

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

نیلوفر آقاچانیپور سورکوهی^۱، آریا باباخانی^{۲*}، مهدی طبرسا^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران.

۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۳/۲۴

چکیده

در این مطالعه استخراج رنگدانه‌های جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* به روش غوطه‌وری به منظور شناسایی متغیرهای فرآیند و بهینه‌سازی شرایط استخراج مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش هزینه‌های استخراج از روش سطح پاسخ (RSM) و از طرح Optimal (Custom) با ۳ متغیر مستقل و ۵ تکرار در نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) به صورت کاملاً تصادفی جهت تعیین بهترین ترکیب متغیرهای مؤثر در فرآیند استخراج برای پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین استفاده شد. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان فوکوزانتین، کاروتنوئید کل و کلروفیل کل در شرایط بهینه در مدت زمان ۴ ساعت، اتانول ۱۰۰٪ و نسبت جامد-مایع ۱:۵ به دست آمد. در صورتی که بیش‌ترین میزان کلروفیل a در مدت زمان ۶ ساعت، اتانول ۱۰۰٪ و نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ بود. مقادیر به دست آمده در آزمایش با مقادیر پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار دارای روابط منطقی بوده که نشان‌دهنده تناسب مدل‌های به کار رفته می‌باشد.

واژگان کلیدی: جلبک قهوه‌ای، *Sargassum angustifolium*، استخراج، رنگدانه، بهینه‌سازی.

۱. مقدمه

نشان داده شده است که این رنگدانه فعالیت ضدسرطان (Nakazawa *et al.*, 2009; Jaswir *et al.*, 2013)، دیابت نوع II (Oh *et al.*, 2016)، چاقی (Maeda *et al.*, 2007)، کلسترول (Beppu *et al.*, 2012)، اختلالات التهابی (Shiratori *et al.*, 2005)، آنژیوژنز (فرآیندی فیزیولوژیکی است که در آن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود رشد می‌کنند) (Tomor *et al.*, 2015)، مالاریا (Briglia *et al.*, 2015) و فشار خون بالا (Sivagnanam *et al.*, 2015) دارد و به‌عنوان یک مهارکننده β -secretase 1 (پروتئین مسئول ایجاد بیماری آلزایمر) در بیماری آلزایمر عمل می‌کند (Jung *et al.*, 2016).

در سلول‌های جلبک، فوکوزانتین در کلروپلاست‌ها، درون محفظه‌های متصل به غشا به نام تیلاکوئیدها وجود دارد. فوکوزانتین به‌طور قابل توجهی در پهنک (قسمتی از تال) جلبک دریایی تولید می‌شود، جایی که اکثریت فتوسنتز به‌دلیل حداکثر تابش نور در سطح اقیانوس رخ می‌دهد (Lobban and Harrison, 1994; Kita *et al.*, 2015; Schmid and Stengel, 2015).

خلیج فارس نیز در عرض‌های پایین قرار گرفته و دارای گونه‌های جلبکی متنوعی می‌باشد. یک گروه از این جلبک‌ها خانواده سارگاسوم‌ها (Sargassae) هستند که از مهم‌ترین خانواده‌های رده جلبک‌های قهوه‌ای بوده که در سطح جهان پراکنده هستند و شامل بیش از ۴۰۰ گونه می‌باشند. میزان بسیار زیادی از این جلبک‌ها در خلیج فارس وجود دارد که هیچ گونه استفاده‌ای از آن نمی‌شود (Babakhani *et al.*, 2012). از طرفی، استفاده از جلبک‌ها که به‌دلیل دارا بودن مواد بیولوژیکی فعال و گسترده جزء غنی‌ترین منابع شناخته شده‌اند (Marimuthu *et al.*, 2012)، رو به افزایش است.

امروزه استفاده از روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی روش‌های تحلیلی عمدتاً گسترش یافته و به‌دلیل مزایای آن جهت بهینه‌سازی کلاسیک یک متغیر زمانی، مانند تولید مقادیر زیاد اطلاعات از تعداد کمی از آزمایشات و امکان ارزیابی اثر متقابل بین متغیرها در پاسخ می‌باشد (Bezerra *et al.*, 2008). هدف از این مطالعه بهینه‌سازی شرایط استخراج و بررسی اثر غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع در استخراج ترکیبات

جلبک‌های قهوه‌ای (Phaeophyceae) بزرگ-ترین و پیچیده‌ترین نوع جلبک‌ها می‌باشند که به رنگ قهوه‌ای، زیتونی یا زرد-قهوه‌ای دیده می‌شوند. حدود ۱۸۰۰ گونه جلبک قهوه‌ای وجود دارد که به‌طور گسترده از اقیانوس‌های مناطق گرمسیر تا قطبی گسترش یافته اما تنها برخی از گونه‌های این جلبک‌ها در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. محصولات تجاری مختلفی از قبیل آلژینات، غذاها، کودها و... از جلبک‌ها تولید می‌شود. با این وجود به رنگدانه‌ی جلبک توجه اندکی شده است و در طی تولید به‌عنوان مواد زائد دور ریخته می‌شود (Indrawati *et al.*, 2015).

بیش از ۷۵۰ نوع کاروتنوئید مختلف در طبیعت مورد شناسایی قرار گرفته است (Bechtold and Mussak, 2009)، که تنها از تعداد کمی از آن‌ها در خوراک جانوران، مواد آرایشی، رنگدانه‌های خوراکی و مواد دارویی استفاده به‌عمل می‌آید (Kop and Durmaz, 2008). از جمله این کاروتنوئیدها می‌توان به آستاگزانتین، کانتاگزانتین، لوتئین، کاپسانتین (Capsanthin)، اتیل استر (Ethyl ester)، کریپتوگزانتین (Cryptoxanthin)، زیگزانتین، سیتراناکسانتین (Citranaxanthin)، β -آپو-۸'-کاروتنال (β -Apo-8'-carotenal) و β -آپو-۸'-کاروتنوئیک اسید (β -Apo-8'-carotenoic acid) اشاره نمود (Bechtold and Mussak, 2009).

از جمله ترکیبات ارزشمند رنگدانه‌ای، فوکوزانتین (Fucoxanthin) است که نمونه‌ی غالب کاروتنوئید در جلبک قهوه‌ای می‌باشد (Indrawati *et al.*, 2015). کاربرد زیستی فوکوزانتین به‌عنوان ضدچاقی، آنتی-اکسیدان و همچنین ضدالتهاب می‌باشد. به‌علاوه رنگدانه‌های ارزشمند دیگری مانند کلروفیل a و c به‌عنوان رنگدانه‌های اولیه فتوسنتز و بتاکاروتن و زانتوفیل‌ها در جلبک‌های قهوه‌ای وجود دارند. کلروفیل و کاروتنوئید مانند هر ماده‌ی شیمیایی دیگر توسط گرما و نور به آسانی تخریب می‌شوند (Indrawati *et al.*, 2015). فوکوزانتین به‌منظور بررسی اثر بخشی آن در برابر بسیاری از بیماری‌ها مورد مطالعه بالینی قرار گرفته است. در شرایط آزمایشگاهی

شد. عصاره‌ها تا زمان ارزیابی در بطری‌های تیره برای جلوگیری از تجزیه با نور نگهداری شدند (Sudhakar *et al.*, 2013).

۳.۲. آنالیز رنگدانه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئید)

۰/۴ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده، با اتانول و آب به‌طور جداگانه به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از رقیق‌سازی جذب آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر (UV/Vis 2100) در طول موج‌هایی در دامنه ۸۰۰-۳۵۰ nm اندازه‌گیری گردید.

کلروفیل a (Arnon, 1949):

$$(\text{Chl a}) (\text{mg g}^{-1}) = [12.7 (\text{A663}) - 2.69 (\text{A645}) \text{V}] / (1000 \times \text{W})$$

کلروفیل کل (Arnon, 1949):

$$(\text{Total Chl}) (\text{mg g}^{-1}) = [20.2 (\text{A645}) + 8.02 (\text{A663}) \text{V}] / (1000 \times \text{W})$$

کاروتنوئیدها (Jensen and Liaaen, 1959; Duxbury and Yentsh, 1956):

$$(\text{mg g}^{-1}) = [7.6 (\text{A480}) - 1.49 (\text{A510}) \text{V}] / (1000 \times \text{W})$$

فوکوزانتین (Seely *et al.*, 1972):

$$(\text{mg g}^{-1}) = \text{A470} - 1.239 (\text{A631} + \text{A581} - 0.3 \times \text{A664}) - 0.0275 \times \text{A664} / 141$$

در فرمول‌های فوق، A = میزان جذب در طول موج خاص، V = حجم کل عصاره به‌دست آمده و W = وزن نمونه مورد استفاده برای عصاره‌گیری است و غلظت رنگدانه‌ها برحسب (mg/g)، ماده خشک /g رنگدانه (mg) بیان می‌شود.

۴.۲. طراحی آزمایش‌ها و آنالیز آماری

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی برای توسعه، ارتقاء و بهینه‌سازی فرآیندها است که برای ارزیابی معنی‌داری نسبی چند متغیر مؤثر، به خصوص در مواقعی که روابط پیچیده‌ای موجود است، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Myers and Montgomery, 2002). برای طراحی آزمایش‌ها، محاسبات، آنالیز داده‌ها و تفسیر نتایج از نرم‌افزار Design-Expert ورژن ۱۱ و از طرح (Custom) Optimal استفاده شد. طراحی آزمایش در روش غوطه‌وری با روش سطح پاسخ، با ۳ متغیر مستقل و ۵ تکرار در نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری

رنگدانه‌ای از جلبک *Sargassum angustifolium* و کاهش هزینه‌های استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه جلبک

نمونه‌های جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* به‌طور تازه از بندر بوشهر، اسکله جلالی، منطقه ریشهر (۸ کیلومتری جنوب شهر بوشهر) در نیمه دوم اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جلبک به آزمایشگاه فرآوری دانشکده منابع طبیعی صومعه‌سرا منتقل و پس از چند مرحله شستشو با آب دریا جهت حذف باقی‌مانده اپیفیت‌ها، شن، ماسه و نمک، دوباره با آب شیرین شستشو گردید. نمونه‌های جلبک در آن (بهداد، ساخت ایران) با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد (Sadeghi *et al.*, 2018). نمونه‌های خشک شده جلبک با استفاده از آسیاب برقی (هاردستون، مدل GCS2700W، ساخت انگلستان) پودر و با توری که اندازه منافذ آن ۹۰۰ μm است، الک شدند. ذرات بزرگ‌تر از ۹۰۰ μm در آزمایشات استفاده نشد. نمونه پودر شده در کیسه‌های پلاستیکی زیپ کیپ در یخچال برای استفاده در آزمایش‌های استخراج نگهداری گردید.

۲.۲. استخراج رنگدانه از جلبک

برای طراحی آزمایش‌ها از RSM استفاده شد. 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. در این روش، نمونه جلبک آسیاب شده، با توجه به نسبت‌ها و غلظت‌های ذکر شده از هر حلال (اتانول و آب) به‌طور جداگانه، در حال هم‌زدن بر روی یک همزن مغناطیسی با آهنربایی به ابعاد ۴×۳/۶ سانتی‌متر در مدت زمان تعیین شده در تاریکی خیس‌مانده شد. دمای استخراج در محدوده ۴۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد بود (Bouras *et al.*, 2015). برای جداسازی جلبک پودر شده، مخلوط با کاغذ صافی (واتمن ۴۲)، صاف گردیده و پس از ۳۰ دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ

جدول ۱ - 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)

جدول ۲ - طراحی آزمایشی متغیرهای مستقل و پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین.

ردیف استاندارد	شماره آزمایش	فاکتور ۱ (درصد غلظت اتانول به آب)	فاکتور ۲ (زمان دقیقه)	فاکتور ۳ (نسبت جامد به مایع گرم/میلی‌لیتر)	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

متغیرها و $X_i X_j$ و $X_i X_k$ و ... تأثیرات کنش متقابل بین متغیرها و ϵ خطای احتمالی است. برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها از آنالیز ANOVA استفاده شد. معنی‌داری آماری تمامی اجزای مدل در سطوح احتمال (P) $0/0001$ و $0/05$ بررسی شد. پس از بهینه‌سازی، کفایت معادله مدل برای پیش‌بینی مقادیر پاسخ مطلوب با نتایج تجربی تأیید شد. مدل براساس متغیرهایی با سطح اطمینان بیش از ۹۵ درصد تهیه گردید و در نهایت شرایط بهینه تعیین شد.

۳. نتایج

۳.۱. بهینه‌سازی شرایط استخراج در روش غوطه‌وری

تعداد ۲۰ آزمایش به منظور بهینه‌سازی شاخص‌های مورد بررسی به صورت تصادفی انجام شد و مقادیر پاسخ‌ها در ترکیب‌های متفاوت آزمایشی در جدول ۲ نشان داده شده‌است. مقادیر میزان کلروفیل a بین

فرآیند) به صورت کاملاً تصادفی به منظور تعیین بهترین ترکیب متغیرهای مؤثر در فرآیند استخراج برای پاسخ‌های میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین انجام شد. متغیرهای مستقل شامل غلظت اتانول (X_1) در ۵ سطح، زمان (X_2) و نسبت جامد-مایع (X_3) که در ۳ سطح کدگذاری می‌شوند و متغیر وابسته (پاسخ) غلظت رنگدانه برحسب mg/g می‌باشد (جدول ۱). مدل مورد استفاده در RSM عموماً رابطه درجه دوم می‌باشد. در RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، برای سه فاکتور معادله چندجمله‌ای به صورت زیر است:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

در این تابع Y نشان‌دهنده مقدار پاسخ پیش‌بینی شده متغیرهای مورد آزمایش‌ها، β_0 عدد ثابت یا عرض از مبدأ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} ضرایب مدل رگرسیون و X_i و X_j متغیرهای مستقل اند. X_1^2 ، X_2^2 ، X_3^2 و ... تأثیرات مجذور

جدول ۳ - نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در روش استخراج غوطه‌وری.

پاسخ‌ها				ضرایب
فوکوزانتین	کاروتنوئید کل	کلروفیل کل	میزان کلروفیل a	
< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	مدل
< ۰/۰۰۰۱	۰/۰۰	۰/۶۰	۰/۰۰	(Et:H ₂ O Ratio) X ₁
۰/۸۷	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۳۲	(Time) X ₂
۰/۶۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۵	(Solid/liquid) X ₃
۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۴۵	۰/۱۶	X ₁ X ₂
۰/۰۰	< ۰/۰۰۰۱	۰/۰۰	۰/۱۴	X ₁ X ₃
۰/۶۵	۰/۸۴	۰/۰۸	۰/۳۳	X ₂ X ₃
-	۰/۰۰	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱	X ₁ ²
-	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۵۶	X ₂ ²
-	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۳۶	X ₃ ²
۰/۰۰۲۲	۰/۰۱۱۸	۰/۰۲۳۸	۰/۰۰۷۷	مقادیر عدم برازش
۰/۸۹۸۷	۰/۹۷۷۹	۰/۹۸۷۷	۰/۹۷۷۷	ضرایب تبیین
۰/۸۵۲۰	۰/۹۵۸۰	۰/۹۷۶۷	۰/۹۵۷۶	ضرایب تطابق یافته
۰/۷۵۹۰	۰/۸۱۳۵	۰/۸۷۸۵	۰/۸۳۵۱	ضرایب پیش‌بینی شده
۰/۱۰۲۷	۰/۱۱۰۸	۰/۰۷۹۰	۰/۰۰۴۴	انحراف معیار

جدول ۳ نشان داده شده است. نرم‌افزار برای اثبات کارایی و تناسب مدل ضریب تبیین (R^2)، ضریب تطابق یافته ($Adj.R^2$) و ضریب پیش‌بینی ($pre.R^2$) را نیز ارائه می‌دهد (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005) که حاصل از آنالیز واریانس ANOVA است. این مقادیر در واقع صحت مدل انتخاب شده برای پیش‌بینی پاسخ‌ها را مبنی بر مقادیر به‌دست آمده در شرایط واقعی توجیه می‌کند. 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). این ضرایب در ارتباط باهم هستند و مقادیر آن‌ها می‌بایست به هم نزدیک باشد. هم‌چنین، معنی‌داری مدل‌های انتخاب شده از نظر آماری به میزان P بستگی دارد و مدل‌هایی با میزان p کم‌تر نشان‌دهنده معنی‌داری بیشتر مدل به کار گرفته شده و پارامترهای دخیل در آن است (Safari et al., 2015). این مدل با توجه به داده‌های به‌دست آمده بسیار مناسب بوده و دارای تغییرات کمی در میزان ضریب تبیین می‌باشد. در این مطالعه میزان معنی‌داری تمامی مدل‌ها با مقادیر کم‌تر از ۰/۰۵ (۰/۰۰۰۱) نشان داد که سطح معنی‌داری رگرسیون بالاتر از ۹۵٪ است. همان‌طور که از جدول ۳ برمی‌آید، مقادیر تمامی ضرایب تبیین به استثنای فوکوزانتین بالای ۹۰٪ به‌دست آمده است که معنی‌داری این رگرسیون‌ها را نشان می‌دهد. ضریب تبیین فوکوزانتین بالای ۸۰٪ می‌باشد.

۰/۰۰ تا ۰/۰۶ میلی‌گرم در گرم پودر جلبک خشک شده بود. این مقادیر برای کلروفیل کل بین ۰/۰۵ تا ۵/۲۸ میلی‌گرم در گرم پودر جلبک خشک شده، برای کاروتنوئید کل بین ۰/۰۷ تا ۲/۱۸ میلی‌گرم در گرم پودر جلبک خشک شده و برای فوکوزانتین بین ۰ تا ۱/۰۱ میلی‌گرم در گرم پودر جلبک خشک شده به دست آمد. نرم‌افزار مدل‌های پیش‌بینی شده را به صورت معادلات رگرسیون حاصل از آنالیز واریانس (ANOVA) در مورد هر یک از پاسخ‌ها فراهم کرد که به صورت زیر است:

$$Y_{Chla} = -0.011558 - 0.000723X_1 + 0.004826X_2 + 0.001979X_3 + 0.000028X_1X_2 + 0.000013X_1X_3 - 0.000191X_2X_3 + 9.60729E-06X_1^2 - 0.000306X_2^2 - 0.000083X_3^2$$

$$\sqrt{Y_{Total\ Chl}} = +0.804713 - 0.001338X_1 + 0.39947X_2 - 0.169131X_3 + 0.00027X_1X_2 - 0.000794X_1X_3 - 0.006477X_2X_3 + 0.000173X_1^2 - 0.040187X_2^2 + 0.007452X_3^2$$

$$Y_{Cr} = +0.722406 + 0.018903X_1 + 0.349874X_2 - 0.249241X_3 - 0.000533X_1X_2 - 0.001654X_1X_3 + 0.000960X_2X_3 + 0.000086X_1^2 - 0.043513X_2^2 + 0.011580X_3^2$$

$$(Y_F)^{0.5} = -0.02081 + 0.014892X_1 + 0.008962X_2 + 0.008794X_3 - 0.000465X_1X_2 - 0.000684X_1X_3 + 0.001997X_2X_3$$

۲.۳. اثبات مناسب بودن مدل

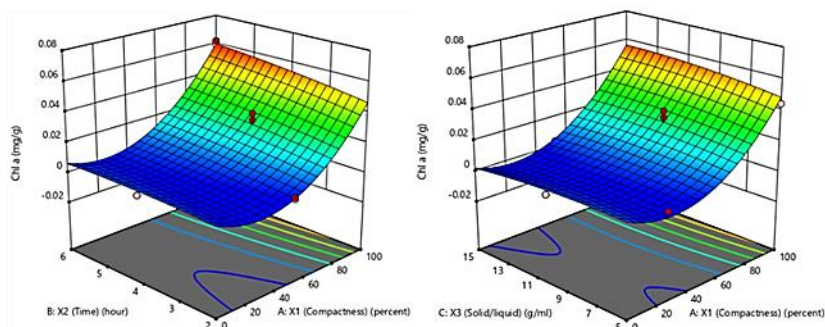
بهینه‌سازی فرآیند استخراج با استفاده از معادله چند جمله‌ای مرتبه دوم انجام شد. داده‌های تجربی در

میزان پاسخ در مقادیر بیش تر اتانول مشاهده شد. در این مطالعه حداکثر کلروفیل a به دست آمده mg/g $0/06$ است که در اتانول 100% ، مدت زمان 6 ساعت و نسبت جامد-مایع $1:10$ می باشد. شکل ۱-پ مربوط به کلروفیل کل در شکل ۱، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت 4 ساعت نشان می دهد، که با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع میزان کلروفیل کل بیش-تری استخراج می شود. در شکل ۱-ت مربوط به کلروفیل کل، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج در نسبت ثابت جامد-مایع $1:10$ نشان داده شده است. با توجه به شکل فوق با افزایش دو فاکتور ذکر شده میزان کلروفیل کل افزایش می یابد. در واقع هر سه فاکتور غلظت اتانول، زمان و نسبت جامد-مایع اختلاف معنی داری را نشان می دهند ($P < 0/05$). براساس نمودار بیش ترین میزان پاسخ در مدت زمان 4 ساعت، غلظت اتانول 100% و نسبت جامد-مایع $1:5$ می باشد. در شکل ۱-ث میزان کاروتنوئید کل تحت تأثیر دو فاکتور درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع در مدت زمان ثابت 4 ساعت بوده، که با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع، میزان کاروتنوئید کل افزایش می یابد. همین طور در شمل ۱-ج مربوط به کاروتنوئید کل، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج در نسبت ثابت جامد-مایع $1:10$ مشاهده می شود، با افزایش دو فاکتور مذکور میزان کاروتنوئید کل افزایش می یابد. بنابر شواهد موجود بیش ترین میزان کاروتنوئید در اتانول 100 درصد، مدت زمان 4 ساعت و نسبت جامد-مایع $1:5$ بود. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود در شکل ۱-ح مربوط به فوکوزانتین، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع در مدت زمان ثابت 4 ساعت، میزان فوکوزانتین با افزایش درصد غلظت اتانول و کاهش نسبت جامد-مایع، افزایش می یابد. بنابر شکل ۱-خ مربوط به فوکوزانتین، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج در نسبت ثابت جامد-مایع $1:10$ ، با افزایش درصد غلظت اتانول و افزایش مدت زمان استخراج، میزان فوکوزانتین افزایش می یابد.

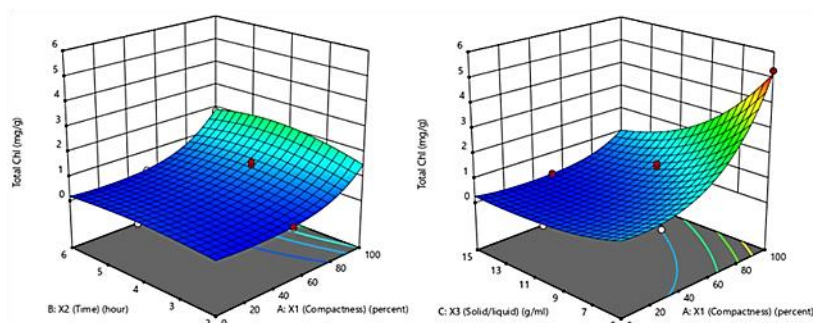
علاوه بر این، مقادیر ضرایب تبیین تطابق یافته و ضرایب تبیین پیش بینی به غیر از فوکوزانتین نیز به ترتیب با مقادیر بالای 90% و 80% در توافق منطقی با ضریب تبیین قرار دارند. برای فوکوزانتین ضریب تبیین تطابق یافته و ضریب تبیین پیش بینی به ترتیب بالای 80% و 70% درصد می باشد. بنابراین، این نتایج نشان می دهد که این مدل ها برای پیش بینی شرایط بهینه استخراج ترکیبات رنگدانه ای از جلبک قهوه ای *S. angustifolium* به خوبی عمل کرده اند. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود درصد غلظت اتانول (X_1 و X_1^2) بیش ترین تأثیر را در میزان پاسخ کلروفیل a داشته است ($P < 0/05$). در پاسخ کلروفیل کل، فاکتورهای X_2 ، X_3 ، X_1X_3 ، X_1^2 ، X_2^2 و X_3^2 تأثیر گذار بودند ($P < 0/05$). از میان فاکتورهای مورد بررسی، فاکتورهای X_1 ، X_2 ، X_3 ، X_1X_3 ، X_1^2 ، X_2^2 و X_3^2 بیش ترین تأثیر را در میزان کاروتنوئید کل داشتند ($P < 0/05$). فاکتور تأثیر گذار در میزان فوکوزانتین X_1 و X_1X_3 می باشد.

۳.۳. تأثیر متغیرهای فرآیند

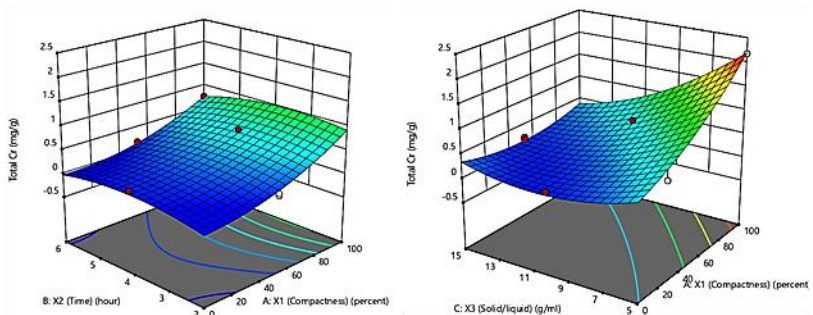
جهت برآورد اثر هر پارامتر و تعامل آن با پاسخ، نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی به عنوان تابع هر دو متغیر ترسیم شد، در حالی که متغیر دیگر در نقطه مرکزی ثابت گردید. در شکل ۱ تأثیر شاخص های اولیه غلظت اتانول، زمان و نسبت جامد-مایع در میزان پاسخ های میزان کلروفیل a ، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین نشان داده شده است. براساس آنالیزهای صورت گرفته مبتنی بر نتایج و داده های جدول ۳، درصد غلظت اتانول به آب به منزله حلال استخراج با مقادیر $P < 0/001$ تأثیر اصلی را در تمامی پاسخ های مذکور داشته است. شکل ۱-الف کلروفیل a ، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع را در مدت زمان ثابت 4 ساعت نشان می دهد. طبق نمودار با افزایش دو فاکتور ذکر شده میزان پاسخ افزایش می یابد. شکل ۱-ب کلروفیل a ، اثر هم زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج را در نسبت ثابت جامد-مایع $1:10$ نشان می دهد. طبق شکل با افزایش دو فاکتور ذکر شده میزان پاسخ افزایش می یابد. براساس شکل های ۱-الف و ۱-ب، بیش ترین



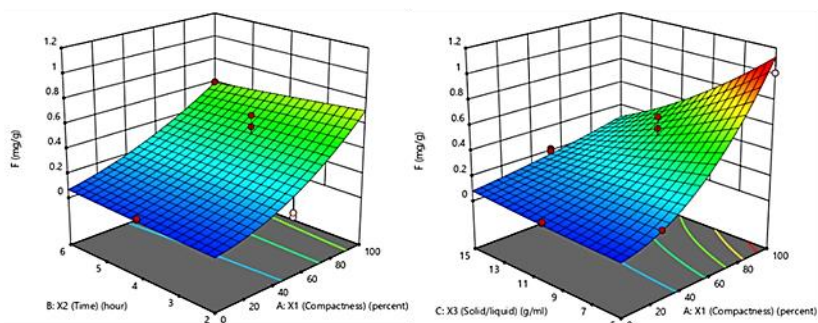
الف) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع (کلروفیل a)
 ب) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج (کلروفیل a)



پ) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع (کلروفیل کل)
 ت) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج (کلروفیل کل)



ث) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع (کاروتنوئید کل)
 ج) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج (کاروتنوئید کل)



ح) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و نسبت جامد-مایع (فوکوزانتین)
 خ) نمودار اثر هم‌زمان درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج (فوکوزانتین)

شکل ۱ - نمودارهای سطح پاسخ متغیرهای وابسته میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین در روش استخراج غوطه‌وری.

جدول ۴ - شرایط بهینه استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای در روش غوطه‌وری.

مقادیر واقعی	مقادیر پیش‌بینی شده	روش غوطه‌وری	متغیرهای مستقل
۵/۲۸	۵/۱۷	کلروفیل کل	۱۰۰ درصد اتانول به آب
۲/۱۸	۲/۲۰	کاروتنوئید کل	۴ زمان
۱/۰۱	۱/۱۳	فوکوزانتین	۱:۵ نسبت جامد-مایع
۰/۰۶	۰/۰۶	کلروفیل a	۱۰۰ درصد اتانول به آب
			۶ زمان
			۱:۱۰ نسبت جامد-مایع

۴.۳. آزمایش‌های اعتبارسنجی

اختلاف کم بین داده‌های پیش‌بینی شده از طریق نرم‌افزار و داده‌های به دست آمده در شرایط واقعی درستی عملکرد را در آزمایش‌های انجام شده تأیید می‌کند. از جمله اولویت‌های اصلی برای شرایط بهینه محدودیت‌های درصد غلظت اتانول، زمان و نسبت جامد-مایع بود. استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای به کمک روش غوطه‌وری از جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* با روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی شد. شرایط استخراج بهینه در روش مذکور به صورت زیر است:

براساس اطلاعات جدول ۴، RSM نشان داد که اتانول ۱۰۰٪ در مدت ۴ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۵ شرایط بهینه برای استخراج کلروفیل کل و کاروتنوئیدها و فوکوزانتین می‌باشد. شرایط بهینه تعیین شده توسط RSM برای کلروفیل a اتانول ۱۰۰٪، مدت زمان ۶ ساعت و نسبت جامد-مایع ۱:۱۰ است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی هستند که توسط گیاهان، جلبک‌ها، فیتوپلانکتون‌ها و برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌گردند (Kraan, 2013; Jaswir and Monsur, 2011) و بنابر نتایج در اتانول ۱۰۰٪ بهتر حل می‌شوند. در مقایسه با کلروفیل a و c، کمپلکس رنگدانه فوکوزانتین-پروتئین به شدت به غشای تیلاکوئید وابسته است، زیرا یک رنگدانه جانبی است که در پاسخ به کاهش دسترسی به نور ساخته می‌شود (Shannon and Abu-Ghannam, 2017). همکاران (Raguraman, 2018) در زمینه استخراج فوکوزانتین توسط اولتراسوند از جلبک *Tetrahymena*

Padina فعالیت کردند. آن‌ها در این پژوهش سه فاکتور غلظت حلال، دما و زمان را در بهینه‌سازی شرایط استخراج مدنظر قرار دادند. در این بررسی غلظت اتانول به‌عنوان یک عامل مهم در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان فوکوزانتین در اتانول ۸۰٪ و در مدت زمان ۳۰ دقیقه به دست می‌آید. همچنین آن‌ها گزارش کردند که اتانول یک حلال عالی برای استخراج فوکوزانتین است. پیش از این، اتانول برای استخراج کاروتنوئید و کلروفیل از میکروجلبک‌ها بهینه بود (Jeffrey et al., 1997). از طرف دیگر متانول در مقایسه با استون و اتانول، حلال مناسب‌تری برای استخراج نمونه‌های دریایی است (Wasmund et al., 2006). استخراج کاروتنوئیدها تحت تأثیر گونه‌های مختلف جلبک‌ها با ساختارها و ترکیبات مختلف قرار دارد (Mori et al., 2004). Warkoyo و Saati (۲۰۰۱) مطالعه‌ای در زمینه تأثیر حلال در فرآیند استخراج رنگدانه‌های جلبک دریایی انجام دادند. هدف از این مطالعه به دست آوردن یک حلال مؤثر در فرآیند استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از سه جلبک دریایی (سبزی، قرمز و قهوه‌ای) بود. در آزمایش عصاره‌گیری با استفاده از ۴ حلال (استون، اتانول، پترولیوم بنزن، هگزان:پترولیوم بنزن (با نسبت ۱:۱)) با نسبت ۱ به ۵ (وزنی/حجمی) به روش غوطه‌وری و به مدت ۳ ساعت انجام گردید. در جلبک‌های سبز و قهوه‌ای، استون در مقایسه با سه حلال دیگر میزان کاروتنوئید بیش‌تری استخراج کرده و پس از آن اتانول بیش‌ترین استخراج را داشته‌است و این به دلیل نزدیک بودن قطبیت ماده حل شونده و حلال می‌باشد. استون و اتانول دارای قطبیت نسبتاً بالایی هستند. به طور کلی کاروتنوئیدها مولکول‌های آبگریز هستند و بنابراین تنها در حلال‌های آلی قابل حل می‌باشند. حضور گروه‌های هیدروکسیل در انتهای زنجیره‌ها باعث می‌شود که کاروتنوئیدها مولکول‌های

مطالعه برای استخراج رنگدانه از استون ۹۰٪ با نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی) استفاده کردند. میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید کل به دست آمده در این تحقیق به ترتیب 0.65 ± 0.05 mg/g، 1.10 ± 0.3 و 0.32 ± 0.06 می‌باشد. Abu-Shannon و Ghannam (۲۰۱۷) مطالعه‌ای در زمینه بهینه‌سازی استخراج فوکوزانتین از جلبک‌های ایرلند با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند، آن‌ها در این مطالعه ۴ فاکتور زمان، دما، pH حلال و درصد غلظت استون را مورد بررسی قرار دادند که در این تحقیق فاکتور زمان تأثیر معنی‌داری نداشت. Vieira و همکاران (۲۰۱۷) در زمینه استخراج کاروتنوئیدها از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای با استفاده از محلول‌های آبی از سطوح مختلف مایعات یونی فعال و سورفاکتانت‌های آنیونی با استفاده از روش سطح پاسخ به فعالیت پرداختند. میزان فوکوزانتین به دست آمده در این پژوهش بین 0.08 ± 0.05 و 1.01 ± 0.39 mg/g بود.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تفاوت قابل توجهی بین شرایط مختلف استخراج به روش غوطه‌وری وجود دارد. مدل تجزیه و تحلیل آماری در روش سطح پاسخ، مدل چند جمله‌ای درجه دوم بود که با ضرایب تبیین بالایی، داده‌ها را برازش کرد. نتایج نشان داد که با افزایش دو فاکتور درصد غلظت اتانول و مدت زمان استخراج میزان رنگدانه بیش‌تری استحصال می‌گردد. میزان کلروفیل کل، کاروتنوئید کل و فوکوزانتین کاهش نسبت جامد-مایع باعث افزایش میزان پاسخ شده و کلروفیل a، افزایش نسبت جامد-مایع باعث افزایش میزان پاسخ شده‌است.

تناسب بالای مدل‌ها نشان داد که مدل چندجمله‌ای درجه دوم می‌تواند برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات رنگدانه‌ای از جلبک قهوه‌ای به کار رود. علاوه براین، نشان داده شد که RSM روش مؤثری برای بهینه‌سازی شرایط استخراج می‌باشد. این یافته‌ها ممکن است در توسعه روش‌های مناسب استخراج برای محصولات با ارزش افزوده جلبک دریایی استفاده شود.

قطبی باشند و تمایل به حل شدن در حلال‌های آلی مختلف داشته باشند (Sabeti Satat et al., 2017).

شرایط مختلف نشان داده که متانول بهترین حلال برای استخراج فوکوزانتین می‌باشد (Mise et al., 2011). با این حال، به دلیل این‌که اتانول از نظر ایمنی بهترین حلال برای فرآوری مواد غذایی است، می‌توان آن را به عنوان جایگزینی برای متانول در نظر گرفت. اگرچه اتانول اندکی گران‌تر می‌باشد (Warkoyo and Saati, 2011). Sudhakar و همکاران (۲۰۱۳) در زمینه استخراج، تصفیه و مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی فوکوزانتین از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای به فعالیت پرداختند. آن‌ها ۵ جلبک قهوه‌ای مانند *S. ilicifolium*، *Sargassum wightii*، *Turbinaria sp.* و *Padina sp.* *S. longifolium* را برای استخراج و تصفیه فوکوزانتین انتخاب کردند. در این مطالعه از حلال‌های استون ۹۰٪، استون ۱۰۰٪ و اتانول ۹۰٪ با نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی) استفاده گردید. عصاره‌گیری به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سلسیوس صورت گرفت. در این تحقیق گزارشی مبنی بر تأثیر زمان نشده‌است. با استفاده از حلال اتانول میزان کلروفیل a به دست آمده در جلبک *S. ilicifolium* 0.36 ± 0.045 mg/g، *S. wightii* 0.45 ± 0.040 mg/g و *S. longifolium* 0.19 ± 0.012 میلی‌گرم بر گرم می‌باشد و به همین صورت میزان کلروفیل کل به دست آمده از این سه جلبک را به ترتیب 0.39 ± 0.045 ، 0.52 ± 0.026 و 0.21 ± 0.012 mg/g گزارش کردند. در این مطالعه میزان فوکوزانتین به دست آمده توسط اتانول ۹۰٪ برای جلبک *S. wightii* 0.08 ± 0.006 mg/g، *S. ilicifolium* 0.15 ± 0.012 mg/g و *S. longifolium* 0.03 ± 0.006 mg/g گزارش شده‌است. میزان کاروتنوئید کل برای این سه جلبک به ترتیب 0.06 ± 0.006 ، 0.13 ± 0.017 و 0.03 ± 0.006 گزارش شده‌بود. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۸) مطالعه‌ای در زمینه تولید نانوکپسول‌های حاوی رنگدانه‌های جلبک دریایی *Sargassum sp.* به روش خشک کردن انجمادی انجام دادند. آن‌ها در این

References

Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta

vulgaris. *Journal of Plant Physiology* 24, 1-15.

- Babakhani Lashkan, A., Rezaei, M., Rezaei, K., Seifabadi, S.J., 2012. Optimization of Extraction of Antioxidant Compounds in Microwave-Assisted Extracts of Brown Algae *Sargassum angustifolium*. *Iranian Journal of Natural Resources* 65(3), 243-255. (In Persian)
- Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S., 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry* 120, 1185-1192.
- Bechtold, T., Mussak, R., 2009. Handbook of natural colorants, John Wiley and Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom. 412 p.
- Beppu, F., Hosokawa, M., Niwano, Y., Miyashita, K., 2012. Effects of dietary fucoxanthin on cholesterol metabolism in diabetic/obese KK-A y mice. *Lipids in Health and Disease* 11(1), 112-119.
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus bark*. *Industrial Crops and Products* 77, 590-601.
- Briglia, M., Calabró, S., Signoreto, E., Alzoubi, K., Laufer, S., Faggio, C., Lang, F., 2015. Fucoxanthin induced suicidal death of human erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 37(6), 2464-2475.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5), 965-977.
- Duxbury, A.C., Yentsch, C.S., 1956. Plankton pigment monographs. *Journal of Marine Research* 15, 91-101.
- Indrawati, R., Sukowijoyo, H., Indriat, M., Esti Wijayanti, R.D., Limantara, L., 2015. Encapsulation of brown seaweed pigment by freeze drying: Characterization and its stability during storage. *Journal of Procedia Chemistry* 14, 353-360.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Salleh, H.M., Taher, M., Miyashita, K., 2013. Isolation of fucoxanthin and fatty acids analysis of *Padina australis* and cytotoxic effect of fucoxanthin on human lung cancer (H1299) cell lines. *African Journal of Biotechnology* 10(81), 18855-18862.
- Jaswir, I., Monsur, H., 2011. Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: a review. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(33), 7146-7154.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern oceanography, UNESCO publications 48, 661p.
- Jensen, S., Liaae, N., 1959. Bacterial Carotenoids. 5. A Note on the Constitution of Rhodovibrin (OH-P481). *Acta Chemica Scandinavica* 13(10), 2143-2146.
- Jung, H.A., Ali, M.Y., Choi, R.J., Jeong, H.O., Chung, H.Y., Choi, J.S., 2016. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. *Food and Chemical Toxicology* 89, 104-111.
- Kita, S., Fujii, R., Cogdell, R.J., Hashimoto, H., 2015. Characterization of fucoxanthin aggregates in mesopores of silica gel: electronic absorption and circular dichroism spectroscopies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 313, 3-8.
- Kop, A., Durmaz, Y., 2008. The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* Heckel 1840). *Aquaculture International* 16, 117-122.
- Kraan, S., 2013. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals, Edition: 1st edition, Chapter: Pigments and minor compounds in algae, Publisher: Woodhead Publishing Ltd, Editors: Herminia Dominquez, pp. 205-251.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J., 1994. Seaweed ecology and physiology. University Press, Cambridge. 384 p.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93, 47-56.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K., 2007. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(19), 7701-7706.
- Marimuthu, J., Essakimuthu, P., Narayanan, J., Anantham, B., Tharmaraj, R., Arumugam, S., 2012. Phytochemical characterization of brown seaweed *Sargassum wightii*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 109-113.
- Martin, L.J., 2015. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment. *Marine Drugs* 13(8), 4784-4798.
- Mise, T., Ueda, M., Yasumoto, T., 2011. Production of fucoxanthin-rich powder from *Cladosiphon okamuranus*. *Journal of Food Science and Technology* 3, 73-76.
- Mori, K., Ooi, T., Hiraoka, M., Oka, N., Hamada, H., Tamura, M., Kusumi, T., 2004. Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater. *Marine Drugs* 2, 63-72.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 2002. Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments, Wiley, J., Sons (2nd Eds), New York. 705 p.
- Nakazawa, Y., Sashima, T., Hosokawa, M., Miyashita, K., 2009. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods* 1(1), 88-97.
- Oh, J.H., Kim, J., Lee, Y., 2016. Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition Research and Practice* 10(1), 42-48.
- Raguraman, V., Abraham, L.S., MubarakAli, D.,

- Narendrakumar, G., Thirugnanasambandam, R., Kirubakaran, R., Thajuddin, N., 2018. Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from *Padina tetrastromatica*: Purification, characterization and biomedical application. *Process Biochemistry* 73, 211-219.
- Sabeti Satat, Gh., Ataye salehi, E., Bolurin, Sh., 2017. Optimization of carotenoid pigments extraction from persimmon fruit (*Diospyros kaki L.*). *Journal of Food Science and Technology Iran* 14(68), 251-259. (In Persian)
- Sadeghi, N., Ojagh, S.M., Hassani, Sh., 2018. Manufacture of nanocapsules containing seaweed pigments *Sargassum* sp. Freeze drying method. The first international conference on sustainable development in agriculture, the environment, tourism and natural resources, Shiraz City: Kharazmi High School of Science and Technology, pp. 1-6. (In Persian)
- Safari, P., Rezaei, M., Shaviklo, A.R., Babakhani Lashkan, A., 2015. Optimization of extraction of antioxidants from the Persian Gulf Sea (*Chaetomorpha* sp.) using microscopy and ultrasound using surface response method. *Iranian Journal of Natural Resources* 4, 555-575. (In Persian)
- Sivagnanam, S.P., Yin, S., Choi, J.H., Park, Y.B., Woo, H.C., Chun, B.S., 2015. Biological properties of fucoxanthin in oil recovered from two brown seaweeds using supercritical CO₂ extraction. *Marine Drugs* 13(6), 3422-3442.
- Shiratori, K., Ohgami, K., Ilieva, I., Jin, X.H., Koyama, Y., Miyashita, K., Yoshida, K., Kase, S., Ohno, S., 2005. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Experimental Eye Research* 81(4), 422-428.
- Shannon, E., Abu-Ghannam, N., 2017. Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology. *Journal of Applied Phycology* 29, 1027-1036.
- Schmid, M., Stengel, D.B., 2015. Intra-thallus differentiation of fatty acid and pigment profiles in some temperate Fucales and Laminariales. *Journal of Phycology* 51(1), 25-36.
- Seely, G.R., Vidaver, W.E., Duncan, M.J., 1972. Preparative and Analytical Extraction of Pigments from Brown Algae with Dimethyl Sulfoxide. *Marine Biology* 12(2), 184-188.
- Sudhakar, M.P., Ananthalakshmi, J.S., Beena, B.N., 2013. Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5(7), 169-175.
- Vieira, F.A., Guilherme, R.J.R., Neves, M.C., Abreu, H., Rodrigues, E.R.O., Maraschin, M., Coutinho, J.A.P., Ventura, S.P.M., 2017. Single-step extraction of carotenoids from brown macroalgae using non-ionic surfactants. *Separation and Purification Technology* 172, 268-276.
- Warkoyo, W., Saati, E.A., 2011. The Solvent Effectiveness on Extraction Process of Seaweed Pigment. *Makara Journal of Technology* 15(1), 5-8.
- Wasmund, N., Topp, I., Schories, D., 2006. Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia* 48, 125-144.