

بررسی اثر تلقیح ترکیبات استخراجی توسط آب مادون بحرانی از پوست پسته جهت افزایش پایداری روغن سویا

مرتضی محمدی^۱، محمد قربانی^۲، عادل بیگ بابایی^۳، سمیرا یگانه زاد^۴، علیرضا صادقی ماهونک^۵

- ۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- ۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیکی: moghorbani@yahoo.com
- ۳- استادیار گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- ۴- استادیار گروه فراوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- ۵- دانشیار گروه شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۴

چکیده

سابقه و هدف: امروزه با توجه به این که سالیانه حجم زیادی از ضایعات محصولات کشاورزی در بخش‌های مختلف صنعت و کشاورزی تولید می‌شود و بخش عمده‌ای از این ضایعات بدون هیچ گونه تبدیلی در طبیعت رها می‌شود، لزوم استفاده و یافتن کاربرد این ضایعات، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است.

مواد و روش‌ها: یکی از محصولات کشاورزی با حدود ۴۰٪ ضایعات، میوه پسته می‌باشد. از این رو در این مطالعه ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز پسته با استفاده از سیال مادون بحرانی آب استخراج و خواص رادیکال‌گیرندگی، احیاکنندگی آهن و پایداری روغن برای عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. فرایند استخراج توسط آب مادون بحرانی در دماهای ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، با نسبت اختلاط ثابت ۱:۲۰ نمونه و حلال و فشار ثابت ۳۰ بار انجام و نتایج آن با عصاره به دست آمده به روش خیساندن مقایسه شد. به عنوان شاهد مثبت از آنتی‌اکسیدان‌های BHT، اسیدآسکوربیک و آلفاتوکوفرول جهت مقایسه بهتر نتایج بهره گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، میزان ترکیبات فنولی افزایش یافت. عصاره به دست آمده از روش خیساندن، دارای بالاترین غلظت مورد نیاز برای احیا ۵۰٪ از یون‌های Fe^{+3} به Fe^{+2} بود. عصاره به دست آمده در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آب مادون بحرانی، دارای قدرت پایداری‌کنندگی مشابه با BHT بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان نمود که دمای بهینه برای استخراج ترکیبات فنولی دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و قدرت رادیکال‌گیرندگی و احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی به صورت معنی‌داری دارای همبستگی با مقدار ترکیبات فنولی بود.

واژگان کلیدی: ترکیبات فنولی، قدرت رادیکال‌گیرندگی، قدرت احیاکنندگی، پوست پسته، آب مادون بحرانی

● مقدمه

اینکه پوست سبز تازه برداشت شده، حدوداً دارای ۴۰٪ پوست سبز می‌باشد که پس از برداشت به وسیله ماشین‌های پوست کن از آن جدا و در اغلب موارد دور ریخته می‌شود و در معدود مواردی نیز به خوراک دام می‌رسد، مطالعه بر روی میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و زیست فعال این بخش از محصول پسته می‌تواند افق‌های جدیدی را در تولید و بهره‌برداری بیشتر در مورد پوست پسته ایجاد نماید.

یکی از مهمترین محصولات کشاورزی ایران، پسته می‌باشد که در مقیاس وسیعی در مناطق مختلف ایران کشت می‌شود. ایران با تولید سالانه ۴۷۸۶۰۰ تن پسته در سال بزرگترین تولیدکننده پسته جهان می‌باشد (۱) و در ایران نیز مطابق با آمار نامه وزارت جهاد کشاورزی، در سال ۱۳۹۲ استان‌های کرمان، یزد، خراسان رضوی، فارس و خراسان جنوبی به ترتیب با تولید ۸۷۱۲۰، ۳۹۴۳۰، ۳۹۱۴۰، ۱۴۲۰۰ و ۱۰۵۱۰ تن، بیشترین مقدار تولید پسته را دارا می‌باشند (۲). با توجه به

بنه (۱۱)، رزماری (۱۲)، توده زیستی سبوس برنج (۱۳)، پوست سیب زمینی (۸)، توت سیاه (۱۴) و تولید هگزوزهای قابل تخمیر از ساقه ذرت و کاه گندم (۱۵) اشاره نمود و این ترکیبات فنولی دارای خواص بسیاری از جمله جذب رادیکال‌های آزاد، جلوگیری کننده از عمل اکسیژن فعال شده ROS (Reactive Oxygen Species)، جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها و پایدارکننده روغن‌های خوراکی، احیاکننده آهن بوده و در سلامت انسان نیز نقش بسزایی داشته و از بیماری‌های قلبی و عروقی جلوگیری می‌کنند (۱۶).

از این رو و با توجه به یافتن اهداف توجیهی برای ضایعات محصولات کشاورزی با استفاده از روش‌های نوین فرآوری، در این مطالعه، بر آن شدیم تا ترکیبات فنولی موجود در پوست سبز پسته را توسط سیال مادون بحرانی آب، به عنوان یک تکنولوژی نوین، استخراج و نتایج را با روش سنتی خیساندن مورد مقایسه قرار دهیم.

• مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: عمده‌ترین وارسته کشت شده در ایران و خصوصاً استان خراسان رضوی، به عنوان سومین تولید کننده کشور، وارسته کله قوچی می‌باشد. پوست سبز پسته از باغات این استان و در بازه زمانی ابتدای مرداد تا پایان مهر ماه برداشت شد. سپس تحت شرایط کنترل شده، تا رسیدن به رطوبت ۶٪ خشک و در محلی تاریک تا زمان مصرف نگهداری گردید. روغن سویا نیز از شرکت سه گل نیشابور و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک تهیه شد.

استخراج به روش سنتی: برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز پسته با استفاده از روش سنتی خیساندن از نسبت اختلاط ۱:۲۰ (نمونه و حلال) و از آب مقطر، به عنوان حلال استفاده شد. فرایند استخراج بر روی همزن مغناطیسی (IKA، مدل: RCT-basic، کشور: آلمان) و در دمای محیط و در طی مدت زمان ۱۸ ساعت صورت گرفت.

استخراج با استفاده از سیال مادون بحرانی آب: برای این منظور از دستگاه استخراج کننده مادون بحرانی آب طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فناوری‌های نوین مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی استفاده شد (شکل ۱). فرایند استخراج در دمای ۱۲۰-۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، فشار ثابت ۳۰ بار و نسبت اختلاط ۱:۲۰ (نمونه و حلال) استفاده شد.

روش‌های سنتی استخراج مانند خیساندن، سوکسله و ... اغلب زمان‌بر بوده و راندمان پایینی دارند و موجب افزایش هزینه‌های تولید می‌گردند. از طرف دیگر به خاطر استفاده از حلال‌های آلی مانند اتانول، متانول، هگزان، استون و سایر حلال‌های شیمیایی در این روش‌ها، علاوه بر اثرات سو بر روی محیط زیست، با توجه به اینکه باقیمانده آن‌ها در محصول نهایی باعث ایجاد ناهنجاری‌ها و بیماری‌های مختلف برای مصرف کننده می‌شود، روش‌های نوین استخراج مورد توجه صنایع و گروه‌های تحقیقاتی قرار گرفته‌اند (۳-۶).

از جمله روش‌های استخراج که مورد توجه بسیاری قرار گرفته است می‌توان به استخراج مادون بحرانی آب، استخراج فوق بحرانی گاز کربنیک، استخراج تحت فشار و استفاده از پالس‌های الکتریکی قوی، اشاره نمود. این روش‌ها به خاطر راندمان بالاتر استخراج و استفاده از حلال‌های غیر مضر و همچنین کاهش زمان استخراج، به تکنولوژی سبز معروف بوده و در سال‌های اخیر برای استخراج ترکیبات مؤثره و زیستی از منابع مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این میان استفاده از آب مادون بحرانی به خاطر سادگی روش، راندمان بسیار مناسب در استخراج ترکیبات، زمان کوتاه فرآیند و ارزان بودن مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است و برای استخراج هر دو گروه ترکیبات قطبی و غیرقطبی کاربرد دارد (۷-۹). برای رسیدن به آب مادون بحرانی بایستی با استفاده از افزایش فشار، آب را در دماهای بالاتر از نقطه جوش (۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتی‌گراد)، به صورت مایع نگه داشت. در این شرایط آب تبدیل به یک سیال مادون بحرانی می‌گردد (۱۰). تحت شرایط مادون بحرانی، باندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب شکسته شده و ثابت دی‌الکتریک آب کاهش می‌یابد. به عنوان مثال با افزایش دما تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، ثابت دی‌الکتریک آب کاهش یافته و به ثابت دی‌الکتریک اتانول نزدیک می‌شود. با توجه به اینکه ثابت دی‌الکتریک آب از ۸۰ تا ۱۳ (۲۵ تا ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد) متغیر است بنابراین از آن می‌توان برای استخراج و جداسازی ترکیبات با قطبیت‌های متفاوت استفاده نمود. به این صورت که از دماهای پایین‌تر برای استخراج ترکیبات با قطبیت بیشتر و از دماهای بالا برای استحصال ترکیبات با قطبیت کمتر می‌توان بهره گرفت (۷).

تحقیقات بسیاری نیز برای استخراج ترکیبات فنولی از منابع مختلف با استفاده از آب مادون بحرانی صورت گرفته است. از جمله می‌توان به استخراج ترکیبات فنولی از پوست

Ability) تبدیل و در ترسیم منحنی‌های رادیکال‌گیرندگی استفاده شدند.

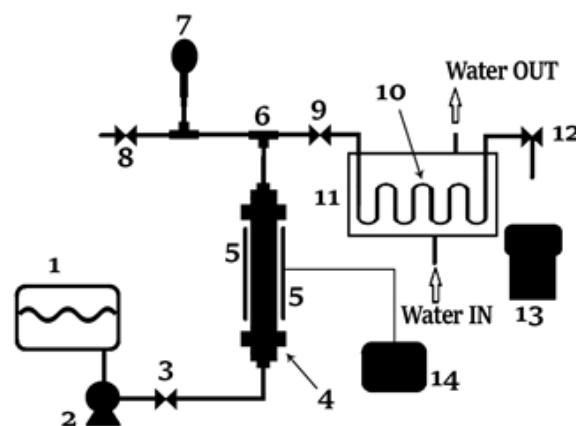
رابطه (۱)

$$RSA\% = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100$$

که در آن $Abs_{control}$ جذب نمونه شاهد و Abs_{sample} جذب نمونه می‌باشد. برای مقایسه قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی، از فاکتور IC_{50} که برابر است با غلظت موثر برای جذب ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط، استفاده شد. برای مقایسه بهتر از BHT و اسید آسکوربیک بهره گرفته شد.

تعیین قدرت احیاکنندگی: ۲/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به لوله‌های آزمایش درب دار منتقل و بعد از آن ۲/۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات (pH=۶/۶، ۰/۲ مولار)، ۲/۵ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۱٪ تهیه شده در آب مقطر، به لوله‌ها اضافه و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه درون بن ماری (Memmert، مدل: w 350، کشور: آلمان) ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن بلافاصله در آب ۴ درجه سانتی‌گراد خنک و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱۰٪ تری کلرواستیک اسید به لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰rpm) (Hettisch، مدل: EBA-20، کشور: آلمان) شد. ۵ میلی لیتر از محلول بالایی به لوله آزمایش دیگری منتقل و توسط ۵ میلی لیتر آب مقطر رقیق و پس از آن ۱ میلی لیتر محلول فریک کلراید ۰/۱٪ به لوله اضافه و تکان داده شد و در پایان جذب آن در ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. این آزمایش با سه تکرار انجام شد (۱۸). برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی، از مقدار عددی EC_{50} (Efficient Concentration) که برابر است با غلظت مورد نیاز برای به دست آمدن جذب ۵۰٪، استفاده شد. هرچه مقدار EC_{50} کمتر باشد، نشان از قدرت بیشتر عصاره در احیا آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی می‌باشد. از BHT و اسید آسکوربیک به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد.

اندازه‌گیری قدرت پایدارکنندگی: به منظور اندازه‌گیری پایداری اکسایشی روغن، از دستگاه رنسیمت (Metrohm، مدل: 743، کشور: آمریکا) استفاده شد. در این روش از شرایط تشدید شده اکسایش مانند دمای بالا و جریان هوا استفاده می‌شود. اکسایش نمونه‌ها در ظروف مخصوص و در محفظه مجهز به گرم کن انجام شد. در این حال جریانی از هوا از محل واکنش اکسایش به ظرف محتوی آب، هدایت و ضریب هدایت الکتریکی آب بر حسب میکروزیمنس بر سانتی‌متر ($\mu S/cm$)



شکل ۱. شماتیک دستگاه استخراج کننده مادون بحرانی آب. مخزن ذخیره آب مقطر (۱)، پمپ آب فشار بالا (۲)، شیر یکطرفه (۳)، راکتور (۴)، پوشش حرارتی (۵)، شیر T شکل (۶)، فشار سنج (۷)، شیر اطمینان (۸)، شیر نازلی (۹)، لوله‌های خنک کننده (۱۰)، حمام آب (۱۱)، شیر میکرو (۱۲)، مخزن جمع آوری نمونه (۱۳)، کنترل کننده دما (۱۴).

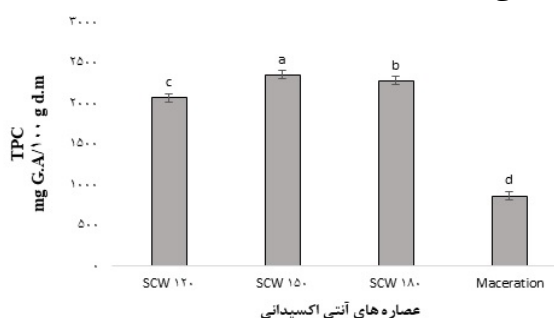
تعیین مقدار کل ترکیبات فنولی به روش Folin

ciocalteo: غلظت مناسبی از عصاره‌های استخراجی تهیه و ۰/۵ میلی لیتر از آن‌ها به همراه ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ده بار رقیق شده در آب مقطر، به لوله‌ها منتقل و در نهایت ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در پایان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu، مدل: UV visible -160A، کشور: ژاپن) قرائت گردید. برای نمونه شاهد از ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد (۱۷). مقدار کل ترکیبات فنولی بر حسب میلی گرم گالیک اسید در صد گرم نمونه خشک پوست سبز پسته محاسبه گردید.

اندازه‌گیری قدرت رادیکال‌گیرندگی: قدرت

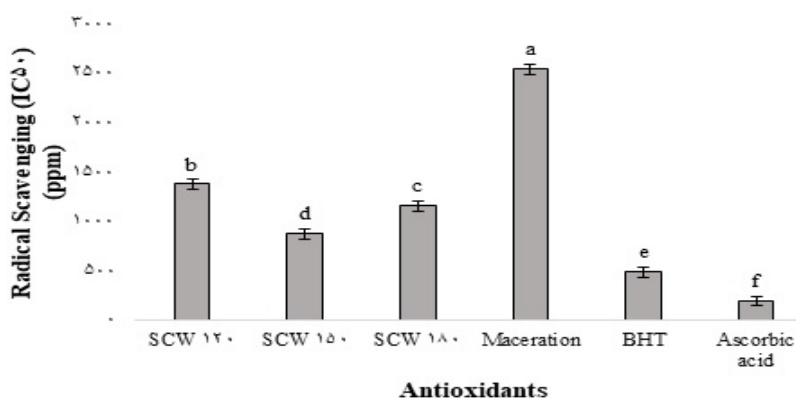
رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های استخراجی با استفاده از روش توصیف شده توسط Shaddeh و همکاران (۲۰۱۴)، با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد (۱۱). در این روش، ۰/۰۲ گرم از DPPH در ۵۰ میلی لیتر متانول حل شد بطوری که جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر، بین ۰/۹-۱ باشد. ۰/۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی به همراه ۳/۹ میلی لیتر از محلول DPPH در لوله‌های آزمایش درب دار و فویل پیچ شده، ریخته به طوری که حجم نهایی ۴ میلی لیتر باشد. پس از قرار دادن لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک و دمای محیط، جذب محلول نهایی در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. از متانول به عنوان شاهد استفاده شد. جذب‌های به دست آمده با استفاده از رابطه ۱ به درصد توانایی جذب رادیکال $RSA\%$ (Radical Scavenging)

استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز پسته شده است. در روش استخراج توسط آب مادون بحرانی، با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، در ابتدا شاهد افزایش مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده و پس از آن شاهد کاهش مقدار استخراج این ترکیبات بودیم به گونه‌ای که بهترین دما برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز پسته دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۲).



شکل ۲. مقدار ترکیبات فنولی به دست آمده از روش خیساندن و در دماهای متفاوت روش مادون بحرانی آب. (SCW- عصاره‌های حاصل از آب مادون بحرانی در دماهای ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد). TPC- ترکیبات فنولی کل

اندازه‌گیری قدرت رادیکال‌گیرندگی: قدرت جذب رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های استخراج شده به روش سنتی با قدرت جذب این رادیکال‌ها توسط عصاره‌های به دست آمده به روش آب مادون بحرانی مقایسه گردید. عصاره به دست آمده از روش خیساندن، کمترین قدرت را در جذب رادیکال‌های آزاد داشت و اختلاف معنی‌داری با سایر آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه را نشان داد ($P < 0.05$). میان عصاره‌های به دست آمده از روش آب مادون بحرانی، عصاره استخراج شده در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، کمترین غلظت مؤثر (IC_{50}) را دارا بود (شکل ۳).



شکل ۳. غلظت IC_{50} (معادل غلظت مؤثر در جذب ۵۰٪ از رادیکال آزاد DPPH موجود در محیط) عصاره‌های استخراج شده و آنتی‌اکسیدان‌های BHT و آسکوربیک اسید.

(SCW- عصاره‌های حاصل از آب مادون بحرانی در دماهای ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد)

محاسبه می‌گردد. افزایش هدایت الکتریکی آب به عنوان شاخصی از پیشرفت اکسایش در نظر گرفته می‌شود.

روش کار به این صورت بود که غلظت ثابت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از عصاره‌ها در آب، به کمک ماده حد واسط پروپیلن گلیکول که در صنعت به منظور توزیع BHT در روغن کاربرد دارد، در روغن سویای تصفیه، بوگیری و رنگبری شده بدون آنتی‌اکسیدان، تهیه و ۴ گرم از نمونه آماده شده به درون لوله‌های مخصوص دستگاه منتقل شد. پس از آن لوله‌ها در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با شدت جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت، درون دستگاه قرار گرفتند. زمان لازم، بر حسب ساعت، برای رسیدن روغن به شرایط اکسید شده تحت عنوان دوره القا (Induction Period) بیان گردید (۱۹). به منظور مقایسه بهتر از BHT به عنوان آنتی‌اکسیدان سنتزی و آلفاتوکوفرول به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت پایداری روغن سویا استفاده شد.

روش آماری: تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از جدول ANOVA در طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی و سطح معنی‌داری $\alpha = 0.05$ انجام شد. آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (Least Significant Difference) نیز بین میانگین‌ها انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ بهره گرفته شد و شکل‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ ترسیم گردید.

• یافته‌ها

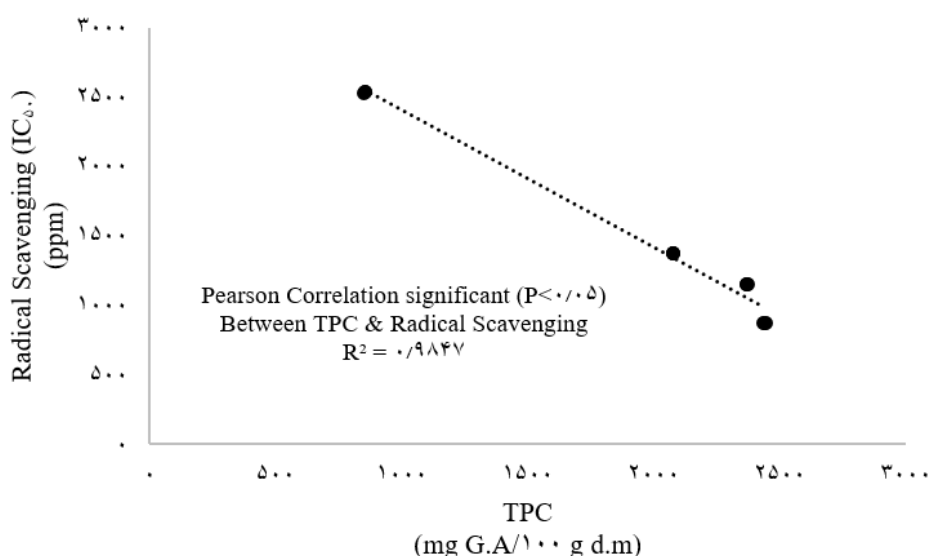
بررسی میزان ترکیبات فنولی: با توجه به شکل ۲

می‌توان بیان نمود که میزان ترکیبات فنولی استخراج شده توسط سیال مادون بحرانی آب بسیار بیشتر از روش خیساندن بوده است به گونه‌ای که استفاده از دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در روش مادون بحرانی آب، که کمترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را در میان دیگر دماهای مورد استفاده را دارا بوده است، باعث افزایش ۲۴۰ درصدی

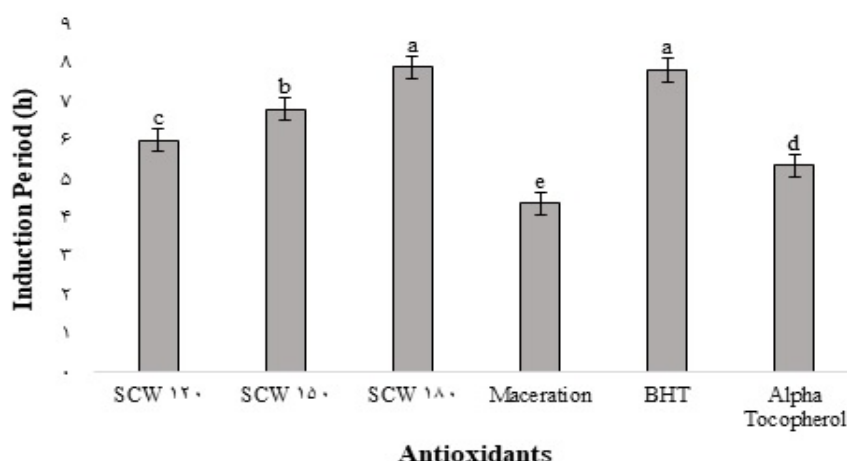
سانتی‌گراد مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با سایر عصاره‌های به دست آمده از روش مادون بحرانی آب دارا بود ($P < 0.05$) (شکل ۵). بیشترین قدرت پایدارکنندگی در میان عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مورد بررسی، به روغن حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مربوط بود که اختلاف معنی‌داری میان قدرت پایدارکنندگی BHT و عصاره به دست آمده در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در روش مادون بحرانی آب مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۵).

نتایج حاکی از همبستگی بالای میان مقدار ترکیبات فنولی و قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های استخراجی بود. ضریب تبیین بالای ۹۸٪ در آنالیز نتایج به دست آمد (شکل ۴).

بررسی قدرت پایدارکنندگی: نتایج نشان داد که با افزایش دما در روش استخراج توسط آب مادون بحرانی، قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراجی افزایش یافت به گونه‌ای که بیشترین قدرت پایدارکنندگی در دمای ۱۸۰ درجه



شکل ۴. همبستگی مقدار ترکیبات فنولی و قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های استخراج شده توسط سیال مادون بحرانی آب و روش خیساندن

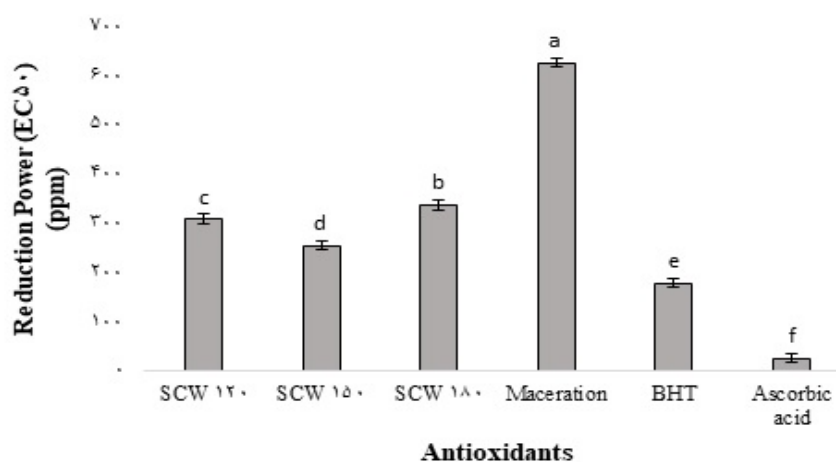


شکل ۵. قدرت پایدارکنندگی عصاره‌های استخراج شده و آنتی‌اکسیدان‌های BHT و آلفاتوکوفرول در پایدار کردن روغن سویا (SCW- عصاره‌های حاصل از آب مادون بحرانی در دماهای ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد)

قدرت احیاکنندگی عصاره پوست سبز پسته به صورت معنی داری افزایش یافت ولی پس از آن با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی گراد، قدرت احیاکنندگی کاهش یافت ($P < 0.05$).

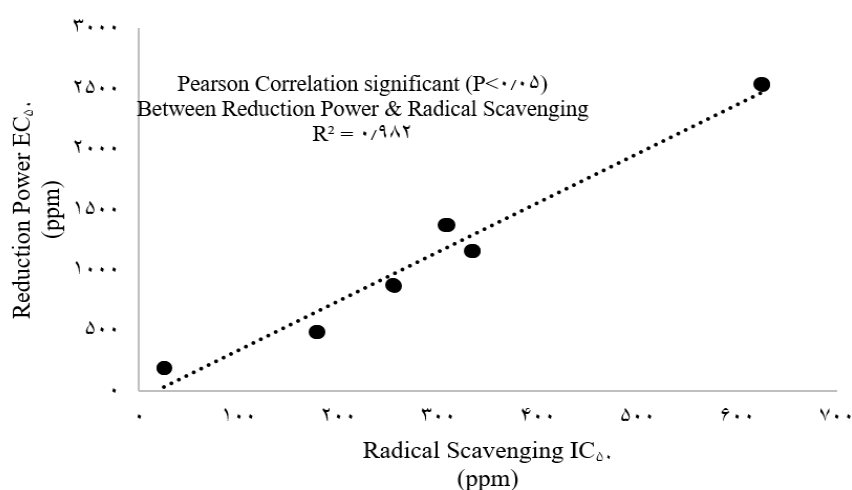
برازش و تجزیه و تحلیل نتایج مربوط به قدرت احیاکنندگی و قدرت رادیکال گیرندگی نشان از همبستگی بالای میان نتایج این دو آزمون بود که در شکل ۷ ارائه شده است.

بررسی قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی: قدرت احیاکنندگی عصاره‌های به دست آمده از روش خیساندن و مادون بحرانی آب اندازه‌گیری و با آنتی اکسیدان‌های BHT و اسید آسکوربیک مقایسه شد. نتایج نشان داد که در میان عصاره‌های استخراج شده از دو روش خیساندن و آب مادون بحرانی، بیشترین قدرت احیاکنندگی به عصاره به دست آمده در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد توسط آب مادون بحرانی مربوط بود (شکل ۶). در روش مادون بحرانی آب با افزایش دما از ۱۲۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی گراد،



شکل ۶. غلظت EC₅₀ (معادل غلظت موثر در احیا ۵۰٪ از یون‌های Fe²⁺ به Fe³⁺ موجود در محیط) عصاره‌های استخراج شده و آنتی اکسیدان‌های BHT و آسکوربیک اسید.

(SCW- عصاره‌های حاصل از آب مادون بحرانی در دماهای ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ درجه سانتی گراد)



شکل ۷. همبستگی قدرت احیاکنندگی و قدرت رادیکال گیرندگی عصاره‌های استخراج شده توسط سیال مادون بحرانی آب و روش خیساندن.

• بحث

بررسی میزان ترکیبات فنولی: استفاده از آب مادون بحرانی برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست پسته، باعث افزایش میزان استخراج این ترکیبات نسبت به روش خیساندن شد. ارزش این افزایش در مقدار ترکیبات فنولی زمانی مشخص می‌شود که به تفاوت زمان فرایند در روش‌های خیساندن و آب مادون بحرانی توجه شود با این توضیح که در روش سیال مادون بحرانی آب، از زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد اما در روش خیساندن، فرایند استخراج و عصاره‌گیری به مدت ۱۸ ساعت به طول انجامید. هرچند که افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، باعث کاهش مقدار ترکیبات فنولی شد اما مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده در دمای ۱۸۰ بیشتر از مقدار آن در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد بود که این اختلاف در سطح احتمال ۹۵٪ معنی‌دار بود (شکل ۲) ($P < 0.05$). کاهش مقدار ترکیبات فنولی با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، به تجزیه دمایی این ترکیبات با افزایش دما مربوط می‌شود (۲۰). این موضوع در نتایج برخی از محققان نیز مشاهده شد. در مطالعه انجام شده بر روی استخراج ترکیبات فنولی از هسته انار، توسط آب مادون بحرانی مشخص گردید که با افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش و پس از آن با افزایش دما تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیبات فنولی کاهش یافت (Zecovi'c و همکاران (۲۰۱۴) که بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از دانه‌های گشنیز را انجام دادند که بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در فشار ثابت ۳۰ bar مشاهده شد. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش دما از ۱۰۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیبات فنولی همواره افزایش داشته است (۲۱). Inouye و Narita در سال ۲۰۱۲ گزارش نمودند که مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از قهوه با افزایش دما از ۱۸۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش و پس از آن با افزایش دما تا ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد، استخراج ترکیبات فنولی کاهش یافته است (۲۲).

اندازه‌گیری قدرت رادیکال‌گیرندگی: به منظور مقایسه نتایج حاصل از قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های استخراج شده توسط آب مادون بحرانی و روش خیساندن، از معیار IC_{50} که معادل غلظت موثر در جذب ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط می‌باشد، استفاده شد. نتایج به دست آمده از هر دو روش، با آنتی‌اکسیدان BHT، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سنتزی و اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد

که قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان در میان عصاره‌های استخراجی و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های کنترل مثبت، آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک بود که اختلاف معنی‌داری با BHT و سایر عصاره‌های استخراجی داشت ($P < 0.05$). Aliakbarian و همکاران (۲۰۱۲)، بیان نمودند که با افزایش دما تا ۱۴۵ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیبات فنولی از ضایعات کارخانه الکل سازی افزایش یافت (۲۳) که مشابه نتایج به دست آمده در این مطالعه بود. Shaddel و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی استخراج ترکیبات فنولی از پوست بنه توسط آب مادون بحرانی مطالعه نمودند، بیان کردند که با افزایش دما قدرت جذب رادیکال‌های آزاد افزایش یافت (۱۱).

همبستگی نتایج به دست آمده از قدرت رادیکال‌گیرندگی عصاره‌های استخراج شده از پوست سبز پسته به دو روش خیساندن و آب مادون بحرانی، مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۶ ارائه شده است.

بررسی قدرت پایدارکنندگی: یکی از مهمترین خواص ترکیبات فنولی، قدرت پایدارکنندگی روغن توسط این ترکیبات می‌باشد. همچنین در صورتیکه به دنبال یک کاربرد صنعتی سریع و آسان برای عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی باشیم، صنعت روغن‌های خوراکی یکی از اولین مقاصد کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد. از این رو در این مطالعه قدرت پایدارکنندگی روغن سویا توسط عصاره‌های استخراجی مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی نتایج به دست آمده از آزمون پایدارکنندگی روغن توسط عصاره‌های استخراجی و عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان عصاره حاصل از دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و BHT، این امر نشان از قدرت بالای عصاره پوست سبز پسته به دست آمده به روش آب مادون بحرانی در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد بود.

مقایسه نتایج به دست آمده توسط Chandrika و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی اثر افزایش عصاره‌های استخراج شده از گندم نانوائی و گندم درم بر چند نوع روغن خوراکی مطالعه نمودند، با نتایج این مطالعه مشخص گردید که عصاره‌های استخراجی از پوست سبز پسته توسط آب مادون بحرانی دارای اثر بسیار بیشتری بوده‌اند (۲۴). عصاره به دست آمده از روش خیساندن نیز دارای قدرت پایدارکنندگی مناسب و درخور توجهی بود. با مقایسه نتایج می‌توان بیان نمود که به کاربرد عصاره حاصل از روش خیساندن، اثری مشابه با کاربرد آلفاتوکوفرول در روغن سویا دارد. این امر نشان می‌دهد که پوست سبز پسته حاوی مقدار ترکیبات فنولی با قابلیت

عصاره‌گیری از پوست بنه توسط آب مادون بحرانی مطالعه نمودند، مطابقت داشت (۱۱). نتایج مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۶ حاکی از قدرت بیشتر آنتی‌اکسیدان BHT نسبت به عصاره‌های استخراج شده از لوبیا چشم بلبلی بود (۲۷).

با توجه به این که در تمامی فرایندهای استخراج، شرایط بهینه‌ای از نظر دما، زمان، نسبت اختلاط نمونه و حلال، اندازه ذرات و غیره وجود دارد، این موارد در فرایند استخراج توسط آب مادون بحرانی نیز صدق می‌کند. دمای بهینه برای استخراج ترکیبات فنولی دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج حاکی از آن بود که قدرت رادیکال‌گیرندگی و احیاکنندگی عصاره‌های استخراجی به صورت معنی‌داری دارای همبستگی با مقدار ترکیبات فنولی بود و با افزایش دما تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد مقدار ترکیبات فنولی، قدرت رادیکال‌گیرندگی و احیاکنندگی افزایش و با افزایش دما از ۱۵۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد، این مقادیر کاهش پیدار کرد. افزودن عصاره‌های استخراج شده از پوست سبز پسته منجر به افزایش پایداری روغن سویا تحت شرایط تشدید شده اکسایشی گردید و از این لحاظ مشابهت بالایی میان قدرت پایدارکنندگی BHT و عصاره به دست آمده از روش مادون بحرانی آب در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

پایدارکنندگی روغن مناسبی می‌باشد. در سال ۲۰۱۴ مطالعه ای روی افزودن عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی استخراج شده از ضایعات کشاورزی سه محصول زیتون، انار و بادام زمینی به کره انجام شد و نتایج حاکی از اثر بیشتر عصاره به دست آمده از ضایعات پوست بادام زمینی بر پایداری کره بود و افزودن BHT باعث افزایش تقریباً ۶۰٪ پایداری حرارتی کره شده است (۲۵).

بررسی قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی: در این روش رنگ زرد اولیه محلول‌های تولید شده به رنگ سبز تبدیل شده که نشانه احیا ترکیبات موجود در محیط می‌باشد بنابراین افزایش جذب در ۷۰۰ نانومتر نشانه قدرت احیاکنندگی بیشتر می‌باشد. احیاکننده‌های موجود در این مطالعه آنتی‌اکسیدان‌های بودند که موجب تبدیل یون‌های آهن سه ظرفیتی (فری سیانید) به دو آهن ظرفیتی (فروس) شدند (۲۶). قدرت احیاکنندگی آهن توسط BHT و اسیداسکوربیک نیز اندازه‌گیری شد و مشخص گردید که قدرت احیاکنندگی اسید اسکوربیک بیشتر از BHT و همچنین تمامی عصاره‌های مورد مطالعه بود ($P < 0.05$). قدرت احیاکنندگی آهن عصاره‌ها مشابهت بیشتری با قدرت احیاکنندگی BHT داشت. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه انجام شده توسط Shaddel و همکاران (۲۰۱۴) که بر روی

• References

1. Food and Agricultural Organization of United Nations (FAO). 2015. Major edible nuts. Available from: URL: <http://www.fao.org/docrep/v8929e/v8929e04.htm>. Accessed 2018 Feb 05.
2. Agricultural Statistics, Ministry of Agriculture, Islamic Republic of Iran, 1394. [in Persian].
3. Salehi M, Reisnia N, Mehrabian S. Investigation of antibacterial activity of methanolic extract of Pistacia (Pistacia vera). Microbial Biotechnology Islamic Azad University 2011; 3 (10): 53-59. [in Persian].
4. Al-Weshahy A, Rao VA. Isolation and characterization of functional components from peel samples of six potatoes varieties growing in Ontario. Food Res Int 2009; 42, 1062-1066.
5. Friedman M, Levin C. Analysis and biological activities of potato glycoalkaloids, calystegine alkaloids, phenolic compounds and anthocyanins. In J. Singh, & L. Kaur (Eds.), Advances in potato chemistry and technology; Elsevier Inc; 2009: 127-161.
6. González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. Anal Chim Acta 2004; 513: 283-289.
7. Cvetanovic A, Svarc-Gajic J, Gašic U, Tešic Z, Zengin G, Zekovic Z, Durovic S. Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process. J Supercrit Fluid 2017; 120: 32-42.
8. Singh PP, Saldaña MDA. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. Food Res Int 2011; 44: 2452-2458.
9. Carr AG, Mammucari R, Foster NR. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. Chem Eng J 2011; 172: 1-17.
10. Zakaria SM, Kamal SMM, Harun MR, Omar R, Siajam SI. Subcritical Water Technology for Extraction of Phenolic Compounds from Chlorella sp. Microalgae and Assessment on Its Antioxidant Activity. Molecules 2017; 22 (1105): 1-14.

11. Shaddel R, Maskooki A, Haddad-Khodaparast MH, Azadmard-Damirchi S, Mohamadi M, Fathi-Achachlouei B. Optimization of Extraction Process of Bioactive Compounds from Bene Hull Using Subcritical Water. *Food Sci Biotechnol* 2014; 23 (5): 1459-1468.
12. Ibanez E, Kubatova A, Senorans FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB. Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants. *J Agric Food Chem* 2003; 51, 375-382.
13. Pourali O, Salak Asghari F, Yoshida H. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. *Chem Eng J* 2011; 160: 259–266.
14. Aybastier O, Isik E, Sahin S, Demir C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Ind Crop Prod* 2013; 44: 558– 565.
15. Zhao Y, Lu WJ, Wang HT, Yang JL. Fermentable hexose production from corn stalks and wheat straw with combined supercritical and subcritical hydrothermal technology. *Bioresource Technol* 2009; 100: 5884–5889.
16. Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA. Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; 1861: 802-813.
17. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different method for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004; 85: 633-640.
18. Maghsoudlou E, EsmailzadeKenari R, Raftani Amiri Z. The effects of extraction technique on phenolic compounds extracted from fig (*Ficus carica*) pulp and skin. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 2016; 11 (6): 758-769.
19. Yang Y, Song X, Sui X, Qi B, Wang Z, Li Y, Jiang L. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Ind Crop Prod* 2016; 80: 141–147.
20. He L, Zhang X, Xu H, Xu C, Yuan F, Knez Z, Novak Z, Gao Y. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum L.*) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS•+ assay. *Food Bioprod Process* 2011; 243: 1-9.
21. Zeković Z, Vidović S, Vladić J, Radosavljević R, Cvejin A, Elgndi MA, Pavlić B. Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *J Supercrit Fluid* 2014; 3080: 1-7.
22. Narita Y, Inouye K. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chem* 2012; 135: 943–949.
23. Aliakbarian B, Fathi A, Pereg P, Dehghani F. Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *J Supercrit Fluid* 2012; 65: 18– 24.
24. Chandrika M, Pathirana L, Shahidi F. The antioxidant potential of milling fractions from bread wheat and durum. *J Cereal Sci* 2007; 45: 238–247.
25. El-Shourbagy GA, El-Zahar KM. Oxidative stability of ghee as affected by natural antioxidants extracted from food processing wastes. *Annal Agri Sci* 2014; 59 (2): 213–220.
26. Barros L, Ferreira MJ, Queiro's B, Ferreira ICFR, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem* 2007; 103: 413–419.
27. Siddhuraju P. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chem* 2006; 99: 149–157.

Investigation on the Adding Effect of Subcritical Water Extracts from Pistachio Hull for Increasing the Stability of Soybean Oil

Mohamadi M¹, Ghorbani M^{*2}, Beigbabaei A³, Yeganehzad S⁴, Sadeghi-Mahoonak AR²

1- Ph.D. Student of Food Chemistry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Corresponding Author: Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: moghorbani@yahoo.com

3- Food Chemistry Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

4- Food Processing Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received 6 Jan, 2018

Accepted 24 Apr, 2018

Background and Objectives: Nowadays given to the fact that a large volume of agricultural waste is produced annually in different parts of industry and agriculture and most of these wastes are abandoned or burned without any change in nature, the need to use and find the application of agricultural waste has become particularly important.

Materials and Methods: One of the agricultural products with about 40 % of the waste is pistachio. Therefore, in this study, phenolic compounds in pistachio hull were extracted using subcritical water (SCW), and radical scavenging, reduction power and induction period in edible soybean oil for extracts were measured. The extraction process by SCW was carried out in 120–180 °C with 1:20 (sample:solvent) ratio and constant pressure of 30 bar conditions, and the results were compared with the extract obtained by maceration. As a positive control, BHT, ascorbic acid, and alpha-tocopherol antioxidants were used to better compare the results.

Results: The results showed that the amount of phenolic compounds increased by increasing from the temperature from 120 to 150°C. The extract obtained from the maceration method had the highest concentration required for the reduction of 50% of trivalent iron ions to bivalent capacity. The extract obtained at 180°C using SCW had the same ability of BHT for stabilizing soybean oil as the synthetic antioxidant.

Conclusion: The overall results indicated that the optimum temperature for the extraction of phenolic compounds from pistachio hull by SCW was 150°C, and radical scavenging ability and reduction power of the extracts had a good correlation with the total phenolic compounds.

Keywords: Phenolic compounds, Radical scavenging, Reduction power, Pistachio hull, Subcritical water