

(مقاله پژوهشی)

بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز با استفاده از امواج فراصوت به روش سطح پاسخ

راحله دهقان تنها^۱، الهام مهدیان^۱، محمد حسین امینی فرد^۲، حسن بیات^{۳*} و رضا کاراژیان^۳

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۳- عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم و فناوری غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸

چکیده

امروزه استفاده از امواج فراصوت با توجه به اثرات مؤثر آن در نگهداری و فرآیند مواد غذایی رو به افزایش می‌باشد. فرآیند فراصوت، روش غیرحرارتی مؤثر در استخراج مواد می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی کارایی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی از فلفل قرمز و بهینه‌سازی شرایط استخراج به روش سطح پاسخ انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل زمان (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه)، دما (۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس) و شدت صوت (۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد) بودند. نتایج نشان داد میزان ترکیبات فنلی در فرآیند فراصوت دهی در دمای ۴۹ درجه سلسیوس، زمان ۳۹ دقیقه و شدت صوت ۸۹/۸ درصد دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنلی (۴۹/۶ میلی‌گرم در صد گرم فلفل) بود. همچنین با آزمون ۲ و ۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازین (DPPH) بیشترین میزان قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فلفل (۸۴/۹ درصد) تحت شرایط دمای ۳۰ درجه سلسیوس، زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۹۰ درصد بدست آمد که در مقایسه با نمونه شاهد (بدون فراصوت دهی) افزایش چشم‌گیری داشت. بنابراین امواج فراصوت می‌توانند تأثیر معنی‌داری بر استخراج متابولیت‌های ثانویه فلفل داشته باشد.

واژه های کلیدی: فلفل قرمز، فراصوت، بهینه‌سازی، ترکیبات فنلی، قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی.

۱-مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و یا سبب حذف آن‌ها می‌شوند و سلول‌های بدن را، از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می‌دارند و از این طریق، با روند پیری و ابتلا به بیماری‌های مختلف مبارزه می‌کنند. همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها در صنعت، به عنوان نگهدارنده مواد غذایی در جلوگیری از فساد و تغییر رنگ آن‌ها به کار می‌روند، بنابراین مدت زمان ماندگاری مواد غذایی را افزایش می‌دهند (۱۰). اخیراً عوارض نامطلوبی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی گزارش شده، از جمله اینکه در حیوانات آزمایشگاهی باعث سرطان زایی و آسیب کبدی شده است. بنابراین تلاش برای جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی منجر به بررسی آنتی‌اکسیدان‌هایی از منابع گیاهی شد (۷). مطالعات دانشمندان نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها و سبزیجات به مقدار کل ترکیبات فنلی آنها بستگی دارد. ترکیبات فنولیک گروه عمده از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که در قسمت‌های مختلف گیاه وجود دارند و دارای اثرات زیستی متعددی از قبیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی هستند (۴). از نقطه نظر استخراج ترکیبات مؤثره از محصولات کشاورزی، میزان استخراج ترکیبات فعال آنها از جمله ترکیبات فنلی بسیار مهم است و میزان حضور این ترکیبات در محصولات غذایی به صورت طبیعی یا غنی شده نشان دهنده ارزش غذایی آن محصول در حفظ سلامتی انسان است (۱). فرآیند فراصوت یک روش غیر حرارتی مؤثر در استخراج مواد می‌باشد. پدیده کاویتاسیون در فراصوت، نیروی برشی ایجاد می‌کند که دیواره‌های سلول را به صورت مکانیکی شکسته و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد. تأثیرات مکانیکی امواج فراصوت، سبب نفوذ بیشتر حلال به درون مواد درون سلولی گردیده و در نتیجه سرعت انتقال جرم را افزایش می‌دهد. بنابراین، امواج فراصوت سبب افزایش سرعت استخراج، مصرف کمتر حلال، محافظت ویژه از ترکیبات ناپایدار در برابر

حرارت و کاهش آلودگی محیط زیست می‌شود. شایان ذکر است که این فرآیند، دارای دقت بالا و بازدهی استخراج بیشتر نسبت به سایر روش‌های استخراجی مرسوم می‌باشد (۱۷). کاربرد روش فراصوت در شرایط آزمایشگاهی به طور وسیعی برای استخراج ترکیبات موثر گیاهان بررسی شده است. این روش برای استخراج مواد مؤثره‌ای همچون اسانس‌ها، روغن‌ها و پلی‌فنول‌ها از گیاهان استفاده شده است و براساس مطالعات انجام شده، فراصوت می‌تواند بازدهی استخراج را افزایش دهد (۲۹). پدرام‌نیا و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند که بیشترین مقدار آنتوسیانین در عصاره و تفاله‌ای که با استفاده از امواج فراصوت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان ۲۰ دقیقه استخراج شده بود، بدست آمد. همچنین با کاربرد امواج فراصوت، زمان فرآیند استخراج آنتوسیانین‌ها کاهش و سرعت آن افزایش یافت (۳). میلانی و همکاران (۱۳۹۱) در تحقیقی بهینه سازی استخراج اینولین از ریشه بابا آدم را توسط امواج فراصوت با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار دادند و اظهار داشتند که شرایط بهینه استخراج اینولین با اعمال امواج فراصوت در دمای ۳۶/۸ درجه سلسیوس، زمان ۲۵ دقیقه و شدت صوت ۸۳/۲ درصد تعیین شد و همچنین امواج فراصوت باعث بهبود استخراج اینولین شدند (۱۱). ساهین^۱ و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی شرایط بهینه استخراج پلی‌فنول‌ها از عصاره برگ زیتون به کمک امواج فراصوت را مورد بررسی قرار دادند. استخراج با استفاده از امواج فراصوت در حمام فراصوت با قدرت ۲۲۰ وات و فرکانس ۵۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط بهینه فرآیند شامل ۵۰۰ میلی‌گرم ماده جامد به ۱۰ میلی‌لیتر حلال در مدت ۶۰ دقیقه بود که در این آزمایش مقدار ۲۰۱/۲ میلی‌گرم عصاره در هر گرم ماده خشک و ۹۵/۵ درصد قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد بدست آمد (۲۴). شارما و گوپتا^۲ (۲۰۰۴) گزارش کردند که فراصوت یک پیش تیمار مناسب بوده و باعث افزایش بازدهی استخراج روغن از بادام و سبوس برنج

1 - Sahin

2 - Sharma and Gupta

می‌شود (۲۵). چیمات^۱ و همکاران (۲۰۰۴) در آزمایشی به بررسی سرعت استخراج کاروون^۲ و لیمونن^۳ به دست آمده از عصاره مرکبات با روش فراصوت پرداختند. نتایج آنها نشان داد که استفاده از امواج فراصوت با توجه به دمای بکار رفته، باعث افزایش سرعت استخراج به میزان ۱/۳ تا ۲ برابر نسبت به روش‌های مرسوم گردید (۱۶). در مطالعه ای که توسط وانگ^۴ و همکاران (۲۰۰۸) بر روی بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی از پوسته گندم با استفاده از حمام فراصوت صورت گرفت، بهترین شرایط استخراج، غلظت اتانول ۶۴ درصد، دمای ۶۰ درجه سلسیوس و زمان ۲۵ دقیقه گزارش شد که زمان استخراج بیشترین پارامتر معنی‌دار برای فرآیند بود (۳۰). شوتیپراک^۵ و همکاران (۲۰۰۱) امکان استفاده از فراصوت را برای استخراج منتول^۶ از گیاه نعنای با روش سنتی استخراج مطالعه و گزارش نمودند گیاهان فراصوت شده به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در حمام فراصوت ۴۰ کیلوهرتز، تقریباً ۱۷/۸ میکروگرم منتول در هر گرم بافت برگ آزاد کردند (۲ درصد کل محصول). زمانی که دما از ۲۲ درجه سلسیوس به ۳۹ درجه افزایش یافت، میزان منتول استخراجی از ۲ به ۱۲ درصد کل محصول افزایش یافت (۲۶). مورلا^۷ و همکاران (۲۰۱۲) بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی در مربای انگور قرمز با استفاده از امواج فراصوت با روش سطح پاسخ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج با استفاده از روش سطح پاسخ نشان داد که بهترین ترکیب برای بهینه‌سازی، اتانول ۶۰٪ با زمان استخراج ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به دست آمد (۲۲). باربرو^۸ و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایشی استخراج کاپسایسینوئیدهای^۹ فلفل تند را به کمک امواج فراصوت

مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که بهترین تیمار برای استخراج، در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان استخراج ۱۰ دقیقه و با حلال متانول می‌باشد (۱۳). بیمکر^{۱۰} و همکاران (۲۰۱۲) پژوهشی در مورد بهینه‌سازی استخراج روغن خام از دانه خربزه زمستانی و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به کمک امواج فراصوت انجام دادند که نتایج آنها نشان داد شرایط بهینه استخراج در سطح قدرت ۶۵ درصد، دمای ۵۲ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۶ دقیقه می‌باشد (۱۴). داس^{۱۱} (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای شرایط بهینه استخراج فلاونوئیدهای کل و خواص آنتی‌اکسیدانی دانه گیاه شنبلیله را به کمک امواج فراصوت مورد بررسی قرار داد و گزارش کرد که شرایط مطلوب برای استخراج بهینه فلاونوئیدهای کل، استفاده از متانول ۷۰ درصد، مدت زمان ۵۰ دقیقه و نسبت ۳۰ درصد مایع به جامد می‌باشد (۱۸). یکی از گیاهانی که امکان بررسی و مطالعه بیشتر از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی برای آن وجود دارد گیاه فلفل قرمز است. این گیاه یکی از سبزیجات مهم خانواده سولاناسه است که میوه آن دارای مقادیر زیادی متابولیت‌های ثانویه (فنل، آنتی‌اکسیدانها و فلاونوئید) می‌باشد. فلفل حاوی ۱/۵ درصد ترکیبات اولئورزینی است. مهم‌ترین ترکیب اولئورزینی فلفل قرمز کاپسانتین می‌باشد که ساختمان فنلی دارد و به میزان ۰/۰۲ درصد در فلفل وجود دارد و هر چه هوای محل کشت آن گرم باشد این ماده بیشتر تولید شده و فلفل تندتر می‌شود. ترکیبات مهم دیگر فلفل شامل کاروتنوئید، کمی اسانس و ویتامین‌های C و A است که آنتی‌اکسیدان‌هایی قوی هستند و بر روی رادیکال‌های آزاد تاثیر می‌گذارند (۶). هدف از انجام این تحقیق، عصاره‌گیری از فلفل قرمز به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با استفاده از حلال و به کمک امواج فراصوت بود. به عبارت دیگر منظور از این مطالعه، بررسی کارایی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی استخراج شده از فلفل قرمز و بهینه‌سازی شرایط استخراج به

- 1 - Chemat
- 2- Carvone
- 3- Limonene
- 4 - Wang
- 5 - Shotipruk
- 6- Menthol
- 7 - Morella
- 8 - Barbero
- 9- Capsaicinoids

۲-۳- استخراج به کمک فراصوت

در روش استخراج به کمک فراصوت، با استفاده از حمام فراصوت مدل Transsonic Elma T1H20، قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنل کل میوه مشابه روش استخراج با حلال و از طریق آزمونهای شیمیایی تعیین شد. بدین منظور، پودر فلفل تهیه شده با حلال متانول به نسبت ۱ به ۵ مخلوط گردید و به کمک همزن با دور ۲۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ ساعت هم زده و توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. سپس عصاره (تیمارها) در حمام فراصوت و در معرض امواج آن، برای زمانهای مختلف (۴۰ و ۲۵، ۱۰ دقیقه) و دماهای متفاوت (۵۰ و ۴۰، ۳۰ درجه سلسیوس) و شدت صوت های مختلف (۹۰ و ۶۰، ۳۰ درصد) قرار گرفتند و عمل استخراج صورت گرفت. توان دستگاه ثابت و ۳۵ کیلوهرتز بود. سپس عصاره‌ها توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. در نهایت برای تبخیر حلال، از آن تحت خلأ با دمای ۵۰ درجه استفاده گردید (۹).

۲-۴- قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی میوه

ارزیابی مهار رادیکال‌های DDPH که در واقع اندازه گیری توانایی ترکیبات احیاکننده مانند فنول‌ها جهت انتقال اتم هیدروژن به رادیکال می‌باشد، معمول‌ترین روش برای محاسبه قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اساس این روش بر پایه بی‌رنگ شدن محلول DDPH است که توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره انجام می‌شود. برای تعیین فعالیت آنتی رادیکالی از طریق آزمون DDPH از معرف ۲و۲ - دی فنیل پیکریل‌هیدرازین استفاده می‌شود (۲۸). شرایط کار بدین صورت بود که عصاره تهیه شده از مرحله قبل، ابتدا در دستگاه سانتیفریوژ مدل Sigma and Heralab، ساخت آلمان، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت. سپس در مرحله بعد به ۰/۱ میلی لیتر از قسمت روشن‌آور محلول، ۴ میلی لیتر محلول DDPH اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Biochrom، ساخت انگلستان، در طول موج ۵۱۷

روش سطح پاسخ بود و علاوه بر این کارایی استخراج ترکیبات فوق الذکر با دو روش استفاده از حلال و امواج فراصوت مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

۲-مواد و روش ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، فلفل قرمز گونه Capsicum annum var. Red chili تهیه شده از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، حلال متانول از شرکت پارس شیمی، معرف فولین سیو کالتو از شرکت مرک آلمان، گالیک اسید و معرف دی فنیل پیکریل‌هیدرازین^۱ و کربنات سدیم از شرکت سیگما بود.

۲-۱- آماده سازی میوه فلفل برای استخراج

هنگامی که میوه‌های فلفل تند در اواسط مرداد ماه، کاملاً قرمز و رسیده شدند، برداشت میوه‌ها صورت گرفت و سپس برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر، ابتدا میوه‌ها به چهار قسمت مساوی تقسیم شده و سپس در آن با دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید (دمای بالاتر از ۵۰ درجه سلسیوس تأثیر منفی بر روی ترکیبات فنلی دارد). نمونه‌های خشک شده با آسیاب برقی پودر شدند تا زمان انجام آزمایشات در دمای فریز نگهداری شد (۲).

۲-۲- استخراج با حلال (روش غرقابی)

در این روش با استفاده از حلال متانول، قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنل کل میوه با آزمون‌های شیمیایی تعیین شد. بدین منظور، پودر فلفل تهیه شده با حلال متانول به نسبت ۱ به ۵ مخلوط گردید و به کمک همزن با دور ۲۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ ساعت هم‌زده و توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. در نهایت برای تبخیر حلال، از آن تحت خلأ (ساخت ایران، آریا طب) با دمای ۵۰ درجه استفاده گردید (۹).

دقیقه روی شیکر گذاشته و در نهایت میزان جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد و از اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده گردید. میزان ترکیبات فنلی کل از روی منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره بیان شد.

۲-۶- روش آماری طرح

به منظور بررسی اثر متغیرهای موردنظر (دما، زمان و شدت صوت) بر روی مقدار ترکیبات فنلیک و درصد آنتی‌اکسیدانی میوه فلفل و همچنین بهینه‌سازی فرایند استخراج از روش سطح پاسخ استفاده شد و نرم افزار مورد استفاده Design Expert نسخه 6.02 بود. بر اساس طرح RSM، مدل Box-Behnken جهت کسب حداکثر اطلاعات، با انجام حداقل آزمایشات برای بررسی ۳ متغیر در ۳ سطح انتخاب شد و ۲۰ آزمون جهت بررسی روند میزان استخراج و تعیین شرایط بهینه انجام شد (جدول ۱).

نانومتر قرائت شد. درصد گیرندگی رادیکال آزاد DDPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصدگیرندگی رادیکال آزاد DDPH} = 1 - \frac{A_{\text{sample}(517\text{nm})}}{A_{\text{control}(517\text{nm})}} \times 100$$

۲-۵- ترکیبات فنلی کل میوه

میزان فنل کل میوه با روش فولین سیکالتو اندازه گیری شد (۲۷). شرایط کار بدین صورت بود که عصاره تهیه شده از مرحله قبل، ابتدا در دستگاه سانتریفیوژ مدل Sigma and Heralab، ساخت آلمان، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت. در مرحله بعد، به ۰/۱ میلی لیتر از قسمت محلول شناور رویی، ۰/۴ میلی لیتر فولین ۵۰ درصد اضافه گردید. سپس محلول به مدت یک دقیقه ورتکس شد و بعد از ۳ دقیقه، یک میلی لیتر کربنات سدیم ۲ درصد به این محلول اضافه شد، و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری گردید و دوباره محلول را به مدت یک

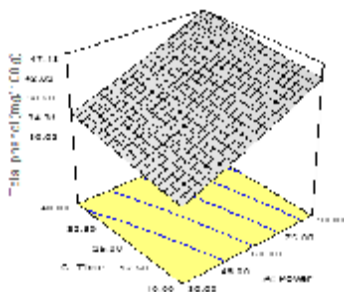
جدول ۱- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر پاسخ ها

تیمار	شدت (A) (درصد)	دما (B) (درجه سلسیوس)	زمان (C) (دقیقه)	میزان گیرندگی رادیکال آزاد DPPH (درصد)	ترکیبات فنلی کل (میلی گرم بر صدگرم)
۱	۶۰	۵۰	۲۵	۷۴/۲۵	۴۲/۴۴
۲	۳۰	۳۰	۴۰	۷۲/۳۹	۳۲/۹۵
۳	۳۰	۴۰	۲۵	۷۰/۴۱	۳۱/۳۵
۴	۹۰	۳۰	۴۰	۸۱/۰۳	۴۶/۲۴
۵	۶۰	۴۰	۲۵	۷۶/۹۸	۳۹/۵۴
۶	۶۰	۴۰	۲۵	۷۴/۸۴	۳۸/۴۷
۷	۶۰	۴۰	۲۵	۷۷/۶۹	۴۱/۶۸
۸	۶۰	۴۰	۲۵	۷۳/۸۰	۳۶/۹۸
۹	۶۰	۴۰	۱۰	۷۶/۲۲	۳۴/۲۵
۱۰	۶۰	۳۰	۲۵	۷۵/۶۶	۳۳/۷۵
۱۱	۹۰	۵۰	۴۰	۷۸/۶۷	۴۹/۵۱
۱۲	۳۰	۵۰	۱۰	۷۵/۴۱	۳۲/۰۱
۱۳	۳۰	۳۰	۱۰	۷۸/۳۲	۳۰/۵۹
۱۴	۹۰	۴۰	۲۵	۸۰/۹۶	۴۴/۴۱
۱۵	۶۰	۴۰	۲۵	۷۶/۷۴	۳۷/۵۲
۱۶	۳۰	۵۰	۴۰	۶۹/۳۴	۳۶/۸۴
۱۷	۶۰	۴۰	۲۵	۷۶/۳۲	۳۹/۲۹
۱۸	۹۰	۳۰	۱۰	۸۷/۵۲	۴۳/۱۴
۱۹	۶۰	۴۰	۴۰	۷۵/۳۸	۴۰/۶۵
۲۰	۹۰	۵۰	۱۰	۸۲/۲۳	۴۷/۸۹

۳- نتایج و بحث

۳-۱- انتخاب بهترین مدل

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری توسط روش سطح پاسخ از بخش مدل مناسب نشان داد که مدل خطی برای آزمون های اندازه گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی دار با سایر مدل ها بود و این مدل جهت آنالیز آماری آزمون ها انتخاب شد. پس از انتخاب بهترین مدل، جهت تعیین معادله کلی با توجه به جدول ANOVA پارامتری که آزمون F برای آن معنی دار نباشد ($P>0.01$) از مدل حذف شد و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی دار در سطح (۹۹٪) بودند در مدل نگهداری شد. سپس معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتر حاصل گردید (۲۱).



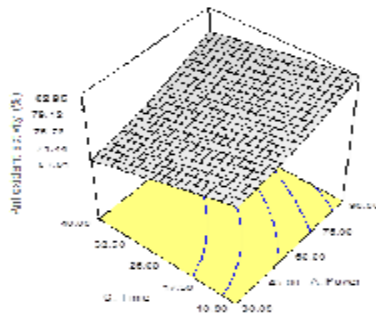
شکل ۱- اثر همزمان دو متغیر دما و شدت صوت بر مقدار استخراج ترکیبات فنلی.

نتایج نشان داد که با افزایش زمان و شدت صوت مقدار استخراج ترکیبات فنلی افزایش می یابد (شکل ۲). فاکتور زمان مدت انتقال جرم را افزایش می دهد، بنابراین روند صعودی استخراج ترکیبات فنلی از میوه فلفل با افزایش زمان با توجه به نمودار سطح پاسخ کاملاً منطقی به نظر می رسد. در زمان های بالاتر به دلیل وقوع اکسیداسیون و به علت در معرض امواج فراصوت قرار گرفتن در مدت طولانی، میزان استخراج کاهش می یابد (۲۳). گو^۲ و همکاران (۲۰۰۷) در انتخاب بهترین زمان برای استخراج کاتکین ها و کافئین از نمونه های چای با روش استخراج به کمک اولتراسوند، ۵ زمان را مورد مطالعه قرار دادند که نتایج نشان دهنده یک روند افزایشی در میزان استخراج کاتکین ها و کافئین با افزایش زمان وجود داشت (۱۹). همچنین در بهینه سازی استخراج ترکیبات فنلی از سبوس گندم به کمک روش فراصوت، وانگ و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که میزان استخراج ترکیبات فنلی از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه به طور معنی داری افزایش یافت (۳۰).

۳-۲- اثر زمان، شدت و دمای فراصوت دهی بر روی استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز

با توجه به شکل ۱ که اثر همزمان دو متغیر دما و شدت صوت را بر مقدار استخراج ترکیبات فنلی نشان می دهد، مشاهده می شود که با افزایش دما و شدت صوت مقدار استخراج ترکیبات فنلی افزایش می یابد. بونکرد^۱ و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که با افزایش دما از ۳۰ به ۴۵ درجه سلسیوس، استخراج ترکیبات فنلی افزایش می یابد. آنها شرایط مناسب استخراج ترکیبات فنلی را با روش فراصوت در فرکانس ۳۵ کیلوهرتز، حلال اتانول ۹۵ درصد، دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۳ ساعت تعیین کردند که در این شرایط ۸۵ درصد از کاپسایسینوئیدهای فلفل استخراج شد که در مقایسه با دو روش سوکسله (۵ ساعت) و غوطه وری (۱۵ ساعت)، زمان کاهش چشم گیری داشت (۱۵). باربرو و همکاران (۲۰۰۸) نیز در تحقیقی که به منظور استخراج کاپسایسینوئیدهای فلفل به کمک امواج فراصوت انجام دادند، بهترین تیمار برای استخراج را در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با حلال متانول گزارش کردند که با نتایج

قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی در شدت صوت ۹۰ درصد مشاهده شد. شدت صوت یکی از فاکتورهای مؤثر در افزایش میزان قدرت ترکیبات آنتی اکسیدان فلفل می باشد که علت آن می تواند مربوط به نیروی برشی ایجاد شده و محتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آن ها در شکستن و متلاشی کردن دیواره های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات آن ها به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم باشد. فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات می شود که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می یابد (۲۰).



شکل ۴- اثر همزمان دو متغیر شدت صوت و زمان بر درصد آنتی اکسیدانی فلفل قرمز.

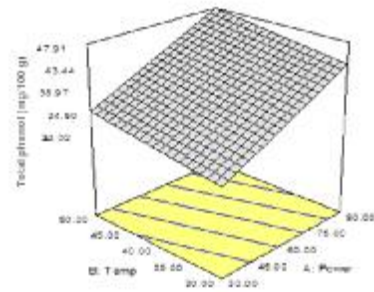
۳-۴- بهینه یابی

نتایج حاصل از آنالیز توسط روش سطح پاسخ به منظور استخراج هر چه بیشتر ترکیبات فنلی از میوه فلفل حاکی از آن بود که شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات فنلی، زمان ۳۹ دقیقه، شدت صوت ۸۹/۸ درصد و دمای ۴۹/۹ درجه سلسیوس می باشد. تحت این شرایط میزان استخراج ترکیبات فنلیک ۴۹/۶۳ میلی گرم درصد گرم پودر فلفل پیش بینی شد (جدول ۲). کمترین مقدار ترکیبات فنلی برابر با ۳۰/۵ میلی گرم در صد گرم بود که به تیماری در شدت صوت ۳۰/۷ درصد، دمای ۳۸/۶ درجه و زمان ۱۲ دقیقه مربوط بود.

در پایان معادله کلی مدل خطی به صورت زیر بدست آمد:
معادله ۱

$$Y = 13.63 + 0.22 A + 0.22 B + 0.12 C$$

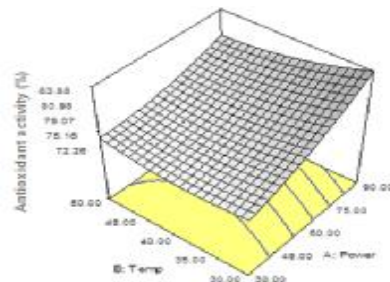
A=power B=temp C=time



شکل ۲- اثر زمان و شدت صوت بر روی میزان استخراج ترکیبات فنلی.

۳-۳- اثر زمان، شدت و دمای فراصوت دهی بر قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی

قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی میوه با افزایش دما کاهش، ولی با افزایش شدت صوت، افزایش یافت. (شکل ۳). نتایج حاصله با آزمایشات بونکرد و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد که اظهار داشتند سرعت استخراج کاپسایسینوئیدهای فلفل قرمز که آنتی اکسیدان های قوی می باشند، در ۵ دقیقه اول استخراج خیلی بالا بود و سپس با گذشت زمان بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافت و همچنین استفاده از دما و زمان پایین تر باعث افزایش در درصد آنتی اکسیدانی میوه فلفل گردید (۱۵).



شکل ۳- اثر همزمان دو متغیر دما و شدت صوت بر قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی فلفل قرمز.

شکل ۴ نشان دهنده اثر شدت صوت و زمان بر قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی فلفل است و همان طور که مشاهده می شود قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی با افزایش زمان، روندی نزولی داشت، ما با افزایش شدت صوت، این فاکتور به طور چشم گیری افزایش یافت، بطوریکه بالاترین درصد

به طور کلی، نتایج حاکی از آن بود که فاکتور شدت صوت، نسبت به دو فاکتور دیگر بیشترین تأثیر را بر میزان استخراج ترکیبات فنلی میوه فلفل داشته است و فاکتور زمان تأثیر کمتری نسبت به دو فاکتور دیگر داشت.

جدول شماره ۲- نتایج بدست آمده از فرآیند بهینه سازی برای ترکیبات فنلی.

نقاط بهینه	شدت صوت (درصد)	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	فنل کل (میلی گرم بر صد گرم)
۱	۸۹/۸۴	۴۹/۹۲	۳۹/۳۷	۴۹/۶۳
۲	۹۰	۴۹/۹۰	۳۹/۱۱	۴۹/۶۴
۳	۸۹/۶۶	۴۹/۸۰	۳۹/۱۶	۴۹/۵۲
۴	۸۹/۹۱	۴۹/۹۱	۳۸/۳۷	۴۹/۵

قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی فلفل ۸۴/۹۵ درصد پیش بینی شد. کمترین مقدار قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی ۶۹ درصد، که مربوط به تیماری در شدت صوت ۳۴ درصد، دمای ۴۸ درجه سلسیوس و زمان ۳۹ دقیقه بود (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه توسط روش سطح پاسخ نشان داد که بیشترین قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی در میوه فلفل قرمز در شرایط بهینه، زمان ۱۰ دقیقه، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شدت صوت ۹۰ درصد می باشد. تحت این شرایط میزان

جدول ۳- نتایج بدست آمده از فرآیند بهینه سازی برای قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی.

نقاط بهینه	شدت صوت (درصد)	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی (%)
۱	۹۰	۳۰	۱۰	۸۴/۹۵
۲	۹۰	۳۰/۰۱	۱۰/۱۶	۸۴/۹۳
۳	۸۹/۸۳	۳۰	۱۱/۱۴	۸۴/۷۵
۴	۹۰	۳۲	۱۰	۸۴/۵۸

ساتی گراد، زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۹۰ درصد انتخاب شد.

در پایان معادله کلی مدل خطی به صورت زیر بدست آمد:
معادله ۲:

$$Y = 77.56 + 0.14 A - 0.14 B - 0.15 C$$

$$A = \text{power} \quad B = \text{temp} \quad C = \text{time}$$

۳-۵- مقایسه دو روش استخراج فراصوت و غوطه وری بر مقدار کل ترکیبات فنلی و قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی فلفل قرمز

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنلی با روش های غرقابی و فراصوت حاکی از آن بود که روش استخراج تأثیر بسزایی بر میزان این ترکیبات دارد و روش فراصوت

به طور کلی نتایج حاکی از آن بود که فاکتور شدت صوت، نسبت به دو فاکتور دیگر بیشترین تأثیر را بر روی درصد قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی میوه فلفل داشته است. شرایط بهینه استخراج با فراصوت برای ترکیبات فنلی و قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی فلفل قرمز، دمای ۵۰ درجه

می باشد. نتایج تحقیقات فیاض مهر و همکاران (۱۳۹۱) تأییدکننده نتایج فوق است. آنها در مطالعه ای به بررسی تأثیر امواج فراصوت بر مقدار و قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی لیکوپن استخراج شده از گوجه فرنگی پرداختند. نتایج بالاترین مقدار و قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی لیکوپن استخراجی را مربوط به تیماری که با فراصوت پیش تیمار شده بود در کمترین زمان (۱۰ دقیقه) پیش بینی کردند (۸). همچنین مورلا و همکاران (۲۰۱۲) بهینه سازی استخراج ترکیبات فنلی و قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی در انگور قرمز را با استفاده از امواج فراصوت با روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار دادند. نتایج بیانگر این بود که با روش فراصوت، میزان قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی انگور قرمز در مقایسه با روش غرقابی افزایش زیادی داشت و استفاده از این امواج باعث کاهش قابل توجهی در زمان استخراج (از ۱۰ ساعت به ۳۰ دقیقه) نسبت به روش های سنتی گردید (۲۲).

۴- نتیجه گیری

نتایج آزمون‌ها نشان داد که استخراج به روش فراصوت به دلیل مصرف انرژی کمتر و کارایی بالاتر نسبت به روش استخراج با حلال، جایگزینی مناسبی از نظر استخراج ترکیبات فنلی و درصد قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی فلفل قرمز می باشد. لذا استخراج به کمک امواج فراصوت، یک ابزار قدرتمند برای استخراج ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی از این گیاه می باشد. شرایط بهینه استخراج با فراصوت برای فلفل قرمز دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، زمان ۱۰ دقیقه و شدت صوت ۹۰ درصد انتخاب شد. همچنین مشخص گردید که از میان متغیرهای مورد بررسی در این تحقیق، شدت صوت بیشترین تأثیر را بر میزان استخراج داشته است. مدل های تجزیه و تحلیل آماری در روش سطح پاسخ برای ۲ پارامتر اندازه گیری شده، مدل خطی بود که با ضریب تبیین بالایی داده ها را برازش کرد. در طرح نمودار سطح پاسخ با افزایش متغیرهای دما و زمان، روند استخراج ترکیبات فنلی افزایش ولی درصد قدرت ترکیبات

ترکیبات فنلی بیشتری را نسبت به روش غرقابی استخراج کرده است. همچنین می توان اظهار کرد که تنش برشی حاصل از امواج ما فوق صوت باعث شکسته شدن مولکول های پلیمری بزرگ و در نتیجه باعث استخراج بهتر ترکیبات فنلی نسبت به روش غرقابی می شود (۵). با توجه به نتایج تیمارهای فراصوت در دماها، زمان ها و شدت صوت های متفاوت، مقدار ترکیبات فنلی از ۳۱ تا ۴۹ میلی گرم به ازای صد گرم از پودر فلفل می باشد در حالی که در نمونه شاهد (بدون حمام فراصوت) مقدار این ترکیبات ۲۵ میلی گرم بر گرم پیش بینی شد. این نتایج با گزارش آلبو^۱ و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت که گزارش کردند استفاده از روش فراصوت باعث افزایش کارنوسیک اسید استخراج شده از رزماری می شود (۱۲). یاکین^۲ و همکاران (۲۰۰۹) نیز با بررسی روند استخراج ترکیبات فنلی از نارنگی بیان کردند که استفاده از امواج فراصوت باعث افزایش معنی داری در استخراج ترکیبات فنلی نسبت به روش غرقابی شده است (۳۱). بیمکر و همکاران (۲۰۱۲) پژوهشی در مورد بهینه سازی استخراج روغن خام از دانه خربزه زمستانی و بررسی قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی آن به کمک امواج فراصوت انجام دادند و گزارش کردند که شرایط بهینه استخراج در سطح قدرت ۶۵ درصد، دمای ۵۲ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۶ دقیقه می باشد. همچنین قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی و محتوای کل ترکیبات فنلی روغن خام با استفاده از امواج فراصوت بسیار بالاتر نسبت به روش سوکسله بود (۱۴). نتایج حاصل از مقایسه این دو روش نشان داد که روش فراصوت اثر بیشتری بر افزایش درصد قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی نسبت به روش غوطه وری داشته است بطوریکه درصد قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی نمونه شاهد (بدون حمام فراصوت) برابر با ۶۶/۳ درصد بود که نسبت به مقدار بهینه پیش بینی شده توسط نرم افزار کاهش زیادی داشت. افزایش درصد قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی در تیمارهای فراصوت شده، به دلیل اعمال شدت صوت و زمان کوتاه فرایند نسبت به روش غوطه وری

۱۰. مرادی نژاد، ف. ۱۳۹۰. آنتی اکسیدانها، انقلابی برای سلامتی. مؤسسه انتشارات شعرا. ۱۳۰ ص.
 ۱۱. میلانی، ا.، کدخدایی، ر.، گلی موحد، غ. و حسینی، ف. ۱۳۹۱. بهینه سازی استخراج اینولین از ریشه بابا آدم توسط امواج فراصوت با استفاده از روش سطح پاسخ. فصلنامه گیاهان دارویی، جلد ۱۱، شماره ۲، ۷۶-۷۸.

12. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, P. and Mason, J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11:261-265.

13. Barbero, G.F., Liqid, A., Palma, M. and Barroso, C.G. 2008. Ultrasound- assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75:1332-1337.

14. Bimakr, M., Abduirahman, R. and Taibe, F. 2012. Optimization of ultrasound- assisted extraction of crude oil from winter melon seed using response surface methodology. *Molecules*, 17:11749-11756.

15. Boonkird, S., Phisalaphong, C. and Phisalaphong, M. 2008. Ultrasound- assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum Frutescens* on a lab and pilot-plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 1075-1079.

16. Chemat, S., Lagha, A., Aitamar, H., Bartels, P.V. and Chemat, F. 2004. Comparison of conventional and ultrasound - assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavors and Fragrance Journal*, 19:188-195.

17. Chemat, F., Huma, Z. and Khan, M.K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18:813-835.

18. Das, S. 2013. Optimization of ultrasound- assisted extraction of total flavonoides and antioxidant properties from *Trigonella Foenum* seeds with response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(11):4308-4318.

19. Gu, X., Cai, J., Zhang, Z. and Su, Q. 2007. Dynamic ultrasound-assisted extraction of catechins and caffeine in some tea samples. *Annali di Chemical*, 97:321-330.

آنتی اکسیدانی کاهش یافت. همچنین افزایش متغیر شدت صوت باعث افزایش درصد قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی و استخراج ترکیبات فنلی در فلفل قرمز گردید

۵- منابع

۱. امیدبگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فراوری گیاهان دارویی. مؤسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی، چاپ اول.
 ۲. امینی فرد، م. ح. ۱۳۹۲. بررسی و مقایسه اثر کودهای مختلف آلی بر خصوصیات مورفولوژی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی فلفل تند و شیرین. پایان نامه دکتری باغبانی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. پدرام نیا، ا.، شریفی، ا. و توکلی پور، ح. ۱۳۸۹. بهینه سازی فرایند استخراج آنتوسیانین زرشک در حضور امواج فراصوت. مجله علوم و فناوری غذایی. جلد ۲، شماره ۵۲، ۴۵-۱

۴. پیوست، غ. ۱۳۸۱. سبزیکاری (تألیف). چاپ دوم، نشر علوم کشاورزی.

۵. زندی، م. و نیا کوثری، م. ۱۳۸۹. بررسی کارایی سیستم های فراصوت در فرایندهای مواد غذایی. مجله کشاورزی و غذا، جلد ۱۰۶، ۸۳-۸۰

۶. شریعتی، ا.، پردلی، ح. ر.، خادمیان، آ. ن. و آیدانی، م. ۱۳۸۹، ارزیابی پتانسیل عصاره گونه های *Capsicum annum* و *Capsicum frutescens* فلفل قرمز علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم. فصلنامه پژوهشهای علوم گیاهی. ۵: ۱۲۵-۱۳۴.

۷. شیرانی، م و فیاض، ن. ۱۳۹۰. کاشت انواع فلفل و خواص آنها. نشر نصح. ۱۳۲ ص.

۸. فیاض مهر، ب. و آصفی، ن. ۱۳۹۱. تأثیر امواج فراصوت بر مقدار و ظرفیت آنتی اکسیدانی لیکوپن استخراج شده از تفاله گوجه فرنگی. نشریه پژوهش های صنایع غذایی. جلد ۲۲، شماره ۳، ۲۴۸-۲۴۲.

۹. محمدی، م.، عطای صالحی، ا. و اسماعیل زاده کناری، ر. ۱۳۹۴. بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره فلفل قرمز رایج در ایران. نشریه نوآوری در علوم و فن آوری غذایی. ۱: ۵۴-۴۵.

- 26- Shotipruk, A., Kaufman, B. and Wang, Y. 2001. Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperata* using ultrasonic extraction, *Biotechnology Progress*, 17:924-928.
27. Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphor molybdc- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
28. Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93:713-718.
29. Vilkha, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound -assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:161-169.
- 30- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. and Li, X. 2008. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106:804-810.
31. Ya-Qin, M. and Jian-Chu, C. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*, 16:57-62.
20. Li, J., Dong, S. and Xiao-lin, D. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. jinsixiaoza. *Journal of Food Engineering*, 80: 176-183.
21. Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2nd Ed. Wiley, New York.
22. Morella, L. and Prado, M.A. 2012. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19:1144-1149.
23. Rostagno, A., Palma, M. and Barroso, C. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography*, 1012:119-128.
24. Sahin, S. and Samli, R. 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound - assisted extraction with a response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20: 595-602.
25. Sharma, A. and Gupta, M.N. 2004. Oil extraction from almond, apricot and rice bran by three-phase partitioning after Ultrasonication. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106:183-186.

(Original Research Paper)
Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Content From *Capsicum Annum* Fruits with Response Surface Methodology

Raheleh Dehghan Tanha¹, Elaham Mahdian¹, Mohammad Hossein Amini Fard², Hassan Bayat^{2*}, Reza Karajian³

1- Department of Food Sciences and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University,, Quchan, Iran.

2- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

3- Food Science and Technology Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research- Khorasan Razavi, Mashhad, Iran.

Received: 15/07/2016

Accepted: 07/02/2018

Abstract

Ultrasound-assisted extraction is an inexpensive, simple and efficient alternative to conventional extraction techniques. Response surface methodology was used to optimize experimental conditions for ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from Chili peppers. Variables in study were extraction temperatures at 3 levels (30, 40 and 50 °C), extraction times at 3 levels (10, 25 and 40 minutes) and power at 3 levels (30, 60 and 90 percent). It was observed that ultrasound waves applied at (temperature 49°C, time 39 minutes and power 89.6%) resulted to the highest phenolic compounds (49.6 mg 100 g⁻¹), while the lowest value was recorded in the control. Also with DPPH method, Antioxidant activity significantly increased in response to ultrasound treatments and the highest value was obtained from (temperature 30°C, time 10 minutes and power 90%). Thus, results showed that ultrasound waves have strong impact on extraction of antioxidant compounds from pepper.

Keywords: Pepper, Ultrasound, Optimization, Phenolic Compounds, Antioxidant Activities

*Corresponding Author: hassanbayat@birjand.ac.ir

