نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره۳/ سال ۱۳۹۴

شناسایی عوامل تأثیرگذار بر تولید و استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از تفاله سیب با استفاده از دو زیر واریته *رایزوپوس اولیگوسپوروس*

سعید حمدی‌پور*[1]، محمود رضا زاد[2] و محمد علیزاده[2]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۵

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[2] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه
*مسئول مکاتبه:E-mail:saeid.hamdipour@gmail.com

چکیده

تفاله سیب از محصولات جانبی کارخانه‌های فرآوری سیب به شمار می‌آید که می‌توان از آن ترکیبات زیست فعالی همچون مواد فعلی تولید کرد. در این مطالعه از دو زیرواریته *رایزوپوس میکروسپوروس* *الیگوسپوروس* جهت تولید مواد زیست فعال آنتی‌اکسیدانی در بستر تفاله سیب و پودر آب‌پنیر استفاده شد. همچنین تغییرات میزان ترکیبات فنولی کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات با استفاده از آزمون بازدارندگی رادیکال‌های آزاد دی پی پی اچ و اندازه‌گیری فاکتور محافظت آنتی‌اکسیدانی و شمارش کپک در ٥٤ تیمار موردبررسی قرار گرفت. در هریک از این تیمارها تأثیر متغیرهایی از قبیل دمای گرمخانه گذاری در سه سطح ۲۷،۲۳و۳۱ (درجه سلسیوس)،زمان گرمخانه گذاری در سه سطح ۸،۳ و۱۳ روز و نسبت اختلاط تفاله سیب به پودر آب‌پنیر در سوبسترا در سه نسبت ۵۰:۵۰، ۷۰:۳۰، ۹۰:۱۰ ،بررسی شد. میزان تغییرات ترکیبات فنولی کل، درصد بازدارندگی رادیکال دی پی پی اچ، فاکتور محافظت آنت اکسیدان و شمارش کپک بسته به نسبت پودر تفاله به پودر آب‌پنیر، زمان گرمخانه گذاری، نوع کپک و دمای گرمخانه گذاری به ترتیب ۱/۱۲-٦/۱۱ معادل میلی‌گرم اسید گالیک در گرم ماده خشک، ٪۹۵/۲-٪٦٥/۸، ۱/۵۵-۱/۱۸، ۱۰^۱۰*۳/۱۳-۱۰^۸*۲/۲محاسبه شد و حداکثر کارایی مربوط به *رایزوپوس الیگوسپوروس* زیر واریته ٥۲۸۷ می‌شد و مدت‌زمان گرمخانه گذاری نسبت به سایر متغیرها بیشترین تأثیر را روی پارامترهای اندازه‌گیری شده داشت.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پودر آب‌پنیر، تفاله سیب، *رایزوپوس الیگوسپوروس*

مقدمه

سیب یکی از میوه‌های مهم در جهان است که سالانه میلیون‌ها تن از آن برای تولید محصولات گوناگون از قبیل مربا، ژله ، شراب و آب سیب و... مورداستفاده قرار می‌گیرد(بوشانووهمکاران۲۰۰۸). بنابراین استفاده بهینه از ضایعات کارخانه‌های فرآوری سیب یکی از مسائل مهم در این زمینه بوده است،از طرفی تفاله سیب به‌دست‌آمده از کارخانه‌ها دارای ترکیبات فنولی باقابلیت

استخراج بالا می‌باشد (پینگرت و همکاران ۲۰۱۲) فرآورده‌های جانبی تولیدی از فرآوری سیب همچنین به‌عنوان غنی کننده‌های آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی به کار می‌روند و خاصیت ضد سرطانی دارند که تأثیر این ترکیبات در جلوگیری از سرطان روده بزرگ در شرایط آزمایشگاهی مورد تائید می‌باشد (گا سارا و همکاران ۲۰۱۲، مک کان و همکاران ۲۰۰۷) در طول پروسه تولید آب سیب حدود ۳۰-۲۵درصد تفاله سیب و حدود ۱۰-۵درصد نیز پوسته سیب تولید می‌شود (دیون و همکاران ۲۰۱۲) که توجه به این مواد و تولید موادی باارزش افزوده بالاتر اعم از ترکیبات فنولیک (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۰) بازیابی پکتین (اسشایبر و همکاران ۲۰۰۳) تولید آنزیم (تورس و همکاران ۲۰۰۶) تولید اتانول و ترکیبات معطر (پاگانینی و همکاران ۲۰۰۵) و سایر مواد مغذی از اهمیت بالایی برخوردار است درحالی‌که پتانسیل تفاله سیب به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات فنولیک آنت اکسیدان واضح و روشن است اما اطلاعات کمی در ارتباط با چگونگی استخراج این ترکیبات وجود دارد چراکه بسیاری از این ترکیبات فنولیک به‌صورت باند شده با ترکیبات کربوهیدراتی هستند (به‌صورت گلیکوزید) که وجود این باندها از خاصیت آنتی‌اکسیدانی فنول‌ها می‌کاهد (دیراج و شتی ۲۰۰۳) ضایعات میوه‌ها معمولاً منبع مهم قند، فیبر و سایر مواد باارزش از قبیل ترکیبات فنولیک می‌باشند بیش از ۸۰۰۰ نوع ساختار فنولیک مفید در سبزی و میوه‌ها شناسایی شدند (کوریا و همکاران ۲۰۰۳) خاصیت این ترکیبات این است که دهنده هیدروژن خوبی هستند و با دادن هیدروژن خود به مواد خطرناک تبدیل نمی‌شوند و با این مکانیسم از اکسیداسیون مواد حساس به اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند (چیونگ و همکاران ۲۰۰۲) اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به‌صورت عمده مورد مصرف قرار می‌گیرند اما امکان تشکیل مواد سمی و سرطان‌زا در طول تجزیه این مواد وجود دارد (ینگ و چانگ ۲۰۰۲) بنابراین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی پتانسیل جایگزینی با نوع مصنوعی رادارند اما گران بودن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و همین‌طور میزان اثربخشی کمتر آن‌ها نسبت به انواع مصنوعی دو مشکل اساسی استفاده از این ترکیبات می‌باشد بنابراین یافتن منبعی ارزان و درعین‌حال باقدرت تأثیر بیشتر بسیار حائز اهمیت می‌باشد استفاده ازمیکروارگانیسم‌ها این امکان را تا حدودی فراهم می‌کند (ینگ و چانگ ۲۰۰۲) بیشتر ترکیبات فنولی به‌صورت پیوند با گروه هیدروکسیلی کربوهیدرات‌ها هستند و میکروب‌ها با تولید آنزیم‌هایی مثل بتا گلوکوزید از منجر به بالا رفتن سطح ترکیبات فنولیک آزاد با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند یکی از این میکروارگانیسم‌ها کپک *رایزوپوس میکروسپوروس* می‌باشد این کپک در دسته عمومی غذاها بوده (کوریا و همکاران ۲۰۰۳، موراشیما و همکاران ۲۰۰۱) و در سیستم تخمیر با بستر جامد بسیار خوب رشد می‌کند که این سیستم تشکیل‌شده از سوبسترای جامد در حضور مقدار کمی رطوبت که برای رشد و نمو کپک‌ها ضروری می‌باشد (راند هیر و شتی ۲۰۰۶) در این مطالعه فقط از آب به‌عنوان حلال استفاده گردید. پودر آب‌پنیر به‌عنوان منبع مغذی می‌تواند سوبسترای میکرو ارگانیسم‌ها باشد.

آب‌پنیر به‌صورت معمولی ۶-۵ درصد لاکتوز، ۱-۸/. درصد پروتئین و ۶/.درصد چربی دارد و حدود ۸/.-۷/. درصد مواد معدنی دارد (کرژی و اوزمائیسی ۲۰۰۵) آب‌پنیر یکی از محصولات فرعی تولید پنیر محسوب می‌شود که در صورت عدم مدیریت صحیح به دلیل حجم بالا و محیط مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها تبدیل به مشکلات زیست‌محیطی می‌شود تبدیل آن به پودر آب‌پنیر و استفاده از آن در شرکت‌های تولید شیر خشک و... و همین‌طور به‌عنوان سوبسترای میکروبی برای تولید اتانول و سایر مواد با ارزش افزوده بالاتر از اهمیت بالایی برخوردار است (کوشواهاو همکاران ۲۰۱۰، گویمارائیس و همکاران ۲۰۱۰) چراکه دارای ریز پپتیدها و مواد معدنی و کربوهیدرات‌ها است که برای رشد

میکروارگانیسم‌ها ضروری می‌باشد (شون و هاگو ۲۰۰۷) در این تحقیق میزان تغییرات ترکیبات فنولی و قدرت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در شرایط مختلف و با تغییر متغیرهایی از قبیل دما و زمان و نسبت پودر تفاله سیب به پودر آب‌پنیر و دو زیر واریته کپک رایزوپوس بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تفاله سیب از کارخانه شادلی ارومیه (ایران، استان آذربایجان غربی) تهیه شد و پودر آب‌پنیر از شرکت سانا خریداری شد که هر دو به‌عنوان سوبسترای میکروبی در سیستم تخمیر در حالت‌جامد مورداستفاده قرار گرفت، تمامی مواد شیمیایی موردنیاز برای انجام آزمایش‌ها از شرکت سیگمای انگلیس و مرک آلمان تهیه شدند.

تخمیر با بستر جامد

در این سیستم از مواد کاملاً خشک به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌گردد و مقدار کمی مایع برای تأمین فعالیت آبی میکروارگانیسم موردنیاز می‌باشد (شتی و همکاران ۲۰۰۳) به‌منظور آماده‌سازی سوبسترا تفاله سیب روی سینی خشک‌کن پخش‌شده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به میزان رطوبت ۵ درصد خشک گردید سپس تفاله خشک‌شده با استفاده از نوعی دستگاه juicer/blender(Panasonic-control-japan) پودر شد و الک گردید و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. پودر آب‌پنیر خریداری شده نیز بدون نیاز به فرآوری خاص به‌عنوان سوبسترا مورداستفاده قرار گرفت.

میکروارگانیسم‌ها

هر دو زیر وارسته کپک *رایزوپوس میکروسپوروس واریته الیگوسپوروس* PTCC NO.5173,PTCC NO.5287از بانک جهانی میکروارگانیسم توسط سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه خریداری شد و در شرایط آزمایشگاهی استریل توسط محیط کشت مغذی نوترینت براث فعال شدند سپس به محیط کشت PDA انتقال یافتند و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۳۱°C زیر وارسته ۵۲۸۷و در دمای ۲٤ °C زیر واریته۵۱۷۳ گرمخانه گذاری شدند (شتی و همکاران ۲۰۰۳).

رشد و تکثیر

میسیلیوم های کپکی رشد یافته در محیط کشت PDA به مدت ۱۰-۷ روزبه داخل ارلن مایرهای حاوی سوبسترا (پودر آب‌پنیر و تفاله سیب) با میزان اولیه و محدود تلقیح می‌شوند درصد اختلاط سوبسترا در سه سطح ۵۰:۵۰ ، ۹۰:۱۰، ۷۰:۳۰، و ازنظر زمان گرمخانه گذاری در سه سطح زمانی ۳،۸،۱۳ روز و ازنظر دمایی نیز در سه سطح دمایی ۲۳،۲۷،۳۱ درجه سلسیوس بررسی شدند ٥٤ تیمار در ٥٤ تا ارلن مایر که هرکدام ازنظر شرایط دمایی و زمان گرمخانه گذاری و درصد اختلاط سوبسترا متفاوت بودند آزمایش شدند. به هرکدام از تیمارها ۱۰ میلی‌لیتر آب اضافه گردید و محتوای هرکدام ازارلن مایرها قبل از تلقیح کپک در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو گردید و در زمان‌های مشخص‌شده در طرح آماری برای هر یک از تیمارها ارلن مایرها از گرمخانه خارج‌شده و آزمایش‌ها لازم انجام گرفت لازم به توضیح است که تفاوت در شرایط کشت و نسبت درصد اختلاط سوبستراها و تغییرات دما برای شناسایی مؤثرترین عامل و یافتن شرایط بهینه تولید و استخراج ترکیبات فنولی می‌باشد.

آماده‌سازی سوپرناتانت

به هر یک از نمونه‌های کشت داده‌شده در شرایط مختلف بعد طی زمان گرمخانه گذاری ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ولرم اضافه گردید و توسط مخلوط‌کن به‌صورت کامل هموژن شد هر یک از نمونه‌ها با دستگاه سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و نهایتاً سطح‌رویی توسط کاغذ وات من شماره یک جدا شد و سوپر ناتانت برای آزمایش‌ها بعدی آماده شد (راند هیر و شتی ۲۰۰٦).

ترکیبات فنولیک کل

محتوای فنولی نمونه‌ها توسط روش اصلاح‌شده شتی و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد به این صورت که ۱میلی‌لیتر از سوپرناتانت با یک میلی‌لیتر از اتانول ۹۵ درصد مخلوط شده و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵/. میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو[1] ۵۰ درصد وزنی/ وزنی به این مخلوط اضافه و بلافاصله به‌شدت هم زده‌شده و بعد از ۵ دقیقه ۱ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به مجموعه اضافه گردید مخلوط ٦۰ دقیقه در محیط کاملاً تاریک نگه‌داشته شد و بعدازآن میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل اتانول ۹۵ درصد به‌عنوان شاهد اندازه‌گیری شد وازاسید گالیک به‌عنوان نمودار کالیبراسیون استفاده و میزان ترکیبات فنولیک کل به‌صورت معادل میکروگرم اسید گالیک در گرم ماده خشک بیان شد.

فعالیت مهار رادیکال آزاد

برای اندازه‌گیری درصد بازدارندگی DPPH مطابق روش مکیو و همکاران (۲۰۰۳) عمل شد به این صورت که محلول یک میلی مولار دی پی پی اچ در اتانول ۹۵ درصد تهیه شد سپس یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت نمونه موردنظر را برداشته و بایک میلی‌لیتر از محلول دی پی پی اچ یک میلی مولار مخلوط و به هم زده شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری و بعد نمونه با دور ۱۰۰۰۰دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد میزان جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد نمونه شاهد شامل همه موارد بود که به‌جای سوپرناتانت از آب استفاده شد و نهایتاً درصد بازدارندگی از روی رابطه موردنظر محاسبه گردید.

$$DPPH\%=\{1-(As/Ao)*100$$

که As جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر و Ao جذب شاهد در این طول‌موج می‌باشد.

آزمون بتا کاروتن

در این آزمون درواقع بی‌رنگ شدن بتا کاروتن در حضور اسید لینولییک و توین زمانی که در معرض آب‌اکسیژنه قرار دارد اندازه‌گیری می‌شود که درواقع میزان اکسیداسیون اسید لینولییک است که ملاک فاکتور محافظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد ابتدا محلول ۲/. میلی‌گرم در میلی‌لیتر بتا کاروتن در کلروفرم تهیه و یک میلی‌لیتر از این محلول برداشته شد و یک ارلن مایر ۲۵۰ پوشیده شده با فویل آلومینیوم توسط پیپت انتقال یافت سپس در دمای ٤۰درجه در او اپراتور تحت خلأ کلروفرم آن بخار و بتا کاروتن چسبیده به دیواره ارلن خراشیده شد و ۲۰ میکرولیتراسید لینولئیک اضافه شد (Sigma chemical) به این مجموعه ۱۸٤ میکرو لیتر توین ٤۰ اضافه‌شده و از محلول ۵۰ میلی مولار آب‌اکسیژنه ۵۰ میلی‌لیتر به داخل ارلن انتقال داده شد و توسط مخلوط‌کن تا هموژن شدن کامل هم زده شد به هریک از لوله‌های آزمایشی حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر سوپرناتانت ۵ میلی‌لیتر از مخلوط آماده‌شده اضافه گردید و در حمام آب ۵۰°C برای ۳۰ دقیقه قرار داده شد دوباره لوله‌آزمایشی هم زده شد و میزان جذب در طول‌موج ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد نمونه شاهد نیز به‌جای سوپرناتانت ۱۰۰ میکرو لیتر آب اضافه شد و جذب شاهد نیز در طول‌موج ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (شتی و همکاران ۲۰۰۳) نهایتاً فاکتور محافظت آنت اکسیدان با این رابطه محاسبه گردید:

Apf=(sample absorbance at 470 nm)/ (control absorbance at470 nm)

شمارش میکروبی

برای شمارش میکروبی هم برای میزان تلقیح اولیه و هم برای شمارش نهایی کپک‌ها از ارلن مایر حاوی نمونه یک سی‌سی برداشته و توسط پیپتون واتر٪۱/. رقت‌های مختلف تهیه شد و نهایتاً در محیط کشت PDA کشت داده شد.

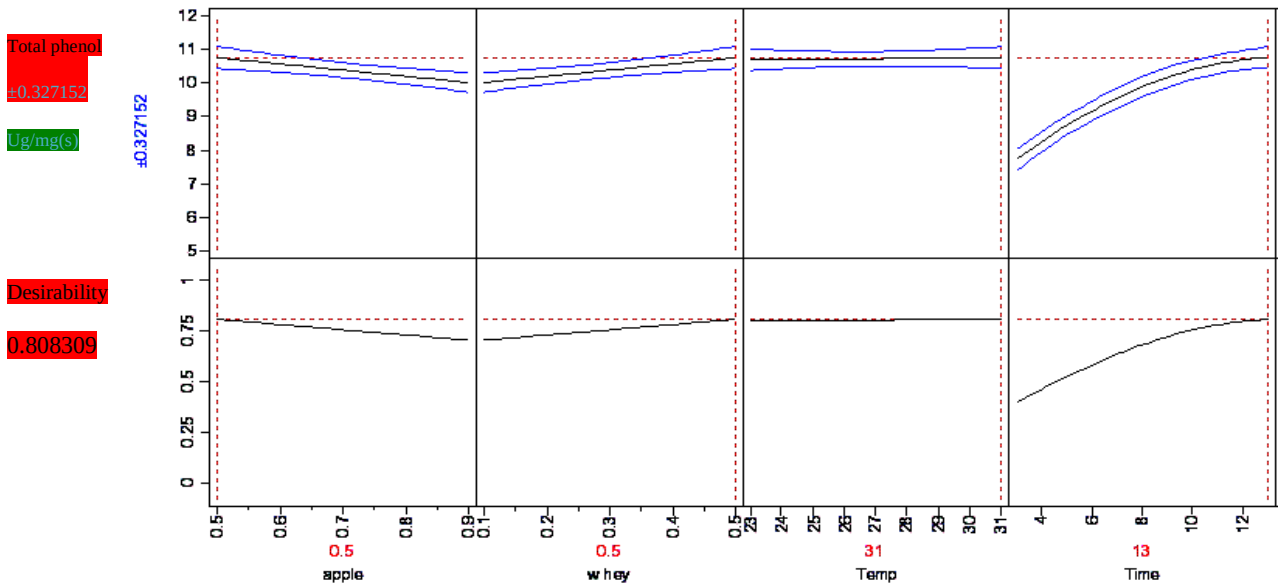
[1] Folin Ciocalteu

آنالیز آماری

در این مطالعه از طرح ترکیبی با دو فاکتور مخلوط و سه فاکتور فرآوری و برای انتخاب طرح بهینه از معیار D-optimal استفاده گردید و با توجه به مشکل بودن دمای گرمخانه گذاری به‌صورت تصادفی، این فاکتور به‌صورت کرت کامل در نظر گرفته شد. بررسی آنالیز داده‌ها توسط روش REML انجام شد (به دلیل دقت بالا و حساسیت زیاد این روش نسبت به تغییرات تدریجی در طول انجام آزمایش‌ها) و احتمال خطای نوع اول برابر ۰۵/. در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

همانطوریکه در شکل شماره ۱ نشان داده‌شده است ترکیبات فنولی کل با کاهش نسبت پودر تفاله سیب به پودر آب‌پنیر افزایش پیداکرده که کاهش نسبت مذکور افزایش ریز پپتیدها و ترکیبات نیتروژنی و سایر مواد مغذی را در پی دارد که محدودیت ترکیبات نیتروژنی به‌عنوان عامل محدودکننده رشد کپک است و آن‌هم به‌نوبه خودروی ترکیبات فنولی محلول تأثیر می‌گذارد (کوریا و شتی ۲۰۰۳). با افزایش دما تغییر بسیار جزئی در ترکیبات فنولی مشاهده می‌کنیم و با افزایش مدت‌زمان گرمخانه گذاری نیز روند سعودی را در میزان ترکیبات فنولی مشاهده می‌کنیم (شکل شماره ۱ به همراه نمودار مطلوبیت) که احتمالاً به رشد کپک‌ها و تولید متابولیت های مؤثر روی این ترکیبات مربوط می‌شود نتایج حاصله با مطالعات قبلی تطابق داشت (کوریا و شتی۲۰۰۳، آجیلا و همکاران ۲۰۱۰) طبق آنالیز آماری صورت گرفته تأثیر متقابل آب‌پنیر با دما و زمان و همچنین اثر کوادراتیک زمان و پودر تفاله سیب و اثر کوادراتیک زمان و پودر آب‌پنیر در سطح P<۰/۰۵ معنادار بود.رابطه بین متغیرهای مختلف و میزان ترکیبات فنولی در معادله شماره ۱ آمده است.



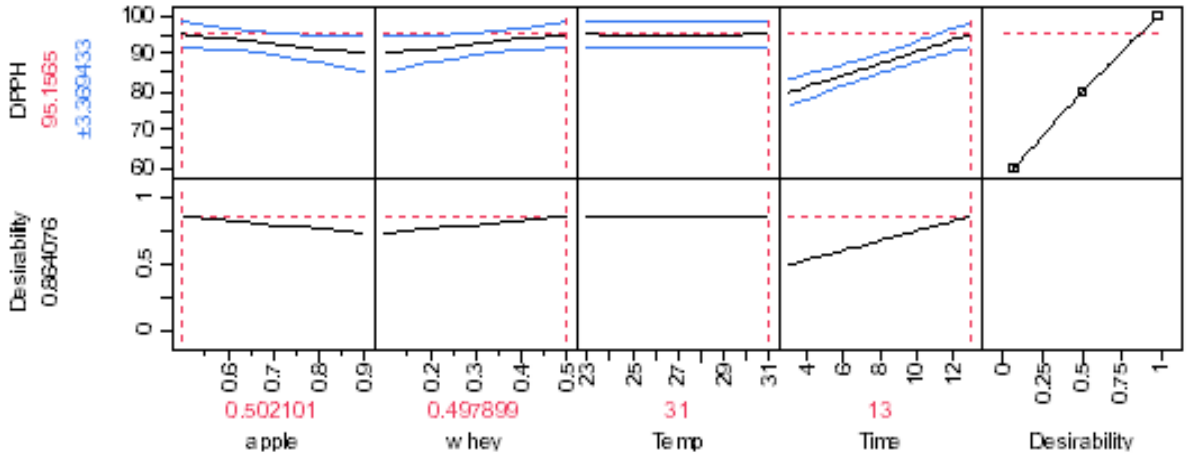
شکل ۱- تأثیر فاکتورهای مختلف بر میزان ترکیبات فنولی کل (TPC)

(دما برحسب درجه سلسیوس واحد زمان روز و نسبت سوبستراها در تمامی شکل‌ها به‌صورت درصد واحد اولیه گرم می‌باشد)

[1] TPC=8.84393*[(apple-0.5)/0.4]+9.574402*[(whey-0.1)/0.4]+0.445592*(apple*temp)+ 1.502348*(apple*time)+0.306068*(whey*temp)+1.798879*(whey*time)-0.17875* (apple*temp*time)-0.27404*(whey*temp*time)-0.59812*(apple*time*time)-0.65114* (whey*time*time),$\mathbf{R}^2$= 0.978069

درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

با توجه به شکل شماره ۲ (نتایج همراه با نمودار مطلوبیت) با کاهش نسبت پودر تفاله سیب به پودر آب‌پنیر شاهد افزایش درصد بازدارندگی بودیم ولی با افزایش دما تأثیر معناداری در میزان درصد بازدارندگی دیده نمی‌شد اما بیشینه درصد بازدارندگی مربوط به دمای ۳۱°C می‌شد همچنین با افزایش زمان گرمخانه گذاری افزایش در صد بازدارندگی را دیدیم که با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیقات قبلی مطابقت داشت (آجیلا و همکاران ۲۰۱۰، راندهیر و شتی ۲۰۰۶، کوریا وشتی ۲۰۰۳) که دلیل این امر مربوط به دمای بهینه رشد میکروارگانیسم‌های موردنظر بوده که با افزایش رشد آن‌ها و تولید متابولیت های بیشتر شاهد افزایش استخراج ترکیبات فنولیک آنتی‌اکسیدانی و همچنین افزایش قدرت آنتی‌رادیکالی این ترکیبات بودیم (کوریا و شتی ۲۰۰۳).البته با افزایش مدت‌زمان گرمخانه گذاری این مسئله تشدید می‌شد (آجیلا و همکاران۲۰۱۰) دلیل افزایش این فاکتور همگام با افزایش ترکیبات فنولی کل این مسئله می‌تواند باشد که اکثریت ترکیبات فنولی تولیدشده دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بوده است که این مسئله در تطابق کامل با نتایج راندهیر و شتی (۲۰۰۶) نبود ولی با نتایج آجیلا و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت. بر اساس آنالیز آماری انجام‌شده تأثیر متقابل پودر تفاله سیب و زمان، پودر آب‌پنیر و زمان و همچنین اثر کوادراتیک دما و پودر تفاله سیب در P<۰/۰۵ معنادار بود ولی تأثیر دما به همراه سایر متغیرها در این بازه معنادار نبود، رابطه بین متغیرهای مختلف و درصد بازدارندگی رادیکال DPPH از معادله شماره ۲ پیروی می‌کرد. لازم به توضیح است که در معادله‌های نوشته‌شده علامت + قبل از هر عبارت نشان‌دهنده موثربودن آن عوامل درنتیجه کار و علامت – نشان‌دهنده عدم تأثیر یا تأثیر منفی اختلاط آن عوامل در برآیند کار می‌باشد.



شکل ۲- تأثیر متغیرهای مختلف بر درصد بازدارندگی مولکول‌های DPPH

(واحد بیان DPPH به‌صورت درصد بازدارندگی می‌باشد واحد زمان روز واحد دما درجه سلسیوس می‌باشد)

[2] DPPH Inhibitation=71.74954*[(apple-0.5)/0.4]+87.54156*[(whey-0.1)/0.4] +1.485974*(apple*temp) +5.930381*(apple*time)+7.641972*(whey*time) +10.86968*(apple*temp*temp) ,R^2=0.780551

فاکتور محافظت آنت اکسیدان

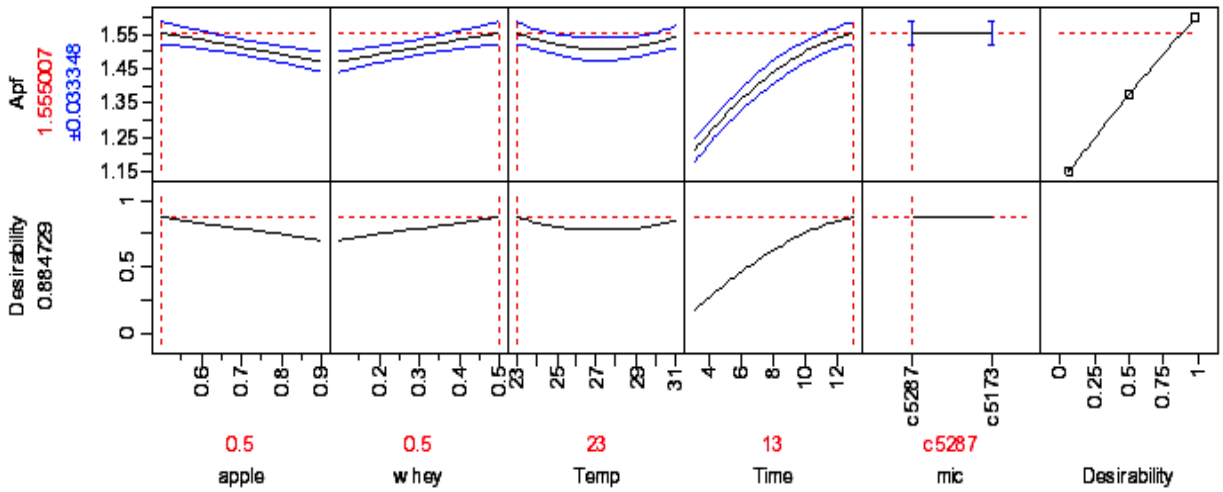
با توجه به شکل شماره ۳ با کاهش نسبت پودر تفاله و افزایش درصد پودر آب‌پنیر افزایش در APF مشاهده شد و حداکثر میزان آن دردمای ۲۳°C، روز سیزدهم و *رایزوپوس الیگوسپوروس* زیر وارسته ۵۲۸۷ رخ داد و نکته حائز اهمیت اینکه بیشترین ترکیبات فنولی حداکثر APF را به دنبال نداشت که دلیل این مسئله می‌تواند به استخراج ترکیبات فنولی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی

چندان بالایی ندارند مربوط شود (راندهیر و شتی ۲۰۰۶). ازنظر دمایی نیز بعد از حداکثر فاکتور محافظت در دمای ۲۳°C روند کاهشی دیده شد تا دمای ۲۷°C و بعدازآن دوباره روند افزایشی تا دمای ۳۱°C مشاهده شد، طبق آنالیز آماری انجام‌شده تأثیر متقابل پودر تفاله سیب و زمان و پودر آب‌پنیر و زمان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار بود ولی تأثیر نوع کپک معنی‌دار نبود.

رابطه بین متغیرهای مختلف با فاکتور محافظت آنتی‌اکسیدانی از معادله شماره ۳ تبعیت می‌کند با توجه به داده‌های شکل و معادله شماره ٤ مؤثرترین عامل مدت‌زمان گرمخانه گذاری بود که دلیل این امر داشتن فرصت مناسب توسط کپک‌ها برای تولید متابولیت های مربوط به افزایش سطح ترکیبات فنولیک می‌باشد (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۰).

شمارش کپک‌ها

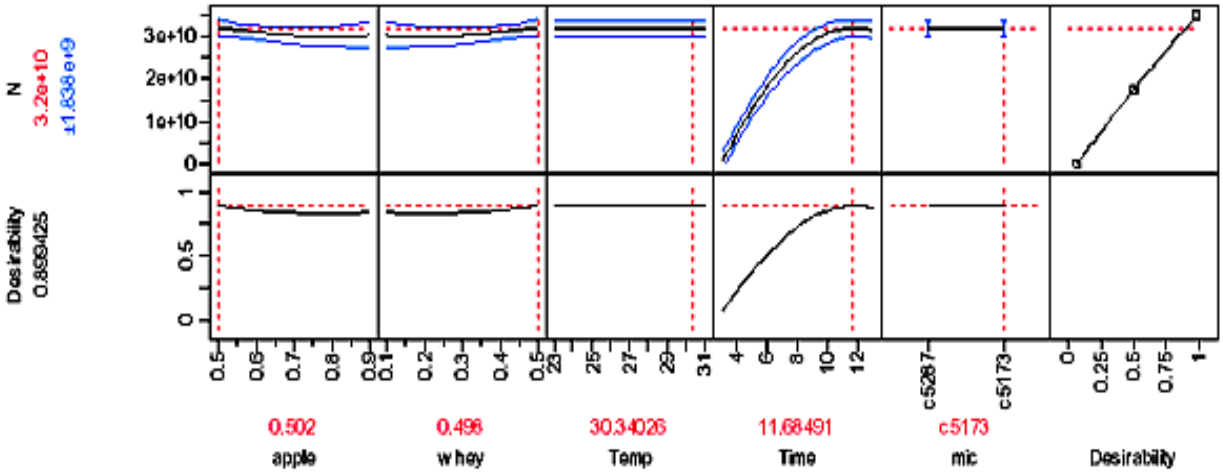
رشدوتکثیر کپک‌ها در این مطالعه یکی از مهم‌ترین عوامل در تعیین میزان ترکیبات فنولی بوده است به طوریکه‌افزایش رشدوافزایش متابولیت های حاصله منجر به افزایش ترکیبات فنولی آزاد و باقابلیت استخراج می‌شود (آجیلا و همکاران ۲۰۱۰). با توجه به شکل شماره ٤ با کاهش نسبت پودر تفاله سیب و به دنبال آن افزایش نسبت پودر آب‌پنیر جمعیت میکروبی افزایش یافت درحالی‌که افزایش دما تأثیری در جمعیت میکروبی نداشت که این موضوع را می‌توان درکل به شرایط بهینه رشد برای هریک از ساب واریته‌های موردمطالعه ربط داد همچنین با گذر زمان جمعیت میکروبی رو به افزایش داشته که با نتایج روبرتا و همکاران ۲۰۰۳ مطابقت دارد. بر اساس آنالیز آماری انجام‌گرفته تأثیر متقابل پودر تفاله سیب و زمان، پودر آب‌پنیر و زمان همین‌طور اثر کوادراتیک زمان با پودر تفاله سیب و با پودر آب‌پنیر در سطح P<۰/۰۵ معنادار بود ولی تأثیر نوع کپک و دما به‌تنهایی معنادار نبود که اهمیت مدت‌زمان گرمخانه گذاری در جمعیت میکروبی نیز کاملاً مشهود بود همچنین رابطه بین متغیرهای موردمطالعه و جمعیت کپک‌ها نیز از معادله ٤ تبعیت می‌کرد.



شکل۳- تأثیر متغیرهای موردمطالعه بر روی فاکتورهای محافظت آنت اکسیدان

(واحد دما C ° واحد زمان روز و Apf بدون واحد)

[3] APF=1.37413*[(apple-0.5)/0.4]+1.418124*[(whey-0.1)/0.4]+0.020773*(apple*temp) +0.132548*(apple*time)+0.011388*(apple*mic[5287])+0.020369*(whey*temp)+0.146843*(whey*time)-0.02617*(whey*temp*time)-0.02706*(apple*time*time)+0.041849*(whey*temp*temp)-0.05761*(whey*time*time),$\mathbf{R}^2$=0.969571



شکل ۴- تأثیر متغیرهای مختلف بر میزان رشد کپک‌ها

[4] N=2.39E+10*[(apple-0.5)/4]+2.62E+10*[(whey-0.1)/0.4]-3.77E+09*(apple*whey)-6.50E+08*(apple*temp)+1.25E+09*(apple*mic[5287])+1.20E+10*(apple*time)+1.56E+10*(whey*time)+2.21E+09*(apple*temp*time)-1.39E+09*(apple*temp*mic[5287])-1.45E+09*(apple*time*(1)+ 1.88 E+09*(apple*temp*temp)-1.01E+10*(apple*time*time)-1.04E+10*(whey*time*time) $\mathbf{R}^2$=0.959403

نتایج کلی نشان‌دهنده این مطلب است که تغییر متغیرها در کل منجر به تغییرات کلی در ترکیبات فنولی شده که بهترین حالت برای هریک از پارامترهای موردسنجش در هریک از شکل‌ها آورده شده و در متن مشخص‌شده است و همین‌طور توانایی *رایزوپوس الیگوسپوروس* در بالا بردن میزان ترکیبات فنولی مشاهده شد هرچند تفاوت معناداری بین دو زیر وارسته این کپک مشاهده نشد اما در حالت کلی میزان ترکیبات فنولی با سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده دارای رابطه مستقیم بوده و قدرت متابولیت های تولیدی از قبیل آنزیم بتاگلوکوزیداز (شتی و همکاران ۲۰۰۳) در بالا بردن مقدار و قدرت آنت رادیکالی و تأثیر بر ترکیبات فنولی استخراج‌شده مشخص شد ولی در برخی از موارد همسو با افزایش ترکیبات فنولی افزایش سایر پارامترها را نداشتیم که مربوط به برخی از ترکیبات فنولی فاقد خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شد (شتی و همکاران ۲۰۰۳). ولی جمعیت کپک‌ها با ترکیبات فنولی کل همواره دارای ارتباط مستقیم بود که نشان‌دهنده تأثیر افزاینده کپک در میزان سطح ترکیبات فنولی کل بود هرچند افزایش سطح ترکیبات فنولی یکی از اهداف این تحقیق بود ولی تطابق این ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی از مهم‌ترین موارد بود که توسط آزمون DPPH و بتا کاروتن موردسنجش قرارگرفت.

منابع مورد استفاده

Bhushan S, Kalia K, Sharma M, Singh B, Ahuja PS, 2008. Processing of apple pomace for bioactive molecules. Critical Reviews in Biotechnology, 28(4): 285–296.

Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC, 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, Food Chemistry 81: 249–255.

Correia RTP, McCue P, Magalhães MMA, Macedo GRM, Shetty K, 2004. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*, Process Biochemistry 39 : 2167–2172.

Dhillon GS, Brar SK, Vermab M, Tyagi RD, 2011. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 54: 83–92.

Favela-Torres E, Volke ST, Viniegra GG, 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technology Biotechnology, 44(2): 221–227.

Gassara F, Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR, 2012. Liquid state fermentation of apple pomace sludge for the production of ligninolytic enzymes and liberation of polyphenolic compounds. Process Biochemistry, 47: 999–1004.

Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L, 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey, Biotechnology Advances 28 : 375–384.

Ibrahim GE, Hassan IM, Abd-Elrashid AM, El-Massry KF, Eh-Ghorab AH, Ramadan Manal M, Osman F, 2011. Effect of clouding agents on the quality of apple juice during storage, Food Hydrocolloids 25: 91-97.

Kargi F, Ozmıhcı S, 2006. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters, Enzyme and Microbial Technology 38 : 711–718.

Kushwaha JP, Srivastava VC, Mall ID, 2010. Treatment of dairy wastewater by inorganic coagulants: Parametric and disposal studies, water research 44: 5867- 5874.

McCann MJ, Gill CIR, Brien GO, Rao J R, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR, 2007. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. Food and Chemical Toxicology, 45: 1224–1230.

Medeiros ABP, Pandey A, Vandenberghe LPS, Pastore GM, Soccol CR, 2006. Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents, Food Technology Biotechnology, 44(1): 47–51.

Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Bourvellec CL, Renard C, Chemat F, 2012. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. Journal of Food Engineering, 111: 73–81.

Randhir R, Shetty K, 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management, Innovative Food Science and Emerging Technologies 8 : 197–204.

Schieber A, Hilt P, Streker P, Endress HU, Rentschler C, Carle R, 2003. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace,Innovative Food Science and Emerging Technology, 4(1): 99–107.

Vattem DH, Shetty K, 2003. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (Vaccinium macrocarpon) mediated by Lentinus edodes using a solid-state system, Process Biochemistry 39: 367_/379.

Yen GC, Chang YC, 2002. Production of antioxidant from *Aspergillus candidus* broth filtrate by fermentor, Process Biochemistry 38 : 1425-1430.

Identification of effective factors on antioxidant production and extraction from apple residue using two subvarietes of *Rhizopus oligosporus*

S Hamdipour[*1], M Rezazad[2] and M Alizadeh[2]

Received: December 30, 2013 Accepted: September 16, 2014

[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia,Urmia, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: E mail: saeid.hamdipour@gmail.com

Abstract

Apple pomace is a byproduct of apple processing plants which can be used as a good source for bioactive materials like phenolic compounds. In this research the 2 sub verities of *Rhizopus oligosporus* was used for production of Antioxidative bioactive compounds from Whey Proteine Concentrate (WPC) and apple pomace. Total Phenolic compounds, free radical scavenging ability by DPPH ,Antioxidative Protection Factor (APF) and total count of molds were evaluated in 48 determined treatments. Effect of Incubation temperature in three levels 23,27,31°C , incubation time at 3,8,13 days, and Apple pomace/WPC ratio at three levels of 50:50, 70:30, 90:10 were studied . The polyphenol content, precent of DPPH inhibitation, APF and count of fungi of the extracts was found to be in the range of 6.01-11.12 mg GAE/g Dry Matter, 65.8%-95.2%, 1.18-1.55 and 2.2*10^8-3.13*10^10 of samples respectively, depending on the ratio of Apple/WPC , time of incubation, type of fungi and temperature. The highest efficiency obtained was related to *Rhizopus oligosporus* PTCC NO.5287 and the results showed that the time of incubation had the most effect on measured parameters.

Keywords: Antioxidant, Whey Powder, Apple pomace, *Rhizopus oligosporus*