نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۶ ص.۲۸۱-۲۷۳

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 2, June. July. 2017, p. 273- 281

مقایسه تاثیر زمان و روش استخراج بر مقدار ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی پوست سبز گردوی مناطق مختلف شمال ایران

محمد دولت‌آبادی[۱]- زینب رفتنی امیری[۲*]- رضا اسماعیل‌زاده‌کناری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۷

چکیده

در این پژوهش، تاثیر سه منطقه شاهرود، بندر گز و هزار جریب از شمال ایران و سه روش استخراج غرقابی، ماکروویو و اولتراسوند در چهار زمان مختلف استخراج بر میزان ترکیبات فنولی استخراجی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست سبز گردو با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.برای تعیین معنی‌داربودن تاثیر هر یک از فاکتورها به تنهایی و اثر متقابل آن ها، داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و سپس میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال($P<0/05$) مقایسه گردیدند. محتوای فنل کل عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو تعیین شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از سنجش قدرت احیاکنندگی آهن III و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی همراه با بالاترین مقدار ترکیبات فنولی با ۹۳/۳۰ میلی‌گرم بر حسب اسید گالیگ در گرم پوست سبز گردو مربوط به روش استخراج اولتراسوند در منطقه هزارجریب بود. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، بهترین منطقه، زمان و روش استخراج به ترتیب، هزارجریب، ۳۰ دقیقه با اولتراسوند شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: پوست سبز گردو، ترکیبات فنولی، غرقابی، ماکروویو ، اولتراسوند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

گردو متعلق به رده نهان دانگان، زیر رده دولپه‌ای‌ها وراسته Amentales و خانواده Juglandaceae و جنس *Juglans* می‌باشد. تمام قسمت‌های گردو از جمله پوست سبزآن حاوی ترکیب‌های دارویی زیادی بوده و اثر مفیدی بر سلامت انسان دارد.تفاوت مناطق رشد گردو می‌تواند در مقدار ترکیبات فنولی استخراجی موثر باشد. Labuckas و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی مقدار ترکیبات فنولی واریته‌های مختلف گردو، ذخیره ترکیبات فنولی را با ژنوتیپ گیاه و زمان برداشت و شرایط آب‌وهوایی محل رشد آن‌ها مرتبط یافتند. از محصولات عمده ضایعات تولید گردو، پوست سبز آن است، که امروزه استفاده کمی دارد، پتانسیل این مواد طبیعی کم‌هزینه، به‌عنوان منبعی از ترکیبات فنلی، با فعالیت‌های ضدرادیکالی و ضدمیکروبی شناخته شده است (Pereira *et al*, 2007). برای تحقیق خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان، اساسی‌ترین مرحله، استخراج و تهیه عصاره می‌باشد.تکنیک‌های قدیمی استخراج با حلال از جمله روش غرقابی، نیاز به زمان، مصرف حلال و نیروی کار بیشتری دارد. بنابراین توسعه و استفاده از تکنیک‌های جدید استخراج، برای کاهش زمان استخراج، مصرف کمترحلال وآلودگی آن و افزایش میزان استخراج ترکیبات ضروری می‌باشد (Fernandez *et al*, 2013). در سال‌های اخیر استفاده از امواج مایکروویو در استخراج، نتایج ارزنده‌ای را ارائه داده است، این روش باعث افزایش بازده استخراج در زمان کوتاه‌تر با مصرف کمتر حلال شده است (Mandal *et al*, 2007). مایکروویو امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگاهرتز ایجاد کرده و با جذب این امواج توسط نمونه موجب تولید گرما درون آن شده و در نهایت با عث تخریب دیواره سلولی و رهایی ترکیبات درون سلولی می‌شود (Wang *et al*, 2006). استفاده از مایکروویو ساختار داخلی سلول را تحت تاثیر گذاشته وبا استفاده از گرمادهی بالا موجب تسریع در فرآیند آبگیری می‌شود که این پدیده، سرعت انتقال جرم را از دیواره سلول افزایش داده و ترکیبات درون سلولی با سرعت بیشتر به خارج سلول انتقال می‌یابند (Chemat *et al*, 2005). یکی دیگر از روش‌های سریع استخراج روش اولتراسوند است. روش‌استخراج به کمک امواج اولتراسوند، یکی از ارزان‌ترین، ساده‌ترین و مؤثرترین روش‌ها است که قادر است بازده استخراج ترکیبات را افزایش داده و

۱، ۲ و۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(* - نویسنده مسئول: Email: zramiri@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.46320

زمان استخراج را کاهش دهد، در نتیجه بازده فراوری را بیشتر کند (Chen *et al*, 2010). امواج صوتی که فرکانس‌های بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز دارند، در یک ماده جامد، مایع و گاز نوسان ایجاد می‌کنند. برخلاف امواج الکترومغناطیسی، امواج صوتی در یک ماده پخش شده و در طی پخش شدن دارای چرخه‌های انقباضی و انبساطی در محیط می‌باشند. انبساط باعث افزایش فاصله بین ملکولی شده و انقباض، حباب هایی را در یک مایع ایجاد کرده و فشار منفی تولید می‌کند. و در نهایت، متلاشی شدن این حباب‌ها باعث ایجاد پدیده کاویتاسیون می‌شود. تأثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث آسیب دیدن دیواره سلولی و نفوذ بیشتر حلال به درون سلول شده و انتقال جرم را بهبود می‌بخشد. فرایندی که در طی زمان استخراج توسط امواج اولتراسوند در محیط استخراج صورت می‌گیرد باعث تسهیل و آزادسازی محتوای درون‌سلولی می‌شود(Vilkha *et al*, 2008). علاوه بر روش استخراج، نوع حلال بکارگیری شده در استخراج ترکیبات فنولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است دراین خصوص Olivera (۲۰۰۸) تاثیر حلال‌های مختلف در استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. حلال‌های استفاده شده با میزان قطبیت متفاوت شامل:آب ، اتانول و مخلوط آب با اتانول به نسبت (۱:۱) بوده است. نتایج نشان داد،در بین حلال‌های انتخابی، حلال آب– اتانول دارای بازده استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود.همچنین مدت زمانی که برای استخراج ترکیبات فنولی در نظر گرفته می‌شود حائز اهمیت می‌باشد بطوری که با افزایش زمان می‌توان میزان ترکیبات فنولی استخراجی درعصاره را افزایش داد. البته میزان افزایش زمان دارای محدودیت بوده و در روش‌های مختلف استخراج متفاوت می‌باشد. Spigno و همکاران (۲۰۰۹) دلیل افزایش ترکیبات فنولی با افزایش زمان استخراج را این گونه توجیه می‌کنند که، با گذشت زمان، حلال فرصت پیدا می‌کند که به درون بافت گیاهی نفوذ کرده و همچنین ترکیبات فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال را دارند.

هدف از این پژوهش تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات فنولی استخراجی شده و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از پوست سبز گردوی سه منطقه شاهرود، بندر گز و هزارجریب در شمال ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

معرف فولین سیوکالتیو، فری سیانید آهن، تری کلرو استیک اسید، کلرید آهن و الکل اتانول ۹۶٪ ساخت شرکت مرک آلمان تهیه شده از نمایندگی آن در ایران مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌برداری

با انتخاب تصادفی چند درخت گردو در یکی از باغ‌های هر منطقه،و جمع‌آوری گردو از این درختان بصورت دستچین، بدون هیچگونه آسیبی به پوست سبز آن، به‌صورت کاملا تصادفی انجام شد. هرس و استفاده از آفت‌کش شیمیایی برای درختان گردو در این مناطق مرسوم نمی‌باشد. با توجه به شرایط آب‌وهوای حاکم بر هریک از سه منطقه انتخابی، زمان برداشت گردو متفاوت است. برداشت در منطقه بندرگز دراول مهر ماه، منطقه شاهرود در۱۵مهر ماه ومنطقه هزارجریب در ۲۵ مهر ماه سال ۱۳۹۲ انجام شد.

آماده‌سازی نمونه برای استخراج ترکیبات فنولی

پس از جمع‌آوری گردوها پوست سبز آن جدا ودر دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پوست‌های سبز گردو قبل از یخزدایی توسط آسیاب خرد شد و بلافاصله ترکیبات فنولی آن با استفاده از حلال اتانول- آب (به نسبت۱:۱) استخراج شد.

استخراج ترکیب‌های فنولی

استخراج غرقابی

استخراج ترکیبات فنلی با استفاده از روش Fernandez و همکاران (۲۰۱۳) با کمی تغییرات انجام شد. بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردوی این مناطق در تحقیق انجام شده توسط دولت‌آبادی و همکاران (۱۳۹۳)، اتانول-آب به نسبت (۱:۱) تعیین شده بود. پس از آماده‌سازی جهت بهتر قرار گرفتن حلال در مجاورت ماتریکس نمونه از همزن مغناطیسی با دور۶۰ دور در دقیقه درمدت زمان‌های ۶، ۱۲، ۱۸ و۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

استخراج به‌کمک امواج ماکرویو

استخراج ترکیبات فنلی به روش ماکروویو با استفاده از روش Chemat وهمکاران(۲۰۰۵) با کمی تغییرات انجام شد. استخراج با دستگاه ماکروویو در مدت زمان‌های ۲، ۴، ۶ و۸ دقیقه انجام شد. از آنجایی که کنترل دما در این دستگاه امکان‌پذیر نبود، برای جلوگیری از افزایش دما، تبخیر حلال اتانول و همچنین اثر سوی افزایش دما بر ترکیبات فنولی، در مراحل (۴ ، ۶ و۸ دقیقه)، به ازای هر دو دقیقه نمونه از دستگاه خارج شده و پس از سرد شدن تا دمای۲۵ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد ادامه استخراج برای زمان باقی مانده انجام شد.

استخراج به‌کمک امواج اولتراسوند

استخراج ترکیبات فنلی به‌روش امواج اولتراسوند با استفاده از روش Sotillo وهمکاران (۱۹۹۴) انجام شد. استخراج به کمک حمام

اولترا سوند (مدل S30H ساخت کشور آلمان) با فرکانس ۵۰ الی ۶۰ کیلو هرتز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و۴۰ دقیقه انجام شد و برای جلوگیری از افزایش دمای از گردش آب سرد درمدت زمان استخراج استفاده شد. پس از پایان زمان استخراج در هریک از روش‌ها، عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. برای جداسازی حلال اتانول از تبخیرکننده چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنلی عصاره پوست سبزگردو با استفاده از معرف فولین‌سیوکالتیو و قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis ۲۱۰۰)، مطابق روش Siddhuraju و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد.

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال های آزاد DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH به روشLi و همکاران(۲۰۰۵)، با قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis ۲۱۰۰) انجام شد. آنگاه درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

(۱) (درصد جذب شاهد/(درصد جذب شاهد− درصد جذب نمونه))= **درصد مهار رادیکال های**DPPH

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش قدرت احیاکنندگی آهن III

اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی با استفاده از روش بکار گرفته توسط Arabshahi و همکاران(۲۰۰۷)، با قرائت جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis ۲۱۰۰) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو با استفاده از آزمایش فاکتوریل (۴×۳×۳) در قالب طرح کاملا تصادفی و سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. فاکتورها، زمان استخراج در چهار سطح، روش استخراج در سه سطح غرقابی، اولتراسوند و ماکروویو و منطقه در سه سطح از شمال ایران بود. برای تعیین معنی‌دار بودن هر یک از فاکتورهای منطقه، زمان و روش استخراج به تنهایی و اثر متقابل آن‌ها بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی از جدول تجزیه واریانس در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۹۵٪، با استفاده از نرم‌افزار SPSS – 19 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

استخراج ترکیبات فنولی به روش‌های غرقابی، ماکروویو و اولتراسوند

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها ، نشان داد فاکتورهای منطقه، زمان و روش استخراج هریک به تنهایی واثر متقابل زمان× روش استخراج اثر معنی‌داری بر مقدار استخراج ترکیبات فنولی داشته ولی اثر متقابل زمان× منطقه و منطقه× روش استخراج اثر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فنولی ندارد ($P<0/05$).

در شکل ۱ مشاهده می‌شود در بین روش‌های انتخابی بالاترین مقدار ترکیبات فنولی در روش استخراج به کمک امواج اولتراسوند با میانگین استخراج ۶۱/۴۳ میلی‌گرم ترکیبات فنولی برحسب اسید گالیک در گرم پوست سبز گردو می‌باشد بعد از آن روش ماکروویو با میانگین استخراج ۵۳/۰۳ در رتبه دوم وسپس روش غرقابی با میانگین استخراج ۳۲/۹۰ در رتبه سوم قرار گرفته است. این نتایج با گزارش Sutivisedsak و همکاران(۲۰۱۰) در مورد لوبیا، Proestos و همکاران(۲۰۰۸)در مورد رزماری و پونه کوهی، Lujan و همکاران(۲۰۰۶) در مورد برگ زیتون، Pan و همکاران(۲۰۰۳) در مورد برگ سبز چای مطابقت دارد. دما و فشار متمرکز می‌تواند در ماکروویو منجر به مهاجرت انتخابی سریع‌تر ترکیبات هدف از ماتریکس به محیط احاطه‌کننده و بازدهی بهتر استخراج نسبت به روش غرقابی گردد. در تحقیقی که توسط رضایی ارمی و همکاران (۱۳۹۲) در مورد برگ درخت گردو انجام شد، کل ترکیبات فنلی در روش غرقابی در حلال آب− اتانول (نسبت ۱:۱) در زمان ۲۴ ساعت ۸۴/۸۷ ودر روش ماکروویو در زمان ۸ دقیقه ۵۴/ ۹۵ میلی‌گرم بر گرم برگ خشک برحسب اسید گالیگ گزارش شد. نتایج مشابهی توسط Goliو همکاران (۲۰۰۵) بر روی پوست پسته و محققی ثمرین و همکاران (۱۳۹۰) بر روی پوست سیب‌زمینی رقم راموس گزارش شده است. به‌منظور استخراج ترکیبات، غشاء سلول‌ها باید شکسته شود. حباب‌های ایجاد شده توسط امواج اولتراسوند، نیروهای برشی را ایجاد می‌کند که دیواره‌های سلول را بطورمکانیکی می‌شکند و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد. اولتراسوند همچنین سبب کاهش اندازه ذرات شده و سطح تماس را افزایش می‌دهد و در نتیجه انتشار حلال دربافت افزایش می‌یابد. راندمان عصاره‌گیری باروش غرقابی تقریباً۵۰٪ روش اولتراسوند با صرف زمان خیلی بیشتر بوده است، بنابراین روش اولتراسوند به‌دلیل کاستن قابل توجه زمان عصاره‌گیری و افزایش کارایی نسبت به‌روش غرقابی ارجح است.

شکل ۱- میانگین مقدار فنول کل حاصل از روش‌های مختلف استخراج

تاثیر منطقه بر میزان استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو

میانگین مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست سبز گردوی سه منطقه در شکل ۲ نشان می‌دهد که بالاترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به منطقه هزار جریب است. احتمالا، منطقه جغرافیایی، شرایط آب‌وهوایی و زمان برداشت گردوهای مورد مطالعه از عوامل موثر بر تفاوت میزان استخراج ترکیبات فنولی نمونه‌ها است. در تحقیقی که Olivera و همکاران (۲۰۰۸) بر روی پوست سبز گردو پنج واریته فرانکوت، مایته، ماربوت، ملانایز و پاریزن انجام دادند، مقدار فنول کل عصاره آبی از ۳۲/۶۱ تا ۷۴/۰۸ میلی‌گرم اسید گالیک برگرم متغیر بود و دلیل این تغییرات را تاثیر واریته و عوامل دیگری از جمله فصل برداشت، شرایط جوی و منطقه جغرافیایی دانستند. Labuckas و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی ترکیبات فنولی واریته‌های مختلف گردو، تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی را به تفاوت ژنوتیپ آن‌ها و زمان برداشت و شرایط آب‌وهوایی محل رشد این گیاهان نسبت دادند.

تاثیر زمان استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو

در جدول ۱ تاثیر زمان استخراج در هریک از روش‌ها به تفکیک مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهد با افزایش زمان استخراج در هر یک از روش‌های غرقابی و ماکروویو میزان استخراج ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد بطوری که بالاترین میزان استخراج فنول کل در ۲۴ ساعت و در روش ماکروویو در ۸ دقیقه می‌باشد. Spigno و همکاران (۲۰۰۹) اثر زمان را روی غلظت ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی تفاله انگور بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند، زمان و حرارت در استخراج، از پارامترهای مهمی برای بهینه‌سازی کاهش مصرف انرژی فرایند است. با گذشت زمان، حلال فرصت نفوذ به درون بافت گیاهی را داشته و ترکیبات فنولی نیز فرصت کافی برای جدا شدن از ماتریکس و ورود به حلال را دارند. اما در روش اولتراسوند مشاهده می‌شود که میزان ترکیبات فنولی استخراج شده با افزایش زمان تا ۳۰ دقیقه، افزایش و سپس با افزایش بیشتر زمان تا ۴۰ دقیقه، کاهش می‌یابد. مشابه با گزارش محققی ثمرین و همکاران (۱۳۹۰) در فرایند استخراج ترکیبات فنولی با روش اولتراسوند، افزایش بیش از حد زمان استخراج، باعث از دست رفتن مقدار بیشتری از ترکیبات فنولی می‌شود.

اثر متقابل زمان× روش استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو

در شکل ۳ تاثیر افزایش زمان بر میزان استخراج ترکیبات فنولی در هریک از سه روش استخراج را به تفکیک نشان می‌دهد. در دو روش غرقابی و ماکروویو تاثیر متقابل زمان× روش استخراج در چهار زمان انتخابی براساس مقدار ترکیبات فنولی صعودی بوده و در روش استخراج اولتراسوند این تاثیر تا زمان ۳۰ دقیقه صعودی و بعد از آن

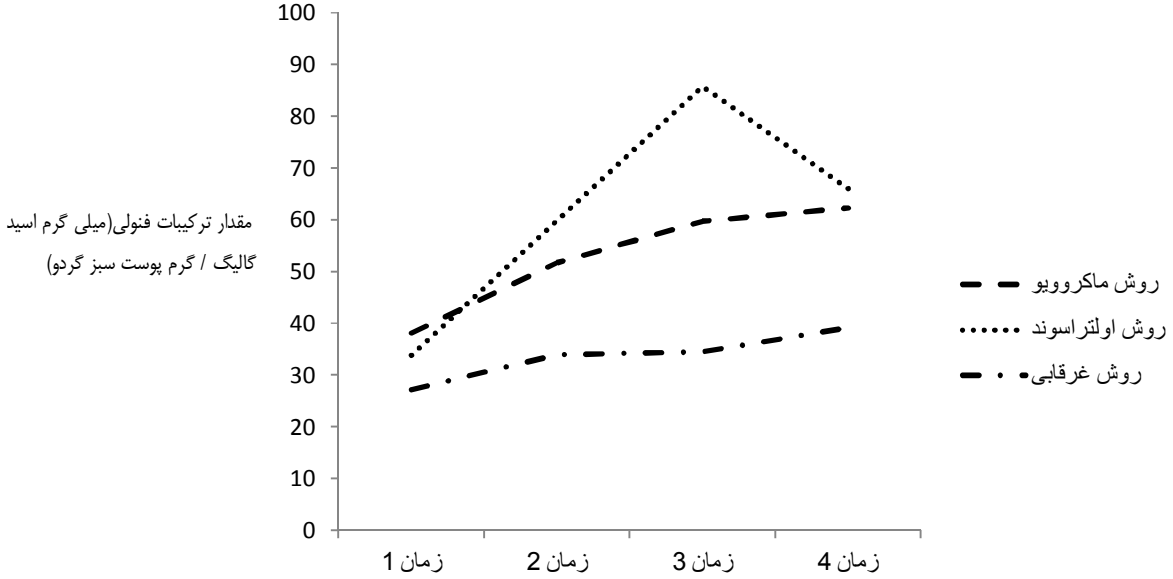
تا ۴۰ دقیقه نزولی می‌باشد

شکل۲ - میانگین مقدار فنول کل پوست سبز گردو ی مناطق شمال ایران

جدول ۱- مقدار فنول استخراجی با روش‌های غرقابی، ماکروویو و اولتراسوند در زمان‌های مختلف

زمان[1]	مقدار فنول (میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم پوست سبز گردو)			
	۱	۲	۳	٤
اولتراسوند	۳۳/۸۶[d]	۵۹/۹۳[c]	۸۵/۸۲[a]	۶۶/۱۰[b]
ماکروویو	۳۸/۱۳[d]	۵۱/۸۱[c]	۵۹/۸۱[b]	۶۲/۳۸[a]
غرقابی	۲۷/۱۸[d]	۳۴/۰۳[c]	۳۴/۵۳[b]	۳۹/۱۷[a]

زمان های ۱، ۲، ۳ و۴ در روش غرقابی به ترتیب ۶، ۱۲، ۱۸ و۲۴ ساعت و در روش ماکروویو ۲، ۴، ۶ و ۸دقیقه و در روش اولتراسوند ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه است.



شکل۳ -اثر متقابل زمان× روش استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو

خواص آنتی‌اکسیدانی

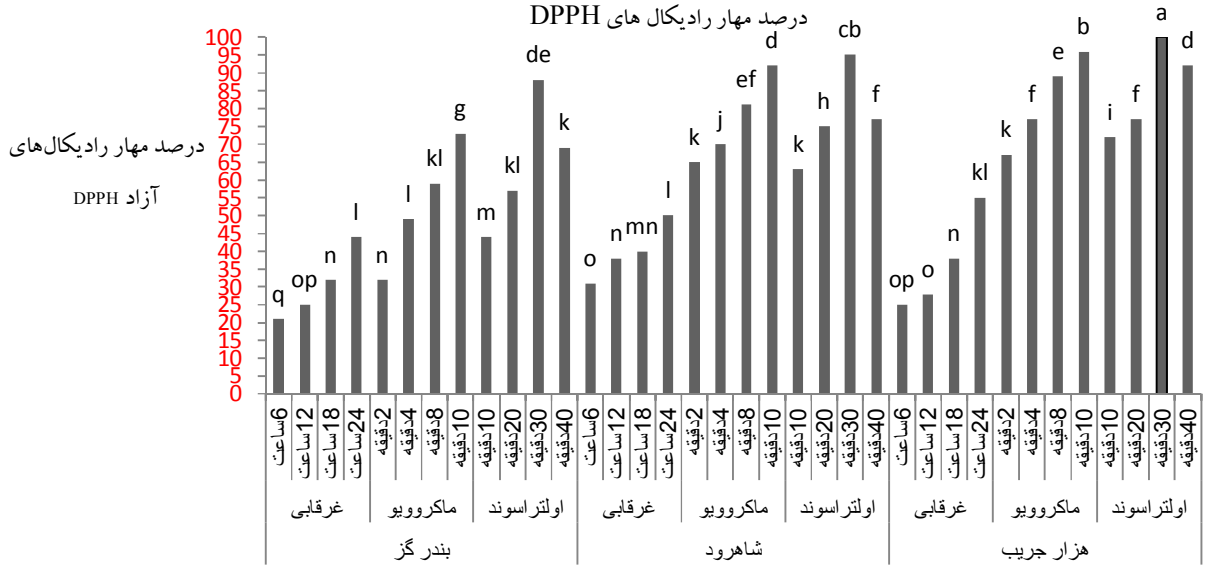
مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

با توجه به شکل ۴ بیشترین مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به مقدار ۱۰۰٪ متعلق به روش استخراج اولتراسوند حاصل از پوست سبز گردوی منطقه هزار جریب درزمان ۳۰ دقیقه می‌باشد. بیشترین غلظت ترکیبات فنولی نیز مربوط به همین عصاره بوده است. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش می‌یابد، زیرا در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال‌های آزاد DPPH و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sun *et al*, 2007).

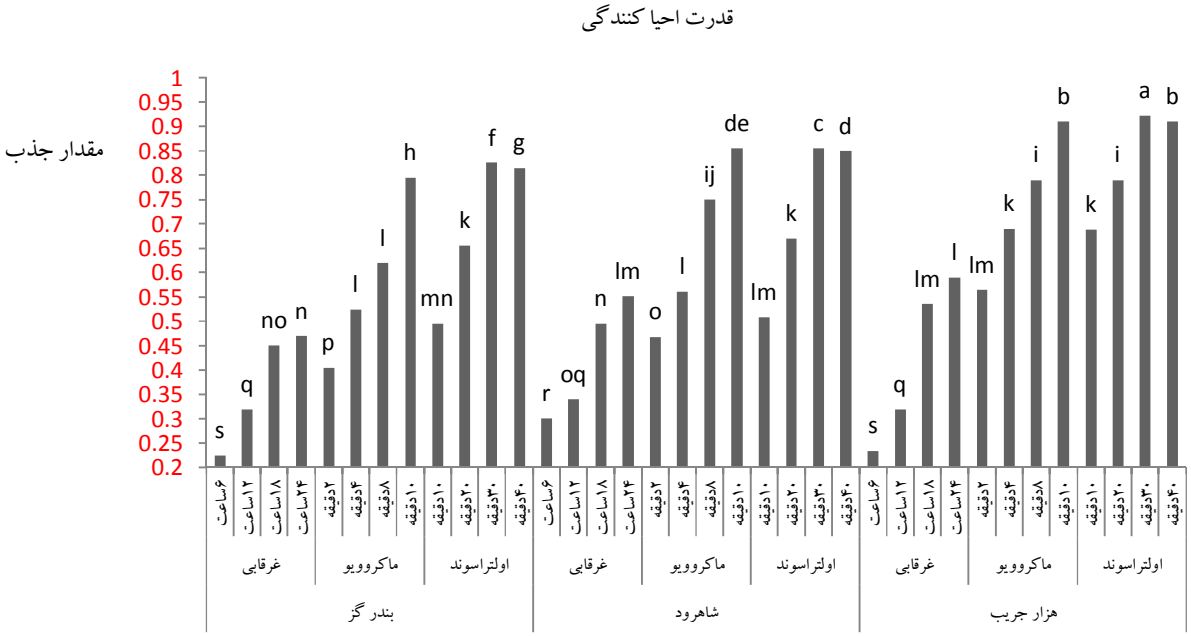
در مطالعه Fernandez و همکاران(۲۰۱۳) بر روی پوست سبز گردو نشان دادند بالاترین مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مربوط به عصاره‌های استخراجی توسط حلال ۵۰٪ اتانول بود که حاوی بیشترین ترکیبات فنلی بوده است. Olivera و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر روی پوست سبز پنج رقم گردوی مختلف نیز نتیجه گرفتند که بالاترین مهار رادیکال‌های آزاد DPPH متعلق به عصاره‌ی پوست سبز گردوی گونه Franquette با مقدار فنول کل ۷۸/۰۸ (میلی‌گرم اسید گالیگ در گرم پوست سبز گردو) بود که دارای بالاترین مقدار ترکیبات فنولی در بین پنج رقم گردو بوده است.

قدرت احیاکنندگی یون آهنIII

با توجه به شکل۵ بیشترین مقدار قدرت احیاکنندگی مربوط به عصاره بدست آمده از روش استخراج اولتراسوند حاصل از پوست سبز گردوی منطقه هزار جریب در زمان ۳۰ دقیقه بوده که دارای بیشترین غلظت ترکیبات فنولی است. بر اساس یافته‌های این تحقیق، نمونه‌های حاوی ترکیبات فنولی بالاتر، قدرت احیاکنندگی بالاتری هم داشته‌اند. ترکیبات فنولی عصاره می‌توانند با اهدای الکترون یا اتم‌های هیدورژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را، شکسته و اکسایش را به تاخیر اندازد، وجود عوامل احیاکننده عامل اصلی قدرت احیاکنندگی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از طریق شکستن واکنش زنجیری رادیکال آزاد انجام می‌دهند (Kumaran *et al*, 2007). Pereira و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی نیروی احیاکنندگی عصاره آبی شش رقم مختلف برگ گردو (لارا، پارزین، ملانایز، فرانکوت، مایته و ماربوت) گزارش کردند که قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت ترکیبات فنولی موجود در عصاره می‌باشدکه مطابق با نتایج این پژوهش بوده است.



شکل٤ - میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره‌های استخراجی پوست سبز گردوی سه منطقه شاهرود، بندر گز و هزار جریب در زمان‌های وروش‌های مختلف استخراج (با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)



شکل۵- مقدار جذب عصاره‌های حاصل از پوست سبز گردوی سه منطقه در زمان‌ها و روش‌های مختلف استخراج (غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که پوست سبز گردو حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی با قدرت آنتی‌اکسیدانی است که استخراج با روش اولتراسوند علاوه بر صرفه‌جویی در زمان استخراج، در مقدار استخراج ترکیبات فنولی نسبت به دو روش دیگر استخراج مورد مطالعه غرقابی، ماکروویو برتری داشته است. در استخراج ترکیبات فنلی، با افزایش زمان استخراج، فرصت بیشتری برای خروج این ترکیبات فراهم شده و مقدار استخراج فنل کل در عصاره افزایش می‌یابد و با افزایش میزان ترکیبات فنولی خواص آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق پوست سبز گردوی مناطق مرتفع و کوهستانی (هزار جریب) مقدار فنول و خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به منطقه معتدل (بندرگز) و منطقه نیمه خشک (شاهرود) داشته است که احتمالا عامل آب‌وهوا به‌عنوان فاکتور تاثیرگذار می‌تواند در تحقیقات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

دولت‌آبادی، م.، رفتنی‌امیری، ز. و اسماعیل‌زاده‌کناری، ر.، ۱۳۹۳، مقایسه فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی پوست سبز گردوی سه منطقه از شمال ایران (شاهرود، بندرگز و هزارجریب)، فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، ۴۵، ۱۹۳-۱۸۲.

رضایی ارمی، س.، جعفری، م.، خمیری، م. و بیات، ه.، ۱۳۹۲، استخراج عصاره برگ گردوی بومی ایران با امواج مایکروویو و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فنولی حاصل، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۹، ۸۹۸-۸۷۹.

محققی ثمرین، آ.، پورآذرنگ، ه.، الهامی‌راد، ا.، دزاشیبی، ز. و همت‌یار، ن.، ۱۳۹۰، استخراج ترکیبات فنولیک پوست سیب‌زمینی راموس با دو روش پرکولاسیون و اولتراسوند و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آن در روغن سویا، فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، ۸، ۹۱-۸۱.

Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4), 1233-1240.

Chemat, S., Ait-Amar, H., Lagha, A. and Esveld, D.C. 2005. Microwave-assisted extraction kinetics ofterpenes from caraway seeds. *Chemical Engineering and Processing*, 44(12), 1320-26.

Chen, X.P., Wang, W.X., Li, S.B., Xue, J.L., Fan, L.J., and Sheng, Z.J. 2010. Optimization of ultrasound-assisted

extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 80, 944–948.

Fernandez- Agullo, A., Pereira, E., Freirea, M. S., Valentao, Andrade, P. B., Gonzalez-Alvareza, and Pereira, J. A. 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglans regia L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126– 132.

Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia Vera) hull extracts. *Food Chemistry*, 92, 521–525.

Kumaran, A. and Karunakaran, R.J. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of fivePhyllanthus species from India. LWT- *Food Science and Technology*, 40, 344-352.

Labuckas, D. O., Maestri, D. M., Perell, M., Martnez, M. L., and Lamarque, A. L. 2008. Phenolics from walnut (Juglans regia L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*, 107(2), 607-612.

Li, J.W., Ding, S.D. and Ding, X.L. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from fivecultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40(11), 3607-3613.

Lujan, R. J., R. J., Rodriguez. And Castro, M. D. L. 2006. Multivariate optimization of the microwaveassistedextraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Analytical andBioanalytical Chemistry*, 385(4), 753-759.

Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S. 2007. Microwave Assisted extraction- An innovative andpromising extraction tool for medicinal plant research. *Food Chemistry*, 92, 144-151.

Oliveira, I., Sousa, A.,Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L. and Pereira, J.A. 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2326-2331

Pan, X., Niu, G. and Liu, H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine fromgreen tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42(2), 129-133.

Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valento, P., Andrade, P. B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and Estevinho, L. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 45(11), 2287-2295.

Proestos, C. and Komaitis, M. 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction ofplant phenolic compounds. LWT-Food Science and Technology, 41(4), 652-659.

Sotillo. R. D, Hadley. M and Holm. E. T. 1994. Potato peel waste: Stability and antioxidant activity of a Freeze-DriedExtract. *J. Food Sci*., 59(5), 1031-1033.

Siddhuraju, P., Mohan, P. S. and Becker, K. 2002. Studies in the antioxidant activity of Indian laburnum (Cassia fistula L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79(2), 61–67.

Spigno, G. and De Faveri, D.M. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenologicalstudy. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 210-217.

Sutivisedsak, N., Cheng, H.N., Willett, J.L., Lesch, W.C., Tangsrud, R.R. and Biswas, A. 2010. Microwaveassistedextraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Research International*, 43(2), 516-519.

Sun, T., powers M.R. and Tang, J. 2007.Evalurion of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. Food Chemistry, 105(1), 101-106.

Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R. and Colaric, M. 2006. Traditinal walnut ligueur-cocktail of phenolics. *Food Chemistry*, 95(4), 627-631.

Vilkha, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ltrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161-169.

Wang, L. and Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol*,, 17, 300-312.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 2, June. July. 2017, p. 273- 281

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۶ ص.۲۸۱-۲۷۳

Comparison of the effect of time and extraction methods on the phenolic compounds and antioxidant properties of walnut green husk of different regions of northern Iran

M. Dolat abadi[1], Z. Raftani Amiri[2*], R. Esmailzadeh Kenari[3]

Received: 2015.04.27
Accepted: 2015.08.08

Introduction: In recent years, much attention has been focused on agricultural wastes especially those containing phenolic compounds with natural antioxidant properties. One of these sources is the green husks of walnuts. The contents of phenolic compounds of plants are influenced under various factors including genetic factors, agricultural varieties and the species, climate and extraction procedures. Extraction is the first step for researchers who work on plants. Traditional extraction techniques with solvent such as water have disadvantages such as time consuming process, solvent consumption and high labor work. So the need to develop and use new extraction techniques, including combination of ultrasound bath and microwave devices, has provided valuable results. This method increases the mass transfer rate of the cell wall and intracellular compounds more rapidly transported out of the cell. In the ultrasound method to create cavitation in the extraction process and with collapse of bubbles and mechanical effects on the cell wall and most influential into the cell solvent improves the mass transfer. Extraction process performed by ultrasound process was used to facilitate the release of the intracellular content. These two methods can increase extraction efficiency within a shorter time and using less solvent, increasing the amount of extracted compounds are less damaging to the environment. Three different weather conditions for walnut production in northern Iran and different methods for extraction and measurement of phenolic compounds were adapted to find the best area and the most efficient extraction method.

Materials and methods: Three areas were selected from north parts of Iran including Bandar Gaz with mild climate, Shahrood with semi-arid climate and Hezarjerib region with mountainous climate located in the Alborz Mountain chains in which walnut is one of their major products. Walnuts randomly were picked by hand without any damage to their husks from a few walnut trees in a random garden in each region. The selected walnut trees were almost similar and were about 35 to 40 years old. In the selected areas, it is not conventional to use pesticides or chemicals and toppings for walnut trees. Walnuts collected were transported to the lab in cold conditions (8 to 10° C) and after cleaning the walnuts, green husks were separated and kept at -18 °C. Solvent extraction of phenolic compounds was carried out by choosing ethanol - water in a ratio of (1-1) by soaking, ultrasound and microwave methods at different times. The amount of phenolic compounds was measured using a spectrophotometer device with the aid of using the Folin Ciocalteau reagent, and antioxidant properties were measured using DPPH free radical scavenging and regenerative power of Iron III.

Results and discussion: This research was carried out on a factorial design (3×3×4) with three replications with Duncan's test for comparison of averages at the 95% confidence level. Comparing the extraction methods (soaking, microwave and ultrasound) showed that the most efficient method was ultrasound method at 30 minutes and the highest phenolic compounds in walnut green husk was for Hezarjerib area. In addition to the savings in time of extraction and safety in this method, the extraction of phenolic compounds is preferred to the other two methods. The results showed that the antioxidant properties were increased with increase in the amount of phenolic compounds. The results of this study also revealed that the walnuts green husks from Hezarjerib had the highest antioxidant properties followed by temperate region (Bandargaz) and semi-arid region (Shahrood).

Keywords: Antioxidant property, Immersion, Microwave, Phenolic compounds, Ultrasound, Walnut green husks

1, 2 and 3. M. Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran
(*Corresponding Author Email: zramiri@gmail.com)