www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1391، جلد 1، شماره 2، صفحات 75-86
DOI: 10.22101/JRIFST.2012.06.21.121

JRIFST

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی استخراج شده از پوست بنه رقم موتیکا به روش مادون بحرانی آب

رضوان شاددل[*1]، محمد حسین حداد خداپرست[2]، عبدالمجید مسکوکی[3]، علی شریف[4]، صدیف آزادمرد دمیرچی[5]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
*نویسنده مسئول (r.shaddel@gmail.com)
2- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
3- استادیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
5- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

در تحقیق حاضر قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌های استخراجی از پوست بنه رقم موتیکا حاصل از روش استخراج آب مادون بحرانی در سه دمای 110 °C، 155 °C و 200 °C (با زمان ثابت 45 دقیقه و نسبت اختلاط ثابت 30:1 بنه- آب) مورد بررسی قرار گرفت. میزان ملانوئیدی شدن، قدرت احیا کنندگی آهن (میلی گرم بر میلی لیتر)، میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (میلی گرم بر میلی لیتر) و همچنین میزان کل ترکیبات فنلی (100 گرم ماده اولیه / میلی گرم اسید گالیک)، شاخص‌های مورد مطالعه بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش دما تا 200 °C میزان ملانوئیدی شدن، قدرت احیاکنندگی آهن، همچنین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ی بدست آمده بیشتر شد؛ ضمن اینکه بالاترین میزان ترکیبات پلی فنلی در 155 °C بدست آمد. تحت این شرایط میزان ترکیبات پلی فنلی، قدرت احیاکنندگی بر حسب EC_{50} و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بر حسب EC_{50} به ترتیب برابر با 2096/41 میلی گرم اسید گالیک در 100 گرم پوست بنه، 0/213 میلی گرم بر میلی لیتر و 0/685 میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج بدست آمده، استفاده از آب مادون بحرانی را به عنوان روشی مناسب جهت استخراج مواد بیولوژیک از پوست بنه با مزایایی از جمله بازده استخراج بالا، با حلال فراوان، ارزان و بدون هیچ آثار زیست محیطی منفی به اثبات می‌رساند.

تاریخ دریافت : 90/3/8
تاریخ پذیرش :90/7/10

واژه‌های کلیدی
آب مادون بحرانی
پوست بنه
ترکیبات فنلی
ملانوئیدی شدن

مقدمه

بنه از جمله گونه‌های وحشی پسته می‌باشد که خاستگاه اصلی آن ایران است. درختان بنه همچون حلقه‌ای اطراف کویرهای داخلی ایران را احاطه کرده‌اند. وسعت درختان بنه در ایران بیش از یک میلیون و دویست هزار هکتار است (Farhoosh et al., 2009). برای این گونه

پسته چهار رقم با انتشار جغرافیایی کم و بیش متفاوت شناسایی شده است؛ مهم‌ترین این ارقام، *موتیکا* (*Pistacia atlantica var mutica*) است که در نقاط مختلف ایران پراکندگی دارد(حاجی حیدری، 1376). میوه بنه از سه قسمت مغز (25 درصد)، پوسته‌ی چوبی سفت (51 درصد) و پوسته‌ی خارجی نرم (24 درصد) تشکیل شده است (کلنگی، 1369). پوسته‌ی خارجی به رنگ سبز است، تقریباً 30 درصد روغن دارد و با فشردن بین دو انگشت به آسانی از پوسته‌ی چوبی جدا می‌شود. همچنین، روغن پوست بنه از پایداری اکسایشی بسیار بالایی برخوردار است و مقاومت سایر روغن‌های گیاهی به اکسایش لیپیدی را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد (Farhoosh et al., 2009). امروزه گرایش به آنتی اکسیدان های طبیعی به علت تأثیر مثبت بر سلامتی و همچنین قدرت بالای برخی از آن‌ها نسبت به آنتی اکسیدان های سنتزی، زیاد شده است (Sharif et al., 2009). مواد بیولوژیک پوست بنه را می‌توان جزء آنتی اکسیدان های طبیعی طبقه بندی نمود.

آب مادون بحرانی ناحیه‌ای از فاز کندانس شده‌ی آب است که دمای بین 100°C (نقطه‌ی جوش آب) و 374°C (نقطه‌ی بحرانی آب) را در بر می‌گیرد و شامل میزان فشاری است که آب در حالت مایع باقی بماند و تغییر فاز ندهد (Ayala and Luquede Castro, 2001). تحت این شرایط حلالیت ترکیبات با قطبیت کم و ترکیبات آلی، نسبت به دمای اتاق، در آب افزایش می‌یابد (Miller and Hawthorne, 1998). امروزه نگرش به سوی فرایندهای سبز زیاد شده است، استخراج با آب مادون بحرانی 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 به عنوان سبزترین حلال استفاده می‌شود. شماری از مطالعات بر روی جنبه‌های زیست محیطی این روش استخراج تمرکز داشته‌اند (Siriwong et al., 2009; Okuda et al., 2009). مطالعات دیگری بر جنبه‌ی انتخابی این روش جهت استخراج ترکیبات خاص (مثل آنتوسیانین ها، ویتامین E یا ترکیبات فنلی) از گونه‌های گیاهی مختلف تأکید کرده‌اند (Herrero et al., 2005; Zaibunnisa et al., 2009). در این تحقیق، تأثیر دماهای مختلف استخراج با آب مادون بحرانی به عنوان جدیدترین روش استخراج ترکیبات بیولوژیک بر قدرت آنتی اکسیدانی عصاره‌های استخراجی از پوست بنه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

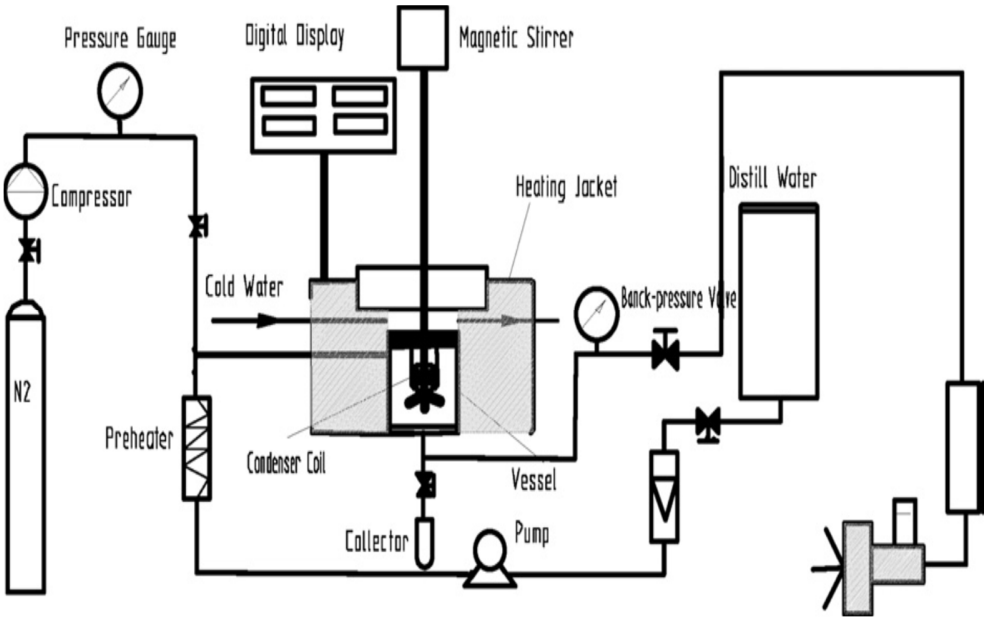
میوه‌ی رسیده بنه (*Pistacia atlantica var mutica*) اوایل آبان ماه از شهرستان مرو دشت در استان فارس تهیه گردید. میوه‌ها تا زمان استفاده در سردخانه زیر صفر نگهداری شد، جداسازی پوست بنه‌ها با دستگاه پوست گیر انجام گرفت. متانول، معرف فولین سیوکالچو، اسید گالیک، کربنات سدیم، پتاسیم فری سیانید، تری کلرو استیک اسید، فریک کلرید، مونو سدیم فسفات مونو هیدرات، دی سدیم فسفات هپتا هیدرات،1 و 1 دی فنیل -2- پیکریل هیدرازیل، اسید آسکوربیک، اسید کلریدریک و اسید استیک از شرکت‌های مرک، شارلو و کالدون خریداری گردید.

استخراج با آب مادون بحرانی

این دستگاه شامل تانک آب مقطر، پمپ (Comet type: MTP AX 2/70 m) جهت تأمین فشار لازم (با حداکثر فشار 70 بار، قطر داخلی 2 cm)، سل استخراج به حجم 140 میلی لیتر، کویل گرم کننده‌ی سل و پنل کنترل دما می‌باشد (شکل 1). استخراج با این روش بدین ترتیب انجام گرفت: 15 گرم پوست بنه در سل استخراج قرار گرفت و مقدار 450 میلی لیتر آب برای رسیدن به نسبت اختلاط 1 به 30 (پوست بنه – آب) در تانک آب ریخته شد. عمل استخراج با تنظیم درجه حرارت و با فشار مناسب (110 °C-2 bar، 155°C-5 bar و 200°C-15 bar) انجام گرفت؛ فشارهای بکار رفته، حداقل فشار لازمی بودند که آب در حالت مایع باقی بماند و تغییر فاز ندهد. دما و فشار مناسب با استفاده از جداول ترمودینامیکی تعیین گردید.

زمان لازم برای افزایش دما در داخل مخزن مادون بحرانی آب از هنگام قرار دادن نمونه تا رسیدن دما به بالای 100 درجه سانتیگراد، 10 دقیقه بود. بعد از رسیدن به دمای 100 درجه سانتیگراد، استخراج به مدت 45

دقیقه انجام گرفت. حجم عصاره‌ی استخراج شده اندازه گیری شد؛ سپس عصاره با استفاده از کاغذ واتمن شماره 4 فیلتر گردید؛ برای صاف شدن هر چه بیشتر عصاره و حذف ذرات زائد از فیلتر تحت خلأ استفاده شد. به منظور حذف حلال، نمونه‌ی فیلتر شده در آون 40 درجه سانتیگراد و سپس در آون تحت خلأ تا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت. بعد از هر مرحله استخراج برای خنک نمودن مخزن دستگاه مادون بحرانی، آب سرد سیرکوله شد. جهت شستشوی بهتر و اطمینان از باقی نماندن نمونه در قسمت‌های مختلف دستگاه، از الکل بازیافتی استفاده گردید؛ در نهایت شستشوی مجدد با آب انجام گرفت.



شکل 1- نمایی شماتیک از دستگاه استخراج با آب مادون بحرانی (He et al., 2011)

تعیین ملانوئیدها (محصول نهایی واکنش مایلارد)

میزان ملانوئیدها با استفاده از شدت قهوه‌ای شدن نمونه‌های استخراج شده تخمین زده شد. شدت جذب در طول موج‌های 360 و 420 نانومتر برای نشان دادن تشکیل محصولات نهایی واکنش مایلارد بکار می‌رود؛ اما بخشی از قهوه‌ای شدن مربوط به کاراملیزاسیون می‌باشد (Benjakul et al., 2005). برای این کار شدت قهوه‌ای شدن در طول موج‌های 360 و 420 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-VIS) خوانده شد. همچنین، تغییرات ایجاد شده در ترکیبات عصاره با روش‌های اسپکتروسکوپی قابل تشخیص است. عصاره‌ها به علت بالا بودن جذب، قبل از اندازه گیری تا 4 برابر رقیق شدند (Hossain et al., 2011; Plaza et al., 2010).

اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن III

2/5 میلی لیتر عصاره نمونه با غلظت‌های مشخص با 2/5 میلی لیتر بافر فسفات (0/2 مولار، pH=6/6) و 2/5 میلی لیتر محلول 1 درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط شد؛ سپس به مدت 20 دقیقه داخل بن ماری 50 درجه سانتیگراد نگه داشته شد. دمای محلول به سرعت در بشر آب سرد پایین آورده شد. سپس با 2/5 میلی لیتر محلول 10 درصد تری کلرو استیک اسید (وزنی حجمی) مخلوط شده و به مدت 10 دقیقه با سرعت 3000 rpm سانتریفوژ

(مدلLabofuge 200E) گردید. فاز رویی جدا شده و 5 میلی لیتر آن با 5 میلی لیتر آب مقطر و 1 میلی لیتر محلول 0/1 درصد فریک کلرید مخلوط شد؛ سپس جذب در 700 نانومتر قرائت گردید. هر چه جذب بیشتر باشد قدرت احیاکنندگی بیشتر است؛ آزمایش در سه تکرار انجام شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. مکانیسم این روش، احیا آهن III به آهن II می‌باشد (Barros et al., 2007).

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

ابتدا 23/5 میلی گرم DPPH در 100 میلی لیتر متانول حل شد. سپس 10 میلی لیتر از این محلول را برداشته و به حجم 100 میلی لیتر رساندیم (1:10)، غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ی بنه (2500 و 500، 1000، 1500، 2000) تهیه شد، به طوری که قدرت مهارکنندگی 100 درصد در بین غلظت‌های موجود باشد. 0/1 میلی لیتر از این محلول‌ها با 3/9 میلی لیتر از محلول DPPH برای رسیدن به حجم 4 میلی لیتر مخلوط شدند. واکنش بعد از 4 ساعت در دمای اتاق کامل شد و جذب در 516 نانومتر با اسپکتروفتومتر (JENWAY 6105) خوانده شد. متانول برای کالیبره کردن دستگاه و برای نمونه شاهد از 0/1 سی سی متانول استفاده شد. درصد بازداری DPPH هر یک از عصاره‌ها بر اساس فرمول (1) محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{Ablank}-\text{Asample}}{\text{Ablank}} * 100 \qquad (1)$$

A_{blank} و A_{sample} به ترتیب میزان جذب نمونه شاهد و عصاره در طول موج 516 نانو متر هستند. پس از ترسیم نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت ترکیب آنتی اکسیدانی، بهترین معادله خط برای نقاط بدست آمده برازش داده شد و سپس غلظتی که ترکیب آنتی اکسیدانی قادر به مهار کردن 50 درصد از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط است تحت عنوان EC_{50} محاسبه گردید؛ آزمایش در سه تکرار انجام شد (Rodriguez-Meizoso et al., 2006).

اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی کل

0/5 ml عصاره با غلظت‌های مختلف با 2/5 ml محلول فولین سیوکالچو ده بار رقیق شده توسط آب مقطر مخلوط و سپس 2 ml محلول 7/5 درصد کربنات سدیم اضافه شد. نمونه به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب در 765nm خوانده شد (با 3 تکرار)، برای نمونه شاهد از آب مقطر استفاده گردید. میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس منحنی کالیبراسیون اسید گالیک، بر حسب میلی گرم اسید گالیک موجود در 100 گرم ماده اولیه بیان شد (Singh et al., 2002). معادله‌ی بدست آمده بدین صورت بود:

$$\text{Polyphenols} = 131/3 \text{ absorbance} - 2/123 \qquad (2)$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی در 3 تکرار انجام شد. میانگین‌ها با نرم افزار MStatC و بر اساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد ($p<0/05$) مقایسه شدند. نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2007 ترسیم گردیدند.

نتایج و بحث

در تحقیق حاضر تأثیر آب مادون بحرانی تحت شرایط دمایی مختلف بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها ارزیابی شد؛ برای رسیدن به این هدف میزان ملانوئیدی شدن، قدرت احیا کنندگی، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و همچنین میزان ترکیبات پلی فنلی کل عصاره‌های بدست آمده بررسی شد.

قهوه‌ای شدن

به طور کلی این نظریه که توسعه‌ی رنگ قهوه‌ای می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از وقوع واکنش قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی بکار رود پذیرفته شده است (Delgado-Andrade et al., 2010; Purlis, 2010). رنگ قهوه‌ای و بوی برشته‌ی خاصی که در دماهای بالاتر طی فرایند استخراج مشاهده شد احتمالا به خاطر قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی بین قندها و آمینو اسیدهای نمونه و یا واکنش کاراملیزاسیون قندها در دمای استخراج باشد. در حقیقت اندازه گیری شدت رنگ قهوه‌ای آسان‌ترین روش پی بردن

به وجود محصولات واکنش مایلارد است. به طوری که گزارش شده، بعضی از محصولات واکنش مایلارد دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند، به همین علت شناسایی این محصولات در عصاره می‌تواند دلیل بخشی از فعالیت بیولوژیک عصاره را توضیح دهد(Rodriguez-Meizoso et al., 2010). افزایش قهوه‌ای شدن مستقیماً مربوط به فازهای نهایی واکنش می‌باشد که محصولات واکنش قهوه‌ای شدن تشکیل می‌شوند (Morales and Jimenez-Perez, 2001). جدول 1 داده‌های مربوط به قهوه‌ای شدن را نشان می‌دهد.

جدول 1- میزان قهوه‌ای شدن عصاره مادون بحرانی پوست بنه(همه جذب‌ها حداقل با 3 تکرار خوانده شد).

جذب در 420 نانومتر			جذب در 360 نانومتر		
200 °C	155 °C	110°C	200 °C	155 °C	110°C
0/959[f]	0/577[e]	0/438[d]	2/044[c]	1/772[b]	1/597[a]

[a-f] اختلاف معنی دار ($p<0/05$)

هر ترکیبی در طول موج‌های مشخصی حداکثر جذب را نشان می‌دهد. محصولات واکنش قهوه‌ای شدن در طول موج‌های 360nm (مربوط به ناحیه UV) و 420nm (مربوط به ناحیه مرئی) حداکثر جذب را نشان می‌دهند. همان طوری که ملاحظه می‌شود اختلاف معنی داری بین داده‌های بدست آمده در 360nm و 420nm وجود دارد ($p<0/05$). در هر طول موج نیز با افزایش دما افزایش جذب‌های اندازه گیری شده مشاهده شد که دلیلی بر وقوع واکنش مایلارد در طول فرایند استخراج با آب مادون بحرانی عصاره‌ی بنه بود. بنابراین ساختارهای شیمیایی جدید و مختلفی ممکن است در طی این فرایند شکل گرفته باشند. Plaza و همکاران (2010) نتایج مشابهی را در مورد چندین گونه‌ی گیاهی گزارش کردند.

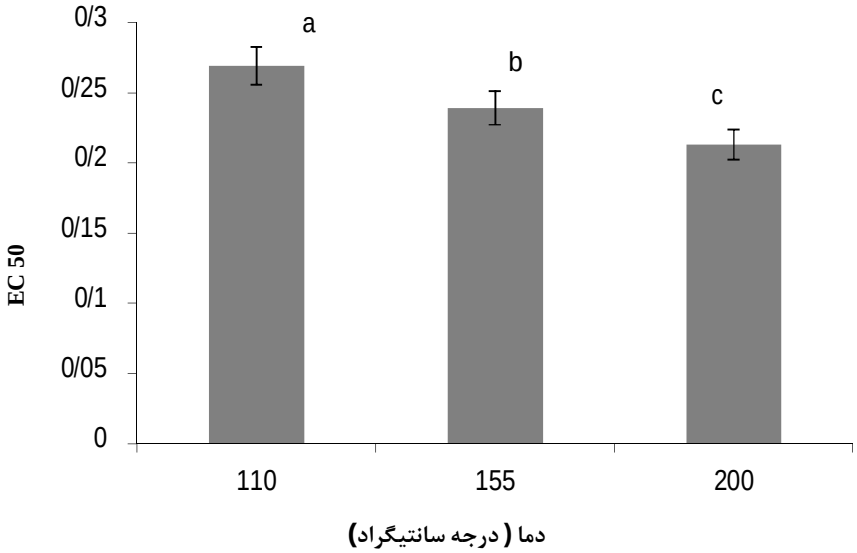
قدرت احیا کنندگی آهن III

همان طور که در شکل 2 و 3 مشاهده می‌شود، با افزایش دما قدرت احیا کنندگی عصاره افزایش یافت. آنتی اکسیدان هایی با قدرت احیا کنندگی آهن بالاتر از توانایی بیشتری در پایان دادن به واکنش‌های مخرب زنجیره‌ای رادیکالی برخوردادند (Wanasundara and shahidi, 2005). غلظتی از عصاره که جذب در طول موج 700 nm برابر 0/5 شود (EC_{50}) برای 110 ℃، 155 ℃ و 200 ℃، 0/269، 0/239 و 0/213 میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد (جدول 2)، مطالعات دیگری نیز چنین روندی را گزارش کرده‌اند (Hossain et al., 2011). به دلیل اینکه با افزایش دما و مدت زمان استخراج، ثابت دی الکتریک آب کاهش و به تناسب آن قطبیت آب کاهش می‌یابد ترکیبات خاصی استخراج می‌شوند که باعث افزایش قدرت احیاکنندگی عصاره‌ی استخراج شده می‌گردند.

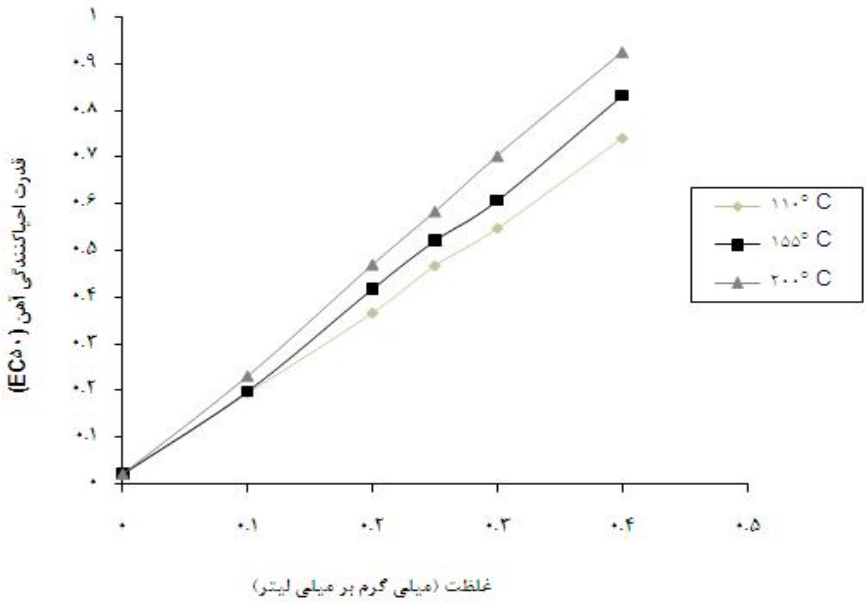
توانایی هیدروژن دهندگی یا رادیکال گیرندگی

بسیاری از آنتی اکسیدان ها با غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد از اکسایش لیپید ها جلوگیری می‌کنند. بنابراین، روش‌هایی توسعه یافته است که در آن‌ها میزان غیر فعال شدن رادیکال‌های آزاد بر اثر حضور ترکیبات آنتی اکسیدانی اندازه گیری می‌شود (Wanasundara and shahidi, 2005). در این روش اثر احیاکنندگی عصاره بر رادیکال پایدار DPPH و تغییر رنگ آن از ارغوانی به زرد در طول موج 516 nm بررسی می‌شود. با افزایش دما میزان قدرت رادیکال گیرندگی عصاره زیاد می‌شود (شکل 4 و 5). غلظتی از عصاره که در آن غلظت، 50 درصد رادیکال آزاد DPPH احیا می‌شود (EC_{50}) به ترتیب برای دماهای 110 ℃، 155 ℃ و 200 ℃ برابر 1/450، 0/784 و 0/685 میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد (جدول 2)؛ EC_{50} پایین‌تر نشان دهنده‌ی قدرت رادیکال گیرندگی بالاتر است. مشابه این نتایج را Rodriguez-

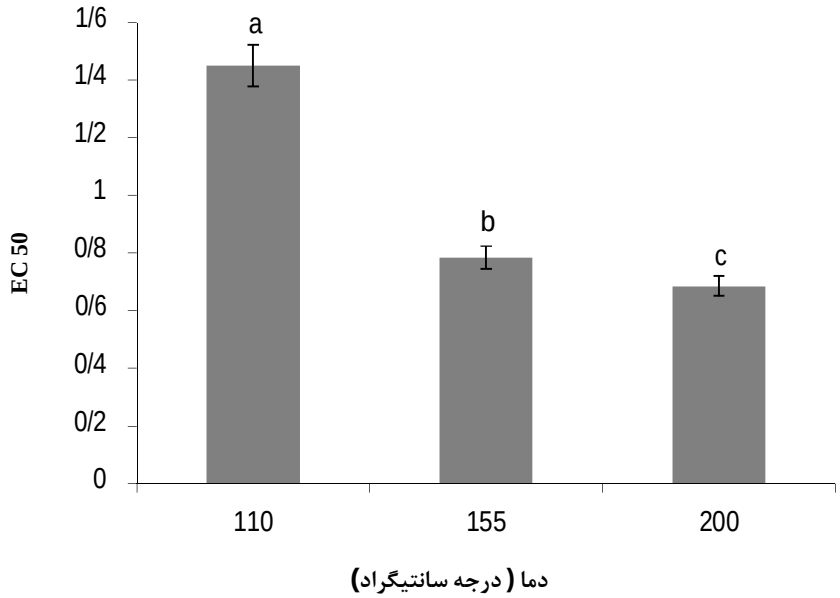
Meizoso و همکاران (2006) گزارش کردند. علت چنین روندی را می‌توان به کاهش ثابت دی الکتریک نسبت داد که موجب افزایش حلالیت ترکیبات آلی و کاهش حلالیت در ترکیبات معدنی و در نتیجه استخراج اجزای خاصی با قدرت مهارکنندگی بالا می‌شوند.



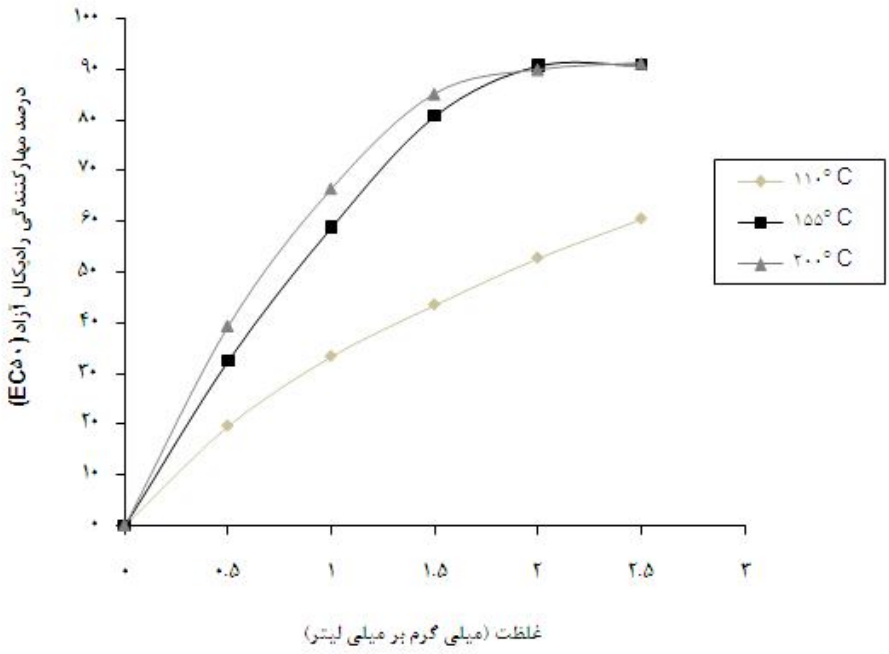
شکل 2- قدرت احیاکنندگی عصاره‌ی مادون بحرانی پوست بنه بر حسب EC_{50} (n= 3) ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند (p<0/05).



شکل 3- نمودار هفت نقطه‌ای قدرت احیاکنندگی عصاره‌ی مادون بحرانی پوست بنه (جذب بیشتر یعنی قدرت احیاکنندگی بیشتر) n=3



شکل 4- قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌ی مادون بحرانی پوست بنه بر حسب EC_{50}(n= 3). ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند (p<0/05).

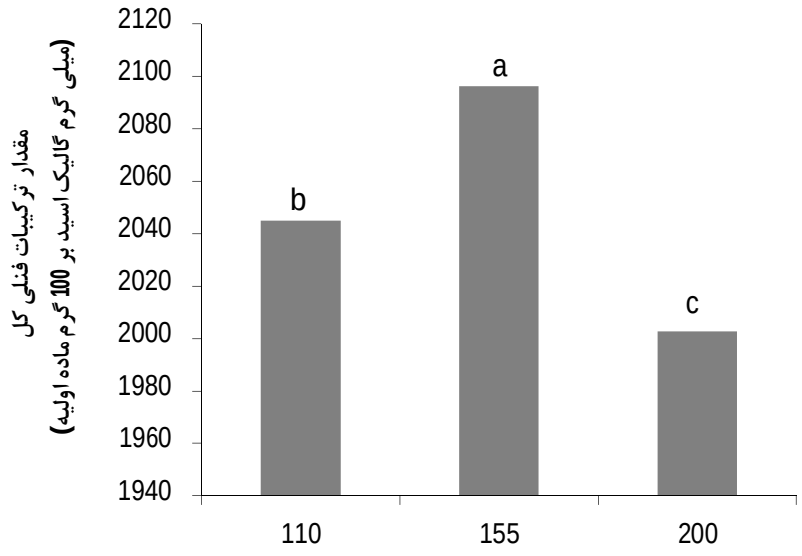


شکل 5- نمودار شش نقطه‌ای درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ی مادون بحرانی پوست بنه n =3

نتایج اندازه گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد با نتایج اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن نسبت مستقیم داشت و عصاره‌های با قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد بیشتر حائز قدرت احیاکنندگی آهن بیشتری نیز بودند. Farhoosh و همکاران (2009)، چنین نتیجه‌ی مشابهی را در مورد روغن پوست بنه بدست آورده بودند.

میزان ترکیبات فنلی

ترکیبات فنلی بیشتر از دیدگاه بروز فعالیت آنتی اکسیدانی مورد توجه قرار می‌گیرند؛ ترکیبات فنلی همچنین دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مهمی در موجودات می‌باشند و ممکن است آثار سودمندی در مبارزه با بیماری‌های مرتبط با تولید رادیکال اکسیژن با غلظت‌های بیش از ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی بدن انسان باشند (Aparicio et al., 1999; Morello et al., 2004). میزان کل ترکیبات فنلی عصاره‌ی بدست آمده از این روش در دماهای 110°C، 155 °C و 200°C به ترتیب 2045/11، 2096/41 و 2002/75 میلی گرم بر حسب اسید گالیک در هر 100 گرم ماده اولیه محاسبه گردید (جدول 2). افزایش دما از 110 °C به 155 °C باعث افزایش میزان ترکیبات پلی فنلی گردیدد (شکل 6).



شکل 6- مقدار ترکیبات فنلی کل. ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند (p<0/05).

افزایش ثابت یونی آب(K_w) در شرایط مادون بحرانی، موجب بهبود استخراج ترکیبات فنلی از میوه‌ها در اثر تجزیه‌ی هیدرولیتیکی شبکه‌ی پلی ساکاریدی– لیگنینی دیواره سلولی می‌شود (Rangsriwong et al., 2009). این در حالی است که افزایش بیشتر دما تا 200 °C موجب کاهش نسبی ترکیبات پلی فنلی شد (p<۰/05)؛ احتمالاً خاصیت انتخابی این روش موجب استخراج ترکیبات فنلی خاص شده، در حالی که بخش دیگری از ترکیبات فنلی موجود را از بین می‌برد و در مجموع میزان ترکیبات فنلی کل کاهش می‌یابد. همچنین به علت افزایش حلالیت مواد و قابلیت نفوذ پذیری آب با افزایش درجه حرارت و فشار بازده استخراج افزایش می‌یابد (Rangsriwong et al., 2009). در دماهای بالاتر ساختار ماده‌ی تحت فرایند، متلاشی شده و در نتیجه کاهش بازده استخراج انتظار می‌رود. همان طوری که در این آزمایش هم مشاهده می‌شود ابتدا تا 155 °C افزایش بازده استخراج را داشتیم؛ در ادامه با افزایش دما تا 200 °C بازده استخراج کاهش می‌یابد(جدول2).

جدول 2- درصد استخراج (٪ ماده خشک)، قدرت احیاکنندگی رادیکال آزاد DPPH (EC_{50})، قدرت احیاکنندگی آهن (EC_{50}) و مقدار کل ترکیبات فنلی

دما	درصد استخراج	EC_{50} [a]	EC_{50} [b]	TPC (mg galic acid/ 100g substance)
110°C	22/18	1/450	0/269	2045/11
155°C	26/67	0/784	0/239	2096/41
200°C	21/33	0/685	0/213	2002/75

[a] EC_{50} (میلی گرم/میلی لیتر): غلظتی که ترکیب آنتی اکسیدانی قادر به مهار کردن 50 درصد از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط است.

[b] EC_{50} (میلی گرم/میلی لیتر) : غلظتی از عصاره که جذب در طول موج 700 nm برابر 0/5 شود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دادند که با افزایش دما تا 200°C میزان قهوه‌ای شدن، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، همچنین قدرت احیا کنندگی آهن عصاره‌ی بدست آمده افزایش یافت؛ ضمن اینکه بالاترین میزان ترکیبات پلی فنلی در 155°C بدست آمد. با توجه به استفاده از آب به عنوان حلال این واکنش، می‌توان از این روش به عنوان فرایندی سبز، ارزان و مناسب جهت استخراج مواد بیولوژیک با فعالیت آنتی اکسیدانی از پوست بنه استفاده نمود. چون که آب در محیط زیست به فراوانی موجود است و همچنین نسبت به حلال‌های شیمیایی مورد استفاده در صنعت بسیار ارزان و بدون هیچ آثار زیست محیطی منفی می‌باشد. برای بدست آوردن نقطه‌ی بهینه‌ی فرایند بایستی از مدل‌های آماری بهینه سازی نظیر روش سطح پاسخ استفاده شود.

منابع

1- حاجی حیدری، د. 1376 . طرح تحقیقاتی استخراج روغن از پسته‌ی وحشی. جهاد دانشگاهی صنعتی اصفهان.

2- کلنگی، ع.1369 . طرح تحقیقاتی روغن کشی از بنه. کمیته فنی جهاد سازندگی فارس.

3- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A. & Gutierrez, F. 1999. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4150-4155.

4- Ayala, R.S. & Luquede Castro, M. D. 2001. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. Food Chemistry, 75: 109–113.

5- Barros, L., Ferreira, M., Queiros, B., Ferreira, I. & Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chemistry, 103: 413–419.

6- Benjakul, S., Lertittikul, W. & Bauer, F. 2005. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system. Food Chemistry, 93(2): 189−196 .

7- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Haro, A., Castellano, R. & Navarro, P. 2010. Development of the maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of maillard-derived compounds. Food Chemistry, 122(1): 145−153.
8- Farhoosh, R., Haddad Khodaparast, M. H. & Sharif, A. 2009. Bene hull oil as a highly stable and antioxidative vegetable oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 111 (12): 1259-1265.
9- He, L., Zhang, X., Xu H., Xu C., Yuan, F., Knez, Z., Novak, Z. & Gao, Y. 2011. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS$^{\bullet+}$ assay. Food and Bioproducts Processing, 90(2): 215-223.
10- Herrero, M., Arraez-Roman, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., & Raggi, M. A.2005. Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. Journal of Chromatography A., 1084(1–2): 54–62.
11- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B. & Brunton, N. P. 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (Rosmarinus officinalis L.), marjoram (Origanum majorana L.) and oregano (Origanum vulgare L.) using response surface methodology. Food Chemistry, 126: 339–346.
12- Miller, D. J. & Hawthorne, S. B. 1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. Analytical Chemistry Journal, 70: 1618–1621.
13- Morales, F. J. & Jimenez-Perez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. Food Chemistry, 72(1): 119−125.
14- Morello, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J. & Romero, M. P. 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. Food chemistry, 85: 357-364.
15- Okuda, T., Yamashita, N., Tanaka, H., Matsukawa, H. & Tanabe, K. 2009. Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrence found in Japanese wastewater treatment plants. Environment International, 35(5): 815–820.
16- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M. D., Ibanez, E. & Herrero, M. 2010. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. Food Research International, 43: 2341-2348.
17- Purlis, E. 2010. Browning development in bakery products-A review. Journal of Food Engineering, 99(3):239-249 99(3): 239−249.
18- Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M. & Shotipruk, A. 2009. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from Terminalia chebula Retz. fruits. Separation and Purification Technology, 66: 51–56.
19- Rodriguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Senorans, F. J., Cifuentes, A. & Ibanez, E. 2010. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from Haematococcus pluviales microalga. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51(2): 456−463.
20- Rodriguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Senorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A.& Ibane, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 1560–1565.
21- Sharif, A., Farhoosh, R., Haddad Khodaparast, M. H. & Tavassoli Kafrani, M. H. 2009. Antioxidant activity of Bene hull oil compared with sesame and rice bran oils during the frying process of sunflower oil. Journal of Food Lipids, 16 (3): 394-406.
22- Singh, R. P., Murthy, K. N. C. & Jayaprakasha, G. K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 81–86.
23- Siriwong, W., Thirakhupt, K., Sitticharoenchai, D., Rohitrattana, J., Thongkongowm, P. & Borjan, M. 2009. DDT and derivatives in indicator species of the aquatic food web of Rangsit agricultural area, Central Thailand. Ecological Indicators, 9(5): 878–882
24- Wanasundara, P. K. & shahidi, F. 2005. Antioxidants: science, technology, and pplications. In Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi F. (Eds). John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

25- Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Mamot, S. & Osman, H. 2009. An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (Curcuma domestica) using pressurised liquid extraction (PLE). LWT – Food Science and Technology, 42(1): 233–238.

Evaluation of bene hull extraction antioxidant activity by superheated water method

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

1- MSc. Student, Department Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
*Corresponding author (r.shaddel@gmail.com)
2- Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture College, Ferdowsi University of Mashhad
3- Assistant Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology
4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
5- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, University of Tabriz

Abstract

In the present research, the power of antioxidant activity in Bene Hull subspecies (*Mutica)* extract was discussed using subcritical water technique, at 110,155 and 200°C temperatures with 45 minutes of constant time and the ratio of 1:30 for Bene hull to water. The dependent variables of this study were measured based on Melanoidic impact extent, the power of resuscitating ferrous (Mg/Ml) the extent of controlling DPPH free radicals (Mg/ Ml) and total amount of phenolic compounds (Mg of Gallic Acid/ 100 G of material). The study revealed that at 200°C the Melanoidic impact extent, the power of resuscitating ferrous (Mg/Ml) the extent of controlling DPPH free radicals (Mg/ Ml) were at the maximum; meanwhile total Phenolic content was highest at 155°C. Under this circumstance, the amount of polyphenolic contents, reduction power according to EC_{50} and DPPH free radical scavenging activity according to EC_{50} were predicted to be 2096.41 mg Gallic acid / 100 g Bene hull, 0.213 mg /ml and 0.685 mg/ ml, respectively. The results proved that subcritical water extraction method was suitable to obtain biological materials out of Bene hull. Intense extraction yield, abundant solvent, cheap and non environmental issues are its benefits.

Key words: Bene hull; Melanoides; Phenolic compounds; Subcritical water