تحقیقات مهندسی صنایع غذایی/جلد ۲۱/ شماره ۷۲/بهار و تابستان ۱۴۰۱/ص ۷۴-۵۷
سایت مجله: https://fooder.areeo.ac.ir

نوع مقاله: علمی-پژوهشی

بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنلی از جلبک *Laurencia papillosa* با روش مایکروویو

یاسمین فیاض[۱] ، مسعود هنرور[۲*] و نرگس مورکی [۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
[۲*] دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
[۳] دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۶/۰۹ ؛ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۶/۲۵

چکیده

گیاهان آبزی یکی از منابع مهم ترکیبات زیست فعال با خاصیت آنتی اکسیدانی محسوب می‌شوند. در تحقیق حاضر به بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی شامل کلروفیل a و b، کاروتنوئید و ترکیبات فنلی از جلبک *Laurencia papillosa* با روش مایکروویو پرداخته شده است که براساس متغیرهای مستقل شامل زمان استخراج، توان مایکروویو، نوع حلال و نسبت حلال به نمونه است. برای طراحی آزمایش در این مطالعه از نرم افزار Design Expert با ۲۵ اجرا استفاده و مقدار ترکیبات آنتی اکسیدانی جلبک اندازه گیری شد. نتایج حاصل از سنجش کلروفیل a و b حاکی از آن است که هیچ یک از چهار متغیر مستقل گفته‌شده اثر معنی‌داری($P>0.05$) بر استخراج کلروفیل نداشته است. در مورد کاروتنوئید، فاکتورهای زمان، اثر متقابل زمان×حلال و اثر متقابل زمان×توان دارای اثر معنی‌دار ($P>0.05$)بوده‌اند و طبق نتایج به‌دست آمده شرایط بهینه استخراج کاروتنوئید شامل حلال متانول با نسبت ۱۰/۵ به ۱، توان ۱۵۶ وات و زمان ۲۴/۵ دقیقه بوده است. در زمینه ترکیبات فنلی، فاکتورهای حلال، زمان، اثر متقابل حلال×زمان و اثر متقابل حلال×توان دارای اثر معنی‌دار ($P>0.05$) بوده‌اند و حلال متانول با نسبت ۱۲/۵ به ۱، توان ۱۸۰ وات و زمان ۱۰ دقیقه شرایط بهینه استخراج فنل را تشکیل داده‌اند. برابر داده‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق، جلبک *Laurencia papillosa* خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارد و با کنترل پارامترهای اثرگذار در فرآیند استخراج با مایکروویو می‌توان به حداکثر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی دست یافت.

واژه‌های کلیدی

حلال، زیست فعال، کاروتنوئید، کلروفیل، گیاه آبزی

مقدمه

گیاهان همواره یکی از مواد اولیه اصلی برای استفاده در پزشکی، درمان بیماری‌ها، تغذیه انسان و سایر جانداران محسوب می‌شده‌اند. از ویژگی‌های مهم گیاهان خاصیت آنتی اکسیدانی آنهاست به طوری که می‌توان آنها را مهم‌ترین منبع آنتی‌اکسیدانی در طبیعت در نظر گرفت. امروزه باتوجه به عوارض نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامتی انسان مانند جهش‌زایی، ایجاد مسمومیت و سرطان‌زایی، توجه زیادی به سمت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جلب شده است (Hwang *et al.*, 2001). اخیراً به دلیل سعی در حفظ منابع گیاهی خشکی‌زی که رو به کاهش رفته‌اند و اهمیت مسائل زیست محیطی، توجه به سمت گیاهان آبزی

* نگارنده مسئول: Email: m-honarvar@hotmail.com
http://doi: 10.22092/FOODER.2022.351679.1283
© 2022,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

جلب شده است. از آنجایی که بیش از ۷۰ درصد سطح کره زمین با آب احاطه شده است و محیط‌های آبی تنوع زیستی گسترده‌ای دارند، گیاهان آبزی از اهمیت بالایی برخوردار هستند(Hashem Dabbaqian *et al.*, 2016). ماکروجلبک های دریایی در سال‌های اخیر منبع گسترده‌ای از متابولیت های متنوع با ساختار و خواص تغذیه‌ای و درمانی گوناگون شناخته شده‌اند و مطالعه روی آنها شاخه‌ای پراهمیت در رشته علوم و تکنولوژی مواد غذایی محسوب می‌شود (Dominguez., 2013). جلبک‌ها در محیط‌های سخت از نظر شرایط محیطی رشد می‌کنند اما دچار آسیب فیزیکی نمی‌شوند زیرا دارای ترکیبات و مکانیزم های محافظتی گوناگونی هستند که همین امر آنها را قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه با خواص ارزشمند ساخته است (Gupta *et al.*, 2012). از متابولیت‌های مهم موجود در جلبک‌ها، ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها هستند. ترکیبات فنلی به‌دلیل دارا بودن قدرت ضداکسایشی و ضدتوموری اهمیت دارند (Souza *et al.*, 2011). کاروتنوئیدها نیز با انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد، سبب افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی جلبک‌ها می‌شوند (Airanthi *et al.*, 2011). به منظور استخراج ترکیبات مفید جلبک‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد. در سال‌های اخیر تمایل به روش‌های جدید استخراج افزایش یافته‌است زیرا این روش‌ها عملیات را با حداقل مقدار حلال و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به‌انجام می‌رسانند. استخراج با مایکروویو روشی جدید محسوب می‌شود که در مقایسه با روش‌های متداول، مانند سوکسله، دارای مزیت‌هایی از جمله نیاز به حلال کمتر و زمان کوتاه‌تر، هزینه پایین و سرعت[1] استخراج بیشتر است. روش‌های متداول وقت‌گیرند و به مقدار زیادی حلال نیاز دارند . استخراج با مایکروویو در مقایسه با روش‌های مرسوم قدیمی سبب صرفه جویی در انرژی می‌شود و درخصوص استخراج ترکیبات حساس به حرارت عملکرد بهتری از خود نشان می‌دهد(Nuchter *et al.*, 2004). روش مایکروویو روشی مناسب برای استخراج ترکیبات زیست فعال ارزشمند از انواع گیاهان محسوب می‌شود.

امروزه با توجه به پراکنش وسیع گونه‌های متنوع جلبکی در خلیج فارس، توجه بسیاری از محققان به سمت ترکیبات موجود در این منابع آبزی و بهینه سازی استخراج آن‌ها معطوف شده است. امیر شریفی (Amir Sharifi., 2015). در تحقیقی اثرهای ضدباکتری و ضدقارچ در عصاره‌های متانولی، اتیل استات، هگزان و کلروفرمی جلبک قهوه‌ای *Sargassum glaucescens* بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و قارچ‌ها را بررسی کرد و نشان داد ابتدا عصاره متانولی جلبک و بعد از آن عصاره هگزانی بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را دارند ولی عصاره‌های اتیل استاتی و کلروفرمی فاقد اثر ضدمیکروبی‌اند. لازم است گفته شود که متاسفانه جلبک‌های آبزی خصوصاً گونه‌های بومی موجود در منطقه خلیج فارس تاکنون به اندازه کافی مورد توجه و بهره برداری قرار نگرفته‌اند. *Laurencia papillosa* نوعی جلبک قرمز با فراوانی گسترده است که بیش از ۴۰ واریته مختلف دارد (Kim *et al.*, 2013) و در اقیانوس‌ها و دریاهای مناطق مختلف از جمله جنوب ایران یافت می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد این جلبک حاوی ترکیبات مختلفی از جمله ترکیبات فنلی، فلاوونوئید، کاروتنوئید، تانن، لیپید،

1- Rate

پروتئین و کربوهیدرات است(Omar *et al.*, 2018). بررسی‌های مختلف حاکی از خاصیت ضدسرطانی این جلبک است(Tannoury *et al.*, 2017). با توجه به خواص این گونه جلبک و پراکنش گسترده آن در آب‌های خلیج فارس می‌توان تحقیقات وسیعی در زمینه استخراج ترکیب زیست فعال و مغذی از آن به مرحله اجرا در آورد. با توجه به ارزش بیولوژیکی و تغذیه‌ای این گونه جلبکی و مزایای مطرح شده درخصوص روش استخراج با مایکروویو، در این تحقیق برای اولین بار در ایران به بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنلی از جلبک *Laurencia papillosa* جمع آوری شده از سواحل خلیج فارس با روش مایکروویو پرداخته شده‌است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه

نمونه جلبک *Laurencia papillosa* در تیر ماه سال۱۳۹۶ از سواحل خلیج فارس در منطقه ساحلی 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. نمونه‌ها پس از جمع آوری از دریا و شناسایی مولکولی آن و دو مرحله شست و شو با آب شیرین، به مدت 24 تا ۴۸ ساعت در دمای اتاق(۲۵ درجه سلسیوس) و در تاریکی قرار گرفتند و خشک شدند. نمونه‌های خشک‌شده با آسیاب الکتریکی(برند IKA مدل M20 Universal ساخت کشور آلمان) کاملاً ریز و خرد 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. در این تحقیق از حلال‌های متانول، اتانول و آب استفاده شد. شرایط هر آزمون شامل زمان استخراج، نوع حلال، توان مایکروویو و نسبت حلال به نمونه با توجه به طراحی آزمایش صورت گرفته مطابق با جدول ۱ در نظر گرفته شد. از مایکروویو آزمایشگاهی(برند Mileston ساخت کشور ایتالیا) برای استخراج استفاده شد. پس از فرآیند استخراج با مایکروویو، عصاره‌ها از دستگاه مایکروویو خارج و از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شدند. عصاره‌های به‌دست آمده در بطری‌های شیشه‌ای تیره در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمون نگهداری شدند.

اندازه گیری کلروفیل a و b

پس از تهیه عصاره‌ها، میزان کلروفیل b برابر روش Lichtentaler و Wellburn محاسبه شد. در این روش ، جذب عصاره‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV-3600 Plus برند شیمادزو در دو طول موج 653 و 666 نانومتر قرائت شد و مقدار کلروفیل b برابر با رابطه ۱ به‌دست آمد(Wellburn *et al.*, 1985).

$$\text{Chlorophyll b}=27.05\ A653-11.21\ A666 \qquad (۱)$$

که در آن؛ A653 = میزان جذب نور توسط نمونه در ۶۵۳ نانومتر؛ A666= میزان جذب نور توسط نمونه در ۶۶۶ نانومتر است.

برای محاسبه مقدار کلروفیل a از روش عمر و همکاران (Omar *et al.*, 2018) مطابق رابطه ۲ استفاده شد.

$$\text{Chlorophyll a}=10.3\ A665-0.918\ A650 \qquad (۲)$$

که در آن؛ A665= میزان جذب نور توسط نمونه در ۶۶۵ نانومتر؛ A650= میزان جذب نور توسط نمونه در ۶۵۰ نانومتر است.

جدول ۱- طراحی آزمایش‌ها با استفاده از نرم افزار Design Expert و روش طراحی Box-Behnken برمبنای ٤ فاکتور قدرت مایکروویو، زمان، نوع حلال و نسبت حلال به نمونه برای جلبک *Laurencia papillosa*

time, Table 1- Experimental Design by Design Expert and Box-Behnken response surface based on power of microwave , type of solvent and the ratio of solvent to sample for *Laurencia papillosa*

آزمون Test	حلال Solvent	زمان (دقیقه)Time(min)	قدرت مایکروویو (وات) Microwave power(watt)	نسبت حلال به نمونه(w/v) Ratio of solvent to sample
1	3	20	270	12.5
2	2	20	270	20
3	3	30	180	12.5
4	2	10	270	12.5
5	2	20	270	5
6	2	10	180	20
7	3	20	90	12.5
8	1	20	180	20
9	2	30	90	12.5
10	2	10	90	12.5
11	2	10	180	5
12	1	10	180	12.5
13	2	30	180	20
14	1	20	180	5
15	2	30	180	5
16	3	20	180	20
17	2	20	180	12.5
18	1	20	270	12.5
19	2	20	90	20
20	2	20	90	5
21	1	20	90	12.5
22	3	10	180	12.5
23	2	30	270	12.5
24	3	20	180	5
25	1	30	180	12.5

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

*solvent 1: Water, solvent 2: Methanol, solvent 3: Ethanol

اندازه گیری میزان کاروتنوئید

مقدار کاروتنوئید نیز مطابق روش عمر و همکاران (Omar *et al.*, 2018) و طبق رابطه ۳ محاسبه شد.

$$\text{Carotenoids} = 4.2\ A452 - 0.0246\ \text{Chlorophyll a} \quad (۳)$$

که در آن؛ A452 = میزان جذب نور توسط نمونه در ۴۵۲ نانومتر است.

اندازه گیری فنل کل

به منظور سنجش فنل کل، ابتدا ۰/۲ میلی¬لیتر از عصاره‌های جلبکی با ۴ میلی‌لیتر Na_2CO_3 دو درصد مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۶ درجه سلسیوس) قرار داده شد. بعد از آن ۰/۲ میلی¬لیتر معرف فولین-سیوکالتیو ۵۰ درصد به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب آن در ۷۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از اسیدگالیک در غلظت‌های صفر، ۰/۰۰۲، ۰/۰۱ و ۰/۰۵میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. معادله استاندارد اسید گالیک مطابق رابطه ۴ است که در آن مقدار Y عبارت است از عدد جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و مقدار X غلظت گالیک اسید بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر را نشان می‌دهد. مقدار فنل کل هر نمونه برحسب میلی گرم گالیک اسید برحجم عصاره بیان شد (Taga *et al.*, 1984).

$$Y=0.0053X-0.003 \quad (۴)$$

طراحی و آنالیز آماری

آزمایش با استفاده از نرم افزار Design Expert و روش آماری سطح پاسخ Box-Behnken، با ۲۵ اجرا طراحی شد. برای تحلیل نتایج از مدل درجه دوم (Quadratic) استفاده شد.

در این تحقیق عصاره‌گیری از جلبک به روش مایکروویو صورت گرفت. در روش مایکروویو برای هر جلبک ۲۵ اجرا با لحاظ‌کردن چهار فاکتور نوع حلال، زمان، توان و نسبت حلال به نمونه جلبک در نظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول۲- فاکتورهای هدف در استخراج عصاره به روش مایکروویو از جلبک *Laurencia papillosa*

Table 2- Target factors in microwave extraction from *Laurencia papillosa*

فاکتور (Factor)	کد (Code)	حد بالا (Upper limit)	حد پایین (Lower limit)
حلال (Solvent)	A	*	*
زمان (Time)	B	10 min	30 min
قدرت (Power)	C	90 W	270 W
نسبت (Ratio)	D	5	20

*حلال 1: آب(قطبیت قوی)، حلال ۲: متانول(قطبیت متوسط)، حلال 3: اتانول(قطبیت ضعیف)

*solvent 1: Water(strong polarity), solvent 2: Methanol(medium polarity), solvent 3: Ethanol(weak polarity)

نتایج و بحث

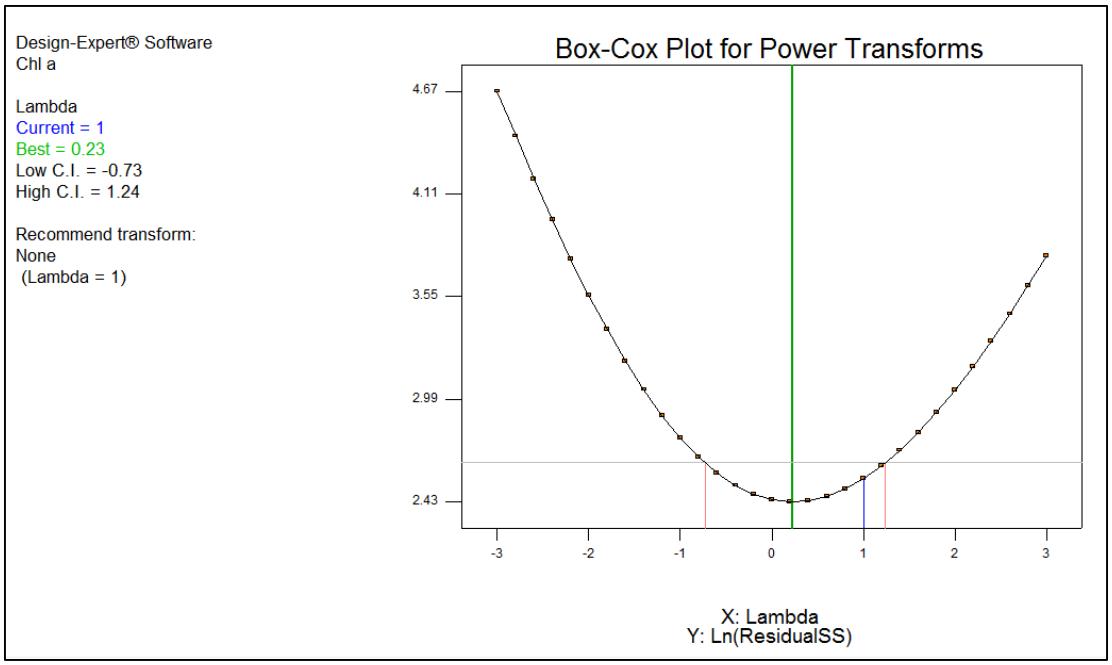
تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان کلروفیل a

پراکنش داده‌های مربوط به استخراج کلروفیل a با توجه به نمودارهای ۱ و ۲ نرمال است. پس از اجرای آنالیز، از مدل جمع مربعات پیشنهادی درجه دوم(Quadratic) استفاده شد زیرا در مقایسه با سایر معادلات ارائه شده P-Value کمتری معادل ۰/۰۶۸ داشته است. پارامترهای R-Squared و Adjusted R-Squared به ترتیب معادل ۰/۵۵۷ و ۰/۲۴۱ به‌دست آمد که مقادیر کمتری را نسبت به یک نشان می‌دهند، با توجه به این نکته و اینکه عدد P معادله از ۰/۰۵ بزرگ‌تر است می‌توان نتیجه گرفت که ۴ فاکتور مورد بررسی تأثیری در استخراج کلروفیل a از جلبک *Laurencia papillosa* نداشته است و مدل ریاضی تعریف شده معنی دار نیست زیرا P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است. با بررسی نتایج به‌دست آمده، حلال متانول با نسبت ۱۲/۵ به ۱، زمان ۱۰ دقیقه و توان مایکروویو برابر با ۱۸۰ وات به عنوان شرایط بهینه استخراج کلروفیل a از جلبک *Laurencia papillosa* تعریف شده است.

تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان کلروفیل b

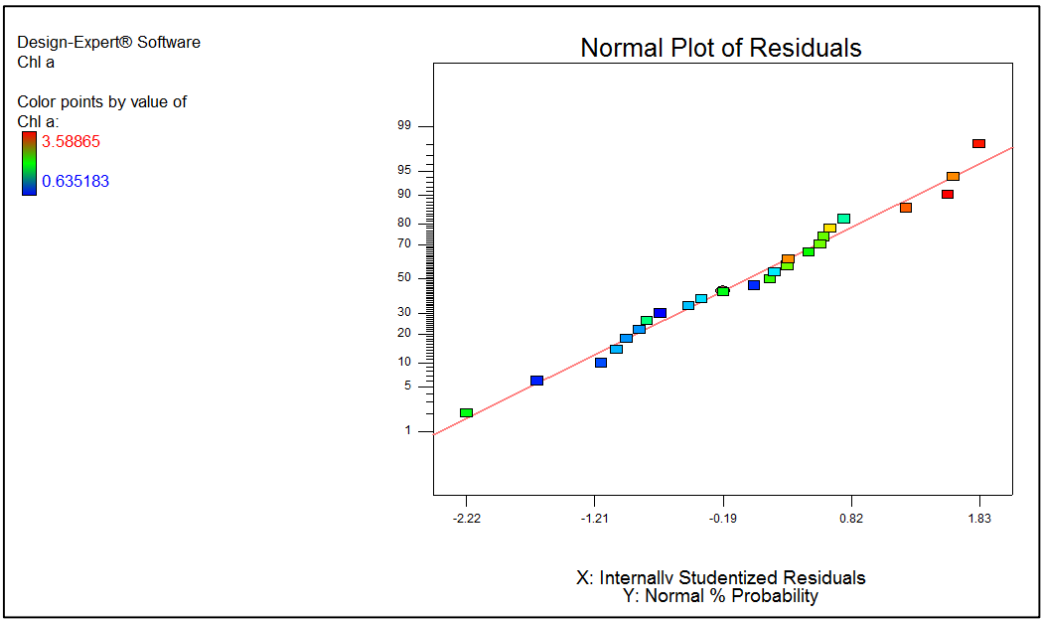
پراکنش داده‌های مربوط به استخراج کلروفیل b با توجه به نمودارهای ۳ و ۴ نرمال است. در این مرحله نیز مانند کلروفیل a از مدل جمع مربعات پیشنهادی درجه دوم(Quadratic) استفاده شد زیرا در مقایسه با سایر معادلات ارائه شده P-Value کمتری معادل ۰/۱۱۹ داشته است. پارامترهای R-Squared و Adjusted R-Squared نیز به ترتیب برابر با ۰/۷۴۵ و ۰/۳۸۸ بوده‌اند. با توجه به این داده‌ها ۴ متغیر نوع حلال، زمان، توان و نسبت حلال به نمونه تأثیر معناداری بر فرآیند استخراج کلروفیل b از این گونه جلبک ندارد و مدل ریاضی تعریف شده معنی‌دار نیست زیرا P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است و مقادیر R-Squared و Adjusted R-Squared نیز به عدد ۱ نزدیک نیستند. طبق نتایج به‌دست آمده حلال آب با

نسبت ۱۲/۵ به ۱، زمان ۲۰ دقیقه و توان مایکروویو برابر با ۹۰ وات به عنوان شرایط بهینه استخراج کلروفیل b از جلبک *Laurencia papillosa* تعریف می‌شود.



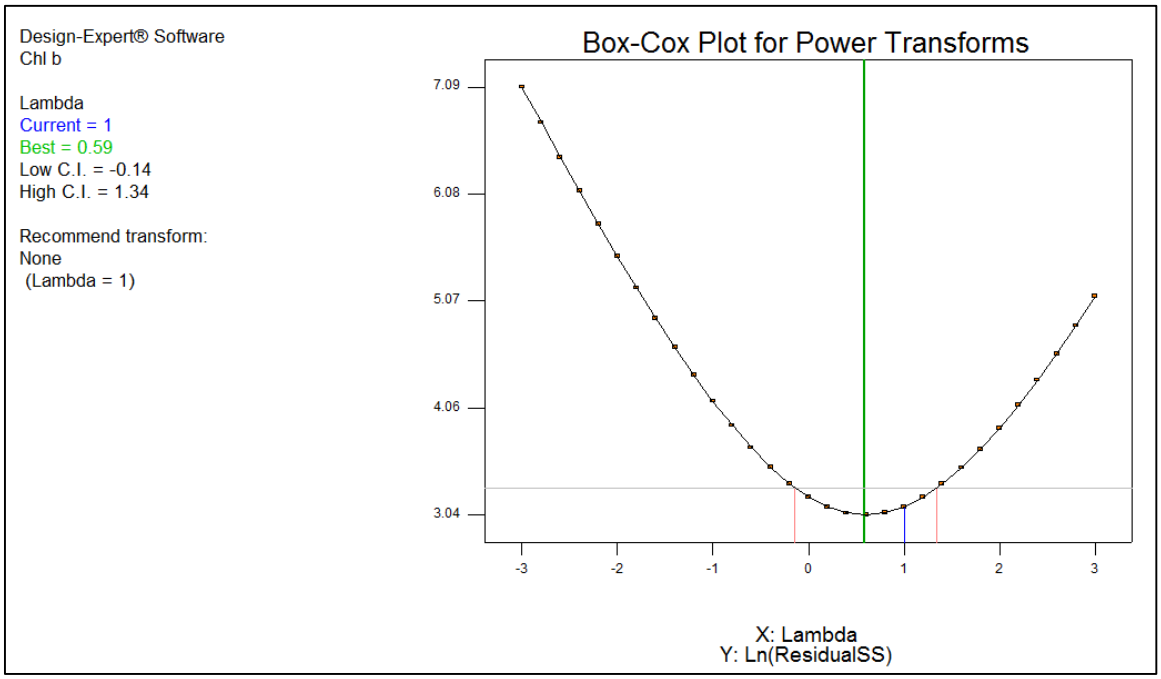
شکل ۱- نمودار Box-Cox کلروفیل a جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 1- Box-Cox plot for chlorophyll a of *Laurencia papillosa*



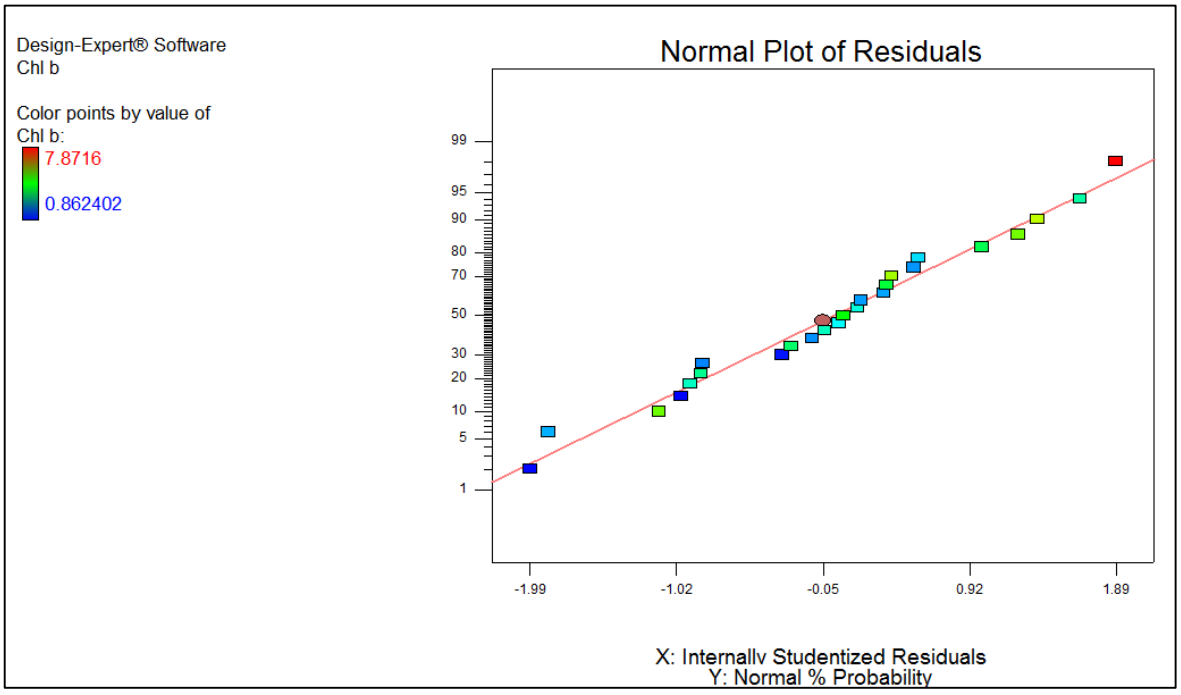
شکل ۲- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده‌های کلروفیل a جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 2- Normal plot of residuals of chlorophyll a of *Laurencia papillosa*



شکل ۳- نمودار Box-Cox کلروفیل b جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 3- Box-Cox plot of chlorophyll b of *Laurencia papillosa*



شکل ٤- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده‌های کلروفیل b جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 4- Normal plot of residuals of chlorophyll b of *Laurencia papillosa*

همان‌گونه که گفته شد به‌رغم معنی‌دار نبودن پارامترهای استخراج روی کلروفیل a و b، متانول و آب به ترتیب به عنوان حلال بهینه برای استخراج این دو ترکیب انتخاب شدند. به طور کلی قدرت انحلال

ترکیبات گیاهی مختلف به خصوصیات شیمیایی ترکیب مورد نظر و گونه گیاه وابسته است. در تحقیق حسن سلطان و همکاران (Hassan Soltan *et al.*, 2016) از متانول و هگزان به عنوان حلال برای استخراج رنگدانه ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی چهار گونه جلبک سبز شامل *Chlamydomona debaryana*, *Selenastrum* sp., *Chlorella sorkinia* و *Chlorella vulgaris* استفاده شد. نتایج به‌دست آمده حاکی از وجود حداکثر مقدار کلروفیل a و b در عصاره‌های متانولی نسبت به عصاره‌های حاوی هگزان بوده است. در مطالعه‌ای دیگر درخصوص میزان ر نگدانه های گیاهی، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماکروجلبک *Urospora penicilliformis* ، عصاره متانولی در مقایسه با حلال هگزان نتایج بهتری ارائه داد و نیز اینکه در تمامی نمونه‌های مورد بررسی رابطه مستقیم میان فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار کاروتنوئید و کلروفیل a و b مشاهده شد (Roleda *et al.*, 2010).

تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان کاروتنوئید

با توجه به نمودارهای ۵ و ۶ ، پراکنش داده‌های حاصل از اندازه گیری کاروتنوئید نرمال است. در این مرحله نیز مدل پیشنهادی جمع مربعات، معادله درجه دوم (Quadratic) با P-Value معادل ۰/۰۵۴ انتخاب شد، مقادیر R-Squared و Adjusted R-Squared به ترتیب معادل ۰/۷۹۷ و ۰/۵۱۳ و از حد مینیمم یک کمتر هستند. نتایج تحلیل واریانس برای سطح پاسخ مدل درجه دوم به شرح جدول ۳ است. با توجه به آنالیز واریانس یک طرفه فاکتور زمان و اثر متقابل زمان×حلال، زمان×توان دارای اثر معنی دار بر استخراج کاروتنوئید از جلبک قرمز است. به‌رغم بی تأثیربودن نوع حلال بر میزان استخراج کاروتنوئید با توجه به نمودار ۷ مشخص شد که حلال ۲(متانول) بیشترین کارایی را در استخراج داشته است. نمودار کانتور ۸ نیز اثر متقابل زمان و قدرت را بر استخراج کاروتنوئید از جلبک *Laurencia papillosa* نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، نسبت ۱۰/۵ به ۱، توان ۱۵۶ وات و زمان ۲۴/۵ دقیقه شرایط بهینه برای استخراج کاروتنوئید معرفی می‌شود.

همانگونه که گفته شد، حلال متانول بیشترین کارایی را در استخراج کاروتنوئید داشته است. این نتایج موافق با نتایج مطالعات رولدا و همکاران (Roleda *et al.*, 2010) است که میزان کاروتنوئید جلبک *Urospora penicilliformis* را اندازه گیری کردند و نشان دادند که میزان این ترکیب زیست فعال در عصاره دارای حلال متانول بیشتر است تا در عصاره دارای حلال هگزان. این نتایج با داده‌های تحقیق حسن سلطان و همکاران (Hassan Soltan *et al.*, 2016) نیز مطابقت دارد که گفته‌اند رنگدانه ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های سبز *Chlamydomona debaryana* *Selenastrum* sp., *Chlorella sorkinia* و *Chlorella vulgaris* در حلال متانول انحلال‌پذیرترند تا در حلال هگزان. نتایج گزارش شده توسط Esquivel- Hernández و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز در خصوص استخراج کاروتنوئید از جلبک *Arthrospira platensis* با روش مایکروویو نشان می‌دهد که بیشترین میزان استخراج در حضور حلال متانول و تحت شرایط ۴۰۰ وات به‌دست می‌آید.

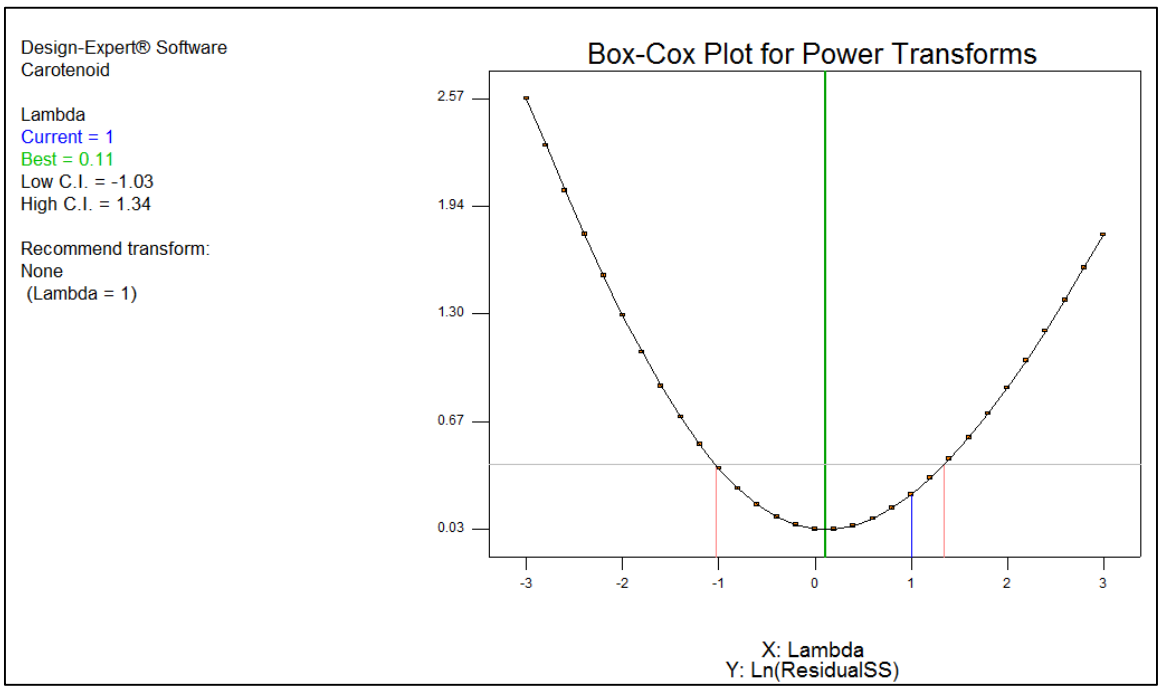
جدول ۳- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور A,B,C وD بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Laurencia papillosa*

Table 3- Analysis of variance of effect of 4 factors A ,B ,C and D on carotenoid extraction of *Laurencia papillosa*

منبع Source	مجموع مربعات Sum of Squares	df	میانگین Mean Square	F Value	p-value Prob > F
مدل Model	4.98	14	0.36	2.81	0.0532*
حلال-A A-Solvent	0.18	1	0.18	1.39	0.2662
زمان-B B-Time	0.80	1	0.80	6.28	0.0311*
قدرت-C C-Power	0.032	1	0.032	0.25	0.6272
نسبت-D D-Ratio A/S	0.082	1	0.082	0.65	0.4392
AB	0.14	1	0.14	1.10	0.3197
AC	0.94	1	0.94	7.41	0.0215*
AD	0.001	1	0.001	0.011	0.9168
BC	0.65	1	0.65	5.11	0.0473*
BD	0.39	1	0.39	3.10	0.1086*
CD	0.066	1	0.066	0.52	0.4853*
A2	0.017	1	0.017	0.14	0.7194
B2	0.13	1	0.13	1.01	0.3393*
C2	0.014	1	0.014	0.11	0.7480
D2	1.02	1	1.02	8.03	0.0177*
Residual	1.27	10	0.13		
Cor Total	6.24	24			

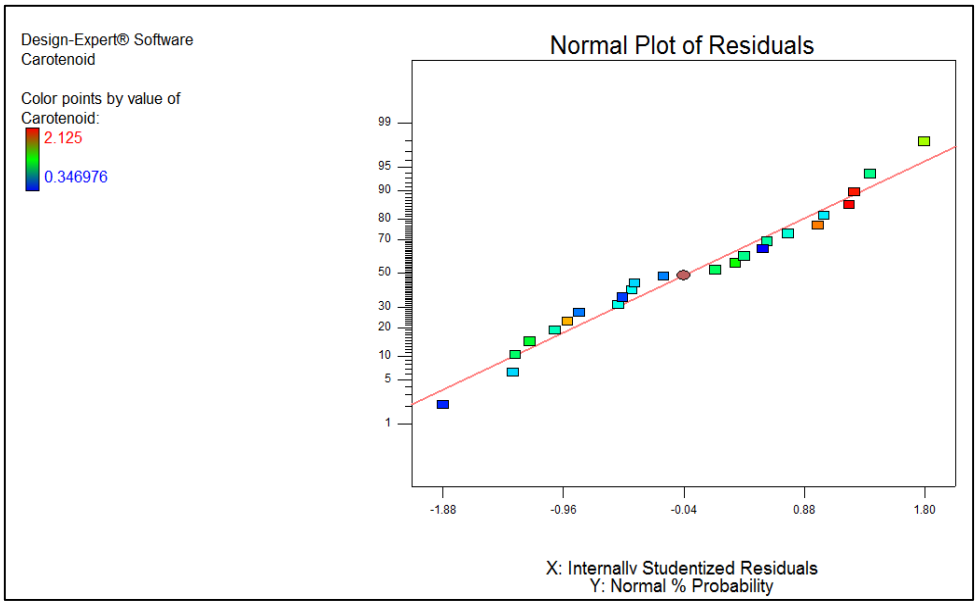
*: Significant difference at P<0.05

*: معنی داری در سطح P<0.05



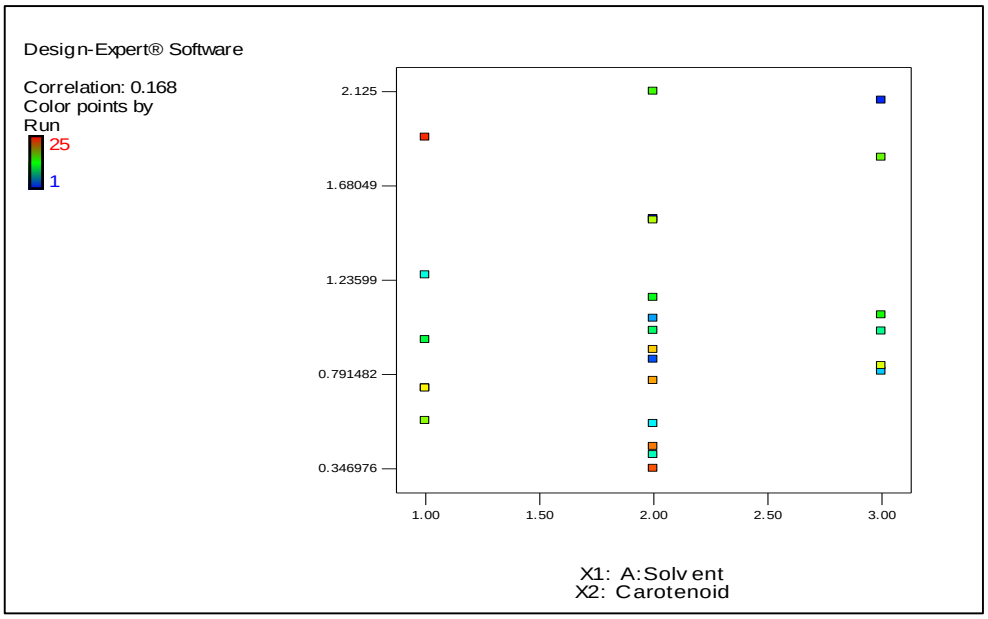
شکل ۵- نمودار Box-Cox کاروتنوئید جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 5- Box-Cox plot of carotenoid of *Laurencia papillosa*



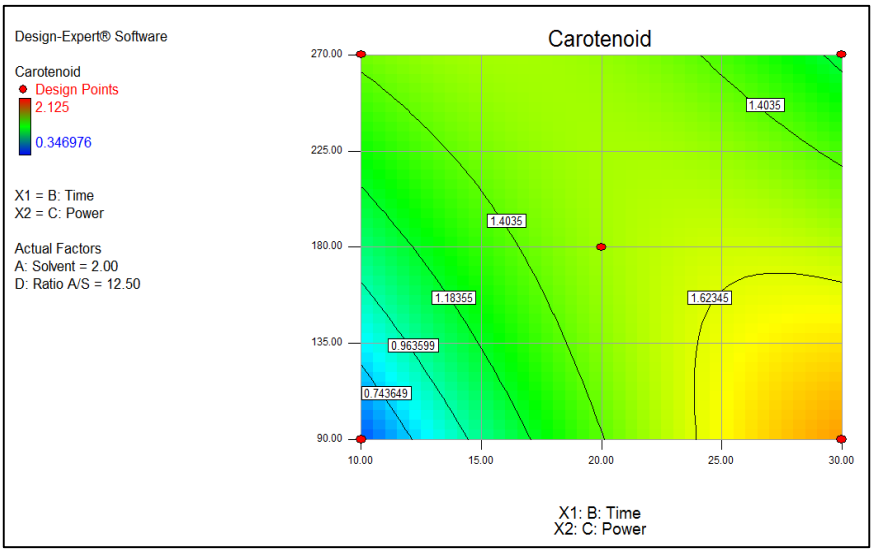
شکل ٦- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده‌های کاروتنوئید جلبک *Laurencia papillosa*

Figure (6) Normal plot of residuals of carotenoid of *Laurencia papillosa*



شکل ۷- نمودار همبستگی اثر حلال بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 7- correlation plot of the effect of solvent on carotenoid extraction of *Laurencia papillosa*



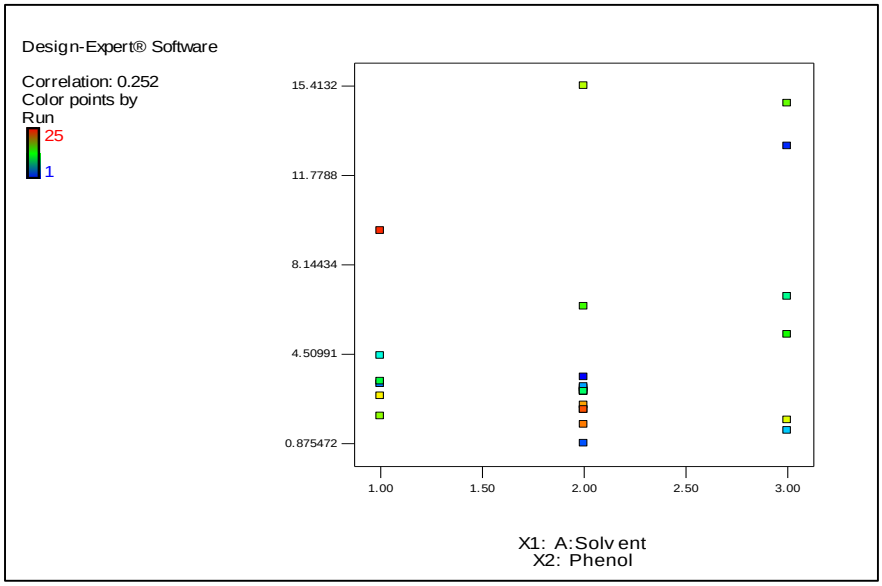
شکل ۸- نمودار کانتور اثر متقابل زمان و توان مایکروویو بر استخراج کاروتنوئید جلبک *Laurencia papillosa*

Fig. 8- Contour plot of the interaction of time and power on carotenoid extraction of *Laurencia papillosa*

تأثیر پارامترهای استخراج بر میزان فنل

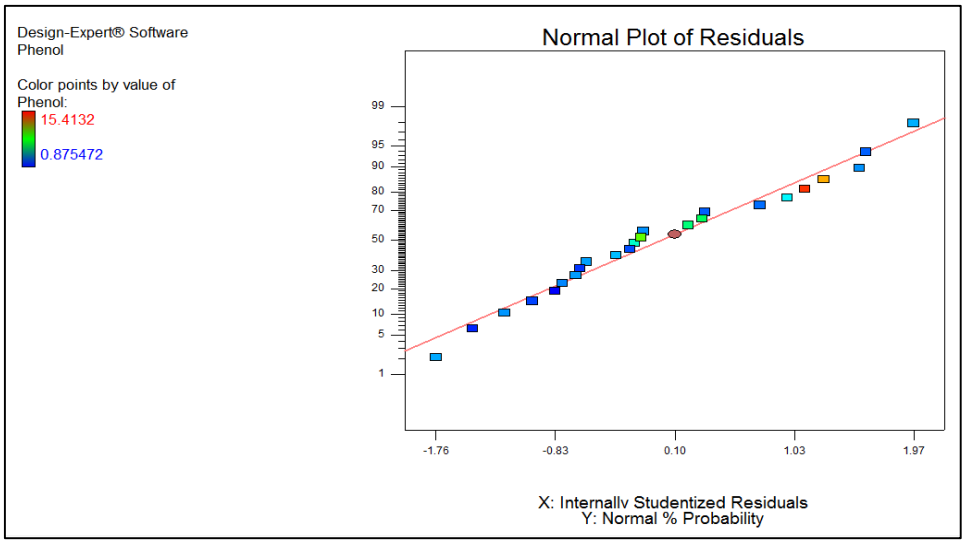
پراکنش داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فنل با توجه به نمودارهای ۹ و ۱۰ دارای پراکنش نرمال است. پس از اجرای آنالیز، مدل جمع مربعات پیشنهادی (Quadratic) معادله درجه دوم با P برابر با ۰/۰۰۱۲ است.

مقادیر R-Squared و Adjusted R-Squared به ترتیب معادل ۰/۸۹۴ و ۰/۷۴۶ است که نشان دهنده تأثیر مدل پیشنهادی است زیرا به عدد ۱ نزدیک هستند و معادله معنی‌دار است.



شکل ۹- نمودار Box-Cox فنل جلبک *Laurencia papillosa*

Figure (9) Box-Cox plot of phenol of *Laurencia papillosa*



شکل ۱۰- نمایش پراکنش نرمال باقی مانده داده‌های فنل جلبک *Laurencia papillosa*

Figure (10) Normal plot of residuals of phenol of *Laurencia papillosa*

اجرای آنالیز وایانس برای سطح پاسخ مدل درجه دوم(جدول ۴) نشان می‌دهد که متغیرهای حلال، زمان، اثر متقابل حلال×زمان و حلال×قدرت دارای تأثیر معنی‌دار بر مقدار فنل استخراج شده از جلبک *Laurencia papillosa* هستند.

جدول ٤- تحلیل واریانس اثر ٤ فاکتور C,B,A وD بر استخراج فنول جلبک *Laurencia papillosa*

Table (4) Analysis of variance of effect of 4 factors A,B,C and D on phenol extraction of *Laurencia papillosa*

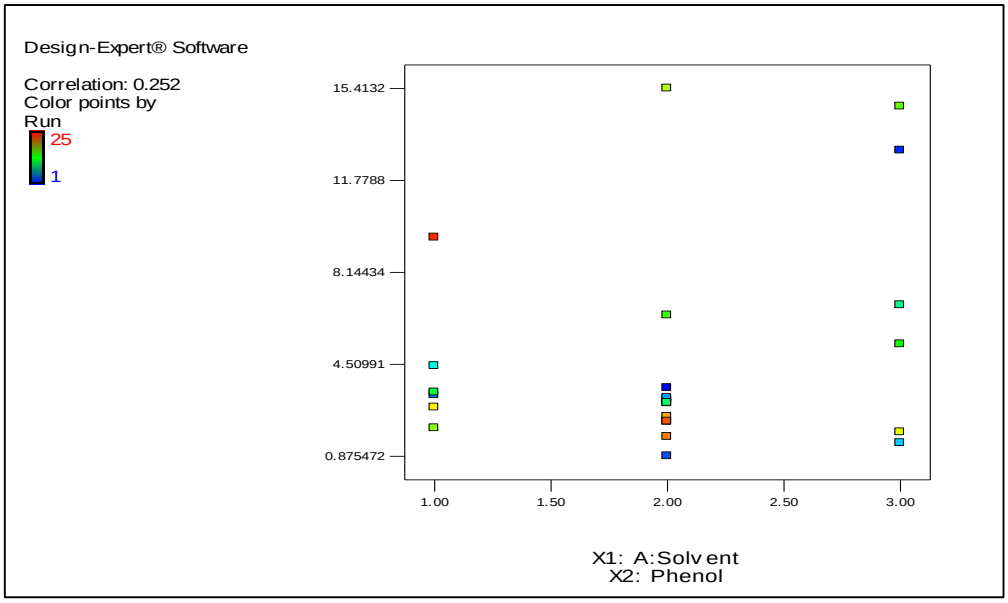
منبع Source	مجموع مربعات Sum of Squares	df	میانگین Mean Square	F Value	p-value Prob > F
مدل Model	361.50	14	25.82	6.05	0.0035*
A-حلال A-Solvent	25.75	1	25.75	6.03	0.0339*
B-زمان B-Time	21.93	1	21.93	5.14	0.0468*
C-قدرت C-Power	0.88	1	0.88	0.21	0.6590
D-نسبت D-Ratio A/S	0.35	1	0.35	0.081	0.7818
AB	27.14	1	27.14	6.36	0.0303*
AC	90.23	1	90.23	21.14	0.0010*
AD	1.40	1	1.40	0.33	0.5801
BC	4.20	1	4.20	0.98	0.3446
BD	1.30	1	1.30	0.30	0.5930
CD	2.94	1	2.94	0.69	0.4258
A2	33.58	1	33.58	7.87	0.0186*
B2	105.15	1	105.51	24.72	0.0006*
C2	77.65	1	77.65	18.20	0.0016*
D2	155.71	1	155.71	36.49	0.0001*
Residual	42.67	10	4.27		
Cor Total	404.17	24			

*: Significant difference at P<0.05

*: معنی داری در سطح P<0.05

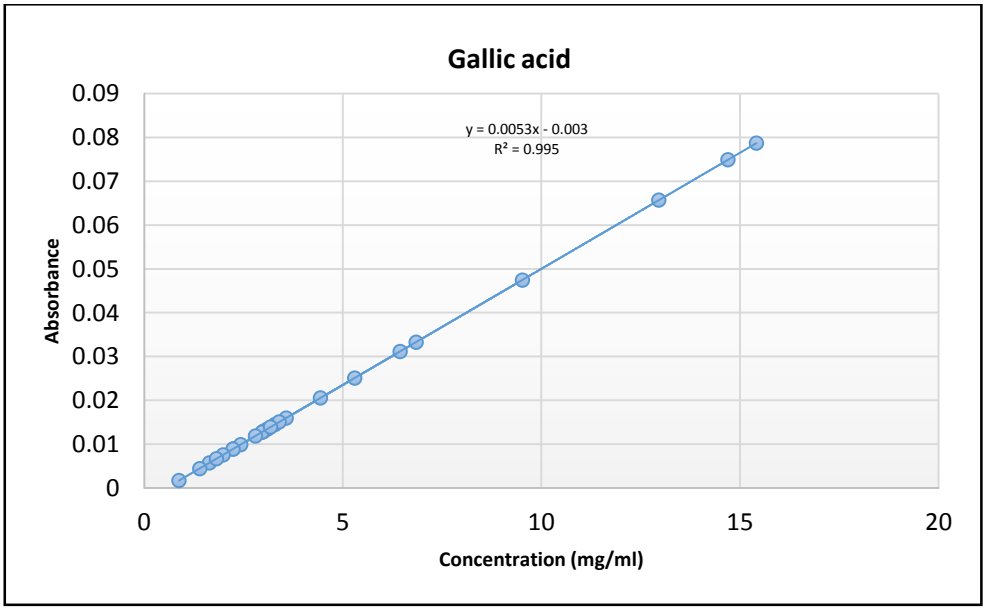
شکل ۱۱ نشان می‌دهد که حلال ۲(متانول) بیشترین تأثیر را در استخراج ترکیبات فنلی از جلبک قرمز *Laurencia papillosa* دارد.

نتایج سنجش مقدار فنل کل عصاره‌های جلبک *Laurencia papillosa* برحسب میلی گرم گالیک اسید بر حجم عصاره در نمودار ۱۲ قابل مشاهده است.



شکل ۱۱- نمودار همبستگی اثر حلال بر استخراج فنل جلبک *Laurencia papillosa*

Figure (11) correlation plot of the effect of solvent on phenol extraction of *Laurencia papillosa*



شکل ۱۲- مقدار فنول جلبک *Laurencia papillosa* برحسب میلی گرم گالیک اسید بر حجم عصاره

Figure (15) Phenolic content based on gallic acid milligram per volume of extract

طبق نتایج به‌دست آمده، حلال متانول با نسبت ۱۲/۵ به ۱، توان ۱۸۰ وات و زمان ۱۰ دقیقه شرایط بهینه برای استخراج فنل از این جلبک محسوب می‌شود.

درخصوص اثر نوع حلال، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی جلبک *Laurencia papillosa* در عصاره‌های متانولی دیده شده است. طبق بررسی‌های رولدا و همکاران (Roleda *et al.*, 2010)، میزان ترکیبات فنلی جلبک *Urospora penicilliformis* در عصاره دارای حلال متانول بیشتر بوده است تا در عصاره دارای حلال هگزان. در پژوهش حاضر معلوم شده است که زمان از جمله عوامل مؤثر معنی دار بر استخراج فنل است در بررسی‌های سفری و همکاران (Safari *et al.*, 2015) در خصوص استخراج فنل از جلبک سبز *Chaetomorpha* sp. با مایکروویو مشخص شد مقدار استخراج فنل با افزایش زمان افزایش می‌یابد. این محققان از حلال‌های آب، متانول، اتانول و استون نیز استفاده کردند و نشان دادند بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در حضور حلال استون مشاهده می‌شود. در تحقیقات این محققان این نتیجه به‌دست آمد که افزودن آب به حلال‌های آلی موجب افزایش استخراج ترکیبات فنلی می‌شود که می‌تواند به ماهیت قطبی ترکیبات فنلی مرتبط باشد. در تحقیقات چیو و همکاران (Chew *et al.*, 2008) نیز میزان ترکیبات فنلی جلبک سبز *Caulerpa rasemosa* اندازه گیری و طبق نتایج به‌دست آمده بیشترین مقدار فنل در عصاره حاوی حلال متانول ۲۰ درصد و ۵۰ درصد دیده شده است، همچنین کمترین مقدار فنل در عصاره حاوی حلال متانول ۹۰ بوده است که نشان می‌دهد با افزودن آب به حلال و به عبارتی با افزایش قطبیت، بازده استخراج ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد.

نتایج تحقیقات اُ سولیوان و همکاران (O'Sullivan *et al.*, 2011) حاکی از وجود ارتباط بین گونه جلبک و میزان فنل کل آن است. این محققان می‌گویند در گونه‌های مشابه نیز بسته به شرایط اقلیمی، آب و هوایی و میزان نور در محیط رشد جلبک، مقدار فنل می‌تواند متفاوت باشد، برای مثال در صورت افزایش دمای محیط، مقدار فنل متعلق به برخی گونه‌های جلبک در پاسخ به استرس محیطی وارد شده افزایش می‌یابد.

در بررسی‌های جونگ و همکاران (Jung *et al.*, 2003) روی خواص آنتی اکسیدانی گیاه *Lupinus albus* نشان داده شد که افزایش pH محیط سبب افزایش مقدار فنل و فلاوونوئید می‌شود که این نکته در فعالیت‌های صنعتی دارای اهمیت است. صنوبری و همکاران (Senobari *et al.*, 2014) در مطالعه‌ای به بررسی اثر غلظت‌های مختلف از نیکل و وجود اسیدیته بالا در محیط رشد جلبک *Cladophora glomerata* بر ترکیبات آنتی اکسیدانی این جلبک پرداختند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که مقدار فنل و فلاوونوئید تام و خواص آنتی اکسیدانی به عوامل مختلفی مانند دما، pH، شوری و سایر عوامل موجود در محیط رشد گیاه بستگی دارد و می‌تواند بر فرآیند متابولیکی آنها نیز اثر بگذارد. بررسی‌ها و مطالعات مختلف نشان داده است که جلبک‌ها می‌توانند در برابر استرس‌های محیطی به روش‌های مختلفی از خود محافظت کنند. در تحقیقات صنوبری و همکاران(Senobari *et al.*, 2014) گفته شده است وجود فلزات سنگین در محیط منجر به افزایش مقدار فنل و فلاوونوئید جلبک می‌شود. دلیل این موضوع آن است که ترکیبات فنلی و فلاوونوئید قادر به تشکیل کمپلکس با فلزات هستند. نتایج مطالعات فراستی و همکاران (Farasat *et al.*, 2014).

روی خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی نشان داده است که تمامی جلبک‌های مورد مطالعه به درجات متفاوت دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند که این امر به شرایط محیطی خاص منطقه‌ای مرتبط است که نمونه در آن وجود دارد. جلبک‌های آبزی نیز مانند گیاهان خشکی زی در معرض نور و اکسیژن قرار دارند که سبب تولید رادیکال‌های آزاد و عوامل اکسیدکننده قوی می‌شود. اما فقدان آسیب اکسیداتیو در اجزای ساختاری جلبک‌ها نشان دهنده مقاومت آنها در برابر اکسیده شدن و دارا بودن سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی در آنهاست. به طور کلی به نظر می‌رسد تغییر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب که در اثر عواملی مانند آلودگی‌های ناشی از دخالت‌های انسانی یا تغییرات آب وهوایی رخ می‌دهد، می‌تواند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی اثرگذار باشد. نتایج مطالعات حاکی از آن است که میزان متابولیت های ثانویه گیاهی از جمله فنل، فلاوونوئید و خاصیت آنتی اکسیدانی آنها به عوامل متعددی مانند آب و هوا، گونه گیاهی، روش استخراج و روش اندازه گیری آنتی اکسیدان بستگی دارد (Kumar Gupta & Neelam, 2006).

نتیجه گیری

جلبک *Laurencia papillosa* نوعی جلبک قرمز است که به شکل بومی در خلیج فارس یافت می‌شود و از منابع زیستی با ارزش کشور به شمار می‌رود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد این جلبک منبعی غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی شامل کلروفیل a و b، کاروتنوئید و ترکیبات فنلی است و می‌تواند در صنایع غذایی و دارویی استفاده شود. روش استخراج با مایکروویو، که در این مطالعه به‌کار رفته است، روشی است نوین که سبب صرفه جویی در زمان، انرژی و هزینه می‌شود و سازگار با محیط زیست است. طبق داده‌های حاصل از این مطالعه و با توجه به شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنلی می‌توان گفت نوع حلال نقش مهمی در استخراج ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدی دارد و حداکثر استخراج وقتی است که حلال متانول به‌کار می‌رود. بنابراین، بررسی و کنترل متغیرهای موجود در فرآیند استخراج با مایکروویو منجر به دستیابی به حداکثر ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنلی خواهد شد. امید است با تحقیقات بیشتر زمینه‌ای مناسب برای بهره برداری هرچه بیشتر از جلبک‌های بومی در صنایع مختلف غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی فراهم آید.

تعارض منافع

نویسندگان در خصوص انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

مراجع

Airanthi, M. K., Hosokawa, M. and Miyashita, K. 2011. Comparative antioxidant activity of edible japanese brown seaweeds. Journal of Food Science. 76 (1): 104-111.

Amir Sharifi, M. 2015. Phytochemical study and antibacterial and antifungal and cytotoxic effects of Sargassum glaucescens algae. Ph.D. Thesis. Faculty of Marine Science and Technology Islamic Azad University, Science and Research Branch [In Persian].

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.

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

Esquivel-Hernández, D., López, V., Rodríguez-Rodríguez, J., Alemán-Nava, G., CuéllarBermúdez, S., Rostro-Alanis, M., and Parra-Saldívar, R. 2016. Supercritical carbon dioxide and microwave-assisted extraction of functional lipophilic compounds from Arthrospira platensis. International Journal of Molecular Sciences. 17(5): 658.

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

Gupta, S., Cox, S., Rajauria, G., Jaiswal, A.K. and Abu-Ghannam, N. 2012. Growth inhibition of common food spoilage and pathogenic microorganisms in the presence of brown seaweed extracts. Food and Bioprocess Technology. 5 (5): 1907–1916.

Hashem Dabbaqian, E., Rezaei, M. and Tabarsa, M. 2016. Ethanolic extraction and solvent-solvent partitioning of antioxidant compounds from green seaweed Enteromorpha intestinalis. Iranian Journal of Natural Resources. 69 (3): 385-396 [In Persian].

Hassan Soltan, T., Noroozi, M. and 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. and 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. and 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.

Kim, M. C., Dharaneedharan, S., Moon, Y.G., Kim, D.H., Son, H.J. and Heo, M.S. 2013. Isolation and Identification of Oceanisphaera Sp. JJM57 from Marine Red Algae Laurencia Sp. (Ceramiales: Rhodomelaceae). The Korean Journal of Microbiology. 49 (1): 58-63.

Kumar Gupta, A. and Neelam, M. 2006. Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of chamomile capitula in paracetamol intoxicated albino rats. American Journal of Pharmacology and Toxicology. 1 (1): 17-20.

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

Omar, H., Al-Judaibiand, A. and 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.

O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y., O'Grady, M. N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D. J., Kerry, j. p. and 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.

Roleda, M. Y., Lutz-Meindl, U.,Wiencke, C. and Lutz, C. 2010. Physiological biological and ultrastructural responses of the green macroalga Urospora pencilliformis from Artic Spitsbergen to UV radation. Protoplasma. 243, 105-116.

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

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

Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Martins, J. T., Quintas, M. A. C., Ferreira, A., Teixeira A. 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59, 5589-5594.

Taga, S., Miller, E. E. and Pratt, D. E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society. 61 (5): 928–931.

Tannoury, M., Saab, A., Elia, J., Harb, N., Makhlouf, H. and Diab-Assaf, M. 2017. In vitro cytotoxic activity of Laurencia papillosa marine red algae from the Lebanese coast. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7 (3), 175–179.

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

Food Engineering Research/Vol.21/No.72/Spring& Summer 2021/P: 57-74

Journal Home page: https://fooder.areeo.ac.ir/

Original Research

Extraction Optimization of Antioxidant and Phenolic Compounds of *Laurencia papillosa* by Microwave-Assisted Process

Yasamin Fayaz, Masoud Honarvar*, Nargess Moorki

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

*-Corresponding author: Email: m-honarvar@hotmail.com

Received: 30 August 2020, Accepted: 16 September 2020

http://doi: 10.22092/FOODER.2022.351679.1283

Abstract

Aquatic plants are one of the most important sources of bioactive compounds with antioxidant activity. The aim of this paper is to optimize the microwave extraction of antioxidant compounds including chlorophyll a and b, carotenoids, and phenolic compounds from *Laurencia papillosa* based on extraction time, microwave power, solvent type, and solvent to sample ratio. Experimental design was performed using Design Expert with 25 runs, and the amounts of the mentioned antioxidant compounds were measured. The results for chlorophyll a and b showed that none of the extraction factors had a significant effect (P > 0.05) on these two types of chlorophylls. In relation to carotenoid extraction, the time, time and solvent interaction, and time and power interaction had significant effects (P 0.05), and according to the results, the optimum conditions for carotenoid extraction include methanol as the solvent with a ratio of 10.5 to 1, power of 156 watts, and time of 24.5 minutes. Regarding phenolic compounds, solvent, time, solvent and time interaction, and solvent and power interaction had significant effects (P 0.05), and the optimum conditions of phenol extraction include methanol as the solvent with a ratio of 12.5 to 1, power of 180 watts, and time of 10 minutes. The results of this paper indicate that *Laurencia papillosa* has significant antioxidant properties, and by controlling the effective parameters in the microwave extraction process, the maximum amount of antioxidant compounds can be obtained.

Key words: Aquatic plant, Bioactive, Chlorophyll, Carotenoid, Solvent