

## بررسی میزان آنتوسیانین و تانن های محلول و نامحلول در دو رقم پسته (*Pistacia vera* L)

شیما آزاده دل<sup>۱</sup>، پریچهر حناچی<sup>۲\*</sup>، عذرا صبورا<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی ارشد بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، بخش بیوشیمی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، بخش بیوشیمی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی، بخش علوم گیاهی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۲)

### چکیده

تانن های گیاهی فرآورده های طبیعی با وزن مولکولی زیاد هستند و قادرند با کربوهیدرات ها و پروتئین ها کمپلکس هایی را تشکیل دهند. این ماده مهم گیاهی دارای خواصی مانند ضد میکروبی و رسوب دادن پروتئین ها است. هدف از انجام آزمایش این است که با توجه به تولید انبوه پوست پسته، امکان تولید صنعتی ترکیبات تانن از آن بررسی گردد. در این مطالعه استخراج تانن با دو روش خیساندن و استفاده از امواج فراصوت و چهار حلال (استون ۷۰درصد، اتانول ۵۰ درصد، متانول ۵۰درصد و آب) در دو رقم پسته، کله قوچی (*P. vera* cv. Kallehghuchi) و اوحدی (*P. vera* cv. Ohadi) انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین و کمترین میزان تانن نامحلول  $13/18$  و  $11/99$  mg/ gDW به ترتیب مربوط به روش خیساندن در رقم کله قوچی در حلال های استون و متانول اندازه گیری شد. اما بیشترین و کمترین میزان تانن محلول  $55/32$  و  $34/46$  mg/g DW به ترتیب مربوط به روش خیساندن در رقم اوحدی در حلال اتانول و رقم کله قوچی در حلال آب بدست آمد. میزان آنتوسیانین در پوست پسته کله قوچی و اوحدی  $9/09$  و  $10/71$   $\mu\text{mol/g DW}$  و در مغز پسته کله قوچی و اوحدی به ترتیب  $4/12$  و  $4/19$   $\mu\text{mol/g DW}$  بدست آمد. این نتایج نشان داد که پوست پسته می تواند به عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس ترکیبات فعال زیستی در نظر گرفته شود.

کلیدواژگان: پوست پسته، تانن، آنتوسیانین

\* مسئول مکاتبات: hanachi\_wrc@yahoo.com

## ۱- مقدمه

مانده پلی الکل می باشند. با وجود اینکه تنوع زیادی در ساختار پلی الکی وجود دارد اما بیشترین گالوتانن ها از گیاهانی منشا گرفته اند که دارای پلی اول های حاوی D-Glucose هستند.

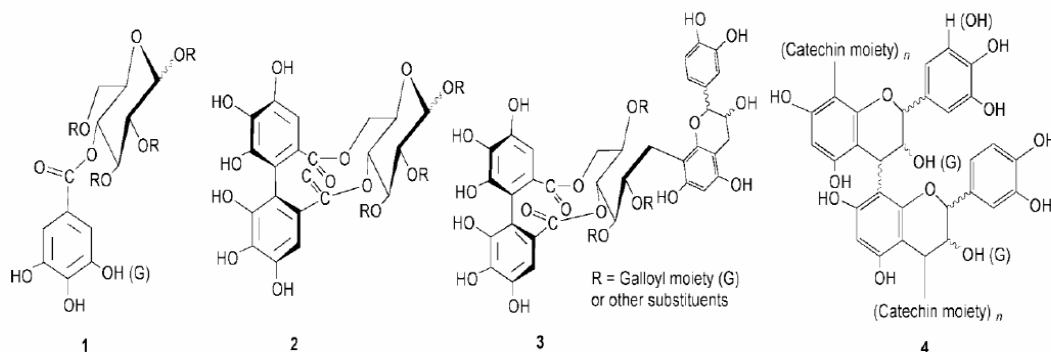
الاجی تانن ها : بزرگترین گروه تانن ها در این گروه مشاهده می شوند. الاجی تانن ها نیز از گالوتانن ها از جفت شدن دو گروه پلی اول ایجاد می شوند.

تانن های مرکب : ساختمان تانن های پیچیده از یک گروه گالوتانن یا الاجی تانن به همراه یک گروه کاتچین تشکیل شده است.

تانن های متراکم : این ترکیبات در واقع پروآنتوسیانین های الیگومری و پلیمری هستند که از واحدهای کاتچین ساخته شده اند. بیوستز این تانن ها با متراکم شدن واحدهای ساختمانی با درجه ای از پلی مریزه شدن بین ۲ تا ۵ واحد ساختمانی ایجاد می شود. اهمیت این گروه از تانن ها در ارتباط با واکنش آنها با پروتئین ها می باشد که این امر نیز بستگی به درجه پلی مریزاسیون آنها دارد.

نام تانن از واژه فرانسوی به معنای ترکیبات مهم در چرم سازی گرفته شده است و از زمان های قدیم از این ترکیبات به دلیل خصوصیات آنها در دباغی کردن پوست حیوانات و ساخت چرم استفاده می شده است [۱]. وزن مولکولی تانن ها بیش از ۲۰۰۰۰ دالتون است و از نظر ساختارهای شیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند. این ترکیبات می توانند در تمام قسمت های گیاه مانند ساقه، چوب، برگ، میوه، دانه و ریشه وجود داشته باشد. همچنین افزایش در تولید تانن می تواند در ارتباط با بیماری گیاه باشد. بنابراین به نظر می رسد نقش زیستی این ترکیبات در گیاه در ارتباط با دفاع گیاه در مقابل آلودگی حشرات و جانوران گیاه خوار باشد [۲]. تانن ها از متابولیت های ثانویه با خاصیت پلی فنولی هستند که در گیاهان عالی دیده می شود. به دلیل تنوع گسترده ساختار تانن ها، یک سیستم طبقه بندی براساس خصوصیات ساختاری و شیمیایی آنها مورد استفاده قرار گرفته است که به صورت زیر است [۱].

گالوتانن ها : این گروه از ساده ترین ترکیبات هستند که قابل هیدرولیز بوده و دارای یک باقی مانده ی پلی فنول و یک باقی



**Fig 1** Classification of the tannins: (1) Gallotannins, (2) Ellagitannins, (3) Complex Tannins, (4) Condensed Tannins [1].

فلاونوئیدها، آنتوسیانین ها، تانن ها، هیدروکسی سینامیک استرها و لیگنین ها از ترکیبات فنولی و جزو متابولیت های ثانویه حاصل از مسیر فنیل پروپانویید هستند که در بافت های گیاهی به وفور یافت می شوند. آنتوسیانین ها یکی از شش گروه گسترده ی فنول های گیاهی هستند و به عنوان فلاونوئید ها شناخته شده اند و مسئول رنگ های نارنجی، قرمز، آبی و بنفش در بسیاری از میوه ها و سبزیجات سیب،توت، چغندر و پیاز هستند شش آنتوسیانیدین رایج وجود دارد و بیش از ۵۴۰ رنگدانه آنتوسیانین در طبیعت شناسایی شده است [۳].

در صنایع غذایی از تانن ها به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی و همچنین به عنوان شفاف سازی نوشیدنی ها و آب میوه ها و در صنایع لاستیک سازی از این ترکیبات به عنوان منعقدکننده استفاده می شود. اخیرا کاربرد این ترکیبات به دلیل اثرات مثبت بر روی تعدادی از بیماری های کشنده عصر حاضراتاثبات شده است به طوریکه در ویروس HIV سبب مهار همانند سازی می شود خاصیت ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد توموری از نقش های دیگر آنها در بدن انسان است [۱].

و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ °C در یخچال نگهداری شدند [۴].

در روش خیساندن، ۱۰۰mg از نمونه با ۵ml از چهار حلال (استون ۷۰ درصد، متانول ۵۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد و آب) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر خیسانده و عصاره گیری کامل شد. سپس نمونه ها برای ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و از محلول رویی برای سنجش ترکیبات بیوشیمیایی استفاده شد [۸].

### ۳-۲- اندازه گیری تانن نامحلول

به منظور جداسازی تانن در عصاره خام ابتدا ۱۰۰mg پلی ونیل پیرولیدون (PVPP) در یک اپندروف ریخته شد. ۱ml آب دوبار تقطیر و ۱ml عصاره خام حاوی تانن به آن اضافه و ورتکس شدند و در دمای ۴ °C و به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. پس از ورتکس مجدد اپندروف ها، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. روشناور جمع آوری شده محتوی ترکیبات فنولی به جز تانن بود که دلیل آن رسوب تانن توسط (PVPP) بود. در این حالت نیز محتوی فنولی روشناور اندازه گیری شد. تفاوت جذب ترکیبات فنولی عصاره خام و عصاره بدون تانن، محتوی تانن عصاره را نشان می دهد:

$$\text{Tannins} = \text{TP} - \text{NTP}$$

برای تهیه محلول پایه تانیک اسید ۲۵mg تانیک اسید ۲۵ml آب دوبار تقطیر حل شد. سپس با آب دوبار تقطیر به میزان ۱۰:۱ رقیق و غلظت های مختلف آن ساخته شد و منحنی استاندارد را با استفاده از محلول تانیک اسید در محدوده ی ۰.۱-۱.۰mg/ml رسم شد [۴].

### ۴-۲- اندازه گیری تانن محلول

برای ساخت معرف فولین دینیز ۱۰۰mg تنگستات سدیم و ۲۰mg اسید فسفو مولیبدیک در ۷۵۰ml آب دی یونیزه حل شده و ۵۰ml اسید اورتو فسفریک نیز اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۲ ساعت، همزمان حرارت داده شده و هم زده شد. پس از سرد شدن این محلول طلایی رنگ حجم آن با آب دی یونیزه به یک لیتر رسانیده شد.

۵ml از عصاره تاننی با ۲۰ml آب دی یونیزه رقیق شد. ۵ml معرف فولین دینیز و در پی آن (پس از گذشت ۵ دقیقه ۲/۵ml محلول کربنات سدیم اشباع) به آن اضافه شدند. ۱-۲ ساعت

در ایران سالانه بیش از ۴۰۰۰۰۰ تن پوست پسته بعد از پوست زدایی محصول پسته بدست می آید که می تواند به عنوان یک منبع مناسب برای خوراک نشخوار کنندگان مورد استفاده قرار گیرد [۴]. با این حال استفاده از این محصولات توسط نشخوار کنندگان به سبب سمیت بالای تانن [۵] یا به علت تعامل با پروتئین ها، کربوهیدرات ها، مواد معدنی و میکروارگانیسم های موجود در دستگاه گوارش محدود شده است [۶]. گلی و همکاران در سال (۲۰۰۵) نشان دادند که پوست سبز پسته حاوی ترکیبات فنولی می باشد که مقدار آن در مقایسه با منابع دیگر قابل توجه است [۷]. با توجه به اینکه، پوست سبز خارجی پسته، حدود ۴۰ درصد وزن میوه را تشکیل می دهد و پسته به طور انبوه در ایران تولید می شود، مقدار پوست حاصل از آن، زیاد خواهد بود بنابراین هدف از این تحقیق، تعیین میزان آنتوسیانین و تانن های محلول و نامحلول در ارقام پوست پسته می باشد.

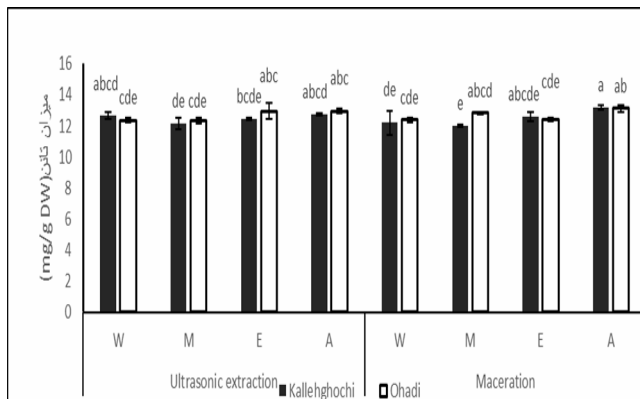
## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد اولیه

ارقام پسته مورد آزمایش، (*P. vera cv. Kallehghuchi*) و (*P. vera cv. Ohadi*)، در سال ۱۳۹۳ از شهرستان سیرجان تهیه شدند و ابتدا پوست پسته ها در سایه خشک شد و با استفاده از آسیاب خرد گردید. نمونه های مورد استفاده برای آزمایش های مرحله ی استخراج دارای اندازه ذرات بین صفر تا ۲mm بودند. نمونه های الک شده تا زمان آزمایش در یخچال ۴ °C نگهداری شد. مواد شیمیایی مورد استفاده همگی با خلوص بالا از شرکت های مرک و سیگما تهیه گردید.

### ۲-۲- استخراج

دو روش استفاده از امواج فراصوت (ultrasound-assisted extraction procedure (UAE) و خیساندن (maceration) برای عصاره گیری استفاده شد. در روش (UAE)، ۵ml از چهار حلال (استون ۷۰ درصد، متانول ۵۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد و آب) به ۱۰۰mg نمونه افزوده و مخلوط حاصل در اولتراسونیکاتور به مدت ۲۰ دقیقه استخراج شد این عمل دو بار در دمای اتاق انجام و سپس نمونه ها برای ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و روشناور جمع آوری



**Fig 2** Insoluble tannin content in different extracts. Values with different letters in the same column represents the difference significant. ( $P < 0.05$ ) Duncan's multiple range test). W: Water, M: Methanol, E: Ethanol, A: Acetone.

مختارپور و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند میزان تانن محصولات پسته تازه در حلال استون ۷۰ درصد، ۵/۲ درصد است [۴]. در تحقیقی که قاسمی و همکاران (۲۰۱۲) انجام دادند میزان تانن در محصولات پسته خشک شده را ۳/۱۶ درصد گزارش کردند [۱۰]. در تحقیقی که ترکمن و همکاران (۱۳۸۷) انجام دادند درصد کلی مواد استخراجی پوست هر یک از گونه ها برطبق استاندارد TAPPI اندازه گیری شدند و از طریق رسوب جزء به جزء مطابق طرح کالبرگ و کورث ترکیبات فنولی پوست استخراج شدند. همچنین برای محاسبه تانن نیز از روش تانوفرم استفاده شده است نتایج نشان داد که کل مواد استخراجی پوست درختان گردو، بلوط، توسکا، ممرز و راش به ترتیب ۲۹/۸، ۲۳/۲، ۱۷/۹، ۱۶/۸، ۱۶/۷ درصد وزن پوست است که از این مقادیر به ترتیب ۱۴، ۱۰/۵، ۷/۵، ۸/۲۵ و ۷ درصد تانن و مابقی آن مواد غیرتاننی است [۱۱].

در تحقیقی که مختارپور و همکاران (۲۰۱۴) انجام دادند میزان تانن حاصل از اندازه ذرات درشت و زمان استخراج ۱۲ ساعت در استون ۷۰ درصد، متانول ۵۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد و آب به ترتیب ۷/۹۷، ۷/۶۱، ۷/۷۴ و ۵/۷۳ درصد گزارش کردند در صورتی که در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب ۷/۹۱، ۷/۶۹، ۷/۲۶ و ۴/۹۷ درصد بدست آوردند که نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج آزمایش ما مطابقت داشت که بیشترین میزان تانن نامحلول در استون ۷۰ درصد بدست آمد. همچنین در صورت استفاده و عدم استفاده از امواج فراصوت در حلال های بالا میزان تانن به ترتیب ۷/۶۴، ۷/۴۴، ۸/۴۸، ۸/۲۰۱ و ۷/۶۱، ۷/۳۸، ۸/۶۷، ۶/۰۴ درصد گزارش کردند [۴].

بعد و با نمود کامل رنگ آبی میزان جذب نوری محلول فوق در طول موج ۷۶۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. غلظت تانن محلول بر اساس منحنی استاندارد غلظت های مختلف اسید تانیک خالص که همزمان با تهیه نمونه ها و مشابه آنها آماده شده بود محاسبه گردید [۹].

## ۲-۵- اندازه گیری آنتوسیانین

۰/۱g بافت گیاه تازه را در هاون چینی با ۱۰ml متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً سائیده و عصاره در لوله آزمایش سر پیچ دار ریخته شد و بمدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. سپس بمدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول روئی در طول موج ۵۵۰nm اندازه گیری شد. غلظت با استفاده از فرمول زیر  $A = \epsilon bc$  و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (E) ۳۳۰۰۰ سانتی متر بر مول و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه شد. A جذب، b عرض کوت و c غلظت محلول مورد نظر می باشد [۸].

## ۲-۶- روش آماری

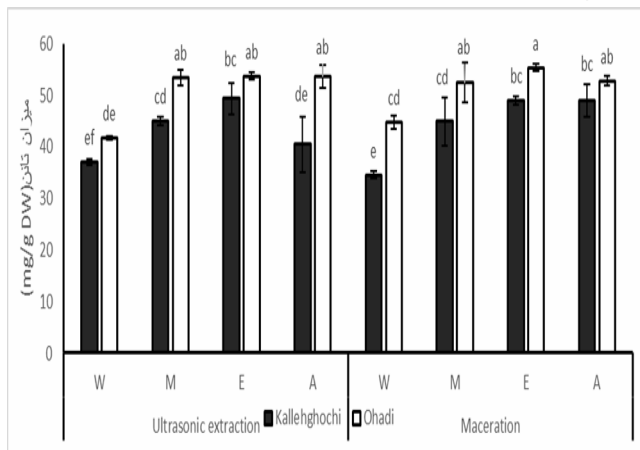
برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار Excel و SPSS ورژن ۲۰ استفاده شد. همچنین برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای Duncan استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- میزان تانن نامحلول

در روش استفاده از امواج فراصوت بیشترین و کمترین میزان تانن نامحلول ۱۲/۹۶ mg/g DW و ۱۲/۱۵ به ترتیب مربوط به عصاره حاصل از رقم اوحدی در حلال استون و رقم کله قوچی در حلال متانول بدست آمد و تفاوت بین بیشترین و کمترین میزان ترکیبات تانن نامحلول در این روش ۶/۲ درصد است که تفاوت معنی داری را در سطح  $P < 0.05$  نشان داد. اما در روش خیساندن بیشترین و کمترین میزان تانن نامحلول ۱۳/۱۸ و ۱۱/۹۹ به ترتیب مربوط به عصاره حاصل از رقم کله قوچی در حلال های استون و متانول اندازه گیری شد و تفاوت بین بیشترین و کمترین میزان ترکیبات تانن نامحلول در این روش ۹/۱ درصد است که تفاوت معنی داری را در سطح  $P < 0.05$  نشان داد (شکل ۲).

در حلال اتانول و رقم کله قوچی در حلال آب اندازه گیری شد و تفاوت بین بیشترین و کمترین میزان ترکیبات تانن محلول در این روش ۳۸ درصد است که تفاوت معنی داری را در سطح  $P < 0.05$  نشان داد (شکل ۳).



**Fig 3** soluble tannin content in different extracts. Values with different letters in the same column represents the difference significant. ( $P < 0.05$ ) Duncan's multiple range test). W: Water, M: Methanol, E: Ethanol, A: Acetone.

تانن های محلول مخلوطی هستند از قندهای ساده (نظیر گلوکز) و اسیدهای پلی هیدریک فنولی (نظیر گالیک اسید، هگزا هیدروکسی دی فنیک اسید یا الازیک اسید) و موادی که از اتصال استری آنها تشکیل شده اند. ترکیبات تانن محلول چون قطبی تر از تانن های نامحلول است بنابراین بیشترین میزان تانن محلول در اتانول ۵۰ درصد مشاهده شد. در تحقیقی که مستوفی و همکاران (۱۳۸۷) بر روی اندازه گیری میزان تانن های محلول میوه خرمالو، رقم کرج پس از تیمارهای رفع گسی انجام دادند نتایج نشان داد که در این آزمایش تیمارهای محلول پاشی با اتانول ۳۶ درصد و یا قرار دادن میوه ها در اتمسفر اشباع از دی اکسید کربن که توانستند غلظت تانن های محلول میوه خرمالو، رقم کرج را به زیر حد بحرانی ایجاد کننده طعم گس ۱۰۰۰ پی پی ام، کاهش دهند به طوریکه میزان تانن محلول در تیمارهای اتانول ۷/۵ میلی لیتر ۴۸ ساعت به روش فولن دنیز و رسوب پروتئین به ترتیب ۳۱۲ و ۴۲ پی پی ام بود و در تیمار دی اکسید کربن ۳۶ ساعت ۴۵۵ و ۵۴ بدست آمد. رسوب پروتئین برخلاف روش فولین دنیز روش مناسبی در اندازه گیری غلظت تانن محلول میوه خرمالو نبوده است. به منظور مشخص نمودن علت این موضوع مقداری از

اخیرا استفاده از امواج فراصوت به طور گسترده در استخراج ترکیبات فنولی از بخش های مختلف گیاه استفاده می شود [۱۲]. یک مطالعه مقایسه ای نشان داد که UAE باعث تخریب کمتر و استخراج سریع تر ترکیبات فنولی از توت فرنگی در مقایسه با دیگر روش های استخراج مثل جامد-مایع، آب فوق بحرانی و روش مایکروویو می شود. استفاده از امواج فراصوت یک تکنولوژی مفیدی است که نیازمند ابزار پیچیده نیست و کم هزینه است [۱۳، ۱۴]. در این آزمایش میزان تانن در روش خیساندن بیشتر از روش استفاده از امواج فراصوت به دست آمد اما روش عصاره گیری هیچ تفاوت معنی داری در سطح  $P < 0.05$  نداشت.

به طور کلی متانول در استخراج پلی فنول ها با وزن مولکولی پایین کارآمدتر است و در حالی که ترکیبات با وزن مولکولی بالا با استون آبی بهتر استخراج می شوند [۱۵]. بازده استخراج شیمیایی به نوع حلال های مورد استفاده با قطبیت های مختلف، زمان استخراج، دما، نسبت نمونه به حلال، ترکیب شیمیایی و ویژگی های فیزیکی نمونه بستگی دارد (۳). ترکیبات فنول ها گستره ی وسیعی از ترکیبات با ساختارهای مختلف و اغلب قطبی هستند اگرچه به دلیل اتصال آنها با مولکول های غیر قطبی، ممکن است با حلال هایی با قطبیت کمتر بهتر استخراج شوند.

استخراج ترکیبات فنولی از پسته با افزایش قطبیت حلال کاهش پیدا می کند. براساس مارکوم و همکاران [۱۶] شاخص قطبیت snyders برای استون ۷۰ درصد، اتانول ۵۰ درصد، متانول ۵۰ درصد و آب به ترتیب ۶/۵، ۷/۱، ۷/۸ و ۹ است. بنابراین ترکیبات فنولی پسته اغلب قطبی با گروه های غیر قطبی هستند از این رو بیشترین میزان تانن نامحلول در استون ۷۰ درصد مشاهده شد.

### ۳-۲- میزان تانن محلول

در روش استفاده از امواج فراصوت بیشترین و کمترین میزان تانن نامحلول  $53/69$  mg/g DW و  $36/97$  به ترتیب مربوط به عصاره حاصل از رقم اوحدی در حلال اتانول و رقم کله قوچی در حلال آب بدست آمد و تفاوت بین بیشترین و کمترین میزان ترکیبات تانن محلول در این روش ۳۱ درصد است که تفاوت معنی داری را در سطح  $P < 0.05$  نشان داد. اما در روش خیساندن بیشترین و کمترین میزان تانن محلول  $55/32$  mg/gDW و  $34/46$  به ترتیب مربوط به رقم اوحدی

در تحقیقی که نادر نژاد و همکاران (۲۰۱۳) انجام دادند میزان آنتوسیانین در گیاه پسته را بدست آوردند و نتایج نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین در پوست سبز پسته (اوایل تیرماه)، پوست قرمز پسته (مردادماه)، و دانه در پایه اهلی رقم اوحدی با مقادیر به ترتیب  $7/66$ ،  $20/24$ ،  $7/66 \mu\text{mol/g DW}$  بدست آمد اما در پوست قرمز پسته (اوایل شهریور ماه) بیشترین میزان آنتوسیانین در پایه موتیکا و رقم اوحدی  $35/87 \mu\text{mol/g DW}$  بدست آمد [۸].

#### ۴- نتیجه گیری کلی

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که پوست پسته می تواند به عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس ترکیبات فعال زیستی استفاده شود. تمام عصاره های بدست آمده از دو روش استفاده از امواج فراصوت و خیساندن، چهار حلال استون، متانول، اتانول و آب و دو رقم پسته کله قوچی و اوحدی دارای ترکیبات تانی و آنتوسیانین بود. بیشترین میزان تانن محلول و نامحلول در روش خیساندن به دست آمد اما مقایسه میانگین های محتوای ترکیبات تانن نامحلول و تانن محلول با دو روش عصاره گیری تفاوت معنی داری را در سطح  $P < 0/05$  نشان نداد در صورتیکه حلال ها در سطح  $P < 0/01$  اثر معنی داری در میزان ترکیبات تانی داشتند و میزان آنتوسیانین در پوست دو رقم پسته بیشتر از مغز آن بود. بنابراین مطالعه بیشتر به منظور شناسایی ترکیبات تانی و بررسی خاصیت آنها ضروری است و در صورتیکه از تانن ها در صنایع غذایی و دارویی استفاده می شود لازم است میزان سم آفلاتوکسین که از قارچ های انگلی در روی درخت پسته به وجود می آید بررسی گردد اما در مصارفی غیر از موارد بالا مانند استفاده از تانن در صنایع لاستیک سازی، دباغی کردن پوست حیوانات و ساخت چسب چوب ضروری نیست.

#### ۵- منابع

- [1] Khanbabaee, K., van, Ree T. 2001. Tannins: Classification and Definition. Natural Product Reports. 18(6):641-9.
- [2] Haslam, E. Chemistry and pharmacology of natural products. Plant Polyphenols Vegetable Tannins. 1989.
- [3] Dai, J., Mumper, R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and

محلول روئی رسوب تانن-پروتئین برداشته شد و توسط روش فولین دنیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که مقدار قابل ملاحظه ای تانن محلول در محلول رویی وجود داشت که در ترکیب تانن- پروتئین وارد نشده است [۹]. تایرا و همکاران (۱۹۹۷) با افزودن مقادیر مختلف پکتین محلول به غلظت ثابت تانن خالص خرما نشان دادند که با افزایش مقدار پکتین محلول غلظت تانن محلول اندازه گیری شده توسط روش رسوب پروتئین کاهش یافت. درحالیکه غلظت تانن محلول اندازه گیری شده توسط روش فولین دنیز تحت تاثیر مقادیر مختلف پکتین محلول قرار نگرفت. علت تفاوت بین این دو روش چنین بیان گردید که در روش رسوب پروتئین، آلبومن سرم گاوی قادر به رسوب دادن تانن محلول ترکیب شده با پکتین محلول نبوده و فقط تانن محلول آزاد را رسوب می دهد. در حالی که روش فولین دنیز تانن های محلول ترکیب شده با پکتین محلول را نیز همانند تانن های آزاد اندازه گیری می نماید [۱۷].

#### ۳-۳- میزان آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین در پوست دو رقم کله قوچی و اوحدی به ترتیب به میزان  $9/09$  و  $10/71 \mu\text{mol/g DW}$  به دست آمد در حالیکه میزان آنتوسیانین در مغز دو رقم کله قوچی و اوحدی به ترتیب به میزان  $4/12$  و  $4/19 \mu\text{mol/g DW}$  اندازه گیری شد و تفاوت بین میزان آنتوسیانین در پوست و مغز دو رقم کله قوچی و اوحدی در حدود ۵۵ درصد و ۶۰ درصد بود که تفاوت معنی داری در سطح  $P < 0/05$  داشتند اما میزان آنتوسیانین در مغز دو رقم پسته تفاوت معنی داری را از خود نشان ندادند (شکل ۴).

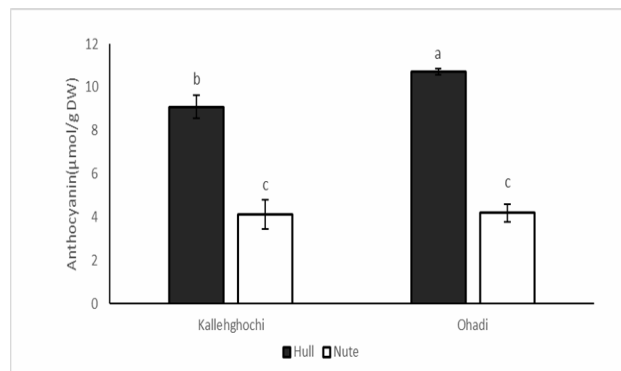


Fig 4 Anthocyanin content in the hull and nuts two cultivar pistachio Kalleghochi and Ohadi.

- [11] Torkeman, J., Siam, Sh. 2008. Measurement of tannin bark of oak, beech, hornbeam, alder and walnut. *Journal of Medicinal Plants*. (1):58-63.
- [12] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, JP., Mason, TJ. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics sonochemistry*. 11(3-4):261-5.
- [13] Herrera, MC., 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.
- [14] Laborde JL, Bouyer C, Caltagirone J-P, Gérard A. 1998. Acoustic bubble cavitation at low frequencies. *Ultrasonics*. 36(1):589-94.
- [15] 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.
- [16] Markom, M., Hasan, M., Daud, WRW., Singh, H., Jahim, JM. 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*. 52(3):487-96.
- [17] Taira, S., Ono, M., Matsumoto, N. 1997. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology*. 12(3):265-71.
- anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 15(10):7313-52.
- [4] Mokhtarpour, A., Naserian, A., Valizadeh, R., Mesgaran, MD., Pourmollae, F. 2014. Extraction of phenolic compounds and tannins from pistachio by-products 2. *proteins*. 3:25.
- [5] Reed, JD. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal science*. 73(5):1516-28.
- [6] McSweeney, CS., Palmer, B., McNeill, DM., Krause, DO. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91(1-2):83-93.
- [7] Goli, AH., Barzegar, M., Sahari, MA. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*. 92(3):521-5.
- [8] Nadernejad, N., Ahmadimoghadam, A., Hossyinfard, J., Poorseyedi, S. 2013. Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Plant Biology*. (15):95-110.
- [9] Mostoufi, Y., Zamani, Z., Fatahi, MM., Khademi, O. 2009. Measurement of soluble tannins and evaluation of consumer acceptance of persimmon fruit cv. Karaj after deastringency treatments. *Iranian journal of Sciences and food technology*. 5(4):79-89.
- [10] Ghasemi, S., Naserian, AA., Valizadeh, R., Vakili, A., Behgar, M., Tahmasebi, A. 2012. Partial and total substitution of alfalfa hay by pistachio byproduct modulated the counts of selected cellulolytic ruminal bacteria attached to alfalfa hay in sheep. *Livestock Science*. 150(1):342-8.

## Investigation of soluble and insoluble tannins and anthocyanins assay in two Cultivar pistachio (*Pistacia vera* L)

Azadedel, Sh. <sup>1</sup>, Hanachi, P. <sup>2\*</sup>, Saboora, O. <sup>3</sup>

1. MSc student Biochemistry, Group of Biotechnology, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Alzahra university, Tehran, Iran.
2. Associate Professor of Biotechnology group, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Alzahra university, Tehran, Iran.
3. Associate Professor of Physiology group, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra university, Tehran, Iran.

(Received: 94/11/28 Accepted: 95/3/12)

Tannins are plant natural products with a high molecular weight and can form a complex with the protein and carbohydrates. This plant important material have properties such as anti-microbial and proteins precipitation. The aim of this study was to investigate the feasibility of industrial mass production of tannins from pistachio hull. Two extraction methods, i.e. shaker and ultrasonic Extraction and four solvents (acetone 70% ,ethanol 50% , methanol 50% and water) were performed in two species kalleghuchi (*P. vera* cv. Kalleghuchi) and Ohadi (*P. vera* cv . Ohadi). The results showed that the highest and the lowest insoluble tannin was measured 13.18 and 11.99 mg/g DW respectively related to maceration method in the ohadi, Acetone and methanol. But the highest and the lowest soluble tannin was measured 55.32 and 34.46 mg/g DW respectively related to maceration method in the ohadi, ethanol and kalleghuchi, water. Anthocyanin in Pistachio hull kalleghuchi and ohadi was measured 9.09 and 10.71  $\mu\text{mol/g DW}$  and Pistachio nute kalleghuchi and ohadi 4.12 and 4.19  $\mu\text{mol/g DW}$  . The results suggest the application of pistachio green hull as a cheap and easily accessible source for production of natural bioactive compounds.

**Keywords:** Pistachio hull, Tannin, Anthocyanin

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: hanachi\_wrc@yahoo.com