۳۴	۰/۰۰۰۲*
A- نوع حلال	۱۴/۵۴	۱	۱۴/۵۴	۶۳/۱۵	< ۰/۰۰۰۱
B- زمان استخراج	۰/۰۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۵	۰/۹۹۴۳
C- قدرت مایکروویو	۰/۲۸	۱	۰/۲۸	۱/۲۲	۰/۲۹۶۱
D- نسبت حلال به نمونه	۰/۳۷	۱	۰/۳۷	۱/۶۰	۰/۲۳۵۲
AB	۰/۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۹۸۱۲
AC	۱/۰۸	۱	۱/۰۸	۴/۶۹	۰/۰۵۵۶
AD	۰/۷۹	۱	۰/۷۹	۳/۴۳	۰/۰۹۳۶
BC	۰/۰۰۰۰۰۲	۱	۰/۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱	۰/۹۹۷۴
BD	۰/۰۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۵	۰/۹۹۴۲
CD	۰/۰۰۰۰۰۵	۱	۰/۰۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۲	۰/۹۹۶۱
A2	۸/۵۸	۱	۸/۵۸	۳۷/۲۶	۰/۰۰۰۱
B2	۰/۱۱	۱	۰/۱۱	۰/۴۷	۰/۵۰۶۵
C2	۰/۰۵۸	۱	۰/۰۵۸	۰/۲۵	۰/۶۲۶۹
D2	۰/۰۰۶	۱	۰/۰۰۶	۰/۲۶	۰/۸۷۴۶
باقی مانده	۲/۳	۱۰	۰/۲۳		
هسته کل	۳۸/۸۵	۲۴			

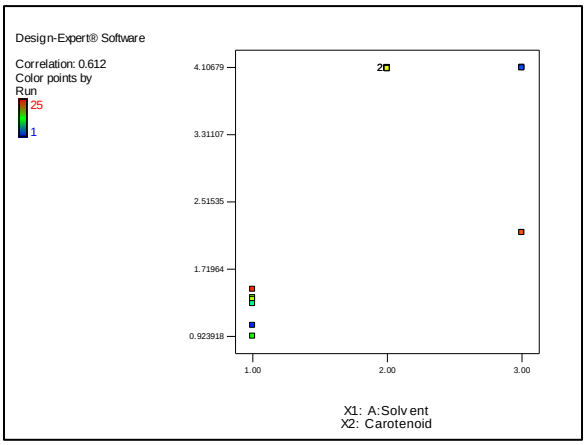
*: معنی داری در سطح P<۰/۰۵



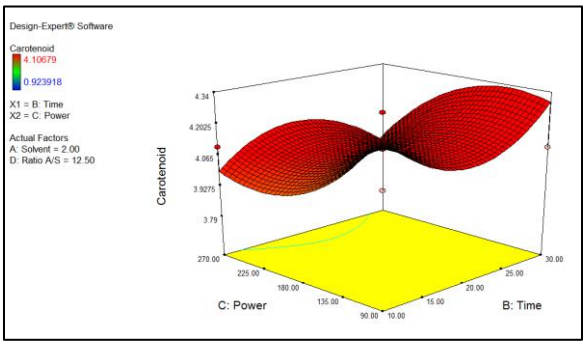
نمودار ۱۳- نمودار Box-Cox کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*



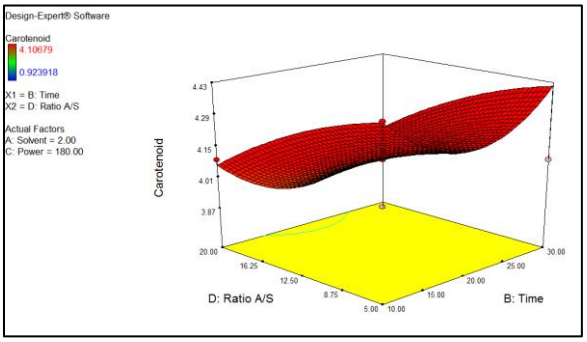
نمودار ١٤- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده های کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*



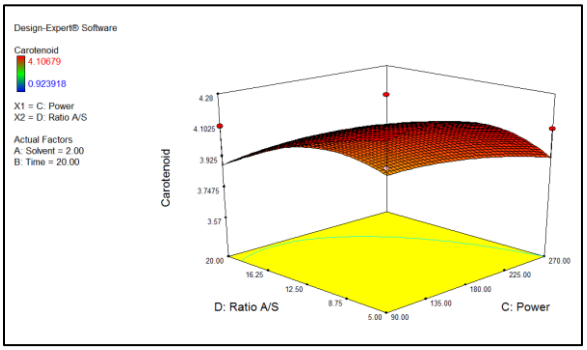
نمودار ۱۵- نمودار همبستگی اثر نوع حلال بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*



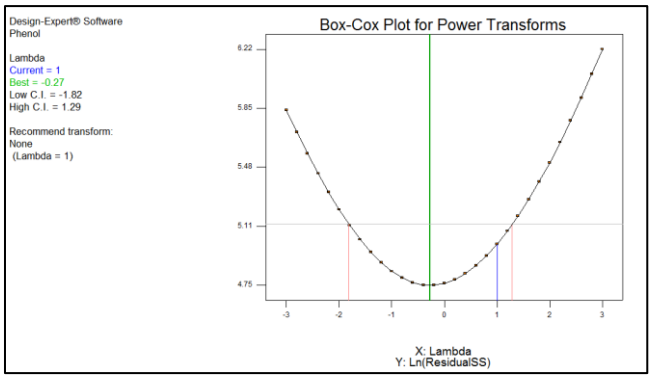
نمودار ١٦- نمودار سه بعدی اثر متقابل زمان استخراج و قدرت مایکروویو بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*



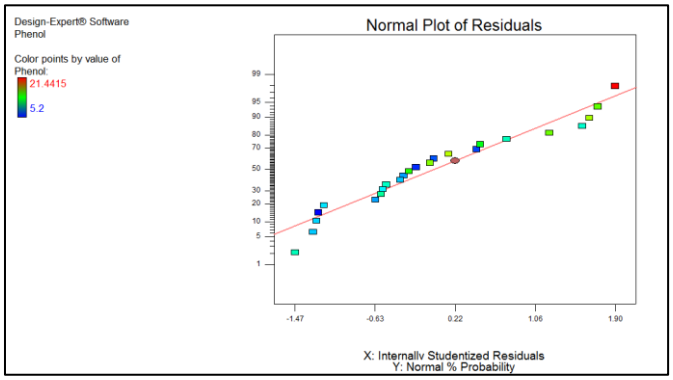
نمودار ۱۷- نمودار سه بعدی اثر متقابل زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*



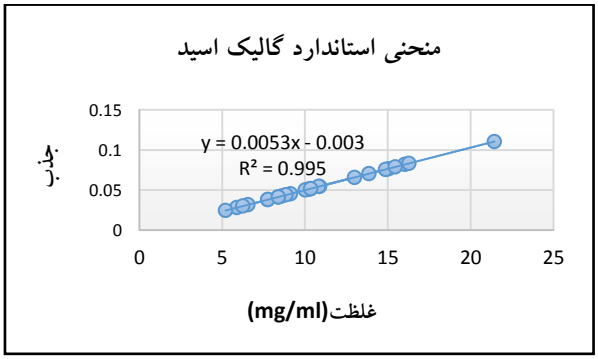
نمودار ۱۸- نمودار سه بعدی اثر متقابل قدرت مایکروویو و نسبت حلال به نمونه بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۱۹- نمودار Box-Cox محتوای فنول کل جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۲۰- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده های فنول کل جلبک *Caulerpa sertularioides*



نمودار ۲۱- منحنی استاندار گالیک اسید

بحث

مطالعات مختلف انجام شده برروی جلبک‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نشان‌دهنده اثر عواملی همچون نوع گونه جلبک و روش استخراج و عوامل زیست محیطی از جمله فصل، شرایط آب و هوایی و محیطی، توزیع جغرافیایی و تنوع فیزیولوژی بر روی خواص آنتی اکسیدانی جلبک ها بوده است. در تحقیق Cox و همکاران (۲۰۱۰) هیچ گونه ارتباط مستقیمی بین مقدار فنول و قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH در جلبک‌های *Laminaria digitata Laminaria saccharina, Himanthalia elongata, Palmaria palmate* و *Chondrus crispus* و *Enteromorpha spirulina* مشاهده نشد. همچنین نتایج تحقیقات Mamelona و همکاران (۲۰۰۷) برروی عصاره‌ی خیار دریایی *Cucumaria frondosa* نشان‌دهنده ارتباط بسیارکم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار کل ترکیبات فنولی بود. بنابراین نمی‌توان به طور قطع در این خصوص اظهار نظر نمود زیرا عوامل مختلف دیگری همچون شرایط محیطی برروی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی یک نمونه تأثیرگذار می‌باشند. برای مثال نتایج تحقیق O'Sullivan و همکاران (۲۰۱۱) حاکی از وجود ارتباط بین

نوع گونه جلبک و میزان فنول کل آن بود. همچنین در گونه‌های مشابه نیز بسته به شرایط اقلیمی، آب و هوایی و میزان نور در محیط رشد جلبک محتوای فنول می‌تواند متفاوت باشد. برای مثال در صورت افزایش دمای محیط، مقدار فنول متعلق به برخی گونه‌های جلبک در پاسخ به استرس محیطی وارد شده افزایش می‌یابد. طبق مطالعه Jung و همکاران (۲۰۰۳) که برروی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه *Lupinus albus* انجام شده است، افزایش pH محیط سبب افزایش مقدار فنول و فلاونوئید می‌شود که این نکته در فعالیت‌های صنعتی دارای اهمیت می‌باشد. Senobari و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه‌ای به بررسی اثر غلظت‌های مختلف از نیکل و وجود اسیدیته بالا در محیط رشد جلبک *Cladophora glomerata* برروی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این جلبک پرداختند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد که مقدار فنول و فلاونوئید تام و خواص آنتی‌اکسیدانی به عوامل مختلفی همچون دما، pH ، شوری و سایر عوامل موجود در محیط رشد گیاه بستگی دارد و می‌تواند برروی فرآیند متابولیکی آن ها اثرگذار باشد. نتایج مطالعه Farasat و همکاران (۲۰۱۴) برروی خواص آنتی اکسیدانی جلبک های دریایی نشان داده که تمامی جلبک های مورد مطالعه دارای توان آنتی‌اکسیدانی ولی با درجات متفاوت بوده اند که این امر به شرایط محیطی خاص منطقه‌ای که هر نمونه در آن وجود داشته است مرتبط می‌باشد. به‌طور کلی به نظر می‌رسد تغییر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب که در اثر عواملی همچون آلودگی‌های ناشی از دخالت‌های انسانی و یا تغییرات آب و هوایی رخ می‌دهد می‌تواند برروی فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی اثرگذار باشد. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن بود که بیشترین میزان استخراج کلروفیل a و b و ترکیبات فنولی از جلبک *Caulerpa sertularioides* با استفاده از حلال متانول، قدرت مایکروویو ۱۸۰ وات و نسبت حلال به نمونه برابر با ۱۲/۵ و طی زمان استخراج ۲۰ دقیقه بدست آمد. شرایط بهینه استخراج کاروتنوئید از این جلبک نیز شامل حلال متانول، قدرت مایکروویو ۹۰ وات، نسبت حلال به نمونه ۵ و زمان استخراج ۱۰ دقیقه بود. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان متانول را مناسب‌ترین حلال در این تحقیق در نظر گرفت. همچنین نتایج تحقیق Hassan Soltan و همکاران (۲۰۱۶) که در خصوص استخراج رنگدانه‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با حلال‌های متانول و هگزان در چند گونه جلبک سبز انجام شد نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل a و b در عصاره های متانولی وجود داشت که با نتایج پروژه حاضر مطابقت دارد. در تحقیق Sousa و همکاران (۲۰۱۰) نیز استخراج آگار از جلبک قرمز *Gracilaria vermiculophylla* با استفاده از مایکروویو انجام شد و نتایج نشان داد که بیشترین مقدار استخراج آگار در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد، طی مدت ۲۰ دقیقه و با استفاده از حلال آب بدست آمد. Zhao و همکاران (۲۰۰۹) در پروژه‌ای به استخراج ترکیب آنتی‌اکسیدانی *Astaxanthin* از جلبک سبز *Haematococcus* با استفاده از مایکروویو پرداختند. شرایط بهینه استخراج شامل استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه جلبک به همراه حلال اتانول و اتیل استات به نسبت ۲ به ۱، قدرت مایکروویو ۱۴۱ وات و زمان استخراج ۸۳ ثانیه بود. مایکروویو روش جدید استخراج است که در مقایسه با روش‌های متداول همچون سوکسله دارای مزایایی از جمله آسیب کمتر به ترکیبات حساس به حرارت می‌باشد. Khajenoori و Haghighi Asl (۲۰۱۴) در تحقیقی به شناخت و بررسی شیوه‌های نوین استخراج همچون استخراج با امواج مایکروویو پرداختند. طی این بررسی مزایای متعددی از جمله سرعت بالا، انتقال جرم بیشتر و کاهش استفاده از حلال‌های آلی سمی در رابطه با این روش مشخص شد. Safari و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای به بررسی اثر حلال‌های مختلف برروی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولی جلبک سبز *Chaetomorpha sp* و جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinuosa* پرداختند. در این بررسی از حلال‌های استون، اتانول و متانول در ترکیب با آب (۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪ و ۱۰۰٪ حجمی/حجمی) برای استخراج با روش غوطه وری استفاده شد. نتایج نشان داد غلظت ۳۰٪ از حلال‌های مختلف بیشترین میزان استخراج فنول کل را از خود نشان داد. درخصوص نوع حلال، استون بیشترین قابلیت را در مقایسه با سایر حلال‌ها برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنولی داشت. همچنین با افزایش درصد آب اضافه شده به حلال، میزان استخراج ترکیبات فنولی افزایش یافت که این امر می‌تواند به دلیل افزایش قطبیت و ماهیت قطبی ترکیبات فنولی باشد که

سبب انحلال بیشتر این ترکیبات در محیط‌های قطبی می‌شود. در پروژه Garmsiri و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* از طریق آزمون‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل سنجیده شد. استخراج به روش غوطه وری با استفاده از حلال‌های آب مقطر (۱۰۰ درصد) و حلال‌های آلی استون، اتانول و متانول با درصدهای ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که عصاره استونی ۵۰٪ بیشترین میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و فعالیت آنتی اکسیدانی کل را نشان داد. در تحقیقی Nahvi و Babakhani Lashkan (۲۰۱۶) به بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* با رفلاکس حرارتی پرداختند. استخراج در سه زمان ۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ دقیقه و با استفاده از سه حلال آب، اتانول و آب/اتانول انجام گرفت. پس از استخراج، میزان فنول کل و میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ها مورد سنجش قرار گرفت. باتوجه به نتایج حاصل شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از این جلبک شامل حلال آب و زمان ۲۷۰ دقیقه بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، جلبک *Caulerpa sertularioides* منبعی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل کلروفیل a و b، کاروتنوئید و ترکیبات فنولی بوده و می‌تواند در صنایع مختلف غذایی، دارویی و آرایشی- بهداشتی مورد بهره‌برداری قرار گیرد. جلبک *Caulerpa sertularioides* با توجه به بومی بودن در منطقه خلیج فارس، از ظرفیت‌های زیستی ارزشمند کشور محسوب می‌شود و لازم است تحقیقات وسیع تری در خصوص ترکیبات ارزشمند آن انجام شود.

در رابطه با اثر فاکتورهای موجود در فرآیند استخراج با مایکروویو برروی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک *Caulerpa sertularioides* که در این پروژه اندازه گیری شدند، نتایج نشان داد در خصوص کلروفیل a و b و کاروتنوئید نوع حلال تنها متغیری بود که اثر معنی‌دار داشت و طبق نتایج بدست آمده متانول مؤثرترین حلال بود. لذا نوع حلال فاکتوری مهم در استخراج کلروفیل a و b و کاروتنوئید از جلبک سبز *Caulerpa sertularioides* می‌باشد. همچنین روش مایکروویو که در این پروژه مورد استفاده قرار گرفت روشی نوین بوده که سبب صرفه‌جویی در زمان، انرژی و هزینه می‌شود و فرآیندی سازگار با محیط زیست محسوب می‌شود.

منابع

Cox, S., Abu-Ghannam, N. & Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. International Food Research Journal, 17, 205-220.

Darah, I., Tong, W.Y., Nor-Afifah, S., Nurul-aili, Z. & Liam, S. (2014). Antimicrobial effects of *Caulerpa sertularioides* extract on foodborne diarrhea-caused bacteria. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 18 (2), 171-178.

Dominguez, H. (2013). Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 1-86.

Farasat, M., Khavari-Nejad, R., Nabavi, M.B. & Namjooyan, F. (2014). Antioxidant activity of methanolic extract of green seaweed *Caulerpa sertularioides. farlowii*. Journal of Marine Biology, 5 (4), 13-20 [In Persian].

Garmsiri, E., Rezaei, M., Shaviklo, A. & Babakhani Lashkan, A. (2013). Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of Persian Gulf Red Algae (*Hypnea hamulosa*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics, 2 (3), 37-48 [In Persian].

Hassan Soltan, T., Noroozi, M. & Amoozegar, M. A. (2016). A survey on total carotenoids, chlorophyll a and b and also antioxidant activity of derived from four strain of green alga isolated from the Golestan coasts (Caspian Sea). New Cellular and Molecular Biotechnology Journal, 6 (24), 31-36 [In Persian].

Hwang, J. Y., Shue, Y. S. & Chang, H. M. (2001). Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. Food Research International, 34 (7), 639-647.

Jung, Ch., Maeder, V., Funk, F., Frey, B., Sticher, H. & Frosserd, E. (2003). Release of phenols from *Lupinus albus L.* roots exposed

to Cu and their possible role in Cu detoxification, Plant and Soil, 252 (2), 301-312.

Khajenoori, M. & Haghighi Asl, A. (2014). Review of extraction of plant natural components by Microwaves and Ultrasounds. Journal of Innovative Food Technologies, 1 (3), 81-91 [In Persian].

Lichtenthaler, H. K. & Wellburn, A. R. (1985). Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11 (5), 591–592.

Mamelona, J., Pelletier, E., Girard-Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S. & Kermasha, S. (2007). Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber *Cucumaria frondosa*. Food Chemistry, 104, 1040–1047.

Nahvi, Z. & Babakhani Lashkan, A. (2016). Optimization of antioxidant compounds extraction from brown algae *Sargassum angustifolium* in heating reflux methods using Taguchi design. Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics, 5 (3), 1-13 [In Persian].

Nuchter, M., Ondruschka, B., Bonrath, W. & Gum, A. (2004). Microwave assisted synthesis – a critical technology overview. Green Chemistry, 6 (3), 128-141.

Omar, H., Al-Judaibiand, A. & El-Gendy, A. (2018). Antimicrobial antioxidant anticancer activity and phytochemical analysis of the red alga *Laurencia papillosa*. International Journal of Pharmacology, 14 (4), 572-583.

Orduna-Rojas, J., Robledo, D. & Dawes, C. J. (2002). Studies on the Tropical Agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (*Rhodophyta*, *Gracilariales*) from Yucatan, Mexico. I. Seasonal Physiological and Biochemical Responses. Botanica Marina, 45, 453-458.

O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y., O'Grady, M. N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D. J., Kerry, J. P. & O'Brien, N. M. (2011). In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. Food Chemistry, 126 (3), 1064-1070.

Proestos, C. & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. Lebensmittel-Wissenschaft & Technology, 41 (4), 652-659.

Safari, P., Rezaei, M., Shaviklo, A. & Babakhani, A. (2015). Optimization of microwave and ultrasound-assisted extraction of antioxidant extract from Green marine algae (*Chaetomorpha sp*) using response surface methodology (RSM). Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources), 68 (4), 555-575 [In Persian].

Schnetter, R. & Bula-Meyer, G. (1982). Algas marinas del litoral Pacífico de Colombia. Edit. Gantner Verlag, Alemania. pp. 287.

Senobari, Z., Jafari, N. & Ebrahimzadeh, M. A. (2014). Effect of nickel and pH on antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Cladophora glomerata*. Journal of Environmental Science and Technology, 16 (2), 129-138 [In Persian].

Sousa, A. M. M., Alves, V. D., Morais, S., Delerue-matos, C. & Goncalves, M. P. (2010). Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: Evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. Bioresource Technology, 101, 3258–3267.

Sumathi, S. & Krishnavenim, M. (2012). Preliminary Screening, antioxidant and antimicrobial potential of *Chaetomorpha antennina* and *Caulerpa scalpelliformis* in vitro study. International Journal of Environmental Science and Technology, 2 (3), 2312-2320.

Taga, S., Miller, E.E. & Pratt, D.E. (1984). Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society, 61 (5), 928–931.

Zhao, L., Chen, G., Zhao, G. & HU, X. (2009). Optimization of microwave-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by response surface methodology and antioxidant activities of the extracts. Separation Science and Technology, 44, 243–262.

Food Technology & Nutrition / Spring 2021 / Vol. 18 / No. 2

Optimization of Extraction of Antioxidant and Phenolic Compounds of *Caulerpa sertularioides* by Microwave-Assisted Extraction Process

Y. Fayaz [a], M. Honarvar [b] *, N. Moorki [c]

[a] M.Sc. Graduated of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[b] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[c] Associate Professor of the Department of Fisheries Science, college of Marine Science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 1 January 2020 Accepted: 6 March 2020

Abstract

Introduction: Plants have been always considered as one of the main raw materials to be used in food, pharmaceutical and cosmetic industries. Marine algae is a rich sources of bioactive compounds with antioxidant activity.

Materials and Methods: In this study optimization of extraction of antioxidant compounds including chlorophyll a and b, carotenoids and total phenolic contents of *Caulerpa sertularioides* has been carried out by microwave-assisted extraction, based on extraction time, microwave power, solvent type and solvent to sample ratio. Experimental design was performed by Design Expert with 25 runs and the amounts of antioxidant compounds were evaluated.

Results: The results of chlorophyll a and b evaluation showed that among 4 studied factors only solvent type had significant effect ($P<0.05$). According to the results the optimum conditions of chlorophyll a and b extraction included methanol as solvent, microwave power of 180 watt, extraction time of 20 minutes and solvent to sample ratio of 12.5. Regarding carotenoid solvent was the only significant factor ($P<0.05$) and its optimum extraction conditions included methanol as solvent, microwave power of 90 watt, extraction time of 10 minutes and solvent to sample ratio of 5. Concerning total phenolic content none of the 4 parameters of extraction process had significant effect on its extraction ($P>0.05$).

Conclusion: According to the results of this study *Caulerpa sertularioides* is an important source of antioxidant compounds and by studying the effect of extraction factors on its antioxidant and phenolic compounds and determination of the optimum extraction conditions for each compound, this algae could be employed appropriately.

Keywords: *Antioxidant Compounds, Caulerpa sertularioides, Extraction, Microwave*.

* Corresponding Author: m-honarvar@hotmail.com

علوم غذایی و تغذیه / بهار ۱۴۰۰ / سال هجدهم / شماره ۲