

# بهینه‌سازی فرآیند استخراج پرس سرد ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و ویتامین ث از میوه زرشک بی دانه به روش سطح پاسخ

سید علی مرتضوی<sup>1</sup>، اکرم شریفی<sup>1\*</sup>، عبدالمجید مسکوکی<sup>2</sup>، مهرداد نیاکوثری<sup>3</sup>، امیرحسین الهامی‌راد<sup>1</sup>،  
صادق ریگی<sup>1</sup>

<sup>1</sup> گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، سبزوار، ایران

<sup>2</sup> گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

<sup>3</sup> گروه علوم و صنایع غذایی و انستیتو نانو تکنولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: 1392/7/12

تاریخ دریافت: 1392/4/1

## چکیده

میوه زرشک بیدانه (*Berberis vulgaris*) منبع سرشار از آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فنلی و ویتامین ث است و کاربرد روش‌هایی برای استخراج این ترکیبات با ارزش که بتوان بیشترین ماده فراسودمند را با کمترین ناخالصی و حداقل تخریب بدست آورد از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این تحقیق فرایند استخراج مواد زیست فعال موجود در میوه زرشک بیدانه با استفاده از پرس سرد و بهینه‌سازی فرایند استخراج به روش سطح پاسخ انجام گرفت. جهت پیش‌بینی رفتار نمونه‌ها، مدل چند جمله‌ای درجه ی دوم و از طرح مربع مرکزی با تعداد 13 تیمار و 5 تکرار در نقاط مرکزی استفاده گردید. فاکتورهای متغیر شامل فشار (35/87-14/35 مگاپاسکال) و زمان استخراج (6-2 دقیقه) و پاسخ‌ها میزان آنتوسیانین، ویتامین ث، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی و بازده عصاره استخراج شده بودند. طبق نتایج حاصل شرایط بهینه استخراج با پرس سرد فشار 26 مگاپاسکال و زمان 4/48 دقیقه بود. که در این شرایط میزان ترکیبات فنلی (345/132 میلی گرم اسید گالیک در 100 میلی لیتر عصاره)، آنتوسیانین (100/908 میلی گرم در لیتر)، فعالیت آنتی اکسیدانی (84/52 درصد)، ویتامین ث (3118/55 میلی گرم در لیتر) و بازده استخراج 92 درصد بود. نتایج این تحقیق نشان داد روش سطح پاسخ ابزاری سودمند برای بهینه سازی متغیرهای فرایند استخراج مواد زیست فعال میوه زرشک با پرس سرد می باشد تا بتوان از این شرایط بهینه در صنعت بهره جست.

**کلید واژه‌ها:** زرشک، روش سطح پاسخ، آنتوسیانین، فعالیت آنتی اکسیدانی، پرس سرد.

## 1- مقدمه

زرشک‌ها گروه بزرگی از درختچه‌های خاردار همیشه سبز هستند که به دلیل مصارف و کاربردهای متعدد از قبیل مصارف خوراکی میوه از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. دستیابی به دانش فنی فرآوری میوه زرشک می‌تواند به صورت یک فناوری منحصر بفرد و بومی و اجرای آن در منطقه، ضمن ارتقاء علمی، سبب گسترش و توسعه اقتصادی و صنعتی گردد (1). میوه زرشک دارای ترکیبات با ارزشی از جمله پلی فنول‌ها، آنتوسیانین‌ها، اسید سیتریک، ویتامین ث و دهها ترکیب دیگر می‌باشد که روشهای استخراج، فرمولاسیون و تهیه اشکال مختلف خوراکی و دارویی آنها بایستی مورد پژوهش قرار گیرد (2،3). کاربرد روش‌هایی برای استخراج این ترکیبات با ارزش که بتوان بیشترین ماده عملگر را با کمترین ناخالصی و حداقل تخریب بدست آورد از اهمیت بسزایی برخوردار است.

استخراج ترکیبات گیاهی با حلال بعنوان یکی از قدیمی‌ترین روشهای جداسازی شناخته شده است. بطوریکه عمدتاً، استخراج ترکیبات زیست فعال<sup>1</sup> از گیاهان توسط تقطیر با بخار و استخراج با حلال آلی و با استفاده از روش‌های تراوش<sup>2</sup>، خیساندن<sup>3</sup> و سوکسله<sup>4</sup> انجام می‌گرفته است. زمان طولانی استخراج، بازدهی کم، مسمومیت فزاینده استخراج شده با حلال و شرایط عملیاتی سخت، استفاده از چنین روش‌هایی را با چالش روبرو کرده است. روش‌های دیگری نیز برای استخراج یا کمک به استخراج ترکیبات زیست فعال نظیر مایکروویو<sup>5</sup>، استخراج با سیال فوق بحرانی<sup>6</sup> و یا امواج فراصوت<sup>7</sup> وجود داد، که در نتیجه کاربرد این روش‌ها استخراج سریع‌تر و موثرتر و در نتیجه مقدار نمونه خروجی نیز بیشتر است. به دلیل مصرف کمتر حلال آلی این روش‌ها به عنوان روش‌های دوست دار محیط زیست معرفی می‌شوند. استخراج با پرس سرد نیز فرایندی است با توانایی تولید محصولات طبیعی، بدون هیچ گونه اثری از وجود حلال و مواد آلوده یا مصنوعی، این روش امکان استخراج مواد حساس به

حرارت و ترکیباتی که به راحتی اکسید می‌شوند را فراهم می‌کند (11، 15، 19).

در طی سال‌های اخیر، در زمینه استخراج ترکیبات موثره گیاهی مطالعات زیادی با هدف مدل‌سازی و بهینه‌سازی فرآیند استخراج این ترکیبات با استفاده از روش سطح پاسخ<sup>8</sup> (RSM) و یا سایر روش‌های رایج به انجام رسیده است.

Rajasekar و همکاران (2012) خصوصیات فیزیکوشیمیایی عصاره 15 واریته انار استخراج شده بوسیله پرس سرد را مورد بررسی قرار دادند. خصوصیات مورد بررسی شامل بازده استخراج، محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود همچنین آنتوسیانین‌های موجود در این عصاره با بوسیله HPLC شناسایی شد. بررسی‌ها نشان داد تفاوت کاملاً معنی‌داری بین تمام واریته‌های انار از نظر همه خصوصیات مورد بررسی وجود داشت ولی آنتوسیانین غالب در همه عصاره‌ها دلفینیدین-3-گلایکوزید<sup>9</sup> بود. نتایج بیانگر کارایی بالای پرس سرد در استخراج ترکیبات زیست فعال عصاره انار بود (14).

Wang و همکاران (2013) 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 بدست 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 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 60 دقیقه و غلظت اتانول 80 درصد تعیین شد (18).

Gan و Latiff (2011) استخراج ترکیبات زیست فعال غلاف لوبیای پارکیا<sup>10</sup> را با کمک حلال و با روش سطح پاسخ انجام دادند و اثر متغیرهای نسبت حلال به مواد، دما و زمان استخراج را روی مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل مورد بررسی قرار دادند. آنالیز واریانس نشان داد مدل درجه دوم برای نشان دادن اثرات متغیرها روی پاسخ‌ها مناسب‌تر بود. شرایط بهینه شامل نسبت حلال به مواد 20 میلی‌لیتر بر گرم، دما 35-36 درجه سانتی‌گراد و زمان 100 تا

- 1-Bioactive
- 2-Percolation
- 3-Maceration
- 4-Soxhlet
- 5-Microwave assisted Extraction
- 6-Supercritical Fluid Extraction
- 7- Ultrasound assisted Extraction

8- Response Surface Methodology

9- Delphinidin 3-glucoside

10-Parkia speciosa pod

100 میلی گرم در لیتر اسید گالیک استاندارد به صورت هفت نقطه ای استفاده شد (16).

### 2-2-2- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده به روش DPPH

خاصیت آنتی رادیکالی عصاره استخراج شده بر اساس توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در عصاره های اتانولی یا میزان بی رنگ کردن محلول بنفش 2-2 دی فنیل-1 پیکریل هیدرازیل<sup>3</sup> (DPPH) در متانول مورد سنجش قرار گرفت (9). ابتدا عصاره اتانولی با مخلوط کردن 10 میلی لیتر عصاره استخراجی با 40 میلی لیتر اتانول 80 درصد و 4 ساعت هم زدن و دوبار صاف کردن تولید شد سپس 0/5 میلی لیتر از عصاره اتانولی تولید شده به 3/5 میلی لیتر محلول 0/004 درصد DPPH در متانول اضافه گردید. بعد از 30 دقیقه تاریک گذاری در دمای اتاق، جذب نمونه ها در طول موج 517 نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکالهای آزاد DPPH با استفاده از معادله 1 محاسبه گردید:

$$\text{DPPH \%} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100 \quad (1)$$

رابطه (1)  $A_{\text{blank}}$ : میزان جذب نمونه ی شاهد  
 $A_{\text{sample}}$ : میزان جذب نمونه ی حاوی عصاره اتانولی

### 2-2-3- اندازه گیری آنتوسیانین به روش pH افتراقی<sup>4</sup>

برای اندازه گیری آنتوسیانین ها از شیوه ای که Fuleki و Fransis در سال 1968 بکار بردند استفاده شد. در این روش جذب نمونه های تهیه شده توسط بافر pH = 1 و pH = 4/5 = بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 510 نانومتر بر حسب رنگدانه سیانیدین-3- گلایکوزید<sup>5</sup> موجود در زرشک که بیشترین جذب را در طول موج 510 نانومتر نشان می دهد اندازه گیری شد و در نهایت غلظت آنتوسیانین ها از رابطه 2 بدست آمد (8):

رابطه (2)

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

D: فاکتور رقیق کردن

r A: اختلاف بین دو جذب در pH = 1 و pH = 4/5

102 دقیقه بود که در این شرایط بیشترین مقدار ترکیبات فنلی بدست آمد (664-668 میلی گرم اسید گالیک در 100 گرم) (10).

تحقیق حاضر با هدف بهینه سازی فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال موجود در میوه زرشک بیدانه با استفاده از پرس سرد و به روش سطح پاسخ انجام شد.

### 2-1-1- آماده سازی نمونه ها

زرشک بی دانه گونه *Berberis vulgaris* از شهرستان بیرجند در مهرماه 1390 خریداری شد. پس از جدا نمودن شاخ و برگ و ضایعات، زرشک ها تا زمان شروع آزمایشات در سردخانه 18- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. کلیه آزمایشات این تحقیق با استفاده از مواد شیمیایی ساخت شرکت آلمانی مرک<sup>1</sup> انجام گرفت.

### 2-2-2- استخراج با پرس سرد

استخراج توسط دستگاه پرس سرد طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه فناوری های نوین پژوهشکده علوم و صنایع غذایی انجام گرفت. این دستگاه دارای حداکثر فشار 294 کیلو نیوتن در  $2/7 \times 10^{-3}$  متر مربع معادل 1/7 مگاپاسکال دقت 0/1 و ظرفیت دستگاه 500 گرم بود. تمام قسمت های که در تماس با نمونه بودند از جنس استیل ضد زنگ 304 تهیه شده بود.

### 2-1-2- اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده

مقدار کل ترکیبات فنلی به روش فولین سیوکالتو<sup>2</sup> شرح داده شده توسط Shahidi و Nacz (2004) تعیین شد. مقدار 0/5 میلی لیتر عصاره با 2/5 میلی لیتر محلول 10 درصد فولین سیوکالتو مخلوط شد و بعد از 3 دقیقه 2 میلی لیتر محلول 7/5 درصد کربنات سدیم (75 گرم در لیتر) به آن اضافه شد و سپس جذب نمونه در 765 نانومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک موجود در 100 میلی لیتر عصاره استخراجی گزارش گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از رقت های 700-

3- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

4- pH Differential method

5- Cyanidin-3-glycoside

1-Merck

2- Folin-Ciocalteu method

M: جرم مولکولی سیانیدین -3- گلایکوزید

€: جذب مولی

L: طول سل که بر حسب سانتی متر

#### 2-2-4- تعیین مقدار ویتامین ث در عصاره استخراج

شده

اندازه‌گیری ویتامین ث بوسیله دستگاه HPLC (KNAUER) ساخت آلمان) و جداسازی با ستون یوروسفر (5×4/6×250 Eurospher, C18، انجام گرفت. حجم تزریق 20 میکرولیتر و دمای ستون در 25 درجه سانتی گراد ثابت بود. از بافر فسفات 1 با pH= 2/8 به عنوان حلال استفاده شد و جذب نمونه در طول موج های 200، 210، 214، 230 نانومتر بررسی و کروماتوگرام ها بوسیله نرم افزار (Ezchromelite) ثبت شد. بوسیله مقایسه سطح زیر پیک ها و زمان بازداری<sup>2</sup> با معادلات بدست آمده از نمودار استاندارد اسید آسکوربیک که بارقت های 400-5 میلی گرم در لیتر تهیه شد مقدار ویتامین ث تعیین گردید (12).

#### 2-2-5- تعیین بازده استخراج

بازده استخراج از طریق محاسبه مقدار ماده جامد موجود در عصاره استخراج شده طبق روش ذکر شده در استاندارد AOAC شماره 93406 انجام گرفت (5).

#### 2-3- طرح آزمایشی و آنالیز آماری

روش سطح پاسخ مجموعه ای از تکنیک های آماری است که در بهینه سازی فرایند هایی بکار می رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می گیرد. یکی از مزیت های روش فوق، کم کردن تعداد آزمایشات مورد نیاز برای بدست آوردن داده ها جهت آنالیز آماری می باشد. این روش بطور گسترده در مطالعات بهینه سازی چند متغیره در فرآیندهای مهندسی، تحقیقات صنعتی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرد (7).

در این تحقیق پارامترهای فرآیند استخراج با استفاده از پرس سرد بوسیله روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. برای این منظور از طرح مربع مرکزی<sup>3</sup> با تعداد 13 تیمار و 5 تکرار در نقاط مرکزی

استفاده گردید. فاکتورهای متغیر شامل فشار (14/35-35/87) مگاپاسکال) و زمان استخراج (6-2 دقیقه) و پاسخ ها آنتوسیانین، ویتامین ث، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی و بازده عصاره استخراج شده بودند. مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل مورد استفاده در جدول 1 نشان داده شده است. آنالیز داده ها با نرم افزار Design expert. 7.5.1 انجام شد. داده های تجربی با کمک مدل چند جمله ای درجه ی دوم زیر برازش داده شدند:

رابطه (3)

$$Y = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_{11} A^2 + b_{22} B^2 + b_{12} AB$$

در معادله فوق، Y بیانگر پاسخ های مورد نظر شامل محتوای ترکیبات فنولی (میلی گرم اسید گالیک در 100 میلی لیتر)، میزان آنتوسیانین (میلی گرم در لیتر)، درصد فعالیت آنتی اکسیدانی، مقدار ویتامین ث (میلی گرم در لیتر)، بازده استخراج (%) و  $b_n$  نشان دهنده ی ضرایب رگرسیون می باشد. این ضرایب اثرات خطی، دو جمله ای و نیز اثرات متقابل فاکتورهای متغیر فرآیند را بیان می کنند. مقادیر A و B نیز به ترتیب نشان دهنده ی فاکتورهای مستقل فرآیند شامل فشار (مگاپاسکال) و زمان (دقیقه) هستند.

جدول 1- مقادیر کد شده و سطوح متغیرهای مستقل فرآیند استخراج عصاره زرشک بوسیله پرس سرد

متغیرهای مستقل			کد و سطوح مربوطه		
	-1	0	+1		
فشار (A, مگاپاسکال)	14/35	25/11	35/87		
زمان (B, دقیقه)	2	4	6		

#### 3- نتایج و بحث

##### 3-1- برازش مدل

مدل مناسب با توجه به معنی دار بودن آزمون F ( $p \leq 0/01$ ) و معنی دار نبودن فقدان برازش<sup>4</sup> ( $P \geq 0/05$ ) در مورد آن و همچنین مقادیر  $R^2$  و  $R^2$  تعدیل شده و ضریب تغییرات انتخاب شد. معنی دار بودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی توسط مدل برازش نشده اند و نمی توان از مدل برای پیش گویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود. بنابراین با عدم معنی داری آزمون عدم برازش، می توان دریافت؛ مدل، به

1- Monopotassium phosphate -- KH2PO4

2- Retention times

3- Central composite

4- Lack of Fit

$(A^2)$  و  $(B^2)$  و نیز جمله‌ی اثر متقابل فشار و زمان  $(A-B)$  تاثیر معنی داری بر میزان استخراج نداشتند و از مدل حذف شدند. معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ بصورت زیر می باشد: رابطه (4)

$$Y = + 321/09 + 75/83 A + 92/99 B$$

این مشاهده با نتایج حاصل از تحقیقات Namrata و همکاران همخوانی دارد (13). این محققین نیز گزارش کردند افزایش فشار و زمان می تواند منجر به افزایش بازده ترکیبات فنولی استخراجی شود. افزایش محتوای ترکیبات فنولی در زمان های طولانی تر استخراج می تواند به دلیل آزاد شدن ترکیبات فنولی باند شده در دیواره ی سلولی و نیز شکل گیری واکنش های پلیمریزاسیون و تولید ترکیبات جدید باشد (17).

مقایسه مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیش بینی شده در شکل 1-ب نشان داده شده است. مشاهدات، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش بینی شده با روش آماری است.

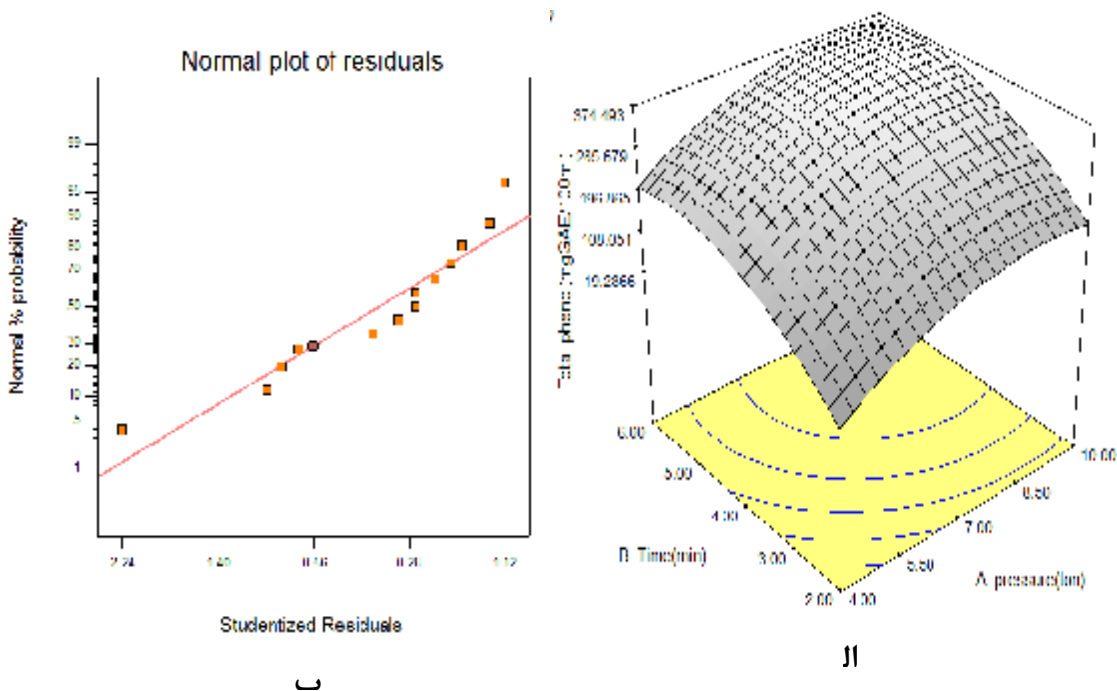
خوبی می تواند بر داده های مورد بررسی برازش شود (3). با توجه به جداول تجزیه واریانس می توان دریافت که مدل برازش داده شده برای تمام پارامترهای مورد بررسی کاملاً معنی دار بود ( $p \leq 0/01$ ) آزمون عدم برازش برای تمام پاسخ ها، معنی دار نبود، این نشان می دهد، مدل به کار رفته به خوبی روند داده‌ها را نشان می دهد.

### 3-2- محتوای ترکیبات فنلی

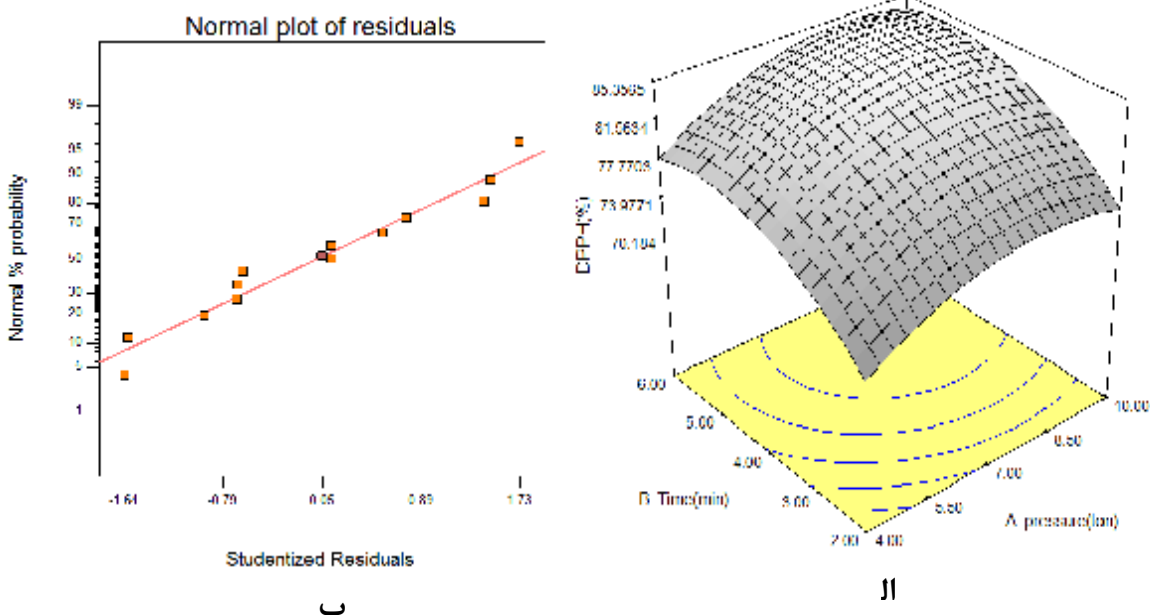
شکل 1-الف اثر فاکتورهای فشار و زمان بر میزان ترکیبات فنلی را نشان می دهد. افزایش فشار و زمان منجر به افزایش بازده استخراج ترکیبات فنلی شد. با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای فشار و زمان می توان دریافت که اثر مثبت زمان و فشار در فرایند استخراج ترکیبات فنولی تقریباً یکسان بوده است. جدول تجزیه واریانس (جدول 2) نیز نشان داد که جملات مربوط به اثرات خطی فشار  $(A)$  و زمان استخراج  $(B)$  تاثیر مثبتی بر میزان ترکیبات فنلی داشتند اما جملات مربوط به اثرات درجه دوم فشار

جدول 2- آنالیز واریانس مدل چند جمله ای درجه ی دوم - پارامتر میزان ترکیبات فنولی (میلی گرم اسید گالیک در 100 میلی لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	$11/258 \times 10^5$	5	25160/58	8/28	0/0075*
Intercept	321/09	-	-	-	-	-
A	75/83	34504/17	1	34504/17	11/35	0/0119
B	92/99	51878/50	1	51878/50	17/07	0/0044
A <sup>2</sup>	-59/54	9791/06	1	9791/06	3/22	0/1158
B <sup>2</sup>	-73/08	14751/23	1	14751/23	4/85	0/0635
AB	-0/42	0/69	1	0/69	$2/284 \times 10^4$	0/9884
Residual	-	21279/54	7	3039/93	-	-
Lack of Fit	-	4258/24	3	1428/41	0/34	0/8014 <sup>ns</sup>
Pure Error	-	16994/31	4	4248/58	-	-
Cor Total	-	$1/471 \times 10^5$	12	-	-	-
R-Squared	-	0/8553	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	0/7520	-	-	-	-
PRESS	-	68172/93	-	-	-	-
C.V.	-	21/22	-	-	-	-
Std. Dev.	-	55/14	-	-	-	-



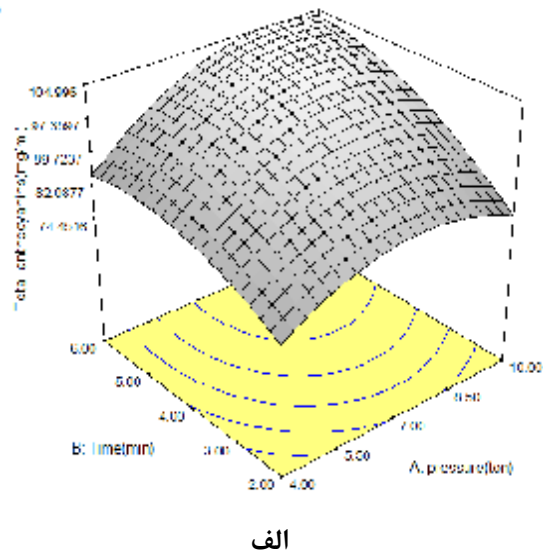
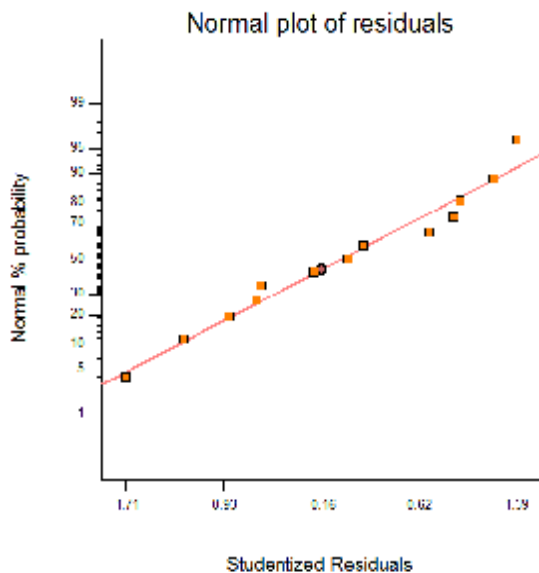
شکل 1- نمایش سه بعدی اثر فشار و زمان استخراج با پرس بر میزان ترکیبات فنلی (الف)، مقایسه مقادیر مشاهده شده ترکیبات فنلی با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل (ب)



شکل 2- نمایش سه بعدی اثر فشار و زمان استخراج با پرس بر فعالیت آنتی اکسیدانی (الف)، مقایسه مقادیر مشاهده شده فعالیت آنتی اکسیدانی با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل (ب)

جدول 3 - آنالیز واریانس مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم - پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH%)

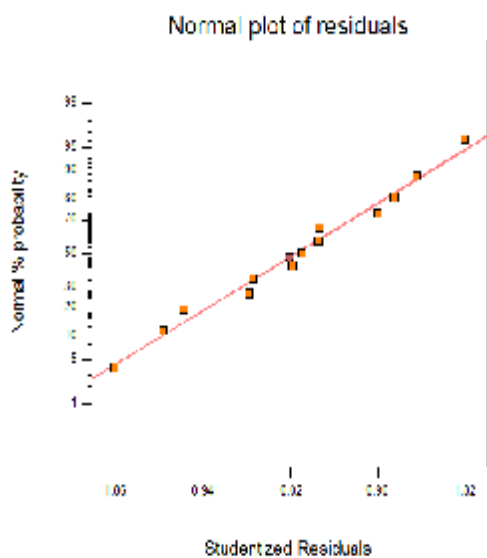
منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	251/95	5	50/39	84/12	0/0001*
Intercept	83/52	-	-	-	-	-
A	2/68	42/98	1	42/98	71/75	0/0001
B	4/19	105/11	1	105/11	175/48	0/0001
A <sup>2</sup>	-3/07	26/11	1	26/11	43/58	0/0003
B <sup>2</sup>	-3/72	38/25	1	38/25	63/85	0/0001
AB	0/32	0/42	1	0/42	0/70	0/4306
Residual	-	4/19	7	0/60	-	-
Lack of Fit	-	2/53	3	0/84	2/02	0/2538 <sup>ns</sup>
Pure Error	-	1/67	4	0/42	-	-
Cor Total	-	256/14	12	-	-	-
R-Squared	-	0/9836	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	0/9719	-	-	-	-
PRESS	-	28/12	-	-	-	-
C.V.	-	0/96	-	-	-	-
Std. Dev.	-	0/77	-	-	-	-



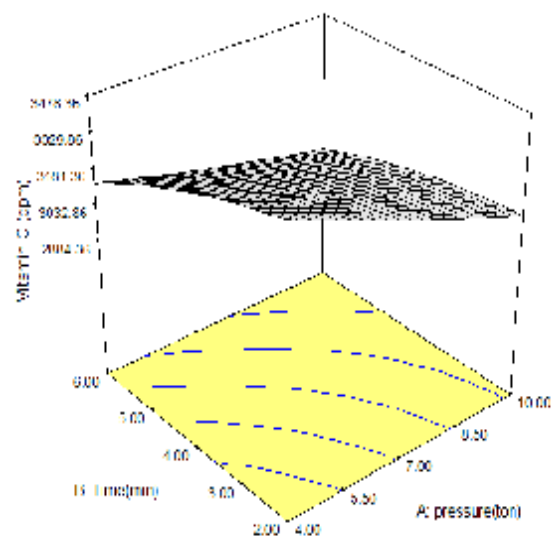
شکل 3- نمایش سه بعدی اثر فشار و زمان استخراج با پرس بر میزان آنتوسیانین (الف). ب- مقادیر مشاهده شده میزان آنتوسیانین با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل (ب)

جدول 4- آنالیز واریانس مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم - پارامتر میزان آنتوسیانین (میلی گرم در لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	1101/50	5	220/30	12/14	0/0024*
Intercept	98/61	-	-	-	-	-
A	5/96	213/47	1	213/47	11/76	0/0110
B	8/63	447/05	1	447/05	24/63	0/0016
A <sup>2</sup>	-8/04	178/71	1	178/71	9/85	0/0164
B <sup>2</sup>	-5/05	70/31	1	70/31	3/87	0/0897
AB	3/53	49/79	1	49/79	2/74	0/1416
Residual	-	127/03	7	18/15	-	-
Lack of Fit	-	35/41	3	11/80	0/52	0/6936 <sup>ns</sup>
Pure Error	-	91/62	4	22/91	-	-
Cor Total	-	1228/53	12	-	-	-
R-Squared	-	0/8966	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	0/8227	-	-	-	-
PRESS	-	494/18	-	-	-	-
C.V.	-	4/60	-	-	-	-
Std. Dev.	-	4/26	-	-	-	-



ب



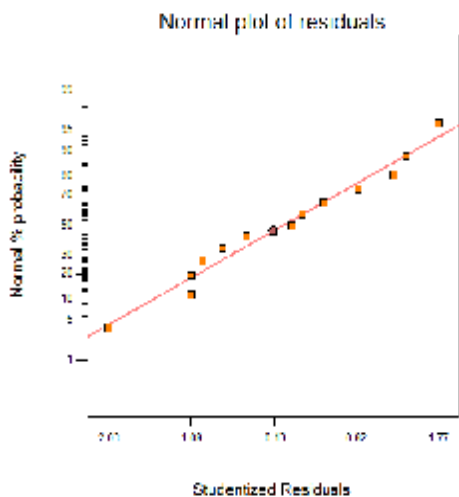
الف

شکل 4- نمایش سه بعدی اثر فشار و زمان استخراج با پرس بر میزان ویتامین ث (الف)، مقایسه مقادیر مشاهده شده میزان ویتامین ث با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل (ب)

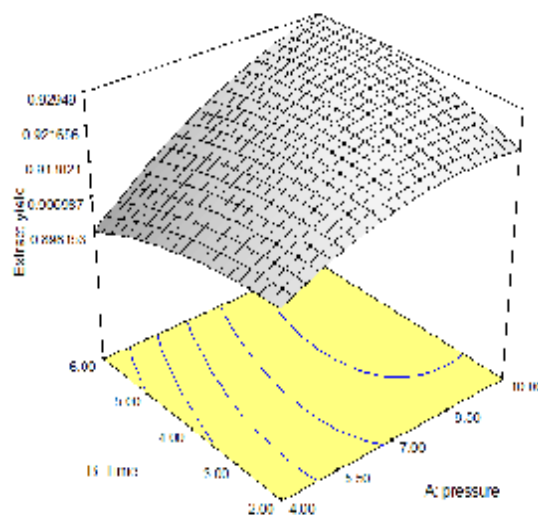


جدول 5- آنالیز واریانس مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم - پارامتر میزان ویتامین ث (میلی گرم در لیتر)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	$2/774 \times 10^5$	5	55472/28	33/91	0/0001*
Intercept	3165/69	-	-	-	-	-
A	-162/17	$1/578 \times 10^5$	1	$1/578 \times 10^5$	96/46	0/0001
B	-134/83	$1/091 \times 10^5$	1	$1/091 \times 10^5$	68.66	0/0001
A <sup>2</sup>	10/09	280/97	1	280/97	0/17	0/6910
B <sup>2</sup>	-35/91	3562/31	1	3562/31	2/18	0/1835
AB	-41/50	6889/00	1	6889/00	4/21	0/0793
Residual	-	11450/91	7	1635/84	-	-
Lack of Fit	-	6674/11	3	2224/70	1/86	0/2766 <sup>ns</sup>
Pure Error	-	4776/80	4	1194/20	-	-
Cor Total	-	$2/888 \times 10^5$	12	-	-	-
R-Squared	-	0/9604	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	0/9320	-	-	-	-
PRESS	-	62455/86	-	-	-	-
C.V.	-	1/28	-	-	-	-
Std. Dev.	-	40/45	-	-	-	-



ب



الف

شکل 5- نمایش سه بعدی اثر فشار و زمان استخراج با پرس بر بازده استخراج (الف)، مقایسه مقادیر مشاهده شده بازده استخراج با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل (ب)

جدول 6- آنالیز واریانس مدل چند جمله‌ای درجه‌ی دوم - پارامتر بازده استخراج (درصد)

منابع تغییر	ضریب	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob > F
Model	-	$8/959 \times 10^{-4}$	5	$1/792 \times 10^{-4}$	14/08	0/0015*
Intercept	0/92	-	-	-	-	-
A	0/011	$6/640 \times 10^{-4}$	1	$6/640 \times 10^{-4}$	52/18	0/0002
B	$-8/096 \times 10^{-4}$	$3/906 \times 10^{-6}$	1	$3/906 \times 10^{-6}$	0/31	0/5968
A <sup>2</sup>	$-4/552 \times 10^{-3}$	$5/723 \times 10^{-5}$	1	$5/723 \times 10^{-5}$	4/50	0/0716
B <sup>2</sup>	$-2/876 \times 10^{-3}$	$2/285 \times 10^{-5}$	1	$2/285 \times 10^{-5}$	1/80	0/2221
AB	$-5/053 \times 10^{-4}$	$1/021 \times 10^{-4}$	1	$1/021 \times 10^{-4}$	8/03	0/0253
Residual	-	$8/905 \times 10^{-5}$	7	$1/272 \times 10^{-5}$	-	-
Lack of Fit	-	$5/553 \times 10^{-5}$	3	$1/851 \times 10^{-5}$	2/21	0/2297 <sup>ns</sup>
Pure Error	-	$3/354 \times 10^{-5}$	4	$1/021 \times 10^{-4}$	-	-
Cor Total	-	$9/849 \times 10^{-4}$	12	-	-	-
R-Squared	-	0/9096	-	-	-	-
Adj R-Squared	-	0/8450	-	-	-	-
PRESS	-	$5/933 \times 10^4$	-	-	-	-
C.V.	-	0/39	-	-	-	-
Std. Dev.	-	$3/567 \times 10^3$	-	-	-	-

جدول 7- شرایط بهینه استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک بیدانه

pressure(mpa)	Time(min)	DPPH(%)	Total phenol (mgGAE/100ml)	Total anthocyanins (mg/l)	Vitamin C (ppm)	Extract yield (%)	Desirability
26	4/48	84/518	345/132	100/908	3118/55	0/92	0/783

### 3-3- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول 3)، جملات خطی زمان (B) و فشار (A) استخراج بیشترین تاثیر مثبت و جملات درجه ی دوم زمان (B<sup>2</sup>) و فشار (A<sup>2</sup>) دارای بیشینه تاثیر منفی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی بودند. اما جمله اثر متقابل فشار-زمان (A-B) تاثیر معنی داری در مدل برآزش داده شده نداشت. با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی دار، معادله برآزش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می باشد:

$$Y = +83/52 + 2/68 A + 4/19B - 3/07 A^2 - 3/72 B^2$$

با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای فشار و زمان می توان دریافت که زمان تاثیر مثبت بیشتری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده داشته است. جمله بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمان 6 دقیقه و فشار 35/87 مگاپاسکال به میزان 84/52 درصد مشاهده شد (شکل 2-الف). شکل 2-ب نشان می دهد که بین مقادیر حاصل از آزمایشات و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل، نزدیکی زیادی وجود دارد. با توجه به شکل 1-الف نیز می توان دریافت که تاثیر فاکتورهای فشار و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابه با اثر این فاکتورها بر میزان ترکیبات فنولی بوده است. علاوه بر این، همبستگی بالا (r= 0/86) میان بازده استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز این مشاهده را تایید می کند. محققین بسیاری گزارش کرده اند که میزان ترکیبات فنولی تاثیر بسزایی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که این امر بدلیل قابلیت احیا کنندگی بالای این ترکیبات و نیز توانایی دادن هیدروژن به رادیکال‌های فعالی نظیر DPPH می باشد (6) پس می توان اثر زمان‌های طولانی استخراج (در دمای بالاتر) را در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی براحتی توجیه نمود.

### 3-4- آنتوسیانین ها

در شکل 3-الف اثر فاکتورهای مستقل بر میزان آنتوسیانین استخراج شده نشان داده شده است. افزایش فشار و زمان استخراج منجر به افزایش بازده آنتوسیانین شد. با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای فشار و زمان می توان دریافت که زمان تاثیر مثبت بیشتری بر میزان آنتوسیانین های عصاره استخراج شده داشت. اثر افزایشی مشاهده شده توسط زمان را می توان به افزایش مدت

زمان انتقال جرم نسبت داد (10). با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 4)، جملات خطی زمان (B) و فشار (A) استخراج بیشترین تاثیر مثبت و جمله درجه ی دوم فشار (A<sup>2</sup>) بیشترین تاثیر منفی بر بازده آنتوسیانین را داشتند. اما جملات درجه دوم زمان (B<sup>2</sup>) و نیز جمله اثر متقابل فشار-زمان (A-B) تاثیر معنی داری بر میزان آنتوسیانین استخراج شده نداشتند. شکل 3-الف نشان می دهد بیشترین بازده استخراج آنتوسیانین در فشار 30/49 مگاپاسکال حاصل شد اما افزایش بیشتر فشار منجر به کاهش میزان آنتوسیانین گردید که این مشاهده منفی بودن اثر درجه ی دوم فشار را توجیه می کند. معادله برآزش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می باشد:

رابطه (6)

$$Y = + 98/61 + 5/96A + 8/63 B - 8/04 A^2$$

شکل 3-ب نیز همبستگی بالای بین اعداد حاصل از آزمایش و اعداد پیش بینی شده توسط مدل را نشان می دهد. همچنین بین مقدار آنتوسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده همبستگی بالا (r= 0/89) وجود داشت و با توجه به این همبستگی بالا افزایش مقدار آنتوسیانین با افزایش فشار را می توان توجیه نمود.

### 3-5- ویتامین ث

شکل 4-الف نشان می دهد که افزایش فشار و زمان منجر به کاهش میزان ویتامین ث گردیده است و شکل 4-ب نیز همبستگی بالای بین اعداد حاصل از آزمایش و اعداد پیش بینی شده توسط مدل را نشان می دهد با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 5)، تنها جملات خطی فشار (A) و زمان (B) تاثیر منفی معنی داری روی مقدار ویتامین ث داشتند و سایر جملات فاقد تاثیر معنی دار از مدل حذف شدند. با توجه به مدل برآزش داده شده برای پاسخ فوق نیز به صورت زیر بود:

رابطه (7)

$$Y = +3156/69 - 162/17A - 134/83 B$$

با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای فشار و زمان می توان دریافت که زمان تاثیر منفی بیشتری بر کاهش میزان ویتامین ث عصاره استخراج شده داشت. ضریب تبیین (R<sup>2</sup>) مدل پیش بینی شده در مورد پاسخ فوق 0/9604 و مقدار p برای آزمون فقدان

می‌دهد مطلوبیت بدست آمده در شرایط بهینه برای متغیرها و پاسخ‌های مورد آنالیز، 0/783 بود.

#### 4- نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان داد کاربرد روش سطح پاسخ برای تعیین شرایط بهینه استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک بی‌دانه روش بسیار مؤثر و قابل اعتمادی است. جهت پیش‌بینی رفتار نمونه‌ها، مدل چندجمله‌ای درجه‌ی دوم استفاده گردید. شرایط بهینه استخراج با پرس سرد فشار 26 مگاپاسکال و زمان 4/48 دقیقه بود. که در این شرایط میزان ترکیبات فنلی (345/132 میلی گرم اسید گالیک در 100 میلی لیتر عصاره)، آنتوسیانین (100/908 میلی گرم در لیتر)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (84/52 درصد)، ویتامین ث (3118/55 میلی گرم در لیتر) و بازده استخراج 92 درصد بود. نتایج نشان داد افزایش فشار تاثیر معنی داری روی افزایش پاسخ‌ها داشت و در همه موارد با افزایش فشار پاسخ‌ها به صورت خطی افزایش می‌یافت. با توجه به درصد بالای آنتوسیانین، ترکیبات فنلی و ویتامین ث و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه عصاره زرشک استخراج شده بوسیله پرس سرد می‌توان از این روش برای تولید محصولات طبیعی، بدون هیچ گونه اثری از وجود حلال و مواد آلوده یا مصنوعی استفاده کرد و برای تولید و فرمولاسیون اشکال مختلف خوراکی و دارویی از میوه زرشک اقدام نمود.

#### 5- منابع

- 1- مسکوکی، ع.م. 1377. طرح جامع (راهبردی)، مطالعاتی اصلاح، بهبود و توسعه فناوری فرآیند فرآوری زرشک و بسته‌بندی آن.
- 2- مسکوکی، ع.م. و مرتضوی ع. 1380. مطالعات جامع و استراتژیک (تولید، تبدیل و توزیع) زرشک بی‌دانه دانشگاه فردوسی مشهد - معاونت پژوهشی.
- 3- میلانی، ا. گلی موحد، غ. و حسینی، ف. 1391. کارایی روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی شرایط استخراج اینولین از گیاه شنگ. مجله پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد 21 شماره 1.
- 4- همتی کاخکی، ع. و حسین پور، س. ح. 1372. بررسی امکان استفاده از کنستانتزه زرشک در تهیه آب میوه و نوشابه گازدار،

برازش 0/2766 بود. این مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند به خوبی پاسخ مورد نظر را پیش‌بینی نماید. معنی دار نشدن اثرات درجه‌ی دوم، می‌توان وجود حالت خطی در منحنی کنتور را انتظار داشت (شکل 4-الف).

#### 3-6- بازده استخراج

شکل 5-الف اثر فاکتورهای مستقل بر بازده استخراج را نشان می‌دهد. افزایش فشار منجر به افزایش بازده استخراج شد. با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای فشار و زمان می‌توان دریافت که فشار تاثیر مثبت بیشتری بر افزایش بازده عصاره استخراج شده داشت. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 6)، جملات خطی فشار (A) و جمله اثر متقابل فشار- زمان (A-B) تاثیر معنی داری بر افزایش بازده استخراج داشتند. با توجه به شکل 5-الف می‌توان دریافت که بیشترین بازده استخراج در فشار 35/87 مگاپاسکال حاصل شده است. معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

رابطه (8)

$$Y = + 0/92 + 0/011A + 5/053 \times 10^{-3}AB$$

ضریب تبیین ( $R^2$ ) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق 0/9096 و مقدار p برای آزمون فقدان برازش 0/2297 بود. این مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند به خوبی پاسخ مورد نظر را پیش‌بینی نماید.

#### 3-7- بهینه‌سازی شرایط استخراج

در فرآیند استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک بیدانه بوسیله پرس سرد، دستیابی به بیشترین میزان ترکیبات فنولی، آنتوسیانین، ویتامین ث و نیز حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بازده استخراج به عنوان اهداف مورد نظر آزمایشات در تجزیه و تحلیل‌های آماری مورد نظر قرار گرفت. شرایط عملیاتی بهینه، با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی<sup>1</sup> انجام شد. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه‌سازی، سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل تنظیم گردید. با استفاده از تکنیک تابع مطلوبیت<sup>2</sup> بهترین پاسخ‌ها بدست آمد. نتایج شرایط بهینه استخراج ترکیبات زیست فعال میوه زرشک بیدانه در جدول 7 آورده شده است. جدول 7 نشان

1- Numerical optimization

2- Desirability function method

- 16-Shahidi, F. and Naczk, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 17-Spigno, G. and De Faveri, D. M. 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.*, 78: 793-801.
- 18-Wang, C. Shi, L. Fan, L. Ding, Y. Zhao, S. Liu, Y. and Ma, C. 2013. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum L.*) leaves. *Industrial Crops and Products* 42 : 587–594.
- 19-Wenqiang, G. Shufen, L. Ruixiang, Y. Shaokun, T. and Can, Q. 2007. Comparison of Essential Oils of Clove Buds Extracted with Supercritical Carbon Dioxide and other Three Traditional Extraction Methods”, *Food Chemistry* 101, pp. 1558-1564.
- زرشک، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز خراسان. شرکت شهید ایران.
- 5- AOAC. 2000. In: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17th edn.) (ed. W. Horwitz). AOAC International, Maryland, USA.
- 6- Cai, Y. Luo, Q. Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157–2184.
- 7- Chang, Y.C. Lee, C.L. and Pan, T.M. 2006. Statistical optimization of mediacomponents for the production of *Antrodia cinnamomea* AC06233 in submerged cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 72 :654-661.
- 8-Fuleki, T. and Francis, F.J.1968. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science* 33: 78-83
- 9- Galvez, A. Di Scala, K. Rodriguez, K. Mondaca, R.L. Miranda, M. Lopez, J. and Perez-Wan, M. 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). *Journal Of Food Chemistry*, 117: 647–653.
- 10- Gan, C.Y. and 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.
- 11- Herreroa, M. Mendiola, b. Jose, A. Cifuentes, A. and neza E. I. 2009. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *Journal of Chromatography*.
- 12-Melendez, A. J. Bejines, E. Vicario, I.M. and Heredia, F.J. 2004. Vitamin c in orange juices determined by hplc: influence of the wavelength of detection. *J. Food Sci.* n. 1, vol. 16 .
- 13-Namrata K, S. Lavu S, P. Ashok M, B. and Suvarna I, B. 2012. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *solanum melongena* linn. fruit and its evaluation of free radical scavenging activity. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. 2012; 3(8): 990-995.
- 14-Rajasekar, D. Akoh, C. C. Martino, K.G. and MacLean, D. D. 2012. Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia, *Food Chemistry* 133. 1383–1393.
- 15-Scalia, S. Giuffreda, L. and Pallado, P.1999. Analytical and Preparative Supercritical Fluid Extraction of Chamomile Flowers and its Comparison with Conventional Methods”, *Journal of Pharmacy Biomedical Analysis* 21, pp. 549-558.