

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه گیلان

موضوع پایان نامه:

بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای
جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium*
خلیج فارس با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

نیلوفر آقاجانپور سورکوهی

استاد راهنما: دکتر آریا باباخانی لشکان

استاد مشاور: دکتر مهدی طبرسا

تیر ۱۳۹۸

گروه شیلات

گرایش فرآوری محصولات شیلاتی

مقدمه

❖ جلبک‌ها، گیاهان فتوسنتزکننده‌ای هستند که زیتوده اولیه در مناطق بین جزر و مدی را تشکیل می‌دهند و براساس رنگدانه به سه گروه عمده جلبک‌های قهوه‌ای، قرمز و سبز طبقه‌بندی می‌شوند (Miyashita *et al.*, 2013). این جلبک‌ها منبع بسیار خوبی از ترکیبات فعال زیستی مانند کاروتنوئید، فیبرهای غذایی، پروتئین، ویتامین‌ها (Holt, 2008)، ترکیبات فنولی (Onofrejova *et al.*, 2010)، پلی‌ساکاریدها (Wijesekara *et al.*, 2011)، اسیدهای چرب ضروری و مواد معدنی می‌باشند (Chandini *et al.*, 2008).

جلبک‌های قهوه‌ای

❖ جلبک‌های قهوه‌ای غالباً دریازی هستند. ریشه (تال) این جلبک‌های چندسلولی نسبتاً بزرگ و با چشم عادی دیده می‌شود. طول تال جلبک‌های قهوه‌ای گاهی تا ۷۰ متر نیز می‌رسد. در بعضی از جلبک‌های قهوه‌ای تال دارای کیسه‌ی هوایی است که موجب شناور شدن گیاه در سطح یا نزدیک سطح آب می‌شود (نصرالله زاده، ۱۳۹۳).

جلبک قهوه‌ای *Sargassum*

angustifolium

❖ جلبک قهوه‌ای سارگاسوم آنگوستیفولیوم (*S. angustifolium*) متعلق به خانواده سارگاسه‌آ (Sargassaceae) و از جمله جلبک‌های دریایی مهم خلیج فارس محسوب می‌شود (طولابی دزفولی و همکاران، ۱۳۹۵). جلبک‌های قهوه‌ای به دلیل داشتن مقدار زیادی رنگدانه‌های گزانتوفیل و فوکوزانتین، دارای رنگ قهوه‌ای می‌باشند (Dawczynski *et al.*, 2007).



جلبک *Sargassum*، این جلبک‌ها با توجه به رنگ قهوه‌ای یا سبز تیره و وجود کیسه‌های حاوی گاز مشخص می‌شوند (صادقی و همکاران، ۱۳۹۶)

ریخت شناسی

رنگ ظاهری آن‌ها عموماً قهوه‌ای یا سبز تیره بوده و شامل یک ناحیه قلاب مانند، یک بخش گوشواره‌ای و یک ساقه برگ‌ی شکل هستند. برخی گونه‌ها حاوی کیسه‌های شبیه به توت فرنگی مملو از گاز هستند که باعث می‌شود ساقه برگ‌ی شکل غوطه‌ور مانده و فرآیند فتوسنتز تسهیل شود. بسیاری از این جلبک‌ها دارای بافت زمخت سخت هستند که به همراه بدنه محکم و البته انعطاف‌پذیر باعث شده‌است تا در برابر جریان‌های سنگین آب مقاومت کنند (صادقی و همکاران، ۱۳۹۶).

محل انتشار

❖ گونه‌های بسیاری از این جنس در مناطق دریایی معتدل و استوایی پراکنده شده‌اند، جایی که در نقاط کم‌عمق و صخره‌های مرجانی اسکان گزیده‌اند. دریای سارگاسو واقع در اقیانوس اطلس براساس وجود بسیار زیادی از انواع جلبک‌های Sargassum نام‌گذاری شده‌است (Hogan and Michael, 2011).

رنگدانه‌ها

رنگدانه‌های جلبک‌ها به سه گروه عمده تقسیم‌بندی می‌شوند که شامل: کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و فیکوبیلی پروتئین‌ها می‌باشند. از این میان، کاروتنوئیدها بیش‌ترین پراکندگی را در طبیعت دارند و آنتی‌اکسیدان‌های قوی محسوب می‌گردند و مهم‌ترین آن‌ها بتاکاروتن، فوکوزانتین و توکوفرول می‌باشند (Chojnacka *et al.*, 2012).

۱- کاروتنوئیدها

کاروتنوئیدها بخشی از سیستم فتوسنتز هستند، عمدتاً در مراکز واکنش‌های فتوسنتز به عنوان رنگدانه‌های جانبی برای فرآیندهای جذب نور در طول فتوسنتز عمل می‌کنند (von Elbe and Schwartz, 1996; Zhang *et al.*, 1999).

۲- کلروفیل‌ها

کلروفیل‌ها رنگدانه‌های سبز محلول در چربی هستند که در تمام جلبک‌ها، گیاهان عالی‌تر یا سیانوباکتری‌هایی که فتوسنتز انجام می‌دهند، یافت می‌شوند (Kraan, 2013). مصرف غذاهای حاوی کلروفیل باعث پاک شدن جریان خون، از بین رفتن بوی بد دهان و بدن، بی‌اثر شدن مواد سرطان‌زا و جلوگیری از فساد دندان‌ها می‌شود (Landy *et al.*, 1995).

۳- فوکوزانتین

استخراج فوکوزانتین برای اولین بار از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای فوکوس، دیاتومه و لامیناریا در سال ۱۹۱۴ (Willstätter and Page, 1914) انجام شد. مقدار فوکوزانتین موجود در جلبک دریایی، در طول فصل و چرخه حیات متفاوت است (Haugan and Liaaen-Jensen, 1994). این رنگدانه به گروه اگزانتوفیل‌ها تعلق دارد و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (Yuan, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

✓ فوکوزانتین به منظور بررسی اثر بخشی آن در برابر بسیاری از بیماری‌ها مورد مطالعه بالینی قرار گرفته‌است. در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده‌است که این رنگدانه فعالیت ضد سرطان (Nakazawa *et al.*, 2009;)، دیابت نوع II (Oh *et al.*, 2016)، چاقی (Maeda *et al.*, 2007)، کلسترول (Jaswir *et al.*, 2013)، اختلالات التهابی (Beppu *et al.*, 2012)، آنژیوژنز تومور (Martin, 2015)، مالاریا (Briglia *et al.*, 2015)، فشار خون بالا (Sivagnanam *et al.*, 2015) دارد و به عنوان یک مهارکننده 1 β -secretase (پروتئین مسئول ایجاد بیماری آلزایمر) در بیماری آلزایمر عمل می‌کند (Jung *et al.*, 2016).

استخراج

روش حلالی معمولی‌ترین روش مورد استفاده در استخراج از نمونه‌های گیاهی به شمار می‌رود (Souza *et al.*, 2011). متغیرهای متعددی مانند مدت زمان استخراج، دما، نسبت جامد-مایع و نوع حلال می‌توانند فعالیت زیستی و عملکرد عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Yang *et al.*, 2010).

به‌کارگیری امواج اولتراسوند در استخراج عناصر کاربردی مواد غذایی، مواد مغذی و مکمل‌های غذایی با موفقیت مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌است (Dion, 2011; Shirsath *et al.*, 2012). امواج فراصوت، مراحل فرآیند استخراج ترکیبات گیاهی، یعنی تورم بافت به منظور جذب حلال و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها بهبود می‌بخشد و انتقال جرم را تسهیل و تسریع می‌کند (Vinatoru, 2001).

برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان کوتاه شده و عصاره گیاهی در طول دیواره سلولی انتشار می‌یابد. مشخصات گیاهی مثل میزان رطوبت، اندازه ذرات و نوع حلال مورد استفاده، به منظور به دست آوردن استخراج کارآمد و موثر مهم هستند. به‌علاوه فاکتورهای زیادی شامل فرکانس، فشار، دما و زمان، کارکرد امواج صوتی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Wang and Weller, 2006).

سوابق تحقیق

در زمینه تأثیر حلال در فرآیند استخراج رنگدانه‌های جلبک دریایی تحقیق کردند. هدف از این به دست آوردن یک حلال مناسب به منظور استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی است. این تحقیق با استفاده از طرح بلوک‌های تصادفی با سه تکرار و با دو فاکتور شامل نوع حلال (۴ سطح: استون، اتانول، پترولیوم بنزن و هگزان: پترولیوم بنزن) و جلبک‌های آبی (۳ سطح: قهوه ای، سبز و قرمز) انجام شد. نتایج نشان داد که حلال استون، مناسب‌ترین برای استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای است.

Warkoyo and Saati,
2011

در زمینه استخراج، تصفیه و مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی فوکوزانتین از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای به فعالیت پرداختند. آن‌ها ۵ جلبک قهوه‌ای مانند *Sargassum wightii*، *Sargassum longifolium*، *alicyfolium*، *Padina sp* و *Turbinaria sp* را برای استخراج و تصفیه فوکوزانتین انتخاب کردند. نتایج این آزمایش نشان داد از میان حلال‌های مختلف مورد استفاده استون ۹۰٪ به منظور استخراج کاروتنوئید، گزینه مناسبی است.

Sudhakar et al., 2013

به مقایسه روش‌های استخراج کاروتنوئیدهای انتخاب شده از ماکرو جلبک و ارزیابی تنوع فصلی/مکانی آن‌ها پرداختند. جلبک‌های مورد استفاده در این پژوهش *Fucus serratus* و *Laminaria digitata* بود. استخراج جامد-مایع (غوطه‌وری) بیش‌ترین بازده استخراج از جلبک *Fucus serratus* را داشت.

Heffernan et al., 2016

Shannon and Abu-
Ghannam, 2017

مطالعه‌ای در زمینه بهینه‌سازی استخراج فوکوزانتین از جلبک دریایی ایرلند با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. روش سطح پاسخ به منظور تعیین پارامترهای مطلوب برای استخراج فوکوزانتین از جلبک دریایی *Fucus vesiculosus* به عنوان یک گونه مدل استفاده شد. (CCD) طرح مرکب مرکزی با چهار متغیر استخراج: زمان (۳۰-۷۰ دقیقه)، دما (۳۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد)، pH حلال (۵-۹) و درصد استون (۳۰-۷۰ درصد) انجام شد.

صادقی و همکاران،
۱۳۹۶

مطالعه‌ای در خصوص تولید نانوکپسول‌های حاوی رنگدانه‌های جلبک دریایی *Sargassum sp* به روش خشک کردن انجمادی انجام دادند. در این تحقیق، شناسایی ترکیبات عصاره جلبک دریایی سارگاسوم (*Sargassum sp*) و اندازه‌گیری میزان ترکیبات کاروتنوئیدی، فنولی و فلاونوئیدی کل به روش اسپکتروفتومتری انجام شد.

Raguraman *et al.*,
2018

در زمینه استخراج فوکوزانتین توسط اولتراسوند از جلبک *Padina Tetrastromatica* فعالیت کردند. آن‌ها در این پژوهش سه فاکتور (غلظت حلال، دما و زمان) را در بهینه‌سازی شرایط استخراج مدنظر قرار دادند. در این مطالعه نسبت جامد-مایع ثابت و ۱:۱۰ و قدرت دستگاه اولتراسوند هم ۲۳۰ ولت بود. نتایج این بررسی نشان داد که بیش‌ترین میزان فوکوزانتین در اتانول ۸۰٪ و در مدت زمان ۳۰ دقیقه به دست آمد. هم‌چنین گزارش دادند که اتانول یک حلال عالی برای استخراج فوکوزانتین است.

در مجموع مطالعات انجام گرفته بر روی خواص رنگدانه‌ها در صنعت غذا و دارو نشان دهنده مناسب بودن این رنگدانه‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در پیشگیری از فساد اکسیداتیو مواد غذایی است. در خارج از ایران مطالعات بسیاری در زمینه استخراج و بهینه‌سازی شرایط به منظور حصول رنگدانه‌ها مخصوصاً کاروتنوئیدها و فوکوزانتین از جلبک‌های دریایی صورت گرفته‌است ولی متأسفانه در ایران تحقیقی در این زمینه انجام نشده‌است. جلبک‌های سارگاسوم که منبع غنی از کاروتنوئیدها و فوکوزانتین می‌باشند، به وفور در خلیج فارس وجود دارند. لذا در مطالعه حاضر سعی گردید تا از این شرایط استفاده بهینه نموده و قدم در راه بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای گذاشته شود.



اهداف

۱- بررسی اثر درصد اتانول به آب تا سطح ۱۰۰ درصد در استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای از جلبک *S. angustifolium*

۲- بررسی اثر نسبت جامد-مایع تا سطح ۱:۱۵، در استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای از جلبک *S. angustifolium*

۳- بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده از جلبک *S. angustifolium*

۴- کاهش هزینه‌های استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای از جلبک *S. angustifolium* با استفاده از روش سطح پاسخ

فرضیات

۱- حلال اتانول (۱۰۰ درصد) بیشترین ترکیبات رنگدانه‌ای را در روش‌های غوطه‌وری و فراصوت از جلبک *S. angustifolium* استخراج می‌کند.

۲- حلال اتانول بالاترین ترکیبات آنتی‌رادیکالی و آنتی‌اکسیدانی را در روش‌های غوطه‌وری و فراصوت از جلبک *S. angustifolium* استخراج خواهد نمود.

۳- با افزایش نسبت جامد-مایع تا سطح ۱:۱۵ در هر دو روش غوطه‌وری و فراصوت میزان استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای از جلبک *S. angustifolium* افزایش می‌یابد.

۴- RSM روش مؤثری برای تعیین تیمار بهینه می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه جلبک

نمونه های جلبک قهوه ای *S. angustifolium* به طور تازه از بندر بوشهر، اسکله جلالی، منطقه ریشهر (۸ کیلومتری جنوب شهر بوشهر) در نیمه دوم اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع آوری شدند.

در چند مرحله با آب دریا جهت حذف باقی مانده اپیفیت ها، شن، ماسه و نمک شست شو شده، دوباره با آب شیرین شست شو شد.

در آون (بهداد، شرکت تولیدی تجهیزات پزشکی) با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد (صادقی و همکاران، ۱۳۹۶).

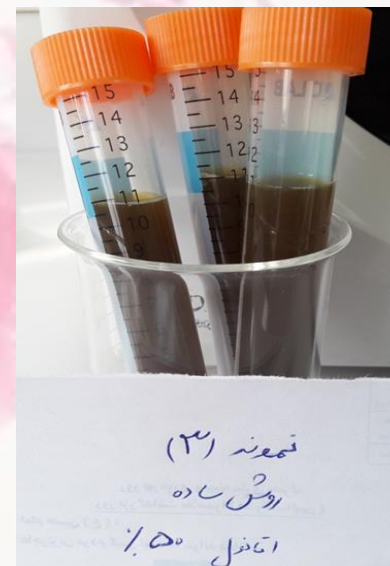
نمونه های خشک شده جلبک با استفاده از آسیاب برقی (هاردستون، مدل GCS2700W، ساخت انگلستان) پودر و با توری که اندازه منافذ آن $90\ \mu\text{m}$ بود، الک شدند.

استخراج به روش غوطه‌وری

استخراج رنگدانه از جلبک

تعداد ۲۰ آزمایش به منظور بهینه‌سازی شاخص‌های مورد بررسی به صورت تصادفی انجام شد. طرح Optimal (Custom)

استخراج با استفاده از حلال آب و اتانول (با ۵ غلظت ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد اتانول)، در ۳ مدت زمان استخراج (۲، ۴، ۶ ساعت) و ۳ نسبت جامد-مایع (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۵) انجام شد.



دمای استخراج در محدوده 50 ± 5 درجه سانتی‌گراد بود (Bouras *et al.*, 2015).

برای جداسازی جلبک پودر شده، مخلوط با کاغذ صافی (واتمن ۴۲)، صاف گردید. پس از ۳۰ دقیقه، عصاره زیر صافی، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.

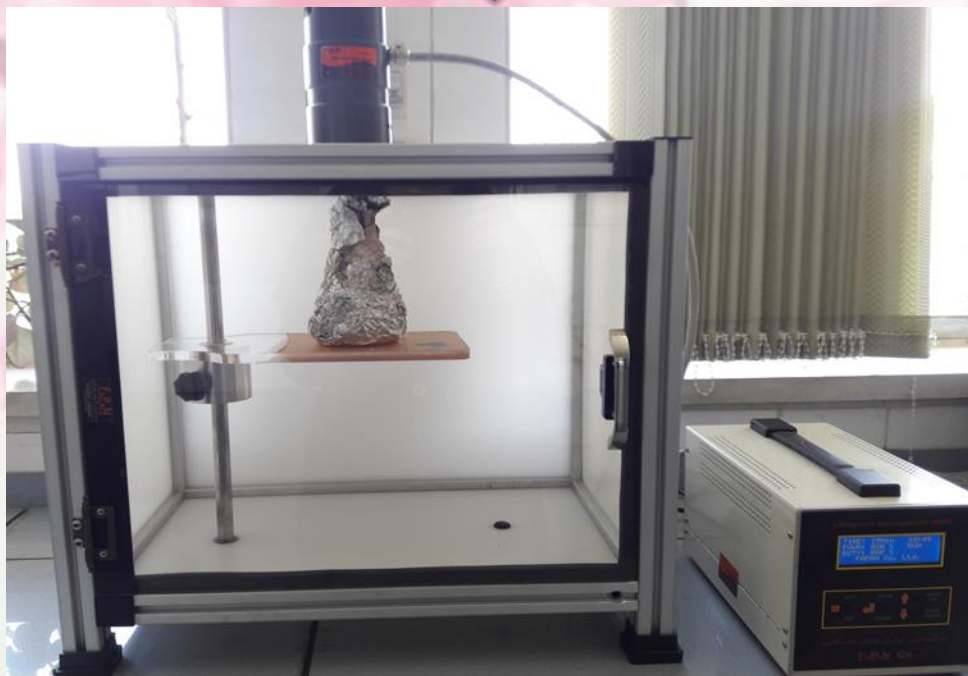


استخراج با استفاده از فراصوت

تعداد ۳۰ آزمایش به منظور بهینه‌سازی شاخص‌های مورد بررسی به صورت تصادفی انجام شد. طرح مرکب مرکزی (CCD)

استخراج با استفاده از حلال آب و اتانول (با ۳ غلظت ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد اتانول)، در ۳ مدت زمان استخراج (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، ۳ نسبت جامد-مایع (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۵) و در سه شدت (۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد) انجام شد.

در معرض امواج فراصوت با قدرت ۴۰۰ وات و فرکانس ثابت ۲۴ کیلوهرتز قرار گرفت.



برای جداسازی جلبک پودر شده، مخلوط با کاغذ صافی (واتمن ۴۲)، صاف گردید. پس از ۳۰ دقیقه، عصاره زیر صافی، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.



نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها در روش غوطه‌وری

سطح مربوطه					نماد ریاضی	متغیر مستقل
۰	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰	X_1	غلظت اتانول به آب (درصد)
	۲		۴	۶	X_2	زمان (ساعت)
	۱:۵		۱:۱۰	۱:۱۵	X_3	نسبت جامد به مایع (گرم/میلیلیتر)

نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها در روش استفاده از امواج فراصوت

سطح مربوطه					نماد ریاضی	متغیر مستقل
۵۰		۷۵		۱۰۰	X_1	غلظت اتانول به آب (درصد)
	۲		۴	۶	X_2	زمان (ساعت)
	۱:۵		۱:۱۰	۱:۱۵	X_3	نسبت جامد به مایع (گرم/میلیلیتر)
۱۰۰		۶۰		۲۰	X_4	شدت امواج (درصد)

آنالیز رنگدانه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئید)

طبق روش فخاری زواره و باقی پور توسط اسپکتروفتومتر (UV/Vis 2100) در طول موج های ۸۰۰-۳۵۰ نانومتر انجام شد.

فرمول‌ها

$$\text{Chl a (mg g}^{-1}\text{)} = [12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}) V] / (1000 \times W) \text{ (Amon, 1949)}$$

(۱-۲)

$$\text{Total Chl (mg g}^{-1}\text{)} = [20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663}) V] / (1000 \times W) \text{ (Amon, 1949)}$$

(فرمول ۲-۲)

$$\text{Carotenoids (mg g}^{-1}\text{)} = [7.6 (A_{480}) - 1.49 (A_{510}) V] / (1000 \times W)$$

(Jensen and Liaaen, 1959 and Duxbury and Yentsh, 1956)

$$\text{Fucoxanthin (mg g}^{-1}\text{)} = A_{470} - 1.239 (A_{631} + A_{581} - 0.3 \times A_{664}) - 0.0275 \times A_{664} / 141$$

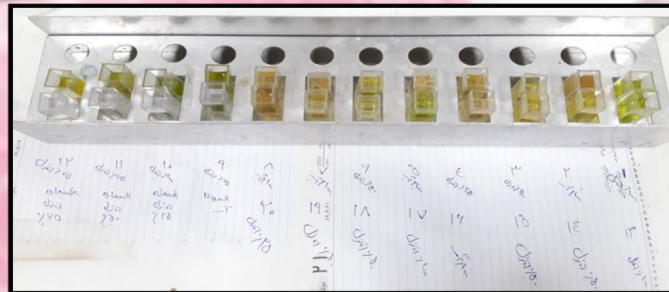
(Seely *et al.*, 1972)

A = میزان جذب در طول موج خاص

V = حجم کل عصاره به دست آمده

W = وزن نمونه مورد استفاده برای عصاره‌گیری

غلظت رنگدانه‌ها برحسب (mg/g ماده خشک / g رنگدانه mg) بیان شد.



ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

۱- طبق روش (Brand-Williams *et al.*, 1995)

۲- ۲ میلی لیتر از عصاره به ۲ میلی لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده

۳- ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد.

۴- جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد.

قدرت خنثی کنندگی رادیکال
آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل
(DPPH)

$$RSA\% = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] * 100$$

A_{sample} = جذب نمونه و محلول DPPH بعد از زمان مورد نظر

A_{control} = جذب محلول DPPH بدون نمونه

$A_{\text{sample blank}}$ = جذب نمونه بدون محلول DPPH

۱- طبق روش (Prieto *et al.*, 1999)

۲- ۲ میلی لیتر از عصاره با ۲ میلی لیتر محلول معرف مخلوط شده و در لوله‌های درب‌دار قرار داده شد. محلول معرف شامل ۰/۶ مولار اسید سولفوریک، ۲۸ میلی مولار سولفات سدیم و ۴ میلی مولار آمونیوم مولیبدات می‌باشد.

۴- لوله‌های شیشه‌ای درب‌دار به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آبی (دمای ۹۵ درجه سلسیوس) قرار داده شدند.

۵- پس از سرد شدن، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد.

۶- قدرت آنتی‌اکسیدانی کل برحسب میزان اکی‌والان اسید آسکوربیک (میلی گرم در گرم ماده خشک) بیان شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)

۱- براساس روش فولین سیوکالتو (Singleton and Rossi, 1965)

۲- مقدار یک دهم میلی لیتر از عصاره استخراج شده در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتر ریخته شد.

۳- مقدار نیم میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد به آن افزوده و مخلوط شد.

۴- یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۲ درصد اشباع افزوده و با آب مقطر به حجم رسانده شد.

۵- پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شدند.

۶- داده‌ها براساس میلی گرم گالیک اسید بر صد گرم ماده خشک گزارش شدند.

تعیین میزان فنول کل (TPC)

نتایج و بحث

جدول ۳-۱- طراحی آزمایشی متغیرهای مستقل و پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین در روش غوطه‌وری

ردیف استاندارد	شماره آزمایش	فاکتور ۱ (درصد غلظت اتانول به آب)	فاکتور ۲ زمان (دقیقه)	فاکتور ۳ نسبت جامد به مایع (گرم/میلی لیتر)	پاسخ ۱ میزان کلروفیل a (a)	پاسخ ۲ میزان کلروفیل کل (a)	پاسخ ۳ میزان کاروتنوئید کل (a)	پاسخ ۴ میزان فوکوزانتین (a)
۱۳	۱	۱۰۰	۶	۱۰	۰/۰۶	۱/۸۱	۰/۷۳	۰/۵۸
۱	۲	۰	۲	۵	۰/۰۰	۰/۶۴	۰/۳۳	۰/۰۰
۱۲	۳	۵۰	۶	۱۰	۰/۰۰	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۱۳
۳	۴	۲۵	۴	۵	۰/۰۰	۰/۷۴	۰/۵۴	۰/۱۳
۱۵	۵	۰	۲	۱۵	۰/۰۰	۰/۱۴	۰/۱۲	۰/۰۵
۷	۶	۵۰	۲	۱۰	۰/۰۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۲
۲۰	۷	۰	۶	۱۵	۰/۰۰	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۰۸
۸	۸	۰	۴	۱۰	۰/۰۰	۰/۲۸	۰/۲۱	۰/۰۶
۱۱	۹	۷۵	۴	۱۰	۰/۰۳	۱/۰۸	۰/۷۰	۰/۵۸
۴	۱۰	۱۰۰	۴	۵	۰/۰۴	۵/۲۸	۲/۱۸	۱/۰۱
۱۰	۱۱	۷۵	۴	۱۰	۰/۰۳	۰/۹۵	۰/۵۷	۰/۴۹
۲	۱۲	۷۵	۲	۵	۰/۰۱	۱/۶۵	۱/۶۳	۰/۹۷
۱۴	۱۳	۱۰۰	۶	۱۰	۰/۰۶	۱/۸۴	۰/۷۶	۰/۶۰
۱۹	۱۴	۵۰	۴	۱۵	۰/۰۰	۰/۰۸	۰/۱۸	۰/۲۰
۱۸	۱۵	۵۰	۴	۱۵	۰/۰۰	۰/۱۲	۰/۲۳	۰/۲۲
۹	۱۶	۰	۴	۱۰	۰/۰۰	۰/۲۷	۰/۲۰	۰/۰۷
۱۷	۱۷	۱۰۰	۲	۱۵	۰/۰۵	۰/۶۷	۰/۲۸	۰/۳۲
۶	۱۸	۵۰	۲	۱۰	۰/۰۰	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۰۸
۱۶	۱۹	۵۰	۲	۱۵	۰/۰۰	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۱۳
۵	۲۰	۲۵	۶	۵	۰/۰۰	۰/۹۵	۰/۶۴	۰/۱۳

a همه داده‌ها برحسب میلی‌گرم رنگدانه / گرم پودر جلبک خشک شده

جدول ۳-۲- طراحی آزمایشی متغیرهای مستقل و پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین در روش فراصوت

ردیف استاندارد	شماره آزمایش	فاکتور ۱ (درصد غلظت اتانول به آب)	فاکتور ۲ (زمان (دقیقه))	فاکتور ۳ نسبت جامد به مایع (گرم/میلی لیتر)	فاکتور ۴ قدرت امواج فراصوت (وات)	پاسخ ۱ میزان کلروفیل a (a)	پاسخ ۲ میزان کلروفیل کل (a)	پاسخ ۳ میزان کاروتنوئید کل (a)	پاسخ ۴ میزان فوکوزانتین (a)
۱۴	۱	۵۰	۱۰	۱۵	۸۰	-۱۲۲	-۱۲۵	-۱۱۲	-۱۱۴
۵	۲	۵۰	۱۰	۱۵	۴۰۰	-۱۰۲	-۱۰۶	-۱۰۸	-۱۰۶
۱۳	۳	۵۰	۳۰	۱۵	۸۰	-۱۰۲	-۱۰۶	-۱۰۸	-۱۰۷
۷	۴	۷۵	۲۰	۱۰	۲۴۰	-۱۰۳	-۱۰۸	-۱۱۱	-۱۰۹
۲۶	۵	۷۵	۲۰	۱۰	۴۰۰	-۱۱۱	-۱۱۹	-۱۳۶	-۱۲۸
۲۴	۶	۷۵	۲۰	۱۵	۲۴۰	-۱۱۳	-۱۲۳	-۱۴۳	-۱۳۰
۲۲	۷	۱۰۰	۳۰	۵	۴۰۰	-۱۰۶	-۱۱۱	-۱۱۸	-۱۱۹
۱۲	۸	۷۵	۲۰	۱۰	۲۴۰	۱/۱۶۹	۱/۸۵	-۱۹۱	-۱۴۱
۳۰	۹	۷۵	۱۰	۱۰	۲۴۰	-۱۱۴	-۱۲۵	-۱۴۰	-۱۲۷
۱۹	۱۰	۷۵	۲۰	۱۰	۲۴۰	-۱۰۹	-۱۱۵	-۱۲۸	-۱۲۱
۲۵	۱۱	۱۰۰	۲۰	۱۰	۲۴۰	-۱۱۰	-۱۱۶	-۱۳۲	-۱۲۴
۱۸	۱۲	۷۵	۳۰	۱۰	۲۴۰	-۱۵۱	-۱۵۴	-۱۲۷	-۱۲۲
۲۰	۱۳	۱۰۰	۱۰	۵	۸۰	-۱۱۵	-۱۲۴	-۱۴۶	-۱۳۲
۲	۱۴	۷۵	۲۰	۱۰	۲۴۰	۱/۰۰۱	۱/۱۰	-۱۵۷	-۱۲۵
۲۷	۱۵	۷۵	۲۰	۱۰	۲۴۰	-۱۱۱	-۱۱۸	-۱۳۴	-۱۲۴
۲۸	۱۶	۱۰۰	۳۰	۵	۸۰	-۱۱۲	-۱۱۹	-۱۳۴	-۱۲۶
۴	۱۷	۱۰۰	۱۰	۵	۴۰۰	۱/۵۰	۱/۶۶	-۱۸۲	-۱۳۶
۱۰	۱۸	۵۰	۳۰	۵	۴۰۰	۱/۴۹	۱/۶۲	-۱۸۲	-۱۳۴
۱۱	۱۹	۱۰۰	۳۰	۱۵	۴۰۰	-۱۰۹	-۱۲۴	-۱۴۵	-۱۱۳
۱۶	۲۰	۷۵	۲۰	۱۰	۸۰	-۱۲۸	-۱۳۰	-۱۱۴	-۱۱۷
۲۳	۲۱	۱۰۰	۱۰	۱۵	۸۰	-۱۱۴	-۱۲۶	-۱۳۶	-۱۲۳
۶	۲۲	۵۰	۱۰	۵	۴۰۰	-۱۱۶	-۱۱۸	-۱۰۹	-۱۱۰
۹	۲۳	۵۰	۱۰	۵	۸۰	-۱۰۶	-۱۱۸	-۱۳۷	-۱۱۳
۱	۲۴	۷۵	۲۰	۵	۲۴۰	-۱۰۶	-۱۱۸	-۱۳۸	-۱۱۳
۲۱	۲۵	۵۰	۳۰	۱۵	۴۰۰	-۱۳۱	-۱۵۸	۱/۱۱	-۱۴۲
۱۵	۲۶	۱۰۰	۳۰	۱۵	۸۰	-۱۰۲	-۱۰۷	-۱۱۳	-۱۱۳
۸	۲۷	۵۰	۳۰	۵	۸۰	-۱۲۶	-۱۳۰	-۱۱۴	-۱۱۷
۳	۲۸	۵۰	۲۰	۱۰	۲۴۰	-۱۱۳	-۱۴۰	-۱۷۵	-۱۲۶
۱۷	۲۹	۷۵	۲۰	۱۰	۲۴۰	-۱۰۳	-۱۱۰	-۱۱۹	-۱۱۲
۲۹	۳۰	۵۰	۱۰	۱۵	۸۰	-۱۱۲	-۱۲۱	-۱۴۰	-۱۳۰

۳- آنالیز واریانس (ANOVA)

نتایج آنالیز واریانس مربوط به آنالیز رنگدانه برای متغیرهای مستقل در روش استخراج غوطه‌وری

پاسخها

فوکوزانتین	کاروتنوئید کل	کلروفیل کل	میزان کلروفیل a	ضرایب مدل
< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	X_1 (درصد غلظت اتانول به آب)
<u>< ۰/۰۰۰۱</u>	۰/۰۰	۰/۶۰	<u>۰/۰۰</u>	X_2 (زمان)
۰/۸۷	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۳۲	X_3 (نسبت جامد مایع)
۰/۶۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۵	X_1X_2
۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۴۵	۰/۱۶	X_1X_3
۰/۰۰	< ۰/۰۰۰۱	۰/۰۰	۰/۱۴	X_2X_3
<u>۰/۶۵</u>	<u>۰/۸۴</u>	<u>۰/۰۸</u>	<u>۰/۳۳</u>	X_1^2
-	۰/۰۰	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	X_2^2
-	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۵۶	X_3^2
-	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۶	مقادیر عدم برازش
۰/۰۰۲۲	۰/۰۱۱۸	۰/۰۲۳۸	۰/۰۰۷۷	ضرایب تبیین
۰/۸۹۸۷	۰/۹۷۷۹	۰/۹۸۷۷	۰/۹۷۷۷	ضرایب تطابق یافته
۰/۸۵۲۰	۰/۹۵۸۰	۰/۹۷۶۷	۰/۹۵۷۶	ضرایب پیشبینی شده
۰/۷۵۹۰	۰/۸۱۳۵	۰/۸۷۸۵	۰/۸۳۵۱	انحراف معیار
۰/۱۰۲۷	۰/۱۱۰۸	۰/۰۷۹۰	۰/۰۰۴۴	

نتایج آنالیز واریانس مربوط به آنالیز رنگدانه برای متغیرهای مستقل در روش استخراج فراصوت

پاسخها

فوکوزانتین	کاروتنوئید کل	کلروفیل کل	میزان کلروفیل a	ضرایب مدل
< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	X_1 (درصد غلظت اتانول به آب)
<u>< ۰/۰۰۰۱</u>	<u>< ۰/۰۰۰۱</u>	۰/۵۹	<u>۰/۰۴</u>	X_2 (زمان)
۰/۲۶	۰/۱۱	<u>۰/۰۲</u>	۰/۰۳	X_3 (نسبت جامد-مایع)
۰/۱۸	<u>۰/۰۰</u>	۰/۰۱	<u>۰/۰۱</u>	X_4 (قدرت امواج فراصوت)
۰/۷۰	۰/۲۹	<u>۰/۰۴</u>	۰/۱۱	X_1X_2
۰/۴۴	۰/۱۵	۰/۵۲	۰/۵۰	X_1X_3
۰/۰۷	۰/۹۵	<u>۰/۰۰</u>	<u>۰/۰۰</u>	X_1X_4
۰/۰۶	۰/۰۵	<u>۰/۰۱</u>	<u>۰/۰۰</u>	X_2X_3
۰/۴۹	<u>۰/۰۲</u>	۰/۳۴	۰/۱۵	X_2X_4
۰/۱۰	۰/۰۵	<u>۰/۰۴</u>	<u>۰/۰۲</u>	X_3X_4
<u>۰/۰۵</u>	۰/۰۷	۰/۶۸	۰/۷۸	X_1^2
<u>< ۰/۰۰۰۱</u>	<u>< ۰/۰۰۰۱</u>	۰/۱۶	۰/۲۱	X_2^2
۰/۷۶	۰/۳۸	۰/۱۸	۰/۳۷	X_3^2
۰/۶۳	۰/۵۹	<u>۰/۰۴</u>	<u>۰/۰۴</u>	X_4^2
۰/۷۸	۰/۵۰	۰/۰۹	۰/۲۰	مقادیر عدم برازش
۰/۱۲	۰/۳۰	۰/۷۵	۰/۶۵	ضرایب تبیین
۰/۹۶۴۷	۰/۹۹۰۷	۰/۹۹۰۳	۰/۹۹۵۸	ضرایب تطابق یافته
۰/۹۳۱۷	۰/۹۸۱۹	۰/۹۸۱۲	۰/۹۹۱۸	ضرایب پیشبینی شده
۰/۷۴۸۱	۰/۹۴۷۶	۰/۹۵۷۸	۰/۹۷۹۵	انحراف معیار
۰/۱۳۱۱	۰/۱۰۰۱	۰/۱۲۶۶	۰/۱۰۹۷	

اثبات مناسب بودن مدل

۱- ضرایب تبیین، مقادیری بالاتر از ۰/۸ فرض شده‌اند که بستگی به شرایط آزمایش‌ها و میزان کنترل فرآیند آزمایش‌ها دارد. ضرایب تبیین بالای ذکر شده برای هر پاسخ می‌تواند نشانه‌ای از توان و تناسب بالای مدل و نشان‌دهنده قابلیت پیش‌بینی پاسخ‌ها از طریق مدل باشد (Ballard *et al.*, 2010).

۲- مقادیر پایین انحراف معیار شاهدهی دیگر بر این معناست و تکرارپذیری مدل‌ها را نشان می‌دهد. ضمن این‌که نبود معنی‌داری مقادیر عدم برازش تأیید اعتبار مدل‌هاست (Wanasundara and Shahidi, 1996).

معادلات رگرسیون حاصل از آنالیز واریانس (ANOVA) در روش غوطه‌وری و اولتراسوند

معادلات مربوط به روش غوطه‌وری

$$(1-3) \text{ معادله } Y_{\text{Chl a}} = -0.011558 - 0.000723 X_1 + 0.004826 X_2 + 0.001979 X_3 + 0.000028 X_1 X_2 + 0.000013 X_1 X_3 - 0.000191 X_2 X_3 + 9.60729E-06 X_1^2 - 0.000306 X_2^2 - 0.000083 X_3^2$$

$$(2-3) \text{ معادله } \sqrt{Y_{\text{Total Chl}}} = +0.804713 - 0.001338 X_1 + 0.39947 X_2 - 0.169131 X_3 + 0.00027 X_1 X_2 - 0.000794 X_1 X_3 - 0.006477 X_2 X_3 + 0.000173 X_1^2 - 0.040187 X_2^2 + 0.007452 X_3^2$$

$$(3-3) \text{ معادله } Y_{\text{Total Cr}} = +0.722406 + 0.018903 X_1 + 0.349874 X_2 - 0.249241 X_3 - 0.000533 X_1 X_2 - 0.001654 X_1 X_3 + 0.000960 X_2 X_3 + 0.000086 X_1^2 - 0.043513 X_2^2 + 0.011580 X_3^2$$

$$(4-3) \text{ معادله } (Y_F)^{0.5} = -0.02081 + 0.014892 X_1 + 0.008962 X_2 + 0.008794 X_3 - 0.000465 X_1 X_2 - 0.000684 X_1 X_3 + 0.001997 X_2 X_3$$

معادلات مربوط به روش اولتراسوند

$$\text{(معادله ۲-۵)} \quad \ln(Y_{\text{Chl a}}) = -4.39419 + 0.037548 X_1 + 0.068565 X_2 - 0.178371 X_3 - 0.002487 X_4 - 0.000076 X_1 X_2 + 0.001099 X_1 X_3 + 0.000023 X_1 X_4 - 0.000824 X_2 X_3 - 0.000046 X_2 X_4 + 9.53364E-06 X_3 X_4 + 0.000142 X_1^2 - 0.000629 X_2^2 + 0.005990 X_3^2 + 3.55035E-06 X_4^2$$

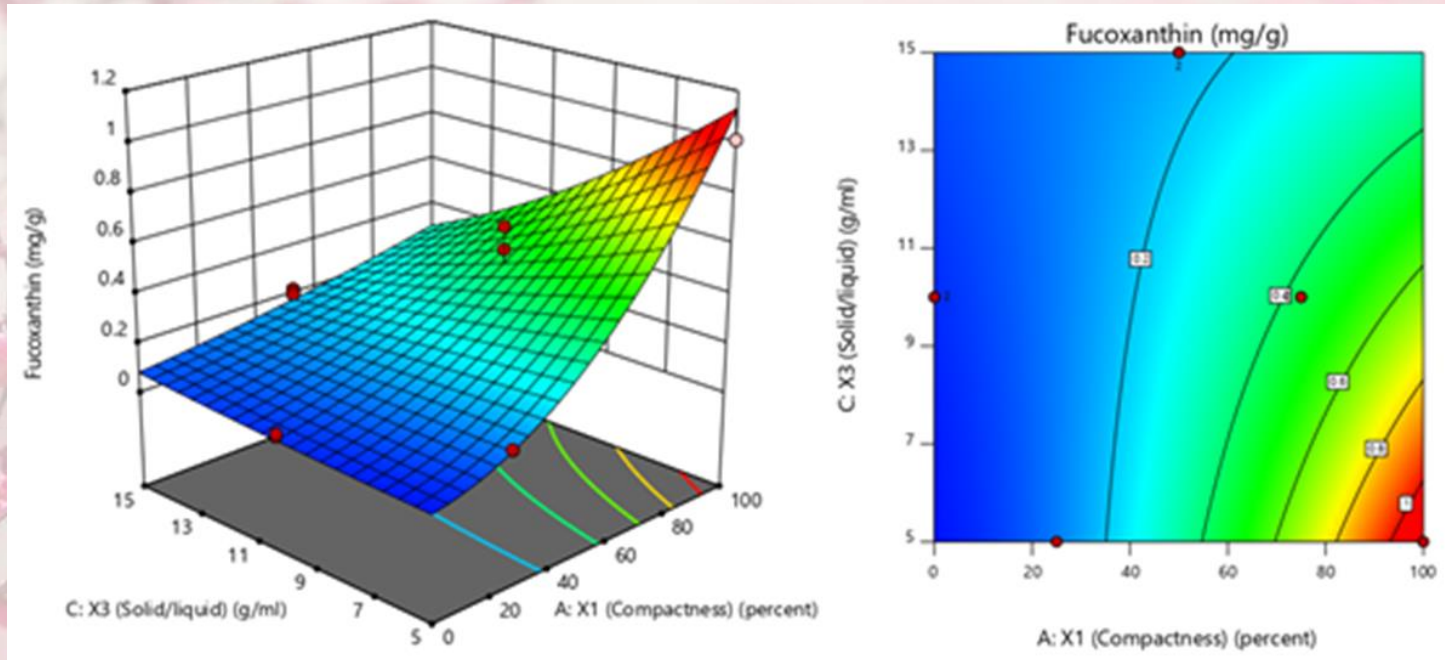
$$\text{(معادله ۲-۶)} \quad \ln(Y_{\text{Total Chl}}) = -1.98163 + 0.010616 X_1 + 0.085972 X_2 - 0.206715 X_3 - 0.003758 X_4 - 0.000084 X_1 X_2 - 0.001053 X_1 X_3 + 0.000025 X_1 X_4 - 0.000620 X_2 X_3 - 0.000044 X_2 X_4 + 0.000017 X_3 X_4 + 0.000186 X_1^2 - 0.001116 X_2^2 + 0.006899 X_3^2 + 5.53159E-06 X_4^2$$

$$\text{(معادله ۲-۷)} \quad 1/\sqrt{Y_{\text{Total Cr}}} = +5.09422 - 0.118566 X_1 - 0.046193 X_2 + 0.182470 X_3 + 0.001482 X_4 + 0.000153 X_1 X_2 + 0.000014 X_1 X_3 - 0.000013 X_1 X_4 - 0.001375 X_2 X_3 + 0.000033 X_2 X_4 - 0.000062 X_3 X_4 + 0.000746 X_1^2 + 0.000557 X_2^2 + 0.001367 X_3^2 - 1.69310E-06 X_4^2$$

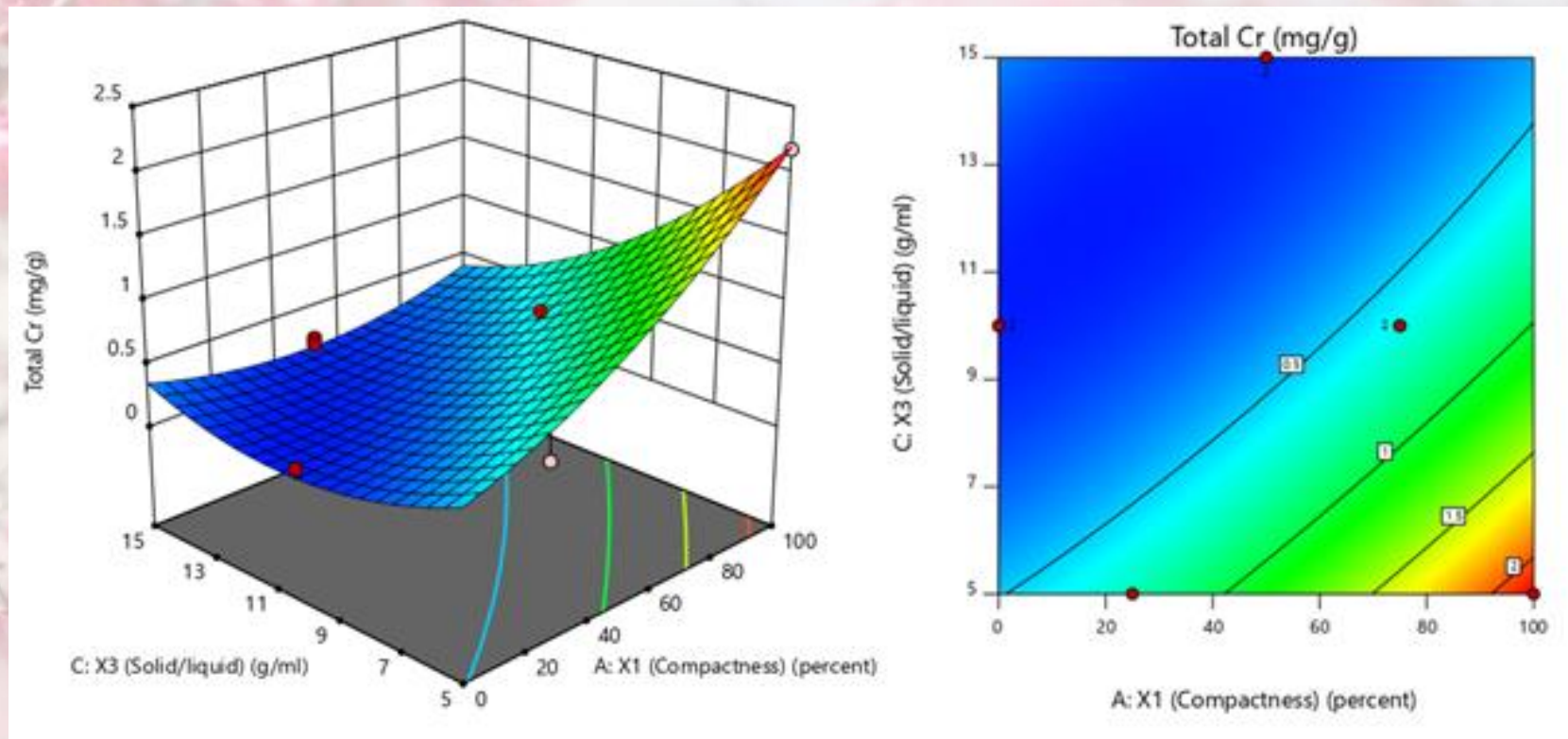
$$\text{(معادله ۲-۸)} \quad \ln(Y_F) = -6.61297 + 0.136537 X_1 + 0.040823 X_2 - 0.097696 X_3 - 0.000688 X_4 - 0.000103 X_1 X_2 - 0.000516 X_1 X_3 + 0.000017 X_1 X_4 + 0.000463 X_2 X_3 - 0.000036 X_2 X_4 + 0.000089 X_3 X_4 - 0.000805 X_1^2 - 0.000257 X_2^2 + 0.001621 X_3^2 - 9.16004E-07 X_4^2$$

تأثیر متغیرهای فرآیند در روش غوطه‌وری

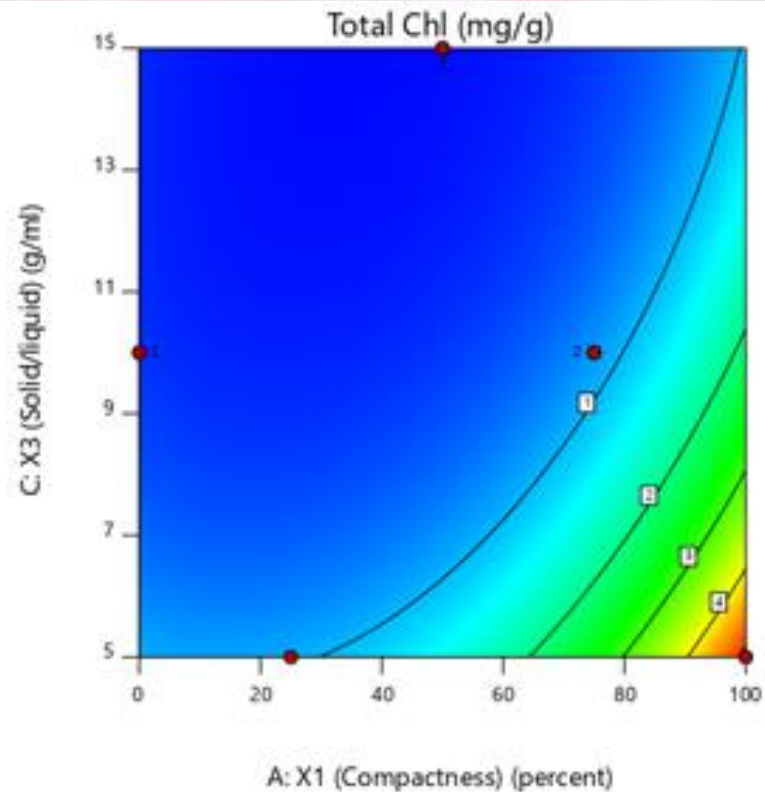
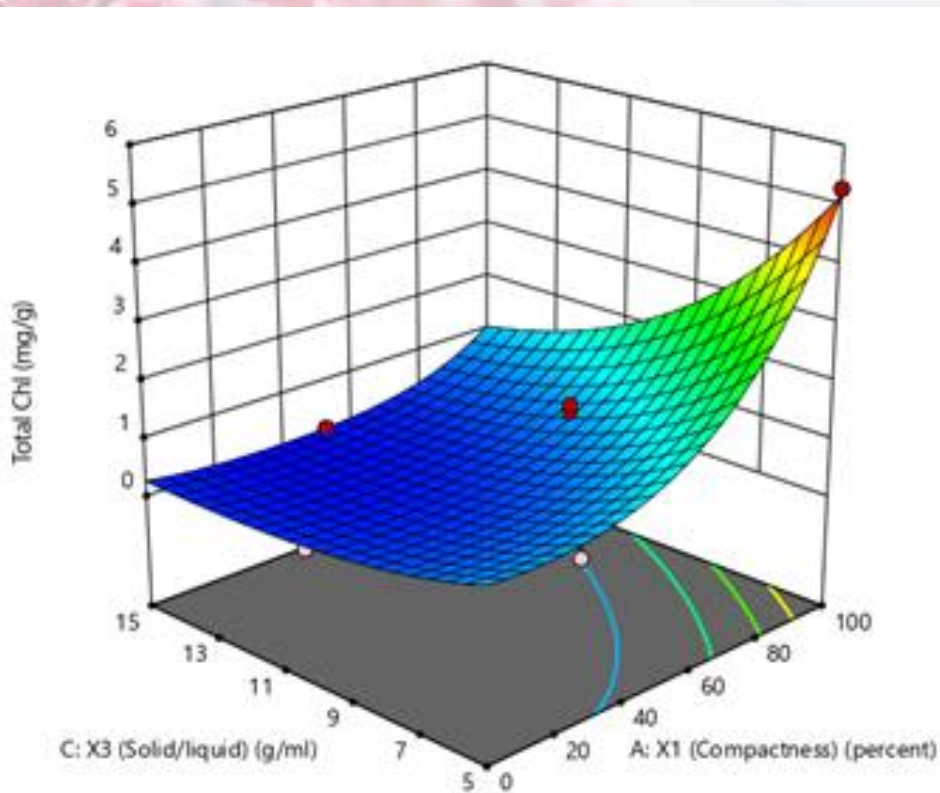
در نمودارهای زیر تأثیر شاخص‌های اولیه غلظت اتانول، زمان و نسبت جامد-مایع در میزان پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین نشان داده شده‌است.



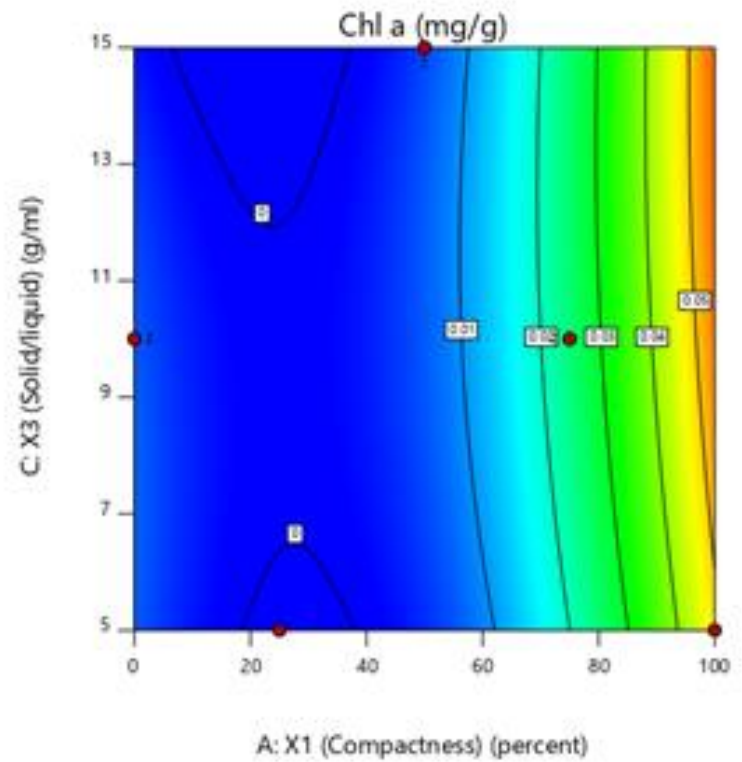
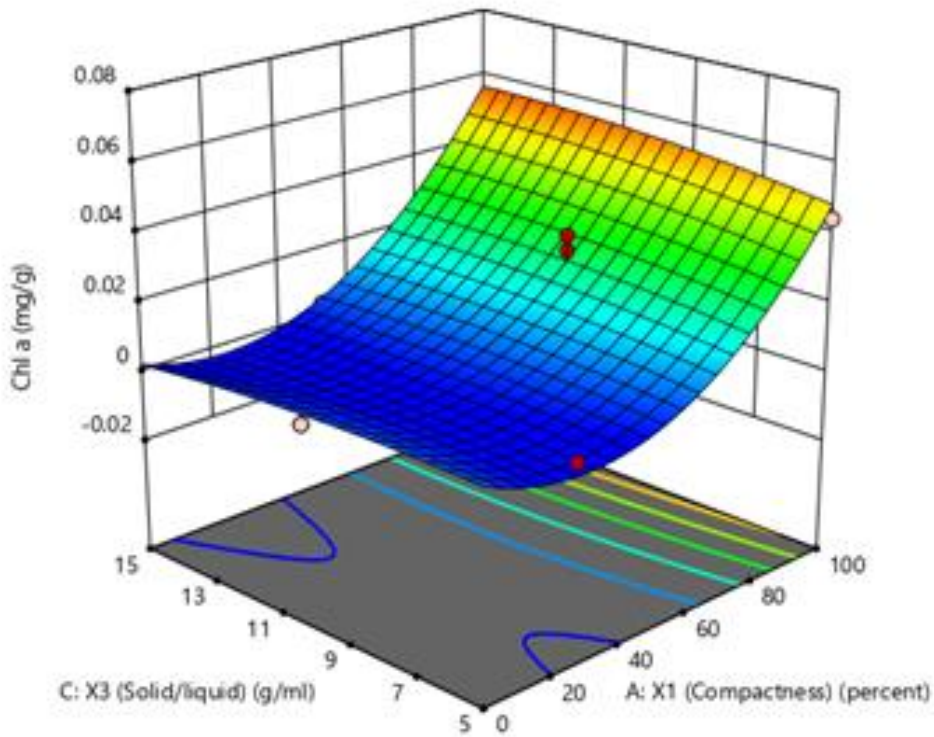
نمودار مربوط به فوکوزانتین، اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۴ ساعت نشان می‌دهد. طبق نمودار میزان فوکوزانتین با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع، افزایش می‌یابد.



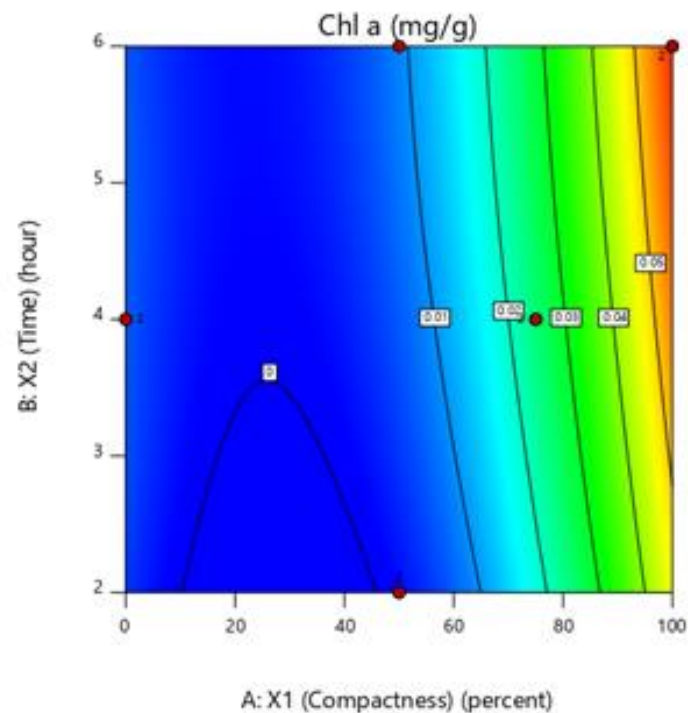
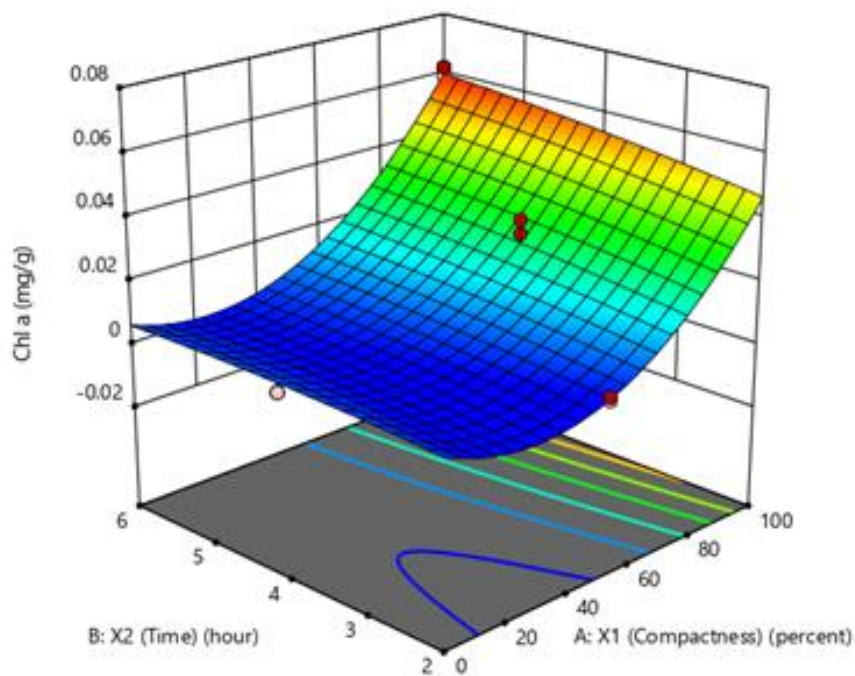
نمودار اثر همزمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۴ ساعت در میزان پاسخ کاروتنوئید کل نشان می‌دهد. با توجه به نمودار فوق با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع، میزان کاروتنوئید کل افزایش می‌یابد.



نمودار مربوط به کلروفیل کل، اثر همزمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۴ ساعت نشان می‌دهد. طبق نمودار با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع، میزان کلروفیل کل بیش‌تری به دست می‌آید.



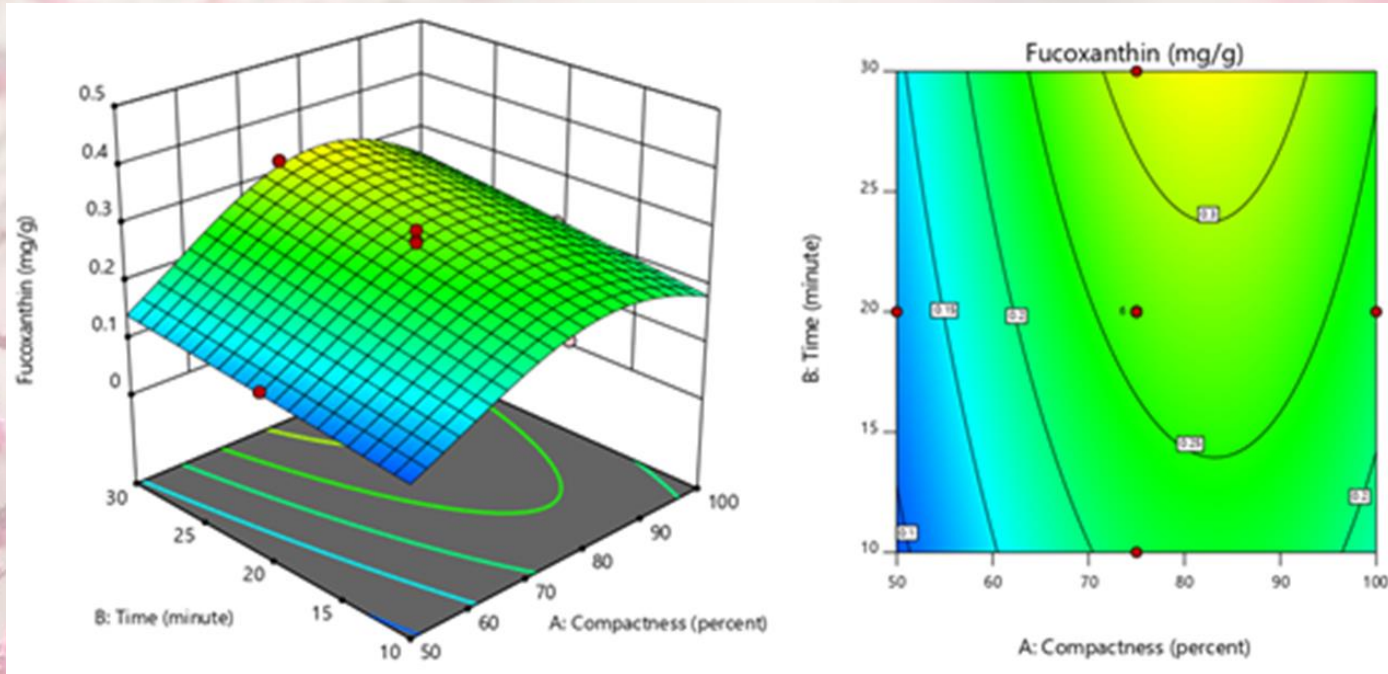
نمودار کلروفیل a، اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۴ ساعت نشان می‌دهد. طبق نمودار با افزایش دو فاکتور ذکر شده میزان پاسخ افزایش می‌یابد.



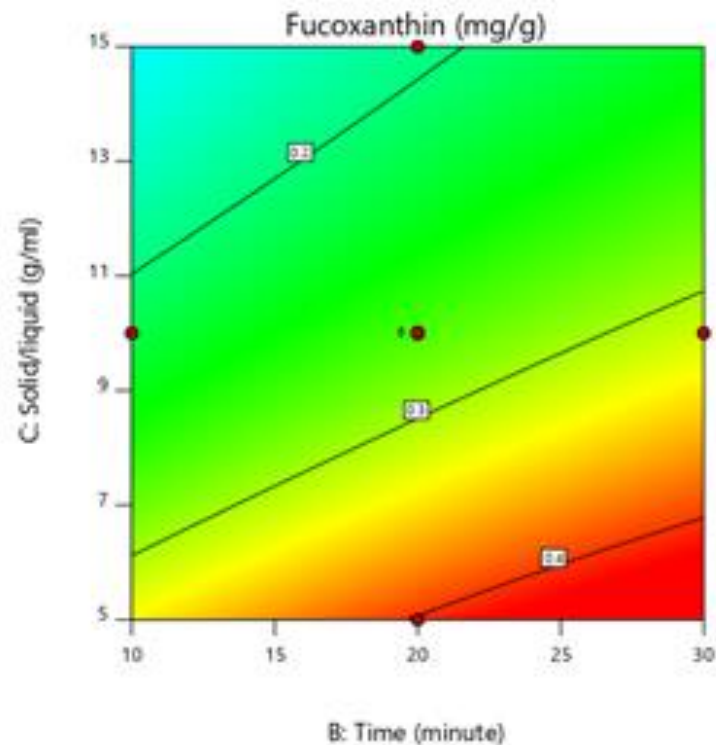
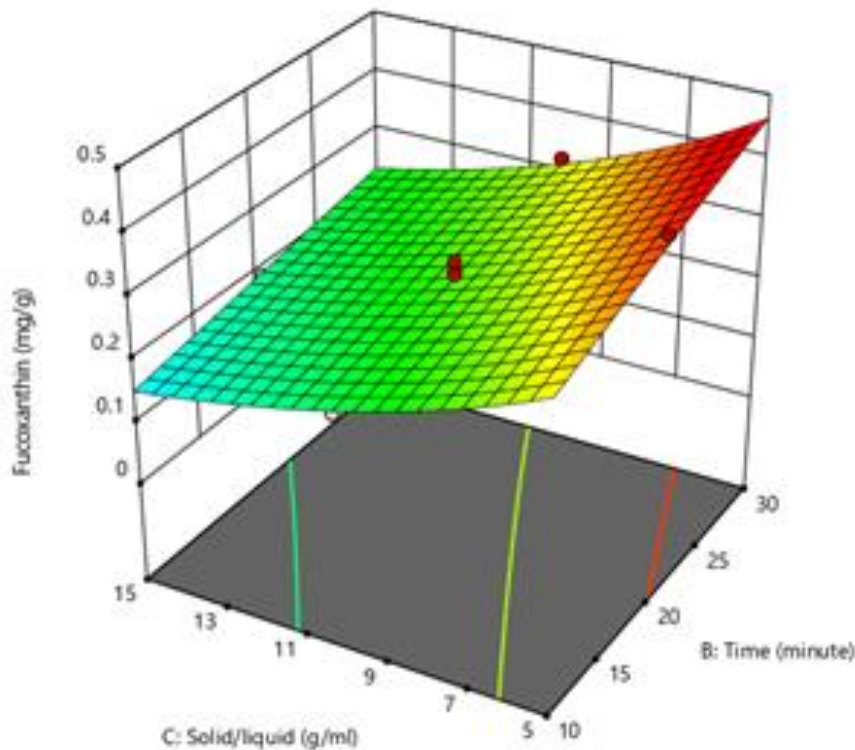
نمودار کلروفیل a، اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج را در نسبت ثابت جامد-مایع ۱:۱۰ نشان می‌دهد. طبق نمودار با افزایش دو فاکتور ذکر شده میزان پاسخ افزایش می‌یابد. براساس نمودارها بیش‌ترین میزان پاسخ در مقادیر بیش‌تر اتانول مشاهده شد.

تأثیر متغیرهای فرآیند در روش اولتراسوند

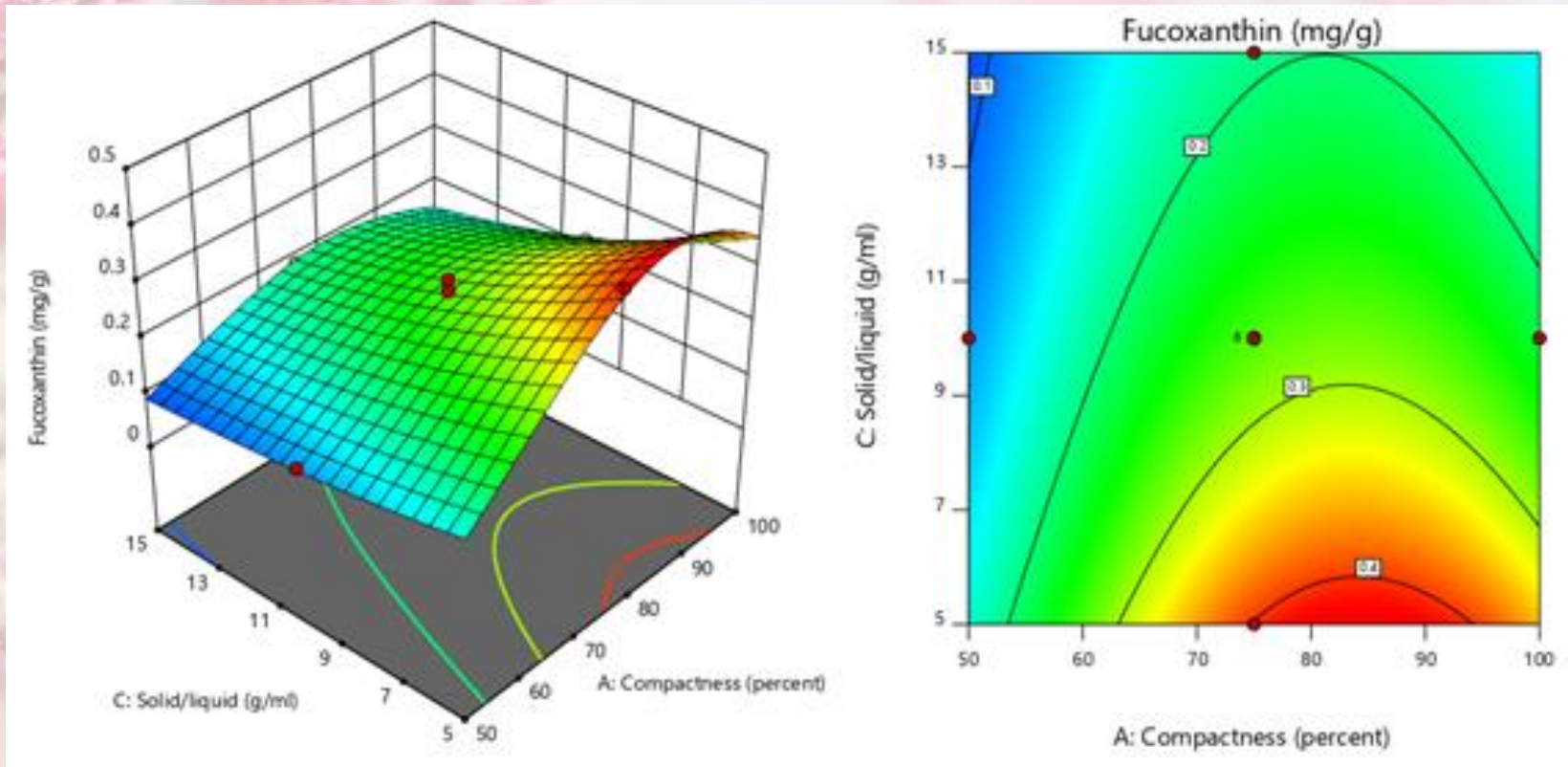
در نمودارهای زیر تأثیر شاخص‌های اولیه غلظت اتانول، زمان، نسبت جامد-مایع و قدرت امواج فراصوت در میزان پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین نشان داده شده است.



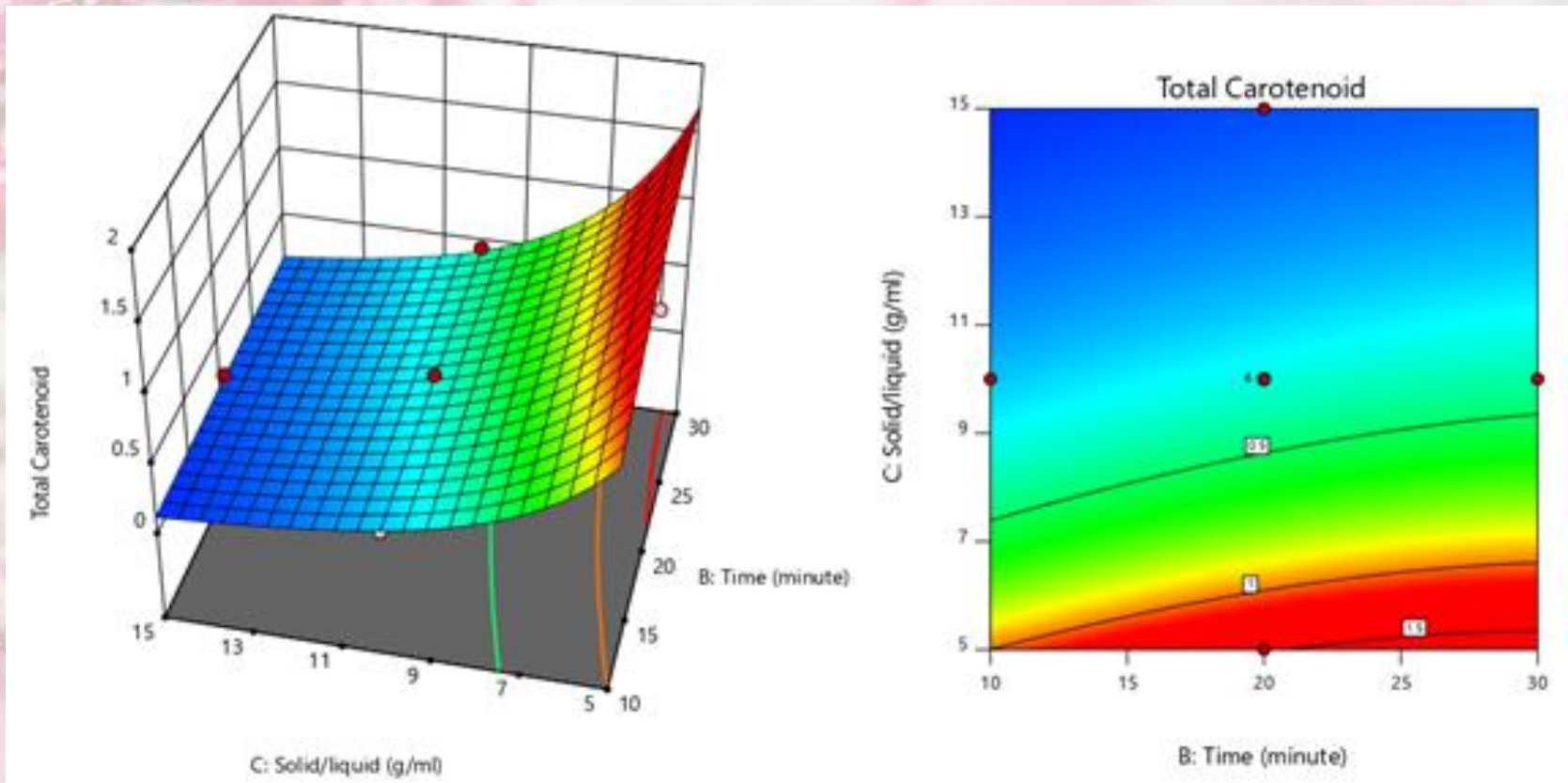
نمودار میزان فوکوزانتین، اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج را در نسبت ثابت جامد-مایع ۱:۱۰ و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. با توجه به نمودار فوق، با افزایش دو فاکتور مذکور میزان پاسخ افزایش می‌یابد. به طوری که طبق نمودار بیش-ترین میزان فوکوزانتین در محدوده ۷۵ تا ۹۵ درصد غلظت اتانول می‌باشد.



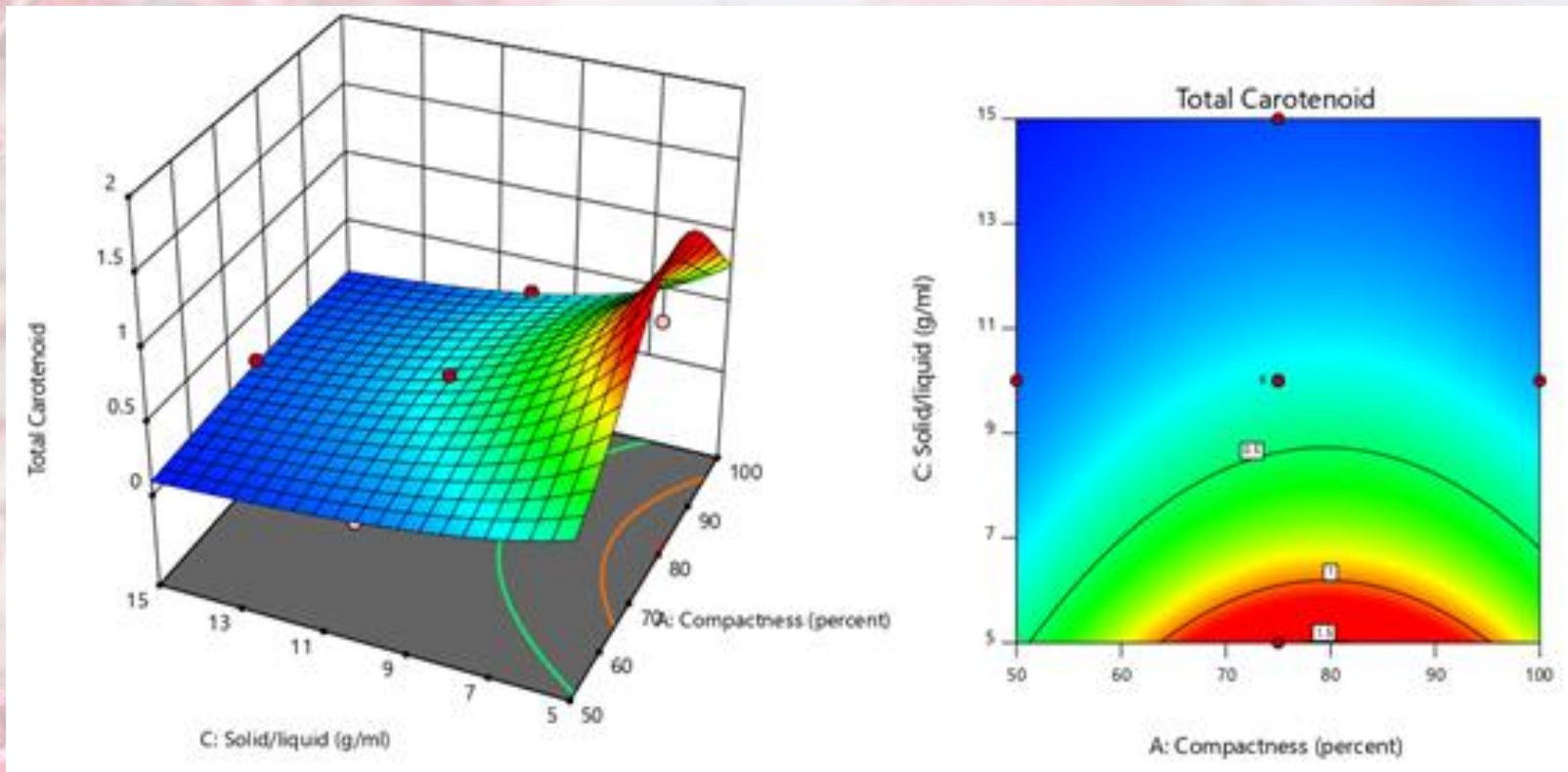
نمودار میزان فوکوزانتین، اثر همزمان مدت زمان استخراج و نسبت جامد-مایع را در غلظت ثابت اتانول ۷۵ درصد و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. با توجه به نمودار فوق، افزایش مدت زمان استخراج و کاهش نسبت جامد-مایع باعث افزایش میزان فوکوزانتین می‌شود.



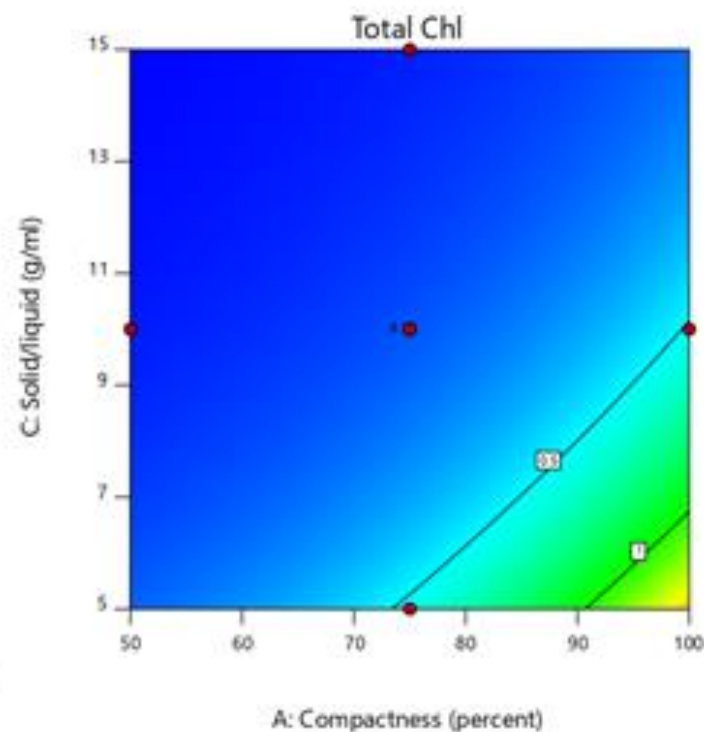
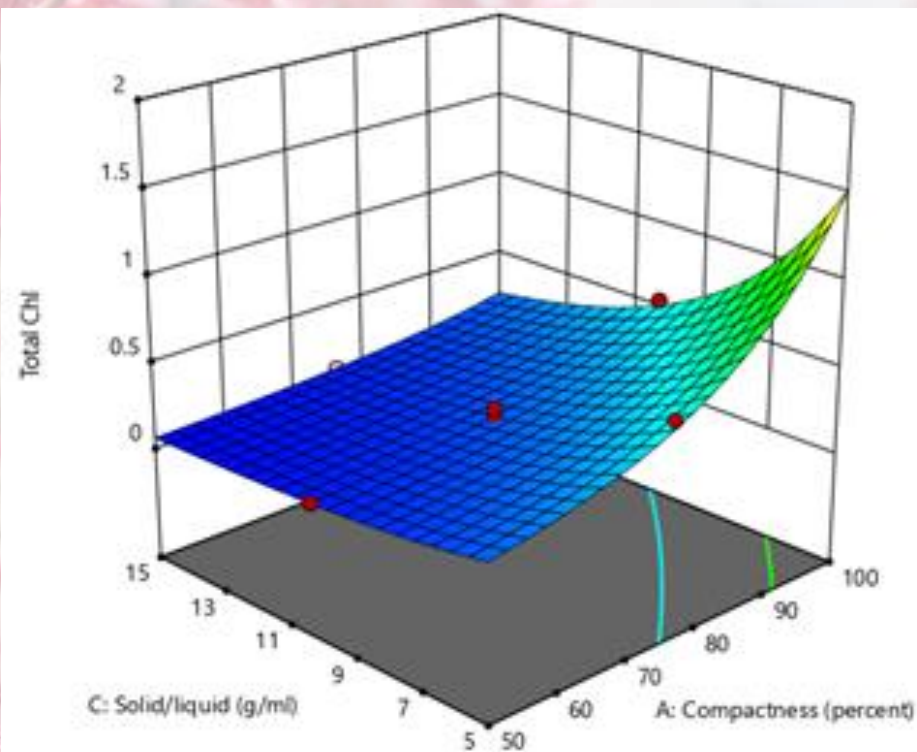
نمودار ۳-۲۲ میزان فوکوزانتین، اثر همزمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۲۰ دقیقه و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. بنابر نمودار فوق، با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع میزان پاسخ افزایش می‌یابد. به طوری که طبق نمودار بیشترین میزان پاسخ در محدوده ۷۵ تا ۹۵ درصد اتانول می‌باشد.



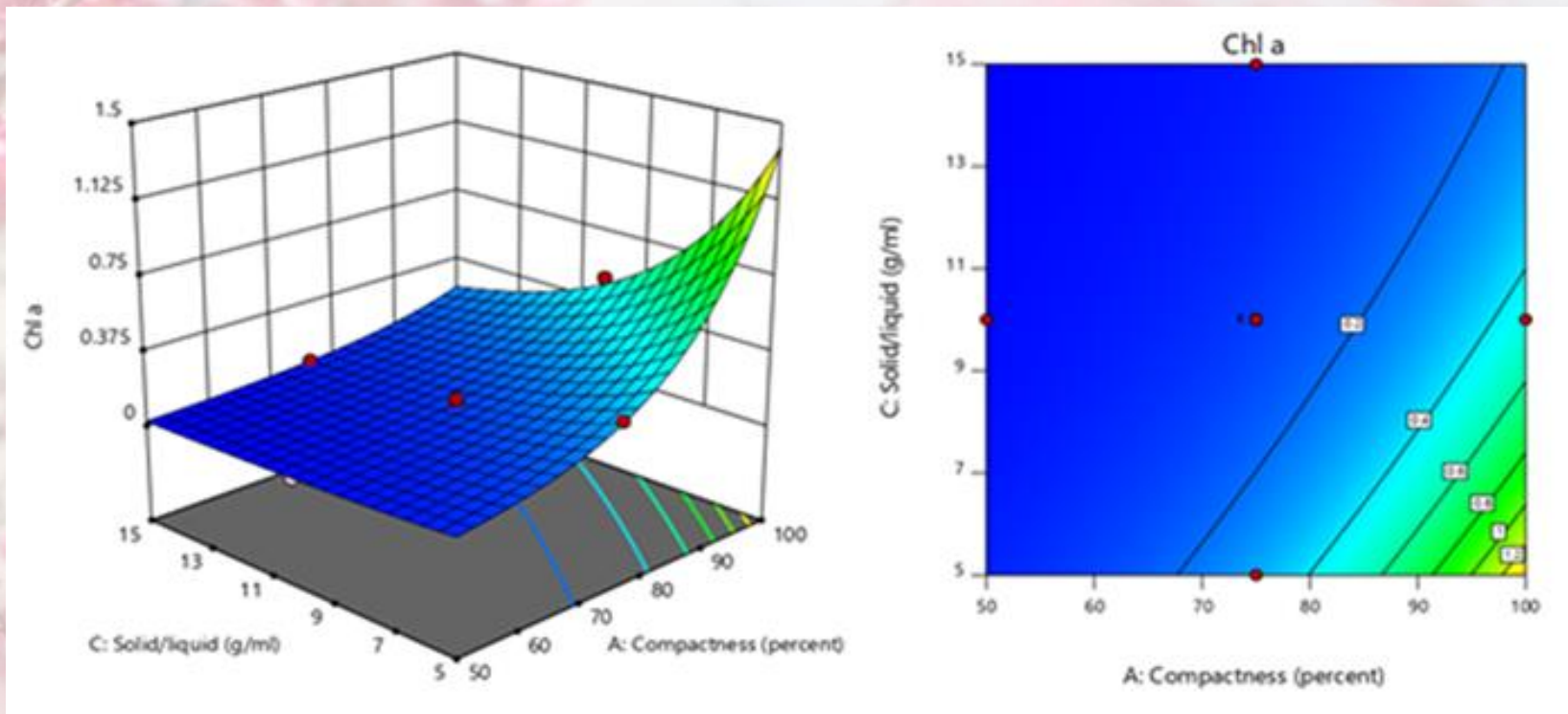
نمودار میزان کاروتنوئید کل، اثر همزمان مدت زمان استخراج و نسبت جامد-مایع را در غلظت ثابت اتانول ۷۵ درصد و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. با توجه به نمودار فوق، با افزایش مدت زمان استخراج و کاهش نسبت جامد-مایع میزان کاروتنوئید کل افزایش می‌یابد.



نمودار میزان کاروتنوئید کل، اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۲۰ دقیقه و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. طبق نمودار، کاهش نسبت جامد-مایع و افزایش درصد غلظت اتانول باعث افزایش میزان پاسخ شده‌است. به طوری‌که در نمودار فوق بیش‌ترین میزان پاسخ در محدوده ۶۵ تا ۹۵ درصد غلظت اتانول بود.



نمودار مربوط به کلروفیل کل، اثر همزمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۲۰ دقیقه و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. با توجه به نمودار، با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع، میزان پاسخ افزایش می‌یابد.



نمودار مربوط به کلروفیل a، اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت ۲۰ دقیقه و قدرت ثابت امواج فراصوت ۲۴۰ وات نشان می‌دهد. طبق نمودار فوق، با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع میزان پاسخ افزایش می‌یابد.

آزمایش‌های اعتبارسنجی مربوط به روش غوطه‌وری و فراصوت

شرایط بهینه استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای در روش غوطه‌وری

مقادیر واقعی	مقادیر پیش‌بینی شده	روش غوطه‌وری	متغیرهای مستقل
۵/۲۸	۵/۱۷	کلروفیل کل	درصد اتانول به آب
۲/۱۸	۲/۲۰	کاروتنوئید کل	زمان
۱/۰۱	۱/۱۳	فوکوزانتین	نسبت جامد-مایع
			درصد اتانول به آب
۰/۰۶	۰/۰۶	کلروفیل a	زمان
			نسبت جامد-مایع

شرایط بهینه استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای در روش اولتراسوند

مقادیر واقعی	مقادیر پیش‌بینی شده	روش اولتراسوند	متغیرهای مستقل
۱/۶۹	۱/۷۹	کلروفیل a	درصد اتانول به آب
			زمان
۱/۸۵	۱/۹۴	کلروفیل کل	نسبت جامد-مایع
			قدرت امواج قراصوت
۱/۱۱	۱/۴۶	کاروتنوئید کل	درصد اتانول به آب
			زمان
۰/۴۲	۰/۴۰	فوکوزانتین	نسبت جامد-مایع
			قدرت امواج قراصوت

کلروفیل‌ها (Kraan, 2013) و کاروتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی هستند (Jaswir and Monsur, 2011).

حضور گروه‌های هیدروکسیل در انتهای زنجیره‌ها باعث می‌شود که کاروتنوئیدها مولکول‌های قطبی باشند و تمایل به حل شدن در حلال‌های آلی مختلف داشته باشند (Sabeti satat *et al.*, 2017).

در مطالعه Raguraman و همکاران در سال ۲۰۱۸، بیش‌ترین میزان فوکوزانتین در اتانول ۸۰٪ و در مدت زمان ۳۰ دقیقه به دست آمد.

هم‌چنین گزارش دادند که اتانول یک حلال عالی برای استخراج فوکوزانتین است (Raguraman *et al.*, 2018).

در مطالعه حاضر در استخراج به روش غوطه‌وری اتانول ۱۰۰ درصد مناسب‌ترین حلال برای استخراج رنگدانه‌های کلروفیل کل، کاروتنوئید کل، فوکوزانتین و کلروفیل a بود. در روش استخراج به کمک اولتراسوند بیش‌ترین میزان کلروفیل کل و کلروفیل a در اتانول ۱۰۰ درصد و بیش‌ترین میزان کاروتنوئید کل و فوکوزانتین در اتانول ۷۵ درصد بود.

در آزمایش حاضر بیشترین میزان رنگدانه‌ها به استثنای کلروفیل a در روش غوطه‌وری، در دو روش استخراج فوق در نسبت جامد-مایع ۱:۵ بود. شرایط بهینه کاروفیل a در روش غوطه‌وری در نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ بود.

این پدیده در ارتباط با اصول انتقال جرم قرار دارد که بیان می‌کند، سرعت انتشار به طور مستقیم متناسب با شیب غلظت است که در نسبت جامد-مایع کمتر، افزایش می‌یابد (Al-Dhabi *et al.*, 2016).

✓ در مطالعه Zhu و همکارانش در سال ۲۰۱۷، بازده استخراج کلروفیل در نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ و قدرت اولتراسوند (۱۰۰ تا ۳۰۰ وات) افزایش یافت.

✓ در مطالعه Raguraman و همکارانش در سال 2018، بیشترین میزان فوکوزانتین در مدت زمان ۳۰ دقیقه و قدرت امواج فراصوت ۲۳۰ ولت بود.

در آزمایش انجام شده بیشترین میزان کلروفیل a و کلروفیل کل در مدت زمان ۳۰ دقیقه و قدرت امواج فراصوت ۴۰۰ وات و بیشترین میزان کاروتنوئید کل و فوکوزانتین در مدت زمان ۲۰ دقیقه و قدرت امواج فراصوت ۲۴۰ وات به دست آمد.

شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در روش غوطه‌وری

مقادیر واقعی	مقادیر پیشبینی شده	روش غوطه‌وری	متغیرهای مستقل	
			۵۰	درصد اتانول به آب
۱/۷۶	۰/۹۱	TAC	۴	زمان
			۱:۱۵	نسبت جامد-مایع
			۰	درصد اتانول به آب
۶۹۸/۰۱	۶۴۹/۴۱	TPC	۶	زمان
			۱:۱۵	نسبت جامد-مایع
			۲۵	درصد غلظت اتانول
۸۶/۰۲	۷۷/۹۷	DPPH	۴	زمان
			۱:۵	نسبت جامد-مایع

شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در روش اولتراسوند

مقادیر واقعی	مقادیر پیشبینی شده	روش اولتراسوند	متغیرهای مستقل	
			۱۰۰	درصد اتانول به آب
۳/۵۰	۳/۰۱	TAC	۱۰	زمان
			۱:۱۵	نسبت جامد-مایع
			۸۰	قدرت امواج فراصوت
			۷۵	درصد اتانول به آب
۴۶۴۶/۶۲	۱۴۶۲/۸۲	TPC	۲۰	زمان
			۱:۱۵	نسبت جامد-مایع
			۲۴۰	قدرت امواج فراصوت
			۵۰	درصد اتانول به آب
۹۸/۶۴	۱۰۲/۲۵	DPPH	۳۰	زمان
			۱:۵	نسبت جامد-مایع
			۸۰	قدرت امواج فراصوت

در آزمایش حاضر در روش غوطه‌وری و اولتراسوند به ترتیب بیش‌ترین میزان TAC در اتانول ۵۰٪ و ۱۰۰٪، TPC در آب مقطر و اتانول ۷۵٪ و DPPH در اتانول ۲۵٪ و ۵۰٪ به دست آمد.

قدرت استخراج ترکیبات فنولی در عصاره-های آبی چندین برابر عصاره‌های متانولی و اتانولی است که قطبی بودن بیش‌تر آب نسبت به دو حلال دیگر باعث این امر شده-است. از دلایل دیگر مناسب‌تر بودن حلال آبی در استخراج ترکیبات فنولی، ویژگی-های ساختاری گونه مورد مطالعه می‌باشد (باباخانی و همکاران، ۱۳۹۱).

حلالیت ترکیبات فنولی به شدت به نوع حلال مورد استفاده، درجه پلیمریزاسیون فنول‌ها و همچنین تعامل فنول‌ها با سایر مواد تشکیل دهنده و ساختار ترکیبات غیر محلول بستگی دارد (Djeridane *et al.*, 2006). در استخراج ترکیبات فنولی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنول‌ها نقش بسیار مهمی دارد (Nazdk and Shahidi, 2006).

در مطالعه‌ای که تأثیر حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، آب/متانول) بر ترکیبات فنولی یک گونه جلبک مورد آزمایش قرار گرفت، آب بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل را داشت و حلال آب/متانول نیز پس از آب دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود (Lopez *et al.*, 2011).

حرکت ترکیبات فعال از سوبسترا ممکن است تا به سطح دمایی خاصی اتفاق بیفتد که احتمالاً به دلیل کاهش و تخریب این ترکیبات در دماهای بالاتر است و در زمان‌های طولانی‌تر ممکن است به دلیل تخریب ترکیبات فنولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش پیدا کند (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005).

با افزایش زمان به سلول‌های گیاهی فرصت کافی داده خواهد شد تا در مواجهه با امواج اولتراسوند به طور کامل تخریب و ترکیبات سلولی وارد حلال استخراج شوند (Wang *et al.*, 2012). ترکیبات فنولی موجود در عصاره به شدت تحت تأثیر زمان استخراج می‌باشد (Rusak *et al.*, 2008).

در آزمایش حاضر در روش غوطه‌وری در مدت زمان ۴ ساعت بیش‌ترین میزان TAC و DPPH و در مدت زمان ۶ ساعت بیش‌ترین میزان TPC بود. در حالی‌که در روش اولتراسوند بیش‌ترین میزان TAC، TPC و DPPH به ترتیب در مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه و در قدرت امواج فراصوت به ترتیب ۸۰، ۲۴۰ و ۸۰ وات بود.

در استخراج با روش‌های مختلف، داده‌های مختلفی وجود دارد که بعضی از آن‌ها زمان‌های کوتاه‌تر استخراج را و تعدادی زمان‌های طولانی‌تر را مناسب‌تر دانسته‌اند (Spigno *et al.*, 2007; Pinelo *et al.*, 2005).

پژوهش در زمینه تأثیر امواج فراصوت در استخراج جامد-مایع ترکیبات فنولی از تفاله قهوه ثابت کرد که عملکرد استخراج با افزایش مدت زمان استخراج (تا ۳۶ دقیقه) افزایش می‌یابد. در این پژوهش مدت زمان طولانی باعث تخریب ساختاری ترکیبات فنولی شده و این امر منجر به کاهش بهره‌وری استخراج می‌گردد (Al-Dhabi *et al.*, 2016).

همانند نتایج به دست آمده، Al-Dhabi و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که نسبت جامد-مایع به طور قابل ملاحظه‌ای بر عملکرد ترکیبات فنولی تأثیر می‌گذارد. حجم حلال به طور غیرمستقیم متناسب با ویسکوزیته و غلظت حلال است. نسبت جامد-مایع (۱:۵ تا ۱:۳۰ گرم/میلی‌لیتر) و اثر آن در میزان پاسخ متفاوت بود. عملکرد استخراج در نسبت جامد-مایع (۱:۵ تا ۱:۲۵ گرم/میلی‌لیتر) افزایش یافت. در حالی که عملکرد استخراج در نسبت جامد-مایع بالاتر از ۱:۲۵ گرم/میلی‌لیتر، کاهش یافت.

یکی از فاکتورهای تأثیرگذار در این مطالعه نسبت جامد-مایع بود، به طوری که در روش غوطه‌وری و اولتراسوند در نسبت جامد-مایع ۱:۱۵ بیش‌ترین میزان TAC و TPC و در نسبت جامد-مایع ۱:۵ بیش‌ترین میزان DPPH به دست آمد.

این امر به دلیل افزایش ناخالصی‌های محلول (پروتئین و پلی‌ساکارید) می‌باشد که مانع از انحلال ترکیبات فنولی می‌گردد (Maran *et al.*, 2013).

نتایج مشابهی نیز توسط Prasad و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است که افزایش غلظت اتانول و نسبت مایع-جامد می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی از عصاره پوست انبه سفید *Mangifera pajang* را افزایش دهد.

Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۹، بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی جلبک قهوه ای *Ascophyllum nodosum* با استفاده از روش سطح پاسخ و توسط سه متغیر نسبت حلال به جامد، درصد غلظت اتانول و دمای استخراج، گزارش دادند که هنگامی که نسبت حلال به نمونه جامد نسبتاً کم است، افزایش غلظت اتانول باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نمی شود.

نتیجہ گیری



در هر دو روش استخراج با افزایش دو فاکتور درصد غلظت اتانول و مدت زمان میزان رنگدانه بیش‌تری استخراج می‌گردد. در کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین کاهش نسبت جامد-مایع باعث افزایش میزان پاسخ شده و در کلروفیل a افزایش نسبت جامد-مایع باعث افزایش میزان پاسخ شده‌است.

نتایج نشان داد که در روش غوطه‌وری با افزایش زمان و نسبت جامد-مایع میزان TPC، TAC افزایش می‌یابد، در صورتی که کاهش نسبت جامد-مایع و افزایش مدت زمان باعث افزایش DPPH می‌گردد. افزایش درصد غلظت اتانول باعث کاهش این ۳ فاکتور می‌شود.



در روش اولتراسوند افزایش درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع و کاهش زمان و قدرت امواج فراصوت باعث افزایش TAC و TPC می‌گردد. در صورتی که کاهش درصد غلظت اتانول، نسبت جامد-مایع و قدرت امواج فراصوت و افزایش مدت زمان استخراج باعث افزایش میزان DPPH می‌شود.

در روش اولتراسوند به دلیل حضور امواج فراصوت، مدت زمان استخراج کاهش یافته و این صرفه‌جویی در مصرف زمان می‌شود. اما از نظر میزان رنگدانه استخراج شده، در روش غوطه‌وری به استثنای کلروفیل a میزان رنگدانه بیش‌تری استخراج شده‌است.

پیشنهادهات

- ۱- بررسی تأثیر فاکتورهای دما، pH و مدت زمان استخراج در روش غوطه‌وری، مایکروویو و اولتراسوند بر روی ترکیبات رنگدانه‌ای
- ۲- خالص‌سازی عصاره‌های استخراج شده در شرایط بهینه با استفاده از روش‌های نوین و HPLC
- ۳- بررسی عملکرد ضدالتهابی و ضد سرطانی ترکیبات رنگدانه‌ای
- ۴- بررسی عملکرد ترکیبات رنگدانه‌ای در نگهداری مواد غذایی
- ۵- بهینه‌سازی تولید فوکوزانتین در مقیاس تجاری-صنعتی

فرضیات

۱- حلال اتانول (۱:۱) بیشترین ترکیبات رنگدانه‌ای را در روش‌های غوطه‌وری و فراصوت از جلبک *S. angustifolium* استخراج می‌کند.

۲- حلال اتانول بالاترین ترکیبات آنتی‌آدنیکی و آنتی‌اکسیدان را در روش‌های غوطه‌وری و فراصوت از جلبک *S. angustifolium* استخراج خواهد نمود.

۳- با افزایش نسبت جامد-مایع تا سطح ۱:۱۵ در هر دو روش غوطه‌وری و فراصوت میزان استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای از جلبک *S. angustifolium* افزایش می‌یابد.

۴- RSM روش مؤثری برای تعیین تیمار بهینه می‌باشد.

بسمه تعالی

گواهی پذیرش

با سلام :

بدین وسیله اعلام میگردد:

مقاله آقایان و خانمها: نیلوفر آقاچایور، سورکوهی، آریا باباجانی و مهدی طبرسا با عنوان " بهینه سازی شرایط استخراج رنگدانه های جلبک قهوه ای *Sargassum angustifolium* خلیج فارس با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) " با کد (۱۱۰۶) در هیأت تحریریه نشریه شیلات مطرح و مورد تصویب قرار گرفته است و در شماره های بعدی به چاپ خواهد رسید.

استاد محترم علیرضا سروافقی
سر دبیر نشریه علمی - پژوهشی
شیلات



تقدیم به پدر و مادر عزیزتر از جانم

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنانی که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پرمهر پدرم

به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانی تان

را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما

تشکر و قدردانی

سپاس خدای بزرگ را که مرا یاری رساند تا بتوانم این مقطع تحصیلی را به پایان رسانده و گامی در راستای اعتلای علم بردارم. از پدر و مادر عزیز و مهربانم به خاطر زحماتی که در طول زندگی همواره برای پیروزی و شادکامی من به جان خریدند، تشکر می‌کنم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر آریا باباخانی لشکان که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده‌است و بدون شک انجام این پایان‌نامه بدون کمک و راهنمایی‌های ارزنده ایشان امکان پذیر نبوده‌است، کمال تشکر را دارم و برای ایشان طول عمر توأم با سربلندی را آرزومندم.

از جناب آقای دکتر مهدی طبرسا که به عنوان استاد مشاور مسئولیت سنگینی را قبول زحمت فرمودند و مطمئناً بدون حمایت‌ها، راهنمایی‌ها و روحیه بخشی ایشان، انجام بخش مهمی از این پایان‌نامه میسر نمی‌شد. بدین وسیله از بزرگواری، حسن سلوک و حمایت بی‌دریغ ایشان سپاسگزارم.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر اسحق زکی پور رحیم آبادی و سرکار خانم دکتر هانیه رستم‌زاد که زحمت داوری این پایان‌نامه را داشتند نیز سپاسگزارم. از جناب آقای مهندس مهدی بی‌باک جهت همکاری ایشان در تهیه جلبک، کمال تشکر را دارم.

از پرسنل محترم دانشکده منابع طبیعی صومعه‌سرا؛ به ویژه آقای مهندس موسی پور، آقای مهندس زمانی، سرکار خانم دکتر ندا قربان‌زاده، خانم مهندس پروا سفری و خانم مهندس سپیده فرعلیزاده که در اجرای این پایان‌نامه همکاری داشتند، تشکر می‌نمایم.

تشکر از تمامی معلمان، اساتیدی که توفیق دانش آموزی و دانشجویی در محضرشان را داشتیم.

از دوستان عزیزم سرکار خانم مهندس خدیجه تقوا و خانم مهندس زینب فکوری که همراهان همیشگی من بوده‌اند و اوقات خوشی را در کنار هم سپری کرده‌ایم، تقدیر و تشکر دارم و در پایان از تمامی عزیزانی که در طول انجام این پروژه مرا یاری کرده‌اند کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایم.



پایان