نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۳ شماره ۱/ سال ۱۳۹۲

بهینه سازی فرآیند استخراج مواد زیست فعال از پوست بنه به روش آب مادون بحرانی با کاربرد روش سطح پاسخ

رضوان شاددل[۱*] ، محمد حسین حداد خداپرست [۲]، عبدالمجید مسکوکی [۳]، علی شریف [۴] و صدیف آزادمرد دمیرچی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/٤ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۲

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
[۲] استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
[۳] استادیارگروه فراوری مواد غذایی پژوهشکده‌ی علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی
[٤] مربی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
[۵] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز
[*]مسئول مکاتبه: E-mail: r.shaddel@gmail.com

چکیده

پوست بنه (*Pistacia atlantica*) حاوی مقدار بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدانی است. هدف از انجام این پژوهش، بدست آوردن شرایط بهینه استخراج مواد زیست فعال پوست بنه با آب مادون بحرانی و با استفاده از روش سطح پاسخ بود. دما (۲۰۰°C -۱۱۰)، مدت زمان فرایند (min ٦۰-۳۰) و نسبت اختلاط حلال (۱:۵۰-۱:۱۰) فاکتورهای مورد مطالعه بودند. طراحی آزمایش با استفاده از نرم افزار رویه سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی محوری انجام گرفت. شرایط بهینه استخراج برای بدست آوردن عصاره‌ای با حداکثر قدرت آنتی اکسیدانی دمای ۱۹٦/۸۱°C، مدت زمان ۵۲/۵۷ دقیقه و نسبت اختلاط ٤۳/٦۱:۱ (پوست بنه-آب) تعیین شد. تحت این شرایط میزان ترکیبات پلی فنلی، قدرت احیاکنندگی بر حسب $EC_{۵۰}$ و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بر حسب $EC_{۵۰}$ به ترتیب برابر با ۲۲۸٤ میلی گرم اسید گالیک/۱۰۰ گرم ماده اولیه، ۰/۲۰۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/٦۲۸٤ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. استخراج و آنالیز عصاره‌ها در نقطه بهینه نتایج بدست آمده را تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: آب مادون بحرانی، آنتی‌اکسیدان، پوست بنه رقم موتیکا، روش سطح پاسخ

Optimization of bioactive compounds extraction process from bene hull (*Pistacia atlantica*) using subcritical water by response surface methodology

R Shaddel[*1], M H Haddad-Khodaparast[2], A Maskooki[3], A Sharif[4] and S Azadmard-Damirchi[5]

Received: July 26, 2011 Accepted: January 1, 2013

[1]MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
[4]Instructor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[5]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*] Corresponding author: E-mail: r.shaddel@gmail.com

Abstract

Bene hull (*Pistacia atlantica*) contains noticeable antioxidant components. The aim of this study was to obtain a set of optimum conditions for bioactive compounds extraction process from bene hull using subcritical water by response surface methodology (RSM). Temperature (110 – 200 °C), processing time (30-60 minutes) and water to bene hull ratio (10:1-50:1) were the factors investigated. Experimental design was performed using central composite face centered design (CCFD) and RSM. The optimal conditions for maximizing antioxidant activity were at 196.81 °C for 52.57 min and the ratio of 43.61:1 for water to bene hull. Under these conditions, the amount of polyphenolic compounds, reduction power according to EC_{50} and DPPH free radical scavenging activity according to EC_{50} were predicted to be 2284 mg gallic acid / 100 g bene hull, 0.2002 mg /ml and 0.6284 mg/ ml, respectively. Extraction and analysis of extracts in optimal point support these results.

Keywords: Antioxidant, Bene hull, Response surface methodology, Subcritical water

مقدمه

تمایل به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به علت آثار فیزیولوژیکی نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی همچنین کارایی پایین برخی از آن‌ها نظیر توکوفرول‌ها زیاد شده است. درخت بنه با نام علمی *Pistacia atlantica* از انواع درختان پسته‌ی وحشی است که در مناطق مختلف ایران پراکندگی دارد و معروف‌ترین رقم آن، موتیکا[1] نام دارد (حاج حیدری ۱۳۷٦)؛ وسعت درختان بنه در ایران به بیش از یک میلیون و دویست هزار هکتار می رسد. میوه بنه از سه قسمت مغز (۲۵ درصد)، پوسته چوبی سفت (۵۱ درصد) و پوسته خارجی نرم (۲٤ درصد) تشکیل شده است. پوسته خارجی به رنگ سبز تیره می باشد، تقریباً ۳۰ درصد روغن دارد و با فشردن بین دو انگشت به آسانی از پوسته خارجی جدا می‌شود (فرهوش و همکاران ۲۰۰۹). روغن پوست بنه استخراج شده با هگزان به روش مرسوم از پایداری اکسایشی بسیار بالایی برخوردار بوده، مقاومت سایر روغن‌های گیاهی

[1] Mutica

به اکسایش لیپیدی را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد (فرهوش و همکاران ۲۰۰۹).

فرهوش و همکاران (۲۰۱۱) خواص آنتی اکسیدانی روغن پوست پسته‌ی وحشی و مواد صابونی ناشونده آن را بررسی کردند. نتایج نشان داد قدرت آنتی‌اکسیدانی روغن پوست بنه نسبت به روغن سبوس برنج، همچنین مواد صابونی ناشونده ی آن نسبت به روغن‌های کنجد و سبوس برنج بالاتر می‌باشد.

آب مادون بحرانی ناحیه‌ای از فاز کندانس شده‌ی آب است که دمای بین ۱۰۰°C (نقطه‌ی جوش آب) تا ۳۷٤°C (نقطه‌ی بحرانی آب) را در بر می گیرد و شامل میزان فشاری است که آب در حالت مایع باقی بماند و تغییر فاز ندهد (راموس و همکاران ۲۰۰۲). به علت اینکه قطبیت آب در این دما و فشار کاهش یافته و قطبیت مشابه اتانول و متانول را دارد، لذا انتظار می‌رود ترکیباتی با قطبیت متوسط تا پایین استخراج شوند. همچنین بعضی از آنتی اکسیدان ها در دماهای بالا از بین می‌روند لذا بایستی اپتیمم فشار و دما که فعالیت آنتی اکسیدانی حداکثر باشد تعیین شود.

رودریگز- میزوسو و همکاران (۲۰۱۰) ترکیبات بیواکتیو نوعی جلبک دریایی را به روش آب مادون بحرانی استخراج کرده و مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد عصاره‌های بدست آمده در ۲۰۰°C بازده بالا دارند و فعالیت آنتی اکسیدانی حداکثر آن ها، مربوط به حضور ویتامین E، فنولیک‌های ساده (اسید گالیک) محصولات کاراملیزاسیون و محصولات احتمالی واکنش مایلارد در نمونه می باشد.

رنگس ریوونق و همکاران (۲۰۰۹) استخراج ترکیبات فنلی مثل اسید گالیک، اسید الاگیک[2] و کریگالین[3] از میوه‌های Terminalia chebula Retz به روش آب مادون بحرانی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌ی بدست آمده به این روش نسبت به روش‌های استخراج مرسوم دارای ترکیبات فنلی قابل توجه با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا بودند. بهترین شدت جریان و دما برای فعالیت آنتی اکسیدانی بهینه در این تحقیق به ترتیب ٤ml/min و ۱۸۰°C تعیین شد.

شلماشی و همکاران (۲۰۰۷) کافئین را از تفاله‌ی چای با استفاده از روش آب مادون بحرانی ایزوله کردند؛ تأثیر شرایط مختلف استخراج مثل دمای آب (۲۰۰°C, ۱۷۵،۱۵۰،۱۲۵،۱۰۰)، شدت جریان آب (۲،۱ و g/min ٤)، اندازه‌ی ذرات (۰/۲۵،۰/۵ و ۱/۲ mm) و همچنین فشار (۲۰،۳۰ bar,٤۰) بر روی بازده استخراج بررسی شد. مناسب‌ترین متغیرهای فرایند دمای °C ۱۷۵، شدت جریان ٤g/min و اندازه‌ی ذرات ۰/۵ mm، همچنین مدت زمان استخراج ۱/۵ ساعت بود.

علاوه بر مطالعات فوق در تحقیقات دیگری از آب مادون بحرانی برای استخراج ترکیبات مختلف استفاده شده است که از آن جمله می توان به استخراج: ترکیبات فنولیک از باقی‌مانده دانه انار (هه و همکاران ۲۰۱۱)، ترکیبات فنلی هندوانه تلخ[4] (بودرات و شوتیپراک ۲۰۰۸)، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در غذاهای گیاهی و میکروآلگ (مندیولا و همکاران ۲۰۰۸)، مواد مغذی ریشه‌ی شیرین بیان (جویونق و همکاران ۲۰۰۸)، ترکیبات آنتی اکسیدانی اکالیپتوس (کلکرنی و همکاران ۲۰۰۷)، آنتی اکسیدان های کانولا (حساس رودسری و همکاران ۲۰۰۷)، مواد بیواکتیو با فعالیت آنتی اکسیدانی پونه‌ی کوهی (رودریگز- میزوسو و همکاران ۲۰۰٦) و ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه رزماری (آیبانز و همکاران ۲۰۰۳) اشاره کرد.

در تحقیق حاضر تأثیر شرایط استخراج شامل دما، مدت زمان استخراج و نسبت اختلاط حلال به نمونه بر روی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌های بدست آمده از پوست بنه با آب مادون بحرانی بررسی شد. برای رسیدن به این هدف، شرایط استخراج بر اساس مقدار پلی فنل کل،

[2] Ellagic acid
[3] Corilagin
[4] Bitter Melon

قدرت احیا کنندگی آهن عصاره و همچنین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه شد.

مواد و روش‌ها

مواد

میوه‌ی رسیده بنه (*Pistacia atlantica var mutica*) اوایل آبان ماه از شهرستان مرو دشت استان فارس تهیه گردید. میوه‌ها تا زمان استفاده در سردخانه زیر صفر درجه سانتیگراد نگهداری شدند؛ جداسازی پوست بنه ها با دستگاه پوست گیر انجام گرفت. متانول، معرف فولین سیوکالچو، اسید گالیک، کربنات سدیم، پتاسیم فری سیانید، تری کلرو استیک اسید از شرکت مرک، فریک کلرید، مونو سدیم فسفات مونو هیدرات، دی سدیم فسفات هپتا هیدرات،۱ و ۱ دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل از شرکت شارلوو اسید آسکوربیک، اسید کلریدریک و اسید استیک از شرکت کالدون خریداری شد.

استخراج با آب مادون بحرانی

فرایند استخراج توسط دستگاه استخراج با آب مادون بحرانی، طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فن آوری های نوین پژوهشکده صنایع غذایی خراسان رضوی انجام گرفت. این دستگاه شامل تانک آب مقطر، پمپ (Comet type: MTP AX 2/70 m) جهت تأمین فشار لازم، سل استخراج به حجم ۱٤۰ میلی لیتر، کویل گرم کننده‌ی سل و پنل کنترل دما می‌باشد. استخراج با این روش بدین ترتیب انجام گرفت : ابتدا پوست بنه به مقدار مشخصی وزن شده و در داخل سل استخراج قرار گرفت؛ سپس مقدار آب مورد نیاز بسته به نسبت اختلاط مناسب (پوست بنه – آب) در تانک آب ریخته شد. عمل استخراج با تنظیم درجه حرارت و با فشار مناسب (۱۱۰°C-۲bar، ۱۵۵°C-۵bar و ۲۰۰°C-۱۵bar) انجام گرفت؛ فشارهای بکار رفته، حداقل فشار لازمی بودند که آب در حالت مایع باقی بماند و تغییر فاز ندهد. دما و فشار مناسب با استفاده از جداول ترمودینامیکی تعیین گردید. زمان لازم برای افزایش دما در داخل مخزن مادون بحرانی آب از هنگام قرار دادن نمونه تا رسیدن دما به بالای ۱۰۰ °C، ۱۰ دقیقه بود. مدت زمان فرایند، بعد از رسیدن دمای سل استخراج به دمای ۱۰۰ °C در نظر گرفته شد. حجم عصاره‌ی استخراج شده اندازه گیری گردید؛ سپس عصاره با استفاده از کاغذ واتمن شماره ٤ فیلتر شد؛ برای صاف شدن هر چه بیشتر عصاره و حذف ذرات زائد از فیلتر تحت خلأ استفاده شد. به منظور حذف حلال، نمونه‌ی فیلتر شده در آون ٤۰ درجه سانتیگراد و سپس در آون تحت خلأ تا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت. بعد از هر مرحله استخراج برای خنک نمودن مخزن دستگاه مادون بحرانی، آب سرد سیرکوله شد. جهت شستشوی بهتر و اطمینان از باقی نماندن نمونه در قسمت های مختلف دستگاه، از الکل بازیافتی استفاده گردید؛ در نهایت شستشوی مجدد با آب انجام گرفت (شاددل و همکاران ۱۳۹۱).

تعیین مقدار ترکیبات فنولی

مقدار ترکیبات فنلی عصاره های حاصل از روش آب مادون بحرانی طبق روش سینگ و همکاران (۲۰۰۲) اندازه گیری شد.

اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن III

تعیین قدرت احیاکنندگی آهن عصاره نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (JENWAY ٦۱۰٥) مطابق روش اویایزو (۱۹۸٦) انجام گرفت.

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره ها با استفاده از روش بکار رفته توسط رودریگز- میزوسو و همکاران (۲۰۰٦) تعیین گردید.

طرح آماری و تجزیه و تحلیل دادها

شرایط بهینه‌ی استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ و نرم افزار Design Expert نسخه ٦.۰.۲ تعیین شد. در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی محوری با سه متغیر مستقل، سه سطح و شش تکرار در نقطه مرکزی

طرح (به منظور بررسی تکرار پذیری طرح) استفاده گردید؛ به طوری که مجموع کل تیمارها ۲۰ تیمار شد. متغیرهای مستقل شامل دما، زمان و نسبت اختلاط حلال – نمونه بودند؛ همچنین متغیرهای وابسته شامل میزان ترکیبات پلی فنلی، قدرت احیا کنندگی آهن و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بودند. سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مربوطه در جدول ۱ ذکر شده‌اند. این طرح آزمایشی شامل سه سطح فاکتوری کد بندی بود (۱–، ۰، ۱+)؛ به طوری که ۱– مربوط به سطح پایین هر فاکتور، ۱+ سطح بالا و ۰ سطح میانی بود. در این طرح، نقطه‌ی مرکزی این سطح که با کد مشخص می‌شود به منظور کاهش خطای آزمایش شش تکرار در نظر گرفته شد.

معادله‌ی بدست آمده از طرح مرکب مرکزی با استفاده از معادله‌ی چند جمله‌ای درجه دو چنین بود:

$$Y_n = ß_0 + ß_1X_1 + ß_2X_2 + ß_3X_3 + ß_{11}X_1^2 + ß_{22}X_2^2 + ß_{33}X_3^2 + ß_{12}X_1X_2 + ß_{13}X_1X_3 + ß_{23}X_2X_3$$

Y_n پاسخ پیش گویی شده یکی از پاسخ‌ها

X_1، X_2 و X_3 متغیرهای مستقل دما، زمان و نسبت اختلاط

$ß_0$ ثابت معادله

$ß_1$، $ß_2$ و $ß_3$ ضرایب خطی معادله

$ß_{11}$، $ß_{22}$ و $ß_{33}$ ضرایب درجه دوم معادله

$ß_{12}$، $ß_{13}$ و $ß_{23}$ ضرایب برهمکنش معادله

مناسب بودن مدل از روی داده‌های عدم برازش مدل، ضریب تبیین (R^2) و F-value حاصل از جدول آنالیز واریانس بررسی شد. معنی داری مدل و متغیرهای آن در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) تعیین شد.

نتایج و بحث

مدل‌سازی پارامترها

با توجه به نتایج بدست آمده، مدل چند جمله‌ای درجه دو برای هر یک از پاسخ‌ها (مقدار ترکیبات پلی فنلی، قدرت احیاکنندگی و میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH) برازش یافت. فرض اولیه و پیشنهادی، بر موثر بودن تمامی پارامترها شامل متغیرها با توان اول و دوم و اثر متقابل متغیرها بود. جهت مشخص نمودن پارامترهای موثر از غیر موثر از تحلیل آماری با آزمون فرض و پارامتر P-value استفاده شد. مدل‌های محاسباتی و ضرایب رگرسیونی هر یک از این مدل‌ها در جدول ۳ ارائه شده است؛ مدل‌های چند جمله‌ای درجه دو هر یک از پاسخ‌ها ضرایب رگرسیونی قابل قبولی را نشان دادند. ضریب رگرسیون بالای ۰/۸۰ برای مناسب بودن یک مدل کافی ست و نشان دهنده انطباق داده‌ها و خط محاسباتی حاصل از رگرسیون می‌باشد.

در مورد هر سه مدل برازش یافته R^2 بالای ۰/۹۰ بدست آمد.

جدول ۱- سطوح کد بندی و واقعی متغیرهای مستقل طرح مرکب مرکزی و میزان فولین، احیای آهن و DPPH عصاره

شماره آزمایش	سطوح کد بندی شده			متغیرهای مستقل			متغیر وابسته		
	X_1	X_2	X_3	دما (°C)	زمان (min)	نسبت اختلاط	پلی فنل کل (میلی گرم اسید گالیک/۱۰۰گرم ماده اولیه)	مهارکنندگی DPPH (EC_{50})	احیا کنندگی (EC_{50})
۱	+۱	+۱	+۱	۲۰۰	٦۰	۵۰	۲۲۰۳/۲۵	۱۸٦/۵٦۷	٦٤٦/۳۷
۲	۰	۰	+۱	۱۵۵	٤۵	۵۰	۲۱۱۲/۹۳	۲۵٦/٤۱	۸٤٦/۳۰۷
۳	−۱	+۱	+۱	۱۱۰	٦۰	۵۰	۱۹۲۲/۹	۳۵۸/٤۲۳	۱٤٦۰/٦۹
٤	۰	۰	۰	۱۵۵	٤۵	۳۰	۱۷۹۹/٦۵	۲٦۸/۸۱۷	۷۸۲/۷۲
۵	+۱	−۱	+۱	۲۰۰	۳۰	۵۰	۲۰۰٦/۳۲	۷۳/۲۲۵	۷۷۷/٦۳۷
٦	۰	۰	۰	۱۵۵	٤۵	۳۰	۱۷۱٤/۸۲	۲۰۰/۸	۵۸۳/۸۲۷
۷	۰	۰	۰	۱۵۵	٤۵	۳۰	۱۷۹۷/۳٤	۲۲۹/۳۵۸	٦۹۸/۳۳
۸	۰	۰	−۱	۱۵۵	٤۵	۱۰	۱٤۲۲/٦۵	۱۸۷/۹۷	٦۳۹/۸۳۸
۹	+۱	+۱	−۱	۲۰۰	٦۰	۱۰	۱۷۱۳/۸۹	۱٦٤/۲۰٤	٦۷٦/۸٤۸
۱۰	−۱	+۱	−۱	۱۱۰	٦۰	۱۰	۱٤۳٤/۲۷	۲۳۳/٤۸	۱٤٤۵
۱۱	۰	+۱	۰	۱۵۵	٦۰	۳۰	۲۲۸۳/٤۳	۲۹٦/۷۳	۷۸۲
۱۲	۰	۰	۰	۱۵۵	٤۵	۳۰	۲۱٤۸/۰۵	۲۰۷/٤٦۹	٦٦۵/۷٦۸
۱۳	+۱	−۱	−۱	۲۰۰	۳۰	۱۰	٤۸۸/۹۷	۳۵٤/٦۱	۱۱۸۱/۹۹
۱٤	۰	۰	۰	۱۵۵	٤۵	۳۰	۲۱۳۸/٤٤	۲٤۳/۹	۷۲۳/۸۹۸
۱۵	۰	−۱	۰	۱۵۵	۳۰	۳۰	۱۸٤۱/٦۸	۳۲۷/۱۲	۸۸٦
۱٦	−۱	−۱	−۱	۱۱۰	۳۰	۱۰	۱۱۱۷/۸۸	۱۸۳/۸۲	۱٤۱۸
۱۷	−۱	−۱	+۱	۱۱۰	۳۰	۵۰	۱۲۱۲/۷	۲۱۹/۲۹۸	۱٤۲٦
۱۸	۰	۰	۰	۱۵۵	٤۵	۳۰	۱۹۹۳/۵۱	۲۳۹/۸۰۸	۷۸٤/۱۸۲
۱۹	+۱	۰	۰	۲۰۰	٤۵	۳۰	۲۰۰۲/۷۵	۱۸۲/۱٤۹	٦۸۵/۱٦
۲۰	−۱	۰	۰	۱۱۰	٤۵	۳۰	۲۰٤۵/۱۱	۲۵۲/۷۱۷	۱٦۱۷/۰۹

(میلی گرم / میلی لیتر)* EC_{50}

جدول ۲ - معادلات چند جمله‌ای درجه دوم و ضریب رگرسیون پاسخ‌ها

پاسخ	معادلات	مدل	ضریب همبستگی	P<۰/۰۵
TPC (mgr galic acid/ 100g substance)	$Y= -704.47843+3.97879X_1+38.49288X_2^{*}+57.22168X_3^{*} -0.041073X_1^{2}- +0.076537 X_1X_2+0.19517X_1X_3^{*}+-0.44630X_2X_3^{**}0.19799X_2^{2}-0.84828 X_3^{2}$	چند جمله‌ای درجه ۲	۰/۹۳	0.0001
Reducing power (EC_{50})	$Y= +1.79998+8.57452X_1 -19.61171X_2+1.79700X_3- 0.015936X_1^{2*}+0.29097 X_2^{2*} -0.017477 X_3^{2} -0.062205X_1X_2^{*} - 0.027977X_1X_3^{*}+ +0.086233 X_2X_3^{*}$	چند جمله‌ای درجه ۲	۰/۹۰	0.0006
DPPH (EC_{50})	$Y= +6094.97884-53.38957X_1^{*}-31.56347 X_2^{*}+10.72255 X_3+0.16559X_1^{2*}+0.45135X_2^{2*}-0.15612X_3^{2*}-0.096541X_1X_2^{*}- 0.039131X_1X_3^{*}+0.085327 X_2X_3$	چند جمله‌ای درجه ۲	۰/۹۸	<0.0001

بهینه یابی شرایط استخراج از پوست بنه

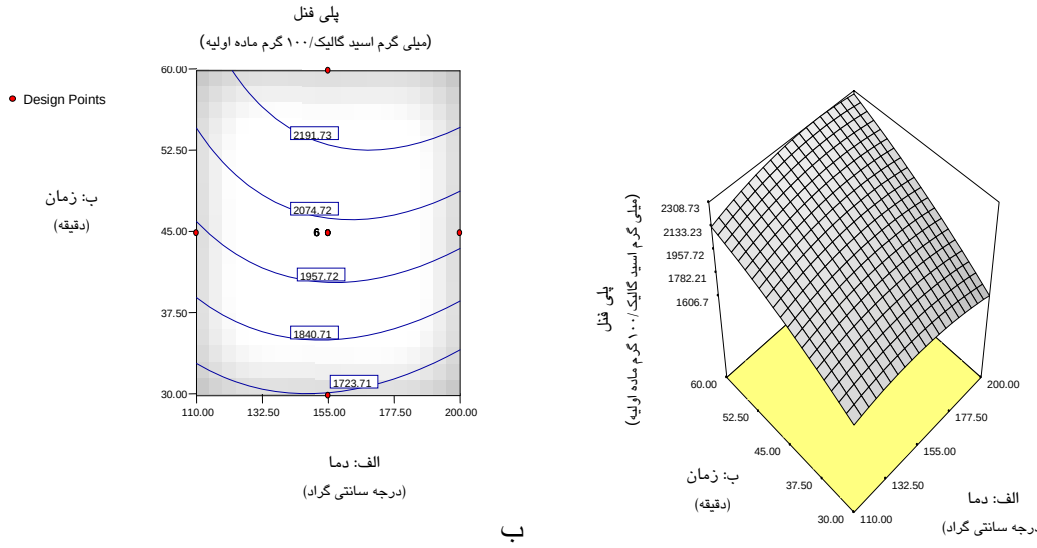
حضور ترکیبات تشکیل شده در طی استخراج در دمای بالا را می‌توان از روی رنگ و بوی خاص عصاره در دماهای بالاتر توضیح داد. رنگ قهوه‌ای و طعم برشتگی خاص می‌تواند دو احتمال داشته باشد: واکنش قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی که ناشی از واکنش مایلارد بین قندها و آمینو اسیدهای نمونه باشد، یا واکنش کاراملیزاسیون قندها در دمای استخراج (رودریگز- میزوسو و همکاران ۲۰۱۰). جدول ۱ اختلاف بین آب معمولی و مادون بحرانی را نشان می‌دهد. قطبیت ترکیبات استخراج شده در این روش پایین‌تر از آب معمولی بوده و در نتیجه عصاره‌ی بدست آمده بسته به دمای بکار رفته، قطبیت مشابه حلال‌های آلی خواهد داشت.

مقدار ترکیبات پلی فنلی

ترکیبات فنلی بیشتر به خاطر فعالیت آنتی اکسیدانی مورد توجه قرار می‌گیرند؛ علاوه بر این، دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مهمی در موجودات زنده‌اند و ممکن است حائز آثار سودمندی در مبارزه با بیماری‌های مرتبط با تولید رادیکال اکسیژن با غلظت‌های بیش از ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی بدن انسان باشند (مورلو و همکاران ۲۰۰٤). ترکیبات فنلی می‌توانند وقوع و شدت واکنش‌های مایلارد و کاراملیزاسیون را تنظیم کنند که بر روی زیست فعالی عصاره‌ی نهایی تأثیر می‌گذارد (ققلیوسی و همکاران ۲۰۰۹). نتایج آنالیز واریانس معنی دار بودن مدت زمان استخراج و همچنین نسبت اختلاط حلال به نمونه را نشان می‌دهد. دما به تنهایی معنی دار نیست؛ اما اثر متقابل دما و نسبت اختلاط معنی دار است ($P<۰.۰۵$).

جدول ۳- اختلاف بین آب معمولی و مادون بحرانی

۳۰۰°C	۲۵°C	ویژگی‌ها
کم	زیاد	قطبیت
۲۰	۸۰	ثابت دی الکتریک
متانول، استونیتریل	-	میزان تشابه به حلال‌های آلی
قطبیت کم	قطبیت بالا	ترکیبات استخراج شده



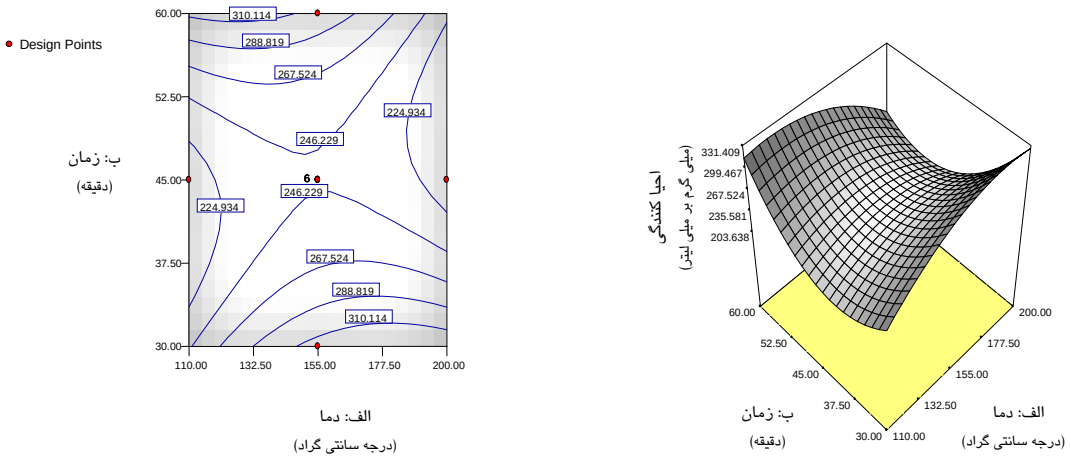
شکل ۱- میزان ترکیبات پلی فنلی عصاره مادون بحرانی پوست بنه به عنوان تابعی از دما و مدت زمان استخراج، الف- نمودار سطح سه بعدی ب- نمودار مسطح، نسبت اختلاط در سطح ۱:۳۰ ثابت نگه داشته شده است.

با افزایش مدت زمان استخراج میزان ترکیبات پلی فنلی به صورت خطی افزایش یافته است (شکل ۱)؛ این افزایش در دماهای بالاتر بیشتر است. پلازا و همکاران (۲۰۱۰)، همچنین رودریگز- میزوسو و همکاران (۲۰۰٦)

نتایج مشابهی را در مورد چندین گونه‌ی گیاهی و پونه کوه گزارش کردند. افزایش ثابت یونی آب (K_w) در شرایط مادون بحرانی، بر میزان هیدرولیز پوست بنه تأثیر می‌گذارد و به عنوان مثال لیگنین که جزئی از ترکیبات دیواره‌ی سلولی گیاه می‌باشد تحت چنین شرایطی به ترکیبات فنلی تبدیل می‌شود. همین ویژگی آب تحت این شرایط موجب بهبود استخراج ترکیبات فنلی از میوه‌ها در اثر تجزیه‌ی هیدرولیتیکی شبکه‌ی پلی ساکاریدی– لیگنینی دیواره سلولی می‌شود (رنگس ریوونق و همکاران ۲۰۰۹).

قدرت احیاء کنندگی

آنتی‌اکسیدان‌هایی با قدرت احیاکنندگی بالاتر، از توانایی بیشتری در پایان دادن به واکنش‌های مخرب زنجیره‌ای رادیکالی برخوردارند (واناساندارا و شهیدی ۲۰۰۵). بسته به قدرت احیاء کنندگی عصاره، رنگ زرد محلول آزمایش به رنگ سبز یا آبی تغییر می‌یابد (آماروویکس و همکاران ۲۰۰٤). در این مطالعه قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ی بدست آمده با افزایش دما و مدت زمان استخراج بیشتر شد. نمودار مربوطه غلظت موثری از عصاره که جذب ۰/۵ شود($EC_{0.5}$) را نشان می‌دهد. میزان $EC_{0.5}$ پایین‌تر نشان دهنده‌ی قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر است. به دلیل اینکه با افزایش دما و مدت زمان استخراج ثابت دی الکتریک آب کاهش و به تناسب آن قطبیت آب کاهش می‌یابد ترکیبات خاصی استخراج می‌شوند که باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ی استخراج شده می‌گردند. همان طوری که در شکل ۲ هم دیده می‌شود با افزایش دما و زمان تا حد خاصی میزان $EC_{0.5}$ کاهش می‌یابد.



شکل ۲- قدرت احیاکنندگی عصاره مادون بحرانی پوست بنه به عنوان تابعی از دما و مدت زمان استخراج، الف- نمودار سطح سه بعدی ب- نمودار مسطح، نسبت اختلاط در سطح ۱:۳۰ ثابت نگه داشته شده است.

در این آزمایش تأثیر فاکتورهای فرایند به تنهایی معنی دار نیست؛ این در حالی است که تأثیر متقابل فاکتورها معنی دار می‌باشد ($P<0.05$). حساس رودسری و همکاران (۲۰۰۹) نتیجه‌ی مشابهی را گزارش کردند. آن‌ها تأثیر افزایش دما به عنوان تنها فاکتور متغیر از ۱۱۰ $^{\circ}C$ به ۱٦۰ $^{\circ}C$ روی قدرت احیاکنندگی عصاره‌ی مادون بحرانی کنجاله ی کلزا بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که اختلاف معنی داری بین قدرت احیاکنندگی در این دو دما وجود ندارد. همچنین حسین و همکاران (۲۰۱۱) برهم کنش معنی داری را بین دما و

غلظت حلال در رزماری[5]، مرزنجوش[6] و پونه کوهی[7] گزارش کردند.

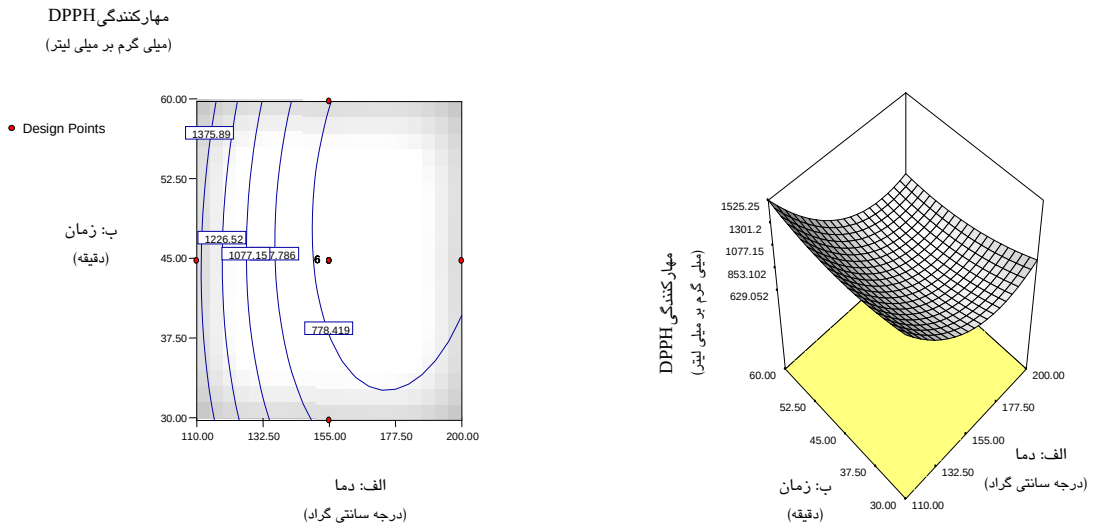
قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد از اکسایش لیپید ها جلوگیری می‌کنند. روش‌هایی توسعه یافته است که در آن‌ها میزان غیرفعال شدن رادیکال‌های آزاد در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اندازه گیری می‌شود (واناساندارا و شهیدی ۲۰۰۵). در این روش اثر احیاء کنندگی عصاره بر رادیکال پایدار DPPH و تغییر رنگ آن از ارغوانی به زرد در طول موج ۵۱۶ nm بررسی می‌شود. نمودار مربوطه میزان EC_{50} یعنی غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را مهار کند نشان می‌دهد. همان طوری که قبلاً ذکر شد هر چه میزان EC_{50} کمتر باشد یعنی قدرت مهار کنندگی عصاره بیشتر می‌باشد. میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH نیز با افزایش دما افزایش نشان می‌دهد (شکل ۳). مشابه این نتایج را رودریگز- میزوسو و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند.

علت چنین روندی را می‌توان به کاهش ثابت دی الکتریک نسبت داد که موجب افزایش حلالیت ترکیبات آلی و کاهش حلالیت در ترکیبات معدنی و در نتیجه استخراج اجزای خاصی با قدرت مهار کنندگی بالا می‌شوند. جدول آنالیز واریانس معنی دار بودن دما و مدت زمان روی DPPH، همچنین تأثیر متقابل فاکتورها را نشان می‌دهد.

نتایج اندازه گیری قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد با نتایج اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی آهن نسبت مستقیم داشت و عصاره‌های با قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد بیشتر دارای قدرت احیاء کنندگی آهن بیشتری نیز بودند. فرهوش و همکاران (۲۰۰۹)، چنین نتیجه‌ی مشابهی را در مورد روغن پوست بنه یافته بودند.

[5] Rosemary
[6] Marjoram
[7] Oregano



ب الف

شکل ۳- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره مادون بحرانی پوست بنه به عنوان تابعی از دما و مدت زمان استخراج، الف- نمودار سطح سه بعدی ب- نمودار مسطح، نسبت اختلاط در سطح ۱:۳۰ ثابت نگه داشته شده است.

نتیجه گیری

افزایش دما، نسبت اختلاط و مدت زمان استخراج تا مقدار خاصی موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی آب مادون بحرانی شد؛ در این مطالعه شرایط بهینه فرایند برای بدست آوردن عصاره‌ای با حداکثر میزان ترکیبات پلی فنلی، قدرت احیاء کنندگی و قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، که نشان دهنده‌ی قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر است، دمای ۱۹۶/۸۱°C، مدت زمان ۵۲/۵۷ دقیقه و نسبت اختلاط پوست بنه-آب ۴۳/۶۱:۱ تعیین شد. تحت این شرایط میزان ترکیبات فنلی کل، قدرت احیاکنندگی و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH به ترتیب برابر با ۲۲۸٤ میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم ماده اولیه، ۰/۲۰۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر (بر حسب EC_{50}) و ۰/٦۲۸٤ میلی گرم بر میلی لیتر (بر حسب EC_{50}) بدست آمد. به منظور تأیید نتایج روش سطح-پاسخ، عصاره در نقطه بهینه استخراج و آنالیز شد. نتایج حاصل با تقریب قابل قبولی نتایج بدست آمده را تأیید نمود. بنابراین می‌توان از این روش به عنوان فرایندی مناسب جهت استخراج مواد زیست فعال با فعالیت آنتی اکسیدانی قابل قبول از پوست بنه استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

حاجی حیدری د، ۱۳۷٦ . طرح تحقیقاتی استخراج روغن از پسته‌ی وحشی. جهاد دانشگاهی صنعتی اصفهان.

شاددل ر، حداد خداپرست م ح، مسکوکی ع، شریف ع و آزادمرد دمیرچی ص، ۱۳۹۱. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ی استخراج شده از پوست بنه رقم موتیکا به روش مادون بحرانی آب، پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. جلد۱، شماره ۲، صفحه: ۸٤-۷۳.

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B and Weil JA, 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry, 84: 551–562.

Budrat P and Shotipruk A, 2008. Extraction of Phenolic Compounds from fruits of bitter melon (*Momordica charanti*a) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. Journal-science, 35: 123-130.

Farhoosh R, Haddad Khodaparast MH and Sharif A, 2009. Bene hull oil as a highly stable and antioxidative vegetable oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 111: 1259-1265.

Farhoosh R, Tavassoli Kafrani MH and sharif A, 2009. Antioxidant activity of sesame, rice bran and bene hull oils and their unsaponifiable matters. European Journal of Lipid Science and Technology , 113: 506–512.

Gugliucci A, Markowicz-Bastos DH, Schulze J and Ferreira-Souza MF, 2009. Caffeic and chloreogenic acids in IIex paraguarensis extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. Fitoterapia, 80: 339−344.

Hassas-Roudsari MR. Chang P, Pegg CR and Tyler R, 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. Food Chemistry, 114: 717–726.

He L, Zhang X, Xu H, Xu C, Yuan F, Knez Z, Novak Z and Gao Y, 2011. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS$\bullet^{+}$ assay. Food and Bioproducts Processing, 90: 215-223.

Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, and Brunton NP, 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. Food Chemistry, 126: 339-346.

Ibanez E, KubaTova A, Senorans FJ, Cavero S, Reglero G and Hawthorne SB, 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. Food chemistry, 51: 375-382.

Ju-Young B, Jung-Min L and Seung-Cheol L, 2008. Extraction of nutraceutical compounds from licorice roots with subcritical water. Separation and Purification Technology, 63: 661–664.

Kulkarni A, Suzuki S and Etoh H, 2008. Antioxidant compounds from Eucalyptus grandis biomass by subcritical liquid water extraction. Journal of Wood Science, 54: 153-157.

Mendiola JA, Rodriguez-Meizoso I, Senorans FJ, Reglero G, Cifuentes A and Ibanez E, 2008. Antioxidant in plant foods and microalgae extracted using compressed fluids. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 7: 3301-3309.

Morello JR, Motilva MJ, Tovar MJ and Romero MP, 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. Food chemistry, 85: 357-364.

Oyaizu M, 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44: 307–315.

Plaza M, Amigo-Benavent M, D. del Castillo M, Ibanez E and Herrero M, 2010. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. Food Research International, 43: 2341-2348.

Ramos L, Kristensen EM and Brinkman UTAh, 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Journal of Chromatography A, 975: 3–29.

Rangsriwong P, Rangkadilok N, Satayavivad J, Goto M and Shotipruk A, 2009. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from Terminalia chebula Retz. fruits. Separation and Purification Technology, 66: 51–56.

Rodriguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Senorans FJ, Cifuentes A and Ibanez E, 2010. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from Haematococcus pluvialis microalgae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51: 456−463.

Rodriguez-Meizoso I, Marin FR, Herrero M, Senorans FJ, Reglero G, Cifuentes A and Ibanez E, 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 1560–1565.

Shalmashi A, Abedi M, Golmohamad F and Eikani MH, 2010. Isolation of caffeine from tea waste using subcritical water extraction. Journal of food process engineering, 33: 701-711.

Singh RP, Murthy KNC and Jayaprakasha GK, 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 81–86.

Wanasundara PK, and shahidi F, 2005. Antioxidants: science, technology, and applications. In Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi, F . (Eds). John Wiley and Sons, Inc. New Jersey.