# ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* با پیش تیمار اولتراسوند به روش سطح پاسخ

**رقیه اشرفی یورقانلو*[۱]، محمود رضازاد باری[۲]، محمد علیزاده خالدآباد[۲]، لطیفه پوراکبر[۳]**

۱- مدرس دانشگاه فنی و حرفه‌ای - دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: r.ashrafi1@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۲۲ پذیرش نهایی: ۹٤/۱/۱۹)

## چکیده

**آنتی اکسیدان‌ها به دلیل ویژگی‌های گسترده بیولوژیکی و نقش آنها در جلوگیری از بروز بیماری‌های مختلف، به عنوان ترکیبات سلامت بخش مورد توجه می‌باشند. تفاله انگور واریته ریش بابا (*vitisviniferacv.rish baba*) حاوی مقدار بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدانی است. تخمیر تفاله انگور با *آسپرژیلوس اریزه* باعث استخراج بیشتر این ترکیبات می گردد. استخراج به کمک امواج فراصوت یکی از مهم‌ترین روش‌های استحصال ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی است و باعث تسریع روند استخراج می‌گردد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر فاکتورهای مختلف بر استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* و با بهره‌گیری از امواج فراصوت و با استفاده از روش سطح پاسخ بود. دما ( ٦٧ – ٥٥ درجه سلسیوس)، زمان (۳۲ – ٢٤ دقیقه)، غلظت حلال (٤٩-۳۷ درصد) و میزان پودر آب پنیر (٥٠ -۱۰ گرم) فاکتورهای مورد مطالعه بودند. نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش دما و غلظت حلال میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافته است. بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی (۹۰/۲۳ میلی گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم نمونه) و بالاترین میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی (۷۱/۸۱ میلی‌گرم کوئرسیتین در ۱۰۰ گرم نمونه) در دمای ٦٤ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۰ دقیقه و با غلظت حلال ٤٦٪ به دست آمدند. بالاترین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (۸۷/۹٪) و فعالیت ضد اکسایشی کل FRAP ( ۲۰۳µmol/g)در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۰ دقیقه و با غلظت حلال ٤٦٪ و میزان پودر آب پنیر ۲۰ گرم بدست آمدند. با افزایش زمان استخراج میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، DPPH و FRAP سیر صعودی نشان دادند. نتایج به دست آمده، بهره‌گیری از تخمیر به کمک *آسپرژیلوس اریزه* و فرآیند استخراج با بکارگیری تکنیک اولتراسوند را به عنوان روشی مناسب جهت استخراج مواد بیولوژیک از تفاله انگور با مزایایی از جمله میزان استخراج بالا، کاهش میزان حلال و دمای مورد نیاز و صرفه‌جویی در زمان را به اثبات می‌رساند.**

**واژه‌های کلیدی:** *آسپرژیلوس اریزه* **اولتراسوند، ترکیبات فنلی، تفاله انگور**

**مقدمه**

اکسیداسیون چربیها بدطعمی، کاهش کیفیت تغذیه‌ای و تشکیل ترکیبات سمی را به دنبال داشته و یک عامل خطر جدی برای مصرف کننده محسوب می‌شود (Esterbauer *et al*., 1993; Markesbery *et al*.,1998). یکی از راه‌های جلوگیری از اکسیداسیون چربیها به کارگیری آنتی‌اکسیدانها در سیستم‌های غذایی می‌باشد. BHT،BHA و TBHQ از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانهای سنتزی هستند که کاربرد گسترده‌ای در صنعت روغن دارند ولی از سوی دیگر استفاده از آنها سلامتی انسان را تهدید می‌کند (X Hou, 2003) در سالهای اخیر به دلایل مربوط به سلامتی توجه محققین به آنتی‌اکسیدانهای طبیعی معطوف گردیده است و تحقیقات گسترده‌ای به منظور بکارگیری این ترکیبات به عنوان جایگزین‌های آنتی‌اکسیدانهای سنتزی در دست اجراست (Madhavi *et al*., 1996).

مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از میوه‌ها و سبزیجات به مقدار کل ترکیبات فنلی آنها بستگی دارد (Mour *et al*., 2001). ترکیبات فنلی یک گروه متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به طور گسترده‌ای در سراسر گیاه پخش شده‌اند و دارای تاثیرات بیولوژیکی متعدد همچون فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی هستند (Lee *et al*., 2000). امروزه به منظور حفظ و افزایش سلامت مصرف کنندگان و نیز دستیابی به منابع جدید و ارزان قیمت آنتی‌اکسیدانهای طبیعی، تحقیقات در این مورد ضروری است. به همین دلیل، در سال‌های اخیر توجه زیادی به ضایعات محصولات کشاورزی حاوی آنتی‌آکسیدانهای طبیعی معطوف گردیده است. یکی از این منابع پسماندهای کارخانجات تولیدکننده آبمیوه و کنسانتره است. از این قبیل پسماندها میتوان به تفاله‌های مرکبات، گوجه فرنگی، سیب و انگور اشاره نمود. انگور یکی از میوه‌هایی است که به طور گسترده در سراسر جهان کاشته می‌شود. مطابق آمار (FAOFAOSTAT, 2005) تولید انگور در سال ۲۰۰۵ به ٦٦ میلیون تن رسیده است. انگور به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی مانند اسید گالیک، کاتچین و رزوراترول و انواع وسیعی از پروسیانیدین‌ها، میوه ارزشمندی است. تحقیقات سال‌های اخیر حاکی از فعالیت‌های بیولوژیکی وسیع این ترکیبات است که می‌توان به جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با دانسیته کم بدن انسان، خواص آنتی‌اکسیدانی، اثرات محافظتی در مقابل اشعه و تابش، جلوگیری از آب مروارید، اثرات ضد قند خون بالا، تعدیل بیان سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضدالتهابی و درمان سرطان اشاره نمود (Lee *et al*., 2000).

تفاله انگور یکی از پسماندهایی است که سالیانه به مقدار زیاد (۵۰۰۰۰ تن در سال) در کارخانجات آبمیوه‌گیری به دست می‌آید. تفاله انگور حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که به دلیل وجود همین ترکیبات، استفاده از آن به عنوان خوراک دام و یا کود زراعی با مشکلاتی همراه است. تعدادی از دام‌های اهلی قادر به تحمل این ترکیبات نیستند و میل چندانی به خوردن آن ندارند (Van Soest, 1994) و در صورت استفاده به عنوان کود زراعی نیز این ترکیبات باعث کاهش حاصل خیزی خاک می‌گردند (Northup *et al*., 1998). به هر حال این ترکیبات سلامت بخش بوده و می‌توانند کاربردهای زیادی در صنایع غذایی داشته باشند.

استخراج ترکیبات فنلی عموما با استفاده از روش استخراج با حلال انجام می‌گیرد، نوع و غلظت حلال، زمان و دما مهم‌ترین پارامترها برای دستیابی به بالاترین میزان استخراج محسوب می‌شوند. حلال‌های مختلفی در سال‌های گذشته برای استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرا گرفته‌اند، حلالیت ترکیبات فنلی بسته به نوع حلال، در جه پلیمریزاسیون آنها و برهم کنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. در کل حلال‌های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (۸۰ – ۴۰٪) توانائی بیشتری نسبت به حالت خالص و در مقایسه با سایر حلال‌ها در استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاهی دارند و بنا به دلایل زیست محیطی اتانول از ارجحیت بیشتری برخوردار است (Spingo *et al*., 2007). امروزه استفاده از امواج فراصوت با توجه به اثرات موثر آن، رو به گسترش می‌باشد. اثرات مکانیکی امواج فراصوت و کاویتاسیون های تولید شده، باعث افزایش نفوذپذیری حلال به داخل سلول‌های گیاهی و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین می‌گردد ( Cho *et al*., 2006). اخیرا قارچ‌ها به عنوان منابع جدیدی از آنتی‌اکسیدانها مورد توجه قرار گرفته‌اند، برخی گونه‌های قارچ‌ها آنتی‌اکسیدانها را به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند. تعدادی از تحقیقات نشان می‌دهند برخی از قارچ‌ها در طی تخمیر آنزیم‌های متابولیسمی تولید می‌کنند و در نتیجه فعالیت این آنزیم‌ها ترکیبات فنلی آزاد می‌گردند. فرایند تخمیر توسط آسپرژیلوس‌ها باعث افزایش قابل توجه در میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی حاصل می‌گردد. در طی تولید furu و rice koji و Kinema میزان ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. به عنوان مثال Kinema دارای ۱۴۴٪ترکیبات فنلی بالاتری نسبت به لوبیای سویای پخته شده و تخمیر نشده است (Moktan *et al*., 2008).

در این تحقیق تاثیر شرایط استخراج شامل دما، زمان، غلظت حلال و میزان پودر آب پنیر (wp) بر روی میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به دست آمده از تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

میوه انگور رقم ریش بابا از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی تهیه شد. نمونه‌ها پس از آب‌گیری در فریزر ۱۸- درجه سلسیوس تا زمان آزمایش نگه‌داری شدند. در هنگام شروع آزمایشات ابتدا به۱۰۰ گرم از نمونه تفاله پودر آب پنیر در مقدار مشخص (۵۰-۱۰گرم) بر اساس طرح آزمایش افزوده شد و سپس با ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آبی *آسپرژیلوس اریزه*با غلظت سلولی $۱/۲\times۱۰^{۸}$ تلقیح و به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. *آسپرژیلوس اریزه* PTCC No.5163 از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی به صورت لیوفلیزه خریداری شد.

مواد شیمیایی با خلوص بالای مورد نیاز از شرکت مرک خریداری شدند.

### استخراج

استخراج نمونه‌ها بر اساس شرایط دما، زمان و غلظت حلال مطابق با طرح آزمایش (جدول۱) در یک حمام اولتراسونیک (ایتالیا Tecno-Gas.S.P.A) در معرض امواج اولتراسوند (فرکانس ۳۰ کیلوهرتز) انجام گرفت.

سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی از مواد جامد جداسازی شده و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال نگه‌داری شدند.

**اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی**

مقدارکل ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین- سیوکالتو-Folin (ciocalteu) اندازه‌گیری شد (McDonald *et al.*, 2001). بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها و مخلوط شدن با معرف، مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی ماوراءبنفش- مرئی (PG instruments, UK) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. برای تعیین محتوای فنل کل بر حسب میلی‌گرم در گرم نمونه از منحنی استاندارد اسید گالیک استفاده شد.

$Y= 0.0054X+0.0628 \quad R_2=0.9998$

Y مقدار جذب و X میزان ترکیبات فنلی

**اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی**

برای تعیین مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی از روش رنگ سنجی استفاده شد (Chang *et al.*, 2002).جذب مخلوط آماده شده در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. برای تعیین محتوای فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم در گرم نمونه از منحنی استاندارد کوئرسیتین استفاده شد.

$Y= 0.0063X \qquad R_2= 0.997$

Y مقدار جذب و X میزان ترکیبات فلاونوئیدی

**قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH**

فعالیت ضداکسایشی ترکیبات فرار گیاهی باروش افزودن هیدروژن یا توانایی جمع آوری رادیکال، با استفاده از رادیکال پایدار DPPH انجام شد (Hatano *et al.*, 1998). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه‌های بیولوژیک به صورت زیر خنثی می‌شود :

$$DPPH + RH \longrightarrow (DPPH - R)- H + R^{\cdot}$$

رادیکال آزاد DPPH در محیط الکل اتانول باعث حداکثر جذب در ۵۱۷ نانومتر و ایجاد یک رنگ ارغوانی می‌گردد. در صورت خنثی شدن این رادیکال، از شدت رنگ ارغوانی کاسته شده و به زرد کم رنگ تغییر می‌یابد، بنابراین کاهش جذب نوری متناسب با توانایی خنثی سازی رادیکال DPPH و به عبارت دیگر قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه مورد نظر خواهد بود. نتایج به صورت درصد مهار یا خنثی سازی رادیکال DPPH توسط نمونه مورد نظر بیان می‌شود.

۴۰ میکرولیتر از عصاره به لوله آزمایش منتقل شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ میلی مولار DPPH به آن اضافه شد. کاهش جذب در ۵۲۰ نانومتر بعد از ۳۰ دقیقه برای نمونه‌ها خوانده شد. جذب رادیکال DPPH بدون عصاره بعنوان کنترل در نظر گرفته شد. درصد جمع‌آوری رادیکال مطابق فرمول ذیل محاسبه شد:

درصد مهار DPPH = ((A0-A1)/A0)*100

A0 جذب کنترل بدون حضور عصاره است که بلانک نامیده می‌شود. و A1 جذب عصاره ضد اکسایشده در حضور عصاره است.

**فعالیت ضد اکسایشی کل**

به منظور ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی کل عصاره‌ها از روش FRAP استفاده شد (Benzie and Strain, 1996). ۱۰ میکرولیتر از عصاره با ۳ میلی‌لیتر از معرف FRAP مخلوط و جذب مخلوط حاصل در ۵۹۵ نانومتر ارزیابی شد. غلظت‌های مشخصی (۱۰ – ۰/۶ میکرومولار) از سولفات آهن ($FeSO_4$) جهت منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت.

**طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها**

در این تحقیق از طرح کامپوزیت مرکزی با ٤ متغیر مستقل، ٥ سطح و ٦ تکرار در نقطه مرکزی طرح (به منظور بررسی تکرار پذیری طرح) استفاده گردید، تعداد کل تیمارها ۳۰ تیمار شد (جدول ۱). دما، زمان، غلظت حلال و میزان پودر آب پنیر متغیرهای مستقل و میزان ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدها و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و فعالیت ضد اکسایشی کل (FRAP) متغیرهای وابسته بودند.

معادله بدست آمده از طرح مرکب مرکزی با استفاده از معادله چند جمله‌ای درجه دو چنین بود:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{n} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{n} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j>i}^{n} \beta_{ij} x_i x_j$$

در این معادله $\hat{y}$ پاسخ پیش‌بینی شده، $\beta_0$ ثابت مدل، $\beta_j$ ضریب خطی، $X_i$ و $X_j$ متغیرهای فاکتور در شکل کد شده، $\beta ij$ ضریب برهم کنش و $\beta_{jj}$ ضریب درجه دوم می‌باشد.

مناسب بودن مدل از روی داده‌های عدم برازش مدل، ضریب تبیین ($R^2$)، $R^2$- adjusted و predictionR$^2$for و F-value حاصل از جدول آنالیز واریانس بررسی شد. معنی‌داری مدل و متغیرهای آن در سطح احتمال $p<۰/۰۱$ تعیین شد.

جدول ۱- طرح CCD **به کار رفته برای بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی**

| آزمون | Wp (گرم) | غلظت حلال (٪) | دما (درجه سلسیوس) | زمان (دقیقه) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۲۸ |
| ۲ | ۳۰ | ۳۷ | ٦۱ | ۲۸ |
| ۳ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۲۸ |
| ٤ | ۲۰ | ٤۰ | ٥۸ | ۳۰ |
| ٥ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۲۸ |
| ٦ | ٤۰ | ٤۰ | ٥۸ | ۳۰ |
| ۷ | ۳۰ | ٤۳ | ٥٥ | ۲۸ |
| ۸ | ٤۰ | ٤۰ | ٦٤ | ۲٦ |
| ۹ | ٤۰ | ٤٦ | ٦٤ | ۲٦ |
| ۱۰ | ٤۰ | ٤٦ | ٥۸ | ۳۰ |
| ۱۱ | ٤۰ | ٤٦ | ٥۸ | ۲٦ |
| ۱۲ | ٤۰ | ٤۰ | ٦٤ | ۳۰ |
| ۱۳ | ۲۰ | ٤٦ | ٦٤ | ۲٦ |
| ۱٤ | ۳۰ | ٤۹ | ٦۱ | ۲۸ |
| ۱٥ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۳۲ |
| ۱٦ | ٤۰ | ٤۰ | ٥۸ | ۲٦ |
| ۱۷ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۲۸ |
| ۱۸ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۲۸ |
| ۱۹ | ۲۰ | ٤۰ | ٦٤ | ۲٦ |
| ۲۰ | ۲۰ | ٤٦ | ٥۸ | ۲٦ |
| ۲۱ | ۳۰ | ٤۳ | ٦۱ | ۲۸ |

ادامه جدول ۱

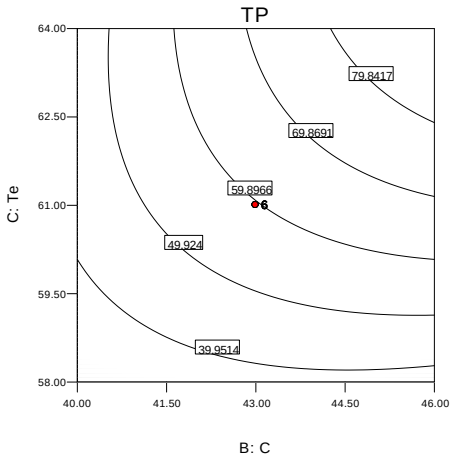
| آزمون | Wp (گرم) | غلظت حلال (٪) | دما (درجه سلسیوس) | زمان (دقیقه) |
|---|---|---|---|---|
| ۲۲ | ٤٠ | ٤٦ | ٦٤ | ۳۰ |
| ۲۳ | ۲۰ | ٤٠ | ٥٨ | ۲٦ |
| ۲٤ | ۲۰ | ٤٦ | ٥٨ | ۳۰ |
| ۲٥ | ۲۰ | ٤٦ | ٦٤ | ۳۰ |
| ۲٦ | ۳۰ | ٤۳ | ٦٧ | ۲۸ |
| ۲۷ | ۲۰ | ٤٠ | ٦٤ | ۳۰ |
| ۲۸ | ٥٠ | ٤۳ | ٦١ | ۲۸ |
| ۲۹ | ۳۰ | ٤۳ | ٦١ | ۲٤ |
| ۳۰ | ۱۰ | ٤۳ | ٦١ | ۲۸ |

**یافته‌ها**

بر اساس نتایج حاصل، مدل چند جمله‌ای درجه دو برای تمامی پاسخ‌ها (میزان ترکیبات پلی فنلی، میزان ترکیبات فلاونوئیدی، میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و فعالیت ضد اکسایشی کل (FRAP) برازش یافت. فرض اولیه و پیشنهادی حاکی از موثر بودن همه پارامترها با توان اول و دوم و اثر متقابل متغیرها بود. به منظور مشخص نمودن پارامترهای موثر از غیرموثر از تحلیل آماری با آزمون فرض و پارامتر P-value استفاده شد. مدل‌های محاسباتی و ضرایب رگرسیونی تمام این مدل‌ها ارائه شده است. مدل‌های چند جمله‌ای درجه دو تمامی پاسخ‌ها ضرایب رگرسیونی قابل قبولی را نشان دادند. اگر ضریب رگرسیون بالای ۰/۸۰ باشد نشان‌دهنده مناسب بودن یک مدل و انطباق داده‌ها و خط محاسباتی حاصل از رگرسیون است.

**مقدار کل ترکیبات فنلی**

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که دما، زمان و غلظت حلال هم به صورت خطی و هم به صورت درجه دوم تاثیر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فنلی دارد. میزان پودر آب پنیر در شکل خطی اثر معنی‌دار نداشت ولی در شکل درجه دوم اثر آن معنی‌دار بود. اثر متقابل دما و غلظت حلال معنی‌دار است ($p< ۰/۰۱$). با افزایش دما و غلظت حلال میزان ترکیبات فنلی افزایش یافته است (شکل ۱). بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی (۹۰/۲۳ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم نمونه) در دمای ٦٤ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۰ دقیقه و با غلظت حلال ٤٦٪ بدست آمد.




شکل۱– میزان ترکیبات پلی فنلی تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* به عنوان تابعی از غلظت حلال و دمای استخراج

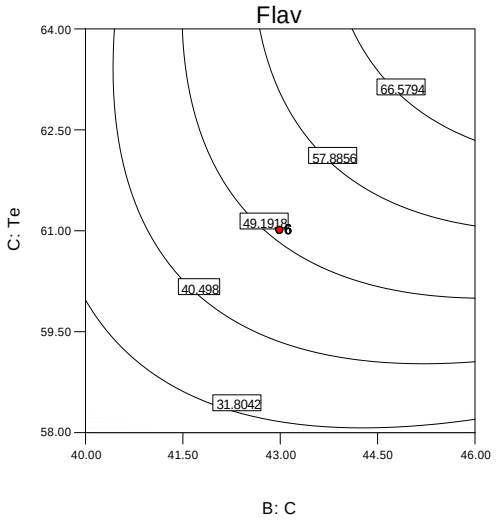
معادله ۱ رابطه بین میزان ترکیبات فنلی را با میزان پودر آب پنیر، غلظت حلال، زمان و دما را نشان می‌دهد. $R^2$ مدل، $R^2$-adjusted و $R^2$- pridicted به ترتیب برابر با ۹۹/٤، ۹۹/۱ و ۹۸/۸ درصد و عدم تطابق آن غیر معنی‌دار می‌باشد.

$$TP=59.44833-0.85125 * A + 14.74306 * B + 16.99396 * C + 2.161042 * D + 9.650625 * B * C + 1. 036875 * B * D + 0.888125 * C * D - 2.77667*A^2-3.82417*B^2-5.37823*C^2-3.00323 * D^2$$

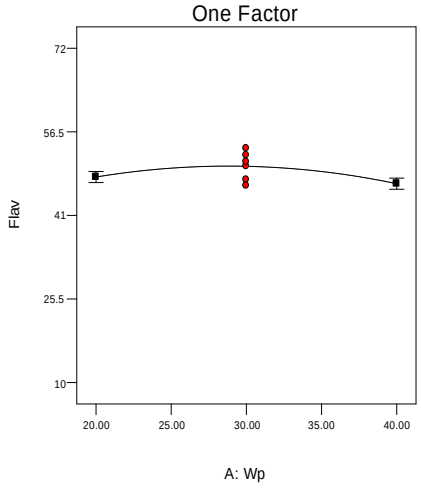
A = میزان پودر آب پنیر، B = غلظت حلال، C = دما، D = زمان

**مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی**

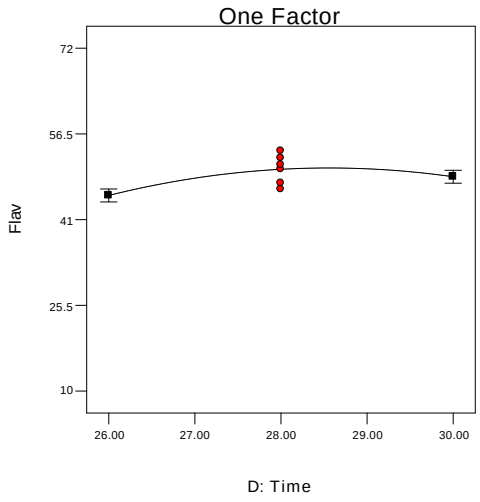
محصولات جانبی به دست آمده از فراوری انگور مانند دانه‌ها یا تفاله، یک منبع ارزان و غنی از فلاونوئیدها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شوند که می‌توانند به عنوان مکمل غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Gonzalez, 2004). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که همه متغیرها (دما، زمان، غلظت حلال و میزان پودر آب پنیر) هم به صورت خطی و هم به صورت درجه دوم تاثیر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی داشتند. اثر متقابل دما و غلظت حلال معنی‌دار است ($p< ۰/۰۱$). با افزایش دما و غلظت حلال میزان فلاونوئیدها افزایش یافته است (شکل ۲). با افزایش میزان پودر آب پنیر تا ۳۰ گرم میزان استخراج فلاونوئیدها افزایش یافته ولی در مقادیر بالاتر از ۳۰ گرم پودر آب پنیر، میزان استخراج فلاونوئیدها سیر نزولی نشان داد (شکل ۳). با افزایش زمان تا ۲۸ دقیقه میزان استخراج فلاونوئیدها افزایش یافته ولی در مقادیر بالاتر از ۲۸ دقیقه، میزان استخراج فلاونوئیدها سیر نزولی تدریجی نشان داد (شکل ۳).




شکل۲ – میزان ترکیبات فلاونوئیدی تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* به عنوان تابعی از غلظت حلال و دمای استخراج




شکل ۳– تاثیر میزان پودر آب پنیر بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه*




شکل٤ – تاثیر زمان بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه*

معادله ۲ رابطه بین میزان ترکیبات فلاونوئیدی را با میزان پودر آب پنیر، غلظت حلال، زمان و دما را نشان می‌دهد. $R^2$ مدل، $R^2$-adjusted و $R^2$- pridicted به ترتیب برابر با ۹۹/۵، ۹۹/۳ و ۹۸/۹ درصد و عدم تطابق آن غیر معنی‌دار می‌باشد.

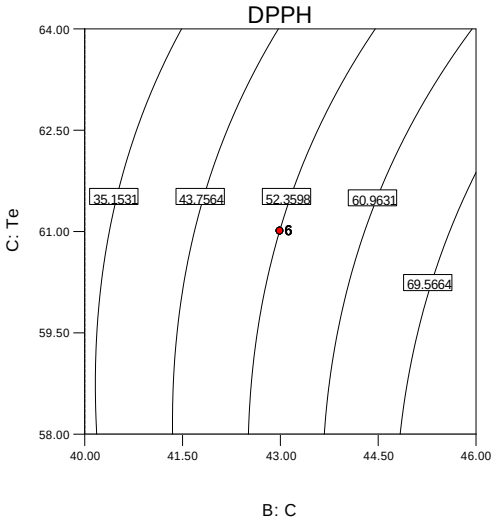
$$Flavonoid = 50.1-0.62 * A + 11.33833 * B + 16.99396 * C + 1.691944 * D + 8.055 * B * C - 2.60556*A^2-4.10056*B^2-4.86264*C^2-3.04014 * D^2$$

A = میزان پودر آب پنیر، B = غلظت حلال، C = دما، D = زمان

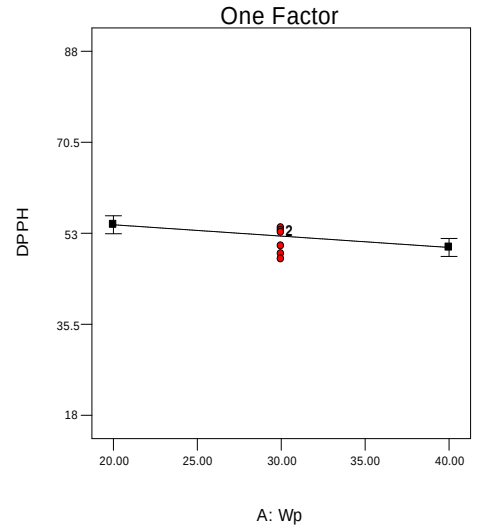
**قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH**

بر اساس نتایج آماری به دست آمده مشاهده شد متغیرهای زمان و دما هم به صورت خطی و هم به صورت درجه دوم تاثیر معنی‌داری بر میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH داشتند، اما متغیرهای غلظت حلال و میزان پودر آب پنیر تنها به صورت خطی اثر آنها معنی‌دار بود و در شکل درجه دوم اثر معنی‌دار نداشتند. اثر متقابل بین غلظت حلال و دما (شکل ۵) معنی‌دار بود ($p< ۰/۰۱$). با افزایش میزان پودر آب پنیر قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH سیر نزولی نشان داد (شکل ٦). با افزایش زمان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH سیر صعودی نشان داد (شکل ۷).

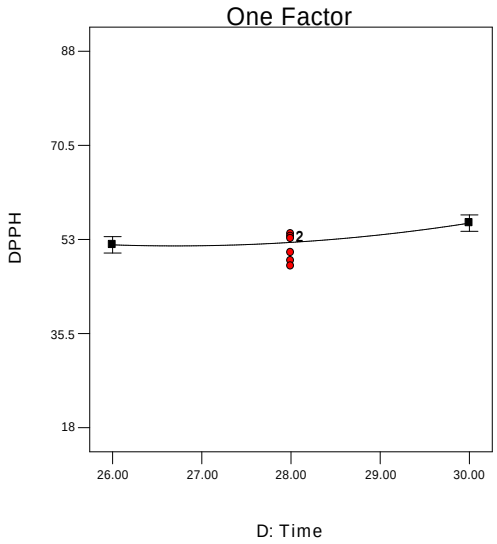
بالاترین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (۸۷/۹٪) در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و مدت زمان ۳۰ دقیقه و با غلظت حلال ٤٦٪ و میزان پودر آب پنیر ۲۰ گرم بدست آمد.




شکل ۵– میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* به عنوان تابعی از غلظت حلال و دمای استخراج




شکل٦- تاثیر میزان پودر آب پنیر بر میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه*




شکل۷ – تاثیر زمان بر میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه*

معادله ۳ رابطه بین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را با میزان پودر آب پنیر، غلظت حلال، زمان و دما را نشان می‌دهد. $R^2$ مدل، $R^2$-adjusted و $R^2$- pridicted به ترتیب برابر با ۹۷/۸، ۹۷/۱ و ۹٤/۸ درصد و عدم تطابق آن غیرمعنی‌دار می‌باشد.

$$DPPH=52.44938-2.18292*A+19.78458*B-6.02542*C+2.020417*D-2.40438*B*C-2.49398*C^2+1.562266*D^2$$

A = میزان پودر آب پنیر، B= غلظت حلال، C = دما، D = زمان

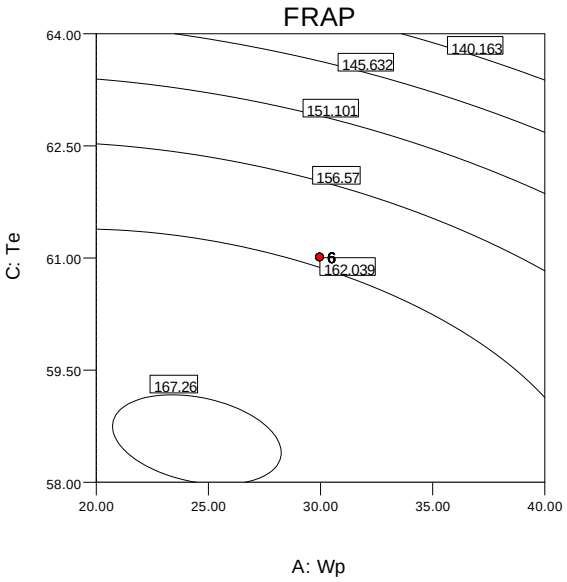
**فعالیت ضد اکسایشی کل FRAP**

آنالیزهای آماری نشان داد که تمامی متغیرها (دما، زمان، غلظت حلال و میزان پودر آب پنیر) به صورت خطی بر میزان FRAP تاثیر معنی‌دار داشتند و در این بین میزان پودر آب پنیر و زمان به صورت درجه دوم نیز اثر معنی‌دار داشتند، ولی غلظت حلال و دما به صورت درجه دوم نیز اثر معنی‌دار نداشتند. اثر متقابل بین پودر آب پنیر و دما و هم چنین بین میزان پودر آب پنیر و غلظت حلال اثر معنی‌دار نشان داد. اثر متقابل بین سایر متغیرها اثر معنی‌دار نداشت. میزان FRAP در یک غلظت ثابت از پودر آب پنیر با افزایش دما کاهش و با افزایش غلظت حلال، افزایش می‌یابد (شکل ۸ و ۹). با افزایش زمان میزان FRAP سیر تدریجی صعودی نشان داد (شکل ۱۰). فعالیت ضد اکسایشی کل FRAP بیشترین مقدار را برابر ۲۰۳ µmol/g در زمان استخراج ۳۰ دقیقه، دمای ۵۸ درجه سلسیوس، غلظت حلال ٤٦ و میزان پودر آب پنیر ۲۰ گرم دارد و کمترین مقدار را برابر ۸۵ µmol/g در زمان استخراج ۲۸ دقیقه، دمای ٦١درجه سلسیوس، غلظت حلال ۳۷ و میزان پودر آب پنیر ۳۰ گرم دارد.

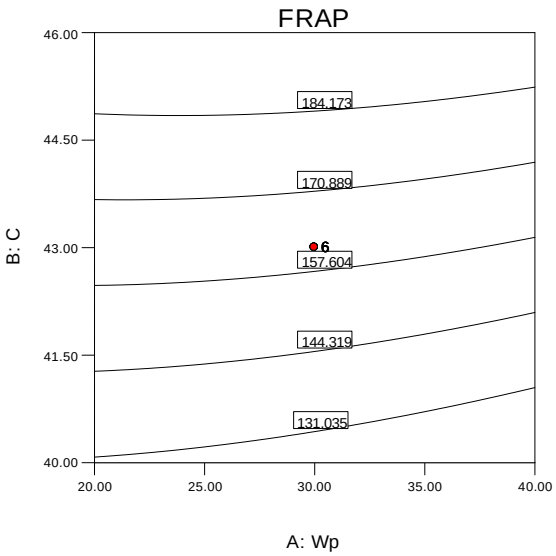
معادله ٤ رابطه بین فعالیت ضد اکسایشی کل FRAP را با میزان پودر آب پنیر، غلظت حلال، زمان و دما را نشان می‌دهد. $R^2$ مدل، $R^2$-adjusted و $R^2$- pridicted به ترتیب برابر با ۹۹/۵، ۹۹/۳ و ۹۸/۹ درصد و عدم تطابق آن غیر معنی‌دار می‌باشد.

$$FRAP=161.5278-3.83333*A+35.65278*B-12.1667*C+3*D+2.375*A*B-2.125*A*C-1.91667*A^2-6.79167*C^2$$

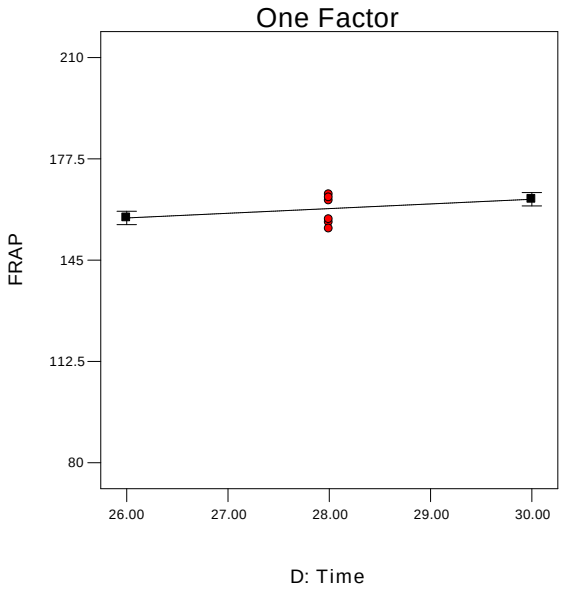
A = میزان پودر آب پنیر، B = غلظت حلال، C = دما، D = زمان




شکل۸- میزان فعالیت ضد اکسایشی کل FRAP تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* به عنوان تابعی از میزان پودر آب پنیر و دمای استخراج




شکل۹ - میزان فعالیت ضد اکسایشی کل FRAP تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه* به عنوان تابعی از میزان پودر آب پنیر و غلظت حلال




شکل۱۰- تاثیر زمان بر میزان فعالیت ضداکسایشی کل FRAP تفاله انگور تخمیر شده با *آسپرژیلوس اریزه*

## بحث و نتیجه‌گیری

واریته‌های مختلف انگور منبع غنی از ترکیبات فنلی محسوب می‌شوند و حدود ۷۵٪ این ترکیبات در پوست و دانه موجود می‌باشند (Sanchez-Alonso *et al.*, 2008). ترکیبات فنلی به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی و ایفاء نقش آنتی‌اکسیدانی، حائز اهمیت می‌باشند. استخراج این ترکیبات عموما با استفاده از روش استخراج با حلال انجام می‌گیرد و غلظت حلال، زمان و دما مهم‌ترین پارامترها برای دستیابی به بالاترین میزان استخراج محسوب می‌شوند (Spingo *et al.*, 2007). بهره‌گیری از تکنیک اولتراسوند تا میزان ۳۰٪ باعث افزایش استخراج ترکیبات عملگرا در مقایسه با تکنیک سنتی استخراج با حلال می‌گردد (Cho *et al.*, 2006) تخمیر توسط *آسپرژیلوس اریزه* به طور قابل توجهی باعث افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Esaki *et al.*, 2004) لوبیای سویای تخمیر شده توسط

*آسپرژیلوس اریزه* در مقایسه با نوع غیرتخمیری دارای توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری است (Wardhani *et al.*, 2009).

افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و افزایش زمان نیز مدت زمان انتقال جرم را افزایش می‌دهد. هررا و همکاران (۲۰۰۵) بیان داشتند که افزایش زمان استخراج به طور معنی‌داری بر روی میزان استخراج ترکیبات فنولیک از توت آسیاب شده و تفاله انگور موثر بود، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در مطالعات رویلا و همکاران (۱۹۹۸) تفاوت معنی‌داری ($p< ۰/۰۰۱$) با افزایش زمان استخراج در میزان ترکیبات فنلی از پوست انگور به دست آمد. طبق گزارشات جونتاچوت و همکاران (۲۰۰٦) افزایش دما باعث افزایش نفوذ حلال به ماتریکس جامد و افزایش حلالیت ترکیبات فنلی در حلال می گردد. لوسیولا و همکاران (۲۰۱۲) بیشترین میزان ترکیبات فنلی از مربای انگور قرمز را در دمای ٦۰ درجه سلسیوس، مدت زمان ۲۵ دقیقه و با اتانول ۵۰٪ استخراج کردند.

نتایج نشان داد که بر هم کنش معنی‌داری بین دما و غلظت حلال وجود دارد. حسین و همکاران (۲۰۱۱) وجود چنین برهم کنش معنی‌داری را در رزماری، مرزنجوش و پونه کوهی گزارش کردند. کاشیف غفور و یونگ هی چوی (۲۰۰۹) در اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی از انگور به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت اتانول باعث افزایش میزان استخراج ترکیبات فنلی می‌گردد، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. استفاده از آب به عنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن برخی از ترکیبات فنلی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج می‌شوند. افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی در این شرایط اطمینان حاصل می‌گردد.

بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد از اکسایش لیپیدها جلوگیری می‌کنند. با استفاده از یک سری روش‌های آزمایشگاهی می‌توان میزان غیر فعال شدن رادیکال‌های آزاد در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری می‌شود (Wanasundara and Shahidi, 2005). در آزمون‌های DPPH و FRAP اگرچه مقدار ترکیبات فنولیک عصاره‌های حاصل در برخی از نمونه‌ها کمتر بود اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها بیشتر بود. این نتیجه نشان می‌دهد که نوع ترکیب فنولیک بیشتر از مقدار آن در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارد. این نتایج با نتایج کارهای محققین دیگری از جمله رباباه و همکاران (۲۰۰٤) مطابقت دارد، این محققین گزارش کرده‌اند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی می‌تواند تحت تاثیر ساختارهای متفاوت اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها و همچنین مشتقات این ترکیبات باشد. به عنوان مثال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای فنولیک و مشتقات آن همانند استرها، وابسته به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در مولکول است.

محصولات مختلف تجاری آب پنیر از قبیل پودر آب پنیر، کنسانتره پروتئین‌های آب پنیر و ایزوله پروتئین‌های آب پنیر در دسترس هستند. این محصولات به طور عمده به عنوان اجزا تغذیه‌ای در غذای کودک و پروتئین مکمل برای ورزشکاران مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bayram *et al.*, 2008). خواص بیولوژیکی

پروتئین‌های آب پنیر عبارتند از خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ... که ناشی از پپتیدها و اسیدهای آمینه خاصی است که به طور عمده از بتا لاکتوگلوبولین مشتق شده‌اند (Hernandez – Ledesma *et al*., 2008). بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در دمای حدود ۵۸ درجه سلسیوس و میزان پودر آب پنیر حدود ۲۵ گرم مشاهده شد. در یک غلظت ثابت از پودر آب پنیر با افزایش دما از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل کاسته شد که احتمالا ناشی از اثرات تخریبی حرارت بر عوامل آنتی‌اکسیدانی پودر آب پنیر می‌باشد. بهره‌گیری از تخمیر تفاله انگور توسط *آسپرژیلوس اریزه* و استفاده از تکنیک اولتراسوند می‌تواند به عنوان روشی مناسب جهت استخراج مواد بیولوژیک از تفاله انگور با مزایایی از جمله میزان استخراج بالا، کاهش میزان حلال و دمای مورد نیاز و صرفه‌جویی مورد استفاده واقع گردد.

## منابع


- Bayram, T., Pekmez, M., Arda, N. and Yalcin, A.S. (2008). Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. Talanto, 75: 705-709.
- Benzie, F. and Strains, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.
- Cho, Y.J., Hong, J.Y., Chun, H.S., Lee, S.K. and Min, H.Y. (2006). Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. Journal of Food Engineering, 77: 725-30.
- Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1997). Antioxidant activity and isolation from soybeans fermented with Aspergillus spp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2020-2024.
- Esterbauer, H., Wag, G. and Puhl, H. (1993). Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. British Medical Bulletin, 49: 566-567.
- FAOSTAT. (2005). FAO statistical database. <http://www.fao.org>.
- Gonzalez-Paramas, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S. and Rivas - Gonzalo, J. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 234-238.
- Hernandez-Ledesma, B., Recio, I. and Amigo, L. (2008). β-Lactoglobulin as source of bioactive peptides. Amino Acids, 35: 257-265.
- Herrera, M.C. and Luqued de Castro, M.D. (2007). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. Journal of chromatography A, 1100(1):1-7.
- Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B. and Brunton, N.P. (2011). Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinusofficinalis*L.), marjoram (*Origanummajorana*L.) and oregano (*Origanumvulgare*L.) using response surface methodology. Food Chemistry, 126: 339-346.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. and Siebenhandl, S. (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. International journal of Food Science and Technology, 41: 121-133.
- Ghafoor, K. and Choi, Y.H. (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. Journal of koreansociety for Applied Biological Chemistry, 52: 295-300.
- Lee, J.C. and Lim, K.T. (2000). Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid level. Food Science and Biotechnology, 9(2): 83–88.

- Morelli, L.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(6): 1144-1149.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. (1996). Food antioxidants, New York: Marcel Dekker, Inc, USA, pp. 738.
- Markesbery, W.R. and Lovell, M.A. (1998). Four-hydrononenal, a product of lipid peroxidation is increased in the brain in Alzheimer's disease. Neurobiology Aging of Disease, 19: 33-36.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73: 73-84.
- Moktan, B., Saha, J. and Sarkar, P.K. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. Food Research International, 41: 586–593.
- Mour, A., Sruz, G.M., Franco, D. and Dominguez, J. (2001). Natural antioxidant from residual sources. Food chemistry, 72: 145-171.
- Northup, R.R., Dahlgren, R.A. and McColl, J.G. (1998). Polyphenols as regulators of plant-litter-soil interactions in northern California's pygmy forest: apositive feedback? Biogeochemistry, 42: 189–220.
- Rababah, T.M., Hettiarachchy, N.S. and Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea,grape seed, ginger,rosmary, gotukola,and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 583-5186.
- Sanchez-Alonso, I., Jimenez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. and Borderias, A.J. (2008). Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. LWT-Food Science and Technology, 41: 42-50.
- Spingo, G., Tramelli, L. and De-Faveri, DM. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marcephenolics. Journal of Food Engineering, 81: 200-208.
- Van Soest, P.J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant (2nd Edition). Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Wanasundara, PK. and Shahidi, F. (2005). Antioxidants: science, technology, and applications. In Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi, F. (Eds). John Wiley and Sons, Inc. New Jersey.
- Wardhani, D.H., Vazquez, J.A. and Pandiella, S.S. (2009). Mathematical modeling of the development of antioxidant activity in soybeans fermented with Aspergillusoryzae and Aspergillusawamori in the solid state. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 540-544.
- X Hou, D. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. Current Molecular Medicine, 3: 149-159.

# Total phenolics, flavonoids content and antioxidant capacities of grape pomace fermented by *Aspergillusoryzae*

**Ashrafi Yorghanloo, R.[1*], Rezazad Bari, M.[2], Alizadeh Khaledabad, M.[2], Pour Akbar, L.[3]**

1- Department of Food Science, Technical and Vocational University of Iran, Urmia, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Science, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran.
[*]Corresponding author email: r.ashrafi1@yahoo.com
(Received: 2014/3/13 Accepted: 2015/4/8)

## Abstract

Antioxidants due to the extensive biological properties and their role in preventing of various diseases, are considered as components of health. Grape pomace*vitisviniferacv.rish baba* contains high amounts of antioxidant compounds. Fermentation of grape pomace by *Aspergillusoryzae* increases the extraction of these compounds. Ultrasound – assisted extraction is the most important methods for the extraction of valuable compounds from plant sources and accelerates the rate of extraction. The aim of this study was to evaluate of various factors effect on the extraction of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant properties of grape pomace fermented by *Aspergillusoryzae* and using response surface methodology. The variables were temperature (55-67°c), time (24-32 min), solvent concentration (37-49%) and whey powder content (10-50gr). The highest rate of phenolic compounds and flavonoids were obtained at 64°c for 30 min and the solvent concentration of 46%. The highest level of DPPH and FRAP were obtained at 58°c for 30 min and the solvent concentration of 46%. With increasing extraction time phenolic compounds, flavonoids, DPPH and FRAP were ascending. Obtained results proved that fermentation by *Aspergillusoryzae* and using ultrasound – assisted extraction was a suitable method for the extraction of biological material from grape pomace with benefites such as high extraction rate, reducing the amount of solvent, temperature and time required.

**Key words**: *Aspergillusoryzae*, Flavonoids, Grape pomace, Phenolic compounds