



دانشگاه گوارا، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی

بهره‌برداری و پرورش آبزیان

جلد نهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۹

۱-۱۳

<http://japu.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/japu.2020.17414.1527

مقاله کامل علمی - پژوهشی

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با روش امواج فراصوت از گیاه آزولا *Azolla filiculoides*

شهاب نقدی^۱ و آریا باباخانی^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران،

^۲ استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷

چکیده

در مطالعه حاضر برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گیاه آبزی آزولا *Azolla filiculoides* از روش امواج فراصوت و بهینه‌سازی تاگوچی استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که زمان التراسوند تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی (TPC) استخراج شده و خشتی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH ندارد ($P > 0/05$). بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنولی از مخلوط حلال‌های اتانول با آب و هم‌چنین در نسبت ۱/۱۵ ماده خشک به حلال حاصل شد ($P < 0/05$). درصد خشتی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در تیمارها دامنه گسترده‌ای را نشان داد، به طوری که در زمان ۱۵ دقیقه بالاترین میزان (۷۵/۵ درصد) را نشان داد ($P > 0/05$). هم‌چنین این شاخص در عصاره اتانولی با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بود ($P < 0/05$). در بهینه‌سازی تاگوچی مقایسه میانگین داده‌ها پس از طراحی آزمایش‌ها انجام شد. با توجه به بررسی نتایج مشخص عصاره اتانولی در مدت زمان ۱۵ دقیقه با نسبت ۱ به ۱۰ ماده خشک به حلال به‌عنوان تیمار بهینه انتخاب شد. نتایج نشان داد که گیاه آزولا می‌تواند به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی کم‌هزینه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، استخراج حلالی، فراصوت، گیاه آزولا

* مسئول مکاتبه: aria_babakhani@yahoo.com

مقدمه

امروزه روش‌های متنوعی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها شامل روش‌های مرسوم مانند استخراج حلالی، استخراج با آب داغ و روش‌های نوینی مانند استخراج با استفاده از امواج فراصوت، استخراج آنزیمی، استخراج با حلال فوق بحرانی می‌باشند (نیانگ و همکاران، ۲۰۱۷؛ میدنا-تورس و همکاران، ۲۰۱۷؛ گلداسمیت و همکاران، ۲۰۱۸). هر کدام از روش‌های ذکرشده دارای مزایا و معایبی هستند که از معایب روش‌های مرسوم می‌توان به آلودگی‌های زیست‌محیطی، هزینه‌های مربوط به تهیه حلال، طولانی بودن زمان انجام فرایند و بازده پایین آن اشاره کرد؛ در مقابل روش‌های نوین با کاهش دادن معایب روش‌های مرسوم از طریق افزایش دادن بازده استخراج و کوتاه کردن زمان انجام فرایند باعث بهبود استخراج ترکیبات زیست‌فعال شده از منابع مختلف شده‌اند (اسپادا بیلدو و همکاران، ۲۰۱۷؛ وونگ و همکاران، ۲۰۱۴؛ میدنا-تورس و همکاران، ۲۰۱۷). امواج فراصوت روش نوینی است که امروزه در طیف گسترده‌ای از پژوهش‌ها برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال مورد استفاده قرار گرفته است. امواج فراصوتی که از دستگاه‌های التراسوند تولید می‌شوند با توجه به توان تعریف شده برای دستگاه انرژی مختلفی دارند که این امواج وقتی به دیواره سلولی منبع موردنظر برخورد می‌کنند باعث آسیب دیدن دیواره شده و خروج ترکیبات مؤثره موردنظر از محتوای سلولی می‌شود (خان و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۷؛ میدنا-تورس و همکاران، ۲۰۱۷). شاخص‌های متفاوتی برای تأثیرگذاری در فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال به‌وسیله امواج فراصوت وجود دارند. از این عوامل می‌توان به زمان فرایند، نسبت ماده خشک به حلال موردنظر، حلال‌های مختلف، قدرت دستگاه اشاره کرد. هر کدام از موارد

ذکر شده به‌نحوی بر پروسه فرایند تأثیرگذار هستند که این تأثیرگذاری ممکن است باعث بهبود بازده فرایند و یا باعث کاهش فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال شوند. در همین راستا بررسی تأثیر تمامی عوامل بر فرایند استخراج بسیار سخت و پیچیده بوده که باعث بررسی تیمارهای بسیار زیادی می‌شود، از این‌رو برای کاهش تیمارها روش‌های آماری توسعه داده شده‌اند که روش بهینه‌سازی تاگوچی یکی از این روش‌ها است. طرح بهینه‌سازی تاگوچی یک طرح فاکتوریل شکسته شده است که به‌وسیله آن تأثیرهای متغیرها در سطوح مختلف و در ترکیبات مختلف سنجیده می‌شود (میدنا-تورس و همکاران، ۲۰۱۷؛ ساها و همکاران، ۲۰۱۱؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۷). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی یکی از ترکیبات زیست‌فعال هستند که امروزه مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها با توجه به فعالیت و ویژگی‌های منحصربه‌فردی که دارند در سیستم‌های غذایی و دارویی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد شده از سوبستراهای مختلف و احیای آن‌ها از بروز سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی در سیستم‌های جانوری جلوگیری می‌کنند و همچنین با جلوگیری یا به تعویق انداختن فرایند اکسیداسیون در سیستم‌های غذایی باعث افزایش طول دوره نگهداری مواد غذایی می‌شوند (اسپادا بیلدو و همکاران، ۲۰۱۷؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۷). امروزه با توجه به مشکلات و عوارض مربوط به مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مثل BHT و BHA علاقه به مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و جایگزینی آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بیش از گذشته است (آمادو و همکاران، ۲۰۱۴؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۷). با توجه به معایب ذکرشده در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک یافتن منابع جدید گیاهی سالم و ارزان برای استخراج این ترکیبات یکی از مسائل مهم علمی پژوهش‌های حال حاضر دنیا می‌باشد.

همکاران، ۲۰۱۷). جنس آزولا با داشتن ۷ گونه که به (سرخس پشه‌ای) یا سرخس آبی مشهور است یک سرخس آبی کوچک است که به صورت طبیعی در رودخانه‌ها، برکه‌ها، کانال‌ها و مزارع شالیکاری که دارای آب راکد است، می‌روید. به دلیل تراکم بالای تولید، آزولا به عنوان غذای دام، طیور و ماهی استفاده می‌شود (دجیسو و همکاران، ۲۰۱۷). میزان پروتئین گیاه آزولا در حدود ۲۰-۳۰ درصد می‌باشد که در مقایسه با پروتئین سویا که ۴۰ درصد است بسیار مناسب است به همین دلیل در کشورهای مختلفی مثل چین، کره جنوبی، ژاپن به عنوان غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد (نیاک و پادهی، ۲۰۱۷). این گیاه که به منظور اهداف مدیریتی به کشور وارد شد و در طی مدت کوتاهی به یکی از مشکلات زیست‌محیطی کشور تبدیل شده است (نظام‌آبادی و انصاری، ۲۰۰۸). در همین راستا روش‌های متفاوتی برای کاهش اثرات زیست‌محیطی این گیاه مورد استفاده و بررسی قرار گرفته است که در پژوهش حاضر از گیاه آزولا به عنوان منبعی بدون هزینه برای استخراج ترکیبات فنولی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: گونه *Azolla filiculoides* در اوایل فصل بهار سال ۱۳۹۷ از تالاب انزلی در منطقه انزلی با استفاده از ساچوک جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه با آب شیرین شستشو شده و آلودگی آن‌ها گرفته شد. سپس در دمای ۶۰ درجه به مدت ۷۲ ساعت کاملاً خشک شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در جای دسیکاتور نگهداری شدند.

عصاره‌گیری: ابتدا نمونه‌های آزولا خشک شده با آسیاب (مولینکس، AR 10 ساخت کشور فرانسه)

نحوه عصاره‌گیری از گیاهان، به عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، بسیار مهم است. اندام‌های گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده می‌تواند بر کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تأثیر بگذارد. از این جهت تجربیات متعددی جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده است. هم‌چنین انتخاب روش استخراج به نوع بافت گیاهی نیز بستگی دارد (نیپورنارم و همکاران، ۲۰۱۸؛ تیان و همکاران، ۲۰۱۸). مطالعات زیادی بر روی گیاهان خشکی و آبی انجام شده است و کاربردهای مختلف آن‌ها در صنایع غذایی مورد بررسی قرار گرفته است (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۸؛ میدنا-تورس و همکاران، ۲۰۱۷). یکی از شاخه‌های آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنولی هستند که به مقدار فراوان در گیاهان یافت می‌شوند. وجود ترکیبات فنلی ممکن است مستقیماً در اثر آنتی‌اکسیداتیو نمونه دخیل باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۱). مکانیسم عمل ترکیبات فنلی گیاه که به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند عمدتاً شامل فعالیت جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد، خصوصیات ژلات‌کنندگی فلز، توانایی تنظیم بیان ژن و نقش کوآنتی‌اکسیدانی است (تبارت و همکاران، ۲۰۰۷؛ میلوناکی و همکاران، ۲۰۰۸). پلی‌فنول‌های گیاهان خشک‌زی از گالیک اسید^۱ و الاگیک اسید^۲ مشتق می‌شوند و در گیاهان دریایی ترکیبات فنولی شامل دو ترکیب اصلی فلوورتانین^۳ و مانیتول^۴ است. ترکیبات فنولی یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که میزان و تنوع آن‌ها در حین رشد گیاهان تحت تأثیر ژنتیک، شرایط رشد، پرورش و عوامل آب و هوایی است (ساویک و همکاران، ۲۰۱۹؛ ژو و همکاران، ۲۰۱۹؛ ساهین و

- 1- Gallic acid
- 2- Ellagic acid
- 3- Phlorotannins
- 4- Mannitol

درصد به آن اضافه شد و پس از مخلوط شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تاریک باقی ماند. جذب نمونه با اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۲۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH:

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۳و۲ دی فنیل ۱ پیکریل- هیدرازیل DPPH طبق روش براند- ویلیام و همکاران (۱۹۹۵) انجام گرفت. دو میلی‌لیتر از عصاره به دو میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی‌مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس بادور rpm ۲۵۰۰ به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر خوانده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره مطابق رابطه زیر محاسبه و به صورت درصد RSA بیان شد.

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

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

A_{control} = جذب محلول DPPH بدون نمونه

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

و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آزمایش‌ها کنترل طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف از تجزیه واریانس یکطرفه آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزارهای SPSS 20 و MINITAB 14 استفاده شد. از نرم‌افزار Excel 2016 برای رسم نمودارها استفاده گردید.

به صورت پودر درآورده شدند. سپس با توجه به طراحی صورت گرفته آزمایش‌ها (جدول ۱) برای هر تیمار، نمونه‌ها توزین شده و در ظرف شیشه‌ای (بالن شیشه‌ای) استخراج ریخته شدند. با توجه به نسبت آزولا به حلال (۱/۱۰، ۱/۱۵، ۱/۲۰ (W/V)) به نمونه‌ها حلال افزوده شد. استخراج با ۳ حلال (اتانول، آب و مخلوط اتانول / آب (۵۰/۵۰)) در سه مدت زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انجام شد. توان دستگاه فراصوت برای تیمارها ثابت ۴۰۰ وات و قدرت دستگاه نیز ثابت ۱۵ کیلوهرتز بود. برای جلوگیری از ورود ذرات به عصاره‌ها، عصاره‌های به دست آمده اوسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ صافی شدند.

میزان فنول کل (TPC): میزان فنول کل (TPC) عصاره با استفاده از روش (تاگا و همکاران، ۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴ میلی‌لیتر Na_2CO_3 ۲ درصد مخلوط شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲۶ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) باقی ماند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتو ۵۰

تجزیه و تحلیل آماری برای طراحی استخراج‌ها از نرم‌افزار Minitab (version 14) استفاده شد. طرح مورد استفاده برای انجام آزمایش‌های تاگوجی L9 بود. پس از تهیه عصاره‌ها، تیماری که بالاترین میزان ویژگی آنتی‌اکسیدانی را داشت، انتخاب شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی از آنالیز واریانس یکطرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. به منظور تجزیه

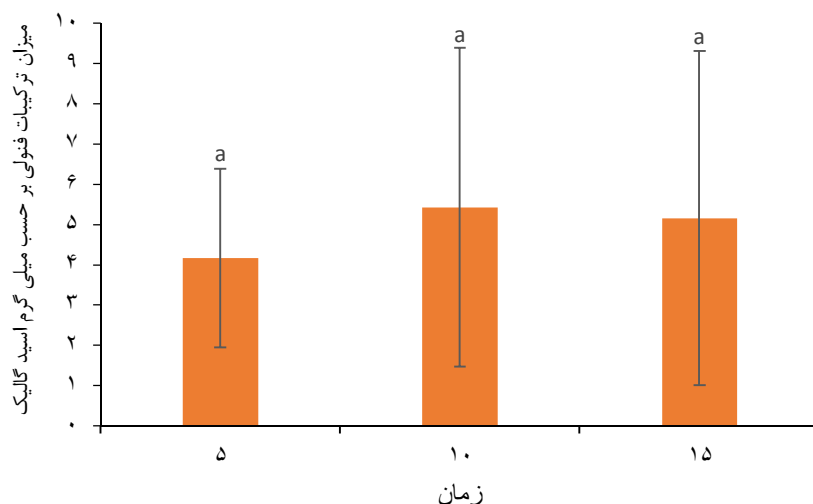
جدول ۱- طراحی آزمایش‌ها برای استخراج ترکیبات فنولی به روش امواج فراصوت.

نسبت	زمان (دقیقه)	نسبت ماده خشک به حلال (W/V)	آزمایش
۱/۱۰	۵	اتانول	۱
۱/۱۵	۵	آب/اتانول	۲
۱/۲۰	۵	آب	۳
۱/۱۵	۱۰	اتانول	۴
۱/۲۰	۱۰	آب/اتانول	۵
۱/۱۰	۱۰	آب	۶
۱/۲۰	۱۵	اتانول	۷
۱/۱۰	۱۵	آب/اتانول	۸
۱/۱۵	۱۵	آب	۹

نتایج

میزان ترکیبات فنولی: میزان ترکیبات فنولی در زمان‌های مختلف استخراج ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان ترکیبات فنولی در زمان ۱۰ دقیقه با مقدار ۵/۴۱ بر حسب میلی گرم اسید گالیک بیش تر از سایر زمان‌ها بود و در زمان ۵ دقیقه کم‌ترین مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده مشاهده شد ($P > 0/05$).

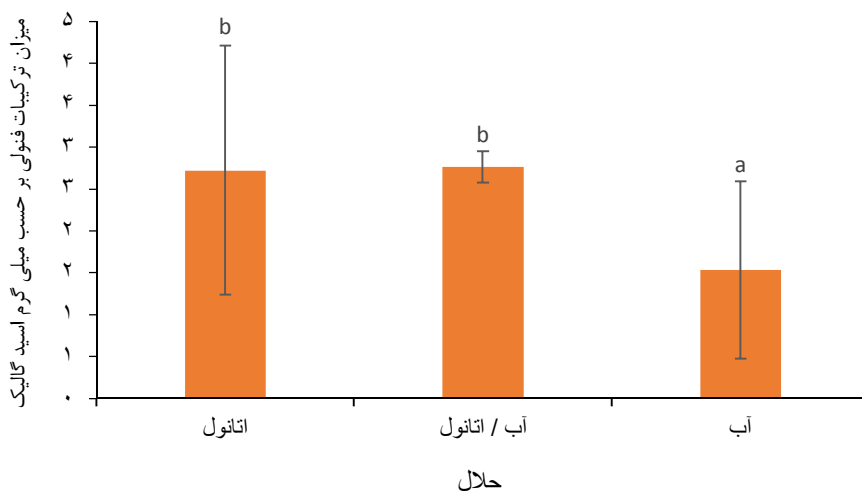
تجزیه و تحلیل آماری: پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف، برای آنالیز داده‌ها از آزمون وان وی آنووا استفاده شد سپس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت.



شکل ۱- میزان ترکیبات فنولی در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) به روش امواج فراصوت. نتایج بر حسب انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است. - حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

یعنی عصاره اتانول / آب بود در حالی که اختلاف معنی‌داری با عصاره اتانولی نداشت ($P > 0/05$)، در حالی که با عصاره آبی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < 0/05$).

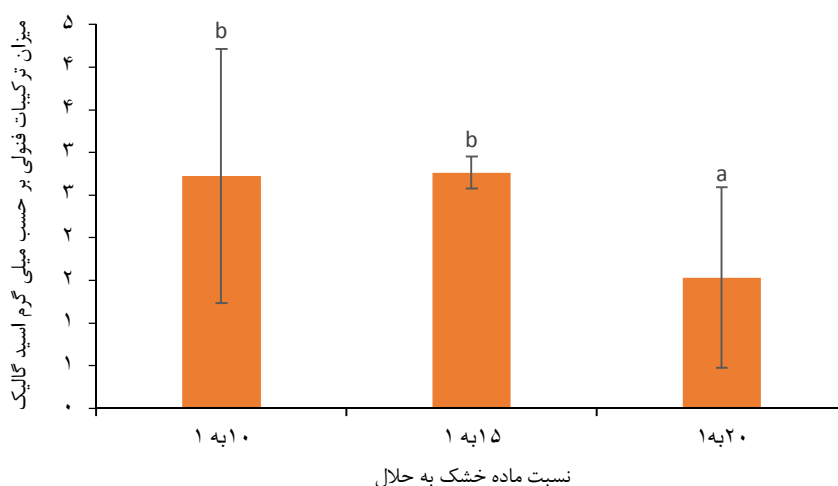
ترکیبات فنولی در عصاره‌های اتانول، اتانول / آب و آب در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طوری که از شکل ۲ پیداست بیش‌ترین مقدار استخراج در مخلوط حلال‌ها



شکل ۲- میزان ترکیبات فنولی در حلال‌های مختلف (اتانول، آب / اتانول و اتانول) به روش امواج فراصوت. نتایج بر حسب انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است. - حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

نسبت ۱/۱۵ مشاهده شد در حالی که اختلاف معنی‌داری با نسبت ۱/۱۰ نداشت ($P > 0/05$)، در حالی که اختلاف معنی‌داری با نسبت ۱/۲۰ داشت ($P < 0/05$).

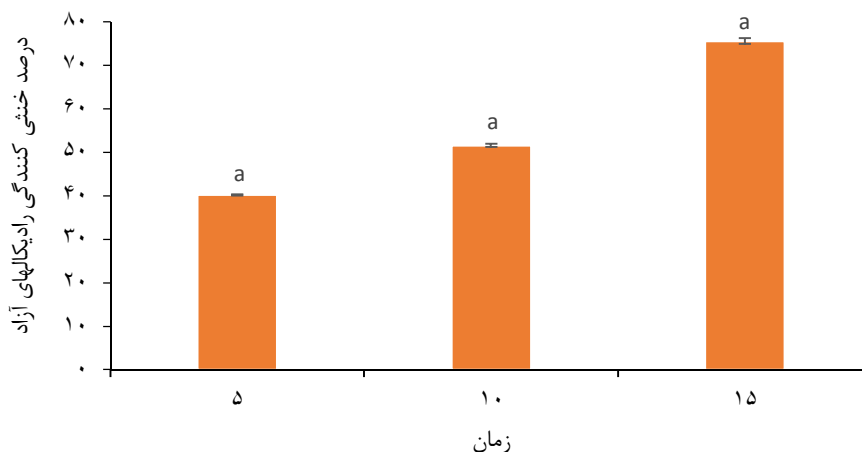
در شکل ۳ میزان ترکیبات فنولی استخراج شده توسط نسبت‌های مختلف ۱/۱۰، ۱/۱۵ و ۱/۲۰ آورده شده است. همان‌طوری که از شکل ۳ پیداست بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده در



شکل ۳- میزان ترکیبات فنولی در نسبت‌های مختلف ۱/۱۰، ۱/۱۵ و ۱/۲۰ به روش امواج فراصوت. نتایج بر حسب انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است. - حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

پیداست بیشترین درصد خشی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در زمان ۱۵ دقیقه مشاهده شد و با سایر مقادیر اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0.05$).

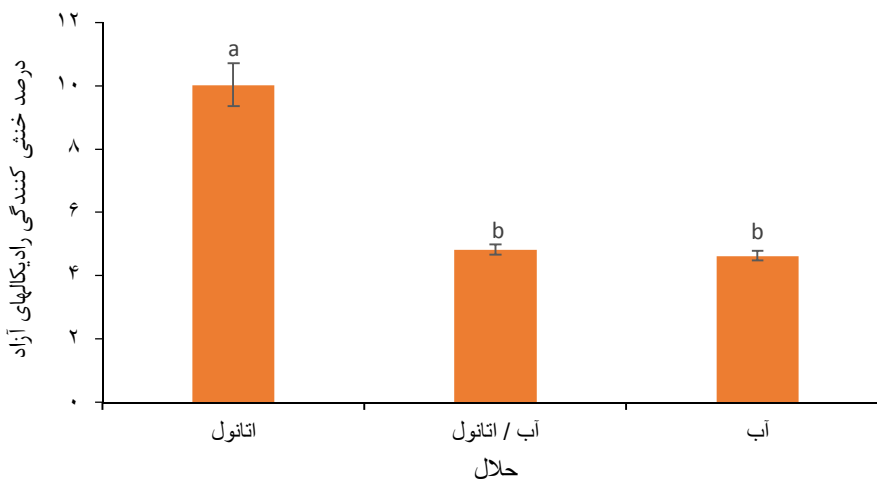
نتایج DPPH: نتایج درصد خشی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره‌های آژولا در زمان‌های مختلف استخراج در شکل ۴ آورده شده است. همان‌طوری‌که از شکل



شکل ۴- درصد خشی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) به روش امواج فراصوت. نتایج بر حسب انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است. - حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

اتانولی بالاترین درصد خشی‌کنندگی را داشته و با بقیه عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

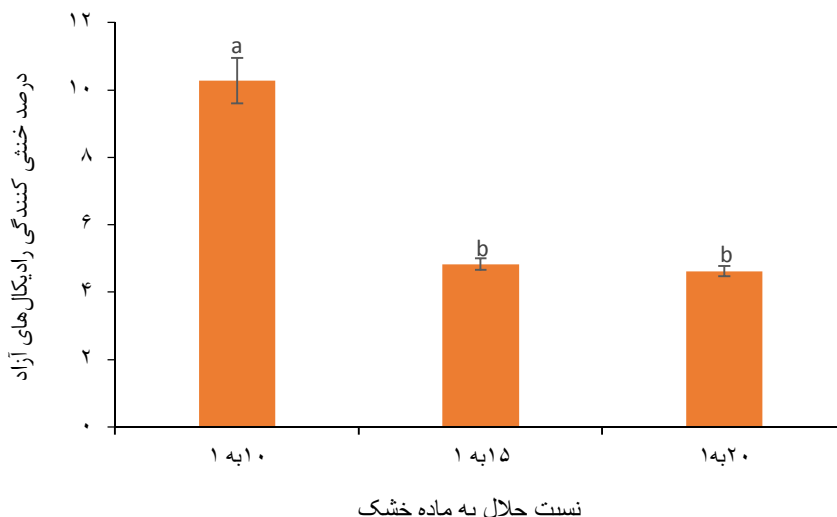
در شکل ۵ درصد خشی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های اتانول، اتانول / آب و آب نشان داده شده است. همان‌طوری‌که از شکل پیداست عصاره



شکل ۵- درصد خشی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در حلال‌های مختلف (اتانول، آب / اتانول و اتانول) به روش امواج فراصوت. نتایج بر حسب انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است. - حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

سایر نسبت‌ها بالاتر بوده و اختلاف معنی‌داری با آن‌ها دارد ($P < 0/05$).

در شکل ۶ نشان داده شد که درصد خشتی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در نسبت ۱ / ۱۰ نسبت به



شکل ۶- درصد خشتی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در نسبت‌های مختلف حلال به ماده خشک (۱/۱۰، ۱/۱۵ و ۱/۲۰) به روش امواج فراصوت. نتایج بر حسب انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است. - حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

موردنظر، قابلیت حل شدن ترکیب موردنظر در حلال و همچنین عدم سمیت حلال مورد استفاده بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. بیش‌تر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها توسط حلال‌های با قطبیت کم مثل اتانول، متانول و استون در ترکیب مقادیر مختلف آب حل شده و قابل استخراج هستند. امروزه به‌خاطر سمیت کم و هزینه نسبتاً پایین اتانول به‌عنوان حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان استفاده می‌گردد (ژو و همکاران، ۲۰۱۷؛ یانگ و همکاران، ۲۰۱۹)؛ از این‌رو در این مطالعه نیز از اتانول به همراه مقادیر مختلف آب استفاده شد (آلونسو و همکاران، ۲۰۱۷؛ ریبرو و همکاران، ۲۰۱۹). محمدی و همکاران (۲۰۱۲) در

پس از بررسی نتایج به‌دست آمده تیمار با حلال اتانول، نسبت ۱ به ۱۰ ماده خشک به حلال و زمان ۱۵ دقیقه به‌عنوان تیمار بهینه انتخاب شد.

بحث

در بین تمامی ترکیبات تخلص‌شده از گیاهان آنتی‌اکسیدان‌ها بیش‌تر توجه را به خود جلب کرده‌اند. این ترکیبات با توانایی سرکوب رادیکال‌های آزاد عامل فساد اکسیداسیونی و سرطان باعث کاهش اکسیداسیون شده و از این طریق باعث بهبود و پایداری بیش‌تر سیستم‌های غذایی می‌شوند (هونگ و همکاران، ۲۰۱۰؛ آواری و همکاران، ۲۰۱۹). امروزه از حلال‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده می‌شود و عواملی مانند دسترسی به حلال

کرد که این نتایج می‌تواند بیانگر آن باشد که قطبیت حلال مورد استفاده در استخراج ترکیبات فنولی بسیار مؤثر بوده و همچنین باعث تغییر در ترکیبات فنولی استخراج شده می‌شود و هم‌این‌که یکی از دلایل احتمالی این موضوع این است که وجود آب و اتانول سبب استخراج دامنه وسیع‌تری از ترکیبات فنولی می‌شود. از دلایل دیگر مناسب‌تر بودن این حلال در استخراج ترکیبات فنولی، ویژگی‌های ساختاری گونه مورد مطالعه است. در استخراج ترکیبات فنولی از جلبک *S. siliquastrum*، عصاره اتانولی بیش‌ترین مقدار ترکیب فنولی را نسبت به حلال‌های متانول و ان-هگزان داشت که دلیل این امر نیز تأثیر قطبیت حلال‌ها در میزان استخراج بود که مشابه نتایج این مطالعه بود (چو و همکاران، ۲۰۱۱). مکانیسم اصلی و کلیدی که باعث برتری روش امواج فراصوت نسبت به سایر روش‌های معمول شده است فرایند کویتیشن^۱ است این فرایند باعث تخریب بیش‌تر دیواره سلولی شده و باعث می‌شود خروج محتویات سلولی به بیرون از دیواره سلولی شده و در ادامه فرایندهای ذکر شده عملکرد حلال‌های موردنظر برای استخراج ترکیبات موردنظر بیش‌تر از روش‌های معمول است (اسپادا- بیلدو و همکاران، ۲۰۱۷). اسماعیل‌زاده و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که روش اولتراسوند توانست تأثیر مثبتی بر روی روش‌های اتانولی، آبی- اتانولی و آبی عصاره کنجد داشته باشد و ترکیبات فنولی بیش‌تری را در این روش‌ها به‌دست آمد همچنین آن‌ها اعلام نمودند کم‌ترین میزان ترکیبات فنولی در روش استخراج آبی بوده است. همان‌طوری‌که در نتایج مشاهده شد بیش‌ترین مقدار

نتایج بررسی‌های خود به روی میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی پوست میوه خرمالو نشان دادند که عصاره اتانولی از مقدار ترکیبات فنولی بیش‌تری نسبت به عصاره متانولی برخوردار بوده است. هم‌چنین عصاره متانولی از راندمان استخراج بالاتری برخوردار بوده است. سلمانیان و همکاران (۱۳۹۲) به این نتیجه رسیدند که نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج تأثیر معنی‌داری ($P < 0/05$) بر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های اتانولی و متانولی زولنگ (*Pinus sylvestris*) داشته است بازده استخراج عصاره اتانولی سبزی زولنگ مورد بررسی در مقایسه با بازده استخراج عصاره اتانولی چندین گونه رشد یافته در ترکیه بالاتر بود. در نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مشخص شد که حلال اتانول به‌صورت مؤثرتری باعث به‌دست آمدن ترکیبات فنولی بیش‌تری از گیاه آزولا شده است در راستای همین نتایج می‌توان به پژوهش باباخانی و سرزراع (۲۰۱۶) که در آن حلال اتانول نسبت به دو حلال آب و اتانول/ آب در استخراج ترکیبات فنولی از گیاه آزولا تأثیر بیش‌تری را شناسایی نمود. در مطالعه‌ای دیگر میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره گیاه تاجریزی (*Solanum nigrum* L.) حاصل از استخراج با اتانول بیش از آب و پترولیوم اتر بود. در مورد حلال آب مورد استفاده در پژوهش حاضر، برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این حلال توانایی بالاتری نسبت به بسیاری از حلال‌های دیگر در استخراج ترکیبات فنولی دارد (ویلخو و همکاران، ۲۰۰۸). چاندینی و همکاران (۲۰۰۸) اشاره کردند که در این مطالعه نیز حلال اتانول نسبت به دو حلال متانول و مخلوط متانول و اتانول در استخراج ترکیبات فنولی از چای بود. هم‌چنین باید به این مورد اشاره

بالاتر برای عملکرد حلال بر سوبسترای گیاهی نسبت داد که تأیید این موضوع نیازمند بررسی‌های بیشتر می‌باشد (ژو و همکاران، ۲۰۱۷؛ لیم و همکاران، ۲۰۰۲).

نتیجه‌گیری

در بهینه‌سازی تاگوچی مقایسه میانگین داده‌ها پس از طراحی آزمایش‌ها انجام شد. پس از بررسی نتایج به دست آمده تیمار با حلال اتانول، نسبت ۱ به ۱۰ ماده خشک به حلال و زمان ۱۵ دقیقه به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد. علاوه بر این نتایج نشان داد که حلال اتانول نسبت به حلال آب و مخلوط آن‌ها بهتر بود هم‌چنین زمان‌های بالاتر در استخراج ترکیبات فنولی مؤثرتر بود. طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌توان نشان داد که گیاه آزولا می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی کم‌هزینه مورد استفاده قرار گیرد.

رهیافت ترویجی

در این مطالعه از منبع گیاهی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده شده است. گیاه مورد مطالعه گیاه آزولا است که این گیاه در ابتدا برای اهداف مدیریتی وارد کشور شد ولی در ادامه به دلیل عدم مدیریت صحیح تبدیل به گیاهی هرز در اکثر منابع آبی استان گیلان شده است. با توجه به این‌که آزولا در کشور از نظر تغذیه‌ای و مطلوبیت بسیار کم مورد توجه مردم است در نتیجه استفاده از آن‌ها برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال بسیار مفید و مقرون به صرفه است. به همین دلیل در همین راستا می‌تواند منبع مطالعاتی بسیار مناسبی در زمینه استخراج ترکیبات مختلف باشد.

ترکیبات فنولی استخراج‌شده و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در نسبت‌های بیش‌تر ماده خشک به حلال مشاهده شد این نتایج می‌تواند بیانگر آن باشد که با افزایش نسبت ماده خشک به حلال سوبسترهای بیش‌تری برای استخراج ترکیبات فنولی وجود داشته و همین امر خود باعث عملکرد بیش‌تر و تأثیرگذاری بیش‌تر حلال مورد استفاده می‌شود، در ادامه این فرایند ترکیبات فنولی استخراج شده موجود در عصاره حلال موردنظر باعث تأثیرگذاری بیش‌تر در پروسه استخراج این ترکیبات از سوبسترهای باقی‌مانده شود (ژو و همکاران، ۲۰۰۷). از عوامل تأثیرگذار دیگر بر فرایند استخراج می‌توان به طول مدت زمان انجام فرایند اشاره کرد. همان‌طوری‌که پژوهشگران اشاره کرده‌اند، این عامل خود به تنهایی و در ترکیب با سایر عوامل نقش خیلی مهمی در استخراج و بازده فرایند بر عهده دارد، هم‌چنین مدت زمان انجام فرایند با توجه به تأثیری که بر کاهش هزینه‌های انجام فرایند دارد نسبت به سایر شاخص‌های به‌خوبی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (نقدی و باباخانی، ۲۰۱۸؛ نیوانگ و همکاران، ۲۰۱۷؛ کاراسابی و مازا، ۲۰۱۰). در استخراج با روش‌های مختلف از منابع مختلف داده‌ها و نتایج متفاوتی به دست آمده است که در بعضی از آن‌ها زمان‌های کوتاه‌تر استخراج و تعدادی هم زمان‌های بلندتر را مناسب‌تر دانسته‌اند، با توجه به نتایج زمان‌های استخراج در این مطالعه نیز مشخص شده که به‌طور کلی زمان‌های استخراج ۱۰ و ۱۵ دقیقه مقدار بیش‌تری ترکیبات فنولی استخراج‌شده در خود داشته‌اند که این عامل را می‌توان به مدت زمان

منابع

1. Alonso-Carrillo, N., de los, M., Aguilar-Santamaría, Á., Vernon-Carter, E.J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz Sosa, F., and Román-Guerrero, A. 2017. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity, *Ind. Crops Prod.* 103: 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.002>.
2. Aware, C.B., Patil, R.R., Vyavahare, G.D., Gurme, S.T., and Jadhav, J.P., 2019. Ultrasound-Assisted Aqueous Extraction of Phenolic, Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of *Mucuna macrocarpa* Beans: Response Surface Methodology Optimization. *J. Amer. Coll. Nutr.* 38: 4. 364-372.
3. Babakhani Lashkan, A., and Sarzare, A. 2016. Optimization of antioxidant compounds extraction from *Azolla* fern, *Azolla filiculoides*. *JFST.* 5: 1. 117-130. URL: <http://journals.modares.ac.ir/article-6-10099-fa.html>.
4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C.L.W.T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28: 1. 25-30.
5. 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 Chem.* 127: 999-1006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.072>.
6. Davaynejad, G., Stefanovits-Banyai, É., and Nagy, P.T. 2012. Investigation of antioxidant capacity and some bioactive compounds of Iranian pistachio (*Pistachio vera* L.) cultivars. *Notulae Scientia Biologicae*, 4: 4. 62-66.
7. Djissou, A.S.M., Ochiai, A., Koshio, S., and Fiogbe, E.D. 2017. Effect of total replacement of fishmeal by earthworm and *Azolla filiculoides* meals in the diets of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) reared in concrete tanks, *Ind. J. Fish.* 64: 31-36. <https://doi.org/10.21077/ijf.2017.64.1.55317-05>.
8. Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C.G., and Barbero, G.F. 2017. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp, *Food Chem.* 219: 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.122>.
9. Goldsmith, C.D., Vuong, Q.V., Stathopoulos, C.E., Roach, P.D., and Scarlett, C.J. 2018. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from *olive pomace*. *LWT*, 89: 284-290.
10. Hong Yu, L., Bin, W., Chun Guang, Y., You le, Q., and Chuan ling, S. 2010. Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China, *J. Med. Plant Res.* 4: 2557-2565. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.609>.
11. Karacabey, E., and Mazza, G. 2010. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology, *Food Chem.* 119: 343-348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.029>.
12. Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., and Chemat, F. 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119: 2. 851-858.
13. 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*, *J. Agric. Food Chem.* 50: 3862-3866. <https://doi.org/10.1021/jf020096b>.
14. Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., and Pacheco, N. 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources, *Agronomy.* 7: 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>.

15. Mohamadi, M., ELHAMI, R.A., and Pourfallah, Z. 2012. Determination of total phenolic compound contents and antioxidant capacity of persimmon skin.
16. Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P. and Kefalas, P. 2008. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392: 5. 977.
17. Naghdi, Sh., and Babakhani Lashkan, A. 2018. Ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from four Persian Gulf seaweed. *Aquaculture sciences*. 6: 2. 29-38.
18. Nayak, N., and Padhy, R.N. 2017. GC-MS analysis of bioactive compounds and host-toxicity studies of *Azolla caroliniana* symbiotic with the cyanobacterium *Anabaena azollae*, *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51: 24-33. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.2s.46>.
19. Nezamabadi, S.M., and Ansari, M.T. 2008. Analytical research on technology and management of aquatic fern in Anzali lagoon and northern of Iran wetlands. *Agricultural science*. 2: 549-562. (In Persian)
20. Nguang, S.L., Yeong, Y.L., Pang, S.F., and Gimbum, J. 2017. Ultrasonic Assisted Extraction on Phenolic and Flavonoid Content from *Phyllanthus niruri* Plant, *Ind. J. Sci. Technol.* 10: 1-5. <https://doi.org/10.17485/ijst/2017/v10i2/110391>.
21. Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., and Singanusong, R. 2018. Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food chemistry*, 241: 338-345.
22. Ribeiro, E.F., Luzia, D.M.M., and Jorge, N. 2019. Antioxidant compounds extraction from coffee husks: the influence of solvent type and ultrasound exposure time. *Acta Scientiarum. Technology*, 41: e36451.
23. Saha, J., Biswas, A., Chhetri, A., and Sarkar, P.K. 2011. Response surface optimisation of antioxidant extraction from kinema, a *Bacillus*-fermented soybean food. *Food chemistry*, 129: 2. 507-513.
24. Sahin, S., Samli, R., Birteks, A.S., Tan, Z., Barba, F.J., Chemat, F., Cravotto, G., and Lorenzo, J.M. 2017. Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties, *Molecules*. 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22071056>.
25. Savic Gajic, I., Savic, I., Boskov, I., Žerajić, S., Markovic, I., and Gajic, D. 2019. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Black Locust (*Robinia Pseudoacaciae*) Flowers and Comparison with Conventional Methods. *Antioxidants*, 8: 8. 248.
26. Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.O., and Dommes, J. 2007. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry*, 105: 3. 1268-1275.
27. Taga, M.S., Miller, E.E., and Pratt, D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61: 5. 928-931.
28. Tian, J., Wu, X., Zhang, M., Zhou, Z., and Liu, Y. 2018. Comparative study on the effects of apple peel polyphenols and apple flesh polyphenols on cardiovascular risk factors in mice. *Clinical and Experimental Hypertension*, 40: 1. 65-72.
29. Vilkh, K., Mawson, R., Simons, L., and Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9: 2. 161-169.
30. Vuong, Q., Goldsmith, C., Dang, T., Nguyen, V., Bhuyan, D., Sadeqzadeh, E., Scarlett, C., and Bowyer, M. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant capacity from *Euphorbia tirucalli* using response surface methodology. *Antioxidants*, 3: 3. 604-617.

31. Yang, Q.Q., Gan, R.Y., Ge, Y.Y., Zhang, D., and Corke, H. 2019. Ultrasonic treatment increases extraction rate of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) antioxidants. *Antioxidants*, 8: 4. 83.
32. Zhang, J., Zong, A., Xu, T., Zhan, P., Liu, L., Qiu, B., Liu, W., Jia, M., Du, F., and Tian, H. 2018. A novel method: ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Chinese purple yam. *Natural product research*, 32: 7. 863-866.
33. Zhou, Y., Zheng, J., Gan, R.Y., Zhou, T., Xu, D.P., and Bin Li, H. 2017. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidants from the mung bean coat, *Molecules*. 22: 1-13. <https://doi.org/10.3390/molecules22040638>.
34. Zhou, Y., Xu, X.Y., Gan, R.Y., Zheng, J., Li, Y., Zhang, J.J., Xu, D.P., and Li, H.B. 2019. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from the seed coats of red sword bean (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.). *Antioxidants*, 8: 7. 200.

