شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۰

ص ۵۵۵-۵۷۵

# بهینه‌سازی استخراج عصارهٔ آنتی‌اکسیدانی از جلبک دریایی خلیج فارس (*Chaetomorpha sp*) با کمک مایکروویو و اولتراسوند و با استفاده از روش پاسخ سطح

❖ **پروا سفری:** کارشناس ارشد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
❖ **مسعود رضائی*:** استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکدهٔ علوم دریایی تربیت مدرس، شهرستان نور
❖ **امیررضا شویک‌لو:** استادیار مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی کشور
❖ **آریا باباخانی لشکان:** استادیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی صومعه‌سرا، دانشگاه گیلان

## چکیده

جلبک *Chaetomorpha sp* یکی از جلبک‌های سبز خلیج‌فارس است که می‌تواند به‌منزلهٔ منبعی دریایی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از جمله پلی‌فنول‌ها باشد. استخراج و کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و سایر مواد زیست‌فعال از منابع طبیعی و استفاده از ظرفیت‌های بومی می‌تواند موجب رشد اقتصادی و صنعتی هر منطقه شود. استخراج به کمک مایکروویو و اولتراسوند از جمله روش‌های جدید است و با مزیت‌هایی چون کاهش زمان استخراج و افزایش بهره‌وری انرژی همراه با کاهش تخریب ترکیبات هدف پتانسیل استفاده در آزمایشگاه‌ها را دارد. در این مطالعه برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک *C. sp* از طراحی مرکب مرکزی در روش مایکروویو شامل ۶ تکرار در نقطهٔ مرکزی و ۲۰ دور آزمایشی و در روش اولتراسوند از طرح باکس بنکن شامل ۶ تکرار در نقطهٔ مرکزی و ۱۷ دور آزمایشی استفاده شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی با آزمایش‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط بهینه در روش مایکروویو در قدرت ۳۰۰، زمان ۸ و غلظت استون به آب ۲۵٪ و در روش اولتراسوند در زمان ۳۰، دمای ۳۰ °C و غلظت استون به آب ۰ ٪ به دست آمد و میزان فنول به ترتیب ۱/۰۹۶ و ۱/۰۹۱ میلی‌گرم تانیک‌اسید بر گرم پودر جلبکی بود. مقادیر واقعی آزمایشی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با نرم‌افزار نیز دارای روابط منطقی بودند که نشان‌دهندهٔ تناسب مدل‌های به‌کاررفته و نیز سازگاری روش پاسخ سطح برای تعیین شرایط بهینه بوده است. همچنین، جلبک *C. sp* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود و به‌منزلهٔ منبعی از فنول‌های طبیعی قابلیت استفاده در صنایع غذایی و دارویی را خواهد داشت.

**واژگان کلیدی:** استخراج به کمک اولتراسوند، استخراج به کمک مایکروویو، پلی‌فنول‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، جلبک سبز *Chaetomorpha.sp*.

* نویسندهٔ مسئول: ۰۹۱۱۱۲۵۲۱۵۹ دورنگار: ۰۰۹۸۱۲۲۶۲۵۳۴۹۹
Email: rezai_ma@modares.ac.ir

## ۱.مقدمه

در دهه‌های اخیر، استخراج و شناسایی افزوده‌های فراسودمند[1] با منشأ طبیعی یکی از مسائل اساسی و مهم در صنعت و علم مواد غذایی بوده است. از این رو، جلبک‌ها و میکروجلبک‌ها نیز به‌منزلهٔ یکی از منابع ممکن برای استخراج این ترکیبات ارزشمند هدف مطالعات بسیاری از دانشمندان و پژوهش‌گران قرار گرفته‌اند. در کشورهای پیشرفته از جلبک‌ها به‌منزلهٔ منبعی برای استخراج ترکیبات مختلف استفاده می‌شود که می‌توان به استخراج آلژینات از جلبک‌های قهوه‌ای و آگار و کاراژینات از جلبک‌های قرمز اشاره کرد (Plaza et al., 2008). تأثیرات مثبت مصرف فیبرهای غذایی جلبک‌ها در کاهش خطر ابتلا به سرطان روده، یبوست و بیماری‌های قلبی و عروقی مرتبط با کلسترول بالا، چاقی و دیابت در مطالعات متعدد نشان داده شده است (Ganesan et al., 2011). جلبک‌ها مدت‌هاست که در کشورهای آسیایی تأمین‌کنندهٔ بخشی از سبد غذایی مردم بوده‌اند (Kuda et al., 2005؛ Nahas et al., 2007)، اما آنچه در دهه‌های اخیر بر اهمیت این منابع دریایی افزوده است تنوع محصولات ثانویه از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها در آن‌هاست که به‌منزلهٔ ترکیباتی مؤثر علیه استرس‌های اکسیداتیو در بدن انسان شناخته شده‌اند (Li et al., 2009). استرسی که طی حیات انسان و سایر ارگانیسم‌های زنده، به دلیل سوخت‌وسازهای طبیعی بدن، از طریق گروهی از اکسیژن‌های بازفعال‌شده مثل آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال بسیار مخرب هیدروکسیل و رادیکال پروکسیل به وجود می‌آید. جلبک‌ها طی چرخهٔ زندگی به میزان زیادی در برابر نور و غلظت بالای اکسیژن قرار می‌گیرند، که ترکیب این دو عامل مانند دیگر اکسنده‌های قدرتمند موجب تحریک تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. نبود آسیب‌های اکسیداتیو در ترکیبات ساختاری جلبک‌ها و نیز مقاومت آن‌ها در برابر شرایط سخت زیستگاهشان شاهدی بر وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آن‌هاست (Souza et al., 2011؛ López et al., 2011). استخراج ترکیبات زیست‌فعال در دهه‌های گذشته بیشتر مبتنی بر روش‌های سنتی بوده است. بسیاری از روش‌های استخراج چون رفلاکس، سوکسله و برخی از روش‌های جدیدتر مثل استخراج مایع فوق بحرانی، که از جمله روش‌های غالب در آزمایشگاه‌ها هستند، طی فرایند استخراج نیاز به صرف دماهای بالا و زمان‌های استخراج طولانی دارند که از معایب روش‌های فوق به شمار می‌روند و در نهایت منجر به تخریب فلاونوئیدها، مصرف بالای حلال، هزینهٔ زیاد فرایند و کاهش مقبولیت محیط‌زیستی می‌شوند. ضمن این‌که نور و اکسیژن طی استخراج فاکتورهای تشدیدکنندهٔ تخریب ترکیبات هدف‌اند (Routray Zheng et al., 2009 ; et al., 2012). بنابراین، سعی شد از روش‌های جدیدی برای استخراج بهره گرفته شود تا ضمن رفع کاستی‌های روش‌های قدیمی کارایی استخراج ترکیبات هدف نیز ارتقا یابد. قاعدهٔ کلی این فنّاوری‌ها کاهش زمان فرایند، ذخیرهٔ انرژی و ارتقای کیفیت محصول است (Chemat et al., 2011). استخراج به کمک اولتراسوند به‌منزلهٔ روشی آزمایشگاهی به طور گسترده برای استخراج ترکیبات و متابولیت‌های گیاهی به کار رفته است (Vilkhu et

1. Functional additive

al., 2008). گزارش‌های متعددی نیز در مورد کاربرد مایکروویو برای استخراج متابولیت‌های ثانویه از گیاهان، مثل پلی‌فنول‌ها از ماتریکس‌های مختلف، در میان دستاوردهای علمی محققان دیده می‌شود (Camel, 2000؛ Su et al., 2009). روشی که در مقایسه با روش‌های گذشته، ضمن حفظ انرژی، استخراج مؤثرتری (Nuchter et al., 2004) از ترکیب‌های حساس به دما را داشته باشد.

خلیج‌فارس و سواحل آن، با شرایط منحصر به فرد آب‌وهوایی، زیستگاه گونه‌های ناب و درخور مطالعه است. ثروتی خاص از منابع طبیعی که در هر یک از آن‌ها نهفته است عرصهٔ تحقیقات بسیار وسیعی برای محققان به وجود آورده است که شایستهٔ توجه است. گونهٔ مورد مطالعهٔ ما جلبک دریایی خلیج فارس *Chaetomorpha sp* بود که در فصل تابستان از سواحل بوشهر برداشت شد. این گونه از راستهٔ جلبک‌های سبز بود که در قسمت‌های بالای جزرومدی و چاله‌های کم‌عمق روی بسترهای صخره‌ای رویش دارد. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ استخراج‌شده از جلبک دریایی *Chaetomorpha sp* با کمک روش‌های جدید استخراج چون مایکروویو و اولتراسوند است. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از آزمایش‌های میزان فنول کل، فعالیت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل استفاده شد. ضمن این‌که شاخص‌های متعددی می‌توانستند به طور بالقوه کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهند که این عوامل با کمک طراحی‌ای آماری آزمایشی با عنوان روش پاسخ سطح ارزیابی شدند و در نهایت شرایط بهینهٔ استخراج در هر یک از روش‌های استخراج مایکروویو و اولتراسوند تعیین شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه از مواد شیمیایی مختلف شامل تری‌کلرید آهن[1]، پتاسیم فری‌سیانید، تری‌کلرو استیک اسید، پتاسیم هیدروژن فسفات، سدیم کربنات، اسید سولفوریک، آمونیوم هپتامولیبدات، اسید آسکوربیک، اسید تانیک، معرف فولین- سیوکالتو، رادیکال پایدار ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱ پیکریل- هیدرازیل[2] (مرک و اپلیکم و شارلو) استفاده شد. ضمن این‌که حلال‌های مصرفی از نوع مرک و با خلوص بالا بودند.

### ۱.۲. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

جلبک‌های دریایی به طور تازه از سواحل جنوبی بوشهر در منطقهٔ جزرومدی جمع‌آوری شدند و پس از شست‌وشو با آب دریا و آب شیرین و حذف باقی‌ماندهٔ اپی‌فیت‌ها، شن و ماسه در سایه خشک و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از خشک شدن با دستگاه انجماد تصعیدی[3] (OPR-FDU-7012. OPERON، کره) طی مدت زمان ۲۴ ساعت در آسیابی الکتریکی (Mulinex, La Molinette, 1000w، فرانسه) به پودر تبدیل شدند. در روش استخراج با دستگاه مایکروویو خانگی (ME3410W. Sumsung، مالزی) ۲/۵ گرم از پودر جلبکی تهیه‌شده با نسبت ۱:۲۰ (حلال: جلبک) در ۵۰ میلی‌لیتر از حلال استون در غلظت‌های ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ استون در ترکیب با آب، در سطوح مختلف

1. FeCl3-6H2O
2. DPPH
3. Freeze drier

قدرت مایکروویو ۲۰۰-۶۰۰ وات (۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ وات) و بازهٔ زمانی ۴ تا ۱۲ دقیقه (۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ دقیقه) استخراج شدند. در استخراج به کمک اولتراسوند نیز ۲/۵ گرم از پودر جلبک با ۵۰ میلی‌لیتر حلال استون در غلظت‌های مختلف (۰٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪ استون) با نسبت ۱:۲۰ (حلال: جلبک) در سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه و سه دمای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد استخراج شدند. طی زمان استخراج، حلال مورد استفاده با مبرد نصب‌شده روی دستگاه خنک شد. عصاره‌ها پس از سرد شدن در دمای اتاق (۲۶-۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد، حدود ۲۰ دقیقه) با کاغذ صافی (واتمن ۴۲) فیلتر شدند و پس از سانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه) و جدا کردن فاز بالایی محلول، در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

## ۲.۲. تعیین محتوای فنول کل[1]

برای تعیین فنول کل از روش Taga. M. silvia, 1984 استفاده شد. به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره، ۴ میلی‌لیتر $Na_2Co_3$ ۲٪ اضافه و پس از ۲ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر محلول فولین-سیوکالتو ۵۰٪ به آن اضافه شد و پس از قرار گرفتن در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Lambda-PerkinElmer precisely، امریکا) خوانده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید به گرم پودر جلبکی خشک‌شده بیان شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از محلول اسید تانیک در غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۲، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. معادلهٔ منحنی استاندارد برابر با رابطهٔ ۱ است.

$$(Y= 0.0138x, R^2= 0.9946) \quad (۱)$$

## ۳.۲. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)[2]

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های جلبکی با روش Prieto et al. (1999) اندازه‌گیری شد. ۰/۶ میلی‌لیتر نمونه با ۶ میلی لیتر محلول معرف (۰/۶مولار اسید سولفوریک، ۲۸ میلی‌مولار فسفات سدیم و ۴ میلی‌مولار آمونیوم مولیبدات) مخلوط و محلول حاصل در حمام آبی (دمای ۹۵ درجهٔ سانتی گراد) به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفت و جذب نمونه ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Lambda-PerkinElmer precisely، امریکا) خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول آسکوربیک اسید در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج بر اساس میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک‌شده بیان شد. معادلهٔ منحنی استاندارد برابر با رابطهٔ ۲ است:

$$(Y=0.0032x, R^2=0.99) \quad (۲)$$

## ۴.۲. قدرت کاهندگی آهن[3]

طبق روش Chew et al., 2008، ۱ میلی‌لیتر از عصاره به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بافرفسفات (pH=۶/۶) اضافه شد و پس از اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱٪ انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در حمامی آبی با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها پس از اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر

1. Total phenol content

2. Total antioxidant capacity
3. Ferric reducing power activity (FRAP)

تری‌کلرو استیک اسید ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و در ادامه با اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۰/۱٪ به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بالا، به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند و در نهایت جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Lambda-PerkinElmer precisely، امریکا) در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید به گرم پودر جلبکی بیان شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید تانیک در غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. فرمول منحنی استاندارد اسید تانیک برای میزان کاهندگی آهن به صورت فرمول ۳ است.

$$(Y= 0.0117x, R^2=0.9954) \qquad (۳)$$

## ۵.۲. قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH)[1]

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، طبق روش Brand-Williams et al., 1995 انجام شد. عصاره‌های مختلف به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده شد و ۱ دقیقه با دستگاه ورتکس (IKA, MS 3b، آلمان) به‌خوبی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط (۲۶-۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شد تا تغییر رنگ در آن صورت بگیرد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ( Lambda-PerkinElmer precisely، امریکا) خوانده شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رادیکالی عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه خواهد شد.

$$RSA=[1-((A_{sample}-A_{sample\ blank})/A_{control})] \qquad (۴)$$

$A_{sample\ blank}$ جذب نمونه بعد از زمان مورد نظر؛

$A_{control}$ جذب کنترل بعد از زمان مورد نظر؛

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

## ۳. طراحی آزمایش‌ها و آنالیز آماری

برای طراحی آزمایش‌ها، محاسبات و آنالیز داده‌ها و تفسیر نتایج از نرم‌افزار ( State-Ease, Inc, Design Expert (Minneapolis, MN, USA نسخهٔ ۷ استفاده شد. طراحی آزمایش در روش مایکروویو با روش پاسخ سطح[2]، در ۵ سطح در مورد ۳ متغیر و به صورت کاملاً تصادفی به منظور تعیین بهترین ترکیب متغیرهای مؤثر در فرایند استخراج برای پاسخ‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل انجام شد. طراحی آزمایش در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD)[3] و ۶ تکرار در نقطهٔ مرکزی انجام شد. مقدار آلفا (فاصلهٔ نقاط محوری از مرکز و مقادیر کدگذاری‌شده) ۲ محاسبه شد. طرح آزمایش در ۲۰ قسمت برای ۳ متغیر مورد نظر شامل زمان، سطح قدرت و غلظت استون به آب طراحی شد. هر متغیر در ۵ سطح کدگذاری‌شدهٔ $\alpha+$، ۱+، ۰، ۱-، $\alpha-$ انجام

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)

2. Response surface methodology
3. Central composite design

گرفت. در روش اولتراسوند روش پاسخ سطح در ۳ سطح در مورد ۳ متغیر شامل (دما، زمان و غلظت استون به آب) به صورت کاملاً تصادفی انجام گرفت. طراحی در قالب طرح باکس بنکن (BBD)[1] در ۱۷ مرحلهٔ مختلف و در سه سطح ۱+، ۰ ، ۱- طراحی و انجام شد. در این آزمایش‌ها برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک سبز انجام شد. محدوده و سطوح متغیرهای مستقل در هر دو روش مایکروویو و اولتراسوند به همراه مقادیر آن‌ها در جدول ۱ دیده می‌شود. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است سه فاکتور مستقل منتخب به صورت $x_1$، $x_2$، $x_3$ کدگذاری شده‌اند. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و مقادیر میانگین به‌منزلهٔ پاسخ یا متغیر پیوسته در نظر گرفته شد. برای پیش‌بینی نقطهٔ بهینه در هر پاسخ، مدلی چندجمله‌ای برای بیان روابط بین متغیرهای مستقل و پاسخ‌ها (میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) در نظر گرفته شد. برای سه فاکتور معادله چندجمله‌ای به صورت زیر است:

$$Y=\beta_0+\sum_{i=1}^{k}\beta iXi+\sum_{i=1}^{k}\beta ii\ X_i^2+\sum_{i=1}^{k-1}\sum_{j=i+1}^{k}\beta ijX_iX_j+\varepsilon$$

در این تابع Y نشان‌دهندهٔ پاسخ پیش‌بینی‌شدهٔ متغیرهای مورد آزمایش‌ها، $\beta_0$ عدد ثابت یا عرض از مبدأ، $\beta_i$، $\beta_{ii}$ و $\beta_{ij}$ ضرایب مدل رگرسیون و $X_i$ و $X_j$ متغیرهای مستقل‌اند. $X_i^2$، $X_j^2$ ... و $X_k^2$ تأثیرات مجذور متغیرها و $X_iX_j$ و $X_iX_k$ و ... تأثیرات کنش متقابل بین متغیرها و ε خطای احتمالی است. در روش پاسخ سطح این پارامترها معادله‌ای درجهٔ دوم تشکیل می‌دهند و مقادیر بهینهٔ هر یک از پارامترها و سطح حاصل از معادلهٔ درجهٔ دوم بر داده‌های برازش‌شده تعیین می‌شود سپس، نمودارهای سه‌بعدی پاسخ سطح رسم می‌شوند. برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها از آنالیز ANOVA استفاده شد و تناسب مدل‌های چندجمله‌ای با ضریب تبیین $R^2$ بیان شد. معنی‌داری آماری تمامی اجزای مدل در سطوح احتمال (p) ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ بررسی شد و در نهایت شرایط بهینه در هر روش استخراج تعیین شد.

**جدول ۱. متغیرهای مستقل و مقادیرآن ها در روش های استخراج میکروویو و اولتراسوند**

| سطوح / کدگذاری | میکروویو | | | اولتراسوند | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | (سطح قدرت، وات) $X_1$ | (زمان، دقیقه) $X_2$ | (غلظت استون به آب،٪) $X_3$ | (زمان، دقیقه) $X_1$ | (دما، درجه سانتی‌گراد) $X_2$ | (غلظت استون به آب،٪) $X_3$ |
| +α | ۶۰۰ | ۱۲ | ۱۰۰ | | | |
| +۱ | ۵۰۰ | ۱۰ | ۷۵ | ۹۰ | ۶۰ | ۱۰۰ |
| ۰ | ۴۰۰ | ۸ | ۵۰ | ۶۰ | ۴۵ | ۵۰ |
| -۱ | ۳۰۰ | ۶ | ۲۵ | ۳۰ | ۳۰ | ۰ |
| -α | ۲۰۰ | ۴ | ۰ | | | |

1. Box-Behnken design

## ۴. نتایج

### ۱.۴. بهینه‌سازی شرایط استخراج در روش استخراج مایکروویو و اولتراسوند

تعداد ۲۰ آزمایش برای بهینه‌سازی شاخص‌های مورد بررسی به صورت تصادفی انجام شد و مقادیر پاسخ‌ها در ترکیب‌های متفاوت آزمایشی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج این آزمایش‌ها نیز در جدول ۲ نشان داده شده است.

مقادیر میزان فنول کل بین ۰/۰۲۸ تا ۱/۱ میلی‌گرم تانیک اسید/ گرم پودر جلبک خشک‌شده بود. این مقادیر برای پاسخ‌های قدرت کاهندگی آهن بین ۰/۰۵۴ تا ۰/۱۲ میلی‌گرم تانیک اسید/ گرم پودر جلبک خشک‌شده و برای میزان جذب رادیکال آزاد DPPH بین ۶۱/۳۱ تا ۹۹/۵۴ درصد و در پاسخ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بین ۰/۰۲۱ تا ۰/۱۹ میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبک خشک‌شده به دست آمد. نرم‌افزار مدل‌های پیش‌بینی‌شده را به صورت معادلات رگرسیون حاصل از آنالیز واریانس (ANOVA) در مورد هر یک از پاسخ‌ها برای ما فراهم کرد که به صورت زیر است:

$$Y_{TPC}=+0.81+0.026x_1+0.008188x_2-0.27x_3+0.022x_1x_2+0.053x_1x_3+0.025x_2x_3-0.015x^2_1-0.01x^2_2-0.071x^2_3$$

$$Y_{FRAP}= +0.1+ 0.0042x_1 + 0.001234x_2 - 0.013x_3 + 0.008139x_1x_2 + 0.015x_1x_3 - 0.003469x_1^2 – 0.004448x_2^2 – 0.004814x_3^2$$

$$Y_{DPPH}=+88.52+3.73x_1+2.44x_2-8.41x_3-0.43x_1x_2+1.41x_1x_3+1.46x_2x_3+7.30x_1^2-4.83x_2^2-2.59x_3^2$$

$$Y_{TAC}=+0.13+0.002215x_1+0.0038x_2-0.045x_3+0.009352x_1x_3+0.004427x_2x_3-0.004336x_3^2$$

تأثیرات تخمینی هر یک از متغیرها به همراه آنالیز واریانس مدل‌ها در جدول ۴ قابل مشاهده است، اما نرم‌افزار برای اثبات کارایی و تناسب مدل ضریب تبیین ($R^2$)، ضریب تطابق‌یافته ($Adj.R^2$) 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 انتخاب‌شده برای پیش‌بینی پاسخ‌ها را مبنی بر مقادیر به‌دست‌آمده در شرایط واقعی توجیه می‌کند. در مورد ضرایب تبیین، مقادیری بالاتر از ۰/۸ بالا فرض شده‌اند که بستگی به شرایط آزمایش‌ها و میزان کنترل فرایند آزمایش‌ها دارد. ضرایب تبیین بالای ذکرشده برای هر پاسخ می‌تواند نشانه‌ای از توان و تناسب بالای مدل و نشان‌دهندهٔ قابلیت پیش‌بینی پاسخ‌ها از طریق مدل باشد (Ballard et al., 2010). این ضرایب در ارتباط با هم‌اند و مقادیر آن‌ها نیز باید به هم نزدیک باشد. همچنین، معنی‌داری مدل‌های انتخاب‌شده از نظر آماری به میزان p بستگی دارد و مدل‌هایی با میزان p کمتر نشان‌دهندهٔ معنی‌داری بیشتر مدل به کار گرفته شده و پارامترهای دخیل در آن است. 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. تمامی این مقادیر در جدول ۴ آورده شده‌اند. همان طور که از جدول ۴ برمی‌آید، مقادیر تمامی ضرایب تبیین بالای ۹۰٪ به دست آمده است که معنی‌داری این رگرسیون‌ها را نشان می‌دهد.

**جدول ۲. طراحی آزمایشی متغیرهای مستقل و پاسخ‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (طرح مرکب مرکزی در روش استخراج میکروویو)**

| ردیف استاندارد | شماره آزمایش | فاکتور۱ قدرت میکروویو(وات) | فاکتور۲ زمان(دقیقه) | فاکتور۳ (درصد غلظت استون/آب) | پاسخ ۱ میزان فنول کل(TPC)a | پاسخ ۲ قدرت کاهندگی آهن (FRAP)a | پاسخ۳ فعالیت جذب رادیکال آزادDPPH b | پاسخ ۴ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل(TAC) c |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۱۳ | ۳۰۰(-۱) | ۶(-۱) | ۲۵(-۱) | ۱/۰۹۶ | ۰/۱۲۲ | ۹۲/۸۵۹ | ۰/۱۸۸ |
| ۲ | ۱۸ | ۵۰۰(۱) | ۶(-۱) | ۲۵(-۱) | ۰/۹۵۱ | ۰/۰۸۵ | ۹۸/۶۹۷ | ۰/۱۶۸ |
| ۳ | ۱۴ | ۳۰۰(-۱) | ۱۰(۱) | ۲۵(-۱) | ۰/۹۸۴ | ۰/۱۰۹ | ۹۶/۰۸۹ | ۰/۱۷۸ |
| ۴ | ۹ | ۵۰۰(۱) | ۱۰(۱) | ۲۵(-۱) | ۰/۹۹۶ | ۰/۱۰۴ | ۹۹/۵۴۳ | ۰/۱۶۸ |
| ۵ | ۱۵ | ۳۰۰(-۱) | ۶(-۱) | ۷۵(۱) | ۰/۳۲۸ | ۰/۰۶۸ | ۷۰/۶۵۲ | ۰/۰۶۳ |
| ۶ | ۱۱ | ۵۰۰(۱) | ۶(-۱) | ۷۵(۱) | ۰/۴۶۳ | ۰/۰۸۹ | ۸۱/۴۴۸ | ۰/۰۸۶ |
| ۷ | ۱۹ | ۳۰۰(-۱) | ۱۰(۱) | ۷۵(۱) | ۰/۳۸۵ | ۰/۰۵۱ | ۷۹/۰۴۷ | ۰/۰۷۷ |
| ۸ | ۲ | ۵۰۰(۱) | ۱۰(۱) | ۷۵(۱) | ۰/۵۳۷ | ۰/۱۰۵ | ۸۸/۸۱۵ | ۰/۰۹۸ |
| ۹ | ۱۶ | ۲۰۰(-۲) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۶۷۴ | ۰/۰۷۷ | ۹۹/۴۳۳ | ۰/۱۲ |
| ۱۰ | ۵ | ۶۰۰(۲) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۸۰۹ | ۰/۰۹۳ | ۹۹/۸۷ | ۰/۱۳۱ |
| ۱۱ | ۱ | ۴۰۰(۰) | ۴(-۲) | ۵۰(۰) | ۰/۷۴۵ | ۰/۰۷۷ | ۶۴/۴۰۷ | ۰/۱۱۴ |
| ۱۲ | ۴ | ۴۰۰(۰) | ۱۲(۲) | ۵۰(۰) | ۰/۷۷۸ | ۰/۰۸۵ | ۷۳/۹۷۹ | ۰/۱۳۶ |
| ۱۳ | ۸ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۰(-۲) | ۱/۰۱۲ | ۰/۱۰۶ | ۹۵/۰۱۲ | ۰/۱۹۵ |
| ۱۴ | ۲۰ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۱۰۰(۲) | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۵۴ | ۶۱/۳۰۶ | ۰/۰۲۱ |
| ۱۵ | ۳ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۸۰۱ | ۰/۰۹۴ | ۸۶/۸۵۵ | ۰/۱۰۷ |
| ۱۶ | ۱۷ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۸۰۴ | ۰/۱۰۷ | ۸۹/۹۱۶ | ۰/۱۴۲ |
| ۱۷ | ۷ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۷۹۶ | ۰/۰۹۵ | ۸۷/۳۸۴ | ۰/۱۰۷ |
| ۱۸ | ۱۲ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۷۸۳ | ۰/۱۰۳ | ۸۹/۶۸۸ | ۰/۱۳۴ |
| ۱۹ | ۱۰ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۸۰۴ | ۰/۱۱ | ۸۸/۹۷ | ۰/۱۳۳ |
| ۲۰ | ۶ | ۴۰۰(۰) | ۸(۰) | ۵۰(۰) | ۰/۸۵۴ | ۰/۰۹۵ | ۸۸/۲۹۸ | ۰/۱۴۳ |

a: همه داده‌ها براساس میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک‌شده بیان شده

b: همه داده‌ها براساس درصد جذب رادیکال آزاد بیان شده

c: همه داده‌ها بر اساس میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شده

**جدول ۳. طراحی آزمایشی متغیرهای مستقل و پاسخ‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (طرح باکس بنکن در روش استخراج اولتراسوند)**

| ردیف استاندارد | شماره آزمایش | فاکتور۱ زمان (دقیقه) | فاکتور۲ دما (سانتی‌گراد) | فاکتور۳ (درصد غلظت استون/آب) | پاسخ ۱ میزان فنول کل(TPC)[a] | پاسخ ۲ قدرت کاهندگی آهن (FRAP)[a] | پاسخ۳ فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH[b] | پاسخ ۴ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل(TAC)[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۷ | (-۱)۳۰ | (-۱)۶۰ | (۰)۵۰ | ۰/۶۵۱ | ۰/۰۶۵ | ۷۸/۴۱۹ | ۰/۰۹ |
| ۲ | ۱۶ | (۱)۶۰ | (-۱)۳۰ | (۰)۰ | ۰/۹۲۶ | ۰/۰۹ | ۹۹/۰۸۶ | ۰/۱۴۶ |
| ۳ | ۱ | (-۱)۳۰ | (۱)۴۵ | (۰)۱۰۰ | ۰/۱۱۲ | ۰/۰۴۹ | ۳۳/۱۷۱ | ۰/۰۵۱ |
| ۴ | ۱۳ | (۱)۶۰ | (۱)۴۵ | (۰)۵۰ | ۰/۶۵۵ | ۰/۰۷۱ | ۶۸/۱۱۸ | ۰/۱۰۱ |
| ۵ | ۱۴ | (-۱)۶۰ | (۰)۴۵ | (-۱)۵۰ | ۰/۶۲۹ | ۰/۰۶۹ | ۶۸/۰۲۰ | ۰/۰۹۸ |
| ۶ | ۸ | (۱)۶۰ | (۰)۶۰ | (-۱)۰ | ۰/۸۹۲ | ۰/۰۷۳ | ۹۹/۵۹۶ | ۰/۲۱ |
| ۷ | ۳ | (-۱)۳۰ | (۰)۳۰ | (۱)۵۰ | ۰/۶۲۱ | ۰/۰۶۳ | ۵۷/۱۲۵ | ۰/۰۹۸ |
| ۸ | ۱۰ | (۱)۹۰ | (۰)۴۵ | (۱)۰ | ۱/۰۹۱ | ۰/۰۷۹ | ۹۸/۶۵۱ | ۰/۱۸ |
| ۹ | ۲ | (۰)۶۰ | (-۱)۶۰ | (-۱)۱۰۰ | ۰/۱۹۱ | ۰/۰۷۶ | ۲۰/۰۷۹ | ۰/۰۶۹ |
| ۱۰ | ۶ | (۰)۹۰ | (۱)۴۵ | (-۱)۱۰۰ | ۰/۰۹۵ | ۰/۰۵۴ | ۱۷/۷۸۷ | ۰/۰۵۴ |
| ۱۱ | ۱۲ | (۰)۶۰ | (-۱)۴۵ | (۱)۵۰ | ۰/۷۰۳ | ۰/۰۷۲ | ۶۸/۵۳ | ۰/۰۸۹ |
| ۱۲ | ۹ | (۰)۶۰ | (۱)۳۰ | (۱)۱۰۰ | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۴۴ | ۲۳/۵۴۶ | ۰/۱۲۷ |
| ۱۳ | ۱۱ | (۰)۹۰ | (۰)۶۰ | (۰)۵۰ | ۰/۷۲۶ | ۰/۰۷۸ | ۴۰/۶۳۷ | ۰/۱۴۲ |
| ۱۴ | ۱۷ | (۰)۳۰ | (۰)۴۵ | (۰)۰ | ۰/۹۵ | ۰/۰۷ | ۹۹/۴۷۳ | ۰/۱۲۱ |
| ۱۵ | ۵ | (۰)۶۰ | (۰)۴۵ | (۰)۵۰ | ۰/۶۸۶ | ۰/۰۷ | ۶۲/۸۰۵ | ۰/۱۰۲ |
| ۱۶ | ۴ | (۰)۹۰ | (۰)۳۰ | (۰)۵۰ | ۰/۶۳۴ | ۰/۰۶۷ | ۶۵.۱۸۱ | ۰/۱۰۴ |
| ۱۷ | ۱۵ | (۰)۶۰ | (۰)۴۵ | (۰)۵۰ | ۰/۶۲۹ | ۰/۰۶۷ | ۶۰/۴۶۸ | ۰/۱ |

a: همه داده‌ها براساس میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک‌شده بیان شده

b: همه داده‌ها براساس درصد جذب رادیکال آزاد بیان شده

c: همه داده‌ها بر اساس میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شده

**جدول ۴. نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در روش استخراج میکروویو**

| | پاسخ‌ها | | | |
|---|---|---|---|---|
| ضرایب | میزان فنول کل | قدرت کاهندگی آهن | DPPH جذب رادیکال | ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل |
| عرض از مبدأ | ۰/۸۱ | ۰/۱ | ۸۸/۵۲ | ۰/۱۳ |
| (power) $X_1$ | ۰/۰۱۸۵ | ۰/۰۱۴ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۴۵۲۹ |
| ( Time) $X_2$ | ۰/۴۰۴۷ | ۰/۴۰۹۲ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۲۰۶۸ |
| (Ac:$H_2O$ Ratio) $X_3$ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| $X_1^2$ | ۰/۱۳۳۱ | ۰/۰۱۱۶ | <۰/۰۰۰۱ | |
| $X_2^2$ | ۰/۰۰۲۷ | ۰/۰۰۲۶ | <۰/۰۰۰۱ | |
| $X_3^2$ | ۰/۰۹۱۷ | ۰/۰۰۱۵ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۶۹۹ |
| $X_1X_2$ | ۰/۰۶۷۵ | ۰/۰۰۲۱ | ۰/۲۵۹۳ | ۰/۰۳۸ |
| $X_1X_3$ | ۰/۱۹۳۹ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۰۳۹ | |
| $X_2X_3$ | <۰/۰۰۰۱ | | ۰/۰۰۳۲ | ۰/۲۹۴ |
| مدل | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| مقادیرعدم برازش | ۰/۰۸۶۴ns | ۰/۸۳۳۲ ns | ۰/۹۸۰۱ns | ۰/۹۹۰۱ns |
| ضرایب تبیین | ۰/۹۸ | ۰/۹۴ | ۰/۹۹ | ۰/۹۵ |
| ضرایب تطابق یافته | ۰/۹۷ | ۰/۹ | ۰/۹۹ | ۰/۹۳ |
| ضرایب پیش‌بینی شده | ۰/۹۲ | ۰/۸۳ | ۰/۹۹ | ۰/۹۱ |
| انحراف معیار (٪) | ۵/۱۵ | ۶/۲۹ | ۱/۱۷ | ۹/۱۳ |

علاوه بر این، مقادیر ضرایب تبیین تطابق‌یافته و ضرایب تبیین پیش‌بینی نیز با مقادیر بالای ۹۰٪ در توافقی منطقی با ضریب تبیین قرار دارند و این نشان می‌دهد که آزمایش‌ها و نیز مدل‌های منتخب برای آنالیز داده‌ها و پیش‌بینی شرایط بهینه روند درستی را دنبال کرده‌اند. از طرف دیگر، مقادیر پایین انحراف معیار شاهدی دیگر بر این معناست و تکرارپذیری مدل‌ها را نشان می‌دهد. ضمن این‌که نبود معنی‌داری مقادیر نبود برازش تأیید اعتبار مدل‌هاست (shahidi and Wanasundara, 1996). بنابراین، این نتایج نشان می‌دهد که این مدل‌ها برای پیش‌بینی شرایط بهینهٔ استخراج عصارهٔ آنتی‌اکسیدانی از جلبک *C. sp* به‌خوبی عمل خواهند کرد.

در روش اولتراسوند نیز آزمایش‌های بهینه‌سازی شاخص‌های اولیهٔ تأثیرگذار در میزان پاسخ‌های مختلف در ۱۷ آزمایش به صورت مجزا و در ۳ تکرار انجام پذیرفت. تمامی اطلاعات اولیهٔ این آزمایش‌ها به صورت کدشده و کدنشده به همراه مقادیر واقعی به‌دست‌آمده در مورد هر ۴ پاسخ مورد نظر در جدول ۳ آمده است. مقادیر میزان فنول کل بین ۰/۰۹۶ تا ۱/۰۹ میلی‌گرم تانیک اسید/ گرم پودر جلبک خشک‌شده بود. این مقادیر برای پاسخ‌های قدرت کاهندگی آهن بین ۰/۰۴۵ تا ۰/۰۹ میلی‌گرم تانیک اسید/ گرم پودر جلبک خشک‌شده و برای میزان جذب رادیکال آزاد DPPH بین ۱۷/۷۹ تا ۹۹/۶ درصد و در پاسخ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بین ۰/۰۵۱ تا ۰/۲۱ میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر جلبک خشک‌شده به دست آمد. معادلات

رگرسیون حاصل از آنالیز واریانس (ANOVA) در مورد هر یک از پاسخ‌ها با نرم‌افزار حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها به دست آمد. این معادلات در واقع به ما امکان پیش‌بینی و تخمین میزان تأثیرات هر یک از سه متغیر اولیه را در پاسخ‌ها می‌دهد که به صورت زیر است:

$$Y_{TPC}=+0.67+0.026x_1+0.03x_2-0.43x_3-0.039x_1x_3+0.046x_2x_3-0.025x_2^2-0.12x_3^2$$

$$Y_{FRAP}=+0.07+0.003952x_1+0.003415x_2-0.011x_3+0.002284x_1x_2-0.0007788x_1x_3+0.012x_2x_3-0.004591x_1^2+0.002961x_2^2-0.002128x_3^2$$

$$Y_{DPPH}=+62.39-5.74x_1-0.78x_2-37.78x_3-11.46x_1x_2-3.64x_1x_3$$

$$Y_{TAC}=+0.098+0.015x_1+0.00452x_2-0.045x_3+0.011x_1x_2-0.014x_1x_3-0.03x_2x_3-0.013x_1^2+0.024x_2^2+0.016x_3^2$$

در این معادلات Y نشان‌دهندهٔ پاسخ، $x_i$ و $x_j$ تأثیرات خطی، $x_{i,j}^2$ تأثیرات مجذور و $x_i.x_j$ تأثیرات برهم‌کنش است. همان طور که از جدول ۵ برمی‌آید، تأثیرات تخمینی هر یک از فاکتورهای اولیه و آنالیز واریانس داده‌ها در مدل‌های منتخب در مورد هر یک از پاسخ‌ها به صورت مجزا آورده شده است که مقادیر کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهندهٔ تأثیرات معنی‌دار این فاکتورهاست.

**جدول ۵. نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای مستقل در روش استخراج اولتراسوند**

| | پاسخ‌ها | | | |
|---|---|---|---|---|
| ضرایب | میزان فنول کل | قدرت کاهندگی آهن | جذب رادیکالDPPH | ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل |
| عرض از مبدأ | ۰/۶۷ | ۰/۰۷ | ۶۲/۳۹ | ۰/۰۹۸ |
| (Time) $X_1$ | ۰/۱۰۶۱ | ۰/۰۰۰۳ | ۰/۰۰۱۷ | ۰/۰۰۰۴ |
| (Tempreture) $X_2$ | ۰/۰۷۳۹ | ۰/۰۰۰۶ | ۰/۵۸۸۶ | ۰/۱۰۵۶ |
| (Ac:$H_2O$ Ratio) $X_3$ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| $X_1^2$ | | ۰/۰۰۰۷ | | ۰/۰۰۵۸ |
| $X_2^2$ | ۰/۲۵۰۸ | ۰/۰۰۷۹ | | ۰/۰۰۰۲ |
| $X_3^2$ | ۰/۰۰۰۲ | ۰/۰۳۳۳ | | ۰/۰۰۱۸ |
| $X_1X_2$ | ۰/۰۹۰۶ | ۰/۰۲۷۹ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۱۲۴ |
| $X_1X_3$ | | ۰/۳۷۷۳ | ۰/۰۹۱۶ | ۰/۰۰۴۷ |
| $X_2X_3$ | ۰/۰۵۴۹ | <۰/۰۰۰۱ | | <۰/۰۰۰۱ |
| مدل | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| مقادیرعدم برازش | ۰/۲۶۲۲ ns | ۰/۸۴۶۴ ns | ۰/۴۵۳۸ ns | ۰/۴۵۳۸ ns |
| ضرایب تبیین | ۰/۹۹ | ۰/۹۹ | ۰/۹۸ | ۰/۹۸ |
| ضرایب تطابق یافته | ۰/۹۸ | ۰/۹۷ | ۰/۹۸ | ۰/۹۷ |
| ضرایب پیش‌بینی شده | ۰/۹۳ | ۰/۹۶ | ۰/۹۶ | ۰/۸۶ |
| انحراف معیار (٪) | ۶/۹۲ | ۲/۴۱ | ۶/۳۱ | ۶/۱۹ |

ضرایب رگرسیون شامل عرض از مبدأ، تأثیرات خطی، مجذور و برهم‌کنش اجزای مدل‌ها در هر یک از پاسخ‌ها از طریق آنالیز داده‌ها در آزمایشگاه انجام شد. آنالیز آماری معنی‌داری بسیار بالای تمامی مدل‌ها را با مقادیر کمتر از ۰/۰۰۰۱ و سطح معنی‌داری رگرسیون را تا میزان بالاتر از ۹۵٪ نشان داد. این مقادیر سپس با نرم‌افزار به صورت مدل تجربی چندجمله‌ای درجهٔ دوم برای پیش‌بینی شرایط بهینه ارائه شد. در مورد روش استخراج اولتراسوند نیز مقادیر تمامی ضرایب تبیین بالای ۹۰٪ به دست آمد که معنی‌داری این رگرسیون‌ها را نشان می‌دهد. مقادیر ضرایب تبیین تطابق‌یافته و ضرایب تبیین پیش‌بینی دارای مقادیری بالای ۹۰٪ در توافقی منطقی با ضریب تبیین بودند و صحت آزمایش‌ها و نیز مدل‌های منتخب را برای آنالیز داده‌ها و پیش‌بینی شرایط بهینه اثبات کرد.

## ۵. بحث

به طور معمول روش‌های پاسخ سطح ممکن است نوعی سردرگمی در آنالیز داده‌ها ایجاد کنند، مگر این‌که با داشتن مقادیر بالای ضرایب تبیین در مورد مدل‌ها، تناسب خود را نشان دهند و این الزام بررسی میزان کارایی و تناسب مدل را به وجود می‌آورد (Zhang et al., 2011). بهینه‌سازی فرایند از طریق هر دو روش تجربی و آماری قابل دستیابی است. در گذشته رسیدن به بهینه‌سازی کامل محدودیت‌ها و هزینهٔ زمانی بالایی داشت. علاوه بر این، باعث افزایش تعداد آزمایش‌های لازم، افزایش مصرف حلال و مواد شیمیایی می‌شد و گاه ممکن بود برهم‌کنش بین عوامل تأثیرگذار در آزمایش نیز نادیده گرفته شود و شانس رسیدن به بهینه‌سازی‌ای درست را بسیار غیر محتمل کند (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005). به این دلیل RSM یا روش پاسخ سطح، ضمن این‌که ارزیابی تأثیرات چندین متغیر فرایند و برهم‌کنش آن‌ها را به طور هم‌زمان ممکن می‌کند، با داشتن مزایایی نسبت به بهینه‌سازی تک‌فاکتوری باعث صرفه‌جویی در زمان نیز می‌شود (Wang et al., 2010).

### ۱.۵. تأثیر متغیرهای فرایند

نمودارهای سه‌بعدی پاسخ سطح در واقع به شکل واضح‌تری روند تأثیر متغیرهای مستقل را در پاسخ‌های مختلف و نتایج استخراج نشان می‌دهند. این نمودارها در فضایی سه‌بعدی تأثیر هم‌زمان دو متغیر را برای مثال در میزان فنول کل نشان می‌دهند. بالاترین نقطهٔ سطح استخراج بهینه و مطلوب را نشان می‌دهد و مقادیر مربوط به هر یک از متغیرها از محورهای x و y قابل استنباط خواهد بود (Li et al., 2011). در شکل ۱ (a-f) تأثیر شاخص‌های اولیهٔ قدرت، زمان و غلظت حلال استون در میزان پاسخ‌های میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان داده شده است. بر اساس آنالیزهای صورت‌گرفته مبتنی بر نتایج و داده‌های جدول ۴، درصد غلظت استون به آب به‌منزلهٔ حلال استخراج با مقادیر $p < ۰/۰۰۱$ تأثیر اصلی را در تمامی پاسخ‌های مذکور داشته است. نمودار پاسخ سطح در شکل ۱a نشان می‌دهد که با افزایش درصد استون به آب و افزایش میزان سطح قدرت از میزان پاسخ یعنی میزان فنول کل کاسته شده است. بر اساس نمودار، بیشترین میزان پاسخ در مقادیر کمتر

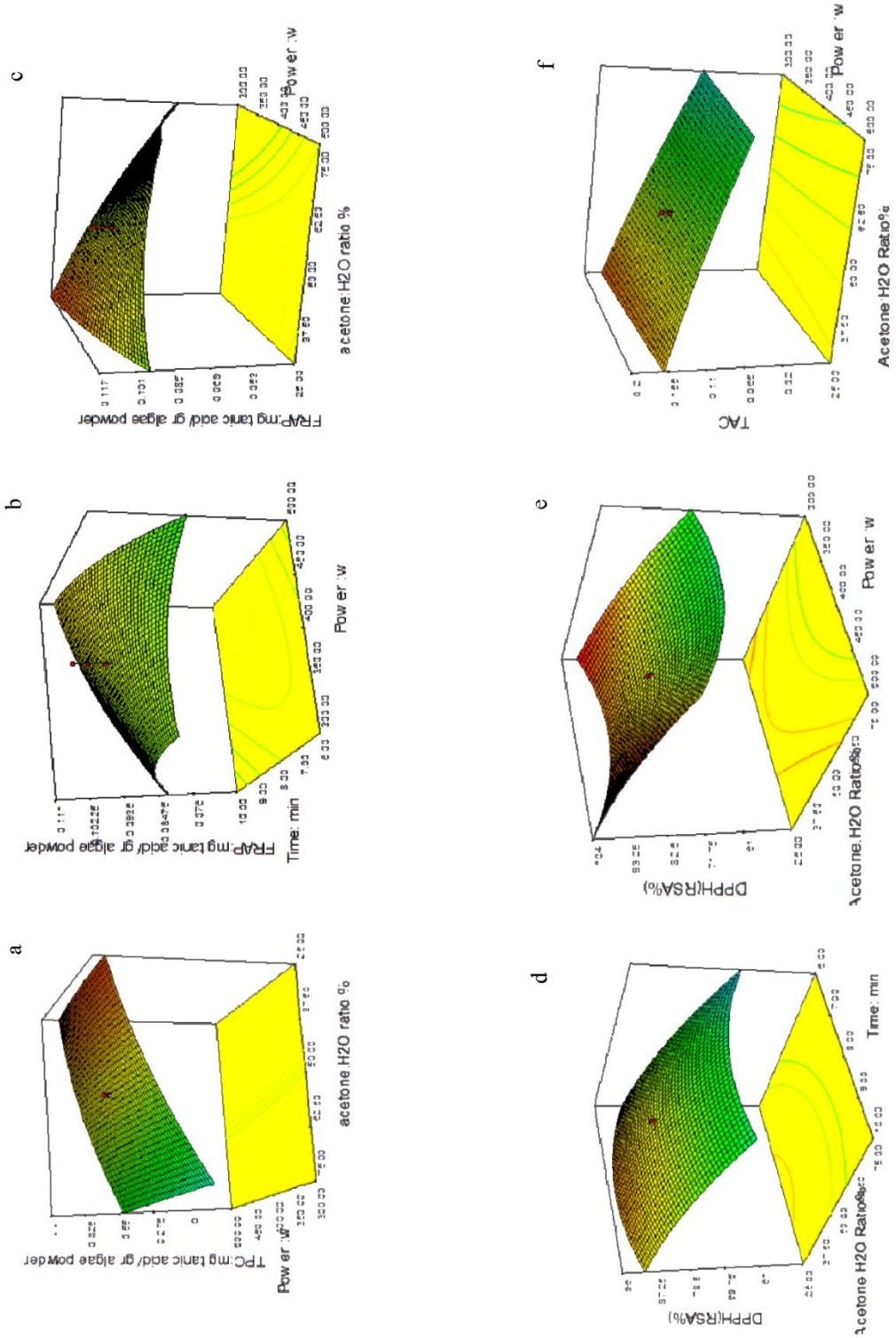
استون مشاهده می‌شود. با تغییر در غلظت حلال، که ناشی از ترکیب با درصدهای مختلف از آب است، احتمالاً تغییر در قطبیت حلال ایجاد می‌شود و در نتیجه استخراج ترکیبات فنولی با کاهش نسبت مقدار حلال به آب و در نتیجه میزان قطبیت افزایش می‌یابد و بازده استخراج ترکیبات فنولی را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، قطبیت حلال می‌تواند ترکیب ترکیبات فنولی استخراج‌شده را تحت تأثیر قرار دهد (Tabaraki and Nateghi, 2011). از طرف دیگر، زمانی که نمونه‌های خشک‌شده در معرض امواج مایکروویو قرار می‌گیرند، اندک رطوبت موجود تبخیر می‌شود که فشاری فزاینده را درون سلول‌ها ایجاد می‌کند و این فشار موجب تخریب دیواره می‌شود و در نهایت انتشار ترکیبات زیست‌فعال را به درون حلال استخراج به همراه دارد. این مهم موجب ارتقای بازده استخراج ترکیبات فنولی می‌شود (Ballard et al., 2010). در این میان، زمان نسبت به غلظت استون تأثیر کمتری در پاسخ دارد و نمودار با افزایش درصد استون به آب دارای کاهش در میزان پاسخ است. شکل ۱b تأثیر هم‌زمان زمان و قدرت را در قدرت کاهندگی نشان می‌دهد. همان طور که از نمودار استنباط می‌شود، هم‌زمان با افزایش میزان قدرت مایکروویو و افزایش زمان استخراج، میزان قدرت کاهندگی عصارهٔ استخراج‌شده افزایش یافته است. احتمالاً در دما و قدرت پایین‌تر کاهش در نرخ انتقال جرم را خواهیم داشت و همین باعث می‌شود که به زمان‌های طولانی‌تری برای انحلال ترکیبات فنولی درون حلال استخراج نیاز باشد.

قدرت مایکروویو، حلال و زمان استخراج و تأثیر هم‌زمان این فاکتورها تأثیر معنی‌داری در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل DPPH و FRAP داشته است و انتشار آنتی‌اکسیدان‌ها از ماتریکس نمونه به حلال اطرافش با افزایش زمان استخراج افزایش پیدا کرد (Krishnaswamy et al., 2012). در شکل ۱c میزان فعالیت کاهندگی آهن با افزایش غلظت استون کاهش پیدا کرد. احتمالاً زمانی که غلظت حلال افزایش یافت، قطبیت حلال تغییر پیدا کرد که منجر به افزایش نرخ استخراج ناخالصی شد و در نهایت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره را تحت تأثیر قرار داد و حتی فعالیت کاهندگی را کاهش داد. همچنین، انعقاد پروتئین‌ها ممکن است باعث افزایش مقاومت در برابر انتشار مواد به داخل حلال و منجر به میزان پایین فعالیت کاهندگی ترکیبات فنولی شود (Li et al., 2012). همچنین، 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). بر اساس داده‌های جدول ۴، زمان در میزان فعالیت کاهندگی تأثیر معنی‌دار داشته است، اما معنی‌دارترین تأثیر در میزان غلظت استون به آب ($p<۰/۰۰۱$) مشاهده شد. تأثیرات فاکتورهای اولیهٔ قدرت، زمان و میزان غلظت استون به آب در شکل‌های ۱(d-e) نشان داده شده است. بر اساس آنالیز واریانس در جدول ۴، تأثیر خطی و مجذور هر یک از این سه متغیر بسیار معنی‌دار بوده است. در نمودار ۱d با افزایش زیاد زمان کاهش میزان پاسخ را داریم، زیرا طولانی شدن بیش از حد زمان استخراج ممکن است به تخریب ترکیبات هدف منجر شود. با افزایش قدرت و کاهش

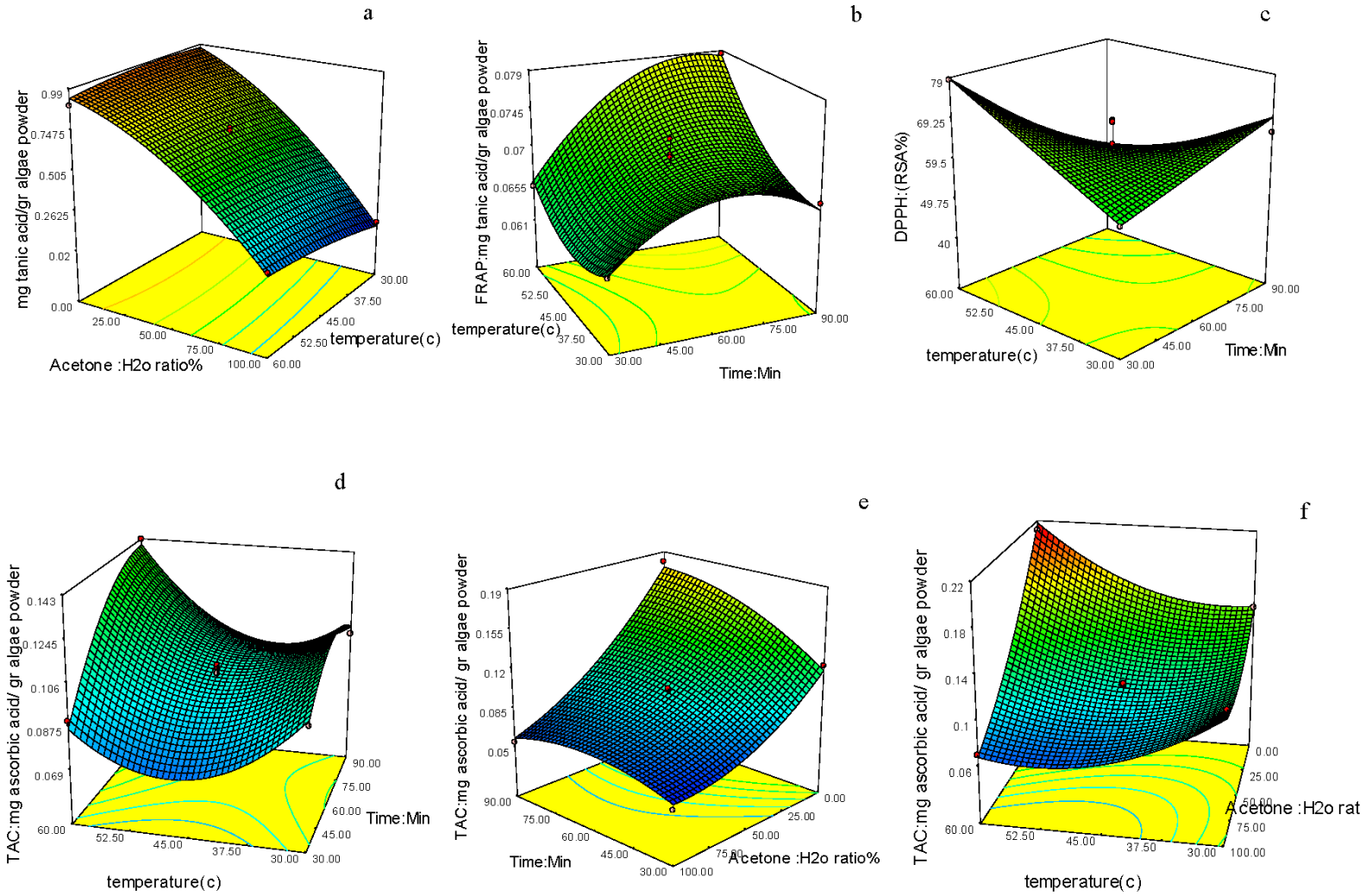
درصد استون به آب، بیشترین میزان پاسخ فعالیت جذب رادیکال آزاد DPPH مشاهده می‌شود. بر اساس نمودارها قدرت در مقایسه با غلظت استون به آب تأثیر کمتری داشته و بیشترین پاسخ در قدرت‌های کمتر و درصدهای پایین استون به آب دیده می‌شود. از شکل ۱f مشخص می‌شود که سطح قدرت تأثیر معنی‌داری در میزان پاسخ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نداشته، اما کاهش غلظت استون به آب با بیشترین میزان پاسخ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل همراه شده است. همچنین، سطح معنی‌داری فاکتورهای اولیه (جدول ۴) نشان می‌دهد که دو عامل قدرت و زمان تأثیر به نسبت کمتری را در مقایسه با غلظت حلال استخراج داشته‌اند. ترکیبات حلال نقشی اساسی در استخراج مواد جامد از تولیدات طبیعی بازی می‌کند. ترکیبات مختلف حلال می‌توانند منجر به تفاوت‌هایی در پروفایل ترکیبات فنولی و در نهایت منجر به تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها شوند (Li et al., 2012). زمانی که قطبیت حلال تغییر پیدا کند می‌تواند منجر به استخراج ناخالصی‌های بیشتر و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شود (Huang et al., 2009).

بهترین راه برای بررسی میزان تأثیر متغیرهای مستقل در پاسخ‌ها در روش اولتراسوند نیز کمک گرفتن از نمودارهای سه‌بعدی پاسخ سطح است. شکل‌های ۱(a-g) تأثیر متغیرهای اولیه را نشان می‌دهد. شکل ۲a تأثیر متغیرهای اولیهٔ دما و میزان غلظت استون به آب را در میزان ترکیبات فنولی نشان می‌دهد. همان طور که از نمودار مشخص است، کاهش درصد استون به آب و افزایش دمای استخراج باعث بیشترین میزان پاسخ فنول کل شده است. در واقع حرارت ملایم ممکن است باعث نرم شدن بافت‌های گیاهی شود و مقاومت دیوارهٔ سلولی را ضعیف کند و منجر به هیدرولیز پیوندهای بین ترکیبات فنولی و اجزای سلولی (فنول- پروتئین یا فنول- پلی‌ساکارید) شود و در نهایت حلالیت ترکیبات فنولی را افزایش دهد و منجر به استخراج بیشتر ترکیبات فنولی شود (Tabaraki and Nateghi, 2011).

افزایش دما نیز حلالیت ترکیبات هدف، سرعت نفوذ حلال و انتقال توده را افزایش می‌دهد؛ این در حالی است که ویسکوزیتهٔ حلال و کشش سطحی را کاهش می‌دهد. این کاهش ویسکوزیته باعث نفوذ بیشتر حلال به داخل ماتریکس نمونه می‌شود و استخراج ترکیبات فنولی را از طریق افزایش مناطق رویارویی نمونه با حلال افزایش می‌دهد (Hossain et al., 2011). در مطالعهٔ Zhang et al., (2011) دربارهٔ بهینه‌سازی استخراج اولتراسونیک ترکیبات فلاونوئیدی از نوعی گیاه خوراکی (*Prunella vulgaris*)، استخراج ترکیبات فنولی با افزایش دما افزایش یافت که آن را ناشی از تأثیری دانسته‌اند که افزایش درجهٔ حرارت در افزایش انتقال جرم داشته است. شکل ۲b تأثیر هم‌زمان دو متغیر دما و زمان را در میزان فعالیت کاهندگی آهن نشان می‌دهد. افزایش دما و زمان باعث افزایش میزان پاسخ قدرت کاهندگی آهن شد. ممکن است افزایش زمان باعث شود که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فرصت انحلال در حلال استخراج را داشته باشند. همچنین، 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).




**شکل ۱. نمودارهای پاسخ سطح متغیرهای وابسته میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در روش استخراج میکروویو.**




**شکل ۲. نمودارهای پاسخ سطح متغیرهای وابسته میزان فنول کل، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت جذب رادیکال آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در روش استخراج اولتراسوند.**

افزایش دما نیز معمولاً با افزایش نرخ انتقال مواد از ماتریکس نمونه به حلال همراه است. در مطالعهٔ Tabaraki et al., (2012) دربارهٔ استخراج به کمک اولتراسوند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، نتایج مشابهی ارائه شد مبنی بر این‌که هر دو عامل زمان و دما دارای تأثیر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه فعالیت قدرت کاهندگی عصاره بوده‌اند. تأثیر برهم‌کنش دو فاکتور دما و زمان در میزان فعالیت جذب رادیکال DPPHدر شکل ۲c آورده شده است. این آزمایش به طور گسترده‌ای برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به کار می‌رود. در این آزمون آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش رادیکال پایدار DPPH به دی‌فنیل پیکرازیل هیدرازیل زردرنگ است و این به توانایی اهدای هیدروژن آن مربوط است (Zhang et al., 2011). افزایش دما و کاهش زمان باعث افزایش جذب رادیکال آزاد شده است. بنابراین، بیشترین میزان جذب رادیکال آزاد در زمان کمتر و دمای بیشتر مشاهده شد. در واقع می‌توان چنین استنباط کرد هنگامی که زمان استخراج طولانی شود، احتمالاً می‌تواند منجر به تجزیهٔ شیمیایی ترکیبات هدف در عصاره شود (Huang et al., 2009). بر اساس شکل ۲d افزایش دما باعث افزایش پاسخ شده است. در شکل ۲e استون در نسبت‌های کمتر و زمان بیشتر باعث افزایش پاسخ سطح شده است. افزایش زمان استخراج ممکن است نفوذ ترکیبات هدف را به حلال استخراج افزایش دهد (Ghafoor et al., 2009). بیشترین میزان پاسخ در دماهای بالاتر و غلظت کمتر استون به آب مشاهده شد (شکل ۲f). نمودار نشان می‌دهد که استون فاکتور به نسبت معنی‌دارتری نسبت به دما بوده است. افزایش دما حلالیت و ضریب نفوذپذیری را در استخراج به کمک اولتراسوند افزایش می‌دهد (Ghafoor et al., 2009). از سوی دیگر، مقادیر مناسبی آب در حلال می‌تواند به افزایش بازده استخراج کمک کند، چون آب به افزایش حالت آبدار شدن مواد گیاهی کمک می‌کند و این به افزایش مناطق تماس حلال و نمونه منجر خواهد شد (Huang et al., 2009).

## ۲.۵. آزمایش‌های اعتبارسنجی

به منظور اثبات و اعتبارسنجی مدل‌ها، شرایط بهینه‌ای با نرم‌افزار ارائه می‌شود که بر اساس فاکتور مطلوبیت است. این شرایط بهینه با مقدار مطلوبیت بالا تضمینی برای قابلیت پیش‌بینی مدل‌هاست. در نهایت، به منظور یافتن نقاط بهینه از مجموع تأثیرات متغیرهای اولیه در میزان پاسخ‌ها، نرم‌افزار بر اساس میزان درستی عملکرد مدل‌های به‌کاررفته در پاسخ‌ها نقاط بهینه‌ای را پیش‌بینی می‌کند که این مقادیر لزوماً باید در شرایط آزمایشگاهی بررسی شوند. اختلاف کم بین داده‌های پیش‌بینی‌شده از طریق نرم‌افزار و داده‌های به‌دست‌آمده در شرایط واقعی درستی عملکرد ما را در آزمایش‌های انجام‌شده تأیید می‌کند. از جمله اولویت‌های ما برای شرایط بهینه محدویت‌های دما و زمان بود که به دلیل کاهش سطح مصرف انرژی و احتمال تجزیهٔ ترکیبات هدف در دماهای بالا و زمان‌های طولانی سطح کمینه، نسبت درصد استون به دلیل مسائل محیط‌زیستی، بحث هزینه و استفاده کمتر از حلال‌های آلی (silvia et al., 2007) به میزان حداقل در نظر گرفته شد. اگرچه افزایش سطوح زمان

و دما باعث استخراج بیشتر پلی‌فنول‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود، اما این روش‌های نوین و دوستدار محیط زیست باید تا حد امکان حداقل دما و زمان استخراج را شامل شوند (Hossain et al., 2011) و مصرف حلال را کاهش دهند (Ghafoor et al., 2009). بنابراین، این متغیرها در حد پایین نگاه داشته شد. بر اساس اطلاعات جدول ۶، مقادیری که از طریق نرم‌افزار به‌منزلهٔ شرایط بهینه پیش‌بینی شد و آنچه در شرایط آزمایشگاهی به دست آمد مشخص کرد که اختلاف کم بین داده‌های پیش‌بینی‌شده و مقادیر واقعی در آزمایشگاه صحت آزمایش‌ها و شرایط بهینه‌سازی را نشان می‌دهد و اثبات می‌کند که روش پاسخ سطح به‌درستی برای بهینه‌سازی شرایط به کار گرفته شده است.

**جدول ۶. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در روش‌های استخراج میکروویو و اولتراسوند**

| متغیرهای مستقل | | روش استخراج میکروویو | مقادیر پیش بینی شده | مقادیر واقعی |
|---|---|---|---|---|
| **سطح قدرت** | ۳۰۰ وات | **میزان فنول کل** | ۱/۰۲ | ۰/۹۸ |
| **زمان** | ۸ دقیقه | قدرت کاهندگی آهن | ۰/۱۲ | ۰/۰۸۶ |
| **درصد استون به آب** | ۲۵٪ | DPPH فعالیت جذب رادیکال | ۹۹/۱۷ | ۹۹/۳۸ |
| | | ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل | ۰/۱۸ | ۰/۱۶ |
| | | روش استخراج اولتراسوند | | |
| **زمان** | ۳۰ دقیقه | میزان فنول کل | ۰/۹ | ۰/۹۰ |
| **دما** | ۳۰ درجه | قدرت کاهندگی آهن | ۰/۰۸ | ۰/۰۷۸ |
| **درصد استون به آب** | ۰٪ | DPPH فعالیت جذب رادیکال | ۹۱/۵۹ | ۹۸/۸۳ |
| | | **ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل** | ۰/۱۲ | ۰/۱۲ |

## ۶. نتیجه‌گیری

استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به کمک روش‌های مایکروویو و اولتراسوند از جلبک سبز *Chaetomorpha sp* با روش پاسخ سطح بهینه‌سازی شد. شرایط استخراج بهینه در روش‌های مذکور به صورت زیر است:

در روش مایکروویو: قدرت مایکروویو ۳۰۰؛ زمان استخراج ۸؛ نسبت غلظت استون به آب ۲۵٪ و در روش اولتراسوند: زمان استخراج ۳۰؛ دمای استخراج ۳۰؛ نسبت غلظت استون به آب ۰٪.

تناسب بالای مدل‌ها نشان داد که مدل چندجمله‌ای درجهٔ دوم می‌تواند برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی از جلبک سبز به منظور ارتقای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به کار

رود که با بهینه‌سازی شرایط امکان حصول بیشترین محصول را همراه با کاهش در مصرف انرژی، حلال، هزینه و زمان داشت. ضمن این‌که روش‌های استخراج مایکروویو و اولتراسوند به‌منزلهٔ فنّاوری‌های جدید دوستدار محیط‌زیست مطرح می‌شوند؛ روش‌هایی که مطالعات بیشتر بر نقاط ضعف آن‌ها می‌تواند با کاهش هزینه‌های استخراج به گزینه‌های جانشین روش‌های مرسوم و سنتی منجر شود.

همچنین، نتایج نشان داد که جلبک سبز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و این مهم پتانسیلی برای بررسی کاربرد آن‌ها به‌منزلهٔ محصولاتی با ارزش افزوده در صنعت غذا و دارو است. اطلاعات به‌دست‌آمده از این مطالعه می‌تواند در بهره‌برداری از گیاهان دریایی و افزایش بهره‌وری در فعالیت‌های شیلاتی کشور به کار رود.

# References

[1]. 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.

[2]. Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S.F., 2009. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 3064-3072.

[3]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology 28, 25-30.

[4]. Camel, V., 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry 19, 229-248.

[5]. Chemat, F., Zill e, H., Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry 18, 813-835.

[6]. Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S., 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT - Food Science and Technology 41, 1067-1072.

[7]. Ghafoor, K., Ju Y. J., Jo, In. Hee., 2009. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. Journal of Agriculture and Food Chemistry 57, 4988–4994.

[8]. Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2011. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from Marjoram (*Origanum majorana*) using response surface methodology. Ultrasonics sonochemistry.

[9]. Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J., 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. Food Chemistry 114, 1147-1154.

[10]. Krishnaswamy, K., Orsat, V., Gariépy, Y., Thangavel, K., 2012. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (*Vitis vinifera*). Food and Bioprocess Technology, 1-15.

[11]. Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., Araki, Y., 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition and Analysis 18, 625-633.

[12]. Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R., 2012. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. Food Chemistry 130, 928-936.

[13]. Li, W., Wang, Z., Sun, Y.-s., Chen, L., Han, L.-k., Zheng, Y.-n., 2011. Application of response surface methodology to optimise ultrasonic-assisted extraction of four chromones in Radix Saposhnikoviae. Phytochemical Analysis 22, 313-321.

[14]. Li, Y., Qian, Z.-J., Ryu, B., Lee, S.-H., Kim, M.-M., Kim, S.-K., 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17, 1963-1973.

[15]. Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry 93, 47-56.

[16]. López, A., Rico, M., Rivero, A., Suárez de Tangil, M., 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry 125, 1104-1109.

[17]. Nahas, R., Abatis, D., Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Vagias, C., Roussis, V., 2007. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. Food Chemistry 102, 577-581.

[18]. Nüchter M, O.B., Bonrath W, Gum A, 2004. Microwave assisted synthesis – a critical technology overview. G r e e n C h e m 6, 1 2 8 – 1 4 1.

[19]. Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science & Technology 19, 31-39.

[20]. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Analytical Biochemistry 269, 337-341.

[21]. Routray, W., Orsat, V., Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. Food and Bioprocess Technology, 1-16.

[22]. Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology 55, 381-387.

[23]. Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Quintas, M.A.C., Ferreira, A.n.C.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.n.A., 2011. Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 5589-5594.

[24]. Su, X.-Y., Wang, Z.-Y., Liu, J.-R., 2009. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. Food Chemistry 117, 681-686.

[25]. Tabaraki, R., Heidarizadi, E., Benvidi, A., 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum*) peel antioxidants by response surface methodology. Separation and Purification Technology.

[26]. Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. Ultrasonics sonochemistry 18, 1279-1286.

[27]. Taga. M. silvia, M.E.E.a.P.D.E., 1984. Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. JAOCS~ vol. 61, no, 5

[28]. Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. Innovative Food Science & Emerging Technologies 9, 161-169.

[29]. Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F., 1996. Optimization of hexametaphosphateassisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. Journal of Food Science 61, 604−607.

[30]. Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., Yao, J., 2010. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina L* polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. Carbohydrate Polymers 80, 84-93.

[31]. Wang, X., Wu, Q., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., 2012. Response Surface Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from Sparganii Rhizoma and Evaluation of Their in Vitro Antioxidant Activities. Molecules 17, 6769-6783.

[32]. Zhang, G., He, L., Hu, M., 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris L.* and evaluation of antioxidant activities in vitro. Innovative Food Science & Emerging Technologies 12, 18-25.

[33]. Zheng X, W.X., Lan Y,Shi J, Jun Xue S, Liua C, 2009. Application of response urface methodology to optimize microwave-assisted extraction of silymarin from milk thistle seeds. Separation and Purification Technology 70, 34–40.