بهینه سازی خواص آنتی اکسیدانی عصاره جلبک قهوه ای (*Sargassum glaucescens*) در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش سطح پاسخ

علی طاهری[1*]، افره نصرتی[2]، چکاوک خواجه امیری[3]

۱- دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۳- مربی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

(تاریخ دریافت: ۹٤ /۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۹/۱۸)

چکیده

جلبک‌دریایی *Sargassum glaucescens* از سواحل چابهارجمع آوری و جهت بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره جلبک‌در سه‌زمان (۱، ۳ و ۵ ساعت)، سه سطح دمایی (۲٤، ٤۷ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و سه‌سطح غلظت (٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد) استخراج شد. خواص آنتی‌اکسیدان عصاره های جلبک با روش مهار رادیکال آزاد[1] سنجش شد. در این تحقیق برای پیش‌بینی خواص آنتی‌اکسیدان عصاره جلبک سارگاسوم از بهینه سازی پاسخ سطحی و طرح مرکب مرکزی استفاده شد. با توجه به نتایج، غلظت حلال ۹۹/۳۹ درصد، دمای ۵۷/٦٦ درجه سانتی‌گراد و زمان٤/۳۲ ساعت به عنوان تیمار بهینه استخراج عصاره بدست آمد. در این روش بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال ازاد ۳٦/۹۳ درصد حاصل شد. اعتبار سنجی مدل بدست آمده نیز تایید گردید. میزان فنل‌کل عصاره در سطح بهینه ۰/٥٦±۳/۲ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره بود. نتایج نشان داد که جلبک *Sargassum glaucescens* می تواند به عنوان یک گونه هدف برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی استفاده شود.

کلید واژگان: آنتی‌اکسیدان، پلی فنل، خلیج چابهار، روش سطح پاسخ، سارگاسوم

* مسئول مکاتبات: taheri@cmu.ac.ir

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۱- مقدمه

اتواکسیداسیون لیپید در فرآورده های شیلاتی شامل سه مرحله می باشد. ۱) شروع، توسط مواد شیمیایی، حرارت و منابع آنزیمی که منجر به افزایش در تعداد رادیکال‌های آزاد می‌شود، ۲) انتشار، توسط واکنش زنجیره ای و ۳) پایان، که با تولید ترکیبات غیر رادیکال خاتمه می یابد. محصولات اولیه هیدروپروکسیدها هستند که بسیار ناپایداراند و منجر به تولید محصولات ثانویه اکسیداسیون مانند آلدهیدها، کتون‌ها، الکل‌ها و هیدروکربن‌ها می‌شوند و روی کیفیت غذا تاثیر می‌گذارند. از این رو می بایست از تولید آن ها جلوگیری نمود. آنتی‌اکسیدان‌ها توسط مهار رادیکال آزاد، قطع واکنش زنجیره ای، از بین بردن اکسیژن یگانه، افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌های دیگر، کلاته‌کردن فلز یا مهار آنزیم‌های اکسیداتیو می‌توانند جلوی اکسیداسیون را بگیرند [۱].

امروزه با توجه به کشف آنتی اکسیدان‌های طبیعی موثر و ایمن نگرانی‌های بهداشتی برای استفاده از آنتی اکسیدان های صنعتی، که می‌تواند در برخی موارد اثرات مضری داشته باشد کاهش یافته است [۲]. معمولاً آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی در مقادیر کمتر بیش‌تر موثرند، درحالی‌که عصاره‌های طبیعی ممکن است در مقادیر بالاتر اضافه شود که در موارد معمولی ایمن شناخته شده است. از سوی دیگر موجودات‌دریایی دارای تنوع طبقه بندی بزرگی بوده و متابولیت‌هایی با ساختارهای متنوع با فعالیت‌های بیولوژیکی جالب توجه برای موادغذایی، آرایشی و بهداشتی، بیوتکنولوژی و داروسازی سنتز می‌کنند. بهره‌برداری از جلبک‌ها در ابعاد صنعتی، کشاورزی، دارویی و غذایی بسیار گسترش یافته و تکنولوژی مدرن برای تولید و بهره برداری از جلبک‌ها در کشورهای صنعتی و پیشرفته جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. برخی از ماکروجلبک‌ها در زیستگاه‌های پیچیده در معرض شرایط سختی زندگی می‌کنند که منجر به شکل گیری رادیکال‌های آزاد و دیگر عوامل اکسیداسیون می‌شود. با این حال، این گونه ها تحت تاثیر مکانیسم‌هایی برای انطباق سریع، تولید متابولیت‌های ثانویه می‌کنند که آن‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. جلبک‌های دریایی منبع بسیارخوبی از مواد زیست فعال مانند کارتنوئیدها، فیبرخوراکی (رژیم غذایی)، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و موادمعدنی هستند [۳]. علاوه بر این، متابولیت جلبک‌های دریایی برای ارائه بسیاری از فعالیت های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی از جمله ضدانعقاد، ضدویروس، ضدتومور، ضدالتهاب و ضداکسیدان شناخته شده‌اند [٤]. از جمله این جلبگ ها جلبک دریایی سارگاسوم می باشد. سارگاسوم از خانواده جلبک های قهوه ای است که این خانواده به دلیل داشتن ترکیبات فوکوئیدان مثل گالاکتوز، زایلوز و گلوکورونیک اسید که ترکیباتی با خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی است مورد توجه می باشند [٥].

در کشور ایران نیز به دلیل شرایط جغرافیایی خاص، گسترش جلبک‌های دریایی زیاد است و می‌توان با بهره‌گیری از آن‌ها به تولید محصولات با ارزش افزوده پرداخت. جلبک‌های دریایی در سواحل صخره‌ای جنوب کشور به‌خصوص سواحل استان سیستان و بلوچستان، هرمزگان و بوشهر به وفور یافت می‌شوند. طی تحقیقات انجام شده بیش از ۲۵۰گونه جلبک در سواحل جنوب کشور شناسایی شده، که بسیاری از گونه‌ها دارای خواص کاربردی بوده و در سطح جهانی از آن‌ها استفاده می‌شود [٦].

با توجه به تحقیقات انجام شده در زمینه شناسایی و کاربرد جلبک‌های سواحل جنوبی کشور و با توجه به اثرات متعددی که متابولیت‌های مستخرج از جلبک‌ها دارند، لزوم توجه هرچه بیش‌تر به شناخت این ذخایر و قابلیت‌های کاربردی آن‌ها مشخص شده و لازم است در مورد اثرات گونه های جلبکی سواحل جنوب کشور تحقیقات لازم صورت گیرد تا بر اساس آن بتوان به نحو مطلوب بهره برداری بهینه را از این منابع طبیعی ملی انجام داد [٦].

روش سطح پاسخ یکی از روش‌های بهینه‌سازی می‌باشد که با استفاده از تکنیک‌های ریاضی و آماری مسائل را مدل می‌کند و نه تنها اجراهای پر هزینه‌ی شبیه سازی کاهش می‌یابد بلکه روند طبیعی بهینه فرآیند را که اغلب غیر خطی می‌باشد پیش‌بینی می‌کند و نشان می‌دهد [۷]. تحقیقاتی چند نیز روی بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان جلبک های دریایی با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شده است که از آن ها می توان به جلبک *Hormosira banksii*، *Fucus vesiculosus*، *Isocrysis galbana* و *Laminaria japonica*، *Chaetomorpha sp.* اشاره نمود [۸-۱۲]. در تحقیق حاضر به بهینه سازی شرایط استخراج عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens* با

خواص آنتی اکسیدانی توسط روش سطح پاسخ پرداخته شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه و عصاره‌گیری

جلبک‌دریایی *Sargassum glaucescens* از منطقه بین جزر و مدی خلیج چابهار، سواحل دریا بزرگ و تیس جمع آوری شد. نمونه برداری در پاییز سال ۱۳۹۲ در هنگام حداکثر جزر صورت گرفت. سپس نمونه‌ها با آب شیرین شستشو شدند تا گل و لای و نمک از آن جدا شود. نمونه‌ها خشک شده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند [۱۳]. جلبک‌ها با آسیاب برقی پودر شدند سپس توزین و به ظرف مورد نظر منتقل شده و به نسبت ۱:۱۰ به آن متانول اضافه شد. سپس با استفاده از یک انکوباتور شیکر دار (پکو، ساخت ایران) و با توجه به طراحی آزمایش صورت گرفته برای هرتیمار (جدول۲) استخراج صورت گرفت و پس از آن عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن ۱، صاف و فریز درای شد (فریزدرایرjFD2L ساخت ایران).

Table 1 The independent variables and their levels used for design

X_i	Factor Levels		
	-1	0	+1
Concentration (X_1) (%)	60	80	100
Temperature (X_2) (℃)	24	47	70
Time (X_3) (h)	1	3	5

۲-۲- طراحی آزمایش

پس از انجام یک پیش تیمار اولیه سطوح متفاوت فاکتورها مشخص گردید و طراحی با استفاده از نرم افزار Design expert ورژن ۷ انجام شد (جدول۲).

۲-۳- آنالیز عصاره

۲-۳-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش Shimada و همکاران اندازه‌گیری شد [۱٤]. در این روش DPPH در غلظت ۰/۱ میلی‌مول اتانول حل و ۱ میلی‌لیتر محلول آزمایشی با ۱ میلی‌لیترمحلول DPPH مخلوط شد و مخلوط در جای تاریک به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۳۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده و ثبت شد. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط معادله زیر محاسبه گردید:

معادله (۱)

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH $=[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100\%$

A_1، A_2 و A_0 به ترتیب، جذب کنترل، جذب محلول آزمایش و کنترل می‌باشند.

۲-۳-۲- سنجش محتوای کل فنل

میزان فنل کل بر اساس استاندارد گالیک اسید با استفاده از شناساگر فولین سیوکالتو اندازه گیری شد، به این صورت که ۱ میلی‌لیتر از نمونه به ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتو ۰/۱ مولار اضافه و با هم مخلوط شد. و بعد از ۱ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد اضافه و با هم مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب در ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد [۱۵].

۲-٤- آنالیز آماری

روش سطح پاسخ یا به صورت اختصاری RSM، یک مجموعه از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است. هدف در این گونه طرح‌ها بهینه‌سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متأثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) می‌باشد. این طرح از ۸ نقطه سازگانی، ٦ نقطه محوری و ٦ نقطه حول نقطه مرکزی تشکیل شد. متغیرهای مستقل در این آزمایش عبارت بودند از غلظت (X_1) ، دما (X_2) و زمان (X_3). معادله چند جمله‌ای درجه دو (معادله ۲) برای پیش‌بینی میزان پاسخ استفاده گردید.

معادله (۲)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} x_i x_j$$

Y متغیر وابسته یا پاسخ دریافتی، β_0 عدد ثابت، β_i, β_{ii} و β_{ij} ضرایب تخمینی مدل. x_i, x_j سطوح متفاوت متغیرهای مستقل است. این مدل تاثیرات خطی، درجه دوم و متقابل متغیرها را بر روی میزان پاسخ نشان می‌دهد و تاثیر هر متغیر مستقل را بر روی پاسخ تخمین می‌زند و مدل بهینه شده نیزاعتبار سنجی گردید. از نرم افزار Design Expert7 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده گردید. در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی (Central composite design face centered) با سه متغیر مستقل شامل غلظت، دما و زمان استخراج در سه سطح، به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج عصاره جلبک‌های دریایی *Sargassum glaucescens* و بهینه سازی فرآیند مذکور استفاده شد. تعداد کل آزمایشات برابر ۲۰ بوده و متغیر وابسته (پاسخ)، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بود (جدول ۲).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصل از روش DPPH

نتایج حاصل از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد که تیمار ۱۲ (غلظت ۱۰۰ درصد، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ ساعت) حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی و تیمار ٤ (غلظت ۸۰ درصد، دمای ٢٤ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ ساعت) و ١٤ (غلظت ۱۰۰درصد، دمای ٢٤ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱ ساعت) حداقل فعالیت آنتی اکسیدانی را داشته اند. ٦ نقطه حول محور مرکزی مربوط به تیمارهای ۳، ۵، ٦، ۱۰، ۱۵ و ١٦ بود که فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها به ترتیب ٢٦/٢، ٢٨/١، ٢٤/٨، ٢٤/١، ٢٦/١ و ٢٦/٦ با انحراف معیار ١/٤٠ ± ٢٥/٩٨ بود (جدول ۲).

Table 2 Experimental values of DPPH free radical scavenging activity of *Sargassum glaucescens* obtained from CCF design

Exp. run	Temperature (°C)	Time (h)	Solvent Concentration (%)	DPPH free radical scavenging (%)
1	70	1	100	29.4
2	47	3	100	33.4
3	47	3	80	26.2
4	24	3	80	16.1
5	47	3	80	28.1
6	47	3	80	24.8
7	47	1	80	20.7
8	70	5	60	24.2
9	24	5	100	21.4
10	47	3	80	24.1
11	47	5	80	25.9
12	70	5	100	36.9
13	24	1	60	19.3
14	24	1	100	16.1
15	47	3	80	26.1
16	47	3	80	26.6
17	70	3	80	21.7
18	47	3	60	29.5
19	70	1	60	21.3
20	24	5	60	20.2

۳-۲- بهینه‌سازی استخراج عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens* با استفاده از روش سطح پاسخ

با توجه به طرح تعریف شده در RSM، آزمون مربوطه انجام شد. در جدول ۲ نتایج آزمون ارائه شده است. در مرحله بعد داده های بدست آمده از آزمون توسط روش سطح پاسخ آنالیز گردیدند. در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل شامل غلظت (درصد) (X_1)، دما (درجه سانتی‌گراد) (X_2) و زمان (ساعت) (X_3) در سه سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله دوم طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی، برازش و مورد ارزیابی قرارگرفت [۷]. مرحله سوم شامل ارائه گرافیکی رابطه‌ی مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه بود که به وسیله‌ی نمودار انجام پذیرفت.

۳-۳- مدل سازی

با توجه به شرایط تعیین شده در روند بهینه سازی پاسخ سطحی، ۲۰ استخراج نهایی انجام گرفت. جدول ۳ نتایج بدست آمده از آزمایش‌ها را نشان می‌دهد. مدل درجه دوم از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱) و مقدار بالای R^2 (۰/۹۷۰۱) و R^2 adjusted (۰/۹۴۳۲)، نیز بیانگر قدرت بالای مدل درجه دوم در پیش‌بینی بود.

۳-٤- نتایج تجزیه واریانس

با توجه به جدول ۳ نتایج نشان داد که هر سه فاکتور غلظت، دما و زمان روی استخراج عصاره اثر دارد و توان دوم غلظت و دما و زمان دارای اختلاف معنی دار است و اثر متقابل غلظت و دما، غلظت و زمان اختلاف معنی داری دارد ولی اثر متقابل دما و زمان معنی دار نیست.

Table 3 ANOVA table for DPPH free radical scavenging activity of *Sargassum glaucescens* extract as affected by independent variables during optimization experiments

Factors	SS	df	MS	F	P*
DH					
Model	519.66	9	57.74	36.05	< 0.0001
Independent Variables					
Concentration (X_1)	51.53	1	51.53	32.17	0.0002
Time (X_2)	163.22	1	163.22	101.90	< 0.0001
Temperature (X_3)	47.52	1	47.52	29.67	0.0003
Interaction					
$X_1 \times X_2$	64.98	1	64.98	40.57	< 0.0001
$X_1 \times X_3$	10.13	1	10.13	6.32	0.0307
$X_2 \times X_3$	2.21	1	2.21	1.38	0.2679
X_i^2					
X_1^2	104.47	1	104.47	65.23	< 0.0001
X_2^2	112.16	1	112.16	70.02	< 0.0001
X_3^2	10.85	1	10.85	6.77	0.0264
Lack of Fit	6.16	5	1.23	0.62	0.6918
Pure Error	9.87	5	1.97		
Cor Total	535.68	19			

*p, Level of significance.

۳-۵- بهینه‌سازی سطوح چندگانه

این روش یک روش ریاضی طراحی آزمایش‌ها، ساخت مدل‌ها، تعیین تاثیر چندین عامل و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ‌های مورد نیاز است. نمودارهای سه بعدی پاسخ وقتی که یکی از متغیرها در سطح مرکزی ثابت است و دوتای دیگر تغییر می‌کند در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. این نمودارها نشان می دهد که غلظت، دما و زمان استخراج عصاره بر خواص آنتی‌اکسیدان تاثیر دارند.

۳-۵-۱- رابطه دما و زمان بر فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره استخراجی

در شکل ۱ در غلظت ثابت ۸۰ درصد اثر همزمان دو متغیر دما و زمان بر خواص آنتی‌اکسیدان عصاره جلبک نشان داده شده است.

بر این اساس در محدوده زمانی۲ تا ۲/۲ ساعت و دمای ٤٧ تا۵۸/۵۰ درجه سانتی‌گراد بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی از عصاره استخراجی به دست می‌آید و خارج از این محدوده افزایش دما و زمان اثر کاهشی بر پاسخ دارد.

۳-۵-۲- رابطه دما و غلظت حلال بر فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره استخراجی

در شکل ۲ در زمان ثابت ۳ ساعت اثر همزمان دو متغیر دما و غلظت حلال بر خواص آنتی‌اکسیدان عصاره جلبک نشان داده شده است. بر این اساس دما در محدوده ۵۰ تا ۵۸/۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۹۷ تا ۱۰۰درصد خواص آنتی‌اکسیدان خوبی را نشان می‌دهد. خارج از این محدوده دما باعث کاهش خواص آنتی‌اکسیدان عصاره شده است.

۳-۵-۳- رابطه زمان و غلظت حلال بر فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره استخراجی

در شکل ۳ در دمای ثابت ٤٧ درجه سانتی‌گراد اثر همزمان دو متغیر زمان و غلظت بر راندمان استخراج عصاره جلبک نشان داده شده است. بر این اساس زمان در محدوده ۳ تا ۵ ساعت و غلظت ۹۵ تا۱۰۰ درصد خواص آنتی‌اکسیدان خوبی را نشان می‌دهد. نمودارهای سه بعدی حاصل از این آزمایش از نوع نمودارهای حداکثر است و می‌تواند میزان حداکثر پاسخ را در محدوده مورد نظر نشان دهد. همان‌طور که در شکل‌ها نشان داده شده است اگر مقادیر متغیرهای انتخابی در محدوده بهینه باشد خواص آنتی‌اکسیدان عصاره استخراجی تا زمانی که ترکیب غلظت، دما و زمان به مقدار تولید حداکثر باشد افزایش می‌یابد. اما اگر شرایط انتخاب شده خارج از این محدوده باشد خواص آنتی‌اکسیدان عصاره نمی‌تواند به حداکثر برسد و سطح آن پایین‌تر از مقادیر حداکثر حاصل از محدوده بهینه خواهد بود. این موضوع تایید می‌کند که غلظت، دما و زمان استفاده شده بر روی خواص آنتی‌اکسیدان تاثیر دارد. افزایش غلظت حلال بیش از ۸۰ درصد هم‌چنین زمان و دما در رنج بهینه باعث شده میزان خواص آنتی‌اکسیدان بالاتری نشان داده شود.

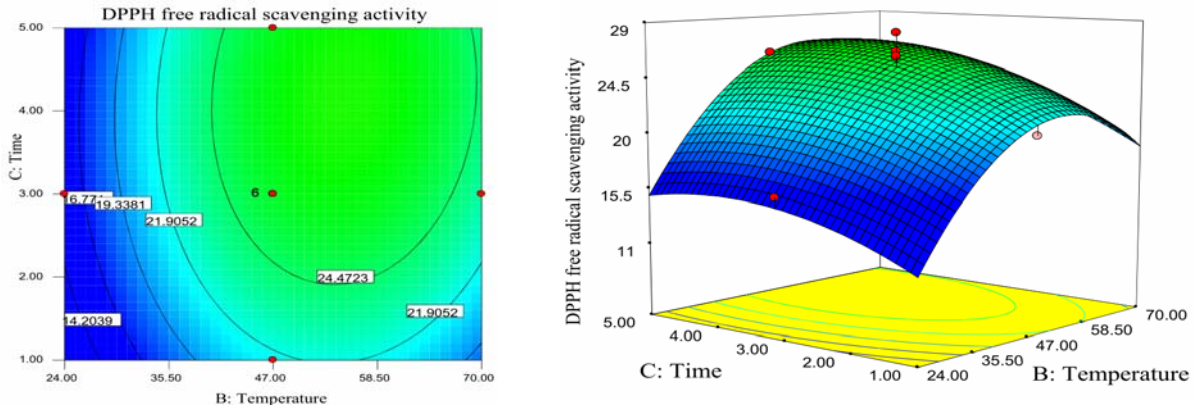

Fig 1 The 3D response surface and 2D contour plots of DPPH free radical scavenging activity (%) of *Sargassum glaucescens* extract affected by temperature (X_2, °C), time (X_3, h)

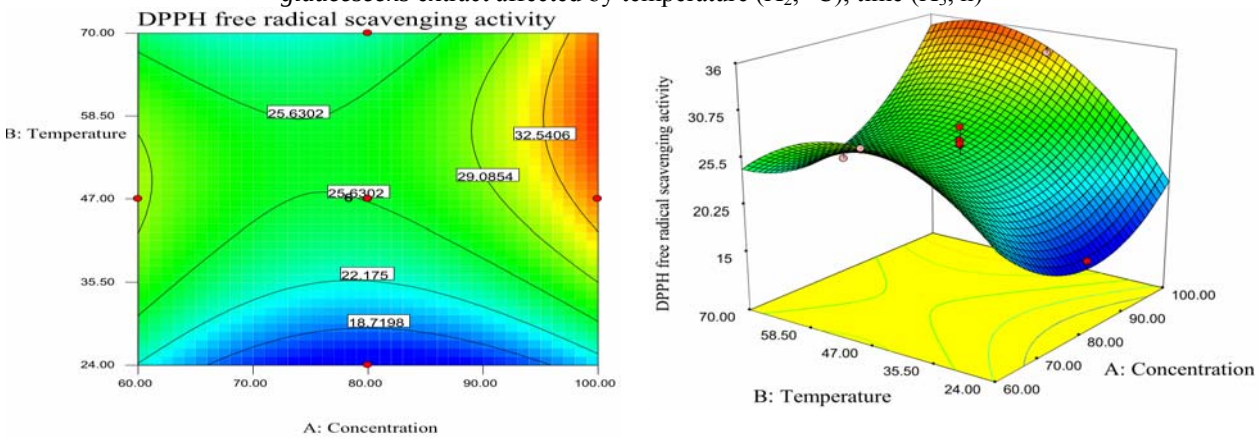

Fig 2 The 3D response surface and 2D contour plots of DPPH free radical scavenging activity (%) of *Sargassum glaucescens* extract affected by temperature (X_2, °C), and solvent concentration (X_1, %)

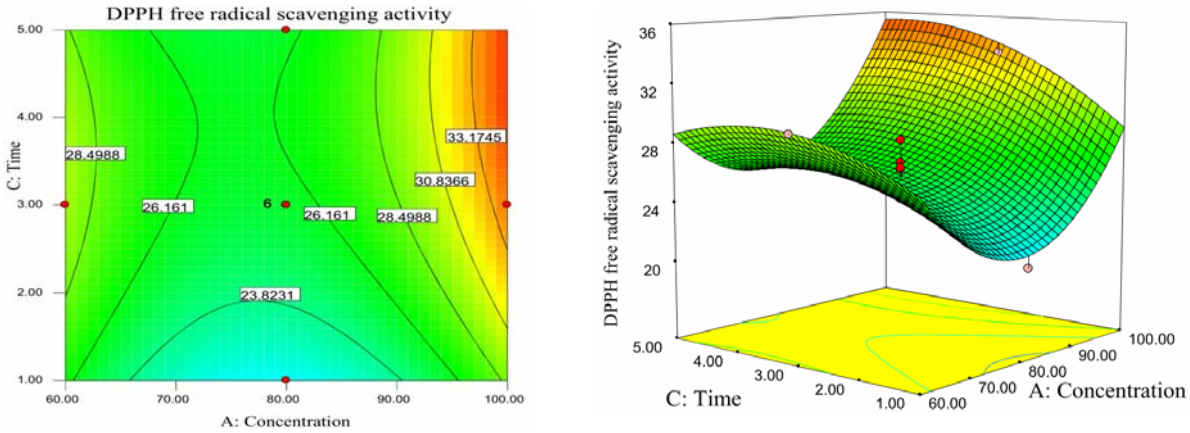

Fig 3 The 3D response surface and 2D contour plots of DPPH free radical scavenging activity (%) of *Sargassum glaucescens* extract affected by time (X_3, h) and and solvent concentration (X_1, %)

۳-۶- تعبیر نمودارهای باقیمانده

پلات احتمال نرمال در شکل ٤ آورده شده نشان می‌دهد که پراکنش مقادیر باقی‌مانده که تفاوت بین میزان عددی پیش‌بینی و مقدار تجربی است خط مستقیمی را تشکیل داده و مقادیر باقی‌مانده به شکل نرمال در دو سمت این خط پراکنده شده‌اند. این نمودار نشان می‌دهد که نقطه مورد آزمایش به شکل معقول با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل هم راستا است. چون آزمایش مدل تعیین شده برای اطمینان از تطابق کافی با سامانه تجربی لازم می‌باشد که در تجزیه بعدی هر کدام از مقادیر تجربی برای میزان استخراج عصاره با خواص آنتی‌اکسیدان بالا با مقادیر پیش‌بینی شده مقایسه شده است. در این پلات (شکل ٤) سطح قابل قبولی را نشان می‌دهد. تمام این نتایج بیان می‌کند که مدل حاصل، توانایی خوبی برای پیش‌بینی استخراج عصاره با خواص آنتی‌اکسیدان بالا تحت شرایط آزمایش برخوردار است. با بکارگیری روش آماری سطح پاسخ، معادله اخیر که نشان دهنده ارتباط تجربی متغیرهای آزمایش و درصد راندمان به صورت کدگذاری شده است، به دست آمده:

فاکتورهای واقعی

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH =

$(+۱۰٤/۲۳٤٤٥)+(-۲/۷۲۷۵۳)A+(+۰/۷۸۰۵۸)B+(۱/۲۸۳۱۳)C+(+٦/۱۹٥٦٥)AB+(۰/۲۸۱۲٥)AC+(۰/۰۱۱٤۱۳)BC+(۰/۰۱٥٤۰۹)A^2+(-۰/۰۱۲۰۷۳)B^2+(-۰/٤۹٦٥۹)C^2$

فاکتورهای کد شده

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH =

$(+۲٥/۷۰)+(+۲/۲۷)A+(+٤/۰٤)B+(+۲/۱۸)C+(+۲/۸٥)AB+(+۱/۱۳)AC+(+۰/٥۳)BC+(+٦/۱٦)A^2+(-٦/۳۹)B^2+(-۱/۹۹)C^2$

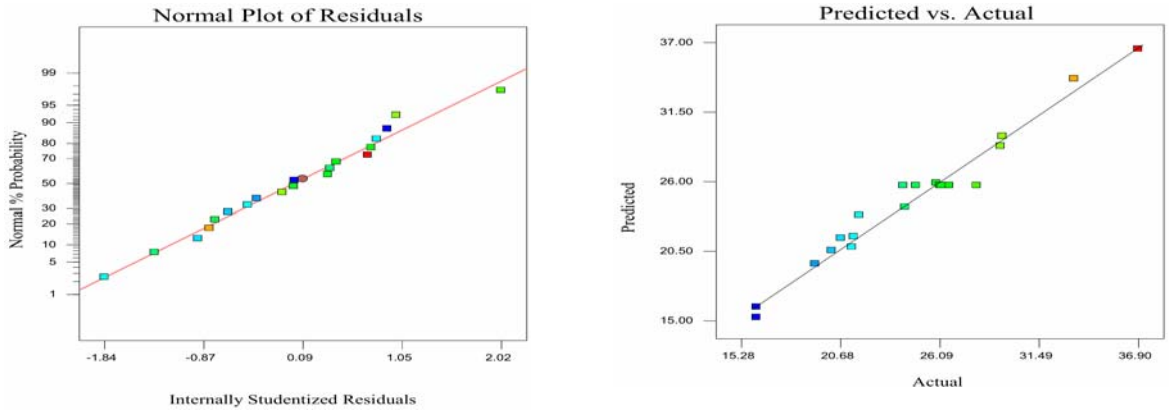

Fig 4 Normal plot of residuals and Relationship between the observed and predicted values

۳-۷- بهینه‌سازی و اعتبار سنجی مدل

در روند بهینه‌سازی میزان مصرف حلال حداقل و میزان استخراج عصاره حداکثر در نظر گرفته شد. هم‌چنین دما و زمان استخراج در محدوده تعریف شده در نظر گرفته شد تا بر این اساس بهینه‌سازی فاکتورهای تاثیر گذار انجام شود. مدل پاسخ سطحی نیز به خوبی توانست تغییرات خواص آنتی اکسیدانی را پیش بینی کند. نسبت سیگنال به اختلال[2] باید در مدل‌های پاسخ سطحی بالاتر از ٤ باشد [١٦]. این مقدار برای استخراج عصاره جلبک ٢٣/٦٩٨ بود و مدل از این نظر کارایی داشت. آزمایش عدم برازش در مدل‌ها معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$) و این نشان می‌دهد که مدل از برازش خوبی بر اساس داده‌های بدست آمده برخوردار است. عدم برازش، خطای باقیمانده را نسبت به خطای محض بررسی می‌کند (جدول ٤). در روند بهینه‌سازی میزان مصرف حلال حداقل و میزان استخراج عصاره حداکثر در نظر گرفته شد. هم‌چنین دما و زمان استخراج در محدوده تعریف شده در نظر گرفته شد تا بر این اساس بهینه‌سازی فاکتورهای تاثیر گذار انجام شود.

نتایج فرآیند بهینه‌سازی، نشان داد: شرایط بهینه استخراج عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens* با فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH ٣٦/٩٣٣٤ درصد: شامل غلظت ٩٩/٣٩ درصد، دمای ٥٧/٦٦ درجه سانتی‌گراد و زمان ٤/٣٢ ساعت می‌باشد. در نقطه بهینه بدست آزمایش با ٣ تکرار انجام شد و عصاره بدست آمده فعالیت حذف رادیکال آزاد ٠/١٢ ± ٣٦/٨٨ درصد را نشان داد که تاییدی بر اعتبار سنجی مدل بود.

۳-۸- مطالعه مقایسه ای نتایج

برخی از جلبک‌ها دارای خواص ضدباکتری، ضدقارچ، ضدویروسی و فعالیت های ضدتومور به طور گسترده توسط محققان زیادی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [١٧]. در مطالعه حاضر عصاره جلبک سارگاسوم فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی از خود نشان داد. در مطالعه ای چهار نوع جلبک دریایی به نام های نوری (*Porphyra* sp.) ، کومبو (*Laminaria* sp.) ، واکامه (*Undaria* sp.) و هیجی کی (*Hijikia* sp.) که با آب و اتانول عصاره‌گیری شدند مطالعه شد. عصاره آبی کومبو بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدان را در مقایسه با گونه‌های دیگر نشان داد (٦٣ درصد). کومبو، نوری و هیجی کی وقتی با آب عصاره‌گیری شدند فعالیت حذف رادیکال آزاد بالاتری نسبت به واکامه داشتند. واکامه وقتی که با اتانول ٥٨ درصد عصاره‌گیری شد بالاترین میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد را نشان داد. نتایج نشان داد که جلبک‌های دریایی درجات مختلفی از خواص آنتی‌اکسیدان را دارند [١٨].

در مطالعه حاضر برای استخراج عصاره جلبک از سه غلظت حلال (٦٠، ٨٠ و ١٠٠درصد)، سه زمان (١، ٣ و ٥ ساعت) و سه دما (٢٤، ٤٧ و ٧٠ درجه سانتی گراد) استفاده شد که نتایج نشان داد استخراج عصاره جلبک در غلظت ١٠٠ درصد، زمان ٥ ساعت و دمای ٧٠ درجه سانتی گراد خواص آنتی اکسیدانی بالاتر داشت. در مطالعه Balavigneswaran و همکاران در سال ٢٠١٣، روی بهینه سازی شرایط استخراج پلی ساکارید از جلبک دریایی *Isocrysis galbana* با استفاده از طرح آزمایشی بوکس بنکن کار شد. آنها زمان ٣/٥ ساعت، دمای ٦٥ درجه سانتی گراد و نسبت آب به مواد خام ١٠ درصد را با بازده ٩/٩٨ درصد گزارش نمودند. پلی ساکارید استخراجی در غلظت ٢٠ میلی گرم در میلی لیتر فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH حدود ٨٠درصد را نشان داد [٩]. در مطالعه Shannon و Abu-Ghannam در سال ٢٠١٧ روی بهینه سازی شرایط استخراج فوکوزانتین از جلبک دریایی *Fucus vesiculosus* کار شد. آنها شرایط بهینه دمای ٣٠ درجه سانتی گراد، زمان ٣٦/٥ دقیقه، پی اچ ٥/٧ و غلظت حلال استون ٦٢/٢ درصد را گزارش نمودند. غلظت حلال بیشترین اثر را در مدل داشت [١٠]. در مطالعه Dang و همکاران در سال ٢٠١٧، روی بهینه سازی استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی جلبک دریایی *Hormosira banksia* کار شد. این محققین گزارش نمودند که دما و زمان استخراج اثر مستقیم روی فعالیت آنی اکسیدانی داشته است. آنها دمای ٣٠ درجه سانتی گراد، زمان ٦٠ دقیقه و قدرت اولتراسوند ٦٠ درصد را به عنوان شرایط بهینه گزارش نمودند [٨].

رادیکال آزاد DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است، به طور گسترده به عنوان یک ابزار برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدان مهار رادیکال آزاد مورد استفاده قرار می‌گیرد [١٩]. در مطالعات دیگر در روش مهار رادیکال آزاد DPPH بالاترین

2. signal to noise ratio.

فعالیت در عصاره متانولی مشاهده شد، در حالی‌که پروپانول، استون و عصاره‌های اتیل استات نیز اثر مهاری خوبی نشان داد. مهار رادیکال آزاد DPPH برای عصاره متانولی گونه *Enteromorpha compressa* ۱/۸۹±۰/۰۴میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. برای پروپانول ۲/۶۶±۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، استون ۲/۷۰±۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اتیل استات ۲/۸۵±۰/۰۵ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر و آب ۹/۲۵±۰/۰۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. در عصاره*Enteromorpha linza* فعالیت مهار رادیکال آزاد برای متانول ۳/۶۶±۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اتیل استات ۳/۷۱±۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، پروپانول ۴/۴۴±۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، استون ۴/۵۰±۰/۱۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و آب ۴/۷۴±۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتربود. عصاره‌های گونه *Enteromorpha tubulosa* فعالیتی در حد متوسط نشان دادند که از ۲/۹۱±۰/۰۵ تا ۴/۶۱±۰/۰۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و فعالیت مهاری به این صورت بود: متانول> استون> اتیل استات> پروپانول> آب. با این حال مشخص شد که فعالیت به دام انداختن رادیکال آزاد عصاره‌ی *Enteromorpha compressa* نسبت به دو گونه دیگر بیشتر بود. این محققین نتیجه گرفتند ارتباط خاصی بین فعالیت به دام انداختن رادیکال آزاد و فنل‌کل می‌باشد [۲۰].

در مطالعه حاضر میزان فنل کل برای عصاره جلبک دریایی *Sargassum glaucescens*در شرایط بهینه ۳/۲±۰/۵۶ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره بود. در رنج گسترده ای از جلبک ها منابع غنی از آنتی اکسیدان ها مثل فلوروتانین، توکوفرول، کاروتنوئیدها، اسید آسکوربیک، اسیدهای چرب و سایر ترکیبات می باشد [۲۱] . از آن جمله جلبک‌های دریایی قهوه‌ای و قرمز هتند که دارای منابع غنی از آنتی اکسیدان همانند فاکوزانتین در *Hijikia fusiformis* و فلوئورتانین‌ها در *Sargassum kjellamanianum* می‌باشند [۲۲-۲۳].

خواص آنتی‌اکسیدان جلبک فقط مربوط به یک ترکیب نیست و ممکن است چند ترکیب با هم روی خواص آنتی‌اکسیدان جلبک تاثیر داشته باشند. بسیاری از محققان خواص آنتی‌اکسیدان جلبک را به فنل‌ها نسبت داده اند. گروهی از پلی‌فنل‌ها مثل کاتچین (گالوکاتچین، اپی‌کاتچین و کاتچین‌گالات) فلاونول و فلاونول گلیسرول در عصاره متانولی جلبک‌های قهوه‌ای و قرمز نیز شناسایی شده‌اند. هم‌چنین جلبک‌ها حاوی چندین ماده شیمیایی با ارزش اقتصادی مثل ویتامین‌ها، کارتنوئیدها، پیکوبیلی پروتئین‌ها، پل یول‌ها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای چرب می‌باشند که دارای خواص ضدالتهاب، ضدسرطان، ضدقارچ، آنتی‌اکسیدان و مواد محرک ایمنی می‌باشد [۲۴].

مطالعات قبلی نقش ترکیبات فنلی در فعالیت های آنتی اکسیدانی بر اساس ارتباط مثبت بین گروه های هیدروکسیل فنولیک و فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH در چندین جلبک قهوه ای را نشان می دهد. این جلبک ها شامل *Fucus vesiculocus*، *Laminaria ochroleuca, Sargassum muticum*، *Bifurcaria bifurcata*، *Undaria pinnatifida* می باشد [۲۵-۲۶]. Charoensiddhi و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش نمودند که ارتباط کم بین ترکیبات فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره جلبک *Ecklonia radiate* ممکن است نشان دهد که فقط فلوروتانین مسئول خواص آنتی اکسیدان نیست و ترکیبات آلی دیگر می تواند این خاصیت را ایجاد کند [۲۷].

Martinsو همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که عصاره جلبک *Cryptonemia seminervis* خواص حذف رادیکال آزاد DPPH بسیار خوبی دارد اما ارتباط معنی داری با ترکیبات فنلی یافت نشد [۲۸]. در مطالعه Júnior و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی جلبک *Spatoglossum schroederi* نشان داده شد که مهم ترین مسئول خواص آنتی اکسیدان ترکیبات فلاوونوئید است [۲۹].

در مطالعه ای مشخص شد که فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره جلبک دریایی قهوه ای *Sargassum pallidum* به بخش فنولیک (فلوئورتانین‌ها) وابسته است [۲۳]. ترکیبات فنلی یک گروه از متابولیت‌های ثانویه اند که میزان و تنوع آن‌ها در حین رشد گیاهان تحت تاثیر ژنتیک، شرایط رشد، پرورش و فاکتورهای آب و هوایی است. دمای بالا و اشعه‌های خورشیدی زیاد در عرض‌های جغرافیایی پایین باعث می‌شود که گیاهان این مناطق برای مقابله با اشعه های ماورای بنفش و رادیکال های آزاد، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری تولید کنند [۳۰]. خلیج چابهار در عرض‌های جغرافیایی پایین قرار دارد و دارای تنوع گونه‌های جلبک می‌باشد. جلبک‌های دریایی نیز به عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی مورد توجه می‌باشند. شاید خواص آنتی

اکسیدان جلبک دریایی سارگاسوم در این تحقیق نیز به محتوای فنل آن وابسته است.

٤- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق بهینه سازی شرایط استخراج عصاره جلبک دریایی سارگاسوم با روش سطح پاسخ انجام شد. با توجه به نتایج، غلظت ۹۹/۳۹ درصد، دمای ۵۷/٦٦ درجه سانتی‌گراد و زمان٤/۳۲ ساعت به عنوان تیمار بهینه استخراج انتخاب شد. که به سبب آن فعالیت مهار رادیکال آزاد برابر با ۳٦/۹ درصد بود. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان گفت که جلبک قهوه‌ای سارگاسوم می تواند منبع مناسبی برای استخراج ترکیبات زیست فعال باشد و با توجه به فراوانی این گونه در سواحل خلیج چابهار و عدم استفاده از این منبع غنی، به نظر می‌رسد بهره‌برداری از این جلبک و سایر جلبک‌های خلیج چابهار مناسب و ضروری می‌باشد. البته سایر روش های استخراج و سایر حلال های آلی و آبی نیز باید مد نظر قرار گیرد.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشگاه دریانوری و علوم دریایی چابهار به جهت فراهم آوردن امکانات این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد و حمایت مادی و معنوی تشکر می نمایند.

٦- منابع

[1] Choe, E. and Min, D.B. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 8:345-358.

[2] Kahl, R. 1993. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung. 329-338.

[3] Miyashita, B.N. 2005. Lipid composition of *Padina tetratomatica* (Dictyotales, Pheophyta), a brown sea weed of the west coast of India. India Journal of Fisheries. 263-268.

[4] Becker, C.F., Guimarães, J.A., Mourão, P.A.S., and Verli, H. 2007. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 26:391-399.

[5] Huang, C. Y., Wu, S. J., Yang, W. N., Kuan, A. W. and Chen, C. Y. 2016. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. Food Chemistry. 197, 1121–1129.

[6] Hajimoniri, M., Ameri, M., and Kamyabi, S. 1391. Study the Algal Genetic pool of Iran and possibility of usage. Noor publication. [In Persian]

[7] Milani, A., Poorazarang, H., Vatankhah, Sh., and Vakilian, H. 1389. Optimization of Inulin extraction from potato by the RSM. Food Science and Technology. 6(3): 176-183. [in Persian]

[8] Dang, T. T., Vuong, Q. V., Schreider, M. J., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A. and Scarlett, C. J. 2017. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. Journal of Applied Phycology.

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

[10] Shannon, E. and Abu-Ghannam. N. 2017. Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology. Journal of Applied Phycology. 29, 1027–1036.

[11] Wan, P., Yang, X., Cai, B., Chen, H., Sun, H., Chen, D. and Pan, J. 2015. Ultrasonic Extraction of Polysaccharides from *Laminaria japonica* and Their Antioxidative and Glycosidase Inhibitory Activities. Journal of Ocean Univiversity of China (Oceanic and Coastal Sea Research). 14 (4), 651-662.

[12] Safari, P., Rezaei, M. and Shaviklo, A. R. 2015. The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian Gulf green algae (*Chaetomorpha* sp.) using response surface methodology. Journal

of Food Science and Technology. 52(5), 2974–2981.

[13] Hwang, P.A., Wu, C.H., Gau, S.Y., Chien. H.Y., 2010. Antioxidant and immune-stimulating activites of hot-water extract from *Sargassum hemiphyllum*. Journal of Marine Science and Technology.18:41-46.

[14] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 40:945-948.

[15] Meenakshi, S., Meenakshi, D., Gnanambigai, S.M., mozhi, T., Arumugam, M., and Balasubramanian, T. 2009. Total Flavanoid and in vitro Antioxidant Activity of Two Seaweeds of Rameshwaram Coast Global. Journal of Pharmacology. 3(2):59-62.

[16] Canettieri, E.V. 2007. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. Bioresource Technology. 98(2): 422-428.

[17] Justo, G.S. 2001. Effects of green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumour transplantation in mice. Immunopharm Immunotoxicol. 23:131-199.

[18] Ismail, A. and Hong, T.S. 2002. Antioxidant Activity of Selected Commercial sesweed. Mal J Nutr. 8(2): 167-177.

[19] Hu, F.L. 2004. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. Fitoterapia.75(1):14–23.

[20] Ganesan, K., Suresh Kumar K., Subba Rao P.V. 2010. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. Innovative Food Science and Emerging Technologies.12:73- 78.

[21] Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends in Food Sciences and Technology. 22, 315–326.

[22] Yan, X.J. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. Journal of Applied Physiology.8:201-203.

[23] Ye, H. Z. 2009. Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. European Food Research and Technology. 230:101-109.

[24] Hanna, H.E. 2008. Algal extracts improve antioxidant defence abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 7, 2812-2832.

[25] Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R. and Saura-Calixto, F. 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. Journal of Science Food and Agriculture. 81, 530–534.

[26] Le Lann, K., Jegou, C. and Stiger-Pouvreau, V. 2008. Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. Phycological Research. 56, 238–245.

[27] Charoensiddhi, S., Franco, C., Su, P. and Zhang, W. 2015. Improved antioxidant activities of brown seaweed *Ecklonia radiata* extracts prepared by microwave-assisted enzymatic extraction. Journal of Applied Phycology. 27, 2049–2058.

[28] Martins, C. D. L., Ramlov, F., Carneiro, N. P. N., Gestinari, L. M., dos Santos, B. F., Bento, L. M. and Horta, P. A. 2013. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. Journal of Applied Phycology. 25, 1179–1187.

[29] Júnior, S. Q., Carneiro, V. H. A., Fontenelle, T. P. C, de Sousa, C. L., Mesquita, J. X., de Brito, T. V. and Aragão, K. S. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extract and its fractions from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi*. Journal of Applied Phycology. 27, 2367–2376.

[30] Lopez, A., Rico, M., Rivero, A., and Suarez de Tangil, M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* alga extracts. Food Chemistry. 1104-1109.

In vitro optimization of the brown algae (*Sargassum glaucescens*) extract Antioxidant properties using Response Surface Methodology

Taheri, A. [1*], Nosrati, A. [2], Khajehamiri, Ch.[3]

1. Associate Professor, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University
2. MSc. of Fish Processing Technology, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University
3. Lecturer, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University

(Received: 2015/12/22 Accepted:2017/12/09)

Marine algae, *Sargassum glaucescens*, collecting from Chabahar coastal waters in order to investigate the antioxidant properties of the extract. Extraction was set at three levels of time (1, 3 and 5 hours), temperature (24, 47 and 70 °C) and solvent concentration (60, 80 and 100%). Antioxidant properties were measured by DPPH free radical scavenging method. In this research, prediction of the antioxidant properties of *Sargassum* algae was done using optimization through response surface methodology. Based on the results, the conditions of optimum extraction treatment were determined by the Method as: the concentration of %99.39, the temperature of 57.66^{o} C and 4.32 hours for the extraction time. In this method, the highest level of antioxidant properties was determined as % 36.9334. The amount of total phenolic content for the *Sargassum glaucescens* was 3.2±0.56 per mg of galic acid /g of extract. The results showed *Sargassum glaucescens* algae could be a good source for the extraction of antioxidant compounds.

Keywords: Antioxidant, Polyphenol, Chabahar Bay, Response Surface Method, *Sargassum* Sp.

* Corresponding Author E-Mail Address: taherienator@gmail.com