

تأثیر فراصوت بر ترکیبات زیست فعال اسانس استخراج شده از پوست پرتقال رقم تامسون

الهام آذرپژوه^a، پروین شرایعی^a، شهین زمردی^{b*}، هدیه یزدانفر^c، سودابه شرایعی^d

^a دانشیار پژوهشی بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

^b دانشیار پژوهشی بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

^c دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

^d دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲

DOI:10.30495/jftn.2022.63466.11153

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1401.20.1.2.6>

مقدمه: در سال‌های اخیر استفاده از اسانس پوست مرکبات به عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های متعددی برای استخراج اسانس پوست پرتقال وجود دارد که یکی از این روش‌ها استفاده از امواج فراصوت می‌باشد. در این تحقیق هدف بهینه‌سازی شرایط استخراج اسانس با روش فراصوت از پوست پرتقال رقم تامپسون با استفاده از روش سطح پاسخ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: متغیرهای مستقل شامل شدت فراصوت، زمان و دمای فرایند به ترتیب در سه سطح ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد، ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود. راندمان استخراج، ترکیبات فنلی کل و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد اسانس و تأثیر بازدارندگی آن بر کپک *آسپرژیلوس نایجر* تعیین شد.

یافته‌ها: شرایط بهینه برای استخراج اسانس پوست پرتقال، شدت فراصوت ۶۰ درصد و زمان فرایند ۱۹ دقیقه و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. در این شرایط راندمان استخراج، میزان ترکیبات فنلی و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد به ترتیب ۱۳/۰۹ درصد، ۴۲/۱۶ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم و ۵۵ درصد به دست آمد. مقادیر تجربی با مقادیر پیش بینی شده مطابقت خوبی داشت. همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* تحت تأثیر اسانس پوست پرتقال در شرایط بهینه و سوربات پتاسیم به ترتیب ۱۸/۵ و ۱۸/۳ میلی‌متر گزارش شد. بنابراین، اسانس پوست پرتقال در غلظت برابر با سوربات پتاسیم (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دارای خاصیت ضد قارچی بود.

نتیجه‌گیری: اسانس پوست پرتقال دارای منبع بالقوه‌ای از مواد فعال مانند پلی‌فنل‌ها است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود مشهور هستند. روش فراصوت یک روش موثر برای استخراج این ترکیبات است. همچنین می‌توان از اسانس پوست پرتقال در نگهداری مواد غذایی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پوست پرتقال، ترکیبات موثره ضدقارچی، فراصوت

مقدمه

پرتقال (*Citrus Sinesis*) از خانواده (*Rutaceae*) و زیرخانواده (*Auratiode*) است. در سال ۲۰۱۹ مقدار تولید پرتقال در جهان بیش از ۴۶ میلیون تن و در ایران حدود ۳/۳۱ میلیون تن گزارش شده است (FAO, 2020). مقدار زیادی از پرتقال تولیدی در کشور در تهیه آب پرتقال مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این فرایند مقدار زیادی پوست پرتقال به عنوان پسماند به جا می‌ماند. از آنجا که پوست مرکبات غنی از فلاوون‌ها و پلی‌متوکسیلات‌ها و فیتوکمیکال‌ها می‌باشد که در گیاهان دیگر بسیار نادر است، در نتیجه در سال‌های اخیر توجه ویژه به استفاده از پوست مرکبات شده است. اسانس پوست پرتقال مخلوطی از ترکیبات فرار بوده و عمدتاً هیدروکربن مونوترپن است. اسانس‌ها به طور گسترده‌ای به عنوان اجزای دارویی، در مکمل‌های تغذیه‌ای، صنایع آرایشی و رایحه درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Giwa et al., 2018).

روش‌های مختلفی برای استخراج اسانس‌ها وجود دارد. یکی از مهمترین روش‌های نوین و مؤثری برای استخراج اسانس‌ها استفاده از امواج فراصوت است. طول امواج فراصوت معمولاً بین ۲۰ تا ۱۰۰ مگاهرتز است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون^۱ مربوط می‌شود که به معنی ساختن، بزرگ کردن و ترکاندن حباب است (Vinatoru, 2001). اخیراً گزارشات متعددی در ارتباط با توانایی بالای امواج فراصوت در استخراج ترکیبات مختلف مانند آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها، اسانس‌های روغنی، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، ساپونین‌ها و غیره از بخش‌های مختلف گیاهان و کاربرد این روش جهت استحصال هرچه بیشتر ترکیبات با خواص ضد میکروبی منتشر شده است (Vilkhu et al., 2008).

Rezende و همکاران (۲۰۲۰) ترکیب شیمیایی و اثر ضد قارچی اسانس استخراجی از دو نوع پوست پرتقال تازه را بر رشد میسلیم ریزوپوس/ستولونیفر^۲ بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که لیمون اصلی‌ترین مونوترپن موجود در اسانس پوست پرتقال بود. اسانس پرتقال رقم لیما و باهیاناو^۳ به ترتیب ۹۱/۹۵ و ۸۰/۰۵ درصد از رشد میسلیم ریزوپوس/ستولونیفر را در بالاترین دوز تحت

ارزیابی (۱۰۰ میکرولیتر) مهار کردند. آنها خاطرنشان کردند که می‌توان اسانس استخراج شده از پوست میوه دو گونه پرتقال را در تهیه بیوفیلم مورد استفاده قرار گیرد (Rezende et al., 2020).

Zomorodi و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر فراصوت را بر ویژگی‌های کمی و کیفی ترکیبات زیست فعال عصاره استخراج شده از تفاله انگور رقم رشه سردشت به روش سطح پاسخ بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد ترکیبات فنلی، قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی و گیرندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش شدت فراصوت، ابتدا افزایش اما سپس کاهش یافت. در حالی که با افزایش زمان فرایند، این ترکیبات کاهش پیدا کردند. در این بررسی شرایط بهینه برای استخراج عصاره آبی پسماند انگور، شدت فراصوت ۶۰ درصد و زمان فرایند ۸/۷۸ دقیقه تعیین شد. Sharayei و همکاران (۲۰۱۹) برای استخراج اجزای مؤثر پوست انار، از فرایند فراصوت با شدت صفر، ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد و در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه استفاده کردند. شدت فراصوت ۶۰ درصد و زمان فرایند ۶/۲ دقیقه به عنوان شرایط بهینه استخراج تعیین شد. در شرایط بهینه، حداکثر مقادیر پیش‌بینی شده راندمان، ترکیبات فنلی کل، گیرندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی عصاره پوست انار به ترتیب ۱۳/۱ درصد، ۴۲/۲ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم، ۸۸/۸ درصد و ۱۸۲۴/۶ میکرومول آهن ۲ در گرم به دست آمد.

هدف از این تحقیق بررسی تأثیر فراصوت بر ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس استخراج شده از پوست پرتقال رقم تامپسون است.

مواد و روش‌ها

پرتقال رقم تامسون از باغی در حومه شهرستان ساری تهیه گردید. میوه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه شستشو و پوست‌گیری شد. قسمت دارای اسانس^۴ از قسمت سفید رنگ فاقد اسانس^۵ از پوست پرتقال جدا شد و در دمای محیط در سایه خشک گردید. سپس آسیاب و از الک با مش ۴۲۵ میکرون عبور داده شد. پودر به دست آمده در فیلم پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با ضخامت ۱۴۰ میکرون

¹ Cavitation² R. stolonifera³ Flavedo⁴ Lima and bahia navel orange⁵ Albedo

$$\text{فرمول (۱)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 = \text{راندمان استخراج}$$

- تعیین ترکیبات فنلی

برای تعیین ترکیبات فنلی، از روش فولین سیوکالچو استفاده شد. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. منحنی کالیبراسیون اسید گالیک در غلظت محدوده ۰/۴-۰/۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر در متانول تهیه (شکل ۱) و از روی منحنی استاندارد مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم اسید گالیک به گرم محاسبه گردید (Zomorodi et al., 2020).

- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نیز با استفاده از آزمون گیرندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) اندازه‌گیری شد. آلفاتوکوفرول و اسید اسکوربیک نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. درصد DPPH از فرمول ۲ محاسبه شد که در آن AS جذب محلول نمونه و ADPPH جذب محلول DPPH است (Sharayei et al., 2019).

$$\text{فرمول (۲)} = \frac{ADPPH - AS}{ADPPH} \times 100 = \%DPPH$$

- بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس پوست پرتقال (استخراج شده در شرایط بهینه) بر علیه آسپرژیلوس نایچرا^۱

فعالیت ضدقارچی به روش انتشار دیسک تعیین شد.

بسته‌بندی و تا شروع آزمایش‌ها در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

- استخراج اسانس پوست پرتقال به روش کلونجر- فراصوت

برای اعمال فراصوت، از دستگاه فراصوت (هیلشر، آلمان) با قدرت حداکثر ۴۰۰ وات در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و پروب از نوع H7 از جنس تیتانیوم با قطر ۷ میلی‌متر و طول ۱۰۰ میلی‌متر استفاده شد. برای هر آزمایش، دقیقاً ۱۰۰ گرم از پودر پوست پرتقال با یک لیتر آب مخلوط و برابر طرح آزمایشی (جدول ۱) تحت تأثیر شدت‌های مختلف فراصوت در زمان‌ها و دماهای مختلف قرار داده شد. سپس تیمارهای حاصل به دستگاه اسانس‌گیر (کلونجر) منتقل و عمل اسانس‌گیری انجام شد (Arafat et al., 2020). پس از اتمام اسانس‌گیری، اسانس در شیشه رنگی تا زمان استفاده در فریزر (دمای ۱۸- سانتی‌گراد) نگهداری شد.

- تعیین راندمان استخراج

نسبت وزنی پوست پرتقال قبل و بعد از استخراج تعیین گردید سپس راندمان استخراج بر حسب درصد براساس فرمول ۱ محاسبه شد که در آن W₁ وزن اولیه پسماند قبل از استخراج و W₂ وزن پسماند پس از استخراج است (Sharayei et al., 2019).

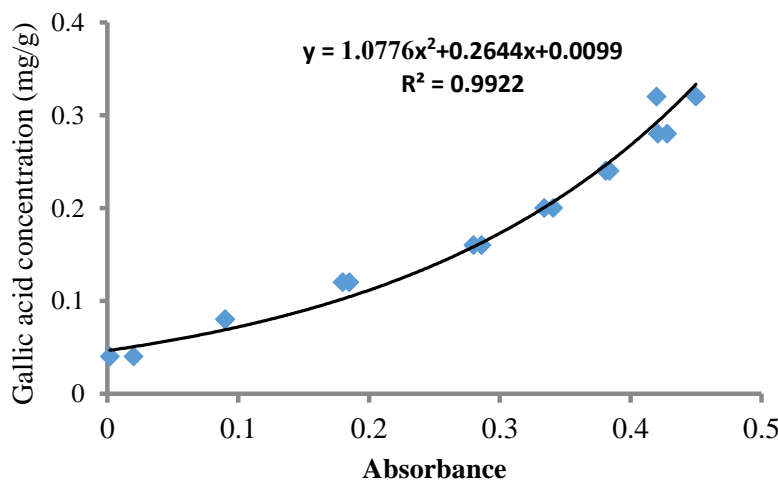


Figure 1-Standard calibration curve of Gallic acid for the determination of total phenolic content

شکل ۱- منحنی استاندارد اسید گالیک برای تعیین محتوای فنلی کل

¹ *Aspergillus niger*

تأثیر فراصوت بر ترکیبات زیست فعال اسانس استخراج شده از پوست پرتقال رقم تامسون

Design Expert نسخه ۸/۱ مدل سازی شد. برای بررسی ارتباط بین متغیرهای مستقل و وابسته، از نمودار سه بعدی سطح پاسخ رسم شده با مدل استفاده شد. آنالیز رگرسیون نیز با مدل درجه دوم (فرمول ۳) انجام گرفت.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

فرمول (۳)

جدول ۱- سطوح متغیرها

Table 1- Variable levels

Factors	Symbol	quantities		
		-1	0	+1
Intensity (%)	X ₁	20	60	100
Time (min)	X ₂	15	35	55
Temperature (°C)	X ₃	35	50	65

یافته‌ها

بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر ویژگی‌های اسانس پوست پرتقال

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، تأثیر شدت و زمان فراصوت و تأثیر متقابل شدت دما و زمان فراصوت بر راندمان استخراج، تأثیر درجه دو زمان و دما و تأثیر متقابل شدت فراصوت و دما بر قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد و تأثیر درجه دو شدت فراصوت و دمای فرآیند بر ترکیبات پلی فنل کل معنی دار است (p<0.05).

برای این منظور صفحات حاوی محیط پتیتودکستروز آگار با کشت قارچ (۱۰ روزه) تلقیح گردید. سپس سوربات پتاسیم و اسانس پوست پرتقال هر کدام در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر آغشته شده توسط دیسک‌های کاغذی با قطر ۷ میلی متر بر روی صفحات محیط کشت حاوی قارچ قرار داده شد. از اتانول برای حل شدن اسانس استفاده شد و قبل از استفاده روی صفحات حاوی قارچ کاملاً تبخیر شد. دیسک خالی آغشته به حلال اتانول و سپس خشک شده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتی گراد قطر مناطق بازدارنده بر حسب میلی متر اندازه گیری شد (Taylor et al., 1995,) (Sharayei et al., 2019).

طرح آزمایشی و تیمارهای آماری

برای بررسی تأثیر شدت، دما و زمان فرایند فراصوت، از روش سطح پاسخ و از طرح مرکب مرکز وجه^۱ (CCF) استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل شدت صوت دهی، دما و زمان فرایند در ۳ سطح است. سطوح کد شده و واقعی هر یک از متغیرها در جدول ۱ آورده شده است (α= ± ۱). تعداد نمونه‌های آزمایشی ۲۰ عدد بود که در این میان ۶ آزمون تکرار در نقطه مرکزی بود که از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده شد. داده‌ها با نرم افزار

جدول ۲- آنالیز واریانس اثر متغیرهای مستقل بر متغیرهای پاسخ

Table 2 - Analysis of variance of the effect of independent variables on response variables

Variable	DF	Extraction efficiency (%)		DPPH (%)		Polyphenol (mg/g)	
		Regression	MS	Regression	MS	Regression	MS
Model	9	2.902	26.72 ^{ns}	71.362	1394.24 ^{ns}	-59.094	4623.64 ^{ns}
Intensity (A)	1	0.151	19.75*	0.871	108.78 ^{ns}	1.602	160.38 ^{ns}
Time (B)	1	0.042	25.90*	-0.261	156.02 ^{ns}	-0.803	2066.60 ^{ns}
Temperature (C)	1	0.070	0.52*	-1.249	54.24 ^{ns}	5.226	440.15 ^{ns}
A ²	1	-8.853	7.49 ^{ns}	-3.882	142.49	-0.012	1466.80**
B ²	1	-	ns	-0.022	291.13*	-	ns
C ²	1	-	ns	0.011	22.99**	-0.057	615.44*
AB	1	-	ns	6.562	110.25 ^{ns}	-	ns
AC	1	-1.458	3.06 ^{ns}	-0.014	305.20**	-	ns
BC	1	-	50.90*	-	207.50	-	ns
Remain	5	-	8.28	-	6.40	-	1325.62
Lack of Fit	3	-	6.63 ^{ns}	-	0.000	-	921.51
Pure error	2	-	1.65	-	6.40	-	404.11
Total	14	-	35	-	1400.75	-	5949.25
Standard deviation	-	0.96	-	1.13	-	12.14	-
Mean	-	8.71	-	44.03	-	65.04	-
CV (%)	-	11.02	-	2.57	-	18.66	-
R-square	-	0.763	-	0.995	-	0.877	-
Adjusted R-sq	-	0.632	-	0.987	-	0.753	-
Predicted R-sq	-	0.288	-	0.989	-	0.704	-

**معنی دار در سطح ۱٪، *معنی دار در سطح ۵٪ و ^{ns} غیرمعنی دار

**p<0.01 *p<0.05 ^{ns} Not significant

¹ Composite Center Face (CCF)

همانطوری که از شکل ۳ مشخص است با افزایش شدت صوت دهی تا ۸۰ درصد و تا دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد مقدار ترکیبات پلی‌فنلی اسانس‌ها افزایش یافت. اما سپس با افزایش بیشتر این فاکتورها مقدار ترکیبات پلی‌فنلی کاهش پیدا کرد ($p < 0.05$). در شکل ۴ نیز مشخص است که با افزایش زمان فراصوت دهی تا ۴۵ دقیقه، درصد بازدارندگی رادیکال آزاد افزایش و سپس با افزایش بیشتر زمان، کاهش یافت ($p < 0.05$).

در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب تاثیر تیمارها بر راندمان استخراج، ترکیبات پلی‌فنلی کل و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد نشان داده شده است. با توجه به شکل ۲ با افزایش شدت صوت دهی تا ۸۰ درصد راندمان استخراج افزایش و سپس با افزایش بیشتر شدت فراصوت کاهش پیدا کرد. اما با افزایش زمان فراصوت راندمان استخراج افزایش یافت. همچنین تاثیر متقابل شدت دما و زمان فراصوت موجب افزایش راندمان استخراج گردید ($p < 0.05$).

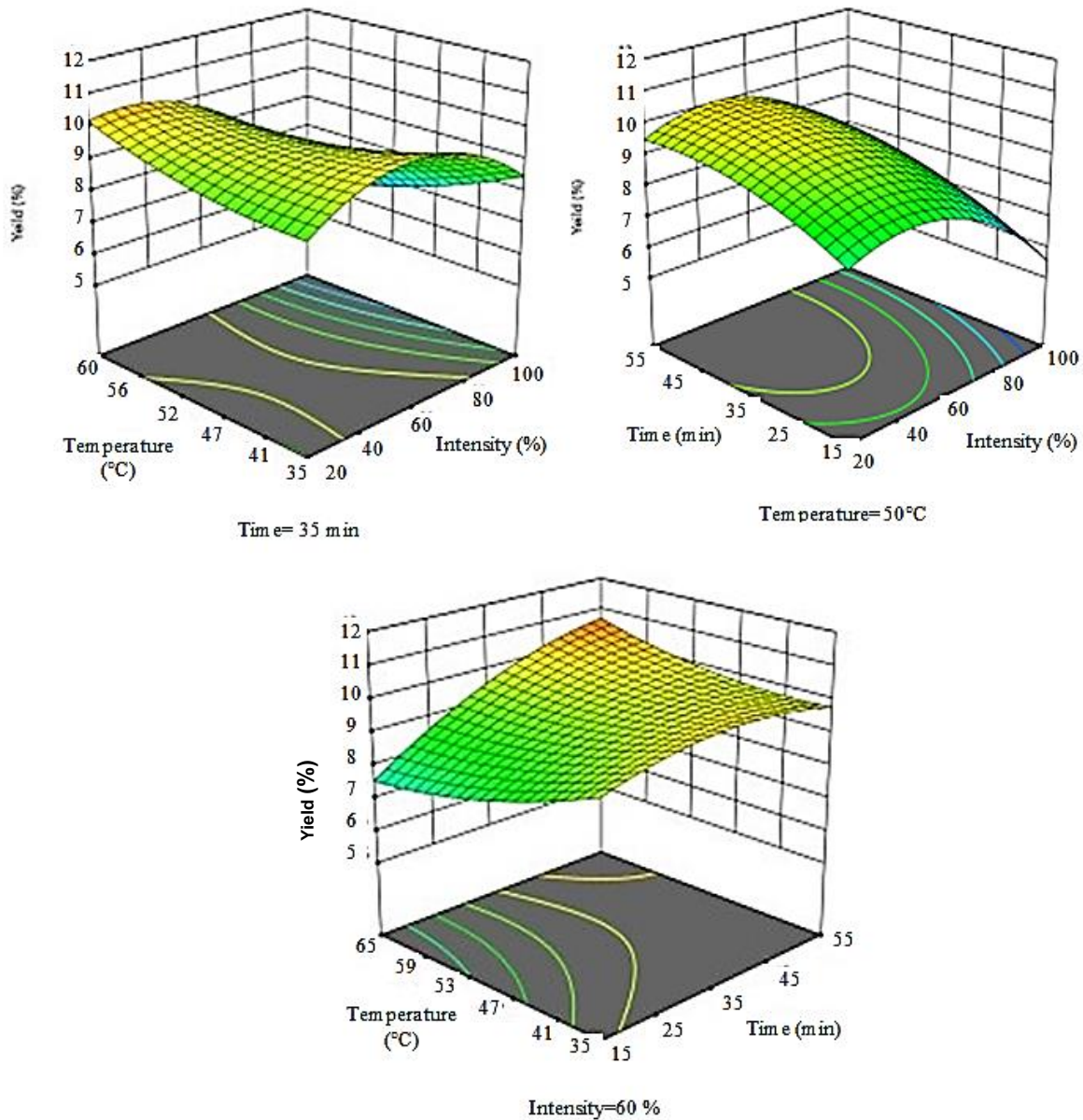


Figure 2 - The effect of time, temperature and intensity of ultrasound on the extraction efficiency of the orange peel essential oil

شکل ۲- تأثیر زمان، دما و شدت صوت دهی بر راندمان استخراج اسانس پوست پرتقال

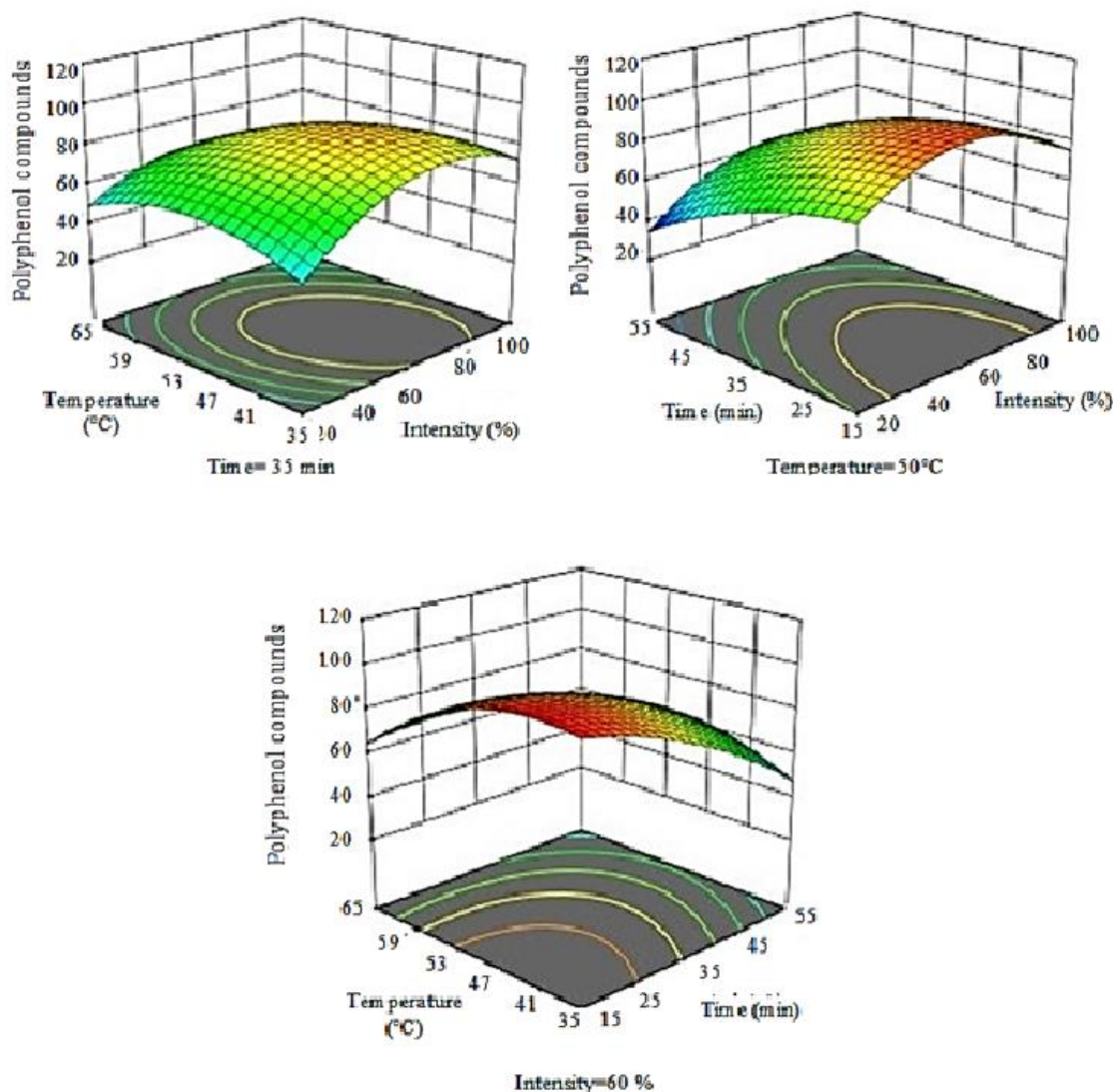


Figure 3 - The effect of time, temperature and intensity of ultrasound on polyphenol compounds of orange peel essential oil

شکل ۳- تأثیر زمان، دما و شدت صوت‌دهی بر ترکیبات پلی فنلی اسانس پوست پرتقال

شرایط بهینه استخراج اسانس از پوست پرتقال تعیین گردید. راندمان استخراج، میزان ترکیبات فنلی کل و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد به ترتیب ۹/۱۱ درصد، ۸۷/۳۱ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم و ۵۸/۳۰ درصد حاصل شد. برای اطمینان از صحت شرایط، آزمایش در شرایط بهینه تکرار گردید که نتایج پیش بینی شده و نتایج به دست آمده از آنها در جدول ۳ آورده شده است. عدم وجود تفاوت معنی‌دار مدل‌ها و مشاهدات تجربی، کارایی مدل‌ها را به خوبی اثبات می‌کند ($P < 0.05$).

– بهینه‌یابی استخراج اسانس

شرایط بهینه استخراج اسانس از پوست پرتقال با استفاده از فراصوت بر پاسخ‌ها از طریق بهینه‌یابی عددی^۱ نرم افزار تعیین شد. مبنای بهینه‌سازی بیشینه نمودن راندمان استخراج، میزان ترکیبات فنلی کل، قدرت گیرندگی رادیکال آزاد بود. برای بهینه‌سازی چند منظوره تابع مطلوبیت کلی^۲ به کار برده شد. مقدار مطلوبیت کلی ۰/۸۵ تعیین شد.

استفاده از شدت فراصوت ۶۰ درصد، زمان و دمای فرایند به ترتیب ۱۹ دقیقه و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان

¹ Numerical optimization

² Desirability

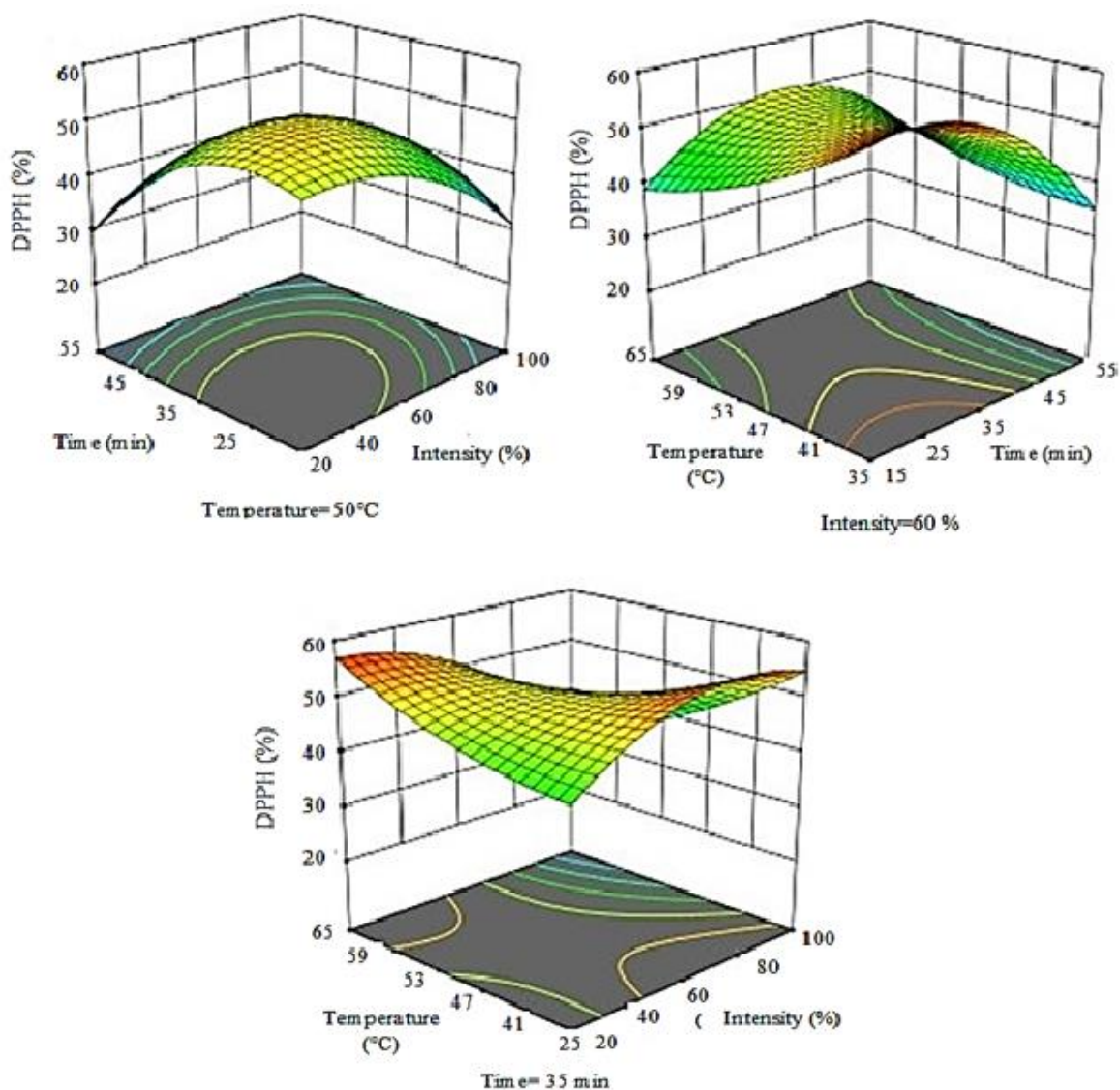


Figure 4 - The effect of time, temperature and intensity of ultrasound on DPPH of the orange peel essential oil
 شکل ۴- تأثیر زمان، دما و شدت صوت‌دهی بر قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH) اسانس پوست پرتقال

جدول ۳- مقادیر پیش بینی شده و تجربی در شرایط بهینه استخراج

Table 3- Predicted and experimental values in optimal extraction conditions

Results	Extraction efficiency (%)	Polyphenol (mg/g)	DPPH (%)
Predicted values	9.03 ^a	89.99 ^a	58.58 ^a
Experimental values	9.11±0.85 ^a	87.1±1.1 ^a	58.0±1.15 ^a

میانگین‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون t, $P < 0.05$).

The same superscript lower letters beside mean values indicate a not significant difference from each other (t- test, $P < 0.05$).

اسانس پوست پرتقال و نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم به ترتیب، ۱۸/۵ و ۱۸/۳ میلی‌متر بود. بنابراین، اسانس پوست پرتقال در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای خاصیت ضد قارچی تقریباً معادل اثر ضدقارچی سوربات پتاسیم (در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود.

بررسی تاثیر اسانس پوست پرتقال (استخراج شده در شرایط بهینه) بر بازدارندگی رشد اسپریژیلوس نایجر

همانطوری که از جدول ۴ مشاهده می‌شود، میانگین قطر هاله عدم رشد کپک اسپریژیلوس نایجر تحت تاثیر

تأثیر فراصوت بر ترکیبات زیست فعال اسانس استخراج شده از پوست پرتقال رقم تامسون

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر قطر هاله عدم رشد قارچ *آسپریژیلوس نایجر*

Table 4- Comparison of the mean effect of different treatments on the diameter of *Aspergillus niger* growth inhibition zone

Extract	Diameter of growth inhibition zone (mm)
Orange peel essential oil (1000 mg/ ml)	18.5±0.58 ^a
Potassium sorbate (1000 mg/ ml)	18.3±0.21 ^a
70% ethanol (negative control)	ND

The same superscript lower letters (a) beside mean values indicate a not significant difference from each other (t- test, P<0.05). ND: not detect.

میانگین‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون $t, P < 0.05$).

بحث

افزایش راندمان استخراج در اثر افزایش شدت صوت‌دهی می‌تواند مربوط به نیروی برشی ایجاد شده و مقدار انرژی بالای امواج فراصوت و تأثیر آنها در شکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات آنها به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم باشد. امواج فراصوت همچنین موجب کاهش اندازه ذرات می‌شود که سطح تماس را افزایش می‌دهد و در نتیجه انتشار حلال در بافت نیز افزایش می‌یابد. علاوه بر این با افزایش شدت صوت، انتقال جرم ناشی از فروپاشی حباب‌های کاویتاسیون در نزدیکی دیواره سلولی شدید می‌شود که به تماس بهتر بین حلال و مواد گیاهی می‌انجامد. در زمان فروپاشی حباب‌های کاویتاسیون نیز یک جریان سریع از امواج فراصوت تولید می‌شود که به‌عنوان یک میکروپمپ برای حلال عمل می‌کند و می‌تواند حلال را به اجبار به درون سلول براند و ترکیبات مورد نظر را حل کند (Li *et al.*, 2006; Sharayei *et al.*, 2019).

همچنین دلیل افزایش ترکیبات پلی‌فنلی در اثر شدت صوت‌دهی تا ۸۰ درصد و تا دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، می‌تواند به علت ایجاد کاویتاسیون در اثر فراصوت باشد که منجر به تشکیل حباب‌های بسیار ریز شده و سپس رشد و انفجار در توده مایع می‌شود. انفجار این حباب‌ها اغلب با آزاد شدن مقدار زیادی انرژی همراه است که به شکل تنش برشی به محیط اطراف اعمال می‌شود (Ji *et al.*, 2006). علت افزایش ترکیبات پلی‌فنلی در اثر افزایش دما نیز می‌تواند به علت افزایش حلالیت ترکیبات فنلی، سرعت انتشار و انتقال جرم سریع‌تر باشد (Pompeu *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). همچنین کاهش ترکیبات پلی‌فنلی در اثر افزایش شدت فراصوت و دما، احتمالاً به دلیل تخریب برخی از ترکیبات طبیعی فعال

است. به‌طوری‌که اعمال امواج فراصوت با شدت بالا و دمای بالاتر با شکستن بیشتر دیواره سلولی موجب استخراج ترکیبات نامحلول می‌شود (Zomorodi *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2013).

از طرفی، این امر را نیز می‌توان به ایجاد واکنش‌های پلیمریزاسیون ترکیبات پلی‌فنلی با خودشان نسبت داد. وقوع اکسیداسیون به علت قرار گرفتن در معرض امواج اولتراسوند و دمای بالا نیز یکی دیگر از دلایل کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی است (Rostagno *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2009). این پدیده که در پژوهش‌های متعددی گزارش گردیده است، به احتمال زیاد در اثر تخریب و اکسایش برخی پلی‌فنل‌های حساس به حرارت در دماهای بالاتر می‌باشد (Silva *et al.*, 2007).

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. کاهش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در اثر افزایش زمان فراصوت، احتمالاً به دلیل تخریب برخی از ترکیبات طبیعی فعال است. به‌طوری‌که اعمال امواج فراصوت در مدت زمان بیشتر با شکستن بیشتر دیواره سلولی موجب استخراج ترکیبات نامحلول می‌شود (Liu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013). از این رو، این ترکیبات در زمان‌های اولیه فرایند فراصوت استخراج شده‌اند و زمان‌های طولانی‌تر تأثیر چندانی بر روند استخراج این ترکیبات نداشته است. نتایج مشابهی توسط Heidari Majd و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش شده است. این محققان نشان دادند که با افزایش زمان میزان گیرندگی رادیکال آزاد در عصاره گیاه پونه گاوی افزایش یافت، که به دلیل افزایش استخراج ترکیبات فنلی با افزایش زمان و اثر بازدارندگی آنها بر روی رادیکال‌های آزاد می‌باشد. اما با افزایش زمان این روند بسیار کند شده و مقدار گیرندگی رادیکال آزاد کاهش

می‌یابد.

بین ترکیبات پلی فنلی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی رابطه مستقیمی مشاهده شده است (Almeida *et al.*, 2016; Csepregi *et al.*, 2016; Skotti *et al.*, 2016). ترکیبات فنلی، به دلیل داشتن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد، فلزات سنگین و جلوگیری از تشکیل هیدروپراکسیدها در سلول‌های گیاهی دارند (Nogala-Kalucka *et al.*, 2005). علت نتایج فوق را می‌توان این‌طور بیان کرد که افزایش شدت صوت از طریق حباب‌های ایجاد شده از طریق کاویتاسیون موجب شکستن دیواره سلول گیاهی و نفوذ بیشتر حلال به داخل سلول گیاهی می‌شود و هم چنین از طریق متلاشی کردن دیواره و آزاد کردن آن به فاز مایع و پراکنده کردن سریع آن در فاز مایع موجب بهبود انتقال جرم و افزایش بین سطح بین فاز جامد و مایع می‌گردد. در نتیجه فرایند استخراج را بهبود می‌بخشد (Zomorodi *et al.*, 2020).

این پدیده که در پژوهش‌های متعددی گزارش گردیده است، به احتمال زیاد در اثر تخریب و اکسایش برخی پلی فنل‌های حساس به حرارت در دماهای بالاتر می‌باشد (Silva *et al.*, 2007; Wissam *et al.*, 2012). همچنین افزایش دما، میزان استخراج ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد و به علت افزایش حلالیت ترکیبات فنلی، سرعت انتشار و انتقال جرم سریع‌تر رخ می‌دهد (Silva *et al.*, 2007, Pompeu *et al.*, 2009).

– بررسی تاثیر اسانس پوست پرتقال (استخراج شده در شرایط بهینه) بر بازدارندگی رشد اسپرئیلوس نایجر

میکروارگانسیم‌ها یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری مواد غذایی است. مواد افزودنی از جمله موادی هستند که بطور عمدی در فرآیند تولید مواد غذایی افزوده شده تا از تغییرات نامطلوب و فساد ناشی از میکروارگانسیم‌ها جلوگیری و موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی شوند (Abraham & Millstone, 1989).

نگرانی‌های مرتبط با ایمنی افزودنی‌های شیمیایی، محدودیت در حدود مجاز مصرف و نیز خطرات احتمالی آنها

بر سلامت انسان، تمایل فزاینده‌ای را در خصوص جایگزینی این نوع از ترکیبات با انواع طبیعی را فراهم آورده است. در این مطالعه اثرات ضدقارچی اسانس پوست پرتقال به‌عنوان جایگزین مناسب برای نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت. سوربات پتاسیم از جمله موادی است که در طبقه مواد نگهدارنده قرار داشته و سبب جلوگیری از فساد میکروبی در مواد غذایی و افزایش عمر انبارداری می‌شود. مصرف سوربیک اسید و نمک‌های حاصل از آنها به عنوان مواد نگهدارنده در مواد غذایی توسط سازمان‌های تنظیم مقررات بین‌المللی و ملی تعیین می‌شود و مصرف آنها در غلظت بسیار کم توصیه شده است. عوارض مصرف این گونه مواد به صورت اثرات پوستی مانند جوش، کهیر و درماتیت تماسی گزارش شده است.

با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، میانگین قطر هاله عدم رشد کپک اسپرئیلوس نایجر تحت تاثیر اسانس پوست پرتقال و نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم به ترتیب، ۱۸/۵ و ۱۸/۳ میلی‌متر بود. بنابراین، اسانس پوست پرتقال در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای خاصیت ضد قارچی تقریباً معادل اثر ضدقارچی سوربات پتاسیم بود.

مکانیسم اثر سوربات پتاسیم، بر طیف وسیعی از کپک و مخمرها، به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز در اکسیداسیون اسید چرب، مهار آنزیم‌های حاوی سولفیدریل و در نتیجه جفت نشدن فسفوریلاسیون اکسایشی و مهار کاتالاز و متعاقباً افزایش هیدروژن پراکسید در سلول می‌باشد (Buazzi & Marth, 1991).

اثر ضد قارچی اسانس پوست پرتقال، را می‌توان به وجود ترکیبات آنتی‌میکروبی در این اسانس نسبت داد. ترکیبات اسانس مرکبات در مطالعات مختلف شناسایی شده است. بطوری‌که Calo و همکاران (۲۰۱۵) معروف‌ترین و شناخته شده‌ترین ترکیبات اسانس مرکبات را لیمونن^۱، α -پینن^۲، سابینن^۳، β -میرسن^۴ و لینالول^۵ تعیین کردند و گزارش نمودند که این ترکیبات به دلیل اثر هم افزایی، می‌توانند طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی را اعمال کنند. اما از آنجایی که این ترکیبات بسیار آبرگیز هستند و به سختی در آب پراکنده می‌شوند، بنابراین باید در

¹ Limonene ² α -pinene ³ β -sabinene

⁴ β -myrcene ⁵ Linalool

تأثیر فراصوت بر ترکیبات زیست فعال اسانس استخراج شده از پوست پرتقال رقم تامسون

درجه سانتی‌گراد به عنوان شرایط بهینه برای استخراج عصارهٔ آبی پوست پرتقال تعیین شد. همچنین اسانس پوست پرتقال در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای خاصیت ضد قارچی تقریباً معادل اثر ضدقارچی سوربات پتاسیم بود. بنابراین می‌توان از اسانس پوست پرتقال در نگهداری مواد غذایی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی استفاده نمود.

منابع

- Abraham, J. & Millstone, E. (1989). Food additive controls, Some international comparisons. *Food Policy*, 14, 43-57.
- Almeida, M. L. B., de Souza Freitas, W. E., de Moraes, P. L. D., Sarmiento, J. D. A. & Alves, R. E. (2016). Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia Americana* L. *Food Chemistry*, 192, 1078-1082.
- Ambrosio, C. M. S., Ikeda, N. Y., Miano, A. C., Saldaña, E., Moreno, A. M., Stashenko, E., Contreras-Castillo, C. J. & Da Gloria, E. M. (2019). Unraveling the selective antibacterial activity and chemical composition of citrus essential oils. *Scientific Reports*. 2019, 9,17719 019-54084-3
- Arafat, Y., Altemimi, A., Ibrahim, S. A. & Badwaik, L. S. (2020). Valorization of Sweet Lime Peel for the Extraction of Essential Oil by Solvent Free Microwave Extraction Enhanced with Ultrasound Pretreatment. *Molecules*, 25, 1-10
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. & Devereux, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42.
- Buazzi, M.M. & Marth, E. H. (1991). Mechanism in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. *Food Microbiology*, 8, 249-56.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A. & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111–119.
- Chan, E., Lim, Y., Ling, S., Tan, S., Lim, K. & Khoo, M. J. L. (2009). Caffeoylquinic acids from leaves of *Etlingera* species (*Zingiberaceae*). *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1026-1030.

غلظت‌های بالاتر استفاده شود تا بتوانند به عنوان ترکیبات ضد میکروبی موثر باشند. Ambrosio و همکاران (۲۰۱۹) نیز لیمون، سیس - لیمون اکسید^۱، ترانس و سیس کارول^۲، کارون^۳، اکسید ترانس لیمون^۴، الکل پریلا^۵ را در چهار گونه اسانس مرکبات شناسایی کردند.

با این حال، ترکیبات اسانس‌ها بسته به عوامل مختلفی از جمله تنوع گیاه، منطقه جغرافیایی، سن گیاه، روش خشک کردن و استخراج اسانس متفاوت است (Bagamboula *et al.*, 2004). این ترکیبات اثر ضد میکروبی خود را از طریق اختلال در غشای باکتریایی از طریق تغییر در ترکیب و نفوذپذیری غشای سلولی، استرس اکسیداتیو، مهار تنفس و فرآیندهای انتقال یون اعمال می‌کند (Nazzaro *et al.*, 2017). پتانسیل ضد قارچی اسانس‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا توجه محققان را در سراسر جهان جلب کرده است زیرا این اسانس‌ها ممکن است به عنوان قارچ کش زیستی عمل کنند و جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی شوند (Rezende *et al.*, 2020). Viuda-Martos و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که اسانس پوست پرتقال مانع رشد چهار گونه قارچی فاسد کننده غذا شد که بیشترین فعالیت بازدارندگی را در برابر اسپیریلوس نایجر داشت. از سوی دیگر Chee و همکاران (۲۰۰۹) لیمون را به عنوان ضد قارچ قوی در برابر تریکوفیتون روبروم^۶ توصیف کرد. به طور کلی اسانس مرکبات توسط سازمان غذا و دارو (FDA) به عنوان ترکیبات ایمن^۷ شناخته شده است (Fisher *et al.*, 2008). لذا می‌توان از آنها در مواد غذایی استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که اسانس پوست پرتقال دارای منبع بالقوه‌ای از مواد فعال مانند پلی فنل‌ها است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود مشهور هستند. استخراج فراصوت یک روش موثر برای استخراج این ترکیبات است. بهینه‌سازی شدت فراصوت، دما و زمان قرار گرفتن در معرض فراصوت برای تولید اسانس با کیفیت مطلوب و عملکرد بالا ضروری است. در این مطالعه شدت فراصوت ۶۰ درصد، زمان و دمای فرایند به ترتیب ۱۹ دقیقه و ۳۵

¹ Cis-limonene oxide

² Carvone

³Trance & cis-carveol

⁴ Trans-limonene oxide

⁵ Perrilla alcohol

⁶ *Trichophyton rubrum*

⁷ GRAS

Chee, H. Y., Kim, H. & Lee, M. H. (2009). In vitro antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Microbiology*, 37, 243-246.

Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M. & Hideg, É. (2016). Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules*, 21, 208-225.

FAO. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals.

Fisher, K. & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food, is citrus the answer. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 156-164.

Giwa, S. O., Muhammad, M. & Giwa, A. (2018). Utilizing orange peels for essential oil production. *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, 13 (1), 17-27.

Heidari Majd, M., Mortazavi, A., Asili, J., Blourian, Sh., Armin, M. & Abdolshahi, A. (2012). Optimization of extraction of phenolic compounds from *Flomidoschema parviflora* using ultrasound. *Journal of Herbal Medicine*, 3, 7-13. [In Parsian].

Ji, J. B., Lu, X. H., Cai, M. Q. & Xu, Z. C. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 455-462.

Liu, G., Xu, X., Hao, Q. & Gao, Y. (2009). Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 42, 1491-1495.

Montgomery, D.C. (2005). Design and Analysis of Experiments, Response Surface Method and Designs. New Jersey, John Wiley and Sons, Inc.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86. <http://dx.doi.org/10.3390/ph10040086>. PMID,29099084.

Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Dratwia, M., Lampart-Szczapa, E., Siger, A. & Buchowski, M. (2005). Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chemistry*, 93, 227-235.

Pompeu, D., Silva, E. & Rogez, H. J. B. T. (2009). Optimisation of the solvent extraction of

phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 100, 6076-6082.

Rezende, J. L., Fernandes, C. C., Costa, A. O. M., Santos, L. S., Vicente Neto, F., Sperandio, E. M., Souchie, E. L., Colli, A. C., Crotti, E. M. & Miranda, M. L. D. (2020). Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lima orange and bahia navel orange) in postharvest control of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb., Fr.) Vuill. *Food Science Technology Campinas*, 40 (Suppl. 2), 405-409.

Rostagno, M.A., Palma, M. & Barroso, C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. 1012, 119-128.

Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S. & Ramaswamy, H.S. (2019). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT – Food Science and Technology* 101, 342-350.

Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J. F. & Larondelle, Y. J. F. C. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.

Skotti, E., Anastasaki, E., Tarantilis, P. & Polissiou, M. (2016). Total phenolic compounds, antioxidant activity and toxicity of selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.

Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B. & Lo, Y. M. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20, 202-208.

Taylor, R.S. L., N. P. Manandhar, J. B. & Towers, G.H.N. (1995). Screening of selected medicinal plants of Nepal for antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 153-159.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simones, L. & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasonic assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9,161-169.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry*, 8, 303-313.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulate* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19, 1130-1138.

Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A. & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and

proanthocyanidins from pomegranate's peel. *4(Suppl 3)*, 675-682.

Zomorodi, Sh., Aazarpazhooh, E. & Sharayei, P. (2020). The effect of ultrasound and microencapsulation on characteristics of bioactive compounds of extracted from grape pomace *rashe sardasht* cultivar. *Food Engineering Research*, 91, 97-112. [In Parsian]

The Effect of Ultrasound on the Bioactive Compounds of Essential Oil Extracted from the Peel of Orange Thomson Cultivar

E. Azarpazhooh^a, P. Sharayei^a, Sh. Zomorodi^{b*}, H. Yazdanfar^c, S. Sharayei^d

^a Associate Professor of Agricultural Engineering Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.

^b Associate Professor of Agricultural Engineering Research Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran.

^c M.Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

^d M.Sc. Student of the Department of Microbiology, Tehran Center Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 23 February 2022

Accepted: 3 July 2022

Abstract

Introduction: In recent years, the use of citrus peel essential oil as a natural preservative in foods has been widely considered. There are several methods to extract the essence oil of orange peel, one of which is the use of ultrasound. The objective of this study was to evaluate the extraction conditions of essential oil by ultrasound method from the peel of Thomson cultivar using the response surface methodology.

Materials and Methods: Independent variables included ultrasound intensity, time and process temperature at three levels of 20, 60 and 100%, 5, 10 and 15 min and 25, 35 and 45 °C were studied, respectively. Efficiency of extraction, total phenolic compounds, DPPH and inhibitory of orange peel essential oils against *Aspergillus niger* fungus were determined.

Results: The optimal conditions for extracting the essential oil of orange peel were sonication intensity 60%, processing time and temperature of 19 min and 35 °C respectively. At this optimum condition, efficiency of extraction, phenolic compounds and DPPH value of the orange peel essential oils were 13.09%, 42.16 mg/100g and 55%, respectively. The experimental values were in a good agreement with the predicted values. Also, at the optimal conditions, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the orange peel essential oils was 18.5 mm and potassium sorbate was 18.3 mm. Therefore, orange peel essential oil at a concentration equal to potassium sorbate (1000 mg/ml) has antifungal activity against *Aspergillus niger*.

Conclusion: The present study revealed that the essential oil of orange peel has a potential source of active ingredients like polyphenols that are well-known for their antioxidant properties. Ultrasound extraction is an effective technique for extraction of these compounds. Also orange peel essential oil can be used in foods instead of chemical and synthetic antioxidants and preservatives.

Keywords: Antifungal, Effective Compounds, Orange Peel, Ultrasound.

* Corresponding Author: s.zomorodi@areeo.ac.ir