پنجمین همايش ملي بررسي ضايعات محصولات كشاورزي

**بازیافت مواد مؤثره‌ی پوست پسته وحشی به عنوان ضایعات کشاورزی با روش استخراج جدید بر پایه‌ی آب مادون بحرانی**

**چکیده**

**در تحقیق حاضر قدرت آنتی اکسیدانی پوست بنه رقم موتیکا حاصل از روش استخراج آب مادون بحرانی در سه دمای 110 ° C، 155 ° C و 200 ° C ( با زمان ثابت 45 دقیقه و نسبت اختلاط ثابت 1:30 (بنه-آب) ) مورد بررسی قرار گرفت. قدرت احیا کنندگی آهن ، میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و همچنین میزان کل ترکیبات فنلی شاخص‌های مورد مطالعه بودند . نتایج این تحقیق نشان دادند که با افزایش دما تا 200 ° C میزان قدرت احیاکنندگی آهن ، همچنین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ی بدست آمده بیشتر می‌شود؛ ضمن اینکه بالاترین میزان ترکیبات پلی فنلی در 155 ° C بدست آمد. همچنین قدرت آنتی اکسیدانی بدست آمده از این تحقیق توانایی این روش به عنوان فرایندی مطابق با محیط زیست جهت استخراج مواد بیو اکتیو پوست بنه را به اثبات می رساند.**

**واژه هاي کلیدي : آب مادون بحرانی ، آنتی اکسیدان ، پوست بنه رقم موتیکا ، ترکیبات فنلی**

**مقدمه**

**بنه از جمله گونه های وحشی پسته است که خاستگاه اصلی این گیاه در واقع ایران است . وسعت درختان بنه در ایران بیش از یک میلیون و دویست هزار هکتار است ( فرهوش و همکاران 2009). مهمترین رقم آن موتیکا (Pistacia atlantica var mutica ) به شمار می آید و در نقاط مختلف ایران پراکندگی خوبی دارد ( حاج حیدری ، 1376 ) . پوسته ی خارجی(24درصد میوه بنه ) به رنگ سبز بوده، تقریبا" 30 درصد روغن دارد ( فرهوش و همکاران 2009 ). فرهوش و همکاران ( 2009 ) نشان دادند روغن پوست بنه از پایداری اکسایشی بسیار بالایی برخورداراست.**

**آب مادون بحرانی ناحیه ای از فاز کندانس شده ی آب هست که دمای بینC 100 ° ( نقطه ی جوش آب ) و 374 ° C ( نقطه ی بحرانی آب ) و همچنین میزان فشاری که آب در حالت مایع باقی بماند و تغییر فاز ندهد را در بر می گیرد ( آیالا و همکاران 2001 ) . تحت این شرایط حلالیت ترکیبات با قطبیت کم و ترکیبات آلی نسبت به دمای اتاق افزایش می یابد ( میلر و همکاران 1998 ) . استخراج با آب مادون بحرانی روشی سریع ، ارزان ، سازگار با محیط زیست بوده و به جای حلال های آلی سمی ، آب به عنوان سبزترین حلال در این روش استفاده می شود . شماری از مطالعات روی جنبه های محیط زیستی این روش استخراج تمرکز داشته اند ( اوکودا و همکاران 2009 ؛ همچنین سیریوونق 2009 ) . مطالعات دیگری بر جنبه ی سلکتیویته ی این روش تآکید کرده اند ( هرورو 2005 ؛ زایبونیسا و همکاران 2009 ) . در این تحقیق ، تآثیر روش استخراج با آب مادون بحرانی به عنوان جدیدترین روش استخراج ترکیبات بیولوژیک بر قدرت آنتی اکسیدانی پوست بنه بررسی می شود .**

**روش مطالعه**

**مواد**

**میوه ی رسیده بنه (Pistacia atlantica var mutica) اوایل آبانماه از شهرستان مرو دشت در استان فارس تهیه گردید. میوه ها تا زمان استفاده در سردخانه زیر صفر نگهداری شد؛ پوست بنه ها با دستگاه پوست گیر جدا شد . متانول، معرف فولین سوکالچو، اسید گالیک ، کربنات سدیم ، پتاسیم فری سیانید ، تری کلرو استیک اسید ، فریک کلرید ، مونو سدیم فسفات مونو هیدرات، دی سدیم فسفات هپتا هیدرات ،1و1 دی فنیل -2- پیکریل هیدرازیل ، اسید آسکوربیک،اسید کلریدریک و اسید استیک از شرکت های مرک ، شارلو و کالدون خریداری شد.**

**استخراج با آب مادون بحرانی**

**به طور خلاصه ، این دستگاه شامل تانک آب مقطر ، پمپ جهت تامین فشار لازم، سل استخراج، کویل گرم کننده ی سل و پنل کنترل دما می باشد. استخراج با این روش بدین ترتیب انجام گرفت : ابتدا نمونه ی مورد نظر که در این مطالعه پوست بنه هست در سل استخراج و مقدار آب مورد نیاز به نسبت اختلاط 1 به 30 ( پوست بنه – آب ) در تانک آب ریخته**

**شده و عمل استخراج با تنظیم درجه حرارت (110 ° C ، 155 ° C و 200 ° C ) و به تناسب آن فشار مورد نیاز انجام گرفت. در نهایت ، عصاره ی بدست آمده جهت تهیه ی غلظت مشخصی از آن خشک گردید .**

**اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن Ш**

**2.5 میلی لیتر عصاره نمونه با غلظت های مشخص با 2.5 میلی لیتر بافر فسفات (0.2 مولار ، 6.6 (PH= و2.5 میلی لیتر محلول 1 درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط شد؛ سپس به مدت 20 دقیقه بر روی بن ماری 50 درجه نگهداشته شد. محلول به سرعت سرد شده و با 2.5 میلی لیتر محلول 10 درصد تری کلرو استیک اسید (وزنی حجمی) مخلوط شده و به مدت 10 دقیقه با سرعت 3000 rpm سانتریفوژ شد.فاز روئی جدا شده و 5 میلی لیتر آن با 5 میلی لیتر آب مقطر و 1 میلی لیتر محلول 0.1 درصد فریک کلرید مخلوط شد؛ سپس جذب در 700 نانومتر خوانده شد. هر چه جذب بیشتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی بیشتر است؛ آزمایش در سه تکرار انجام شد. از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد. مکانیسم این روش احیا آهن Ш به آهن ІІ می باشد. (Oyaizu 1986)**

**قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH**

**قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره با استفاده از روش بکار رفته توسط Meizoso و همکاران (2006) تعیین شد. مطابق با روش ارائه شده 23.5 میلی گرم DPPH در 100 میلی لیتر متانول حل شد. سپس با متانول رقیق شد(1:10)؛ غلظت های مختلفی از عصاره ی بنه (500 تا2500** پي .پي.ام.**) تهیه شده و 0.1 میلی لیتر از این محلول ها با 3.9 میلی لیتر از محلول DPPH برای رسیدن به حجم 4 میلی لیتر مخلوط شدند. واکنش بعد از 4 ساعت در دمای اتاق کامل شد و جذب در 516 نانومتر در اسپکتروفتومتر JENWAY 6105 U.V/Vis خوانده شد. محلول DPPH- متانول به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. درصد بازداری DPPH هر یک از عصاره ها بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:**

 **= درصد بازداری** $\frac{Ablank-Asample}{Ablank}\*100$

 **Ablank و Asample به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه ها در طول موج 516 نانومتر هستند. پس از ترسیم نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد EC 50 محاسبه گردید؛ آزمایش در سه تکرار انجام شد.**

**یافته ها و بحث**

**در تحقیق حاضر تآثیر آب مادون بحرانی تحت شرایط دمایی مختلف بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ارزیابی شد ؛ برای نیل به این هدف میزان قدرت احیا کنندگی ، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و همچنین میزان ترکیبات پلی فنلی کل عصاره های بدست آمده بررسی شد ؛**

**قدرت احیا کنندگی آهن Ш**

**همانطوری که در نمودار مشاهده می شود ، با افزایش دما قدرت احیا کنندگی عصاره افزایش می یابد . آنتی اکسیدان هایی با قدرت احیا کنندگی آهن بالاتر از توانایی بیشتری در پایان دادن به واکنش های مخرب زنجیره ای رادیکالی برخورداند (واناساندارا و شهیدی 2005) . میزان غلظتی از عصاره که جذب در 700 nm برابر 0.5 شود (EC 50 ) به ترتیب برای دماهای 110 ° C ، 155 ° C و200 ° C برابر 0.269081 ، 0.2394 و 0.213 میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد .**

**شکل 2 . قدرت احیاکنندگی عصاره ی مادون بحرانی پوست بنه بر حسب EC 50 (n = 3 ) شکل 3 . نمودار هفت نقطه ای قدرت احیاکنندگی عصاره ی مادون بحرانی پوست بنه ( جذب بیشتر یعنی قدرت احیاکنندگی بیشتر ) . n=3 توانایی هیدروژن دهندگی یا رادیکال گیرندگی**

**در این روش اثر احیاکنندگی عصاره بر رادیکال پایدار DPPH در طول موج 516 nm بررسی می شود ( ون گادو 1997 ) . همانطوری که مشاهده می شود ، با افزایش دما میزان قدرت رادیکال گیرندگی عصاره زیاد می شود . غلظتی از عصاره که در آن غلظت ، 50 درصد رادیکال آزاد DPPH احیا می شود ( EC 50 ) به ترتیب برای دماهای 110 ° C ، 155 ° C و200 ° C برابر 1.45037 ، 0.784182 و 0.68516 میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد ؛ EC 50 پایین تر نشاندهنده ی قدرت رادیکال گیرندگی بالاتر است . نتایج اندازه گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد با نتایج اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن نسبت مستقیم داشت و عصاره های با قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد بیشتر حائز قدرت احیاکنندگی آهن بیشتری نیز بودند . فرهوش و همکاران ( 2009 ) نتیجه ی مشابهی را در مورد روغن پوست بنه بدست آورده بودند.**

**شکل 4 . قدرت رادیکال گیرندگی عصاره ی مادون بحرانی پوست بنه بر حسب EC 50 (n = 3 ) شکل 5 . نمودار شش نقطه ای قدرت احیاکنندگی عصاره ی مادون بحرانی پوست بنه ( جذب بیشتر یعنی قدرت احیاکنندگی بیشتر ) . n=3**

**میزان ترکیبات فنلی**

**ترکیبات فنلی بیشتر از دیدگاه بروز فعالیت آنتی اکسیدانی اهمیت دارند ؛ میزان کل ترکیبات فنلی عصاره ی بدست آمده از این روش در دماهای 110 ° C ، 155 ° C و 200 ° C به ترتیب 2045.11 ، 2096.4105 و 2002.75 میلی گرم بر حسب اسید گالیک بر کیلو گرم محاسبه گردید . افزایش دما از 110 ° C به 155 ° C باعث افزایش میزان ترکیبات پلی فنلی گردید ؛ این در حالی است که افزایش بیشتر دما تا 200 ° C موجب کاهش نسبی ترکیبات پلی فنلی می شود ؛**

**نتیجه گیری**

**نتایج این مطالعه نشان دادند که با افزایش دما تا 200 ° C میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH ، همچنین قدرت احیا کنندگی آهن عصاره ی بدست آمده بیشتر می شود ؛ ضمن اینکه بالاترین میزان ترکیبات پلی فنلی در 155 ° C بدست آمد . با توجه به نتایج حاصله ، روش استخراج با آب مادون بحرانی به دلایلی چون ارزان بودن ، مطابق با محیط زیست بودن ، همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی قابل قبول به عنوان روشی مناسب جهت استخراج مواد بیولوژیک می باشد .**

**فهرست منابع**

1. **حاجی حیدری ، د. 1376 . طرح تحقیقاتی استخراج روغن از پسته‌ی وحشی. جهاد دانشگاهی صنعتی اصفهان**

2. Ayala, R.S. and Luquede Castro, M.D., 2001, Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. Food Chem., 75: 109–113.

3. Farhoosh, R., Haddad Khodaparast, M.H., and Sharif, A. 2009. Bene hull oil as a highly stable and antioxidative vegetable oil. European Journal of Lipid Science and Technology (EJLST), 111 (12), 1259-1265.

4. Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M. A., et al.

(2005). Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. Journal of Chromatography A, 1084(1–2), 54–62.

5. I. Rodr´ıguez-Meizoso, F.R. Marin, M. Herrero, F.J. Se˜norans,

G. Reglero, A. Cifuentes , E. Ib´a˜ne. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 : 1560–1565

6. Miller, D.J. and Hawthorne, S.B., 1998, Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. Anal. Chem., 70: 1618–1621.

 7. Okuda, T., Yamashita, N., Tanaka, H., Matsukawa, H., & Tanabe, K. (2009).

Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrence found in Japanese wastewater treatment plants. Environment International, 35(5), 815–820.

8. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307–315.

9. Siriwong, W., Thirakhupt, K., Sitticharoenchai, D., Rohitrattana, J., Thongkongowm,

P., Borjan, M., et al. (2009). DDT and derivatives in indicator species of the aquatic food web of Rangsit agricultural area, Central Thailand. Ecological Indicators, 9(5), 878–882.

10. Wanasundara, P.K., and shahidi, F. 2005 . Antioxidants: science,technology, and applications. In Bailey,s industrial oil and fat products. Shahidi,F . (Eds) . John Wiley & Sons, Inc. New Jersey .

11. Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Mamot, S., & Osman, H. (2009). An experimental

design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (Curcuma domestica) using pressurised liquid extraction (PLE). LWT – Food Science and Technology, 42(1), 233–238.