مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۰ شماره ۲/ سال ۱۳۹۹/ صفحات ۱۲۹ تا ۱۴۱

تاثیر شرایط مختلف استخراج آب زیربحرانی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی عصاره تفاله انار

یاسمن پورمحمد[۱] و مهدی قره‌خانی[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/٦ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲٤

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[۲] گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[*]مسئول مکاتبه: Email: m.gharekhani@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: اخیراً، نقش سودمند آنتی‌اکسیدان‌ها مقابل بسیاری از بیماری‌های انسانی و فساد مواد غذایی که ناشی از فساد اکسایشی می‌باشد، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. تفاله انار، بخش غیرخوراکی و از محصولات جانبی صنعت آبمیوه‌گیری و منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی است. **هدف**: این مطالعه، با هدف فراهم نمودن زمینه، جهت بررسی اثر عصاره تفاله انار در صنایع غذایی و تولید محصولات غذایی فراسودمند، صورت گرفته است. **روش کار**: در این پروژه، ارزیابی روش‌های استخراج آب زیربحرانی و غرقابی جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی عصاره تفاله انار انجام شد. متغیرهای استخراج آب زیربحرانی، پارامترهای: دما (۱۲۰°C، ۱۵۰°C و ۱۸۰°C) و زمان (۵، ۱۵ و ۲۵ دقیقه) بودند. در عصاره‌های تهیه شده، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، با روش‌های: آنتی‌اکسیدان احیاء رادیکال آزاد (DPPH) برحسب درصد RSA و آنتی‌اکسیدان احیاکننده آهن (FRAP) برحسب میلی‌گرم آهن ۲ ظرفیتی بر گرم ماده خشک، محتوای فلاونوئیدی بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک و محتوای فنل کل با روش فولین-سیوکالتیو بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک، اندازه‌گیری و گزارش شد. **نتایج**: ارزیابی دو روش غرقابی و آب زیربحرانی نشان داد که بیشترین میزان استخراج، مربوط به روش آب زیربحرانی بود. نتایج بررسی تأثیر متغیرهای مورد مطالعه در استخراج آب زیربحرانی نشان داد که با افزایش دما و زمان، میزان استخراج این ترکیبات، افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین استخراج در تیمار ۱۸۰°C و ۲۵ دقیقه بود. **نتیجه‌گیری نهایی**: روش آب زیربحرانی نه‌تنها یک فن‌آوری دوستار محیط زیست است، بلکه میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال را نیز افزایش داد.

واژگان کلیدی: استخراج آب زیر بحرانی، آنتی اکسیدان، تفاله انار، ترکیبات فنلی، فلاونوئید

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیباتی حیاتی هستند که به‌طور گسترده به‌عنوان پارامتری برای غذا و ترکیبات زیست‌فعال دارویی استفاده می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات ختثی‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بدن هستند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن میل ترکیبی زیادی با مولکول‌های حیاتی بدن ازجمله، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها دارند. بنابراین رادیکال‌های آزاد از طریق ترکیب با این مولکول‌ها، باعث تخریب آن‌ها و در نتیجه موجب ایجاد بیماری‌های مختلف ازجمله سرطان‌ها،

بیماری‌های قلبی- عروقی، التهابی و تضعیف سیستم ایمنی بدن می‌شوند (ایوب نژادگان جهرمی و حسن‌پور ۱۳۹۷). فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه نزدیک با میزان ترکیبات فنلی دارد. ترکیبات فنلی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند. مهم‌ترین عملکرد این ترکیبات در ارتباط با اکسیداسیون، غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی است (سلیمانی ده دیوان و همکاران ۱۳۹۵). در سال‌های اخیر به دلایل مربوط به سلامتی، توجه زیادی به سوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، معطوف گردیده است. نکته در خور توجه، در مورد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی این است که نه‌تنها فاقد برخی از زیان‌های آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هستند، بلکه مصرف آن‌ها می‌تواند منجر به حفظ و تأمین سلامت بیشتر برای انسان گردد (فاطمی ۱۳۷۸). انار با نام علمی *پونیکا گراناتوم*[1] یک میوه مهم مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است. با توجه به ظرفیت بالای ایران در تولید انار و هم‌چنین تفاله انار (که به‌عنوان یک محصول جانبی کارخانه‌جات تولید نوشیدنی انار محسوب می‌شود) و به‌دلیل خواص درمانی و سلامتی‌بخش آن، این محصول می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب مغذی و مفید مورد استفاده قرار گیرد (کاظمی‌زاده و فدایی نوغانی ۱۳۹۳). روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال وجود دارند. یکی از روش‌های جدید، استخراج با آب زیربحرانی می‌باشد. آب زیربحرانی، ناحیه‌ای از فاز کندانس‌شده آب است که دمای بین ۱۰۰^{oC} (نقطه جوش آب) تا ۳۷٤^{oC} (نقطه بحرانی آب) و هم‌چنین میزان فشاری که آب در حالت مایع بماند و تغییر فاز ندهد را شامل می‌شود (راموس و همکاران ۲۰۰۲). تحت این شرایط، حلالیت ترکیبات با قطبیت کم و ترکیبات آلی نسبت به دمای محیط، افزایش می‌یابد. استخراج با آب زیربحرانی، روشی سریع، ارزان، با قابلیت بازیافت مجدد و سازگار با محیط زیست است و در مقایسه با حلال‌های آلی سمی مورد استفاده در روش‌های مرسوم، از آب به‌عنوان سبزترین حلال استفاده می‌شود (میلر و هاوتورن ۱۹۹۸). به‌طور کلی معایب روش‌های سنتی، بازده پایین و زمان طولانی استخراج می‌باشد. احتمال باقی ماندن حلال آلی در محصول نهایی نیز وجود دارد که ممکن است جذب بدن شود. (عزت‌زادگان جهرمی ۱۳۹۱). در استخراج به‌روش غرقابی[2] گیاهان به صورت پودر یا سالم، در یک مخزن و در دمای اتاق، درون حلال موردنظر، غوطه‌ور شده و مرتباً توسط یک هم‌زن، به هم زده می‌شوند و درنهایت پس از طی بازه زمانی موردنظر، مخلوط حلال و گیاه، از فیلتر عبور کرده و عصاره از مواد جامد جدا می‌گردد (سوکدِو و همکاران ۲۰۰۸). اِرشان و همکاران (۲۰۱۸)، در مطالعه‌ای، استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی را از پوسته پسته به روش آب‌زیربحرانی انجام داده و نتیجه گرفتند که درمقایسه با روش استخراج با متانول، این ترکیبات با میزان بالایی استخراج شدند. در مطالعه انجام شده توسط لی و همکاران (۲۰۱٤)، پوست پیاز خوراکی از طریق اتانول، آب داغ و روش آب زیربحرانی، عصاره‌گیری شد. نتایج نشان داد که عصاره پوست پیاز خوراکی تولید شده توسط آب زیربحرانی پتانسیل بسیار بالایی به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی مفید دارد. در مطالعه انجام شده توسط محمدی و همکاران (۲۰۱۲)، خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره زرشک، با استفاده از روش‌های غرقابی و آب زیربحرانی مورد بررسی قرار گرفتند و با روش‌های معمول مقایسه شدند. نتایج نشان داد که از عصاره‌های به‌دست آمده با روش آب زیربحرانی می‌توان به جای آنتی‌اکسیدان مصنوعی استفاده کرد. رنگس ریوونق و همکاران (۲۰۰۹)، استخراج ترکیبات فنلی از میوه هلیه کابلی[3] به روش آب زیربحرانی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره به‌دست آمده به این روش، نسبت به روش‌های استخراج مرسوم، دارای ترکیبات فنلی قابل

[1] Punica granatum

[2] Maceration Extraction

[3] Terminalia

توجه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بودند. در تحقیق حاضر دو روش استخراج آب زیربحرانی و غرقابی و هم‌چنین تأثیر متغیرهای فرآیند آب زیربحرانی شامل دما و زمان بر میزان استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و پلی‌فنلی عصاره تفاله انار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

تفاله انار، از کارخانه تولید آب‌میوه تکدانه تبریز تهیه شده و سپس در سایه خشک گردید و بعد آسیاب شده و از آرد حاصل برای تهیه عصاره استفاده شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پروژه (DPPH[1]، معرف فولین-سیرکالتیو، سدیم کربنات، نیترات سدیم، تری کلرید آلومینیوم، هیدروکسید سدیم، کلریدریک اسید، بافراستات، TPTZ[2]و فریک کلرید) ساخت شرکت تجاری مرک[3] آلمان بود. حلال‌های مورد استفاده آب مقطر و متانول بود.

روش‌ها

استخراج با آب زیربحرانی

عملیات استخراج عصاره، توسط دستگاه استخراج با آب زیربحرانی، طراحی و ساخته‌شده در آزمایشگاه فن‌آوری‌های نوین پژوهشکده صنایع غذایی خراسان رضوی، در پایلوت آزمایشگاهی، انجام گرفت. استخراج بدین ترتیب انجام گرفت که ابتدا پودر تفاله انار به مقدار مشخصی وزن شده و در داخل سل استخراج، قرار گرفت. سپس آب مورد نیاز، بسته به نسبت اختلاط پودر تفاله انار– آب (۱ به ۳۰) در تانک آب ریخته شد. عمل استخراج، با تنظیم درجه حرارت و فشار (۱۲۰°C در فشار ۳ بار، ۱۵۰°C در فشار ۸ بار و ۱۸۰°C در فشار ۱۲ بار) انجام گرفت. فشارهای به کار رفته، حدأقل فشار لازمی بودند که آب در حالت مایع، بماند و تغییر فاز ندهد. بعد از رسیدن دما به ۱۲۰°C استخراج در زمان‌های مورد مطالعه (۵، ۱۵ و ۲۵ دقیقه) انجام شد. سپس در دماهای ۱۵۰°C و ۱۸۰°C نیز به همین صورت عصاره‌ها به‌دست آمد. حجم عصاره استخراج‌شده، برای هر تیمار، ۷۵ میلی‌لیتر بود. سپس عصاره، با سرعت ۶۰۰۰ rpm[4] و به مدت زمان ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ شد و در نهایت فاز رویی با استفاده از کاغذ واتمن، فیلتر گردید (شاددل و همکاران ۱۳۹۱).

استخراج به روش غرقابی

جهت تهیه عصاره به روش غرقابی با نسبت اختلاط پودر تفاله انار– آب (۱ به ۳۰)، ۳ گرم پودر تفاله در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. مخلوط حاصل در تاریکی و دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت توسط هم‌زن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰rpm، هم‌زده شد، سپس جهت جداسازی فاز جامد از عصاره، مخلوط با سرعت rpm ۶۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی با عبور دادن از کاغذ صافی فیلتر گردید (محمدی و همکاران ۲۰۱۲).

تعیین مقدار فنل کل

جهت انجام این آزمایش، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد فولین سیوکالتیو با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷/۵ درصد سدیم کربنات مخلوط شده و درنهایت ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول نمونه افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و تاریکی نگه‌داری شده و جذب در ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک، بیان شد (محمدی و همکاران ۲۰۱۲). غلظت ترکیبات فنلی بر اساس معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین گردید که در رابطه ۱ ارائه شده است.

$$Y=۰/۰۰۱۲\ X+۰/\ ۱۹۹۵ \quad (R^2 = ۰/۹۹۱۲) \qquad [۱]$$

تعیین مقدار فلاونوئید

جهت انجام این آزمایش، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول نمونه با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط گردید. سپس ۰/۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد نیترات سدیم اضافه گردید

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
[2] 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine
[3] Merck
[4] *Revolutions Per Minute*

و بعد از ٦ دقیقه، ۰/۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد تری کلرید آلومینیوم افزوده شد و بعد از ٦ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول ٤ درصد هیدروکسید سدیم، اضافه شده و حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگه‌داری گردیده و جذب در ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. نتایج برحسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک بیان شد (پائول و باتاچاریا ۲۰۱۵). غلظت فلاونوئید براساس معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد کوئرستین تعیین گردید که در رابطه ۲ ارائه شده است. [۲] (R^2 = ۰/۹۹۱۲)،

Y = ۰/۰۰۱ X + ۰/ ۰۰۸۳

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان احیاء رادیکال آزاد

جهت انجام این آزمایش، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد نمونه داخل لوله آزمایش ریخته و ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول ٤ درصد متانولی DPPH به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط، نگه‌داری شده و جذب در ۵۱۷ نانومتر، قرائت شد. جذب محلول متانولی DPPH فاقد اجزا نمونه اندازه‌گیری شده و به‌عنوان جذب کنترل، در نظر گرفته شد. نتیجه آزمایش بر حسب درصد RSA[1] بیان شد. درصد RSA طبق رابطه ۳ محاسبه شد (محمدی و همکاران ۲۰۱۲).

%RSA= (جذب کنترل/جذب نمونه–جذب کنترل)×۱۰۰ [۳]

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان احیاءکننده آهن

برای اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره تفاله انار از طریق FRAP، از روش بنزی و استرین استفاده شد. ابتدا محلول FRAP تهیه گردید، که میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر بافراستات با ۲۰۰ میلی‌لیتر از ماده TPTZ محلول در۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ٤۰ درصد، مخلوط شد، به محلول فوق ۲۰ میلی‌لیتر محلول کلرید فریک ۲۰ درصد اضافه گردید و درنهایت، ۲٤ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. از محلول فوق، ۱/۵ میلی‌لیتر در کوت به دمای ۳۷^{oC} رسانده شد و جذب آن در ۵۹۳ نانومتر، قرائت گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه به محلول فوق، اضافه شد و جذب در ۵۹۳ نانومتر و ۳۷^{oC} به مدت ٤ دقیقه اندازه‌گیری شد. پس از کسر جذب بلانک، با استفاده از قرار دادن جذب مقابل غلظت، معادله خطی به‌دست آمد و با قرار دادن اعداد جذب در معادله به‌دست آمده، مقدار نهایی FRAP، بر اساس میلی‌گرم آهن ۲ظرفیتی بر گرم ماده خشک بیان شد (بنزی و استرین ۱۹۹٦).

آنالیز آماری

در این تحقیق، آنالیز آماری برای تأثیر دما و زمان استخراج با روش آب زیربحرانی بر ویژگی‌های عصاره تفاله انار از طرح کاملا تصادفی انجام شد. روش آنالیز واریانس بین گروه‌ها (ANOVA)[2] جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر حاصل از تیمارهای مختلف استفاده شد. نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس در سطح احتمال (p<۰/۰۱) و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال (p<۰/۰۵)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمایشات در سه تکرار انجام شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار مینی‌تب ۱۷ صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل ۲۰۱٦ استفاده شد.

نتایج و بحث

در جدول ۱، نتایج مربوط به آنالیز واریانس پارامترهای: فنل کل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان احیاء رادیکال آزاد و آنتی‌اکسیدان احیاءکننده آهن برای تیمارهای مختلف عصاره تفاله انار که به دو روش آب زیربحرانی و غرقابی تهیه گردیده، ارائه شده است. نتایج آنالیز واریانس در جدول ۱ نشان داد که اختلاف بین مقادیر حاصل از اندازه‌گیری تمام پارامترها برای تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).

[1] Radical Scavenging Activity

[2] Analysis Of Variance between groups

جدول ۱- آنالیز واریانس پارامترهای: فنل کل، فلاونوئید، آنتی اکسیدان احیاء رادیکال آزاد و آنتی‌اکسیدان احیاءکننده آهن برای تیمارهای مختلف عصاره تفاله انار

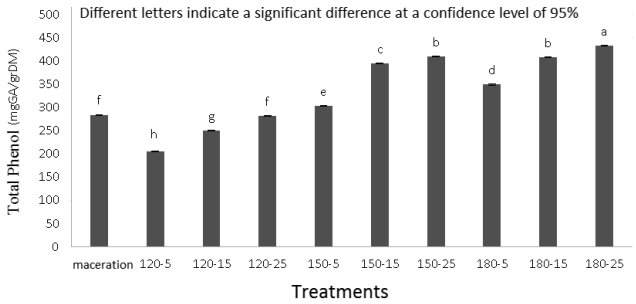
Table 1- Analysis of variance of parameters: total phenol, flavonoid, free radical scavenging antioxidant and ferric reducing antioxidant for different treatments of pomegranate pulp extract

test	variation source	degree of freedom	sum of squares	average of squares	F value	P value
total phenol	treatment	9	163650	18183.3	14474.30	0.000
	error	20	25	1.3		
	total	29	163675			
flavonoid	treatment	9	4926.67	547.407	47088.80	0.000
	error	20	0.23	0.012		
	total	29	4926.90			
free radical scavenging antioxidant	treatment	9	1675.56	186.173	70137.17	0.000
	error	20	0.05	0.003		
	total	29	1675.61			
ferric reducing antioxidant	treatment	9	4.40325	0.489250	1359.03	0.000
	error	20	0.00720	0.000360		
	total	29	4.41045			

مقدار فنل کل

در شکل ۱، نتایج تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان استخراج فنل کل عصاره تفاله انار، نشان داده شده است. نتایج مقایسه روش‌های استخراج آب زیربحرانی و غرقابی نشان داد بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی در روش آب زیربحرانی که مربوط به تیمار ۱۸۰ درجه سلسیوس و ۲۵ دقیقه بود (۴۳۲/۸۷۵ میلی‌گرم اسید گالیگ در گرم ماده خشک) نسبت به روش غرقابی (۲۸۳/۸۷۵ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم ماده خشک) افزایش ۳۵ درصدی داشت. میزان فنل کل عصاره در نمونه غرقابی و نمونه آب زیربحرانی ۱۲۰ درجه سلسیوس و ۲۵ دقیقه (۲۸۱/۸۷۵ میلی‌گرم اسید گالیگ در گرم ماده خشک) یکسان بود.

در روش استخراج آب زیر بحرانی، با افزایش دما و زمان استخراج میزان ترکیبات فنلی، افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان فنل کل مربوط به تیمار ۱۸۰ درجه سلسیوس و ۲۵ دقیقه بود و کمترین میزان مربوط به تیمار ۱۲۰ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه (۲۰۵/۳۷۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک) بود.



شکل ۱- تأثیر تیمارها بر میزان استخراج فنل کل عصاره تفاله انار

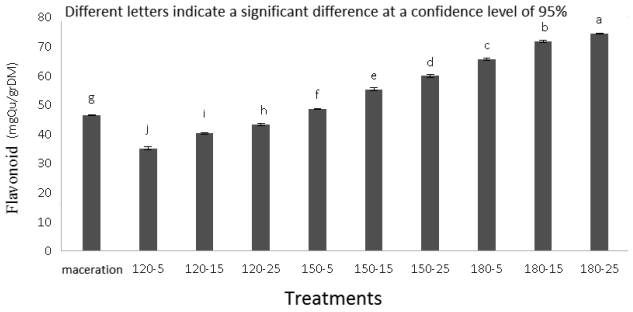
Figure 1- The effect of treatments on total phenol extraction of pomegranate pulp extract

ولی با توجه به مقادیر به‌دست آمده، تأثیر متغیر زمان استخراج نسبت به متغیر دمای استخراج، بیشتر بود، به همین دلیل، میزان ترکیبات فنلی در عصاره آب زیربحرانی ۱۵۰ درجه سلسیوس و ۲۵ دقیقه، بیشتر از تیمار ۱۸۰ درجه سلسیوس با زمان‌های ۱۵ و ۵ دقیقه بود. افزایش استخراج ترکیبات فنلی با افزایش دما در روش آب زیربحرانی چنین توصیف می‌شود که آب در دما و فشار معمولی حلال ترکیبات قطبی بوده و ترکیبات غیرقطبی در آن حل نمی‌شوند، ولی افزایش دما و فشار از قطبیت آب می‌کاهد و به‌عنوان حلال غیرقطبی عمل می‌کند و در نتیجه توانایی آب برای حل کردن ترکیبات غیرقطبی افزایش می‌یابد. همچنین بالا بردن دما و فشار آب باعث کاهش کشش سطحی و ویسکوزیته آن

می‌شود و در نتیجه حین فرآیند استخراج، سرعت انتشار افزایش یافته و انتقال جرم تسهیل می‌یابد (براند ویلیامز و همکاران[1] ۱۹۹۵).ارشان و همکاران[2] (۲۰۱۸)، در یک مطالعه، استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی را از پوسته پسته به‌روش آب‌زیربحرانی انجام داده و نتیجه گرفتند که درمقایسه با روش استخراج با متانول، این ترکیبات با میزان بالایی استخراج شدند و هم‌چنین نشان دادند که با افزایش‌دما میزان استخراج ترکیبات فنلی از پوسته پسته افزایش یافت که نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نیز با یافته‌های مطالعه ارشان و همکاران مطابقت داشت. رنگس ریوونق و همکاران[3] (۲۰۰۹)، استخراج ترکیبات فنلی از میوه هلیله کابلی به روش آب زیربحرانی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که عصاره به‌دست آمده با روش آب زیربحرانی نسبت به روش‌های استخراج مرسوم، دارای ترکیبات فنلی قابل توجهی بود و هم‌چنین بیان کردند که به‌دلیل افزایش دما و فشار حین فرآیند، نه‌تنها میزان ترکیبات فنلی، بلکه سرعت استخراج نیز به علت افزایش سرعت انتشار، افزایش یافت که نتیجه تحقیق حاضر با نتایج رنگس ریوونق و همکاران مطابقت داشت.

مقدار فلاونوئید

در شکل ۲، نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف بر مقدار فلاونوئید عصاره تفاله انار، نشان داده شده است. نتایج اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید نشان داد، در مقایسه روش‌های استخراج آب زیربحرانی و غرقابی بیشترین میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در روش آب زیربحرانی که مربوط به تیمار ۱۸۰ درجه سلسیوس و ۲۵ دقیقه بود (۷٤/۳۰ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک) نسبت به روش غرقابی (٤٦/۳۸ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم ماده خشک) افزایش ٤۰ درصدی داشت و هم‌چنین در روش استخراج آب زیربحرانی با افزایش دما و زمان در استخراج، میزان ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به تیمار ۱۸۰ درجه سلسیوس و ۲۵ دقیقه و کمترین میزان مربوط به تیمار ۱۲۰ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه (۳۵/۱۳ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک) بود. با توجه به افزایش بازده استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در روش آب زیربحرانی نسبت به روش غرقابی، می‌توان گفت که روش آب زیربحرانی یک روش مناسب جهت استخراج فلاونوئیدهای موجود در عصاره تفاله انار می‌باشد. علت افزایش میزان ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش دما و زمان در فرآیند استخراج آب زیربحرانی، افزایش حلالیت ترکیبات غیرقطبی آلی در آب زیربحرانی می‌باشد (براند ویلیامز و همکاران[4] ۱۹۹۵). مطالعه‌ای توسط عزیزی و همکاران (۱۳۹٤)، به‌منظور بررسی و مقایسه ترکیبات فلاونوئیدی عصاره به‌دست آمده از حلال‌ها و روش‌های دستگاهی متفاوت از پوست دو رقم متفاوت انار انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داده که، رقم، حلال و روش استخراج، مهم‌ترین فاکتورها جهت تعیین ترکیبات فلاونوئیدی در انار می‌باشد.



شکل ۲- تأثیر تیمارها بر میزان فلاونوئید عصاره تفاله انار

Figure 2- The effect of treatments on flavonoid of pomegranate pulp extract

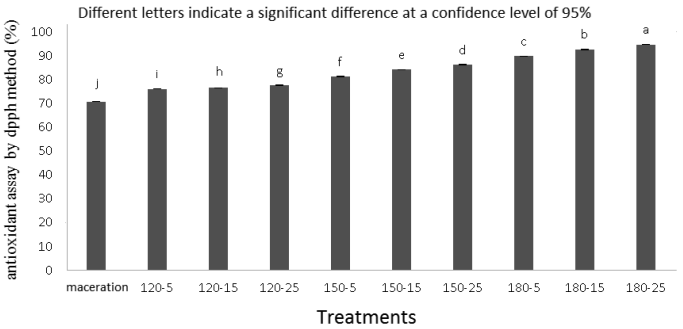
ظرفیت آنتی‌اکسیدان احیاء رادیکال آزاد

در شکل ۳، نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش احیا رادیکال آزاد

[1] Brand-Williams et al. (1995)
[2] Erşan et al. (2018)
[3] Rangsriwong et al. (2009)
[4] Brand-Williams et al. (1995)

(DPPH) عصاره تفاله انار، نشان داده شده است. طبق این نتایج، بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH، مربوط به عصاره آب زیربحرانی در ۱۸۰ ^{oC} و ۲۵ دقیقه بود (۹۴/۶۳٪) و کمترین میزان، مربوط به نمونه غرقابی بود (۷۰/۷۳ ٪). در مطالعه انجام شده توسط محمدی و همکاران (۲۰۱۲)، خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره زرشک با استفاده از روش‌های غرقابی و استخراج آب زیربحرانی مورد بررسی قرار گرفتند و با روش‌های معمول مقایسه شدند. نتایج نشان داد که در روش استخراج زیربحرانی، مقدار کل ترکیب فنلی و آنتی‌اکسیدانی با افزایش فشار و درجه حرارت به‌دلیل افزایش حلالیت ترکیبات غیرقطبی افزایش یافت. هم‌چنین عصاره‌های به‌دست آمده با روش استخراج آب زیربحرانی، اثری حیاتی در حفظ روغن خوراکی مواد غذایی تحت فرآیند سرخ شدن داشتند و می‌توان از آن‌ها به جای آنتی‌اکسیدان مصنوعی استفاده کرد. مطابق با یافته‌های تحقیق محمدی و همکاران می‌توان دلیل افزایش استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از عصاره تفاله انار در روش آب زیربحرانی نسبت به روش غرقابی را به تأثیر بالا بودن دما و فشار در فرآیند آب زیربحرانی که موجب افزایش حلالیت ترکیبات آلی می‌شود، مرتبط دانست.

آیبانز و همکاران[1](۲۰۰۳) در مطالعه‌ای که بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری به روش آب زیربحرانی انجام دادند، مشاهده کردند که با افزایش دمای استخراج میزان ترکیبات قطبی مانند کارنوزیک اسید و کارنوزول کاهش یافت.

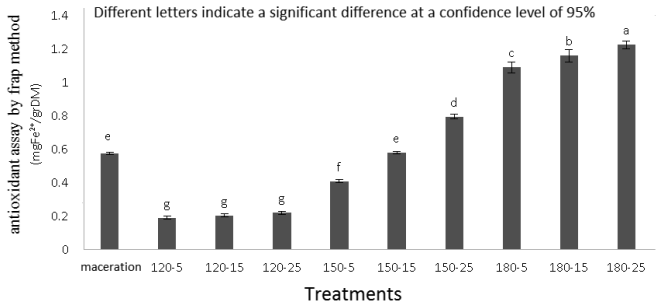


شکل ۳- تأثیر تیمارها بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش احیا رادیکال آزاد (DPPH) عصاره تفاله انار

Figure 3- The effect of treatments on free radical scavenging assay (DPPH) of pomegranate pulp extract

ظرفیت آنتی‌اکسیدان احیاءکننده آهن

در شکل ٤، نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش احیاکننده آهن (FRAP) عصاره تفاله انار، نشان داده شده است که طبق این نتایج بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش احیاکننده آهن (FRAP)، مربوط به عصاره آب زیربحرانی در ۱۸۰ ^{oC} و ۲۵ دقیقه بود (۱/۲۲۵ میلی‌گرم آهن دو ظرفیتی بر گرم ماده خشک) و کمترین میزان، مربوط به ۱۲۰ ^{oC} و ۵ دقیقه بود (۰/۲۰۵ میلی‌گرم آهن دو ظرفیتی بر گرم ماده خشک).



شکل ۴- تأثیر تیمارها بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش احیاکننده آهن (FRAP) عصاره تفاله انار

Figure 3- The effect of treatments on ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay of pomegranate pulp extract

نتایج به‌دست آمده از تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH وFRAP نشان داد که، استخراج

[1] Ibanez et al. (2003)

آنتی‌اکسیدان به روش DPPH در آب زیربحرانی، نسبت به غرقابی ۲۵ درصد افزایش یافت، درحالی‌که میزان آنتی‌اکسیدان به روش FRAP در آب زیربحرانی نسبت به غرقابی ۵۰ درصد افزایش یافت. در آزمون FRAP، ظرفیت آنتی‌اکسیدان نمونه غرقابی و نمونه تیمار ۱۵۰^{oC} و ۲۵ دقیقه یکسان بود. در روش آب زیربحرانی، میزان آنتی‌اکسیدان احیاء رادیکال آزاد و آنتی‌اکسیدانی احیاءکننده آهن با افزایش دما و زمان استخراج، افزایش یافت. در روش FRAP تأثیر متغیر زمان در تیمارهای دمای ۱۲۰^{oC} معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از مقایسه دو روش DPPH و FRAP نشان داد که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یک ماده آنتی‌اکسیدان علیه رادیکال‌های آزاد، ضرورتاً با توانایی آن ماده در احیاء آهن فریک به آهن فروس برابر نمی‌باشد. نتیجه مطالعه طایفی نصرآبادی و خدارحمی (۱۳۸٦) بر ارزیابی روش‌های مختلف جهت تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی تام سرم موش صحرایی نشان‌دهنده اختلاف بین میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی تام سرم موش صحرایی در روش‌های مختلف تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بود، که علت این امر را به تکنولوژی مختلف و جداگانه‌ای که هر روش جهت سنجش مقادیر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی تام بکار می‌برد نسبت داده‌اند. در مطالعه ای که حسینی و همکاران (۱۳۹۳) بر روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی انجام داده‌اند، به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از مخلوط چند روش می‌تواند برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی مفید باشد. در مطالعه انجام‌شده توسط لی و همکاران (۲۰۱٤)، پوست پیاز خوراکی از طریق اتانول، آب داغ و استخراج به روش آب زیربحرانی، عصاره‌گیری شد و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت. محققین در این مطالعه بیان کردند که به‌دلیل پیچیده بودن واکنش‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی تنها با استفاده از یک روش نمی‌توان میزان این ترکیبات را در عصاره‌های گیاهی ارزیابی کرد و باید از چندین روش جهت بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها استفاده کرد. برطبق یافته‌های مطالعه لی و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء رادیکال آزاد عصاره پوست پیاز به‌دست آمده با روش آب زیربحرانی در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس مشابه با عصاره استخراجی از طریق اتانول بود. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در مورد تأکید بر استفاده از روش آب زیربحرانی به‌عنوان روشی مؤثر برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با یافته‌های مطالعه لی و همکاران سازگاری داشت.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از بررسی تأثیر متغیرهای مورد مطالعه (دما و زمان استخراج) در روش استخراج آب زیربحرانی نشان داد که با افزایش دما و زمان، میزان استخراج فنل کل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش یافت. هم‌چنین، می‌توان از روش استخراج آب زیر بحرانی به‌عنوان فرآیندی مناسب جهت استخراج ترکیبات پلی‌فنلی و آنتی‌اکسیدانی تفاله انار استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

ایوب نژادگان جهرمی ب و حسن‌پور ح، ۱۳۹۷. ارزیابی ترکیبات حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست و گوشت میوه ازگیل توسط عصاره متانولی و استونی، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۸(٤)، ۷۲-۵۷.

حسینی س، قراچورلو م، غیاثی طرزی ب و قوامی م، ۱۳۹۳. مروری بر روش های تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی (اساس واکنش، روش کار، نقاط قوت و ضعف)، نشریه علوم غذایی و تغذیه، ۱۱(٤)، ۱۱۱-۸۹.

سلیمانی ده دیوان ن، گلشن تفتی ا و یاسینی اردکانی س ع، ۱۳۹۵. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان پلی‌فنل‌ها، رنگدانه‌ها و فیبر در هسته ارقام خرمای مضافتی و کلوته استان کرمان، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲٦(۱)،۱۲۲-۱۱۳.

شاددل ر، حداد خداپرست م ح، مسکوکی ع، شریف ع و آزادمرد دمیرچی ص،۱۳۹۱. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از پوست بنه رقم موتیکا به روش مادون بحرانی آب، نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی،۱(۲)، ۸٤-۷۳.

طایفی نصرآبادی ح و خدارحمی ر، ۱۳۸٦. ارزیابی دو روش TRAP و FRAP جهت تعیین پتانسیل آنتی اکسیدانی تام سرم موش صحرایی، فصل‌نامه علمی پژوهشی یافته – دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ۹(۳)، ٤۷-٤۱.

عزت زادگان جهرمی س، ۱۳۹۱. معرفی روش استخراج مواد فراسودمند توسط آب زیر بحرانی و مقایسه با روشهای متداول استخراج، مجموعه مقالات سومین همایش ملی علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا، ٥-۱.

عزیزی غ، قاسمی پیربلوطی ع، جعفری ولدانی م و رحیمی ا، ۱۳۹٤. تاثیر نوع حلال و روش عصاره گیری بر ویژگی های آنتی اکسیدانی عصاره پوست انار ارقام نجف آباد و شهرضا، مجموعه مقالات نخستین همایش بین‌المللی صنایع غذایی ایران، مرکز همایشهای *توسعه* ایران، تهران، ۱۲-۱.

فاطمی ح، ۱۳۷۸. شیمی مواد غذایی، انتشارات شرکت سهامی انتشار تهران، ۱۲، ۱۸۷-۱۸۱.

کاظمی زاده ر و فدائی نوغانی و، ۱۳۹۳. معرفی عصاره پوست انار به‌عنوان یک جزء سلامتی بخش برای کاربرد در صنعت غذا، مجموعه مقالات سومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا، ۸-۱.

Benzie IF and Strain JJ, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Journal of Analytical Biochemistry 239(1): 70-76.

Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset CL, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie -Food science and Technology 28(1): 25-30.

Erşan S, Üstündağ ÖG, Carle R and Schweiggert RM, 2018. Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera L.*) hulls. Journal of Food chemistry 253: 46-54.

Ibanez E, Kubátová A, Señoráns FJ, Cavero S, Reglero, G and Hawthorne SB, 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(2): 375-382.

Lee KA, Kim KT, Kim HJ, Chung MS, Chang PS, Park H & Pai HD, 2014. Antioxidant activities of onion (*Allium cepa L.*) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. Journal of Food Science and Biotechnology 23(2): 615-621.

Miller DJ and Hawthorne SB,1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. Journal of Analytical Chemistry 70(8): 1618-1621.

Mohamadi M, Maskooki AM and Mortazavi SA, 2012. Evaluation of antioxidant properties of barberry fruits extracts using maceration and subcritical water extraction (SWE). Journal of World Academy of Science Engineering and Technology 69: 344-351.

Paul P and Bhattacharyya S, 2015. Antioxidant profile and sensory evaluation of cookies fortified with juice and peel powder of fresh Pomegranate (*Punica granatum*). International Journal of Agricultural and Food Science 5(3): 85-91.

Ramos L, Kristenson EM and Brinkman UT, 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Journal of Chromatography A 975(1): 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. Journal of Separation and Purification Technology 66(1): 51-56.

Sukhdev, SH, Suman, PSK, Gennaro, L and Dev DR, 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants international. United Nation Industrial Development Organization the International Centre for Science and High Technology in *Trieste* 11.

Journal of Food Researches/vol.30 No.2/ 2020/pp 129-141
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

Effect of different conditions of subcritical water extraction on antioxidant capacity and amount of phenolic compounds of pomegranate pulp extract

Y Puormohammad[1] and M Gharekhani[2]*

Received: January 26, 2019 Accepted: May 14, 2019
[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz Islamic Azad University, Iran
[2] Department of Food science and Technology, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
*Corresponding Author: m.gharekhani@iaut.ac.ir

Introduction: Recently, the role and benefits of antioxidants against many human diseases and food spoilage caused by oxidative corruption has attracted a lot of attention. Antioxidants are vital compounds that are widely used as a parameter for food and bioactive drug compounds. Antioxidants are compounds that inactivate oxygen-free radicals in the human Body. Oxygen-free radicals have a strong tendency to combine with vital molecules in the body, including nucleic acids and proteins. Therefor, free radicals, by combining with these molecules, destroy them and thus cause various diseases such as cancers, cardiovascular disease, inflammatory and Weakening of the immune system (Ayub Nejadgan Jahromi and Hasanpour 1397). Pomegranate pulp is a non-edible part and by-product in the juice industry and is a rich source of polyphenol antioxidants and due to its cure and health benefits, it can be used as a nutritious and useful compound (Kazemizadeh and fadaeeie noghani 1393). There are various methods for extracting bioactive compounds. One of the new methods is extraction with subcritical water. Subcritical water is a region of the condensed phase of water, the temperature of which is between 100°C and 374°C, as well as the pressure that the water stays in the liquid state and does not change the phase (Ramos et al 2002). In the present study, two methods for extraction of subcritical water and maceration and also the effects of subcritical water process variables, including temperature and time, on the extraction of antioxidant and polyphenolic compounds of pomegranate pulp extract were investigated.

Material and methods: In this project, two methods for extraction including subcritical water and maceration were evaluated to determine the antioxidant capacity and phenolic compounds of pomegranate pulp extract. Extract of subcritical water extraction operation was performed by a subcritical water extraction device in a pilot laboratory. Subcritical water extraction variables were two parameters: temperature (120°C,150°C and 180°C) and time (5, 15 and 25 minutes). Volume of the extracts were 75 ml for each treatment (shaddel et al. 1391). In the method of maceration to prepare the extract, mixture pomegranate pulp powder-water were mixed in a dark environment and ambient temperature for 24 hours using a magnetic stirrer, Then, the mixture was centrifuged to separate the solid phase of extract (Mohamadi et al. 2012). In the extracts, the antioxidant capacity was measured using two methods: the free radical scavenging assay (DPPH) in %RSA (Mohamadi et al. 2012) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay in milligram Fe^{2+} per gram dry matter (Benzie and Strain 1996), Furthermore, total phenol content by the folin-ciocalteau method in milligram of gallic acid per gram of dry matter (Mohamadi et al. 2012) and flavonoid contents in milligram of quercetin per gram of dry matter (Paul and Bhattacharyya 2015) were evaluated and reported. In this research, statistical analysis was carried out on the effect of temperature and time of extraction by subcritical water on the properties of pomegranate pulp extract from a completely randomized design. (ANOVA) was used to analyze the presence or absence of significant

differences between the amounts of different treatments. The results of the analysis of variance method were analyzed at probability level (P<0.01) and averages were compared at probability level (P<0.05). The experiments were carried out in three replications.

Results and discussion: The results of the assessment of two methods of maceration and subcritical water showed that the highest extraction was related to the subcritical water method compared to the maceration method. The results of analysis of variance showed that the difference between the values of total phenol, flavonoids, free radical antioxidant and ferric reducing antioxidant for different treatments of pomegranate pulp extract, which was prepared by two methods of subcritical water and maceration, was significant at %1 probability level (P<0.01). The results of the effect of different treatments on the extraction of measured parameters showed that, with increasing temperature and time, the extraction rates of these compounds increased, so that the highest extraction was carried out at treatment at a temperature of 180°C and time of 25 minute. The highest total phenol content was 180°C and time of 25 minute (432.875 mg of gallic acid per gram of dry matter), and the lowest was 120°C and time of 5 minute (205.375 mg / g galic acid per gram of dry matter). In the subcritical water extraction method, with increasing temperature and time in extraction, the amount of flavonoid compounds increased so that the highest amount of flavonoid compounds was related to the treatment of 180°C and time of 25 minute (74.30 mg of quercetin per gram of dry matter) and the lowest amount was related to the treatment of 120°C and time of 5 minute (35.13 mg of quercetin per gram of dry matter). According to the results, the highest amount of antioxidant capacity by DPPH method was related to subcritical water extraction method in 180°C and time of 25 minute (%94.63). According to the results, the highest amount of antioxidant capacity with iron reduction method (FRAP) was related to subcritical water extraction in 180°C and time of 25 minute (1.225 mg of divalent iron per gram of dry matter) and the lowest amount was related to 120°C and time of 5 minute (0.205 mg of divalent iron per gram of dry matter). Increasing the extraction of these compounds by increasing the temperature and pressure in the subcritical water method is described by the fact that water at ordinary temperature and pressure is solvent of polar compounds and non-polar compounds are not soluble in it, But the increase of temperature and pressure reduces the polarity of water and acts as a non-polar solvent, which increases the ability of water to dissolve non-polar compounds. Also, raising the temperature and pressure of water reduces surface tension and viscosity, and thus, during the extraction process, the propagation velocity increases and the mass transfer is facilitated (Brand-Williams et al 1995). In other studies, the results showed that the extracts extracted by subcritical water have significant phenolic and antioxidant compounds than conventional extraction methods and also stated that it was due to increased temperature and pressure during the process, not only the amount of phenolic compounds but also the rate of extraction increased due to increased propagation velocity (Erşan et al 2018; Rangsriwong et al 2009; Mohamadi et al 2012).

Conclusion: According to the results, subcritical water extraction can be used as a suitable method for extraction of polyphenolic and antioxidant compounds of pomegranate pulp. Subcritical water is not only an environmentally friendly technology, but also increases the amount of bioactive compounds extracted compared with the maceration method.

Keywords: Antioxidant, Flavonoid, Phenolic compounds, Pomegranate pulp, Subcritical water extraction