بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات ضداکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* با رفلاکس حرارتی در روش تاگوچی

زهرا نحوی[۱] و *آریا باباخانی[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، نور،
[۲]استادیار شیلات، گروه شیلات، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۷

چکیده

در این مطالعه از روش رفلاکس حرارتی برای استخراج عصاره از جلبک قهوه‌ای سارگاسوم استفاده شد. استخراج با ۳ حلال (اتانول، آب/ اتانول و آب) و در ۳ زمان (۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ دقیقه) انجام شد. آزمایش‌ها با استفاده از طرح تاگوچی در سه سطح انجام شد. میزان فنول کل و خنثی کنندگی رادیکال آزاد سنجیده شد. با توجه به نتایج، بهترین شرایط برای استخراج ترکیبات ضداکسیدانی از سارگاسوم استخراج آبی و زمان ۲۷۰ دقیقه بود. میزان فنول کل و IC_{50} در شرایط بهینه ۳۹۲ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک (GAE) و ۰/۰۰۸ میلی‌گرم عصاره بود. نتایج نشان داد که این جلبک برای استخراج ترکیبات ضداکسیدانی مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سارگاسوم، ضداکسیدان‌های طبیعی، خلیج فارس

مقدمه

امروزه علاقه به مصرف ضداکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی و دارویی به‌عنوان جایگزین ضداکسیدان‌های مصنوعی همانند بوتیل هیدروکسی تولوئن[۱]، بوتیل هیدروکسی آنیزول[۲] و ترت بوتیل

*مسئول مکاتبه: babakhani@guilan.ac.ir

1- Butylated hydroxytoluene
2- Butylated hydroxyanisole

هیدروکینون[1] با توجه به نگرانی‌هایی که درمورد امنیت غذایی وجود دارد، افزایش یافته است (حسین و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین شناسایی منابع جدید ضداکسیدانی سالم و ارزان با منشا طبیعی از اهمیت بالایی برخوردار است. گیاهان منبع اصلی ضداکسیدان‌ها در طبیعت هستند (مندیولا و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعات زیادی بر روی ضداکسیدان‌های طبیعی مستخرج از گیاهان صورت گرفته و کاربردهای آن‌ها نیز در سیستم‌های غذایی مورد آزمایش قرار گرفته است. امروزه جلبک‌ها نیز به‌عنوان منابع غنی از ضداکسیدان‌های طبیعی مورد توجه واقع شده‌اند (چو و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات نشان داده است که ماکرو جلبک‌های[2] دریایی منبع غنی ضداکسیدان‌های مختلف مثل پلی فنول هستند که می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری از اکسیداسیون به عمل آورند. فنول‌ها گروه مهمی از ترکیبات طبیعی هستند که دارای خواص ضداکسیدانی و دیگر خواص زیستی می‌باشند (آنوفرجوا و همکاران، ۲۰۱۰). یک سری از پلی فنول‌ها مثل کاتچین (گالوکاتچین، اپی کاتچین و کاتچین گالات)، فلاونول و فلاونول گلیسرول در عصاره متانولی جلبک‌های قهوه‌ای و قرمز شناسایی شده‌اند (آنوفرجوا و همکاران، ۲۰۱۰). از تحقیقات مهم انجام شده روی تعیین خاصیت ضداکسیدانی عصاره‌های جلبکی در شرایط *In vitro* می‌توان به‌طور مختصر به مطالعات انجام شده بر جلبک‌های سبز (الباکی و همکاران، ۲۰۰۹)، جلبک‌های قرمز (دوآن و همکاران ۲۰۰۶؛ جانسان و همکاران، ۲۰۰۸؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۸) و جلبک‌های قهوه‌ای (باباخانی و همکاران، ۲۰۱۶؛ چاندینی و همکاران، ۲۰۰۸؛ چکیویشویلی و رمضانف، ۲۰۰۰؛ کودا و همکاران، ۲۰۰۵) اشاره کرد.

استخراج مهم‌ترین مرحله در جداسازی و شناسایی ترکیبات زیست فعال[3] می‌باشد که معمولاً روش واحدی برای ترکیبات مختلف به‌عنوان استاندارد وجود ندارد (ایگنات و همکاران، ۲۰۱۱). به همین دلیل در تحقیقات مختلف بهینه‌سازی استخراج ترکیبات مورد توجه قرار می‌گیرد. امروزه روش‌های استخراج متفاوتی برای به‌دست آوردن ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های متداول معمولاً در دمای رفلاکس انجام می‌پذیرند (کومیاتیس و پروئستوس، ۲۰۰۸).

بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی یک روش منحصر بفرد و قدرتمند است که می‌توان با کمترین تعداد آزمایش بهینه‌سازی را انجام داد (آدویی و اوینکان، ۲۰۰۷). تاگوچی یک شکل از طرح

1- Tert butylhydroquinone
2- Macroalgae
3- Bioactive compounds

فاکتوریل شکسته شده است که به‌وسیله آن تأثیرات متغیرها در سطوح مختلف و در ترکیبات مختلف مورد سنجش قرار می‌گیرد (چیح و همکاران، ۲۰۱۰) بنابراین استفاده از این روش باعث صرفه‌جویی در وقت و هزینه انجام تحقیقات و بهبود عملکرد آن‌ها می‌شود. گونه سارگاسوم با توجه به پراکنشی که در سواحل ایران و به ویژه خلیج فارس دارا می‌باشد، می‌تواند به‌عنوان گزینه بالقوه جهت بررسی وجود ترکیباتی با خواص ضداکسیدانی مورد بررسی قرار گیرد. هدف از انجام این تحقیق بررسی فعالیت ضداکسیدانی جلبک قهوه‌ای سارگاسوم خلیج فارس و تعیین شرایط بهینه جهت استخراج ترکیبات ضداکسیدانی جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) با استفاده از روش رفلاکس ساده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) از سواحل خلیج فارس در منطقه ساحل جنوبی شهر بوشهر جمع‌آوری و با آب دریا شستشو شدند تا باقیمانده‌ی اپی‌فیت‌ها، شن و ماسه و نمک از جلبک‌ها جدا شود. سپس نمونه‌ها با آب شیرین شستشو شده و در دمای محیط و در سایه به‌مدت ۳ تا ٤ روز قرار گرفته تا خشک شوند. نمونه‌ها بعد از خشک شدن، به آزمایشگاه فرآوری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان منتقل شده و در یک دستگاه خردکن (Mulinex, La Molinett، فرانسه) به‌صورت پودر درآمدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسه‌های پلاستیکی درب‌دار و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری: نمونه‌های پودر شده ابتدا با توجه به طراحی صورت گرفته آزمایش‌ها (جدول ۱) برای هر تیمار، توزین شده و در کاغذهای صافی قرار داده شد و در ظروف دستگاه سوکسله قرار گرفت. با توجه به نسبت جلبک به حلال (۱:۲۰)، به نمونه‌ها حلال افزوده شد. استخراج با ۳ حلال (اتانول آب و مخلوط ۵۰/۵۰ آب و اتانول)، در ۳ مدت زمان استخراج (۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ دقیقه)، انجام شد. برای طراحی آزمایش‌ها از طرح تاگوچی L9 استفاده شد (Roy., 1990). پس از اتمام زمان استخراج، عصاره‌ها با کاغذ صافی (Whtman 42) فیلتر شده و تا هنگام انجام آزمایش‌های بیشتر (حداکثر تا یک هفته) در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جدول ۱- طراحی آزمایش‌ها برای استخراج ترکیبات فنولی در روش استخراج رفلاکس حرارتی.

آزمایش	حلال	زمان استخراج (دقیقه)
۱	اتانول	۹۰
۲	آب/ اتانول	۹۰
۳	آب	۹۰
٤	اتانول	۱۸۰
٥	آب/ اتانول	۱۸۰
٦	آب	۱۸۰
۷	اتانول	۲۷۰
۸	آب/ اتانول	۲۷۰
۹	آب	۲۷۰

تعیین میزان فنول کل: میزان فنول کل[1] (TPC) عصاره با استفاده از روش تاگا و همکاران (۱۹۸٤) اندازه‌گیری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ٤ میلی‌لیتر (۲ درصد) Na_2Co_3، مخلوط شد و به‌مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲٦-۲٤ درجه سانتی‌گراد) باقی ماند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو ٥۰ درصد به آن اضافه شد و پس از مخلوط شدن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی باقی ماند. جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر (Unico، آمریکا) در طول موج ۷۲۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدگالیک از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک برگرم پودر جلبکی خشک گزارش شد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH: بررسی فعالیت ضداکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل- هیدرازیل [2](DPPH)، طبق روش (برند ویلیام و همکاران، ۱۹۹٥) انجام گرفت. ۲ میلی‌لیتر از عصاره به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱٦ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول در طول موج ٥۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت

1- Total phenol content
2- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

مهارکنندگی رادیکال‌های آزادِ DPPH عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه و به‌صورت درصد RSA[1] بیان شد.

RSA%= [1-(Asample-Asample blank)/Aconrol]*100

Asample =جذب نمونه و محلول DPPH بعد از زمان موردنظر

Acontrol =جذب محلول DPPH بدون نمونه

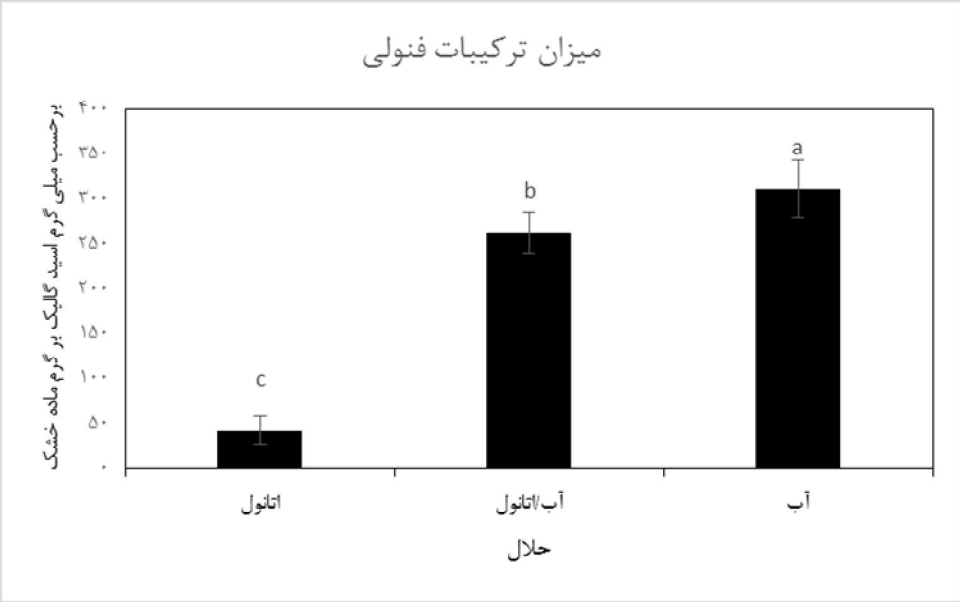
Asample blank= جذب نمونه بدون محلول DPPH

آنالیز داده‌ها: برای طراحی استخراج‌ها از نرم‌افزار Minitab (version 14) استفاده شد. طرح مورد استفاده برای انجام آزمایشات تاگوچی L9 بود. پس از تهیه عصاره‌ها، تیماری که بالاترین میزان خاصیت ضداکسیدانی را داشت، انتخاب شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها پس از بررسی نرمالیته داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنف از از آنالیز واریانس یک‌طرفه[2] و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (Microsoft office, 2010) استفاده شد.

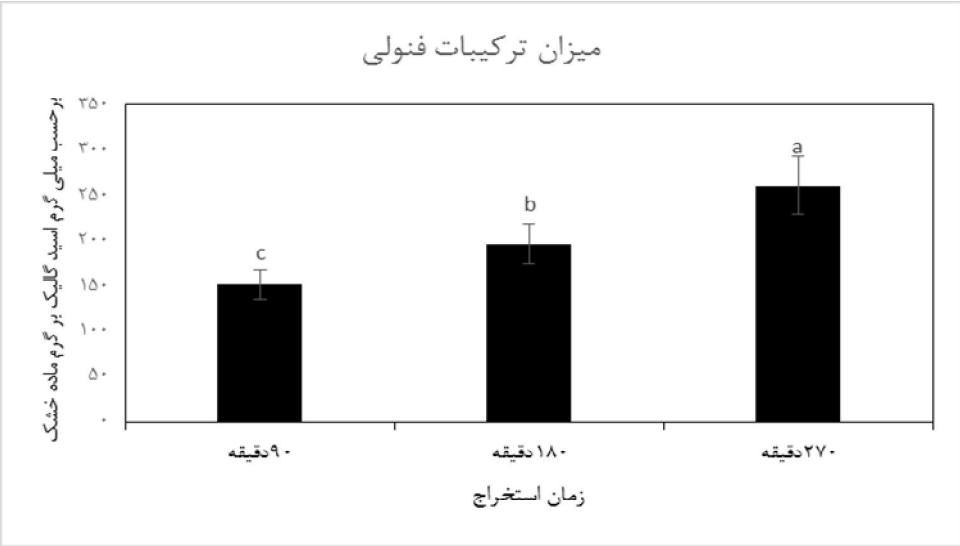
نتایج

میزان ترکیبات فنولی: ترکیبات فنولی در شکل ۱ آورده شده است. مطالعه حاضر نشان داد که میزان ترکیبات فنولی در عصاره استخراج شده با حلال آب بالاترین ترکیبات فنولی را داشت و عصاره‌های اتانولی کمترین میزان ترکیبات فنولی را داشتند ($p<۰/۰۵$).

1- Radical scavening activity
2- One-way ANOVA



شکل ۱- میزان ترکیبات فنولی (اشتباه معیار ± میانگین) بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک توسط حلال‌های آب، آب/ اتانول و اتانول. حروف مختلف نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۲- میزان ترکیبات فنولی (اشتباه معیار ± میانگین) بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک در زمان‌های در زمان‌های مختلف استخراج ۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ دقیقه. حروف مختلف نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار است.

میزان ترکیبات فنولی در زمان استخراج ۲۷۰ دقیقه بالاترین مقدار و عصاره‌های استخراج شده در زمان‌های استخراج ۱۸۰ و ۹۰ دقیقه به‌ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشته‌اند.

جدول ۲- میزان IC_{50} رادیکال‌های آزاد در آزمایش‌های انجام شده مختلف.

آزمایش	زمان استخراج (دقیقه)	حلال	میلی‌گرم عصاره
۱	۹۰	اتانول	۰/۷٤
۲	۹۰	آب/اتانول	۰/۰۲
۳	۹۰	آب	۰/۰۳۵
٤	۱۸۰	اتانول	۰/۵۹
۵	۱۸۰	آب/اتانول	۰/۰۱٦
٦	۱۸۰	آب	۰/۰۱٤
۷	۲۷۰	اتانول	۰/۳۷
۸	۲۷۰	آب/اتانول	۰/۰۱۸
۹	۲۷۰	آب	۰/۰۰۸

با توجه به نتایج جدول ۳، حلال آب/ اتانول میلی‌گرم از عصاره آبی در زمان ۲۷۰ دقیقه ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را خنثی کرد که بالاترین قدرت را در بین سایر تیمارها داشت. کمترین قدرت خنثی کنندگی در عصاره‌های اتانولی بود. عصاره‌های استخراج شده در زمان‌های استخراج ۲۷۰ دقیقه نسبت به سایر عصاره‌ها از قدرت ضداکسیدانی بالاتری برخوردار بودند.

جدول ۳- میزان IC_{50} رادیکال‌های آزاد (اشتباه معیار ± میانگین) در حلال‌ها و زمان‌های مختلف استخراج.

زمان استخراج (دقیقه)	حلال	میلی‌گرم عصاره
۹۰	-	۰/٤۱ ± ۰/۱۷
۱۸۰	-	۰/۳۳± ۰/۱٤
۲۷۰	-	۰/۲۱ ± ۰/۰۸
-	اتانول	۰/۵٦ ± ۰/۰۷
-	آب/ اتانول	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰
-	آب	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰

در بهینه‌سازی انجام شده با تاگوچی حلال آب/ اتانول دارای بالاترین قدرت ضداکسیدانی بود و ۰/۰۰ ± ۰/۰۱۸ میلی‌گرم از عصاره توانست ۵۰ درصد از DPPH را خنثی کند. همچنین زمان استخراج ۲۷۰ دقیقه بالاترین قدرت ضداکسیدانی را داشت.

بحث

فنول‌های گیاهی مهار کننده‌های رادیکال آزاد و ضداکسیدان‌های مؤثری هستند و فعالیت ضداکسیدانی میوه‌ها و چای به طور عمده از فنول‌ها و ترکیبات فنولی مشتق شده است. بنابراین ارتباط نزدیکی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت ضداکسیدانی وجود دارد (پن و همکاران، ۲۰۰۸). معمولاً انتخاب حلال‌ها برای استخراج با توجه به هدفی که وجود دارد، طبیعت ترکیبات، خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماده، قابل دسترس بودن مواد و تجهیزات انجام می‌شود (ربی و همکاران، ۲۰۱۱). در استخراج ترکیبات فنولی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنول‌ها نقش بسیار مهمی دارند (شهیدی، ۲۰۰۶). به‌طور کلی ترکیبات فنولی در حلال‌های آلی قطبی نسبت به آب محلول‌ترند و حلال‌های مورد استفاده برای استخراج هنگامی که مخلوطی آبی از متانول، اتانول و استون باشند، موثرترند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). ترکیبات جلبکی ممکن است به شیوه مشابهی همانند کاهنده‌ها، از طریق اهدا الکترون و واکنش با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به محصولات پایدار و پایان بخشیدن به واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد عمل کنند.

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان ابزاری جهت تخمین مهار رادیکال آزاد توسط ضداکسیدان به کار برده می‌شود (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۱). همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، بیشترین قدرت ضداکسیدانی به عصاره‌های آبی الکلی مرتبط می‌باشد. در حالی‌که بیشترین میزان ترکیبات فنولی در عصاره‌های آبی بود. این نتیجه بیانگر آن است که ترکیبات دیگری به‌غیر از ترکیبات فنولی نیز در قدرت ضداکسیدانی عصاره‌ها مؤثرند که در عصاره‌های آبی/ اتانولی میزان بیشتری از آن وجود دارد. فنول‌ها ضداکسیدان‌های موثری برای اسیدهای چرب چندغیراشباعی هستند. در واقع با دادن اتم هیدروژن به رادیکال‌های پروکسیل، آن را تبدیل به فرم آریلوکسیل[1] می‌کنند که توانایی عملکرد به‌عنوان حامل زنجیره و جفت شدن با دیگر رادیکال‌ها را

1- Aryloxyl

ندارد و در نتیجه سبب مهار واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد می‌گردد (سیرواردهانا و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات نشان می‌دهد که عصاره‌های جلبک قرمز هنگامی که با استفاده از آب، اتانول و متانول استخراج می‌شوند، فعالیت مهارکنندگی ضعیفی دارند. در حالی‌که عصاره‌های استونی، کلروفرمی و اتیل‌استاتی چندین جلبک قرمز فعالیت مهارکنندگی قوی را از خود نشان داده‌اند. بنابراین حلال‌هایی که برای استخراج استفاده می‌شوند، تأثیر بسیار زیادی بر ترکیبات مورد استخراج دارند (کوکس و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه‌ای که بر روی عصاره‌های جلبکی ایسلند انجام شد نیز عصاره استونی ۷۰ درصد ترکیبات بیشتری با توانایی مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH نسبت به عصاره آبی استخراج کرد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

در مطالعه‌ای که بر خواص ضداکسیدانی سه گونه جلبک قهوه‌ای صورت گرفته بود، فراکسیون آبی گونه سارگاسوم (*Sargassum marignatum*) و توربیناریا (*Turbinaria conides*) ترکیبات فنولی بالاتری نسبت به بقیه فراکسیون‌های یک گونه داشت (چاندینی و همکاران، ۲۰۰۸). شاید یکی از دلایل ممکن این باشد که استفاده از آب به‌عنوان حلال در استخراج ترکیبات ضداکسیدانی، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن ترکیبات فنولی با درجه قطبیت پایین به میزان کمتری استخراج می‌شوند و علاوه‌بر این حضور ناخالصی‌هایی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول در عصاره آبی نیز باعث اختلال در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی می‌شوند. هر چند حضور ترکیبات فوق شاید دلیلی بر افزایش فعالیت ضداکسیدانی کل در آب خالص باشد (چیرینوس و همکاران، ۲۰۰۷). در بررسی کوکس و همکاران (۲۰۱۰) نیز تفاوت معنی‌داری در فعالیت ضداکسیدانی عصاره‌های اتانولی، متانولی و استونی جلبک *P. palmata* وجود نداشت. در مطالعه‌ای که تأثیر حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، آب/ متانول) بر ترکیبات فنولی یک گونه جلبک مورد آزمایش قرار گرفت، آب بالاترین خاصیت ضداکسیدانی و فنول کل را داشت و حلال آب/ متانول نیز پس از آب دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود (لوپز و همکاران، ۲۰۱۱). در چای مخلوط اتانول و آب برای استخراج فلاونوئیدها بسیار مؤثرتر از متانول و استن بود (وانگ و هلیول، ۲۰۰۱)، ولی آب برای استخراج کاتچین‌ها بسیار مؤثرتر از متانول ۸۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد بود (کوخار و مگنوسدوتی، ۲۰۰۲). متانول استفاده شده برای پلی فنول‌های چای (یائو و همکاران، ۲۰۰٦) و استن ۵۰ درصد برای استخراج پلی فنول‌های گندم از آب کارامدتر بود (ژو و یو، ۲۰۰٤). مانند دیگر تحقیقات انجام گرفته در این آزمایش نیز حلال نقش موثری در میزان ترکیبات فنولی داشت.

ترکیبات فنولی موجود در عصاره به شدت تحت تأثیر زمان استخراج می‌باشد (روساک و همکاران، ۲۰۰۸). هنگامی‌که قصد کاهش هزینه‌های فرایند استخراج را داشته باشیم، دما و زمان دو فاکتور مهم برای بهینه‌سازی محسوب می‌شوند. در استخراج با روش‌های مختلف داده‌های مختلفی وجود دارد که بعضی از آن‌ها زمان‌های کوتاه‌تر استخراج را و تعدادی زمان‌های بلندتر را مناسب‌تر دانسته‌اند (پینلو و همکاران، ۲۰۰۵؛ اسپینگو و همکاران، ۲۰۰۷). در زمان استخراج‌های بالاتر میزان ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت. همچنین میزان خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد نیز با افزایش زمان استخراج در ۲۷۰ دقیقه به بالاترین حد رسید.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ترکیبات پلی‌فنولی جلبک‌ها ضداکسیدان‌های طبیعی موثری جهت جلوگیری از اکسیداسیون و صدمه رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها می‌باشند. بنابراین این ترکیبات پتانسیل استفاده در صنایع غذایی و دارویی را دارا می‌باشند. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان اظهار داشت که جلبک قهوه‌ای سارگاسوم منبع مناسبی برای استخراج ترکیبات زیست فعال بوده و با توجه به وفور این‌گونه در آب‌های خلیج فارس و عدم استفاده از این منبع، بهره‌برداری از این جلبک و دیگر جلبک‌های خلیج فارس امری مناسب و ضروری به‌نظر می‌رسد.

منابع

1. Adewuyi, Y.G., and Oyenekan, B.A. 2007. Optimization of a Sonochemical Process Using a Novel Reactor and Taguchi Statistical Experimental Design Methodology. Industrial and Engineering Chemistry Research. 46: 411-420.
2. Babakhani, Aria, KH Sabeena Farvin, and Charlotte Jacobsen. 2016. Antioxidative effect of seaweed extracts in chilled storage of minced Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): effect on lipid and protein oxidation." Food and bioprocess technology. 9(2): 352-364.
3. Chandini, S.K., Ganesan, P., and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107(2): 707-713.
4. Cheah, E.L.C., Heng, P.W.S., and Chan, L.W. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of active principles from Magnolia officinalis using the Taguchi design. Separation and Purification Technology. 71(3): 293–301.
5. Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz and amp; Pavón) tubers. Separation and Purification Technology, 55(2): 217-225.

6.Chkhikvishvili, I.D., and Ramazanov, Z.M. 2000. Phenolic Substances of Brown Algae and Their Antioxidant Activity. Applied Biochemistry and Microbiology. 36: 289-291.
7.Cho, M., Lee, H.S., Kang, I.J., Won, M.H., and You, S. 2011. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. Food Chemistry. 127: 999-1006.
8.Cox, S., Abu-Ghannam, N., and Gupta, S. 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. International Food Research Journal. 17: 205-220.
9.Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., and Wang, B.G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, Polysiphonia urceolata. Food chemistry. 95: 37-43.
10.El-Baky, A., El-Baz, H.H., and El-Baroty, F.K. 2009. Natural preservative ingredient from marine alga Ulva lactuca L. International Journal of Food Science and Technology. 44: 1688-1695.
11.Ganesan, P., Kumar, C.S., and Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technology. 99: 2717-2723.
12.Ganesan, K., Kumar, K.S., and Rao, P.V.S. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 12: 73-78.
13.Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., and Barry-Ryan, C. 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana L.*) using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry. 19: 582-590.
14.Khokhar, S., and Magnusdottir, S.G.M. 2002. Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. Journal of Agricultural and Food chemistry. 50: 565-570.
15.Kuda, T., Tsunekawaa, M., Goto, H., and Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition Analytical. 18: 625-633.
16.Kumar, K.S.K., Ganesan, and Rao, P.V.S. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. Food Chemistry. 107: 289-295.
17.Lim, S.N., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C., and Ang, P.O. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 3862–3866.
18.López, A., Rico, M., Rivero, A., and Suárez de Tangil, M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry, 125(3): 1104-1109.

19.Mendiola, J.A., Rodríguez-Meizoso, I., Señoráns, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., and Ibáñez, E. 2008. Antioxidants in plant foods and microalagae extracted using compressed fluids. Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry. 7: 3301-3309.
20.Naczk, M., and Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 1523–1542.
21.Onofrejova, L., Vasickova, J.V., Klejdus, B., Stratil, P., Misurcova, L., Kracmar, S., Kopecky, J., and Vacek, J. 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 51: 464-470.
22.Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., and Ji, X. 2008. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan Lour*.) peel. Food Chemistry. 106: 1264-1270.
23.Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., and Núñez, M.J. 2005. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 2111-2117.
24.Rebey, I.B., Bourgou, S., Debez, I.B.S., Karoui, I.J., Sellami, I.H., Msaada, K., Limam, F., and Marzouk, B. 2011. Effects of Extraction Solvents and Provenances on Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum L*.) Seeds. Food and Bioprocess Technology. 5: 2827-2836.
25.Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., and Kovač, M. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. Food Chemistry. 110: 852-858.
26.Siriwardhana, N., Lee, K.W., Jeon, Y.J., Kim, S.H., and Haw, J.W. 2003. Antioxidant Activity of *Hizikia fusiformisa* on Reactive Oxygen Species Scavenging and Lipid Peroxidation Inhibition. Food Science and Technology International. 9: 339-346.
27.Spigno, G., Tramelli, L., and De Faveri, D.M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of food engineering. 81: 200-208.
28.Taga, M.S., Miller, E.E., and Pratt, D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of American Oil Chemist's Society. 61: 928–931.
29.Wang, H., and Helliwell, K. 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. Food Research International. 34: 223-227.
30.Wang, T., Jónsdóttir, R., and Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry. 116: 240-248.

31.Yao, L.H., Jiang, Y.M., Caffin, N.D., Arcy, B., Datta, N., and Liu, X. 2006. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. Food Chemistry. 96: 614-620.
32.Zhang, G., He, L., and Hu, M. 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. Innovative Food Science and amp; Emerging Technologies, 12(1): 18-25.Zhou, K., and Yu, L. 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. LWT- Food Science and Technology. 37: 717-721.