Comparing and investigating the tannin of potato peels with four solvents

Introduction

Tannins are a type of phenolic compound with high molecular weight that are usually present in plants with molecular weight from 500 to more than (Da) 3000 and up to (Da) 20000. The chemical structure of tannin is very diverse and different. Tannin exists in plant cells in two forms, hydrolyzable and condensed. The tannin content can vary from 0.2% to 25% of the dry weight of the plant depending on the plant species, harvest time, plant habitat and extraction method. Currently, tannin is used in various fields such as leather making, medicine, food, beverage, ink and glue making, paint and tanning industries, plastic resins, water treatment and surface coatings. The application of tannin depends on the tannin concentration. Extraction of tannin from agricultural products is done by different methods. Maceration, decoction, Pressurized water extraction, Soxhlet, Supercritical fluid, Ultrasound and microwave are among these methods. Ultrasound extraction is an effective method for extracting chemical compounds, which is performed in a shorter period of time compared to other methods, and can be used for heat-sensitive compounds such as tannins.

materials and methods

Potato peel was randomly selected, dried and ground. Extraction was performed with an ultrasonic device, and after centrifugation, the total amount of phenolic compounds was measured by Folin-Ciocalteo method. Then, with the method of Makar et al., 2001, the amount of total tannin was calculated, and with the method of Porter et al., 1986, the amount of condensed tannin was calculated.

Results and discussion

Some of the results of this research are as follows

- The average amount of total tannin extracted by water solvent 142.8 ± 50.9mg per 100 grams of dry powder in a period of 15minutes, which is the highest amount of extraction.
- After water, methanol is the second solvent with the amount of 0.63 ± 55.9mg per 100 grams of dry powder in 15 minutes.
- The lowest amount of extraction related to ethanol solvent is in 10 minutes.
- There is a significant difference between the extraction time of 10 and 15 minutes for total tannin, and the extraction takes place more often in a longer period of time.

- Water is the best solvent for extraction due to its higher polarity.
- Comparing the results of this experiment with previous researches, water solvent is suitable for extracting tannin from potato skin. In addition, water solvent is a suitable solvent for extraction due to its compatibility with the environment.
- The effect of time on the amount of condensed tannin is not significant and changes in the amount of dense tannin are due to random changes.
- The amount of condensed tannin did not increase with the increase of extraction time, it is expected that the increase of the amount of total tannin with the increase of the extraction time is related to the increase of the amount of hydrolyzable tannin extracted in the sample.

Conclusion

In this research, the amount of tannin in potato peel was measured. To prepare potato peel, the ultrasound method is used, which is a less expensive and faster method than other methods. The effect of different solvents was investigated at different times. The results showed that by increasing the extraction time with ultrasound from 10 to 15 minutes, the total amount of extraction increases. But the final amount of dense tannin does not change significantly with increasing time. Among the different solvents, water solvents accounted for the highest amount of tan. Water increases your rate due to its high polarity. After water, methanol is the solvent, followed by acetone and ethanol. Water solvent is suitable for removing potato peel due to its polarity and high efficiency. In addition, water solvent is a suitable solvent for tannin extraction due to its compatibility with the environment. Potato peel contains significantly less tannin and dense tannin than hydrolyzable tannin.

Keywords: Potato peels , Extraction , Ultrasound , Phenolic compounds , Tannin

مقایسه و بررسی میزان تانن پوست سیب‌زمینی با چهار حلال مختلف

فاطمه مرتضوی [۱]، رسول خدابخشیان [*۲]، مرضیه معین فرد [۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی،دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. استادیار گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
* رسول خدابخشیان(khodabakhshian@um.ac.ir)

چکیده

گروهی از ترکیب‌های فنلی به نام تانن‌ها به لحاظ فعالیت بیولوژیکی و واکنش‌پذیری شیمیایی، قابل‌تشخیص هستند که در صنایع چرم‌سازی، چسب‌سازی، رنگ‌سازی، داروسازی و سایر صنایع کاربرد دارند. روش‌های استخراج این ترکیب‌ها بسیار متنوع هستند. استخراج به روش فراصوت روشی مؤثر برای استخراج ترکیب‌های شیمیایی است که در مقایسه با سایر روش‌ها در مدت‌زمان کوتاه‌تری انجام می‌گیرد و قابلیت استفاده برای ترکیب‌های حساس به حرارت را دارد. در این پژوهش استخراج ترکیب‌های فنلی، تانن و تانن متراکم به روش فراصوت از پوست سیب‌زمینی بررسی شد و اثر مدت‌زمان استخراج و نوع حلال روی میزان استخراج این ترکیب‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور پوست سیب‌زمینی پس از شستشو، خشک و آسیاب گردید سپس با چهار حلال متانول، اتانول، استون و آب و در دو زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه عصاره‌گیری انجام شد. با افزایش زمان استخراج میزان ترکیب‌های فنلی و تانن کل استخراج شده افزایش می‌یابد؛ اما میزان تانن متراکم استخراج شده وابسته به زمان استخراج نمی‌باشد. کم‌ترین استخراج مربوط به حلال اتانول ((میلی‌گرم در هر صد گرم پوست)۶/۲۲±۱۳/۳) در مدت‌زمان ۱۰ دقیقه و بیش‌ترین استخراج را حلال آب ((میلی‌گرم در هر صد گرم پوست)۹/۵۰±۱۴۲/۸) در مدت‌زمان استخراج ۱۵ دقیقه به خود اختصاص داد. حلال آب به دلیل دارابودن قطبیت و راندمان بالا برای استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی مناسب است. به‌علاوه حلال آب به دلیل سازگاری با محیط‌زیست حلال مناسبی برای استخراج تانن است. پوست سیب‌زمینی حاوی مقادیر قابل‌توجهی تانن و مقدار کمتری تانن متراکم نسبت به تانن قابل هیدرولیز می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: تانن، تانن متراکم، ترکیب‌های فنلی، فراصوت

مقدمه

یکی از چالش‌های جدی بیش‌تر کشورها به‌ویژه کشورهای درحال‌توسعه، روند افزایشی ضایعات کشاورزی است. بخش کشاورزی در ایران با تولید سالانه ۱۰۰ میلیون تن محصول، نقش عمده‌ای در تأمین مواد اولیه صنایع و ۹۰ درصد نیاز غذایی و در نتیجه اقتصاد کشور را دارد. این در حالی است که ضایعات کشاورزی در ایران بنا بر اظهارات مسئولان ۳۰ تا ۳۵ درصد با ارزشی معادل پنج میلیارد دلار در سال تخمین زده شده است که در حدود شش برابر متوسط جهان و همچنین معادل ۲۵ درصد درآمد نفتی کشور است (Eazadi and Hayati. 2013) به‌عنوان‌مثال در صنعت غذا، دانه و پوست گیاهان و میوه‌ها به‌عنوان ضایعات در نظر گرفته می‌شود، درحالی‌که منبع غنی از ترکیب‌های فعال گیاهی هستند؛ بنابراین استفاده

از ضایعات کشاورزی به کاهش آلودگی محیط‌زیست و اقتصاد کمک می‌نماید (Sultan Toyeh et al. 2013) همچنین مقدار زیاد زباله تولید شده توسط کارخانه‌های صنایع غذایی مشکلات جدی زیست‌محیطی ایجاد می‌کند و در صورت عدم استفاده مؤثر از آن، زیان‌های اقتصادی نیز به همراه دارد. گزارش‌های تحقیقاتی مختلف نشان داده است که محصولات جانبی صنایع غذایی می‌توانند منابع خوبی از ترکیبات فعال گیاهی باشند (Jahurul *et al.* 2015). علاوه بر این با اینکه استفاده از مواد تهیه شده از نفت در چندین دهه گذشته گسترش‌یافته است، اما در حال حاضر به دلیل مشکلاتی مانند، نوسان‌های قیمت نفت، مشکلات تخلیه ذخایر و آلودگی ناشی از این مواد موضوع موردتوجهی است. علاوه بر این، امروزه اهمیت مواد پایدار (به‌عنوان‌مثال اسید پلی لاکتیک، کیتوزان، لیگنین، تانن و غیره) به‌منظور کاهش مصرف روغن خام و کاهش تأثیرات زیست‌محیطی، در حال افزایش است (Luckeneder *et al.*۲۰۱۶). دراین‌بین ترکیب‌های فنلی، گروهی از ترکیب‌های شیمیایی گیاهی هستند که به‌واسطه ساختار شیمیایی ویژه خود قادر به مهار رادیکال‌های آزاد، غیرفعال‌کردن اکسیژن یگانه و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی هستند (Beutner *et al.* 2001). به‌طورکلی گیاهان دارای انواع وسیعی از متابولیت‌های ثانویه (ترکیب‌های فنلی، ترپن‌ها و آلکالوئیدها) هستند. این ترکیب‌ها می‌توانند گیاهان را در مقابل انواع بیماری‌ها محافظت نمایند. متابولیسم ترکیب‌های فنلی در گیاهان پیچیده است و باعث ایجاد دسته وسیعی از ترکیب‌ها شامل انواع پیگمان‌های موجود در گل‌ها – موسوم به آنتوسیانیدین‌ها – تا ترکیب‌های فنلی پیچیده موجود در دیواره سلولی گیاه می‌شوند. به‌هرحال، گروهی از ترکیب‌های فنلی معروف به تانن[1]ها به طور واضح از سایر فنل‌های ثانویه گیاهی، به لحاظ فعالیت‌های بیولوژیکی و واکنش‌پذیری شیمیایی، قابل‌تشخیص هستند. (Ebrahimi and Sedghi. 2013). تانن یکی از جالب‌ترین مواد قابل‌استخراج از گیاهان است. تانن‌ها ساختارهای فنلی طبیعی هستند که به‌وفور در پوست و همچنین چوب و مقدار کمتری در برگ و میوه انواع گیاهان یافت می‌شوند (Mueller-Harvey. 2001; Schofield *et al*. 2011). تانن‌ها نوعی ترکیب فنلی با وزن مولکولی بالا هستند که معمولاً در گیاهانی که وزن مولکولی از ۵۰۰ تا بیش از (Da) ۳۰۰۰و حتی تا (Da) ۲۰۰۰۰دارند، وجود دارد. ساختار شیمیایی تانن بسیار متنوع و متفاوت است. تانن در سلول‌های گیاهی به دو صورت قابل هیدرولیز و متراکم وجود دارد. محتوای تانن بسته به گونه‌های گیاهی، زمان برداشت، زیستگاه گیاهان و روش استخراج می‌تواند از ۲/ ۰٪ تا ۲۵٪ وزن خشک گیاه متغیر باشد. در حال حاضر، تانن در زمینه‌های مختلفی از جمله چرم‌سازی، دارو، غذا، نوشیدنی، ساخت جوهر و چسب، صنایع رنگ و برنزه کردن، رزین‌های پلاستیکی، تصفیه آب و پوشش‌های سطحی استفاده شده است. کاربرد تانن به غلظت تانن بستگی دارد (Cuong et al. 2020).

استخراج تانن از محصولات با روش‌های مختلفی انجام می‌شود. روش‌هایی مانند خیساندن، جوشاندن، فراصوت، سوکسله، استخراج آب تحت‌فشار و استخراج با ماکروویو از انواع این روش‌ها هستند. استخراج به کمک فراصوت روشی مؤثر برای استخراج ترکیبات شیمیایی از مواد گیاهی است که در مقایسه با سایر روش‌های استخراج در مدت‌زمان کوتاه‌تری انجام می‌گیرد و قابلیت استفاده برای استخراج ترکیب‌های حساس به حرارت مورداستفاده در مواد غذایی، محصولات سلامت بخش، مواد دارویی و مواد آرایشی را داراست (Moftakher et al. 2013) یک دستگاه فراصوت با استفاده از امواج صوتی باانرژی بالا سبب ایجاد نیرویی جهت نفوذ حلال به موادی که قابلیت مرطوب شدن ندارند، می‌شود. در یک حمام فراصوت می‌توان چندین نمونه را به طور هم‌زمان به کار گرفت (Ebrahimi and Sedghi. 2013) . در برخی نمونه‌ها ترکیبات فنولی می‌توانند به طور مؤثر

[1] Tannin

و تکرارپذیر با استفاده از دستگاه فراصوت استخراج شوند(Torti et al.2015). در این روش ، قدرت اولتراسونیک، دما و زمان عواملی هستند که به‌شدت بر بازده استخراج تانن تأثیر می‌گذارند (Cigdem and Hasan .2012). نظر به این که سیب‌زمینی یکی از محصول‌های عمده کشاورزی در ایران است و باتوجه‌به میزان زیاد ضایعات پوست سیب‌زمینی و تعداد بالای کارخانه‌های فراوری سیب‌زمینی و این که پوست سیب‌زمینی یک منبع ترکیب‌های فنولی است، انتظار می‌رود میزان قابل‌توجهی تانن از پوست سیب‌زمینی قابلیت استخراج و استفاده را داشته باشد. این آزمایش در سه مرحله در آزمایشگاه گروه صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه

پوست سیب‌زمینی تازه از شرکت صنایع غذایی شهد پاک (تاپیس) واقع در کیلومتر ۲۰ جاده مشهد – قوچان تهیه شد و متانول ۹۸٪، اتانول ۹۶٪، استون ۹۹٪، معرف فولین سیوکالتئو، محلول کربنات سدیم ۷/۵٪، پلی‌وینیل پلی پیرولیدون، سولفات آمونیوم فریک ۲ درصد، اسیدکلریدریک ۳۷٪ و بوتانول ۹۹٪ تهیه شده از شرکت صنایع شیمیایی مجللی و مرک آلمان، مورداستفاده قرار گرفت. نمونه‌هایی از محصولات فرعی پوست سیب‌زمینی تازه به طور تصادفی برداشت شده تمیز شده و پس از شستشو در سایه کامل خشک شدند. سپس آسیاب شده و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. پس از تعیین درصد رطوبت به‌منظور استخراج ترکیبات فنلی در شرایط آزمایشگاه از حلال‌ها استفاده شد. در این بررسی از حلال‌های متانول، اتانول استون و آب برای استخراج بهره‌گیری شد. به این صورت که ۱ گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر حلال مخلوط شده و با دستگاه فراصوت در مدت‌زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه عصاره‌گیری شد. محلول حاصل پس از عصاره‌گیری با دستگاه حمام فراصوت در دمای ۲۵ درجه از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بخش رویی محلول (سوپرتانانت) جدا شده و باقی‌مانده آن با ۱۰ میلی‌لیتر حلال مخلوط و دوباره سانتریفیوژ شد. در آزمایش‌ها اولیه نشان داده شد که میزان بازیافت کل ترکیبات فنولی در سوپرتانانت دوم کمتر از ۵ درصد سوپرتانانت اول می‌باشد؛ بنابراین مرحله دوم استخراج حذف شد.

شکل ۱- نمونه داخل حمام اولتراسوند

Figure 1- Sample inside the ultrasonic bath

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی عصاره (عصاره فاقد پلی‌وینیل پلی پیرولیدون)

برای تعیین میزان ترکیبات فنلی ۱۲۵ میکرولیتر از محلول استخراج شده برداشته و با ۳۷۵ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتئو ۱،۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (حجمی/وزنی) و ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کرده ورتکس کرده و به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد، سپس جذب محلول در ۷۶۵ نانومتر توسط طیف‌سنج فرابنفش – مرئی (یونیکو – آمریکا) قرائت شد(Makkar et al. 2001).

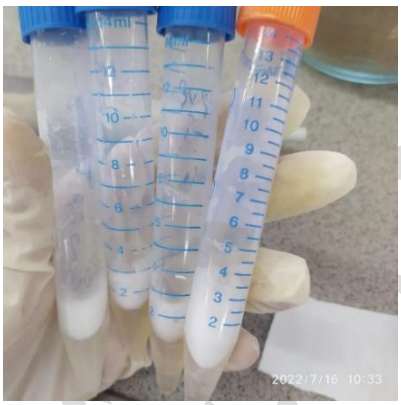
شکل ۲- محلول تعیین ترکیب‌های فنلی

Figure 2- Determination solution of phenolic compounds

اندازه‌گیری ترکیب‌های فنلی غیر تانن (عصاره حاوی پلی‌وینیل پلی پیرولیدون)

میزان کل تانن بر اساس روش مکار و همکاران (۲۰۰۱) با معرف فولین انجام شد. در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پلی پیرولیدون ریخته سپس یک میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر عصاره حاوی تانن (عصاره اولیه) به آن اضافه شده و ورتکس شد. فالکون‌ها به مدت

۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شده و دوباره ورتکس شدند. سپس ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده تا تانن با پلی‌وینیل پلی پیرولیدون رسوب کند سپس محلول رویی که فاقد تانن است جدا شد. ۱۲۵ میکرولیتر از سوپرتانانت اول برداشته و در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. (۳ تکرار برای هر نمونه) سپس ۳۷۵ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتئو (با نسبت یک به ۱۰ رقیق شده) و ۱/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (وزنی/حجمی) اضافه شد و حجم محلول با کمک پنج میلی‌لیتر آب دیونیزه به هفت میلی‌لیتر رسانده شد (شکل ۳-۱۲). ورتکس شده و به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط نگه‌داری شد تا میزان ترکیبات فنولی فاقد تانن محاسبه شود و از اختلاف آن با ترکیب حاوی تانن مقدار تانن خالص محاسبه شود.



شکل ۳- محلول تعیین تانن

Figure 3- Determination solution of Tannin

تهیه محلول استاندارد جهت تعیین فنول کل

منحنی استاندارد با استفاده از اسیدگالیک تهیه شد. بدین منظور ۵۰۰ میکروگرم اسیدگالیک را در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل کرد و محلول‌های استاندارد در محدوده غلظتی پنج تا ۵۰۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر آب با رقیق کردن محصول مادر تهیه شد. از محلول استاندارد به‌دست‌آمده مقادیر ۱۲۵ میکرولیتر برداشته و بعد از رساندن حجم آن به هفت میلی‌لیتر توسط پنج میلی‌لیتر آب مقطر، ۳۷۵ میکرولیتر فولین و ۱/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (وزنی/حجمی) بعد از ورتکس کردن به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر برای هر محلول استاندارد با استفاده از طیف‌سنج فرابنفش – مرئی اندازه‌گیری شده و منحنی جذب در غلظت رسم گردید و شیب منحنی محاسبه شد. (رابطه ۱)

$$Y = 0.0021X - 0.0041$$ رابطه ۱

Yجذب نمونه منهای جذب شاهد

X غلظت معادل اسیدگالیک ($mg\ 100ml^{-1}$)

میزان جذب در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با کمک طیف‌سنج فرابنفش – مرئی (یونیکو، آمریکا) اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم پوست سیب‌زمینی گزارش شدند (Mussatto et al. 2011).

اندازه‌گیری تانن متراکم قابل‌استخراج

برای اندازه‌گیری میزان تانن متراکم ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره تانینی با ۳ میلی‌لیتر معرف بوتانول – اسیدکلریدریک و ۰/۱ میلی‌لیتر معرف فریک مخلوط شده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه داخل بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. پس از خنک‌شدن جذب را در ۵۵۰ نانومتر قرائت کردیم. میزان تانن متراکم بر اساس درصد ماده خشک و معادل لوکوآنتوسیانیدین به‌صورت زیر (رابطه ۲) (Porter et al. 1986) محاسبه شد:

رابطه ۲ (پوست $mg\ 100g^{-1}$)تانن‌های متراکم به‌صورت معادل لوکوسیانیدین‌ها= جذب در 550 نانومتر $\times \frac{78}{26} \times \frac{\text{درصد ماده خشک}}{\text{ضریب رقت}}$

در این معادله فاکتور رقت برای استون عدد یک می‌باشد.

شکل ٤– نمونه در دستگاه بن ماری

Figure 4- Sample in water bath

روش‌های آماری

تجزیه‌وتحلیل نتایج حاصل از آزمایش‌ها در قالب آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد که در آن فاکتور اول نوع حلال مورداستفاده برای استخراج (آب، متانول، اتانول و استون)، فاکتور دوم زمان استخراج (۱۰ و ۱۵ دقیقه) می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و آزمون فیشر صورت گرفت. برای این منظور از نرم‌افزار مینی تب[۲] استفاده شد. همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل[۳] استفاده گردید.

نتایج و بحث

[2] Minitab 2021
[3] Excel 2016

در این پژوهش استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی با ۴ حلال متانول، اتانول، استون و آب مورد بررسی قرار گرفت. کلیه نمونه‌ها با روش اولتراسوند عصاره‌گیری شد. میزان کل تانن بر اساس روش Makkar و همکاران (2001) با معرف فولین سیوکالتئو انجام شد. میزان تانن متراکم کل (پروآنتوسیانیدین) توسط روش Porter و همکاران (۱۹۸۶) محاسبه گردید. آزمایش‌های سنجش ترکیبات فنلی، تانن و آنتوسیانین، وجود مقادیر نسبتا بالای این ترکیبات را در عصاره‌های مختلف تایید نمود.

نتایج استخراج و اندازه‌گیری ترکیب‌های فنلی

میزان ترکیب‌های فنلی قابل‌استخراج از پودر پوست سیب‌زمینی به تفکیک نوع حلال و زمان استخراج در جدول 1 آورده شده است.

جدول ۱– نتایج استخراج ترکیبات فنلی پوست سیب‌زمینی (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پوست خشک)

Table 1- Results of the phenolic compounds of potato peel (mg/100 g of dry powder)

حلال solvent	زمان (دقیقه) Time(min)	ضریب تغییرات CV%	میانگین±انحراف معیار
متانول Methanol	۱۰	%۲۰	۷۸/۲±۱۵/۳۰
	۱۵	%۱۰	۱۴۶±۱۴/۹۳
اتانول Ethanol	۱۰	%۱۹	۴۵/۵±۸/۸۲
	۱۵	%۴	۱۱۴/۷±۴/۷۵
استون Aceton	۱۰	%۱۰	۴۸±۴/۷۵
	۱۵	%۸	۶۵/۵±۵/۵۴
آب Water	۱۰	%۴	۱۵۶±۵/۴۸
	۱۵	%۲	۲۱۹/۵±۴/۷۵

باتوجه‌به جدول ۱ که مربوط به میزان فنل استخراجی از پوست سیب‌زمینی با حلال‌های مختلف می‌باشد، مشاهده می‌شود که حلال آب با اختلاف زیادی بالاتر از سایر حلال‌ها قرار گرفته است.

میانگین میزان ترکیب‌های فنلی استخراج شده با حلال آب در زمان ۱۵ دقیقه 219/5±4/75 (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر) می‌باشد. پس از آن حلال متانول در زمان ۱۵ دقیقه با مقدار عددی ۹۳/۱۴ ±۱۴۶ (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر) در جایگاه دوم قرار دارد. کم‌ترین میزان ترکیب‌های فنلی استخراج شده مربوط به حلال اتانول در زمان ۱۰ دقیقه به مقدار ۸/۸۲ ±۴۵/۵(میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر) می‌باشد.

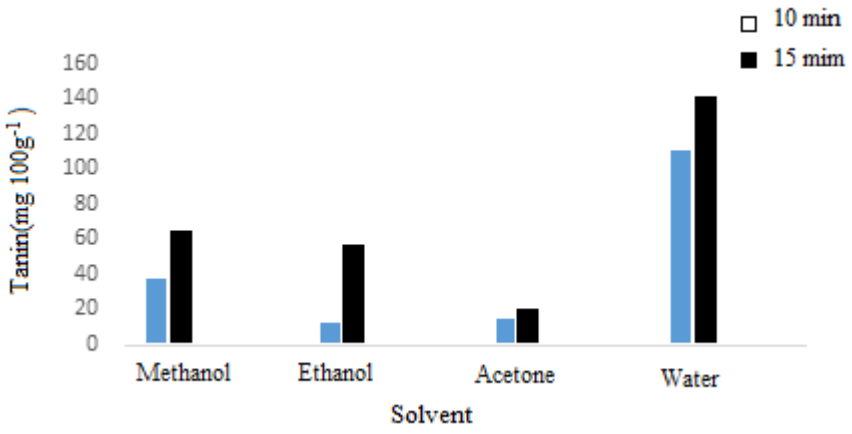
میانگین میزان ترکیب‌های فنلی پوست سیب‌زمینی ۱۵/۸–۳۲/۲ ٪ وابسته به نوع واریته سیب‌زمینی می‌باشد. ترکیب‌های فنلی پوست سیب‌زمینی قرمز ۵۸/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست و در سیب‌زمینی قهوه‌ای میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم (اسیدگالیک) می‌باشد (Onyeneho et

al.1993) بخش بزرگی از ترکیب‌های فنلی موجود در پوست سیب‌زمینی بسیار محلول در آب هستند. مقدار ترکیب‌های فنلی موجود در پوست سیب‌زمینی ۱۱ میلی‌گرم در یک گرم پوست گزارش شده است (Wu et al. 2012).

Ezekiel و همکاران (۲۰۱۳) میزان فنل کل در سیب‌زمینی را ۲۳۷/۷ g/gμ – ۵۲۷/۲ گزارش کردند. حلال برای حل‌کردن ماده در خود نیاز به غلبه بر جاذبه بین‌مولکولی در ماده موردنظر دارد. با افزایش قطبیت حلال بازده عصاره‌گیری افزایش پیدا می‌کند. آب بالاترین قطبیت را بین حلال‌های مورد آزمایش دارا می‌باشد. این امر در بالابودن راندمان عصاره‌گیری با آب مؤثر است؛ زیرا بخش زیادی از ترکیبات پوست سیب‌زمینی از مواد قطبی تشکیل شده‌اند. علت تفاوت در میزان ترکیبات استخراج شده از پوست سیب‌زمینی در تحقیقات مختلف به گونه سیب‌زمینی، درجه خلوص حلال‌های مورداستفاده و شرایط استخراج نسبت داده می‌شود (Mohagheghi et al. 2017). ترکیبات فنلی پوست انار را با چهار حلال اتانول، متانول، استون و آب استخراج کردند و محتوای فنل کل را 35/669mg/100g ± ۱۹/۵ گزارش کردند(Wang et al.2013) . استخراج پلی‌فنل‌ها از پوست انار یا سایر مواد زائد صنایع غذایی توسط متانول یا سایر حلال‌های آلی انجام می‌شود. این امر نیازمند حلال‌های آلی پرخطر بر سلامت انسان و محیط‌زیست می‌باشد. استفاده از حلال آب با کاهش خطر آلودگی می‌تواند روشی مؤثر در استخراج ترکیبات پلی‌فنلی باشد (Cama et al.2010)

نتایج استخراج و اندازه‌گیری تانن کل

میزان تانن استخراج شده حاصل از روش فراصوت با ۴ حلال و ۲ زمان در شکل ۵ آورده شده است.



شکل ۵– میزان تانن استخراج شده از پودر پوست سیب‌زمینی (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر خشک)– a متانول – b اتانول

Figure 5- Amount of tannin extracted from potato peel powder (mg/100 grams of dry powder)

باتوجه‌به شکل ۵ که مربوط به میزان تانن استخراجی با استفاده از حلال‌های مختلف می‌باشد، مشاهده می‌شود که حلال آب با زمان استخراج ۱۵ دقیقه با مقدار عددی ۹/۵۰±۱۴۲/۸(میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر خشک) بالاترین میزان تانن استخراجی را به خود اختصاص داده است. به‌طورکلی مقدار تانن قابل‌استخراج با حلال آب در مدت‌زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه بیشتر از سایر حلال‌ها بود. بعد از آب متانول در مدت‌زمان استخراج ۱۵

دقیقه با مقدار ۹/۵۵±۰/۶۳(میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر خشک) در رتبه بعدی قرار می‌گیرد. کمترین میزان استخراج تانن مربوط به حلال اتانول در مدت‌زمان ۱۰ دقیقه می‌باشد.

عوامل مختلفی از جمله تفاوت در واریته سیب‌زمینی مورداستفاده، نسبت اجزاء تشکیل‌دهنده پوست سیب‌زمینی، روش آماده‌سازی و اندازه‌گیری نمونه و شرایط کشت در اختلاف نتایج تحقیقات مختلف در مورد مقدار تانن محصولات تأثیر دارد.

Sukor (۲۰۲۱) میزان اسیدتانیک موجود در پوست پیاز را با روش اولتراسوند ۹۹/۳۶ میکروگرم در هر گرم پوست بیان کرد.

استفاده از امواج فراصوت بر خلاف روش‌های دیگر استخراج مانند ماکروویو و آب فوق‌بحرانی سریع‌تر انجام می‌شود و تخریب کم‌تری به همراه دارد. کم‌هزینه‌تر است و ابزار ساده‌تری برای استخراج نیاز دارد (Laborde et al. 1998; Herrera et al. 2004)

نتایج تجزیه واریانس میزان استخراج تانن کل

نتایج تجزیه واریانس جهت تأثیر نوع حلال و زمان بر روی میزان تانن قابل‌استخراج از پوست سیب‌زمینی در جدول 2 گزارش شده است.

جدول 2- نتایج تجزیه واریانس برای میزان تانن کل

Table 2- Results of analysis of variance for total tannin content

عامل تغییرات Source	درجه آزادی Degrees of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	میانگین مجموع مربعات Meen of Squares	F-Value	P-Value	F 5%	F 1%
تیمار Treatment	7	48379.54	6911.36	186.59**	0.00**	2.66	4.03
حلال Solvent	3	43042.6	14347.5	387.35**	0.00**	3.24	5.29
زمان Time	1	3700.6	3700.6	9.99**	0.00**	4.49	8.53
اثرات متقابل Interaction effect	3	1636.34	545.45	14.72**	0.00**	3.24	5.29
اشتباه Error	16	592.58	37.04				
کل Total	23	48972.12					

**: معنی‌دار در سطح 1 درصد

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اثر مستقل نوع حلال ($P<۰/۰۱$) در سطح ۱٪ و ۵٪ معنادار شده است. یعنی بین حلال‌های مختلف در استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی اختلاف وجود دارد. همچنین اثر مستقل زمان استخراج روی میزان تانن معنادار می‌باشد، به عبارتی در زمان‌های استخراج متفاوت مقدار استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی متغیر است. اثر متقابل نوع حلال و زمان نیز معنادار شده است. یعنی میزان استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی به زمان استخراج نیز وابسته است. با افزایش زمان استخراج، میزان استخراج تانن کل افزایش می‌یابد. در نتیجه بهترین زمان برای استخراج تانن ۱۵ دقیقه می‌باشد، زمان‌های بالاتر به دلیل ثابت‌بودن میزان تانن استخراج شده توصیه نمی‌شود.

Kilicarislan وOzgunay (۲۰۱۲) با استخراج تانن از بلوط به روش اولتراسوند و مقایسه اثر دما بر استخراج تانن باتوجه‌به آزمون تجزیه واریانس و مقایسات دانکن بیان کردند که استخراج با فراصوت می‌تواند روش مؤثری برای ارزیابی تانن باشد. همچنین افزایش زمان استخراج تأثیر معناداری بر بازده استخراج داشته و باعث افزایش آن می‌شود.

استفاده از روش فراصوت باعث افزایش بازده استخراج و مقدار تانن در نمونه بلوط شد و کاهش زمان استخراج با این روش امکان‌پذیر است (Schieber and Saldana. 2009).

باتوجه‌به نتایج آزمایش و تحقیقات سایر محققان فراصوت روشی مناسب برای استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها در استخراج تانن کل

مقایسه میانگین میان حلال‌های مورد بررسی توسط آزمون دانکن انجام شد. نتایج در جدول 3 گزارش شد.

جدول 3- نتایج مقایسه میانگین تانن کل

Table 2- Comparison results of total tannin average

Time زمان / **Solveent** حلال	**10** min دقیقه	**15** min دقیقه
متانول Methanol	37.96 [a]	62.96 [c]
اتانول Ethanol	13.3 [a]	57.13 [c]
آب Water	111.6 [b]	142.83 [d]
استون Acetone	18.83 [a]	14.26 [a]

در مقایسه میانگین بین حلال‌های مورد بررسی بین حلال آب با متانول، اتانول و استون اختلاف معنادار مشاهده گردید. اما بین استون و اتانول اختلاف معناداری وجود ندارد. همچنین بین حلال‌های متانول و اتانول نیز اختلاف معناداری وجود ندارد. نوع حلال در میزان استخراج تانن تأثیرگذار است، این ارتباط به پیوند داخلی ترکیبات فنلی موجود در محصول و سازگاری با ترکیب شیمیایی حلال مورداستفاده مرتبط است.

در مقایسه میانگین بین زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه، برای حلال‌های آب، متانول و اتانول اختلاف معنادار مشاهده شد. در زمان‌های کوتاه استخراج ترکیبات از محلول به طور کامل انجام نمی‌شود. نتایج آزمایش نشان داد زمان ۱۵ دقیقه زمان مناسب‌تری برای استخراج کامل تانن از عصاره می‌باشد.

متانول برای استخراج پلی‌فنل‌هایی با وزن مولکولی پایین و استون آبی برای استخراج پلی‌فنل‌ها با وزن بالا بیشترین کاربرد را دارند (Labarbe et al. 1999). آب بالاترین بازده در استخراج تانن از پوست بلوط را دارد و بهترین حلال در استخراج تانن از پوست بلوط می‌باشد، زیرا آب قطبیت بیشتری نسبت به دیگر حلال‌ها دارد. بیشتر ترکیباتی که قابلیت استخراج دارند؛ مانند لیگنین‌های قابل‌حل، املاح معدنی، کربوهیدرات‌ها و سلولزهای موجود در پوست، به‌خوبی در آب حل می‌شوند؛ اما در حلال‌های دیگر گزینشی حل می‌شوند به عبارتی در جریان استخراج پیوندهای گلیکوزیدی آبکافت نمی‌شوند(Jahanshahi et al. 2019). همچنین نتایج تحقیق روی پوست اکالیپتوس نشان داده است بیشترین میزان استخراج عصاره به‌وسیله حلال آب انجام شده است (Yazaki et al. 1993).

از مقایسه نتایج این آزمایش با تحقیقات پیشین نتیجه‌گیری می‌شود که حلال آب برای استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی مناسب است. به‌علاوه حلال آب به دلیل سازگاری با محیط‌زیست حلال مناسبی برای استخراج می‌باشد.

نتایج استخراج و اندازه‌گیری تانن متراکم

میزان تانن متراکم قابل‌استخراج از پوست سیب‌زمینی با استفاده از حلال استون به روش فراصوت اندازه‌گیری شد. روش مذکور با حلال استون قابلیت اندازه‌گیری میزان تانن متراکم را دارد. نتایج در جدول 4 گزارش شد.

جدول ٤- میزان تانن متراکم استخراج شده از پودر پوست سیب‌زمینی (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر)

Table 4- Amount of condensed tannin extracted from potato peel powder (mg/100 grams of powder)

آنتوسیانین Anthocyanin	10min دقیقه	15min دقیقه
استون Acetone	5.96	6.89

Ezekiel و همکاران (۲۰۱۳) میزان تانن متراکم موجود در واریته‌های مختلف سیب‌زمینی را ۲۲–۳۶۸ میلی‌گرم در هر ۱۰ گرم پودر خشک سیب‌زمینی عنوان کردند و بیان کردند سیب‌زمینی می‌تواند به‌عنوان منبع آنتوسیانین طبیعی مورداستفاده قرار بگیرد؛ زیرا هزینه تولید سیب‌زمینی در مقایسه با سایر محصولات باغی نسبتاً پایین است. غلظت آنتوسیانین در انواع واریته‌های سیب‌زمینی متفاوت است.

Jansen و Flamme (۲۰۰۶) نشان داد محتوای آنتوسیانین سیب‌زمینی پس از ۱۳۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تغییر قابل‌توجهی نداشته است. در نتیجه آنتوسیانین موجود در عصاره در طول مدت آزمایش از بین نمی‌روند.

Bule و همکاران (۲۰۲۰) میزان تانن متراکم موجود در پوست لوبیا را ۴۰/۶ $mg\ g^{-1}$ وزن خشک ماده گزارش کرده‌اند. این میزان برای زردآلو ۰/۸–۷/۳ $mg\ g^{-1}$ ، برای سیب ۲۷/۸–۴/۶ mg/g ، برای هلو ۱۱–۲/۹ $mg\ g^{-1}$ ، برای آلو ۳۳/۴–۲–۳ $mg\ g^{-1}$ ، برای چای به طور میانگین ۱۹۱/۶ $mg\ g^{-1}$ برای پوست انگور ۱/۳۸۷ $mg\ g^{-1}$ برای هسته انگور ۲۸/۳–۱/۶ $mg\ g^{-1}$ و برای سورگوم ۱۲/۸ $mg\ g^{-1}$ گزارش شده است.

میزان کل تانن متراکم در پوست سیب‌زمینی به طور میانگین ۶/۴۲ (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم پودر) می‌باشد. ای مقدار تانن متراکم در عصاره و اختلاف آن با میزان کل تانن بیانگر این است که عصاره دارای میزان قابل‌توجهی تانن قابل هیدرولیز می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس میزان استخراج تانن متراکم

نتایج تجزیه واریانس جهت تأثیر زمان استخراج بر روی میزان تانن قابل‌استخراج از پوست سیب‌زمینی در جدول 5 گزارش شده است.

جدول ٥- نتایج تجزیه واریانس برای میزان تانن متراکم

Table 5- Results of analysis of variance for the amount of dense tannin

عامل تغییرات Source	درجه آزادی Degrees of	مجموع مربعات Sum of	میانگین مجموع مربعات	F-Value	P-Value	F 5%	F 1%

	Freedom	Squares	Meen of Squares				
زمان Time	1	6.43	6.43	0.84 ns	0.412	7.71	21.20
خطا Error	4	30.77	7.68				
کل Total	5	37.15					

ns: غیرمعنی‌دار.

همان گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود مقدار احتمال بیش‌تر از ۰/۰۵ می‌باشد. این نشان می‌دهد اثر زمان روی میزان تانن متراکم معنی‌دار نمی‌باشد و تغییرات میزان تانن متراکم ناشی از تغییرات تصادفی است. همچنین مقایسه میانگین میان زمان‌های استخراج توسط آزمون دانکن انجام شد و مشاهده شد برای حلال استون اختلاف معناداری بین زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه وجود نداشت. با افزایش زمان استخراج میزان تانن متراکم افزایش نمی‌یافت، انتظار می‌رود افزایش میزان تانن کل با افزایش زمان استخراج مربوط به افزایش میزان تانن قابل هیدرولیز استخراج شده در نمونه باشد.

نتیجه‌گیری

باتوجه‌به وجود تانن در پوست سیب‌زمینی و نیاز صنایع کشور به این ماده مهم اهمیت بررسی این ماده بر همگان روشن است. در این پژوهش میزان تانن موجود در پوست سیب‌زمینی تهیه شده از یک کارخانه فراوری محصول سیب‌زمینی اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۲۰ کیلوگرم پوست سیب‌زمینی که به روش صنعتی پوست‌گیری شده بود مورد آزمون قرار گرفت. برای استخراج تانن از پوست سیب‌زمینی از روش فراصوت که روشی کم‌هزینه‌تر و سریع‌تر نسبت به سایر روش‌هاست و روش طیف‌سنجی و معرف فولین سیوکالتئو و منحنی استاندارد اسیدگالیک و طیف‌سنج فرابنفش – مرئی (یونیکو – آمریکا) استفاده شد. اثر حلال‌های مختلف در زمان‌های متفاوت استخراج بررسی گردید. نتایج نشان داد با بالابردن زمان استخراج با فراصوت از ۱۰ به ۱۵ دقیقه میزان استخراج تانن کل افزایش می‌یابد. اما مقدار نهایی تانن متراکم با افزایش زمان استخراج تغییر چشمگیری ندارد. بین حلال‌های مختلف حلال آب بیشترین میزان استخراج تانن را به خود اختصاص داد. آب به دلیل قطبیت بالا میزان استخراج تانن را افزایش می‌دهد. بعد از آب حلال متانول و سپس به ترتیب استون و اتانول در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده در تعیین میزان تانن پوست سیب‌زمینی که مقدار قابل‌توجهی است، می‌توان اقدام به استخراج تانن موجود در پوست سیب‌زمینی کرده و در صنایع غذایی، چرم، چسب، رنگ و دارو مورداستفاده قرار بگیرد. همچنین باتوجه‌به خاصیت ضدپوسیدگی تانن می‌توان تأثیر استفاده از تانن پوست سیب‌زمینی بر حفظ تازگی محصولات فراوری شده سیب‌زمینی مانند چیپس سیب‌زمینی را مورد بررسی قرارداد.

منابع

Beutner, S., Bloedorn, B. and Frixel, S. 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavenoids, phenols and indigoids. The role of β- carotene in antioxidants functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 559-568.

Bule, M., Khan, F., Nisar, M. F.,and Niaz, K. 2020. Tannins (hydrolysable tannins, condensed tannins, phlorotannins, flavono-ellagitannins). *Elsevier*.

Cama, M., and Hısıl, Y. 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Journal of Food Chemistry*,123: 878-885.

Cigdem,K.O.and Hasan,O. 2012. Ultrasound extraction of valonea tannin and its effects on extraction yield. *Journal of American Leather Chemists Association*, 107(11): 394-403.

Cuong, D. X., Hoan, N. X., Dong, D. H., Thuy, L. T. M., Thanh, N. V., Ha, H. T., Tuyen, D. T. T., Chinh, D. X. 2020. Tannins: Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge. United Kingdom: *IntechOpen*.

Eazadi, ,N., Hayati, D., 2013. Waste reduction, future development. Quarterly Journal of Engineering and Agriculture. Natural Resources, 30:24-39.

Ebrahimi, P., Sedghi, M., 2013. tannin Chemistry .Hagerman, Ann., E. Makhtumaghli Faraghi Publications in collaboration with Gonbad Kavos University. Gonbad Kavos University.

Ezekiel, R., Singh, N., Sharma, S., and Kaur, A. 2013. Beneficial phytochemicals in potato — a review. *Journal of Food Chemistry*, 50(2): 487-496.

Herrera, M.C., Luque, de Castro MD. 2004. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. Analytical and bioanalytical chemistry. 379(7-8):1106-12.

Jahanshahi, S., Tabarsa, T., Asghari, J., Rasalti, H. 2019. Investigating the amount of tannic acid in the bark of Mazo tall oak (Quercus castanifolia). Iranian Journal of Wood and Paper Industries, first year, number 1.

Jahurul, M., H., A., Zaidul, I., S., M., Ghafoor, K., , Al-Juhaimi, F., Y., Nyam, K., Norulaini, N., A., N., Sahena, F., and Omar, A., K., M. 2015. Mango (Mangifera indica L.) by-products and their valuable components:A review. *Journal of Food Chemistry*,15(183): 173-180.

Jansen, G., and Flamme, W. 2006. Coloured potatoes (Solanum Tuberosum L. — Anthocyanin content and tuber quality. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 1321–1331.

Kilicarislan, C., Ozgunay, H. 2012. Ultrasound Extraction of Valonea Tannin and its Effects on Extraction Yield. *Jalca*, 107: 394-403.

Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, JM., Moutounet, M. 1999. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. Journal of agricultural and food chemistry. 47(7):2719-23.

Laborde JL, Bouyer C, Caltagirone J-P, Gérard A. 1998. Acoustic bubble cavitation at low frequencies. Ultrasonics. 36(1):589- 94.

Luckeneder, P., Gavino, J., Kuchernig, R., Petutschnigg, A.,and Tondi, G. (2016). Sustainable phenolic fractions as basis for furfuryl alcohol-based co-polymers and their use as wood adhesives. *Journal of Polymers*, 8, 396.

Makkar, H., P., S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., and Becker, K. 2001. Gravimetric determination of tannins and their correlations whit chemical and protein precipitation methods. *Journal os science of Food and Agriculture*, 61:161-165.

Moftakher, M., Samvati, and Zand Moghadam, A., 2013. Optimizing extraction of antioxidant extract from potato skin using ultrasonic waves using the response surface method. National Conference on Agricultural Pollutants and Food Health, Challenges and Solutions. 888 -893.

Mohagheghi, S.A., Pourazhang, H., Akhlaghi, H., Elhami-Rad, A.H., and Hematyar, N., 2017. Antioxidant activity of Raja potato peel extract. Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran. 3:23-32 .

Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. Anim. Feed Sci. Technol. 91:3–20.

Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 661-672.

Onyeneho, S,. N.and Hattiarachchy, N., S. 1993. Antioxidant Activity, Fatty Acid and Phenolic Acids Compositions of Potato Peels. *journal of food Agriculature*, 63: 345-350.

Porter, L., J., Hrstich, L., N.,and Chan, B., G. 1986. The conversion of procyanidins to cyaniding and delphinidin. *Ohytochemistry*, 25: 223-230.

Schieber, A.,and Saldana, A., M. 2009. Potato Peels: A source of Nutritionally and Pharmacologically Interesting Compounds- A Review. *Global Science Books, Food*. 3(2): 23-29.

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. Animal Feed Science. Technology. 91, 21–40.

Sukor, N., F., Selvam, V., P., Jusoh, R., Kamarudin, N., S., and Rahim, S., A. 2021. Intensified DES mediated ultrasound extraction of tannin acid from onion peel. *Journal of Food Engineering*, 296: 110437.

Sultan Toyeh, T., Ismailzadeh Kanari, R., and Nahidi, F. 2013. Bioactive compounds and antioxidant properties of potato skin. The second food science and industry conference.

Torti,S.D., Dearing,D.M. and Kursar,T.A. 2015. Extraction of phenolic compounds from fresh leaves: A comparison of methods. *journal of Chemical Ecology*, 21: 117-125.

Wang, C., Shi, L., Fan, L., Ding, Y., Zhao, S., Liu, Y., Ma, C. 2013. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate(Punica granatum L.) leaves. *Journal of Industrial Crops and Products*, 42: 587-594.

Wu, T., Yan, J,. Liu, R., Marcone, M., F., Aisa, H., A., Tsao, R. 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstreem waste using orthogonal array design. Food Chemistry, 133:1292-1298.

Yazaki, Y. Collins, P. J. and Iwashina, T. 1993. Extractves from Blackbutt (Eucalyptus Pilularis) Wood which Affect Gluebond Quality of Phenolic Resins. Holzforschung.47(5): 412-418.