

بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال از میوه زرشک (*Berberis vulgaris*) توسط روش سطح پاسخ

سید علی مرتضوی^۱، اکرم شریفی^{۲*}، عبدالمجید مسکوکی^۳، مهرداد نیاکوثری^۴، امیر حسین الهامی راد^۵

۱- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار

۲- دانش آموخته دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار
*نویسنده مسئول (a.sharifi@iaus.ac.ir)

۳- دانشیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

چکیده

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱

واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین

ترکیبات فنلی

روش سطح پاسخ

زرشک

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری برای طراحی آزمایشات، مدل‌سازی و بررسی اثر فاکتورها بر نتایج نهایی و در نهایت بهینه‌سازی فرایند می‌باشد. این تحقیق با هدف بهینه‌سازی فرایند استخراج آبی ترکیبات زیست فعال موجود در میوه زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris*) به روش سطح پاسخ انجام شد. برای این منظور از طرح مرکب مرکزی با تعداد ۱۳ تیمار و ۵ تکرار در نقاط مرکزی استفاده گردید. اثرات فاکتورهای متغیر دما (۷۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۱۲۰-۴۰ دقیقه) بر روی مقدار آنتوسیانین، ویتامین ث، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده زرشک بررسی شد. نتایج حاصل شباهت زیادی بین مقادیر حاصل از آزمایشات و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل، نشان داد. زمان و دمای استخراج اثر معنی‌داری روی پاسخ‌ها داشت. شرایط بهینه استخراج آبی ترکیبات زیست فعال میوه زرشک بی‌دانه دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲۰ دقیقه بود که در این شرایط بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۵۸۵/۷۲۵ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره)، آنتوسیانین (۲۰۸/۳۹۲ میلی‌گرم در لیتر)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۴/۲۶۰ درصد) و ویتامین ث (۱۲۹۲/۵۶ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. نتایج نشان داد این روش می‌تواند برای استخراج ترکیبات زیست فعال در صنعت تولید فراورده‌های طبیعی به کار گرفته شود.

مقدمه

عمدتاً در دو شهرستان قاین و بیرجند تولید می‌گردد، لذا دانش و پرورش زرشک بی‌دانه بومی ایران بوده و تقریباً ۹۸ درصد تولید آن به خراسان جنوبی مربوط می‌شود، البته زرشک دانه‌دار که مصارف دارویی داشته و برای مصارف تغذیه‌ای از آن استفاده نمی‌گردد در اغلب نقاط ایران و دنیا به صورت خودرو مشاهده

جنس زرشک دارای بیش از ۶۶۰ گونه است که فقط نوع بی‌دانه آن به عنوان محصول باغی و اقتصادی پرورش می‌یابد و آنچه به نام زرشک در ایران وجود دارد از نوع زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris*) واریته *Asperma* می‌باشد که در منطقه جنوب خراسان و

فاکتورها بر نتایج نهایی و در نهایت بهینه‌سازی فرایند می‌باشد. یکی از مزیت‌های روش فوق، کم کردن تعداد آزمایشات مورد نیاز برای به دست آوردن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل آماری می‌باشد. این روش به طور گسترده‌ای در مطالعات بهینه‌سازی چند متغیره در فرآیندهای مهندسی، تحقیقات صنعتی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chang *et al.*, 2006).

گزیده‌ای از منابع موجود و قابل دسترس در حال حاضر، در ارتباط با استخراج ترکیبات زیست فعال و کاربرد روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی فرایند به شرح ذیل می‌باشند:

Kukula- Koch و همکاران (۲۰۱۳) توسعه، بهینه‌سازی و استفاده از روش‌های مختلف استخراج را به منظور به دست آوردن عصاره زرشک (*Berberis cretica*) با ظرفیت آنتی‌اکسیدان بالا، مورد بررسی قرار دادند. بدین منظور روش‌های ASE^۱ و SFE^۲ به کار برده شد و ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH انجام گرفت. بهترین نتایج در نسبت اتانول و آب ۵۰-۵۰ و روش ترکیبی SFE و ASE حاصل شد. نتایج به دست آمده زرشک را به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان قوی معرفی کرد. Zovko و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی دو گونه زرشک (*Berberis vulgaris* و *Berberis croatica*) را تعیین کردند. این محققان برای استخراج عصاره از پیش تیمار فراصوت کمک گرفتند. نتایج نشان داد تمام عصاره‌های استخراج شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشتند و از این نظر تفاوت معنی‌داری در رابطه با دو گونه زرشک مورد بررسی مشاهده نشد. Jimenez و همکاران (۲۰۱۱) آنتوسیانین‌های زرشک گونه *Berberis boliviana* را با استفاده از حلال‌های استن و آب و فیلتراسیون تحت خلا استخراج کردند و سپس با روش pH افتراقی^۳ تعیین مقدار نمودند. در مرحله بعد، عصاره استخراج شده با استفاده از یک ستون C₁₈ خالص‌سازی و سپس آنتوسیانین‌ها به وسیله HPLC شناسایی شدند. نتیجه این تحقیق شناسایی ۵ آگلیکون و ۱۰ آنتوسیانین بود.

می‌شود (حمیدی، ۱۳۵۳). دیدگاه کلی محققان، متخصصان و کارشناسان به زرشک فراتر از میوه آن بوده و به آن به عنوان یک گیاه استراتژیک و انحصاری می‌نگرند. میوه زرشک دارای ترکیبات با ارزشی از جمله پلی‌فنول‌ها، آنتوسیانین‌ها، اسید سیتریک، ویتامین ث و ده‌ها ترکیب دیگر می‌باشد که بعضا شناسایی نشده و روش‌های استخراج، فرمولاسیون و تهیه اشکال مختلف خوراکی و دارویی آنها بایستی مورد پژوهش قرار گیرد (مسکوکوی و مرتضوی، ۱۳۸۰؛ همتی کاخکی و حسین پور، ۱۳۷۲). از مهم‌ترین ترکیبات موجود در میوه زرشک می‌توان به ترکیبات فنلی از جمله آنتوسیانین‌ها اشاره کرد. ترکیبات فنلی خواص آنتی‌اکسیدانی داشته و جزء ترکیبات فراسودمند در رژیم غذایی می‌باشند که مانع بروز سرطان و تصلب شرایین می‌گردند. فعالیت زیستی ترکیبات فنولی‌ها ممکن است وابسته به توانایی فلزات شلاتی، ممانعت لیپوکسیژناز و جمع‌آوری کننده رادیکال‌های آزاد باشد (Chung *et al.*, 2002).

آنتوسیانین‌های مختلف رنگدانه‌های اصلی زرشک را تشکیل می‌دهند. در کنار خصوصیت رنگ‌دهندگی، آنتوسیانین‌ها اثر درمانی نیز دارند. آنتوسیانین‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان، ضد عفونت، مقاوم به اشعه، مقاوم به مواد شیمیایی، جلوگیری از اکسیداسیون کلسترول LDL و همچنین کاهش ریسک بیماری‌های قلبی و عروقی شناخته شده‌اند. علاوه بر این از آنتوسیانین‌ها می‌توان به عنوان یک رنگ سلامت بخش و طبیعی به جای رنگ‌های زیانبار شیمیایی در مواد غذایی استفاده کرد. (خورشیدزاده، ۱۳۶۷؛ شریفی و همکاران، ۱۳۸۷). میوه زرشک از لحاظ کربوهیدرات، املاح و ویتامین نیز غنی می‌باشد. ویتامین ث موجود در زرشک بالاتر از ویتامین ث موجود در پرتقال است. ویتامین ث به دلیل ساختار ویژه خود، به سرعت اکسیده و طی دوره استخراج و یا نگهداری کاهش می‌یابد. کاربرد روش‌هایی برای استخراج این ترکیبات با ارزش که بتوان بیشترین ماده عملگر را با کمترین ناخالصی و حداقل تخریب به دست آورد از اهمیت بسزایی برخوردار است (کافی و بالندری، ۱۳۸۱).

روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از روش‌های آماری برای طراحی آزمایشات، مدل‌سازی و بررسی اثر

1- Accelerated Solvent Extraction
2- Supercritical Solvent Extraction
3- pH differential method

آماده‌سازی نمونه‌ها

زرشک بی‌دانه گونه *Berberis vulgaris* از شهرستان بیرجند در مهر ماه ۱۳۹۰ خریداری شد. پس از جدا نمودن شاخ و برگ و ضایعات، زرشک‌ها تا زمان شروع آزمایشات در سردخانه ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کلیه آزمایشات این تحقیق با استفاده از مواد شیمیایی ساخت شرکت آلمانی مرک^۳ انجام گرفت.

استخراج با سیستم برگشت حلال^۴

برای هر بار آزمایش مقدار ۲۰۰ گرم زرشک به وسیله آسیاب خرد شد. زرشک‌های خرد شده همراه با ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال آب درون بالن قرار گرفت و بالن همراه با کندانسور درون بن ماری در دماهای ۷۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰-۴۰ دقیقه در معرض حرارت بود، سپس بالن از سیستم جدا و در محلی تاریک به مدت ۲ ساعت ساکن ماند و به وسیله صاف کردن تحت خلا عصاره زرشک به دست آمد (شریفی و همکاران، ۱۳۸۷). در نهایت اثرات فاکتورهای متغیر دما (۷۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان استخراج (۱۲۰-۴۰ دقیقه) بر روی مقدار آنتوسیانین، ویتامین ث، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده زرشک بررسی گردید.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده

مقدار کل ترکیبات فنلی به روش فولین سیوکالتو^۵ شرح داده شده توسط Shahidi و Nacz (۲۰۰۴) تعیین شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد فولین سیوکالتو مخلوط شد و بعد از ۳ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ درصد کربنات سدیم (۷۵ گرم در لیتر) به آن اضافه شد و سپس جذب نمونه در ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک موجود در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره استخراجی گزارش گردید. جهت رسم

Ghafoor و همکاران (۲۰۱۰) استخراج ترکیبات زیست فعال پوست انگور شامل آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنلی به وسیله سیال فوق بحرانی را با روش سطح پاسخ بهینه‌سازی کردند. نتایج نشان داد دما و فشار در فرایند استخراج روی همه پاسخ‌ها تأثیر معنی‌دار داشته و شرایط بهینه استخراج دمای ۴۶-۴۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۶۵-۱۶۰ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع بود که در این شرایط بازده استخراج ۱۲/۳۱ درصد و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انگور ۹۳ درصد به روش DPPH گزارش شد. Wang و همکاران (۲۰۱۳) استخراج ترکیبات فنولی برگ‌های انار را به روش سطح پاسخ بهینه‌سازی کردند. این محققین ابتدا اثر حلال‌های آب، اتانول، متانول و استن را روی بازده استخراج مورد بررسی قرار دادند و با توجه به نتایج به دست آمده اتانول را برای بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات فنولی برگ انار با متغیرهای دما و زمان استخراج و همچنین غلظت حلال انتخاب کردند. شرایط بهینه با حداکثر ترکیبات فنولی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه و غلظت اتانول ۸۰ درصد تعیین شد. بهینه‌سازی فرایند استخراج کروسین^۱، جنی پوساید^۲ و ترکیبات فنلی میوه یاسمن توسط Yang و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این پژوهش اثر متغیرهای مستقل مثل غلظت اتانول، دما و زمان روی بازده استخراج ترکیبات زیست فعال ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها برازش خوبی با سه مدل چند جمله‌ای مرتبه دوم داشتند. شرایط بهینه در این تحقیق غلظت اتانول ۵۱/۳ درصد، دما ۷۰/۴ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۲۸/۶ دقیقه تعیین شد که در این شرایط بیشترین مقدار ترکیبات زیست فعال حاصل شد.

تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی فرایند استخراج آبی ترکیبات زیست فعال موجود در میوه زرشک بی‌دانه (*Berberis vulgaris*) به روش سطح پاسخ انجام شد.

مواد و روش‌ها

- 3- Merck
- 4- Reflux
- 5- Folin-Ciocalteu method

- 1- Crocin
- 2- Geniposide

ΔA : اختلاف بین دو جذب در $pH = 1$ و $pH = 4/5$
 M: جرم مولکولی سیانیدین-۳- گلایکوزید
 ϵ : جذب مولی
 L: طول مسیر

تعیین مقدار ویتامین ث در عصاره استخراج شده اندازه‌گیری ویتامین ث به وسیله دستگاه HPLC (KNAUER ساخت آلمان) و جدا سازی با ستون یوروسفر (Eurospheer, C_{18} , $5 \times 4/6 \times 250$) انجام گرفت. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و دمای ستون در ۲۵ درجه سانتی‌گراد ثابت بود. از بافر فسفات^۳ با $pH = 2/8$ به عنوان حلال استفاده شد و جذب نمونه در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۱۴، ۲۱۰ و ۲۰۰ نانومتر بررسی و کروماتوگرام‌ها به وسیله نرم افزار (Ezchromelite) ثبت شد. به وسیله مقایسه سطح زیر پیک‌ها و زمان بازداری^۴ با معادلات به دست آمده از نمودار استاندارد اسید آسکوربیک که با رقت‌های ۴۰۰-۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد مقدار ویتامین ث تعیین شد (Melendez *et al.*, 2004).

طراحی آزمایشات

پارامترهای فرآیند استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شد. برای این منظور از طرح مرکب مرکزی^۵ با تعداد ۱۳ تیمار و ۵ تکرار در نقاط مرکزی استفاده گردید. فاکتورهای متغیر شامل دما (۷۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۱۲۰-۴۰ دقیقه) بود. مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار Design expert. ۷.۵.۱ انجام شد. داده‌های تجربی با کمک مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم زیر برازش داده شدند:

رابطه (۳)

$Y = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_{11} A^2 + b_{22} B^2 + b_{12} AB$
 در معادله فوق، Y بیانگر پاسخ‌های مورد نظر شامل محتوای ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر)، میزان آنتوسیانین (میلی‌گرم در

محنی استاندارد از رقت‌های ۷۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک استاندارد به صورت هفت نقطه‌ای استفاده شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده به روش DPPH

خاصیت آنتی‌رادیکالی عصاره استخراج شده بر اساس توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در عصاره‌های اتانولی یا میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲-۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل^۱ (DPPH) مورد سنجش قرار گرفت (Galvez *et al.*, 2007). ابتدا عصاره اتانولی با مخلوط کردن ۱۰ میلی‌لیتر عصاره استخراجی با ۴۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و ۴ ساعت هم زدن و دو بار صاف کردن تولید شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از این عصاره به ۳/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در اتانول اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه تاریک‌گذاری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

رابطه (۱)

$$DPPH \% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

A_{blank} : میزان جذب نمونه‌ی شاهد

A_{sample} : میزان جذب نمونه‌ی حاوی عصاره اتانولی

اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش pH افتراقی

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها از روش Fuleki و Fransis (۱۹۶۸) استفاده شد. در این روش جذب نمونه‌های تهیه شده توسط بافر $pH = 1$ و $pH = 4/5$ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر بر حسب رنگدانه سیانیدین-۳- گلایکوزید^۲ موجود در زرشک که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۰ نانومتر نشان می‌دهد اندازه‌گیری شد و در نهایت غلظت آنتوسیانین‌ها از رابطه زیر به دست آمد:

رابطه (۲)

$$C \text{ mg/l} = \Delta A / \epsilon L \times M \times D$$

D: فاکتور رقیق کردن

3- Monopotassium phosphate (KH₂PO₄)

4- Retention times

5- Central composite

1- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

2- Cyanidin-3-glycoside

بیان می‌کنند. مقادیر A و B نیز به ترتیب نشان‌دهنده‌ی فاکتورهای مستقل فرایند شامل دما (درجه‌ی سانتی‌گراد) و زمان (دقیقه) هستند (Noshad *et al.*, 2011).

لیتر)، درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار ویتامین ث (میلی‌گرم در لیتر) و b_n نشان دهنده‌ی ضرایب رگرسیون می‌باشد. این ضرایب اثرات خطی، دو جمله‌ای و نیز اثرات متقابل فاکتورهای متغیر فرایند را

جدول ۱- مقادیر کد شده و سطوح متغیرهای مستقل فرایند استخراج عصاره زرشک

کد و سطوح مربوطه			متغیرهای مستقل
+۱	۰	-۱	
۷۰	۶۰	۵۰	دما (A, درجه سانتی‌گراد)
۱۲۰	۸۰	۴۰	زمان (B, دقیقه)

مشاهده شده و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل می‌باشد. با توجه به نتایج فوق، می‌توان دریافت که بین مقادیر حاصل از آزمایشات و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل، شباهت زیادی وجود دارد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایشات در مورد پارامترهای وابسته فرایند، شامل محتوای ترکیبات فنولی، میزان آنتوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویتامین ث در جدول ۲ نشان داده شده است که شامل پاسخ‌های

جدول ۲- پاسخ‌های مشاهده شده و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل برای ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اسید گالیک موجود در ۱۰۰ میلی‌لیتر)، میزان آنتوسیانین (میلی‌گرم در لیتر)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر حسب درصد و به روش DPPH) و ویتامین ث (میلی‌گرم در لیتر)

مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل				مقادیر مشاهده شده				B	A
ویتامین ث	آنتوسیانین	ترکیبات فنولی	قدرت آنتی‌اکسیدانی	ویتامین ث	آنتوسیانین	ترکیبات فنولی	قدرت آنتی‌اکسیدانی	زمان	دما
۱۵۵۷/۵۶	۹۷/۸۲	۱۱۵/۴۵	۴۵/۸۹	۱۵۶۷	۱۰۵/۸۴	۱۱۸/۲۵	۵۱/۶۰	۸۰	۶۰
۱۳۱۹/۸۹	۱۴۰/۸۴	۲۷۹/۷۵	۸۲/۲۱	۱۲۳۱	۱۴۱/۱۷	۳۰۴/۰۸	۸۵/۹۲	۴۰	۵۰
۱۲۹۲/۵۶	۲۰۸/۳۹	۵۸۵/۷۳	۸۴/۲۶	۱۳۴۳	۲۰۹/۵۷	۵۹۳/۲۵	۸۴/۴۷	۱۲۰	۷۰
۹۹۲/۸۹	۱۸۷/۵۲	۷۳۳/۳۷	۹۰/۰۶	۹۴۵	۱۸۱/۰۱	۷۶۲/۴۲	۸۸/۲۸	۱۲۰	۶۰
۱۴۱۹/۸۹	۱۵۸/۹۳	۲۹۵/۲۴	۶۴/۰۶	۱۴۳۲	۱۴۹/۷۴	۲۸۴/۹۲	۵۸/۱۴	۸۰	۵۰
۱۲۲۳/۲۲	۱۷۰/۰۱	۴۵۱/۲۱	۸۵/۱۲	۱۳۶۰	۱۷۶/۲۰	۳۹۷/۸۳	۸۳/۱۸	۸۰	۷۰
۱۴۲۱/۵۵	۱۲۱/۸۵	۱۹۲/۰۵	۶۲/۰۹	۱۵۰۱	۱۱۳/۵۱	۱۶۴/۹۲	۵۲/۶۶	۸۰	۶۰
۱۱۲۵/۵۵	۲۰۰/۴۸	۶۵۳/۹۹	۸۵/۲۰	۱۱۲۳	۲۰۵/۸۱	۶۱۷/۴۲	۸۶/۷۶	۱۲۰	۵۰
۱۳۴۰/۳۸	۱۶۶/۹۹	۳۶۷/۶۸	۷۲/۶۳	۱۳۰۸	۱۶۷/۴۸	۴۲۹/۰۸	۸۲/۹۵	۸۰	۶۰
۱۳۴۰/۳۸	۱۶۶/۹۹	۳۶۷/۶۸	۷۲/۶۳	۱۳۲۲	۱۵۰/۹۴	۳۹۲/۴۲	۷۱/۴۶	۴۰	۶۰
۱۳۴۰/۳۸	۱۶۶/۹۹	۳۶۷/۶۸	۷۲/۶۳	۱۲۹۹	۱۷۳/۱۹	۳۷۳/۲۵	۷۴/۸۹	۸۰	۶۰
۱۳۴۰/۳۸	۱۶۶/۹۹	۳۶۷/۶۸	۷۲/۶۳	۱۳۵۲	۱۷۳/۱۹	۳۰۴/۰۸	۷۰/۱۷	۴۰	۷۰
۱۳۴۰/۳۸	۱۶۶/۹۹	۳۶۷/۶۸	۷۲/۶۳	۱۳۴۴	۱۷۳/۱۹	۴۰۳/۲۵	۷۱/۵۴	۸۰	۶۰

مورد بررسی کاملاً معنی‌دار است ($p \leq 0.01$). جهت بررسی پارامترهای اثر گذار در مطالعه با توجه به جدول تجزیه واریانس، جملات فاقد آزمون F معنی‌دار از مدل حذف و سایر جملات که دارای اختلاف معنی‌دار بودند، در مدل حفظ شدند (Noshad *et al.*, 2011).

برازش مدل

مدل مناسب با توجه به معنی‌دار بودن آزمون F ($P \leq 0.05$) و معنی‌دار نبودن فقدان برازش در مورد آن و همچنین مقادیر R^2 و R^2 تعدیل شده و ضریب تغییرات انتخاب شد. با توجه به جداول تجزیه واریانس می‌توان دریافت که مدل برازش داده شده برای تمام پارامترهای

محتوای ترکیبات فنولی

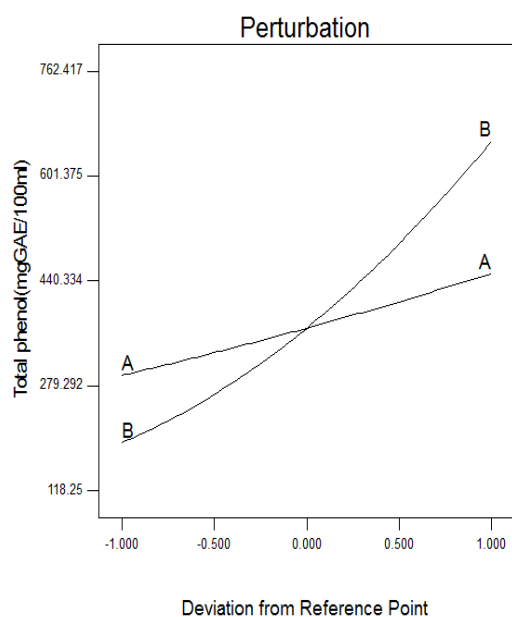
در واقع دماهای بالاتر استخراج می‌تواند منجر به نرم شدن بافت گیاهی، تخریب اتصالات ترکیبات فنولی با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها و افزایش قابلیت انحلال ترکیبات فنولی شده که این اثرات، می‌تواند انتقال جرم را بهبود بخشد. این امر نیز افزایش میزان استخراج ترکیبات فوق در دماهای بالاتر استخراج را به دنبال دارد (Gan & Latiff, 2011). بنابراین با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

رابطه (۴)

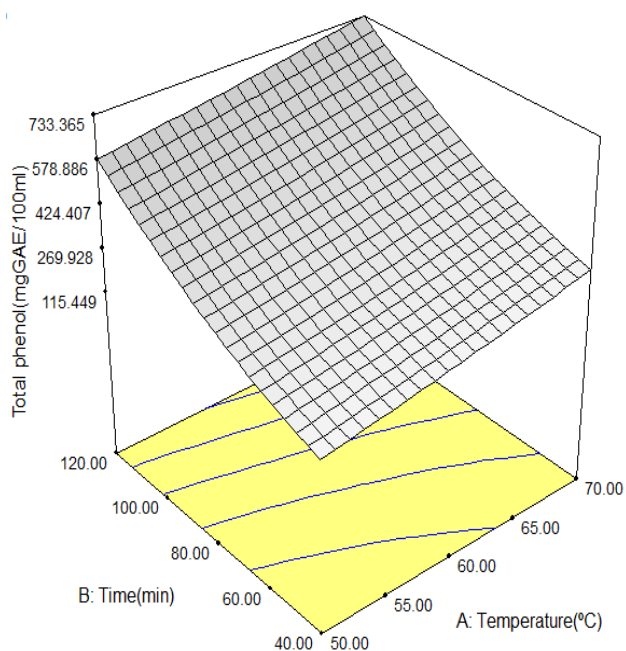
$$Y = +367/68 + 77/99A + 230/97B$$

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۹۵۷۶ و مقدار p برای آزمون فقدان برازش ۰/۴۴۶۷ بود. این مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند به خوبی پاسخ مورد نظر را پیش‌بینی نماید (جدول ۳).

شکل ۱- الف اثر فاکتورهای مستقل بر میزان ترکیبات فنولی را نشان می‌دهد که افزایش دما و زمان منجر به افزایش بازده استخراج ترکیبات فنولی شده است. جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که جملات خطی زمان (B) و دمای استخراج (A) تاثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی داشتند. اما جملات مربوط به اثرات درجه دوم (A^2 و B^2) و نیز جمله‌ی اثر متقابل دما و زمان (A-B) تاثیر معنی‌داری بر میزان استخراج نداشتند. بنابراین این اثرات از مدل حذف شدند. با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای دما و زمان می‌توان دریافت که زمان تأثیر مثبت بیشتری بر میزان استخراج ترکیبات فنولی داشته است (شکل ۱-ب). اثر مشاهده شده توسط زمان را می‌توان به افزایش مدت زمان انتقال جرم نسبت داد (Gan & Latiff, 2011). اثر مثبت دما در افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی نیز توسط محققین زیادی به اثبات رسیده است (Shi *et al.*, 2003; Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2003).



ب



الف

شکل ۱- الف) نمایش سه بعدی اثر زمان و دمای استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولی، ب) نمایش اثر متغیرهای مستقل روی میزان استخراج ترکیبات فنولی

جدول ۳- تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم- پارامتر میزان ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	$۳/۶۷۴ \times ۱۰^۵$	۵	۷۳۴۸۰/۳۲	۳۱/۶۵	۰/۰۰۱*
Intercept	۳۶۷/۶۸	-	-	-	-	-
A	۷۷/۹۹	۳۶۴۹۱/۰۰	۱	۳۶۴۹۱/۰۰	۱۵/۷۲	۰/۰۰۵۴
B	۲۳۰/۹۷	$۳/۲۰۱ \times ۱۰^۵$	۱	$۳/۲۰۱ \times ۱۰^۵$	۱۳۷/۸۵	<۰/۰۰۱
A ²	۵/۵۵	۸۵/۱۷	۱	۸۵/۱۷	۰/۰۳۷	۰/۸۵۳۶
B ²	۵۵/۳۴	۸۴۵۹/۸۵	۱	۸۴۵۹/۸۵	۳/۶۴	۰/۰۹۷۹
AB	-۴/۱۷	۶۹/۴۴	۱	۶۹/۴۴	۰/۰۳۰	۰/۸۶۷۶
Lack of Fit	-	۷۳۴۲/۱۶	۳	۲۴۴۷/۳۹	۱/۱۰	۰/۴۴۶۷ ^{NS}
R-Squared	-	۰/۹۵۷۶	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۹۲۷۴	-	-	-	-

میزان آنتوسیانین

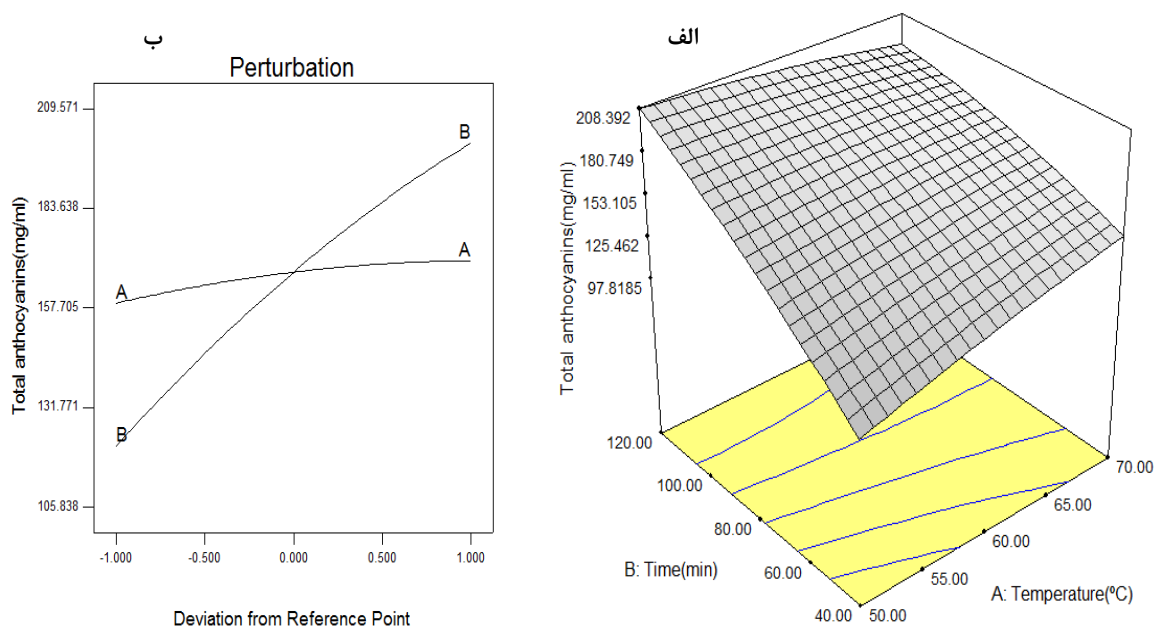
در شکل ۲- الف و ب اثر فاکتورهای مستقل دما و زمان استخراج بر میزان استخراج آنتوسیانین نشان داده شده است. افزایش زمان استخراج منجر به افزایش بازده استخراج آنتوسیانین شد. اما دما تاثیر کمتری بر پاسخ مورد نظر داشت. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، جمله خطی زمان (B) بیشترین تأثیر مثبت و جمله اثر متقابل (A-B) بیشترین تأثیر منفی بر بازده آنتوسیانین را داشتند. اما جملات خطی دما (A) و نیز جملات درجه دوم زمان و دما (A² و B²) تاثیر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین استخراج شده نداشتند. با توجه به معنی‌دار شدن جمله اثر متقابل دما-زمان (A-B)، جمله خطی دما (A) در مدل حفظ و سایر جملات فاقد اثر متقابل از مدل حذف شدند (حیدری مجد و همکاران ۱۳۹۱). با در نظر گرفتن اثرات یاد شده و نیز مراجعه به شکل ۲- الف می‌توان دریافت که بازده استخراج آنتوسیانین در دماهای کمتر، از مقدار بیشتری نسبت به دماهای بالاتر برخوردار بوده است. مشاهده فوق با نتایج حاصل از تحقیق Chumsri و همکاران (۲۰۰۸) در مورد چای ترش کاملاً همخوانی دارد. این محققین نیز کاهش میزان آنتوسیانین استخراج شده در دما و زمان‌های طولانی استخراج را گزارش کردند. تخریب

آنتوسیانین‌ها به فاکتورهای متعددی نظیر pH، دما حضور ویتامین ث و اکسیژن بستگی دارد. نتایج مطالعه Bridle و Timberlake (۱۹۹۷) نیز نشان داد که حرارت دادن در محیط اسیدی می‌تواند ساختار آنتوسیانین‌ها را به سمت ایجاد چالکون‌های بی‌رنگ تغییر دهد. با توجه به محیط اسیدی مورد مطالعه در این تحقیق نیز می‌توان اثر حرارت‌های بالا در کاهش بازده آنتوسیانین‌های زرشک را توجیه نمود. علاوه بر این، با توجه به حضور مقادیر زیادی ویتامین ث در زرشک، این ترکیب نیز می‌تواند با آنتوسیانین‌ها واکنش داده و منجر به کاهش رنگ آن شود. کمپلکس‌های ایجاد شده در اثر این واکنش تخریبی، به احتمال زیاد پایدار هستند (Francis, 1985). معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

رابطه (۵)

$$Y = +۱۶۶ / ۹۹ + ۵/۵۴A + ۳۹/۳۱ B - ۱۵/۹۷ AB$$

ضریب تبیین (R²) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۹۳۸۱ و مقدار p برای آزمون فقدان برازش نیز ۰/۴۱۹۸ بود. بنابراین مدل ارائه شده در معادله‌ی فوق برازش مناسبی برای پاسخ مورد نظر ارائه می‌دهد (جدول ۴).



شکل ۲- (الف) نمایش سه بعدی اثر زمان و دمای استخراج بر میزان استخراچ آنتوسیانین، (ب) نمایش اثر متغیرهای مستقل روی میزان استخراچ آنتوسیانین

جدول ۴- تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه ی دوم- پارامتر میزان آنتوسیانین (میلی گرم در لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	۱۰۶۴۴/۳۴	۵	۲۱۲۸/۸۷	۲۱/۲۲	۰/۰۰۴*
Intercept	۱۶۶/۹۹	-	-	-	-	-
A	۵/۵۴	۱۸۳/۹۸	۱	۱۸۳/۹۸	۱/۸۳	۰/۲۱۷۸
B	۳۹/۳۱	۹۲۷۳/۲۳	۱	۹۲۷۳/۲۳	۹۲/۴۲	<۰/۰۰۱
A ²	-۲/۵۲	۱۷/۵۷	۱	۱۷/۵۷	۰/۱۸	۰/۶۸۸۲
B ²	-۵/۸۳	۹۳/۸۶	۱	۹۳/۸۶	۰/۹۴	۰/۳۶۵۷
AB	-۱۵/۹۷	۱۰۲۰/۶۰	۱	۱۰۲۰/۶۰	۱۰/۱۷	۰/۰۱۵۳
Lack of Fit	-	۳۳۱/۰۴	۳	۱۱۰/۳۵	۱/۱۹	۰/۴۱۹۸ ^{ns}
R-Squared	-	۰/۹۳۸۱	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۰/۸۹۳۹	-	-	-	-

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

دما و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابه با اثر این فاکتورها بر میزان ترکیبات فنولی بوده است. علاوه بر این، همبستگی بالا ($R^2=0/10$) میان بازده استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز این مشاهده را تایید می‌کند. محققین بسیاری گزارش کرده‌اند که میزان ترکیبات فنولی تاثیر بسزایی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که این امر به دلیل قابلیت احیا کنندگی بالای این ترکیبات و نیز توانایی دادن هیدروژن به رادیکال‌های فعالی نظیر DPPH می‌باشد (Bucic-Kojic et al., 2011; Kumaran &)

مطابق جدول ۵، جمله اثر متقابل دما و زمان (A-B) دارای بیشینه تاثیر منفی و جملات خطی زمان (B) و دمای استخراج (A) بیشترین تاثیر مثبت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده را داشته‌اند. اما جملات اثرات درجه دوم (A^2 و B^2) تاثیر معنی‌داری در مدل برازش داده شده نداشتند. در شکل ۳-ب اثر افزایشی فاکتورهای مستقل بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده است. با توجه به شکل ۲ نیز می‌توان دریافت که تاثیر فاکتورهای

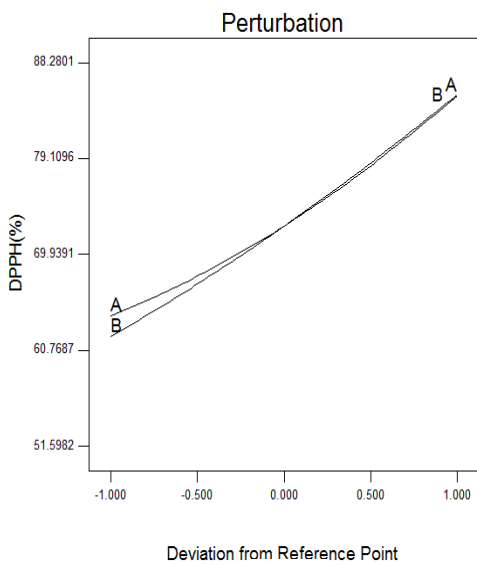
استخراجی نیز قابل توجه می‌باشد. با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی دار، معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

رابطه (۶)

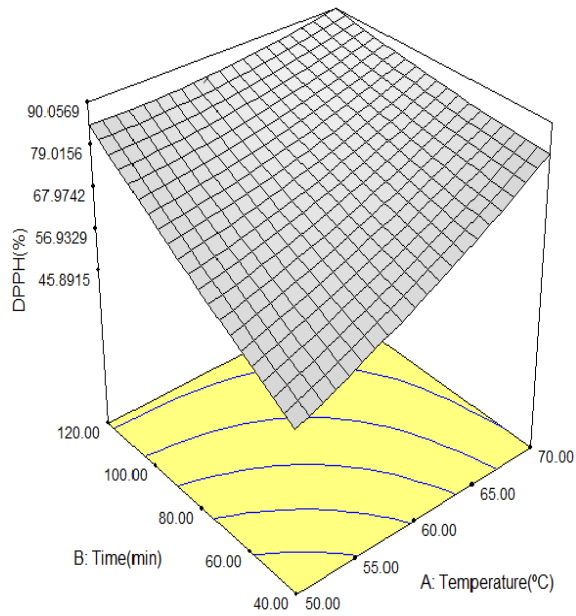
$$Y = + 72/63 + 10/53 A + 11/56 B - 7/63 AB$$

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۸۵۱۵ و مقدار p برای آزمون فقدان برازش ۰/۲۱۱۴ بود. این مقادیر نیز بیانگر برازش مناسب مدل ارائه شده در معادله‌ی فوق برای پاسخ مورد نظر می‌باشد.

پس می‌توان اثر زمان‌های طولانی استخراج (در دمای بالاتر) را در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به راحتی توجه نمود. همان طور که در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۷۰ و زمان ۱۲۰ درجه بود. نتایج تحقیق Ruslawati و Azizah (۱۹۹۹) نیز نشان داد که ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراج شده در دماهای بالا (به جز بالای ۹۰ درجه سانتی‌گراد) پایدار بودند. بنابراین تاثیر مثبت دماهای بالا در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های



ب



الف

شکل ۳- (الف) نمایش سه بعدی اثر زمان و دمای استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده، (ب) نمایش اثر متغیرهای مستقل روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده

جدول ۵- تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه ۱ دوم - پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH%)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F مقدار	Prob > F
Model	-	۵۸/۱۷۱۹	۵	۹۲/۳۴۳	۰۳/۸	*۰۰۸۱/۰
Intercept	۶۳/۷۲	-	-	-	-	-
A	۵۳/۱۰	۹۹/۶۶۴	۱	۹۹/۶۶۴	۵۲/۱۵	۰۰۵۶/۰
B	۵۶/۱۱	۱۱/۸۰۱	۱	۱۱/۸۰۱	۷۰/۱۸	۰۰۳۵/۰
A ²	۹۶/۱	۶۴/۱۰	۱	۶۴/۱۰	۲۵/۰	۶۳۳۵/۰
B ²	۰۱/۱	۸۳/۲	۱	۸۳/۲	۰۶۶/۰	۸۰۴۷/۰
AB	۶۳/۷-	۸۳/۲۳۲	۱	۸۳/۲۳۲	۴۳/۵	۰۵۲۵/۰
Lack of Fit	-	۹۶/۱۹۱	۳	۹۹/۶۳	۳۷/۲	^{ns} ۲۱۱۴/۰
R-Squared	-	۸۵۱۵/۰	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	۷۴۵۴/۰	-	-	-	-

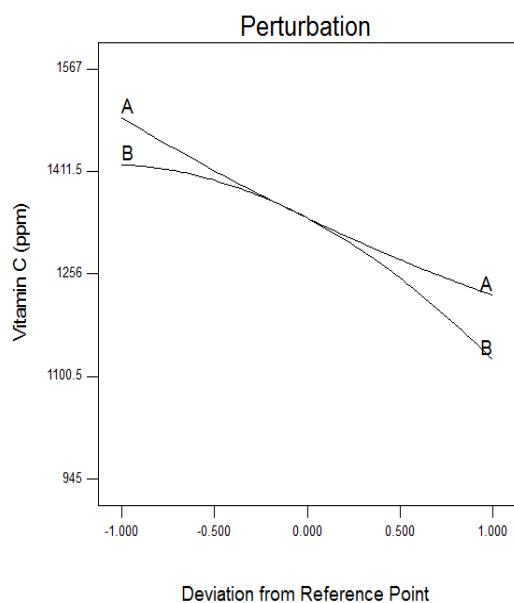
ویتامین ث

شکل ۴-ب اثر فاکتورهای مستقل دما و زمان را نشان می‌دهد که افزایش دما و زمان منجر به کاهش میزان ویتامین ث گردیده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۶)، تنها جملات خطی زمان و دمای استخراج تاثیر معنی‌دار داشته‌اند و بنابراین سایر جملات فاقد تاثیر معنی‌دار از مدل حذف شدند. با توجه به شکل ۴-الف می‌توان دریافت که کمترین میزان ویتامین ث در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و

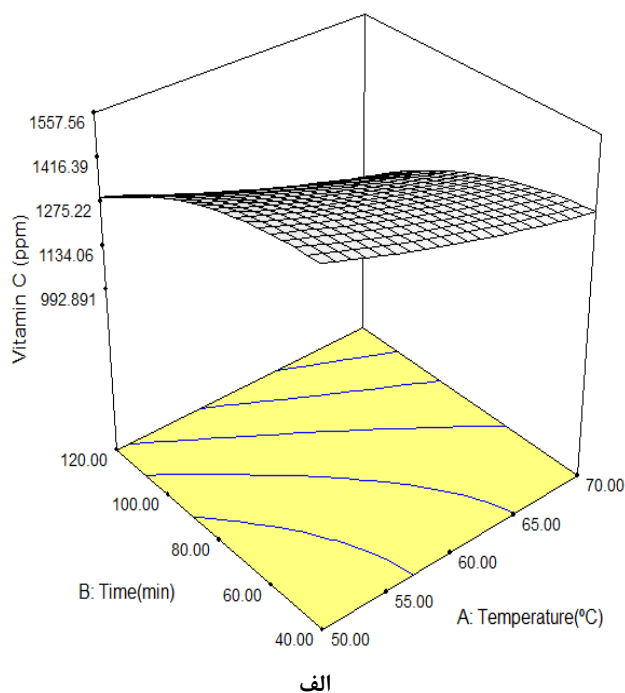
زمان ۱۲۰ دقیقه مشاهده شده است. حساسیت ویتامین ث نسبت به دماهای بالا امری بدیهی می‌باشد. اما علاوه بر این، با توجه به یکسان بودن روند کاهش ویتامین ث و میزان آنتوسیانین استخراج شده، فرضیه واکنش ویتامین ث با آنتوسیانین تأیید می‌شود (Francis, 1985). مدل برازش داده شده برای پاسخ فوق نیز به صورت زیر است:

رابطه (۷)

$$Y = +1340 / 38 - 134 / 33 A - 148 / 00 B$$



ب



الف

شکل ۴- نمایش سه بعدی اثر زمان و دمای استخراج بر میزان ویتامین ث (الف)، نمایش اثر متغیرهای مستقل روی میزان ویتامین ث (ب)

جدول ۶- تجزیه واریانس مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم - پارامتر ویتامین ث

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	$3/201 \times 10^5$	5	$50642/79$	7/93	$0/0084^*$
Intercept	1340/38	-	-	-	-	-
A	-134/33	$1/083 \times 10^5$	1	$1/083 \times 10^5$	16/96	$0/0045$
B	-148/00	$1/314 \times 10^5$	1	$1/314 \times 10^5$	20/59	$0/0027$
A ²	+17/17	814/46	1	814/46	0/13	$0/7315$
B ²	-66/83	12334/46	1	12334/46	1/93	$0/2071$
AB	-15/50	961/00	1	961/00	0/15	$0/7096$
Lack of Fit	-	$42625/30$	3	$14208/43$	27/54	$0/0039^*$
R-Squared	-	1/8500	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	0/7428	-	-	-	-

بهینه‌سازی شرایط استخراج

نمونه‌ها، مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم استفاده گردید. نتایج بیانگر استخراج مقدار قابل توجهی آنتوسیانین (۲۰۸/۳۹۲ میلی‌گرم در لیتر)، ترکیبات فنلی (۵۸۵/۷۲۵ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و ویتامین ث (۱۲۹۲/۵۶ میلی‌گرم در لیتر) بود. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده ۸۴/۲۶۰ درصد بر اساس روش DPPH در شرایط بهینه دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲۰ دقیقه به ثبت رسید. در این تحقیق وجود مقادیر قابل توجه ترکیبات فراسودمند نظیر آنتوسیانین‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ویتامین ث مورد تأیید قرار گرفت. می‌توان از عصاره زرشک استخراج شده به این روش به عنوان یک افزودنی طبیعی و عملگر در مواد غذایی استفاده کرد و روش سطح پاسخ نیز ابزاری سودمند برای بهینه‌سازی متغیرهای فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک می‌باشد تا بتوان از این شرایط بهینه در صنعت بهره جست.

سپاسگزاری

در پایان نویسندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از مسئولان محترم پژوهشکده علوم و صنایع غذایی جهت در اختیار گذاشتن امکانات و وسایل لازم برای انجام این تحقیق، سپاسگزاری نمایند.

در فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک بی‌دانه، دستیابی به بیشترین میزان ترکیبات فنولی، آنتوسیانین، ویتامین ث و نیز حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان اهداف مورد نظر آزمایشات در تجزیه و تحلیل‌های آماری مورد نظر قرار گرفت. شرایط عملیاتی بهینه، با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی^۱ انجام شد. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه‌سازی، سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل تنظیم گردید. با استفاده از تکنیک تابع مطلوبیت^۲ بهترین پاسخ‌ها به دست آمد. نتایج شرایط بهینه استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک شامل دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲۰ دقیقه بود که در این شرایط مقدار آنتوسیانین ۲۰۸/۳۹۲ میلی‌گرم در لیتر، ترکیبات فنلی ۵۸۵/۷۲۵ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر، ویتامین ث ۱۲۹۲/۵۶ میلی‌گرم در لیتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده نیز ۸۴/۲۶۰ درصد بود. مطلوبیت به دست آمده در شرایط بهینه برای متغیرها و پاسخ‌های مورد بررسی، ۰/۷۷۶ بود.

نتیجه‌گیری

هدف از این تحقیق بهینه‌سازی فرایند استخراج آبی ترکیبات زیست فعال موجود در میوه زرشک بی‌دانه به روش سطح پاسخ بود. جهت پیش‌بینی رفتار

1- Numerical optimization

2- Desirability function method

منابع

- ۱- حمیدی اسکویی، ج. ۱۳۵۳. کلیاتی در مورد زرشک. پایان نامه کارشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
- ۲- حیدری مجد، م. مرتضوی س.ع. اصیلی، ج. بلوریان، ش. آرمین، م. و عبدالشاهی، ا. ۱۳۹۱. بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه پونه گاوی *Flomidoschema parviflora* با استفاده از دستگاه اولتراسوند. داروهای گیاهی، سال سوم، شماره ۱: ۷-۱۳.
- ۳- خورشیدزاده، ف. ۱۳۶۷. ترکیبات رنگی گیاه زرشک. پایان نامه دکتری، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.
- ۴- شریفی، ا.، مسکوک، ع. م.، توکلی پور، ح. و الهامی راد، ا. ح. ۱۳۸۷. بررسی روش‌های استخراج و ارزیابی پایداری رنگ زرشک. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار.
- ۵- کافی، م. و بالندری، الف. ۱۳۸۱. زرشک، فناوری تولید و فرآوری. موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۶- مسکوک، ع. م. و مرتضوی ع. ۱۳۸۰. مطالعات جامع و استراتژیک (تولید، تبدیل و توزیع) زرشک بیدانه، دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۷- همتی کاخکی، ع. و حسین پور، س. ح. ۱۳۷۲. بررسی امکان استفاده از کنستانتیره زرشک در تهیه آب میوه و نوشابه گازدار زرشک. سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز خراسان. شرکت شهید ایران.
- 8- Azizah, A. H., Ruslawati, N.M.N., & Tee, T.S. 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, 64: 199–202. 10.
- 9- Bridle, P., & Timberlake, C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2): 103-109.
- 10- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Jokic, S., Mujic, I., Bilic, M., & Velic, D. 2011. Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3): 195-199.
- 11- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74: 2157–2184.
- 12- Chang, Y.C., Lee, C.L. & Pan, T.M. 2006. Statistical optimization of mediacomponents for the production of *Antrodia cinnamomea* AC06233 in submerged cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 654-661.
- 13- Chumsri, P., Sirichote, A., & Itharat, A. 2008. Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 30: 133-139.
- 14- Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2454–2458.
- 15- Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. 2003. Polyphenol extraction from foods. In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.), *Methods in polyphenol analysis* (pp. 1–16). Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.
- 16- Francis, F.J. 1985. Pigments and other colorants. In *Food Chemistry*, 2nd ed., Fennema, O. R. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, USA. p. 545-584.
- 17- Fuleki, T., & Francis, F.J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins, determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33: 78-83.
- 18- Galvez, A., Di Scala, K., Rodriguez, K., Mondaca, R.L., Miranda, M., Lopez, J., Perez-Wan, M. 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant

- capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Journal Of Food Chemistry*, 117: 647–653.
- 19- Gan, C.Y., & Latiff, A.A. 2011. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chemistry*, 124: 1277–1283.
- 20- Ghafoor, A.K., Jiyong Park, A., & Choi, Y.H. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca B.*) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 485–490.
- 21- Jiménez, C. D. C., Flores, C. S., He, J., Tian, Q., Schwartz .S. J., & Giusti, M. M. 2011. Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins. *Food Chemistry*, 128: 717–724.
- 22- Kukula-Koch, W., Aligiannis, N., Halabalaki, M., Skaltsounis, A., & Glowial, K. 2013. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. *Food Chemistry*, 138: 406–413.
- 23- Kumaran, A., & Karunakaran, J. 2006. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 344–352.
- 24- Melendez, A.J., Bejines, E., Vicario, I.M., & Heredia, F.J. 2004. Vitamin c in orange juices determined by HPLC: influence of the wavelength of detection. *Italian Journal of Food Science*, 16: 79-85.
- 25- Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., & Mortazavi, S.A. 2011. Multi-objective optimization of osmotic-ultrasonic pretreatments and hot-air drying of quince using response surface methodology. *Food Bioprocess Technology*, 6-2: 89-96.
- 26- Shahidi, F., & Naczki, M. 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 27- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, C., Bryan, M., & Wu, Y. 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food Agriculture and Environment*, 1: 42–47.
- 28- Wang, C., Shi, L., Fan, L., Ding, Y., Zhao, S., Liu, Y., & Ma, C. 2013. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum L.*) leaves. *Industrial Crops and Products*, 42: 587– 594.
- 29 -Yang, B., Liu, X., & Gao, Y. 2009. Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia* (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 610–615.
- 30- Zovko Koncic, M., Kremer, D., Karlovic, K., & Kosalec, I. 2010. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris L.* and *Berberis croatica* Horvat. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2176–2180.

Optimisation of bioactive compounds extraction from barberry fruit (*Berberis vulgaris*) using response surface methodology

Seyed Ali Mortazavi¹, Akram Sharifi^{2*}, Abdolmajid Maskooki³, Mehrdad Niakousari⁴, Amir Hossein Elhamirad⁵

1- Professor, Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

2- Graduated PhD. Student, Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

Corresponding author (a.sharifi@iaus.ac.ir)

3. Associated Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural College, Shiraz University, Shiraz, Iran

5- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

Abstract

Response surface methodology is a series of statistical techniques that can be used to design experiment, modeling and evaluating the effect of variables on the final obtained results and optimization of process conditions. In this research, optimization of the solvent extraction method of bioactive compounds from seedless barberry (*Berberis vulgaris*) was carried out using response surface methodology. Central composite design was employed with 13 treatments and 5 replications in central points and the effect of variable factors of temperature (50-70°C) and extraction time (40-120 minutes). The amount of anthocyanin content, vitamin C, phenolic contents and antioxidant activities of extracted barberry were measured. Close agreement was found between experimental and predicted values of model. Effects of extraction temperature and time were found to be significant on all responses. According to these results, optimal extraction conditions were identified at 50 °C temperature for 120 minutes. In this condition the maximum of phenolic compounds, anthocyanin, antioxidant activities and vitamin C contents were 585.725 mg GAE/100ml, 208.392 mg/l, 84.2603% and 1292.56 ppm respectively. The results showed that this methodology could be applied in the extraction of bioactive compounds in the natural product industry.

Keywords: Antioxidant activities, Anthocyanin, Barberry, Phenolic contents, Response surface methodology