(مقاله پژوهشی)

بررسی اثر فرآیند استخراج به روش‌های پرکولاسیون و مایکروویو بر ترکیبات زیست فعال جلبک قرمز *Gracilariacorticata*

آتوسا شاعری[۱]، مسعود هنرور[۱*]، نرگس مورکی[۲]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحدعلوم وتحقیقات، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه شیلات، دانشکده علوم وفنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۲/۱۲

DOI: 10.30495/jfst.2021.1923459.1702

چکیده

هدف از این تحقیق استخراج ترکیبات فنولی، کاروتنوئیدی و کلروفیل از جلبک قرمز***Gracilariacorticata*** به روش پرکولاسیون و مایکروویو بود. در این پژوهش جهت استخراج با مایکروویو از متغیرهای نوع حلال (آب، اتانول و متانول)، زمان (۱۰، ۲۰ و۳۰ دقیقه)، توان (۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ وات) و نسبت حلال به نمونه(۵:۱ ، ۱۲/۵:۱ ، ۲۰:۱) استفاده گردید. در روش پرکولاسیون نیز از متغیرهای نوع حلال (آب، اتانول و متانول)، زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و نسبت حلال به نمونه (۵:۱ ، ۱۲/۵:۱ ، ۲۰:۱) استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده در طی این پژوهش مشخص شد که در روش پرکولاسیون اثر متقابل حلال وزمان،اثرمتقابل حلال ونسبت، توان دوم نوع حلال روی محتوی کلروفیل **a** استخراج شده تاثیر معنی‌داری داشت (**p**<۰/۰۵). برای استخراج کاروتنوئیدها در روش پرکولاسیون حلال آب و نسبت حلال به نمونه برابر با ۲۰:۱ بیشترین کارایی را داشتند. متغیرهای روش استخراج پرکولاسیون و روش استخراج تسهیل شده با مایکروویو تاثیر معنی‌داری روی محتوی فنل نداشتند. در روش استخراج با مایکروویو متغیر نسبت حلال به نمونه و توان دوم نوع حلال تاثیر معنی‌داری (***p***<۰/۰۵) روی محتوی کلروفیل داشتند. درخصوص استخراج کاروتنوئیدها با استفاده از مایکروویو، نوع حلال و نسبت حلال به نمونه تاثیر معنی‌داری روی راندمان استخراج داشتند (**p**<۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: استخراج، مایکروویو، پرکولاسیون، ترکیبات زیست فعال، جلبک *Gracilariacortica*.

*مسئول مکاتبات: M-honarvar@hotmail.com

۱-مقدمه

جلبک‌از واژه یونانی فایکوز (phykos) به معنی علف دریایی مشتق شده است. این گیاهان فاقد ریشه، ساقه و برگ حقیقی بوده و از جمله آبزیانی هستند که اهمیت فوق العاده‌ای دراکوسیستم آبی به عنوان تولیدکنندگان اولیه دارند. عوامل‌موثر و تعیین‌کننده در تقسیم‌بندی و ایجاد خصوصیات منحصر به فرد در جلبک‌ها رنگدانه گیاهی، نور، عمق، دما، جزر و مّد و طوفان‌های دریایی می‌باشند (۱۶).آن‌ها اساسا براساس رنگ به سه گروه اصلی: قهوه‌ای، سبز و قرمز طبقه‌بندی می‌شوند. به دلیل دارا بودن انواع کلروفیل مانند a، b و همچنین کاروتنوئیدها از عمده فتوسنتزکننده‌های‌آبزی به شمار می‌آیند. این دسته از گیاهان دریایی‌گروه‌بزرگی از اتوتروف‌های ساده محسوب می‌شوند و مربوط به قلمرو یوکاریوتی هستند زیرا دارای یک هسته، یک کلروپلاست محصور شده و یک غشاء سلولی می‌باشند(۱۲). جلبک‌های قرمز موجوداتی هستند که در آب‌های گرم اقیانوس‌ها زندگی می‌کنند. رنگیزه این جلبک برای جذب امواج نوری در اعماق دریا به روشی مناسب سازمان‌دهی شده می‌توانند در اعماق دریا به راحتی رشد و تکثیر نمایند. از بعضی از آن‌ها به عنوان منبع سرشار پروتئین استفاده می‌شود. جلبک‌های قرمز از نظر غذایی، دارویی و صنعتی‌حائز اهمیت می‌باشد. جلبک‌های قرمز اگر در معرض تابش اشعه مستقیم خورشید قرار بگیرند، رنگ قرمز خود را از دست می‌دهند و به رنگ سبز در می‌آیند. رنگ قرمز آن‌ها به واسطه دارا بودن رنگدانه‌های محلول در آب به نام فیکوبیلین‌است(۱۳)یکی از مهمترین جلبک‌های قرمز جلبک *Gracilariacorticata* است که ۱۲-۱۰ سانتی متر طول دارد(۸)دیواره سلولی این گروه از لایه بیرونی پکتین و یک لایه داخلی سلولز تشکیل شده است و محصول فتوسنتزی این گروه نشاسته فلوراید است.دیواره سلولی آن‌ها علاوه بر دارا بودن سلولز،لایه ضخیمی از موسیلاژهای لعابی ترکیب یافته‌ازگالاکتان‌سولفات‌رانیزدارد(۱۳).رنگ *Gracilariacorticata* قرمز متمایل به ارغوانی تا قهوه‌ای می‌باشد و به اشکال مختلف غضزوفی،بوته‌ای و باد بزنی دیده می‌شود.جلبک‌های قرمز حاوی کلروفیلaوb می‌باشند. به دلیل اهمیت اقتصادیآن، به عنوان آگاروفیت بسیار قابل توجه است(۳).جلبک‌های قرمز منبع غنی‌از آگار محسوب می‌شوند(۸).از جلبک‌ها ترکیبات عملگرا و زیست فعال متعددی استخراج می‌شود که از این ترکیبات در صنایع مختلفی از جمله صنایع غذایی و دارویی استفاده‌می‌گردد. ترکیبات لیپیدی، پلی‌ساکاریدی، پروتئینی، اسیدهای‌آمینه‌ضروری،ترکیبات پلی فنولی و آنتی اکسیدانی و همچنین‌ترکیبات کاروتنوئیدی از جمله مهمترین ترکیباتی هستند که از این آبزیان استخراج می‌شوند(۵).فعالیت زیستی اصلی مرتبط با ترکیبات فنلی موجود در جلبک وابسته به فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌آن‌هامی‌باشد. تفاوت محتوی و پروفایل مواد فنولی در جلبک دریایی وابسته به نوع گونه آن‌ها است. برای مثال در جلبک قهوه‌ای دریایی ترکیبات اصلی فنولیفلوروتانین[1]هایی نظیر فلوراتول[2]ها و فلورو تانین‌های سولفاته و هالوژنه هستند(۹).کاروتنوئیدها یک نقش کلیدی در فتوسنتز وابسته به اکسیژن به عنوان رنگدانه‌ها یا به عنوان مولکول های ساختمانی که تثبیت کننده پروتئین در دستگاه فتوسنتز هستند، بازی می‌کنند. کارتنوئیدها پتانسیل زیادی به عنوان رنگدانه غذاها، مکمل های غذایی، مواد مغذی و برای اهداف آرایشی و دارویی دارند. کارتنوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های‌قدرتمند و تاثیرات سودمندشناخته شده‌اند. کارتنوئیدهای اصلی که در جلبک دریایی ایجاد می‌شوند شامل ۸ -کاروتن[3]، لوتئین[4]، ویولا گزانتین[5]، فیو گزانتین[6] و

1-Fluorotanine
2-Floratol
3-8 Carotene
4-Lutein
5-Viola Xanthine
6-Fio Xanthine and

زئاگزانتین[1] در جلبک های سبز (دارای کلروفیل)، آلفا و بتا کاروتن، لوتئین و زئاگزانتین در جلبک های دریایی قرمز (رودوفیت)، بتا کاروتن، ویولاگزانتین و فوکوگزانتین در جلبک‌های‌قهوه‌ای(فتیوفیت‌ها) است(۱۱).روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع مختلف وجود دارند که در این میان روش‌های جدید عصاره‌گیری مانند عصاره‌گیری تسهیل‌شده با امواج فراصوت، عصاره‌گیری تسهیل شده باامواج مایکروویو و عصاره‌گیری تسهیل شده با سیال فوق بحرانی برای استخراج ترکیب‌های از گیاهان و سایرمنابع بسیارسریع و موثر عمل می‌کنند. مایکروویو روشی نوین بوده که کارایی بالایی جهت استخراج ترکیبات فعال گیاهی داشته است. در سال های اخیر مطالعات زیادی با این روش انجام شده است. برای مثال باباخانی و همکاران در سال ۱۳۹۱بهینه‌سازی‌استخراج‌ترکیبات‌آنتی اکسیدانی جلبک قهوه ای *Sargassumangustifolium* خلیج فارس را به کمک‌مایکروویو را مورد ارزیابی قرار دادند. میزان ترکیبات فنولی‌کل، شناسایی ترکیبات فنولی، قدرت کاهندگی آهن، درصد خنثی‌کنندگی ۹۸ رادیکال های آزاد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی‌کل عصاره ها مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نتایج، استخراج با حلال آبی، زمان ۹۱ دقیقه و نسبت جلبک به حلال ۸ به ۰۱ تیمار بهینه برای استخراج عصاره از این جلبک می باشد(۳).گرمسیری و همکاران نیز در سال ۱۳۹۰ به بررسی‌کارآمدی امواج مایکروویو در استخراج‌ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز hamulosaHypnea و بهینه‌سازی شرایط‌استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ پرداختند(۲).هدف از این مطالعه حاضر استخراج کلروفیل، ترکیبات فنولی‌وکاروتنوئیدی به عنوان ترکیبات زیست فعال ازجلبک *Gracilariacorticata*(جلبک قرمز) با استفاده از روش‌تسهیل‌شده‌بامایکروویوومقایسه‌آن‌با روش پرکولاسیون می‌باشد.

۲-مواد و روش‌ها

نمونه جلبک قرمز *Gracilariacorticata* از شرکت توسعه ذخایرزیستی‌جلبک‌های فارس خریداری شد. متانول، اتانول، معرف فولین سیو-کالتیو، سیکلوهگزان و سایر مواد شیمیایی ازشرکت مرک(GermanyMerck Co.,)خریداری شدند.

۲-۱- تهیه عصاره با استفاده از روش پرکولاسیون

برای این منظور ابتدا جلبک *Gracilariacorticata* بلافاصله پس‌از جمع‌آوری در تابستان سال ۱۳۹۶ درآون با دمای ۵۰ درجه‌سلسیوس‌خشک شدند وسپس ۵۰۰گرم از نمونه جلبک خشک شده آسیاب و در داخل ارلن ریخته شدند. در ادامه حلال به نسبت های(۵:۱ ، ۱۲/۵:۱ ، ۲۰:۱) به ۱ گرم پودر جلبک خشک شده (وزنی-حجمی) اضافه شد. هر کدام از نمونه‌ها به طور جداگانه در یک مکان تاریک به مدت زمان های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در دمای اتاق خیسانده شدند (جدول ۱). پس از گذشت زمان مورد نظر مخلوط حاصل از صافی عبور داده شد و عصاره‌های حاصل به منظور بررسی خصوصیات مختلف آن در ظروف تیره در دمای یخچال تا زمان آزمون نگهداری گردیدند(۴).

۲-۲- استخراج عصاره با استفاده از روش تسهیل شده با مایکروویو

طراحی‌آزمایشات برای هر یک از تیمارها با استفاده از نرم افزاز Design-Expert بااستفاده از روش **RSM**[2] صورت گرفت(جدول۲).براین‌اساس برای جلبک قرمزکه به صورت خشک و پودرآماده سازی شده بود،پودر توزین و با توجه به متغیرهای فرآیند استخراج صورت‌گرفت. برای این منظور ازسه‌حلال‌آب (۱)، اتانول(۲) و متانول (۳)، سه توان مختلف مایکروویو(۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ وات)، سه زمان (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) و نسبت حلال به نمونه برابر با ۵ به ۱، ۱۲/۵ به ۱و ۲۰ به ۱ استفاده شد.

1-Zeaxanthin

2- Response Surface Methodology

۲-۳- تعیین محتوی ترکیبات فنولی

به‌منظور تعیین محتوی ترکیبات فنولی کل هر کدام ازعصاره‌های استخراج‌شده از روش فولین سیوکالتیو استفاده گردید. برای این منظور۰/۱ میلی‌لیتر ازهرنمونه‌عصاره‌با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس‌ازمحلول‌سوپرناتانت(محلول‌رویی)۰/۱میل لیتر برداشته و با ۰/۴ میلی لیتر متانول مخلوط شد و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فولین سیوکالتیو ۰/۲ نرمال به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس میزان جذب نمونه به کمک دستگاه‌اسپکتروفتومتردرطول‌موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد(۱).

۲-٤-تعیین محتوی ترکیبات کاروتنوئیدی

۰/۷۵گرم عصاره توسط سیکلوهگزان به حجم ۲/۵میلی‌لیتر رسانده شد وسپس‌به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیددرادامه مقداری از محلول سوپرناتانت (محلول رویی) برداشته و در طول موج ۴۵۲ نانومتر جذب آن سنجیده شد. سپس‌با استفاده از معادله ۱ زیر محتوی ترکیبات کارتنوئیدی کل بر حسب میلی‌گرم در لیتر بیان گردید(۶)

= محتوی کاروتنوئید کل :معادله ۱ = **Carotenoids** ۴/۲ **A** ۴۵۲-۰/۰۲۴۶ **Chlorophyll a**

۲-۵-کلروفیل a

پس‌ازتهیه عصاره‌ها میزان جذب هرکدام از نمونه‌ها به منظور تعیین مقدارکلروفیل **a** در طول موج ۶۶۶ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد(۶).

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی‌آزمایش‌بااستفاده‌ازنرم‌افزارDesign Expert نسخه 7.0.0بااستفاده‌ازروش‌آماری‌سطح‌پاسخ Box-Behnken و طراحی مدل درجه دوم (Quadratic)، خطی(Linear) و معادله2FI (تحلیل دو عاملی) با تعداد مشخص اجرا انجام شد. .در این تحقیق عصاره‌گیری جلبک باروش مایکروویو و پرکولاسیون انجام شد. درانجام روش مایکروویو برای جلبک۲۵ اجرا با لحاظ چهار فاکتور نوع حلال،زمان،قدرت ونسبت حلال به نمونه جلبک در نظر گرفته شد (جدول ۲) و درروش‌پرکولاسیون‌برای‌جلبک۱۵اجرا بالحاظ ۳ فاکتورنوع حلال، زمان ونسبت حلال به نمونه جلبک درنظر گرفته شد (جدول ۱).

جدول۱- تیمارهای مختلف مربوط به روش استخراج به روش پرکولاسیون

تیمار	نوع حلال	زمان (ساعت)	نسبت نمونه به حلال (w/v)
۱	۲	۷۲	۵
۲	۳	۷۲	۱۲/۵
۳	۱	٤۸	۲۰
٤	۲	۲٤	۵
۵	۲	٤۸	۱۲/۵
٦	۲	۲٤	۲۰
۷	۳	٤۸	۲۰
۸	۱	۷۲	۱۲/۵
۹	۲	۷۲	۲۰
۱۰	۳	۲٤	۱۲/۵
۱۱	۱	۲٤	۱۲/۵
۱۲	۳	٤۸	۵
۱۳	۱	٤۸	۵
۱٤	۲	٤۸	۱۲/۵
۱۵	۳	٤۸	۱۲/۵

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

جدول۲-تیمارهای RSM مربوط به استخراج با مایکروویو

تیمار	نوع حلال	زمان (دقیقه)	توان مایکروویو (وات)	نسبت نمونه به حلال (**w/v**)
۱	۱	۲۰	۱۸۰	۵
۲	۳	۲۰	۱۸۰	۲۰
۳	۳	۳۰	۱۸۰	۱۲/۵
٤	۱	۳۰	۱۸۰	۱۲/۵
۵	۱	۲۰	۲۷۰	۱۲/۵
٦	۲	۲۰	۹۰	۵
۷	۲	۲۰	۹۰	۲۰
۸	۲	۳۰	۹۰	۱۲/۵
۹	۲	۲۰	۲۷۰	۵
۱۰	۲	۳۰	۱۸۰	۵
۱۱	۲	۳۰	۱۸۰	۲۰
۱۲	۱	۲۰	۹۰	۱۲/۵
۱۳	۲	۱۰	۱۸۰	۲۰
۱٤	۲	۳۰	۲۷۰	۱۲/۵
۱۵	۱	۱۰	۹۰	۱۲/۵
۱٦	۱	۲۰	۱۸۰	۲۰
۱۷	۲	۱۰	۱۸۰	۵
۱۸	۲	۱۰	۱۸۰	۱۲/۵
۱۹	۲	۲۰	۱۸۰	۱۲/۵
۲۰	۳	۱۰	۱۸۰	۱۲/۵
۲۱	۳	۲۰	۱۸۰	۵
۲۲	۲	۲۰	۲۷۰	۲۰
۲۳	۲	۱۰	۲۷۰	۱۲/۵
۲٤	۳	۲۰	۹۰	۱۲/۵
۲۵	۲	۲۰	۲۷۰	۱۲/۵

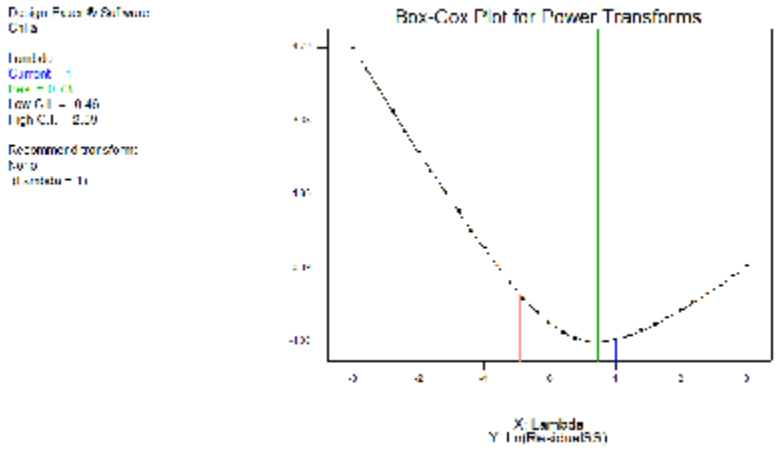
*حلال ۱: آب، حلال ۲: متانول و حلال ۳: اتانول

۳- نتایج و بحث

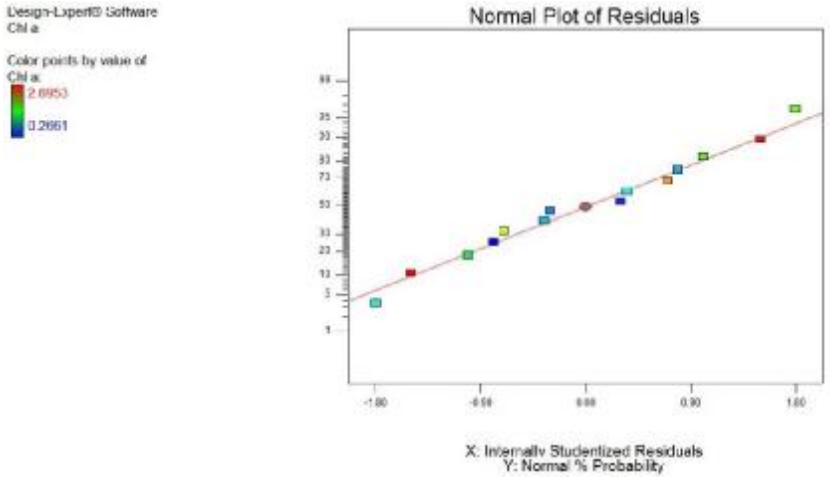
۳-۱-تاثیر متغیرهای فرآیند استخراج روی محتوی ترکیبات زیست‌فعال‌عصاره‌جلبک‌قرمز *Gracilariacorticata* با روش پرکولاسیون

۳-۱-۱-کلروفیل a

نتایج‌حاصل از تاثیر نوع حلال، زمان استخراج و نسبت حلال به‌نمونه برای‌روش‌پرکولاسیون‌روی‌محتوی‌کلروفیل a عصاره جلبک قرمز *Gracilariacorticata* در ادامه‌ارائه شده است. براساس نتایج به دست‌آمده و توزیع نرمال داده‌ها با توجه به نمودارهای ۱-الف و ب مشخص شد که معادله درجه دوم (Quadratic) مدل مناسب برای توصیف رفتار متغیرهای فرآیندروی محتوی کلروفیل aاست (p=۰/۰۰۵). همچنین‌ارزش‌احتمال(p-Value) برای آزمون عدم برازش معادل ۰/۲۲۵ می‌باشد و به ترتیب به همراه مقادیر R-squared و Adjusted R-square، ۰/۹۶۰، ۰/۸۷۱ نشان دهنده تایید مدل درجه دوم می‌باشد. همان‌طور که در جدول تحلیل واریانس برای سطح پاسخ مدل درجه دوم (جدول ۳) نشان داده شد؛ اثر متقابل حلال و زمان، اثر متقابل حلال و نسبت حلال به نمونه، توان دوم نوع حلال روی محتوی کلروفیل a استخراجی تاثیر معنی‌داری دارد(p<۰/۰۵). در فرآیند استخراج ندارند. نیز مشخص می‌شود که به ترتیب زمان ۴۸ ساعت و حلال شماره ۳ با نسبت ۵ میلی‌لیتر بهترین شرایط استخراج را فراهم می‌کنند. براساس مطالعات انجام شده کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و بسیاری ازترکیبات فنولی حلالیت کمی در آب دارند و یا به طورکلی‌درآب‌نامحلول‌می‌باشندبه همین خاطر در حلال‌های آلی قطبی نسبت به آب حلالیت بیشتری دارند و حلال‌های مورداستفاده برای استخراج هنگامیکه مخلوطی آبی از متانول،اتانول واستون باشند،موثرتر است (۱۴)، سامانتا و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مطالعه استخراج ترکیبات کلروفیلی‌از جلبک‌های مختلف با استفاده از حلال‌های استون، متانول، اتانول، دی اتیل اتر و دی متیل سولفوکسید پرداختند. براساس نتایج به دست آمده توسط این محققین مشخص شد که حلال‌های دی اتیل اتر و اتانول بیشترین استخراج کلروفیل را به دنبال داشتند(۱۷).



شکل ۱-الف نمودار **Box-Cox** کلروفیل **a**جلبک ***Gracilariacorticata***



شکل ۱—ب نمودار توزع نرمال داده‌های کلروفیل a جلبک *Gracilariacorticata*

جدول ۳- تحلیل واریانس اثر ۳ فاکتور A , B و C بر استخراج کلروفیل a جلبک *Gracilariacorticata*

منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fفاکتور	P فاکتور Prob > F
مدل	۸/۵۹	۹	۰/۹۵	۱۰/۸۲	۰/۰۱۷*
A	۰/۰۹۱	۱	۰/۰۹۱	۱/۰۳	۰/۳٦۸
B	۰/۰۰۸	۱	۰/۰۰۸	۰/۰۹٤	۰/۷۷٤
C	۰/۱٤	۱	۰/۱٤	۱/۵۵	۰/۲۸۱
AB	۰/٦۷	۱	۰/٦۷	۷/۵۹	۰/۰۵۱
AC	۱/۳۲	۱	۱/۳۲	۱٤/۹۷	۰/۰۱۸۰
BC	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۹۹۵
A^2	٤/۱۳	۱	٤/۱۳	٤٦/۸۹	۰/۰۰۲
B^2	۰/۱۸	۱	۰/۱۸	۲	۰/۲۲۹
C^2	۰/۰۱۳	۱	۰/۰۱۳	۰/۱٤	۰/۷۲۵
باقیمانده	۰/۳۵	٤	۰/۰۸۸		
مجموع	۹/۵۳	۱٤			

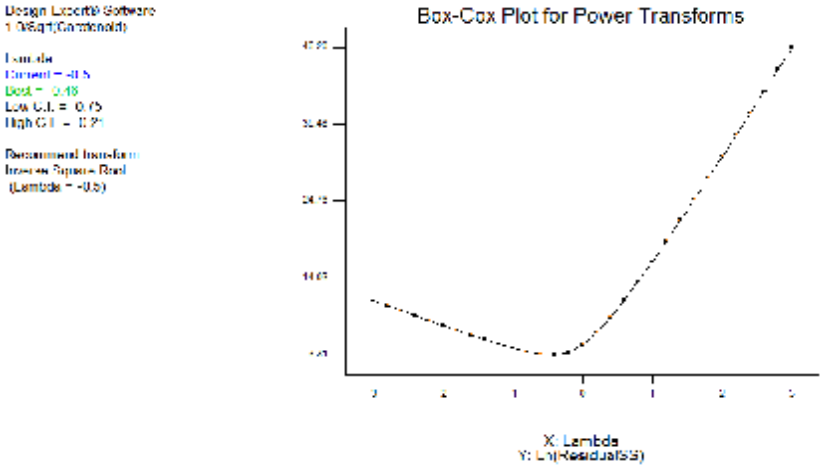
*معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

*A=حلال ، B=زمان ، C=توان

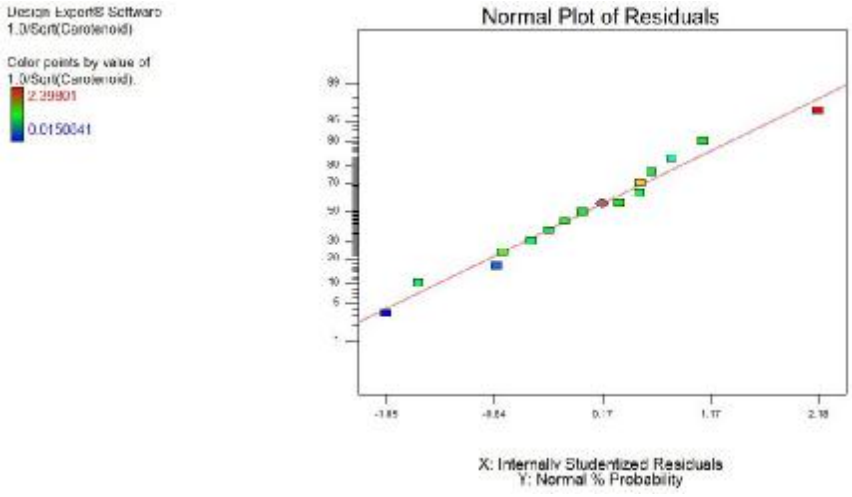
۳-۱-۲-کاروتنوئید

نتایج حاصل از تاثیر نوع حلال، زمان استخراج و نسبت حلال‌به نمونه برای روش پرکولاسیون بر محتوی کاروتنوئید جلبک قرمز *Gracilariacorticata* در ادامه ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده و وضعیت توزیع داده‌ها نمودارهای۲ الف و ب مشخص شد که تبدیل عکس ریشه دوم (Inverse sqrt) لازم است اجرا شود. پس از نرمال نمودن داده‌ها مشخص شد که معادله خطی (Linear) مدل مناسب برای توصیف رفتار متغیرهای فرآیند روی محتوی کاروتنوئید با توجه به p=۰/۱۴۲ و ارزش احتمال آزمون

عدم برازش (Lack of Fit) ۰/۵۵۶ و به ترتیب مقادیر R-squared و Adjusted R-square ۰/۴۰۵ و ۰/۲۲۷ می‌باشد. با توجه به جدول ۴ مشخص است که هیچ کدام از متغیرهای مورد بررسی به طور معنی‌داری بر میزان استخراج کاروتنوئید تاثیر نگذاشته‌اند (p>۰/۰۵). به طورکلی حلال آب و نسبت حلال به نمونه برابر با ۲۰ به ۱ در مقایسه با سایر حلال‌ها و نسبت‌های مصرفی بیشترین کارایی را داشتند. کاروتوئیدهادرکلروپلاست قرار دارند و همراه با کلروفیل‌ها سبب‌ایجادرنگ در میوه‌ها و سبزی‌ها می‌شوند. کاروتنوئیدها و مشتقات آن‌ها متشکل از ۷۰ نوع ترکیب هستند که بیشتر در سبزی‌ها و میوه‌ها یافت می‌شوند. استخراج کاروتنوئیدها با استفاده از حلال‌های مختلف انجام شده است و متانول و اتانول بیشترین سرعت استخراج را دارند (۱۷).Sarkar و همکاران در سال ۲۰۱۲ به استخراج کاروتنوئیدها با استفاده از سیستم‌های حلال مختلف پرداختند.براساس نتایج به دست آمده توسط این محققین مشخص شد که بیشترین قابلیت استخراج کاروتنوئیدها از نمونه‌های جلبک در حضور اتانول و متانول صورت خواهد گرفت(۱۵).



شکل ۲-الف نمودار Box-Cox کاروتنوئیدجلبک *Gracilariacorticata*



شکل ۲-ب نمودار توزیع نمودار داده‌های کاروتنوئیدجلبک ***Gracilariacorticata***

جدول ٤- تحلیل واریانس اثر ۳ فاکتورA , B وC بر استخراج کاروتنوئید از جلبک *Gracilariacorticata*

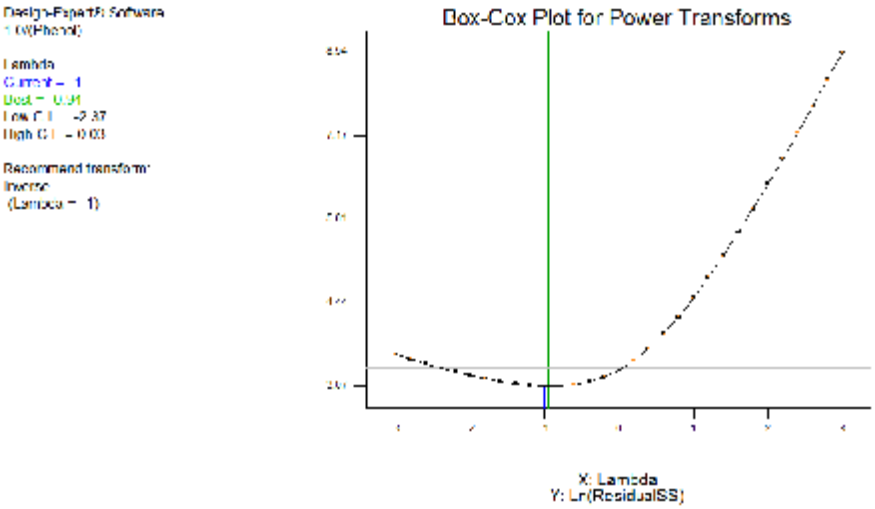
منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fفاکتور	P فاکتور Prob > F
مدل	۱/٤۸	۳	۰/٤۹	۲/۲۷	۰/۱٤۲*
A	۰/۰٤۳	۱	۰/۰٤۳	۰/۲۰	۰/٦٦٦
B	۰/۰۲۰	۱	۰/۰۲۰	۰/۰۹٤	۰/۷٦٥
C	۱/٤۲	۱	۱/٤۲	٦/٥۳	۰/۰۲۸
باقیمانده	۲/۱۷	۱۰	۰/۲۲		
مجموع	٤/٤٦	۱۷			

*معنی‌داری در سطح p<۰/۰٥

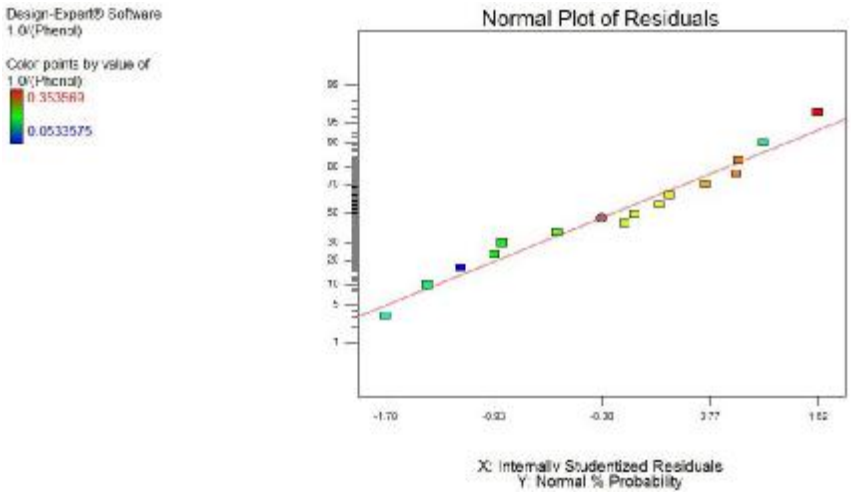
*A=حلال ، B=زمان ، C=توان

۳-۱-۳- فنل

نتایج‌حاصل از تاثیر نوع حلال، زمان استخراج و نسبت حلال به نمونه برای روش پرکولاسیون بر محتوی فنل جلبک قرمز *Gracilariacorticata* در ادامه ارائه شده است. با توجه به‌نتایج‌به‌دست‌آمده‌و وضعیت توزیع داده‌های در نمودارهای ۳ الف‌وب‌مشخص‌شد که تبدیل معکوس **(Inverse)** لازم است اجرا شود، پس از نرمال نمودن داده‌ها مشخص شد که معادله 2FI(تحلیل دو عاملی) با توجه به مقدارp برابر با ۰/۴۴۱ و همچنین ارزش احتمال آزمون عدم برازش برابر ۰/۶۸۹، مناسب‌ترین معادله برای توجیه اثر متغیرهای مورد بررسی میزان استخراج می‌باشد. هرچند که در جدول تحلیل واریانس سطح پاسخ (جدول ۵) هیچ یک از متغیرهای مورد بررسی اثر معنی‌دار را نشان ندادند (**p**>۰/۰٥). ترکیبات فنولی‌گیاهی‌بازدارنده‌رادیکال‌های آزاد و آنتی اکسیدان‌های مؤثری هستند و فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی نظیر جلبک‌ها، میوه‌ها و چای از همین ترکیبات فنولی و مشتقات آن‌ها ناشی می‌شود.از این‌رو بین فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوی فنولی رابطه نزدیکی وجود دارد.انتخاب نوع حلال جهت استخراج ترکیبات زیست فعال باتوجه به هدف مورد نظر،طبیعت ترکیبات،خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماده،قابل دسترس بودن مواد و تجهیزات صورت می‌گیرد .(۱۸)Heffernan و همکاران (۲۰۱۴)، به مطالعه استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از جلبک‌های مختلف ایرلند پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه محققین مشخص نمود که نوع حلال روی استخراج موثر می‌باشد به طوری که عصاره اتانولی و متانولی این جلبک‌ها دارای محتوی ترکیبات فنولی قابل قبولی بودند که بیانگر قابلیت حلالیت این ترکیبات در این نوع حلال‌ها می باشد. همچنین محققین بیان نمودند که از جلبک‌ها می‌توان به عنوان منبع ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی استفاده نمود(۷).



شکل ۳-الف نمودار Box-Cox فنل جلبک *Gracilariacorticata*



شکل ۳-ب نمودار توزیع نرمال داده‌های فنل جلبک *Gracilariacorticata*

جدول ۵- تحلیل واریانس اثر ۳ فاکتورA , B وC بر استخراج فنل از جلبک *Gracilariacorticata*

منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fفاکتور	P فاکتور Prob > F
مدل	۰/۰۱۸	٦	۰/۰۰۲	۰/٦٥	۰/٦۹۰*
A	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۸	۰/۹۲۹
B	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۸	۰/۳۲	۰/۵۸۹
C	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰٤	۰/۹٤۸
AB	۰/۰۱۳	۱	۰/۰۰۰	۲/۸۹	۰/۱۳۲
AC	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۱۳	۰/۳۹	۰/۵۵۳
BC	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۰۱	۰/۳۰	۰/۵۹۸
باقیمانده	۰/۰۳۲	۷	۰/۰۰٤		
مجموع	۰/۰۹۰	۱٤			

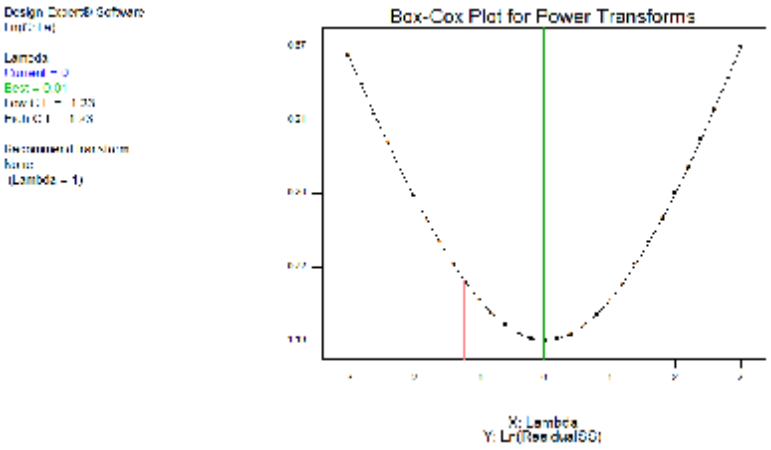
*معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

*A=حلال ، B=زمان ، C=توان

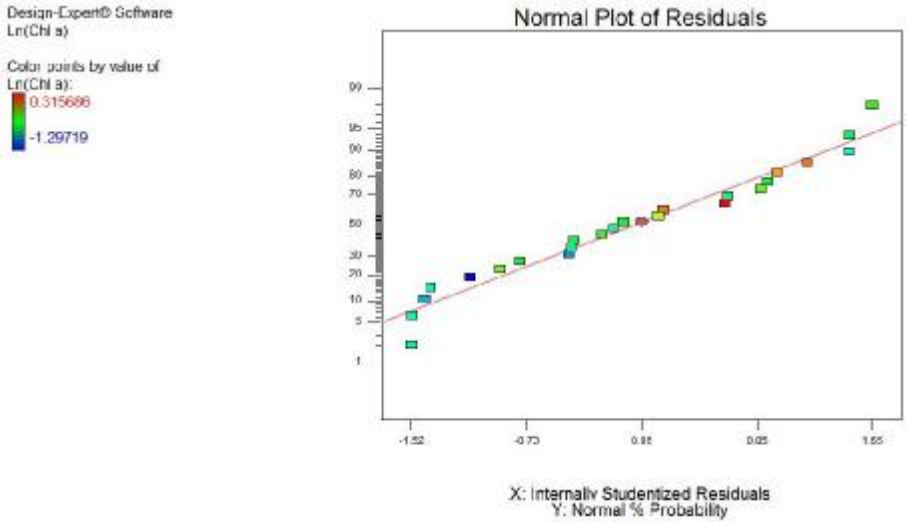
۳-۲-نتایج تاثیر متغیرهای فرآیند استخراج روی محتوی ترکیبات زیست فعال عصاره جلبک قرمز *Gracilariacorticata* با روش مایکروویو

۳-۲-۱-کلروفیل a

نتایج حاصل از تاثیر نوع حلال، زمان استخراج و نسبت حلال به‌نمونه‌و قدرت در روش تسهیل شده استخراج با مایکروویو روی‌محتوی کلروفیل a عصاره جلبک قرمز *Gracilariacorticata* در ادامه ارائه شده است. براساس نتایج به دست آمده و وضعیت نرمال توزیع داده‌ها با توجه نمودارهای ۴ الف و ب مشخص‌شد که معادله درجه دوم (Quadratic) با توجه به مقدار p=۰/۰۱۴۷ وهمچنین‌ارزش‌احتمال‌آزمون عدم برازش R-squared=۰/۷۶۸ وAdjusted R-square به ترتیب ۰/۷۹۱ و ۰/۶۸۷ مدل مناسب برای توصیف رفتار متغیرهای فرآیند بر روی محتوی‌کلروفیل a است. همان‌طور که در جدول‌تحلیل واریانس‌سطح پاسخ (جدول ۶) ملاحظه می‌شود، متغیر نسبت نمونه به حلال (D) و توان دوم نوع حلال(A^2)تاثیرمعنی‌داری (p<۰/۰۵) روی محتوی کلروفیل a عصاره‌ها دارد و سایر متغیرها و حالت‌ها تاثیر معنی‌داری بر استخراج ندارند.



شکل ٤-الف نمودار Box-Cox کلروفیل a جلبک *Gracilariacorticata* به روش مایکروویو



شکل ٤-ب نمودار توزیع نرمال داده‌های کلروفیل a جلبک *Gracilariacorticata* به روش مایکروویو

جدول ٦- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور A , B، C و D بر استخراج کلروفیل a جلبک *Gracilariacorticata*

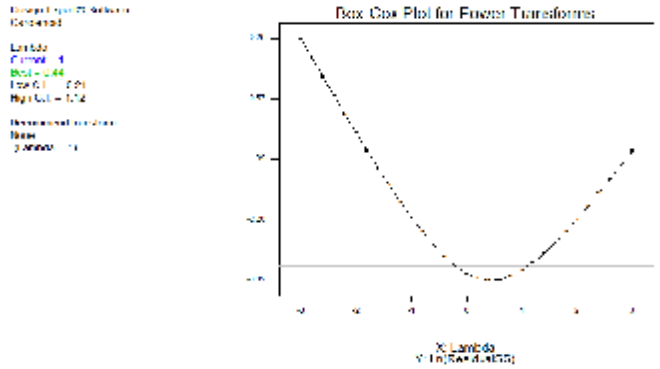
منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	**F**فاکتور	**P** فاکتور **Prob > F**
مدل	۱/۵	١٤	۰/۱۱	۲/۷۲	۰/۰۵۸
A	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۳۳	۰/۸۵۹
B	۰/۰۷۷	۱	۰/۰۷۷	۱/۹٤	۰/۱۹۳
C	۰/۰۰۳	۱	۰/۰۰۳	۰/۰۸۵	۰/۷۷٦
D-A/S	۰/۵٤	۱	۰/۵٤	۱۳/۷۸	۰/۰۰٤
AB	۰/۰۱۱	۱	۰/۰۱۱	۰/۲۷	۰/٦۱۳
AC	۰/۰۰۷	۱	۰/۰۰۷	۰/۱۹	۰/٦۷۳
AD	۰/۰۰۳	۱	۰/۰۰۳	۰/۰۹۵	۰/۷٦٤
BC	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰٦	۰/۹۳۵
BD	۰/۰۱٤	۱	۰/۰۱٤	۰/۳٦	۰/۵٦٤
CD	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۲۲	۰/۸۸٤
A^2	۰/۵۲	۱	۰/۵۲	۱۳/۱۲	۰/۰۰٤
B^2	۰/۰۲۳	۱	۰/۰۲۳	۰/۵۸	۰/٤٦۳
C^2	۰/۰٤۵	۱	۰/۰٤۵	۱/۱۵	۰/۳۰۹
D^2	۰/۰۰۵	۱	۰/۰۰۵	۰/۱٤	۰/۷۱۳
باقیمانده	۰/۳۹	۱۰	۰/۳۹		
مجموع	۱/۹	۲٤			

*معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

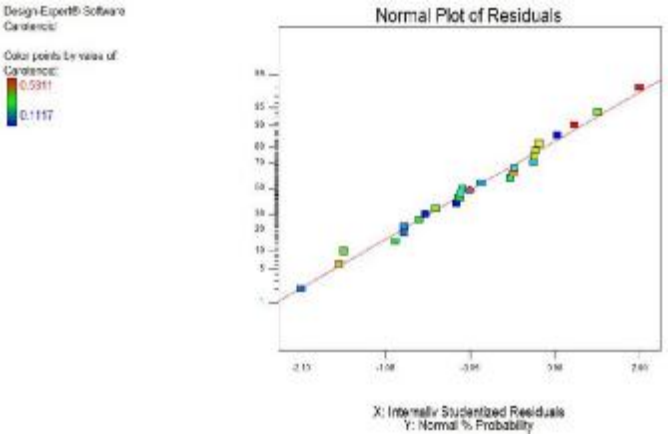
*A=حلال ، B=زمان ، C=توان

۳-۲-۲- کاروتنوئید

نتایج‌حاصل‌از تاثیر۴ متغیر نوع حلال، نسبت حلال مصرفی، زمان و قدرت در روش مایکروویوبر استخراج محتوی کاروتنوئیدازجلبک‌قرمز *Gracilariacorticata* بررسی گردید و مشخص‌شد که با توجه نتایج به دست آمده و وضعیت توزیع داده‌ها با توجه به نمودارهای ۵ الف و ب مشخص‌گردید که معادله خطی (Linear) با توجه به مقدار p<۰/۰۰۰۱ و همچنین ارزش احتمال آزمون عدم برازش p=۰/۸۰۱ وبه ترتیب مقادیر R-squared و Adjusted **R-**square ۰/۸۶۵ و ۰/۸۳۸ مدل مناسب برای توصیف رفتار متغیرهای فرآیند بر روی محتوی کاروتنوئید می‌باشد. همان‌طور که در جدول تحلیل واریانس سطح پاسخ (جدول ۷) ملاحظه می‌شود دو متغیر نوع حلال و نسبت حلال دارای تاثیر معنی‌داری بر راندمان استخراج هستند (p<۰/۰۵) و سایرفاکتورهااثرمعنی‌داری‌بر استخراج ندارند. Esquivel-Hernández و همکاران (۲۰۱۶) از روش استخراج تسهیل شده با مایکروویو برای استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی از جلبک *Arthrospiraplatensis* استفاده نمودند. براساس نتایج به دست آمده توسط این محققین مشخص شد که با استفاده از روش تسهیل شده با فراصوت تحت شرایط ۴۰۰ وات و دمای ۴۰ درجه سلسیوس توسط متانول بالاترین میزان ترکیبات کاروتنوئیدی استخراج می‌گردد(۱۰).



شکل ۵–الف نمودار **Box-Cox** کاروتنوئید جلبک ***Gracilariacorticata*** به روش مایکروویو



شکل ۵–ب نمودار توزیع نرمال داده‌های کاروتنوئید جلبک ***Gracilariacorticata*** به روش مایکروویو

جدول ۷– تحلیل واریانس اثر ۳ فاکتور **B,A**، **C** و **D** بر استخراج کاروتنوئید جلبک ***Gracilariacorticata***

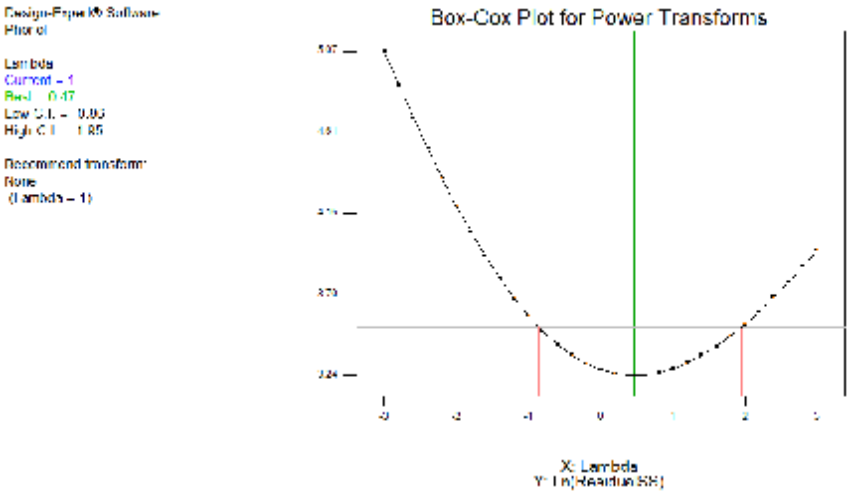
منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fفاکتور	P فاکتور Prob > F
مدل	۰/۳٦	٤	۰/۰۹۰	۳۲/۰۷	<۰/۰۰۰۱
A	۰/۲۳	۱	۰/۲۳	۸۲/۵۹	<۰/۰۰۰۱
B	۰/۰۱۷	۱	۰/۰۱۷	٦/۰۱	۰/۰۲۳
C	۰/۰۰۲	۱	۰/۰۰۲	۰/۷٤	۰/٤۰۱
D-A/S	۰/۱۱	۱	۰/۱۱	۳۸/۹۵	<۰/۰۰۰۱
باقیمانده	۰/۰٥٦	۲۰	۰/۰۰۲		
مجموع	۰/٤۱	۲٤			

*معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

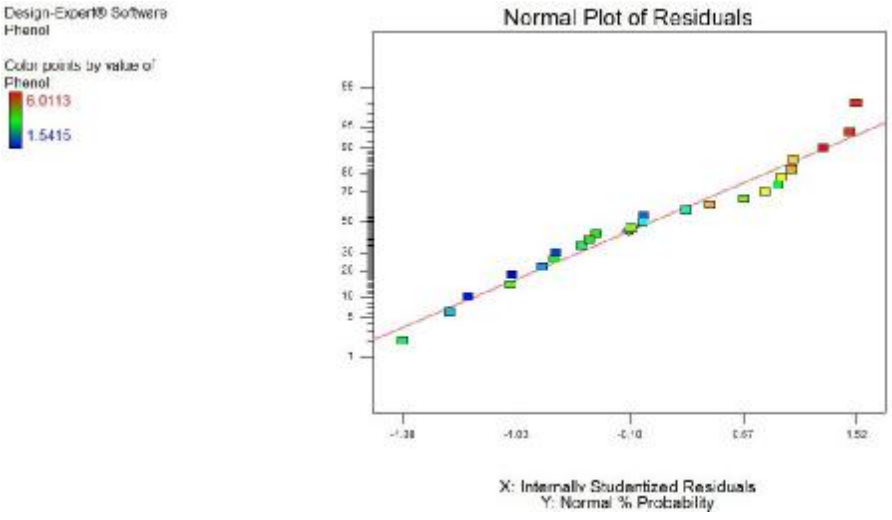
*A=حلال ، B=زمان ، C=توان

۳-۲-۳ -ترکیبات فنلی

نتایج حاصل از بررسی اثر ۴ متغیر نوع حلال، نسبت حلال مصرفی، زمان و قدرت برای استخراج ترکیبات‌های فنلی در روش‌تسهیل‌شده‌بامایکروویوازجلبک‌قرمز *Gracilariacorticata* در ادامه ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده و وضعیت توزیع نرمال داده‌ها با توجه به نمودارهای ۶-الف و ب مشخص شد که معادله 2FI(تحلیل دو عاملی) با توجه به مقدار۰/۳۴۳=pوبه‌ترتیب‌مقادیرR-squared و Adjusted R-square ۰/۴۱۷ و ۰/۰۱۷ در مقایسه با سایر معادلات و رفتارمتغیرها را توصیف می‌کند. در جدول ۸ نتایج تحلیل واریانس سطح پاسخ نمایش داده شده و مشخص می‌شود که هیچ یک از متغیرها در استخراج فنل با روش مایکروویو در بازه‌های تعیین شده اثر معنی‌داری ندارند (P بزرگتر از ۰/۰۵).



شکل ٦-الف نمودار **Box-Cox** ترکیبات فنلی جلبک ***Gracilariacorticata*** به روش مایکروویو



شکل ٦-ب نمودار توزیع نرمال داده‌های ترکیبات فنلی جلبک ***Gracilariacorticata*** به روش مایکروویو

جدول ۸- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور **A , B ،C** و **D** بر استخراج ترکیبات فنلی جلبک ***Gracilariacorticata***

منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fفاکتور	P فاکتور Prob > F
مدل	۱۸/۹۹	۱۰	۱/۹	۱	۰/٤۸٤
A	۰/۲۹	۱	۰/۲۹	۰/۱۵	۰/۷۰۱
B	۰/۱۲	۱	۰/۱۲	۰/۰٦۵	۰/۸۰۲
C	۱/۸۳	۱	۱/۸۳	۰/۹۷	۰/۳٤۲
D-A/S	۲/٦٦	۱	۲/٦٦	۱/٤۱	۰/۲۵۵
AB	۵/۷۷	۱	۵/۷۷	۳/۰۵	۰/۱۰۲
AC	۰/۸٦	۱	۰/۸٦	۰/٤٦	۰/۵۱۰
AD	۰/۸۲	۱	۰/۸۲	۰/٤٤	۰/۵۲
BC	٦/۱۸	۱	٦/۱۸	۳/۲۷	۰/۰۹۲
BD	۰/۰۹۳	۱	۰/۰۹۳	۰/۰٤۹	۰/۸۲۷
CD	۰/۳٦	۱	۰/۳٦	۰/۱۹	۰/٦٦۸
باقیمانده	۲٦/٤۸	۱٤	۱/۸۹		
مجموع	٤۵/٤۷	۲٤			

*معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

*A=حلال ، B=زمان ، C=توان

٤- نتیجه‌گیری

به عنوان نتیجه‌گیری‌کلی لازم است عنوان شود که در استخراج به روش پرکولاسیون برای کلروفیل **a**، کاروتنوئید و ترکیبات فنلی از جلبک قرمز *Gracilariacorticata* حلال اتانول به عنوان حلالی با قطبیت متوسط و زمان ۴۸ ساعت برای استحصال کلروفیل **a** و فنل به ترتیب با نسبت‌های حلال به نمونه ۵ و ۱۲/۵ مناسب بود؛ اما استخراج کاروتنوئید به روش پرکولاسیون و بازه‌های تعریف شده برای قطبیت حلال‌ها، زمان و نسبت مصرف حلال به نمونه جلبکی بوده است.درخصوص روش تسهیل شده مایکروویو برای استخراج سه‌گروه ترکیب کلروفیل a، کاروتنوئید و ترکیبات فنلی، باید عنوان شود که استخراج کلروفیل a و ترکیبات فنلی با حلال نوع متانول (با قطبیت متوسط) به ترتیب در مدت زمان ۳۰ و۲۰ دقیقه با قدرت ۱۸۰ و به ترتیب با نسبت‌های ۵ و ۱۲/۵ مناسب گزارش شد؛ اما استخراج کاروتنوئید با حلال قطبی آب در مدت زمان ۳۰ دقیقه و قدرت ۱۸۰ شرایط بهینه گزارش گردید. در نهایت باتوجه به بومی بودن جلبک *Gracilariacorticata* و حضور مقادیر قابل توجه از ترکیبات زیست فعال در آن، توصیه می‌شودمطالعات‌بیشتری‌درخصوص‌استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی آن به منظور استفاده در تولید ترکیبات دارویی و فراسودمند صورت گیرد.

۵-منابع

۱. فراست، م.، خاوری‌نژاد، ر.، نبوی، م. و نامجویان، ف. ۱۳۹۲. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی جلبک سبز دریایی(f.farlowii Caulerpa sertularioides). *مجله زیست‌شناسی دریا (بیولوژی دریا)*، جلد ۵، شماره۲۰،۵٦- ٤۲.

۲. گرمسیری، ا.، رضائی ،م.، سفری، پ. و باباخانی، آ. ۱۳۹٦.تعیین ویژگی‌های ضداکسیدانی عصاره جلبک های قرمزگونه Hypnea hamulosa و Gracilaria corticata

خلیج‌فارس. نشریه علوم و فنون شیلات،جلد ٦، شماره۳، ۱۳۱-۱٤٥.

۳. لشکان بایاخانی، آ.، رضائی، م.، رضایی، ک.، سیف آبادی، ج. ۱۳۹۱. بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوهایSargassum angustifolium خلیج فارس به روش استخراج به کمک مایکروویو. مجله شیلات، جلد٦٥، شماره۳، ۲٥٥-۲٤۳.

٤. مرادی، پ. وامینی، ک. ۱۳۹٦. استخراج و شناسایی عصاره‌اندام‌های‌مختلف‌گیاه‌گزنه‌دوپایهUrtica dioica L و بررسی‌اثرات‌ضد باکتریایی وضد قارچی آن. مجله *دانشگاه علوم پزشکی مازندران*، شماره٧٤، ۱٥۱-۸٥.

5. Andersen R A. 2005. Algal culturing techniques: *Elsevier*.

6. Ha, NTT., Koike, K. and Nhuan, MT. 2014. Improved accuracy of chlorophyll-a concentration estimates from MODIS imagery using a two-band ratio algorithm and geostatistics: As applied to the monitoring of eutrophication processesover Tien Yen Bay (Northern Vietnam).*Remote Sensing*, 6(1):421-42.

7. Heffernan, N., Smyth, TJ., FitzGerald, RJ., Soler-Vila, A. and Brunton, N. 2014. Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid–liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(7):1765-72.

8. Holdt, SL. and Kraan, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*,23(3):543-97.

9. Kumar, CS., Ganesan, P., Suresh, P. and Bhaskar, N. 2008.Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds–a review. *Journal of Food Science and Technology*, 45(1):1.

10. Mabeau, S. and Fleurence, J. 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*,4(4):103-7.

11. Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K. and Miyashita, K. 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, Undaria pinnatifida, shows antiobesity effect through UCP[1]expression in white adipose tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(2):392-7.

12. Milledge, JJ., Smith, B., Dyer, PW. and Harvey, P. 2014. Macroalgae-derived biofuel: a review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies*, 7(11):7194-222.

13. Murphy, V., Hughes, H. and McLoughlin P. 2008. Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass. *Chemosphere*, 70(6):1128-34.

14. Rebey, IB., Bourgou, S., Debez, IBS., Karoui, IJ., Sellami, IH., Msaada, K. and et al. 2012. Effects of extraction solvents and provenances on phenolic contents and antioxidant activities of cumin (Cuminum cyminum L.) seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7):2728-36.

15. Sarkar, CR., Das, L., Bhagawati, B. and Goswami, BC. 2012. A comparative study of carotenoid extraction from algae in different solvent systems. *Asian J Plant Sci Res*, 2:546-59.

16. Smit, AJ. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of applied phycology*,16(4):245-62.

17. Sumanta, N., Haque, CI., Nishika, J. and Suprakash, R. 2014. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents . *Res J Chem Sci*, 2231: 60-6.

18. Wang , T., Jonsdottir, R. and Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food chemistry*,116(1):240-8.

(Original Research Paper)

Effect of Percolation and Microwave-assisted Extractions on Bioactive Compounds of Red Alga *Gracilariacorticata*

Atoosa Shaeri[1], Masoud Honarvar[1*], Nargess Mooraki[2]

1-Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-Department of Fisheries Science, College of Marine Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received:14/02/2021 Accepted:02/05/2021

Abstract

This study aimed to apply percolation and microwave-assisted extraction methods to extract phenolic, carotenoid and chlorophyll compounds from *Gracilariacorticata* red algae. During this study, in the MAE method the solvent type (water, ethanol, and methanol), time (10, 20 and 30 min), power (90, 180 and 270 W) and solvent-to-sample ratio (5, 12.5 and 20) were used as variables. Also, in the percolation method, the variables were solvent type (water, ethanol, and methanol), time (24, 48 and 72 h) and solvent-to-sample ratio (5, 12.5 and 20). Based on the results obtained during this study, it was found that the percolation method the solvent and time interaction, solvent and solvent to sample ratio interaction had a significant effect on the chlorophyll a content (p<0.05). To the extract carotenoids in the percolation method, the most effective parameters were type 1 solvent (water) and solvent to sample ratio of 20. The variables of percolation and MAE methods had no significant effect on phenol content (p>0.05). In the MAE extraction method, the solvent-to-sample ratio and the square solvent type had a significant effect (p<0.05) on the chlorophyll content. For extraction of carotenoids using the MAE method, solvent type, and solvent to sample ratio had a significant effect on extraction efficiency (p<0.05).

Keywords: Extraction, Microwave, Percolation, Bioactive Compounds, *Gracilariacorticata* Algae

[*]Corresponding Author: M-honarvar@hotmail.com