فصلنامه علمی ـ پژوهشی
دورهٔ ۵، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۱۷- ۱۳۰

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه آزولا *Azolla filiculoides*

آریا باباخانی[1]*، ابوالفضل سرزارع[2]

۱- استادیار شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

دریافت: ۹٤/۰۵/۱۸ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۰
*نویسنده مسئول مقاله:aria_babakhani@yahoo.com

چکیده:
برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سرخس آبی آزولا، از روش استخراج حلالی و بهینه‌سازی تاگوچی استفاده شد. متغیرهای وابسته در این فرایند غلظت اتانول، زمان استخراج و نسبت ماده خشک به حلال بود. غلظت اتانول و نسبت ماده خشک به حلال به‌طور معناداری خواص آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده با میزان فنول کل و خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد را تغییر داد ($p<۰/۰۵$)، درحالی‌که زمان استخراج تأثیر معناداری بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نداشت ($p>۰/۰۵$). میزان ترکیبات فنولی در تیمارها از ۵/۷۷ تا ۱٦/٤۲ برحسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم ماده خشک متغییر بود. میزان درصد خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره‌ها نیز از ۲۰/۵۱ درصد تا ۹۳/۷۱ درصد بود. غلظت ۵۰ درصد اتانول، نسبت ۱به ۱۵ ماده خشک به حلال و زمان استخراج ٤۸ ساعت به‌عنوان تیمار بهینه انتخاب شد. نتایج نشان داد آزولا می‌تواند برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مناسب باشد.

کلید واژگان: آنتی‌اکسیدان، آزولا، استخراج، حلال، ترکیبات فنولی.

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور مؤثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال های آزاد به شکل‌های اکسیژن و نیتروژن فعال با زیست مولکول‌هایی نظیر پروتئین، آمینو اسید، لیپید و DNA، جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان‌ها می‌شوند (Shrififar et al., 2007). در حال حاضر علاقه به مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همانند

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

بوتیل هیدروکسی تولوئن[1] ، بوتیل هیدروکسی آنیزول[2] و ترت بوتیل هیدروکینون[3] با توجه به نگرانی‌هایی که دربارهٔ امنیت غذایی وجود دارد، افزایش یافته است (Hossain et al., 2012). بنابراین شناسایی منابع جدید آنتی‌اکسیدانی سالم و ارزان با منشأ طبیعی از اهمیت بالایی برخوردار است.

گیاهان منبع اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها در طبیعت هستند (Mendiola et al., 2008).مطالعات زیادی بر روی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که از گیاهان خشکی‌زی استخراج شده‌اند، انجام شده و کاربردهای آنها نیز در سیستم‌های غذایی آزمایش شده است (Babakhani et al, 2013; Babakhani et al, 2015).

یکی از شاخه‌های آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنولی هستند که به مقدار فراوان در گیاهان یافت می‌شوند. پلی‌فنول‌های گیاهان زمینی از گالیک اسید[4] و الاگیک اسید[5] مشتق می‌شوند. 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 (Lopez et al., 2011).

امروزه جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. استفاده از گونه‌های کم‌ارزش و فراوان در هر منطقه همچون آزولا، که گونه مهاجم می‌باشد و ازدیاد آن در سال‌های اخیر تأثیرهای مخرب زیست‌محیطی فراوانی بر اکوسیستم تالاب‌های ایران گذاشته است، باعث کاهش اثرهای مخرب آنها می‌شود.

جنس آزولا با داشتن ۷ گونه که به «سرخس پشه‌ای» یا سرخس آبی مشهور است یک سرخس آبزی کوچک است که به‌صورت طبیعی در رودخانه‌ها، برکه‌ها، کانال‌ها و مزارع شالیکاری که دارای آب راکد است، می‌روید (Singh, 1989). به‌دلیل تراکم بالای تولید، آزولا به‌عنوان غذای دام و طیور ماهی استفاده می‌شود (Subudhi and Singh, 1978). آزولا به‌عنوان غذا در برخی کشورها از جمله چین مصرف می‌شود. از آزولا در سوپ‌ها، کوفته‌های گوشتی، املت‌ها، برگرها، به شکل پختنی و سرخ کردنی استفاده می‌شود (Singh, 1989). میزان پروتئین ماده خشک این گیاه در حدود ۳۰-۲۰ درصد است که در مقایسه با سویا که ٤٠ درصد است، بسیار مناسب می‌باشد.

این گیاه از سال ۱۳٦۳ بدون اهداف مدیریتی در مصارف کشاورزی و صنعتی در تالاب انزلی و مانداب‌های شمال ایران رهاسازی شد (Nezam abadi and Ansari, 1386). متأسفانه با رعایت نکردن مسائل حفاظتی و امنیتی این گیاه به آب‌های مزارع و تالاب‌ها وارد شده و پس از چند سال اکوسیستم‌های مهم شمال کشور را تحت تأثیر قرار داده است. راهکارهای متفاوتی برای از بین بردن و مقابله با این گونه مهاجم به‌کار برده شد، ولی هیچ یک از آنها کارساز نبودند. استفاده صنعتی و کاربردی از این گیاه می‌تواند از راهکارهای مؤثر برای کاهش تهاجم آن به اکوسیتم‌های طبیعی ایران باشد. استفاده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌تواند یکی از پتانسیل‌های این گیاه باشد که بررسی آن می‌تواند امکان استفاده کاربردی از آن را فراهم آورد. مطالعاتی بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی سرخس‌های خشکی‌زی انجام شده است، اما بر روی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آزولا

1. Butylated hydroxytoluene
2. Butylated hydroxyanisole
3. tert Butylhydroquinone
4. gallic acid
5. ellagic acid

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

مطالعات اندکی انجام شده است (Dai et al., 2012; Nayak et al., 2014; Selvaraj et al., 2013)، که نشان‌دهندهٔ وجود خواص آنتی‌اکسیدانی آزولا می‌باشد.

مطالب فراوانی در مورد مؤثرترین روش و حلال برای استخراج ترکیبات فنولی وجود دارد، ولی یافته‌های این منابع بسیار متفاوت و گاهی متناقض هم می‌باشند. در مطالعه‌ای که تأثیر حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، آب/متانول) بر ترکیبات فنولی یک گونه جلبک آزمایش شد، آب بالاترین ویژگی آنتی اکسیدانی و فنول کل را داشت و حلال آب/متانول نیز پس از آب دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود (Lopez et al, 2011). متانول استفاده شده برای پلی‌فنول‌های چای (Yao et al, 2006) و استن ۵۰ درصد برای استخراج پلی‌فنول‌های گندم از آب کارامدتر بودند (Zhou and Yu, 2004). در برخی از موارد در حلال‌های آبی با توجه به ساختارهای متفاوت این ترکیبات و خواص فیزیکی و شیمیایی آنها، ارائه روش‌های یکسان برای استخراج ترکیبات فنولی غیرممکن است (Rebey et al., 2012). همچنین بررسی همه عوامل تأثیرگذار در استخراج، هزینه‌بر و وقت‌گیر است. بدین منظور می‌توان از روش‌های بهینه‌سازی برای کاهش تیمارهای آزمایشی استفاده کرد. طرح بهینه‌سازی تاگوچی[1] یک شکل از طرح فاکتوریل شکسته شده است که به‌وسیله آن تأثیرهای متغیرها در سطوح مختلف و در ترکیبات مختلف سنجیده می شود (Cheah et al., 2010).

با توجه به اینکه سازمان‌های زی‌ربط چالش‌های بزرگی برای پیدا کردن راه‌حل مناسبی به‌منظور کاهش اثرهای زیست‌محیطی نامطلوب سرخس آبی آزولا دارند، در این پژوهش کوشش شد تا از این ماده به‌عنوان ماده اولیه تولید ترکیبات با ارزش زیستی استفاده شود تا ضمن مصرف بیشتر از این منبع باعث کاهش پراکندگی این گیاه گردد. به همین منظور در این پژوهش ترکیبات فنولی گیاه سرخس آبی آزولا با حلال‌های آب، آب-اتانول و اتانول استخراج شد و ضمن اندازه‌گیری مقدار آنها در تیمارهای مختلف زمانی و نسبت حلال به ماده خشک، امکان بهینه‌سازی استخراج این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی فراهم گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

گونهٔ *Azolla filiculoides* در اوایل فصل بهار سال ۱۳۹۲ از تالاب انزلی در منطقهٔ آب‌کنار با استفاده از ساچوک جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه با آب شیرین شست‌وشو شده و گل‌ولای آنها گرفته شد. سپس در سایه به مدت ۱۴ روز قرار گرفته و کاملاً خشک شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در جای خشک و خنک نگهداری شدند.

عصاره گیری

ابتدا نمونه های آزولا خشک شده با قهوه خردکن (مولینکس، AR 10، ساخت کشور فرانسه) به صورت پودر درآورده شدند. سپس با توجه به طراحی صورت گرفته آزمایش ها (جدول ۱) برای هر تیمار، نمونه‌ها توزین شده و در ظرف شیشه‌ای (بالن شیشه‌ای) استخراج ریخته شدند. با توجه به نسبت آزولا به حلال (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۵)، به نمونه‌ها حلال افزوده شد. استخراج با ۳ حلال (اتانول، آب

1. Taguchi experimental design

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

و مخلوط ۵۰/۵۰ آب و اتانول)، در ۳ مدت زمان استخراج (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت)، انجام شد. برای طراحی آزمایش‌ها از طرح تاگوچی L9 استفاده گردید (Roy, 1990). پس از اتمام زمان استخراج، عصاره‌ها با کاغذ صافی (Watman 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.

جدول۱ طراحی آزمایش‌ها برای استخراج ترکیبات فنولی در روش استخراج غوطه‌وری

آزمایش	حلال	زمان(ساعت)	نسبت آزولا به حلال (W/V)
۱	آب	۲٤	۱:۵
۲	آب/اتانول	۲٤	۱:۱۰
۳	اتانول	۲٤	۱:۱۵
٤	آب	٤۸	۱:۱۰
۵	آب/اتانول	٤۸	۱:۱۵
٦	اتانول	٤۸	۱:۵
۷	آب	۷۲	۱:۱۵
۸	آب/اتانول	۷۲	۱:۵
۹	اتانول	۷۲	۱:۱۰

تعیین میزان ترکیبات فنولی

میزان فنول کل (TPC) عصاره با استفاده از روش (Taga et al., 1984) اندازه‌گیری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ٤ میلی‌لیتر (۲ درصد) Na_2Co_3 ، مخلوط شد و به‌مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲٦ درجه سانتی‌گراد) باقی ماند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتو ۵۰ درصد به آن اضافه شد و پس از مخلوط شدن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی باقی ماند. جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر (UV/Vis 2100، Unico) در طول موج ۷۲۰ نانومتر در برابر شاهد خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسیدگالیک از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج براساس میلی‌گرم اسیدگالیک برگرم پودر آزولا خشک گزارش شد. برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، در ابتدا یک محلول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از گالیک اسید ساخته شد. مقادیر صفر تا هشت دهم میلی‌لیتر را از این محلول به بالن‌های ۱۰ میلی‌لیتر اضافه گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتو به هر کدام از بالن‌ها افزوده و مخلوط گردید. پس از آن یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲ درصد به همه بالن‌ها اضافه گردید و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر در برابر شاهد خوانده شد. برای تهیه محلول شاهد نیز بدون افزودن اسید گالیک تمامی مراحل بالا تکرار می‌گردد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل- هیدرازیل (DPPH) ، طبق روش (Brand-William et al., 1995) انجام شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۱٦ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به‌خوبی مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی نگهداری شدند. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره مطابق فرمول زیر محاسبه و به‌صورت درصد RSA بیان شد.

درصد خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد = [۱-(A_{sample}-$A_{sample\ blank}$)/A_{conrol}] × ۱۰۰

A_{sample} = جذب نمونه و DPPH پس از ۳۰ دقیقه محلول

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

$A_{control}$ = جذب محلول DPPH بدون نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

برای طراحی استخراج‌ها از نرم‌افزار Minitab (version 14) استفاده شد. طرح مورد استفاده برای انجام آزمایش‌های تاگوچی 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 آنتی‌رادیکالی از آنالیز واریانس یک‌طرفه[1] و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به‌دست آمده از آزمایش‌ها کنترل طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف– اسمیرنوف[2] 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 17 و MINITAB 14 استفاده شد. از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

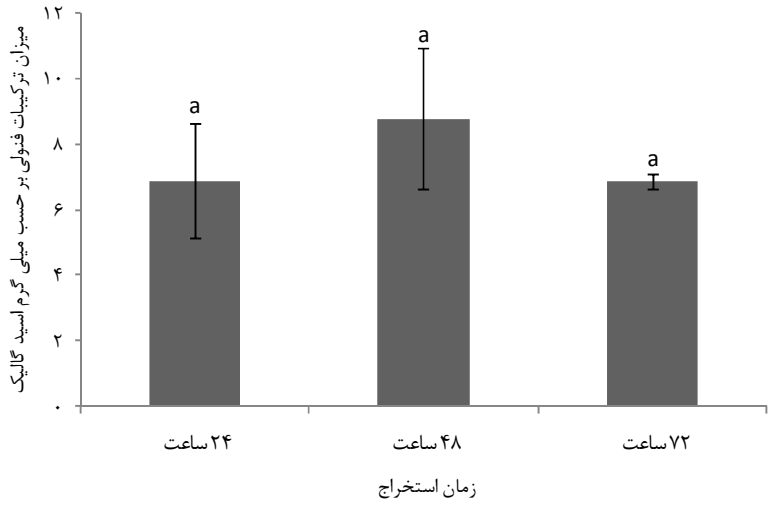
میزان ترکیبات فنولی

میزان ترکیبات فنولی در زمان‌های مختلف استخراج ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۱ آورده شده است. میزان ترکیبات فنولی در زمان ٤۸ ساعت بالاتر از سایر زمان‌ها بود و زمان‌های استخراج ۲٤ ساعت و ۷۲ ساعت اختلاف معناداری با هم نداشتند ($p>۰/۰۵$).

1. One-way ANOVA
2. Kolomogorav – Smirnov

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

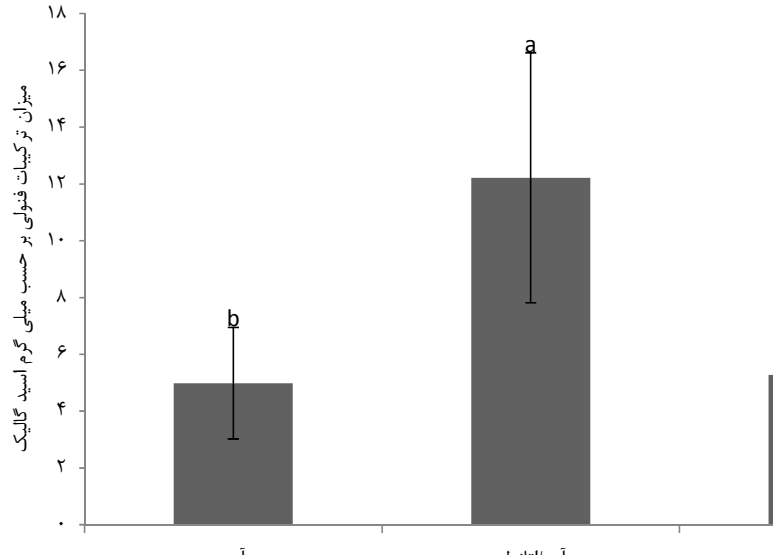
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]



شکل ۱ میزان ترکیبات فنولی آزولا در زمان‌های مختلف استخراج (۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت) به روش غوطه‌وری

- نتایج برحسب «انحراف معیار ± میانگین» بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است.
- حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

میزان ترکیبات فنولی در عصاره‌های آبی، آب-اتانولی و اتانولی در شکل ۲ آورده شده است. ترکیبات فنولی عصاره آبی-اتانولی بیشترین میزان ترکیبات فنولی را داشت ($p<۰/۰۵$) و عصاره‌های اتانولی و آبی اختلاف معناداری با هم نداشتند ($p>۰/۰۵$).



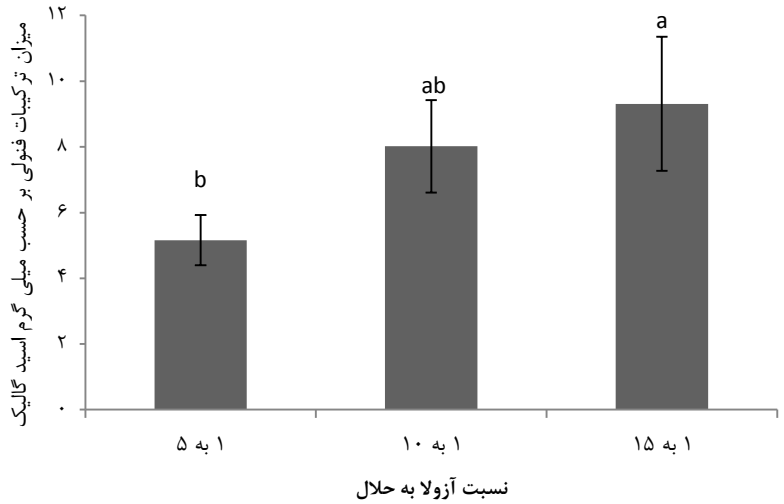
شکل ۲ میزان ترکیبات فنولی آزولا در استخراج به‌وسیلهٔ حلال‌های مختلف (آب، آب/اتانول و اتانول) به روش غوطه‌وری.

-نتایج برحسب «انحراف معیار ± میانگین» بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است.
- حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

از میان نسبت‌های ماده خشک به حلال در نظر گرفته شده برای استخراج عصاره‌ها، نسبت ۱ به ۱۵ پودر آزولا به حلال بیشترین میزان ترکیبات فنولی را داشت که اختلاف معناداری با نسبت ۱ به ۵ داشت ($p<0/05$). میزان ترکیبات فنولی در نسبت‌های ۱ به ۱۰ بیشتر از ۱ به ۵ بود ($p>0/05$).



شکل ۳ میزان ترکیبات فنولی آزولا در نسبت‌های مختلف استخراج (۱به ۵، ۱به ۱۰ و ۱ به ۱۵).

-نتایج برحسب «انحراف معیار ± میانگین» بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است.

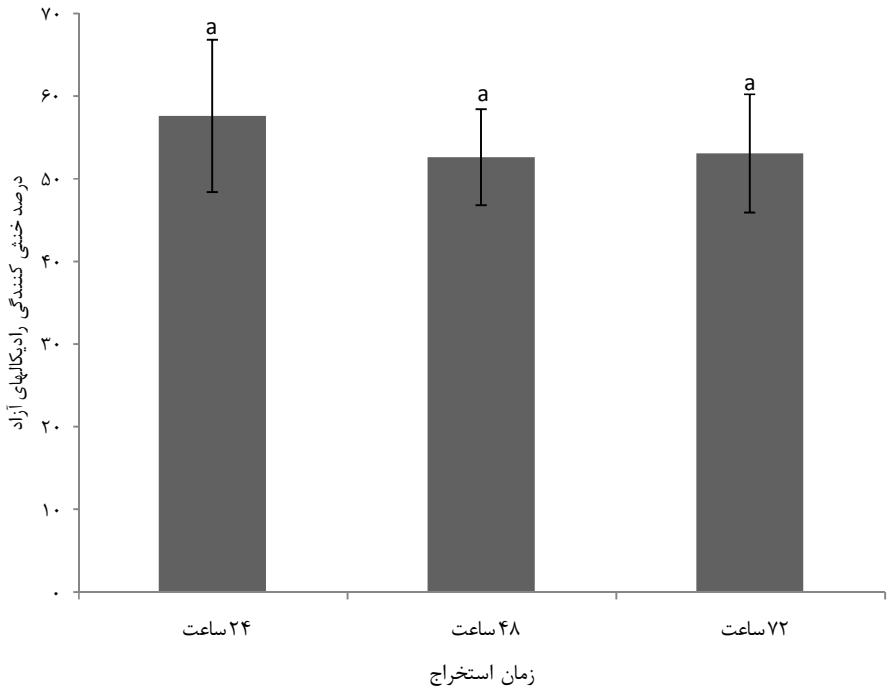
- حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

ویژگی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

نتایج درصد خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) عصاره‌های آزولا در زمان‌های مختلف استخراج در شکل ٤ آورده شده است. عصاره‌ها پس از گذشت ٢٤ ساعت با ۵۸ درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، بالاترین مقدار را داشتند هر چند اختلاف معناداری بین تیمارها وجود نداشت ($p>0/05$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]



شکل ٤ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های مختلف استخراج

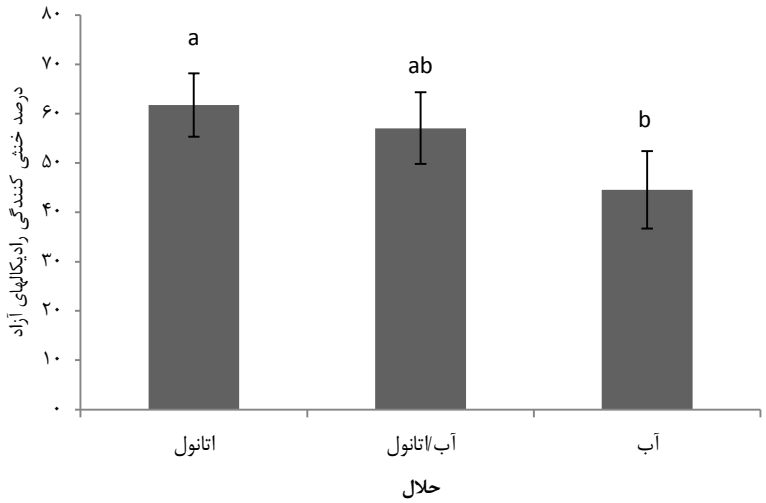
-نتایج برحسب «انحراف معیار ± میانگین» بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است.

- حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

نتایج میزان خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد حلال‌های مختلف در شکل ۵ آورده شده است. درمقایسهٔ میزان جذب عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های مختلف، به‌ترتیب عصاره‌های اتانولی، آب/اتانول و آبی دارای بیشترین مقادیر بودند. عصارهٔ اتانولی با ٦٢ درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد بالاترین مقدار را در بین نمونه ها دارا بود. عصاره‌های آب/اتانول و آبی به‌ترتیب ۵۷ و ٤٥ درصد خنثی‌کنندگی داشتند (p>۰/۰۵).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

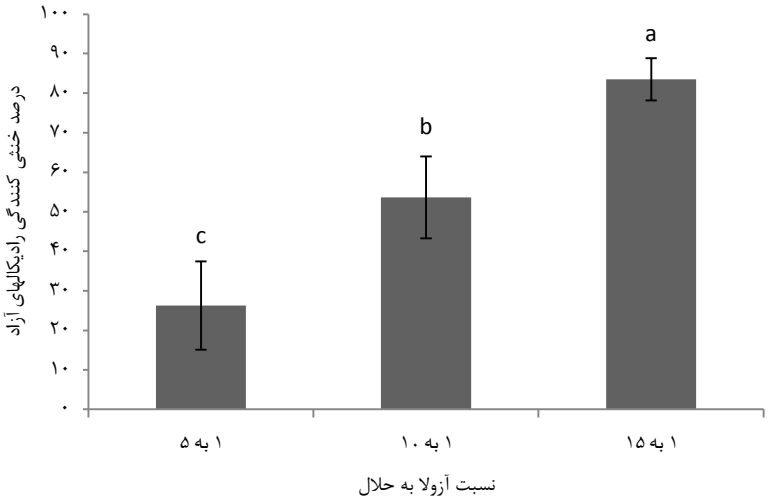


شکل ۵ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در استخراج به‌وسیلهٔ حلال‌های مختلف

-نتایج برحسب «انحراف معیار ± میانگین» بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است.

- حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

در مقایسهٔ نسبت‌های وزنی در نظر گرفته شده برای ساخت عصاره‌ها، نسبت ۱ به ۱۵ پودر آزولا به حلال با ۸۳ درصد بالاترین درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را نشان داد. نسبت‌های ۱ به ۱۰ و ۱ به ۵ به‌ترتیب با ٥٤ و ٢٦ درصد در رتبه‌های بعدی قرار داشتند ($p<0/05$).



شکل ٦ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در نسبت‌های مختلف استخراج (۱به ۵، ۱به ۱۰ و ۱ به ۱۵).

-نتایج برحسب «انحراف معیار ± میانگین» بیان شده است. تعداد تکرار در هر تیمار ۳ عدد است.

- حروف لاتین متفاوت نشانگر اختلاف معنادار در بین تیمارها است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

بحث

معمولاً انتخاب حلال‌ها برای استخراج با توجه به هدف مطالعه، ماهیت ترکیبات، ویژگی های فیزیکوشیمیایی ماده، قابل دسترس بودن مواد و تجهیزات انجام می‌شود (Rebey et al., 2012). در استخراج ترکیبات فنولی، قطبیت حلال‌ها در افزایش حلالیت فنول‌ها نقش بسیار مهمی دارد (Nazdk and Shahidi, 2006). تاکنون از حلال‌های مختلف مانند متانول، اتانول، آب، بوتانول، استون و کلروفرم برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده شده است (Lim et al., 2002; Duan et al., 2006; Chandini et al., 2008). بنابراین تعیین یک روش و حلال مناسب برای استخراج فنول‌های طبیعی امکان‌پذیر نیست. با توجه به شکل ۱ استخراج با حلال آب-اتانول دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود ($p<۰/۰۵$). میزان ترکیبات فنولی عصاره های اتانولی نیز بیشتر از عصاره‌های آبی بود. در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از چای حلال اتانول آبی بسیار مؤثرتر از متانول و استون بود (Wang and Helliwell, 2001). ولی آب برای استخراج کاتچین‌ها از متانول ۸۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد کارایی بالاتری داشت (Khokhar and Magnusdotti, 2002). متانول استفاده شده برای پلی فنول‌های چای از آب کارامدتر بود (Yao et al., 2006). درحالی‌که، در مطالعه ای که تأثیر حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، آب/متانول) بر ترکیبات فنولی یک گونه جلبک آزمایش شد، آب بالاترین ویژگی آنتی‌اکسیدانی و فنول کل را داشت و حلال آب/متانول نیز پس از آب دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود (Lopez et al., 2011). در مطالعهٔ دیگری که بر روی تأثیر حلال‌های آب، متانول و اتانول بر میزان ترکیبات فنولی جلبک سارگاسوم خلیج‌فارس انجام شد نیز حلال آبی ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالاتری از حلال‌های متانولی و اتانولی داشت (Babakhani et al., 2012).

مانند دیگر تحقیقات انجام شده، در این آزمایش نیز حلال نقش مؤثری در میزان ترکیبات فنولی داشت. بالاتر بودن میزان ترکیبات فنولی در استخراج با مخلوط دو حلال نسبت به حلال‌های جداگانه در مطالعات متعددی مشاهده شده است. 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، ویژگی های ساختاری گونه مورد مطالعه است. همان‌گونه که اشاره شد، شاخص‌های زیادی بر استخراج تأثیر می‌گذارد و پیش از انجام آزمایش نمی‌توان تصویری روشن از تفاوت‌های بین حلال‌ها و دیگر عوامل پیش‌بینی کرد.

در آزمایش DPPH، آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش رادیکال پایدار DPPH به دی فنیل پیکرازیل زرد رنگ است. اثر آنتی‌اکسیدان بر مهار رادیکال DPPH مربوط به توانایی اهدای هیدروژن می‌باشد (Zhang et al., 2011). همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در عصاره‌های اتانولی بیشتر از دو عصاره دیگر است، ولی تفاوت آن با آب-اتانول زیاد نمی‌باشد. محققان دیگر نیز ذکر کرده‌اند که نسبت بین ترکیبات فنولی و قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال های آزاد لزوماً رابطه مستقیم و همسانی نیست (Chandini et al., 2008) و بالا بودن در ترکیبات فنولی لزوماً قدرت بالاتر آنتی‌رادیکالی را ایجاب نمی‌کند. در واقع این پدیده نشانگر آن است که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دیگری نیز علاوه بر ترکیبات فنولی در این عصاره موجود است که حلال اتانول توانایی استخراج بیشتری از آنها را دارد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

ترکیبات فنولی موجود در عصاره به‌شدت تحت تأثیر زمان استخراج است (Rusak et al., 2008). به‌منظور کاهش هزینه‌های فرایند استخراج، زمان عامل مهمی برای بهینه‌سازی محسوب می‌شود. در استخراج با روش‌های مختلف داده‌های مختلفی وجود دارد که بعضی از آنها زمان‌های کوتاه‌تر استخراج و تعدادی زمان‌های بلندتر را مناسب‌تر دانسته‌اند (Pinelo et al., 2005; Spingo and De Faveri, 2009). در این مطالعه عصاره‌های استخراج شده در زمان ٤٨ ساعت، دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بودند، ولی بین زمان استخراج ٢٤ ساعت و ٧٢ ساعت تفاوت معناداری مشاهده نشد ($p>0/05$). دلیل بالاتر بودن ترکیبات فنولی در زمان ٤٨ ساعت نسبت به ٢٤ ساعت را می‌توان به اثر بیشتر حلال بر ماده خشک دانست. از طرفی با افزایش زمان استخراج از ٤٨ ساعت به ٧٢ ساعت میزان ترکیبات افزایش نیافت و تا حدی نیز دچار تخریب شد.

میزان خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در عصاره‌های استخراج شده پس از ٢٤ ساعت از سایر عصاره‌ها بیشتر بود. که این امر در زمان‌های ٤٨ و ٧٢ ساعت اختلاف معناداری نشان ندادند. در زمان استخراج نیز همبستگی بالایی بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت خنثی‌کنندگی مشاهده نشد.

نسبت ماده خشک به حلال یک نسبت مهم در بهینه‌سازی استخراج محسوب می‌شود. تأثیر نسبت حلال به ماده توسط (Pinelo et al., 2005) و دیگر محققان در مواد خام مختلف گزارش شده است (Cacace and Mazza, 2003; Herodez et al., 2003). با توجه به حلال مورد استفاده و با توجه به شیوه انتقال ماده توسط آن، بالاترین نسبت ماده خشک به حلال دارای بیشترین میزان ماده جامد به‌دست آمده بود (Spingo et al., 2007). عصاره استخراج شده با نسبت ۱ به ۱۵ آزولا به حلال دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود. خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد نیز در نسبت استخراج ۱ به ۱۵ به‌طور معناداری از دو نسبت دیگر بالاتر بود. این تفاوت در نسبت ۱:۱۰ و ۱:۵ نیز دیده شد.

در بهینه‌سازی تاگوچی، مقایسه میانگین هر عامل پس از طراحی آزمایش‌ها انجام شد. با توجه به نتایج، عصاره آب–اتانولی استخراج شده در ٤٨ ساعت و با نسبت آزولا به حلال ۱ به ۱۵، به عنوان تیمار بهینه استخراج انتخاب شد. علاوه بر این نتایج نشان داد که استفاده از مخلوطی از آب و حلال‌های آلی در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نسبت به سیستم حلالی تک جزئی کارامدتر است. استفاده از حلال‌های مختلف نیز تأثیر معناداری در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نشان داد. همچنین نتایج نشان داد عصاره آزولا دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی است و می‌توان برای این گونه کاربردهایی را متصور شد.

منابع

Babakhani, A, K.H Farvin, S, and Jacobsen, Ch. 2015. Antioxidative Effect of Seaweed Extracts in Chilled Storage of Minced Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*): Effect on Lipid and Protein Oxidation. Food and Bioprocess Technology, 1-13.

Babakhani, L. A. Rezaei, M. Rezaei, K. and Seyfabadi, S. J. 2012. Optimization of extraction of antioxidant compounds in microwave-assisted extracts of brown algae *sargassum angustifolium*. Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources, 65:243-255.

Babakhani, L. A. Rezaei, M. Rezaei, K. and Seyfabadi, S. J. 2013. The Application of Sargassum (*Sargassum angustifolium*) Extract as a Natural Antioxidant in Chilled Storage of Minced Kilka (*Clupeonella cultiventris*). Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources, 66: 1-13.

Brand-Williams, W. Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry, 125, 1104-1109.

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.

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.

Nayak, N. Padhy, R. N. and Singh, P. K. 2014. Evaluation of antibacterial and antioxidant efficacy of the fern *Azolla caroliniana* symbiotic with the cyanobacterium *Anabaena azollae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 1-15.

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).

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.

Rebey, I. B. Bourgou, S. Debez, I. B. S. Karoui, I. J. Sellami, I. H. Msaada, K. Limam, F. and Marzouk, B. 2012. 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.

Roy, R. K. 1990. A primer on the Taguchi method. Van nostrand reinhold, New York (USA), 255p.

Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., 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.

Selvaraj, K. Chowdhury, R. and Bhattacharjee, C. 2013. Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity. antioxidant activity, LWT. Food Science and Technology, 28: 25-30.

Cacace, J. E. and Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering, 59: 379-389.

Chandini, S. K. Ganesan, P. and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107: 707–713.

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: 293–301.

Dai, L. P. Dong, X. J. and Ma, H. H. 2012. Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in Azolla imbricata induced by cadmium. Polish Journal of Environmental Studies, 4: 837-844.

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.

Herodez, S. S. Hadolin, M. Skerget, M. and Knez, Z. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis L.*) leaves. Food Chemistry, 80: 275–282.

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(3): 582-590.

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.

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.

Lopez, A. Rico, M. Rivero, A. and Tangil, D. M. S. 2011. The effects of solvents on the phenolic

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

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.

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.

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.

Zhou, K., and Yu, L., 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. LWT-Food Science and Technology, 37, 717-721.

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 & amp; Emerging Technologies, 12(1): 18-25.

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5, 743-749.

Sharififar, F. Moshafi, M.H. Mansouri, S.H. Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food control, 18, 800-805.

Singh, P. K. 1989. Use of Azolla in Asian agriculture. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 4, 149–161.

Spigno, G. and De Faveri, D. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. Journal of Food Engineering, 93, 210-217.

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.

Subudhi, B. P. R. and Singh, P. K. 1978. Nutritive value of water fern Azolla pinnata for chicks. Poultry Science, 57, 378–380.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 1, Spring 2016

Optimization of antioxidant compounds extraction from Azolla fern, *Azolla filiculoides*

Aria Babakhani[1], Abolfazl Sarzare[2]

1-Assisstant Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowme Sara, Iran

2- B.Sc. Student, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowme Sara, Iran

Received: 09.08.2015 Accepted: 20.02.2016

*Corresponding author: aria_babakhani@yahoo.com

Abstract

Solvent extraction and taguchi method were used to optimize conditions for the antioxidant activity of Azolla fern extracts. The independent processing variables were ethanol concentration, extraction time and solid to solvent ratio. Ethanol concentration and solvent to solid ratio significantly affected antioxidant activity measured by the total phenol content ($p < 0.05$). whereas the extraction time did not significantly affect the activity ($p > 0.05$). Antioxidant activity of the extracts, determined by the total phenolic content, varied from 5.77 to 16.42 mg acid gallic equivalents/g of dry sample. DPPH scavenging activity percentage ranged from %20.51 to %93.71. Ethanol concentration of %50 and sample to solvent ratio of 1 to 15 were optimal for the highest antioxidant activities measured by the TPC assay and the DPPH method. The optimal extraction time was 48h. The result show that azolla fern is suitable for antioxidant extraction.

Keywords: Antioxidants, Azolla, Solvent, Phenolic compounds

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.9.4]