

بهینه سازی استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال از برگ شاتوت به روش حلال متلاطم

ماندانا بی مکر^{۱*}، علی گنجلو^۱، سهیلا زرین قلمی^۱، الهام انصاریان^۲

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- دانش آموخته کارشناسی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۰۷)

چکیده

این مطالعه با هدف بهینه سازی فرایند استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال از برگ گیاه شاتوت با استفاده از طرح باکس- بنکن انجام شد. در این راستا، اثرات متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال متلاطم شامل دما (۴۵-۲۵ درجه سلسیوس)، شدت دور (۱۰۰-۳۰۰ دور در دقیقه) و زمان استخراج (۶-۲ ساعت) بر عملکرد کمی استخراج ارزیابی شد. در این مطالعه، شرایط بهینه با هدف به حداکثر رساندن بازده استخراج ترکیبات زیست فعال شامل دما معادل ۳۸ درجه سلسیوس، شدت دور معادل ۲۳۵ دور در دقیقه و ۵ ساعت زمان استخراج بود. تحت این شرایط، مقدار عملکرد کمی استخراج معادل ۲۰/۰۵ درصد به دست آمد. نتایج نشان داد که مدل به دست آمده به خوبی رابطه بین متغیرهای مستقل و وابسته را بیان می کند و برای تخمین عملکرد کمی استخراج با استفاده از هرگونه ترکیب مقادیر متغیرهای مستقل نیز مناسب می باشد. فعالیت ضد اکسایشی عصاره به دست آمده تحت شرایط بهینه به دو روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تعیین گردید. محتوای فنولی کل به روش فولین- سیوکالتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. محتوای فنولی کل و هم چنین فعالیت ضد اکسایشی اندازه گیری شده به دو روش DPPH و H_2O_2 به ترتیب $38/12 \pm 0/15$ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره، $66/54 \pm 0/12$ و $4/87 \pm 0/16$ درصد به دست آمد. در نهایت نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال به روش سوکسله مقایسه گردید. نتایج بیانگر آن است که با استفاده از روش استخراج توسط حلال متلاطم امکان دستیابی به عملکرد کمی بالاتر و فعالیت ضد اکسایشی بیشتر در مدت زمان استخراج کوتاه تر وجود دارد.

کلیدواژگان: برگ شاتوت، ترکیبات فنولی، فعالیت ضد اکسایشی، بهینه سازی، روش سطح پاسخ.

۱- مقدمه

مختلف به توانایی ضد اکسایشی آنها و مهار رادیکال‌های آزاد بر می‌گردد [۳]. همچنین فعالیت ضد اکسایشی فنول‌ها به ساختار شیمیایی آنها از جمله تعداد گروه‌های هیدروکسیل و نحوه آرایش آنها بستگی دارد [۴].

گیاه شاتوت (*Mulberry*) متعلق به خانواده *Moraceae* می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای در نواحی مرکزی، شرقی و شمالی آسیا، اروپا، آمریکا شمالی و آفریقا کشت می‌شود. از برگ‌های این گیاه عمدتاً برای تغذیه کرم‌های ابریشم استفاده می‌شود. همچنین برگ‌های این گیاه به‌صورت سنتی دارای اثرات سلامتی‌بخش از جمله ضد التهاب و ضد پیری می‌باشد [۵]. در طب چینی، بخش‌های مختلف این گیاه از جمله برگ، ریشه و پوست کاربردهای زیادی دارد. برگ گیاه شاتوت دارای ترکیبات مختلفی از جمله پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، کلسیم، آهن، آسکوربیک اسید، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، بتا کاروتن، فولیک اسید و ترکیبات ضد اکسایشی می‌باشد [۶، ۷]. روش سطح پاسخ^۳ (*RSM*) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که در مورد فرایندهای چند متغیری یا فرایندهایی که مکانیسم‌های دخیل در آنها به‌خوبی مشخص نشده است و همچنین اطلاعات موجود در مورد آن سیستم بسیار کم است کاربرد دارد. همچنین از این روش می‌توان برای بررسی برهم‌کنش‌های میان متغیرها و پاسخ غیرخطی آنها استفاده نمود. در مطالعات متعددی از این روش به‌صورت موفقیت آمیز برای بهینه‌سازی شرایط فرایند استخراج استفاده شده است [۸-۱۱].

بر اساس مطالعات انجام شده تاکنون، پژوهشی در ارتباط با استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال از برگ گیاه شاتوت با استفاده از حلال متلاطم و همچنین بهینه‌سازی فرایند انجام نشده است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر متغیرهای مستقل (شدت دور، دما و زمان استخراج) بر عملکرد کمی استخراج و نیز تعیین شرایط بهینه فرایند استخراج انجام گرفت. همچنین فعالیت ضد اکسایشی و محتوای فنولی کل عصاره به دست آمده در شرایط اندازه گیری می‌شود. به‌منظور مقایسه، ترکیبات با ارزش زیست فعال به‌روش سوکسله نیز استخراج می‌شوند.

اکسایش چربی به عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد تغییرات کیفی غذا شناخته شده است. نقش استرس اکسایشی در ایجاد برخی از بیماری‌های خاص مشخص شده است. از این‌رو به‌منظور محافظت در برابر بسیاری از بیماری‌ها و پیشگیری از فساد مواد غذایی از طریق اکسایش ضروری است که از پراکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌های زنده و محصولات غذایی جلوگیری شود [۱]. ضد اکسایش‌ها، ترکیبات حیاتی با قابلیت محافظت از اکسایش ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این ترکیبات را می‌توان به مواد غذایی به‌منظور کاهش تاثیرات زیان آور گونه‌های فعال نظیر اکسیژن و نیتروژن به‌کار برد. بسیاری از ترکیبات ضد اکسایش مصنوعی نظیر BHA^1 و BHT^2 به‌عنوان مواد افزودنی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. گرچه این ترکیبات در مقایسه با ترکیبات ضد اکسایش طبیعی نظیر آلفاتوکوفرول و آسکوربیک اسید قدرت ضد اکسایش بیشتری از خود نشان می‌دهند اما در ارتباط با ایمنی و مسائل مربوط به آن نگرانی‌هایی وجود دارد. از این‌رو به‌منظور جایگزینی ترکیبات ضد اکسایش مصنوعی با ترکیبات ضد اکسایش طبیعی تحقیقات متعددی صورت گرفته است. ضد اکسایش‌های طبیعی از تمام بخش‌های گیاهان از جمله میوه، ریشه و برگ قابل استحصال می‌باشند. گیاهان به‌منظور حفاظت از خود در برابر عوامل تهدید کننده نظیر بیماری‌ها و آسیب‌های فیزیکی به‌صورت طبیعی ترکیبات ضد اکسایش تولید می‌کنند و از این‌رو می‌توانند منابع خوبی برای ترکیبات ضد اکسایش طبیعی باشند [۲]. جداسازی این ترکیبات از بخش‌های مختلف گیاهان در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین ثابت شده است که اثرات مفید مصرف گیاهان به دلیل حضور ترکیبات ضد اکسایش طبیعی مانند ویتامین‌ها، پلی فنول‌ها، کاروتنوئیدها و فلاوونوئیدها می‌باشد که بر سلامتی انسان نقش چشمگیری دارند. ترکیبات فنولی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی محسوب می‌شوند که نقش مهمی در حفاظت از بافت‌ها در مقابل اثرات اکسید کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر گونه‌های فعال ایفا می‌کنند. اثر حفاظتی ترکیبات فنولی در برابر بیماری‌های

1. *Butylated Hydroxy anisole*2. *Butylated Hydroxy toluene*

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی نمونه

برگ‌های گیاه شاتوت از منطقه جنگلی واقع در استان زنجان جمع آوری شد. به منظور آماده سازی نمونه، برگ‌های این گیاه، پس از شست و شو در خشک کن با دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک گردیدند و سپس با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید و از صافی با مش ۱۵ عبور داده شد و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سلسیوس در بسته‌بندی مقاوم به هوا و رطوبت نگهداری شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه شامل اتانول، دی فنیل پیکریل هیدازیل، محلول هیدروژن پراکسید ۱۰ درصد، بافر فسفات (pH: ۷/۴)، شناساگر فولین- سیکالتیو و سدیم کربنات بودند که از شرکت سیگما (اسپانیا) خریداری شدند. همچنین گالیک اسید از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

۲-۲- استخراج توسط حلال متلاطم

جهت استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ گیاه شاتوت ابتدا مقدار ۴ گرم از پودر خشک برگ با ۱۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و جهت استخراج از روش حلال متلاطم استفاده گردید. شرایط هر آزمون شامل دما، شدت دور و زمان استخراج بر اساس سطوح متغیرهای پیش بینی شده در طرح باکس- بنکن مطابق جدول ۱ در نظر گرفته شد. انتخاب سطوح بالا و پایین متغیرهای مورد مطالعه بر اساس مطالعات اولیه انجام پذیرفت. مخلوط تیمار شده را توسط کاغذ صافی صاف نموده و سپس به منظور حذف حلال مورد استفاده، عصاره به دست آمده در دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء مدل Buchi Rotavapor R-205 (ساخت کشور سوئیس) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. عصاره به دست آمده تا زمان انجام آزمون‌های مورد نظر در تاریکی و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

۲-۳- استخراج به روش سوکسله

جهت استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ گیاه شاتوت به روش سوکسله ابتدا مقدار ۴ گرم از پودر خشک برگ گیاه شاتوت به کارتوش انتقال داده شد. ۱۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد درون بالن ریخته شد و فرایند استخراج به مدت ۸ ساعت انجام شد. به منظور حذف حلال مورد استفاده، عصاره

به دست آمده در دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء مدل Buchi Rotavapor R-205 (ساخت کشور سوئیس) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. عصاره به دست آمده تا زمان انجام آزمون‌های مورد نظر در تاریکی و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

۲-۳- اندازه گیری عملکرد کمی استخراج

عملکرد کمی استخراج با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید [۹].

$$\text{رابطه ۱:} \quad \text{عملکرد استخراج} = \left(\frac{m_2}{m_1}\right) \times 100 \quad (\text{درصد})$$

در این رابطه m_2 وزن عصاره خشک استخراج شده و m_1 وزن نمونه آسیاب شده مورد استفاده جهت استخراج بر حسب گرم است.

۲-۴- اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی کل

محتوای فنولی کل عصاره‌ها با استفاده از روش فولین- سیکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۱۲]. ترکیبات فنولی کل طبق روش بی مکر و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی اصلاحات اندازه گیری گردید. از گالیک اسید به عنوان استاندارد این آزمون استفاده شد. ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر محلول استاندارد گالیک اسید، با حل کردن ۲۵۰ میلی گرم گالیک اسید خشک در ۱ میلی لیتر حلال عصاره گیری تهیه و سپس با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول به دست آمده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد و منحنی کالیبراسیون استاندارد بر اساس گالیک اسید (۰/۰۵-۰/۱-۰/۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) رسم گردید. عصاره با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به لوله آزمایش منتقل شد. سپس ۰/۷۵ میلی لیتر از شناساگر فولین- سیکالتیو (که قبلاً با نسبت ۱ به ۱۰ با آب دیونیزه شده رقیق شده است) اضافه شد و مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۰/۷۵ میلی لیتر از سدیم کربنات ۶٪ (وزنی- حجمی) به مخلوط اضافه شده و به آرامی بهم زده شد. پس از نگهداری مخلوط نهایی به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج قرائت گردید.

۲-۴-۱- رسم منحنی استاندارد گالیک اسید

به منظور رسم منحنی استاندارد گالیک اسید جهت تعیین میزان ترکیبات فنولی کل به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در یک گرم عصاره، ابتدا مطابق روش بیان شده در بالا غلظت‌های ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر از پودر گالیک اسید تهیه شد و میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. معادله خط با ضریب همبستگی بالا (۰/۹۹۳) بصورت $Y = 0.031 + 4/788 X$ بدست آمد.

۲-۵- اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی به

روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین میزان فعالیت ضد اکسایشی است که در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر، توسط ترکیبات ضد اکسایش کاهش یافته و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات ضد اکسایش می‌باشد. توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره به دست آمده از برگ‌های گیاه شاتوت طبق روش بی مکر و همکاران (۲۰۱۶) با اندکی اصلاحات مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش ابتدا ۰/۲ میلی لیتر از نمونه استخراج شده با متانول رقیق شده (غلظت نهایی ۰/۰۱ گرم بر میلی لیتر) و ۲ میلی لیتر محلول DPPH (۰/۵ میلی مولار) به آن اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفت. سپس میزان جذب توسط دستگاه طیف سنج در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. درصد رادیکال‌های به دام انداخته شده DPPH با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد [۱۳].

$$A = \left(\frac{A_i - A_t}{A_t} \right) \times 100$$

میزان جذب نمونه (حاوی نمونه و رادیکال A_i در این رابطه خالص است. DPPH میزان جذب محلول A_t) و DPPH

۲-۶- اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی به

روش هیدروژن پراکسید

توانایی به دام انداختن پراکسید هیدروژن توسط عصاره حاوی ترکیبات زیست فعال بدست آمده از برگ گیاه شاتوت با استفاده از روش ارائه شده توسط راج و همکاران (۱۹۸۹)

اندازه گیری شد. محلول پراکسید هیدروژن (۴۰ میلی مولار) در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار، pH ۷/۴) تهیه گردید. عصاره با غلظت ۰/۰۱ گرم بر میلی لیتر به پراکسید هیدروژن اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۲۳۰ نانومتر در مقایسه با نمونه شاهد حاوی بافر فسفات در غیاب پراکسید هیدروژن توسط دستگاه طیف سنج قرائت گردید. درصد به دام اندازی پراکسید هیدروژن از طریق رابطه ۳ بدست آمد [۱۴]:

= انداخته شده درصد پراکسید هیدروژن به دام

$$\left(\frac{A_i - A_t}{A_t} \right) \times 100$$

در این رابطه A_i میزان جذب نمونه شاهد و A_t میزان جذب نمونه مورد آزمایش است.

۲-۷- طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به منظور ارزیابی اثر متغیرهای مستقل فرایند استخراج توسط حلال متانول بر عملکرد کمی استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ گیاه شاتوت و بهینه سازی فرآیند، از روش سطح پاسخ استفاده شد. بدین منظور، از طرح باکس-بنکن^۱ شامل سه متغیر مستقل دما (۲۵، ۳۵، ۴۵) درجه سلسیوس، شدت دور (۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ دور در دقیقه) و زمان استخراج (۶، ۴، ۲ ساعت) با تعداد ۱۷ تیمار و ۵ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد (جدول ۲). مدل مورد استفاده در روش سطح پاسخ، عموماً رابطه درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته می‌باشد. مدل درجه دوم به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

در این رابطه β_0 و β_i و β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیونی برای عرض از مبدا، اثرات خطی، اثرات مربعی و اثرات متقابل X_i و X_j متغیرهای مستقل هستند.

به منظور ارزیابی صحت مدل برازش داده شده، آزمون فقدان یا ضعف برازش، ضریب تغییرات، مقادیر R^2 ، $R^2(\text{adj})$ مدل و p ضرایب تعیین شدند. تایید کارایی رابطه ارائه شده توسط مدل از طریق مقایسه نتایج حاصل از تولید آن با نتایج پیشگویی شده توسط مدل مورد بررسی قرار می‌گیرد. از نرم افزار Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA) به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای سه بعدی استفاده گردید. برای بهینه سازی، از روش بهینه سازی عددی با

1. Box-Behnken design (BBD)

بعدی استفاده شده است. در نمودار پرتوربیشن کلیه متغیرهای مستقل فرایند در یک نمودار در برابر پاسخ رسم شده‌اند. از این نمودار می‌توان برای یافتن متغیر مستقلی که بیشترین تاثیر را بر پاسخ دارد استفاده نمود.

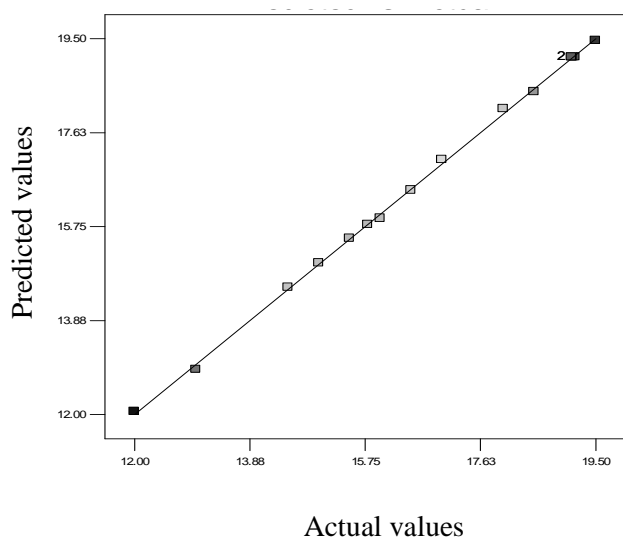


Fig 1 Plot of Actual vs. predicted response

نمودار پرتوربیشن سه متغیر مستقل مورد مطالعه در فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ شاتوت به کمک حلال متلاطم در شکل ۲ ارائه شده است. وجود خط صاف نشانگر عدم حساسیت پاسخ به تغییر متغیر مستقل مورد مطالعه است در حالی که انحنا در نمودار هر متغیر مستقل نشان‌دهنده حساسیت پاسخ به آن متغیر مستقل است [۱۵]. براساس شکل ۲ واضح است که به ترتیب دمای استخراج، زمان استخراج و شدت دور بیشترین تاثیر را بر میزان عملکرد کمی استخراج دارند.

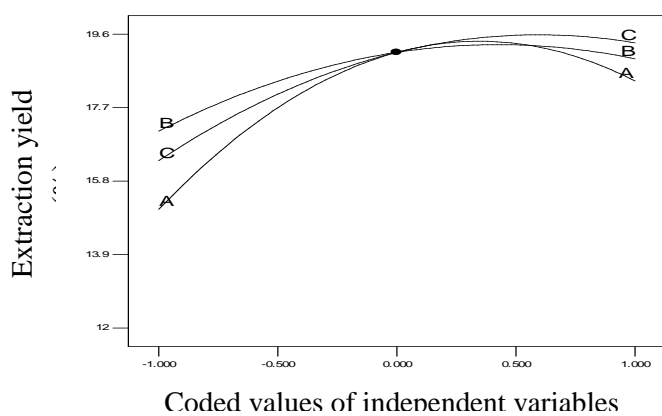


Fig 2 Perturbation plot; (A) Extraction temperature, (B) Agitation intensity and (C) Extraction time.

هدف به حداکثر رسیدن عملکرد کمی استخراج استفاده شد. کلیه آزمایشات نیز با سه تکرار انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر عملکرد استخراج توسط حلال متلاطم

در جدول ۳، نتایج تجزیه و تحلیل واریانس برای عملکرد استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ گیاه شاتوت ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده معادله چندجمله‌ای درجه دوم مورد استفاده برای پیش‌بینی عملکرد استخراج از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). از طرفی آزمون فقدان برازش^۱ معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) که بیانگر مناسب بودن مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل بر متغیر وابسته می‌باشد. تمام متغیرهای مستقل مورد ارزیابی اثر معنی‌داری بر عملکرد کمی استخراج داشتند. نتایج به دست آمده برای ضرایب همبستگی مدل ($R^2_{adjusted} = 0.9920$, $R^2 = 0.9958$) نیز بیانگر تطابق بسیار خوب مدل رگرسیونی بدست آمده با نقاط مورد آزمایش و دقت بالای آن در پیش‌بینی مقدار متغیر وابسته می‌باشد. رابطه ۵، مدل چند جمله‌ای درجه دوم مورد استفاده برای پیش‌بینی میزان عملکرد استخراج براساس مقادیر کد شده را نشان می‌دهد:

رابطه ۵:

$$Y = 19.13 + 1.66 A + 0.94 B + 1.53 C - 2.40A^2 - 1.10 B^2 - 1.28 C^2 - 0.13 AB - 0.20 AC + 0.25 BC$$

که در رابطه فوق Y بیانگر مقدار عملکرد کمی استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال از برگ گیاه شاتوت می‌باشد و نمادهای A، B و C به ترتیب کدهای متغیرهای دمای استخراج، شدت دور و زمان استخراج می‌باشند. به علاوه، مقایسه مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیش‌بینی شده تطابق نزدیک این اعداد را نشان می‌دهد (شکل ۱) که این امر بیانگر همبستگی بالای بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با روش آماری است.

در این مطالعه به منظور ارزیابی تاثیرات متغیرهای مستقل فرایند بر پاسخ از نمودارهای پرتوربیشن و سطح پاسخ سه

1. Lack of Fit

نهایتاً ثابت می‌شود. دیگو سانتوس و همکاران (۲۰۱۱) از روش حلال متلاطم برای جداسازی ترکیبات ضد اکسایش از پوست گیاه *Jaboticaba* استفاده نمودند [۲۱]. آنها طی ۲ ساعت زمان استخراج به حداکثر میزان جداسازی ترکیبات ضد اکسایش دست یافتند. استفاده از جریان متلاطم حلال سبب افزایش معنی‌دار ($p > 0/05$) عملکرد کمی استخراج در این مطالعه گردید. چنانچه در شکل ۳ (الف و ب) مشاهده می‌شود با استفاده از شدت دور بالا بر میزان راندمان استخراج افزوده گردید. همان‌طور که انتظار می‌رود استفاده از جریان متلاطم سبب تسریع خروج مواد محلول از ساختار سلولی به محیط حلال می‌شود. هم‌چنین استفاده هم‌زمان از دما و جریان متلاطم سبب ایجاد پارگی در ساختار غشاء سلولی و در نتیجه تسهیل خروج مواد محلول می‌شود [۲۱]. به گونه‌ای که در مطالعات شاهد انجام شده در این پژوهش تفاوت بسیار چشمگیر و معنی‌داری ($p < 0/05$) در عملکرد استخراج با استفاده از جریان متلاطم و بدون استفاده از سیال متلاطم (سیال آرام) مشاهده گردید. هم‌چنین در مطالعه انجام شده توسط دیگو سانتوس و همکاران (۲۰۱۱) اثبات گردید که استفاده از جریان متلاطم حلال سبب بهبود راندمان استخراج ترکیبات ضد اکسایش به روش فراصوت گردید [۲۱]. در مطالعه حاضر نیز افزایش شدت دور تا حد معینی سبب بهبود جداسازی ترکیبات با ارزش زیست فعال از برگ گیاه شاتوت گردید.

تأثیر متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر راندمان استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ گیاه شاتوت طی فرایند استخراج توسط حلال متلاطم به صورت سطح پاسخ سه بعدی در شکل ۳ (الف-ج) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش دما تا مقدار مشخصی بر عملکرد استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال افزوده می‌شود. سپس در ادامه با افزایش سطح دما از میزان عملکرد استخراج کاسته می‌شود اگر چه که این کاهش از سطح معنی‌داری ($p > 0/05$) برخوردار نیست. افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و در نتیجه بهبود راندمان استخراج می‌شود [۱۶]. اما از طرف دیگر استفاده از دماهای بالا به دلیل تخریب پذیر بودن حرارتی ترکیبات زیست فعال منجر به کاهش راندمان استخراج می‌شود. این تأثیر دوگانه دما بر عملکرد کمی جداسازی ترکیبات با ارزش زیست فعال در مطالعات متعددی بررسی شده و نتایج مشابهی به دست آمده است [۲۰-۱۷]. همان‌طور که در شکل ۳ (ب و ج) مشاهده می‌شود با افزایش زمان بر میزان عملکرد استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال افزوده می‌شود. افزایش زمان از طریق افزایش زمان انتقال جرم ترکیبات حل شونده از ماتریس گیاهی به حلال منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود. براساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان استخراج طی ۴ ساعت اولیه رخ داده است و سپس از سرعت جداسازی ترکیبات زیست فعال کاسته شده و

Table 1 Levels of independent variables and related codes.

Codes and related levels			Symbol	Independent variables
+1	0	-1		
45	35	25	A	Extraction temperature (°C)
300	200	100	B	Agitation intensity (RPM)
6	4	2	C	Extraction time (h)

Table 2 Actual values for Box-Behnken design matrix and response values for the extraction yield valuable bioactive compounds.

Order	Extraction temperature (°C)	Agitation intensity (RPM)	Extraction time (h)	Extraction yield (%)
1(C)	35	200	4	19.12
2(C)	35	200	4	19.17
3	45	200	2	15.80
4	45	100	4	16.50
5	25	100	4	13.00
6	25	200	6	15.50
7	25	300	4	15.00
8(C)	35	200	4	19.14
9	35	100	6	17.00
10(C)	35	200	4	19.12
11	35	300	2	16.00
12	35	300	6	19.50
13	25	200	2	12.00
14	45	300	4	18.00
15	45	200	6	18.50
16	35	100	2	14.50
17(C)	35	200	4	19.11

C; Center Point

Table 3 Analysis of the variance (ANOVA) for the second-order polynomial model.

Source	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	9	88.12	9.79	1376.89	< 0.0001
Extraction Temperature (A)	1	22.11	22.11	3109.26	< 0.0001
Agitation Intensity (RPM)	1	7.03	7.03	988.73	< 0.0001
Extraction Time (C)	1	18.60	18.60	2616.21	< 0.0001
A ²	1	24.32	24.32	3420.33	< 0.0001
B ²	1	5.13	5.13	720.98	< 0.0001
C ²	1	6.88	6.88	967.79	< 0.0001
AB	1	0.063	0.063	8.79	0.0210
AC	1	0.16	0.16	22.50	0.0021
BC	1	0.25	0.25	35.15	0.0006
Residual	7	0.050	7.11×10^{-3}	-	-
Lack of Fit	3	0.047	0.016	27.78	0.0039
Pure Error	4	2.28×10^{-3}	5.70×10^{-4}	-	-
Total	16	88.17	-	-	-

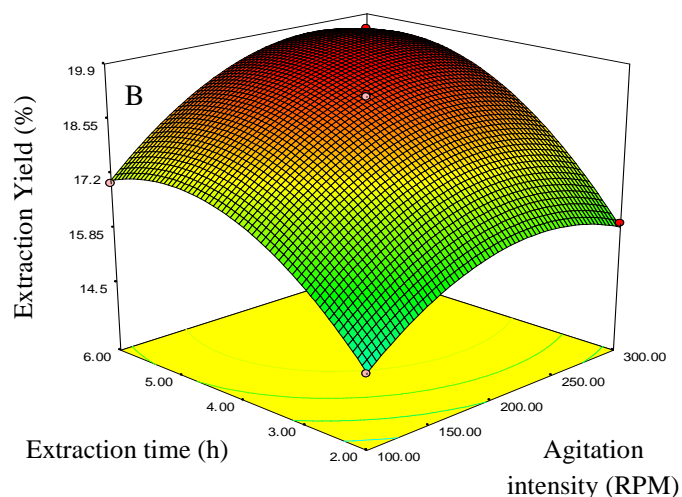
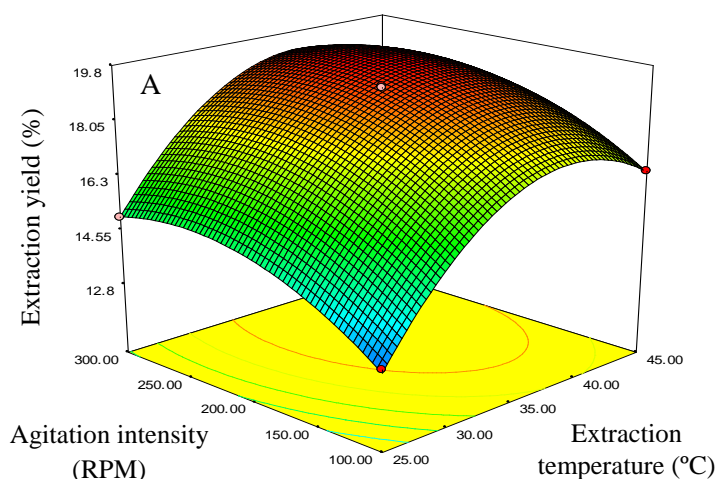
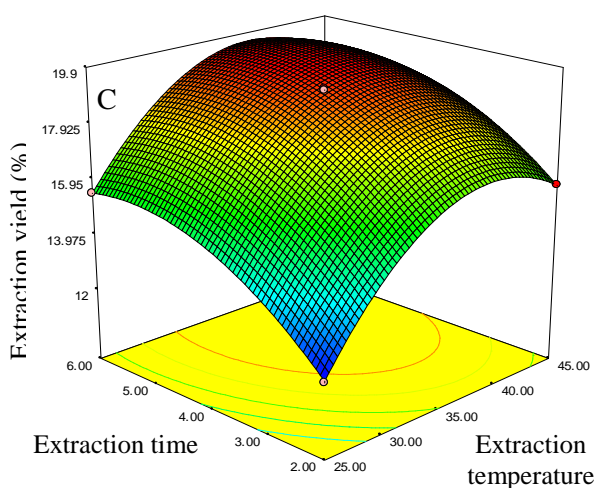


Fig 3 Response surface plots (3D) showing the interactive effects of extraction temperature (°C), agitation intensity (RPM) and extraction time (h) on the extraction yield of valuable bioactive compounds.

۲-۳- بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات با

ارزش زیست فعال از برگ گیاه شاتوت

از تکنیک بهینه‌سازی عددی^۱ به منظور دستیابی به شرایط بهینه فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ گیاه شاتوت توسط حلال متلائم با هدف به حداکثر رساندن عملکرد کمی فرایند استفاده شد. باید توجه داشت از آنجا که مدل‌های رگرسیونی تنها در ناحیه و شرایط مورد بررسی معتبر هستند، معمولاً محدودیت‌های اقتصادی و کیفی اندکی برای تعیین شرایط عملیاتی در نظر گرفته می‌شود [۲۲]. نتایج نشان داد، در

1. Numerical optimization

وجود تفاوت چشمگیر بین مقادیر به دست آمده از مدل و مشاهده تجربی، کارایی مدل را به خوبی اثبات می کند. محتوای فنولی کل و فعالیت ضد اکسایشی اندازه گیری شده به روش DPPH و H_2O_2 عصاره به دست آمده تحت این شرایط به ترتیب $38/12 \pm 0/15$ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره، $66/54 \pm 0/12$ و $4/87 \pm 0/16$ تعیین گردید.

صورتی که زمان استخراج ۵ ساعت، دمای استخراج ۳۸ درجه سلسیوس و شدت دور ۲۳۵ دور در دقیقه باشد، بیشترین عملکرد استخراج به دست خواهد آمد. در این شرایط میزان عملکرد کمی استخراج ۲۰/۰۵ درصد بود. به منظور بررسی صحت فرایند بهینه سازی شده، تیمار پیشنهادی در سه تکرار تولید و نتیجه حاصل از عملکرد کمی استخراج با نتیجه پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید (جدول ۴). عدم

Table 4 Predicted and experimental values of the response at optimum conditions.

Extraction yield (%)		Extraction time (h)	Agitation intensity (RPM)	Extraction temperature (°C)
Predicted	Experimental			
20.05	20.19±0.11	5	235	38

که در روش سوکسله به دلیل استفاده از دمای بالا و زمان طولانی آسیب حرارتی به این ترکیبات اجتناب ناپذیر است.

۴- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر به منظور بهینه سازی فرایند استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال به روش حلال متلاطم از روش سطح پاسخ بر پایه طرح باکس-بنکن و با استفاده از سه متغیر مستقل شامل دما، شدت دور و زمان استخراج استفاده گردید. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که روش سطح پاسخ را می توان به خوبی برای تخمین عملکرد کمی فرایند استخراج، به کار برد. هر سه متغیر مستقل مورد بررسی تاثیر معنی داری بر عملکرد کمی استخراج داشتند. مقادیر بالای R^2 (adj) R^2 به همراه فقدان برازش بی معنی مدل پیشنهادی در این پژوهش همگی بیانگر کارایی مطلوب مدل ارائه شده در پیش بینی پاسخ مورد ارزیابی است. شرایط بهینه فرایند استخراج در دمای ۳۸ درجه سلسیوس، ۲۳۵ دور در دقیقه شدت دور و ۵ ساعت زمان فرایند به دست آمد. مقایسه نتایج به دست آمده در روش حلال متلاطم با روش سوکسله نشان داد که می توان با استفاده از روش حلال متلاطم در دما و مدت زمان کم تر به مقدار بیشتری از ترکیبات زیست فعال از برگ های گیاه شاتوت با فعالیت ضد اکسایشی بالاتر دست یافت. همچنین نتایج به دست آمده بیانگر آن است که برگ گیاه شاتوت منبعی غنی از ترکیبات ضد اکسایش طبیعی است و می توان از آن در صنایع غذایی و دارویی - بهداشتی استفاده نمود.

۳-۳- مقایسه روش های استخراج با حلال متلاطم و سوکسله جهت جداسازی ترکیبات با ارزش زیست فعال از برگ شاتوت

عملکرد کمی استخراج با استفاده از روش سوکسله معادل $20/12 \pm 0/13$ درصد به دست آمد که عصاره به دست آمده می توانست به ترتیب $18/11 \pm 0/25$ درصد و $1/10 \pm 0/13$ درصد رادیکال های آزاد DPPH و H_2O_2 را مهار نماید. از آنجایی که مکانیسم استخراج در روش سوکسله براساس پدیده نفوذ حلال و انتشار ترکیبات قابل انحلال از منافذ سلول به داخل حلال مورد نظر در اثر پدیده اسمز می باشد لذا این روش استخراج روشی طولانی می باشد. اطلاعات به دست آمده نشان می دهند که با استفاده از حلال متلاطم تحت شرایط بهینه تعیین شده (زمان استخراج ۵ ساعت، دمای استخراج ۳۸ درجه سلسیوس و شدت دور ۲۳۵ دور در دقیقه) امکان دستیابی به عملکرد کمی بیشتر استخراج ترکیبات با ارزش زیست فعال (۲۰/۰۵) و فعالیت ضد اکسایشی بالاتر ($66/54 \pm 0/12$) درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH و $4/87 \pm 0/16$ درصد مهار رادیکال های آزاد H_2O_2 در دما و مدت زمان کمتری در مقایسه با روش سوکسله وجود دارد. براساس نتایج به دست آمده می توان بیان نمود که ضربات ایجاد شده روی سطح سلول در اثر تلاطم حلال مورد استفاده سبب تخریب دیواره سلولی و بهبود نفوذ حلال به داخل سلول می شود. فعالیت ضد اکسایشی کمتر ترکیبات استخراج شده به روش سوکسله می تواند ناشی از ناپایداری حرارتی ترکیبات ضد اکسایش باشد

۵- منابع

- methodology. LWT-Food Science and Technology, 42, 1491-1495.
- [11] Liyana-Pathirana, C. and Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry, 93, 47-56.
- [12] Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178.
- [13] Manzocco, L., Anese, M. and Nicoli, M.C. 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie, 31, 694-698.
- [14] Ruch, R.J., Cheng, S.J. and Klaunig, J.E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis, 10, 1003-1008.
- [15] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I. and Ganjloo, A. 2013. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Seed Oil from Winter Melon (*Benincasa hispida*) and Its Antioxidant Activity and Fatty Acid Composition. Molecules, 18: 997-1014.
- [16] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I. and Ganjloo, A. 2016. Characterization of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) seeds using supercritical carbon dioxide extraction combined with pressure swing technique. Food and Bioprocess Technology, 9: 396-406.
- [17] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I. and Ganjloo, A. 2013. Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. International Food Research Journal, 20: 331-338.
- [18] Liza, M.S., Abdul Rahman, R., Bimakr, M., Jinap, S., Rahmat, A., Zaidul, I.S.M. and Hamid, S. 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (*Pecah Kaca*). Food and Bioprocess Technology, 88: 319-326.
- [19] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I. and Ganjloo, A. 2012. Optimization of
- [1] Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry, 106: 444-450.
- [2] Oroian, M. and Escriche, I. 2015. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International, 74: 10-36.
- [3] Wiseman, H. and Halliwell B, 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal, 313: 17-29.
- [4] Lopez-Amoros, M.L., Hernandez, T. and Estrella, I. 2006. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. Journal Food Composition Analysis, 19: 277-83.
- [5] Iqbal, S., Younas, U., Sirajuddin, S., Chan, K.W., Sarfraz, R.A. and Uddin, K. 2012. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.), a comparative study. International Journal of Molecular Science, 13: 6651-6664.
- [6] Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Shiwaku, K. and Yamane, Y. 2005. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. Food Chemistry, 97, 25-31.
- [7] Bose, P.C. Genetic resources of mulberry and utilization. Mysore, India: CSR and TI, 1989, 183-190.
- [8] Bas, D. and Boyaci, I.H. 2007. Modeling and optimization, usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering, 78: 836-845.
- [9] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I. and Ganjloo, A. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. Molecules, 7, 11748-11762.
- [10] Liu, G., Xu, X., Hao, Q. and Gao, Y. 2009. Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface

- [21] Diego Santos, T., Priscilla, C., Veggi, M., Angela, A., Meireles, A. 2011. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation, *Journal of Food Engineering*, 101: 23-31.
- [22] Eren, I. and Kaymak-Ertekin, F. 2007. Optimization of osmotic dehydration of potato using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 79: 344-352.
- ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules*, 17: 11748-11762.
- [20] Zhan, C., Ziqian, Q., Yu, L., Shujuan, Z., Xiaohua, M., Qiang, W., Pu, J. and Pingfan, L. 2016. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, 197: 266-272.

Optimization of valuable bioactive compounds extraction from Mulberry leaves using agitated solvent extraction method

Bimakr, M. ^{1*}, Ganjloo, A. ¹, Zarringhalami, S. ¹, Ansariyan, E. ²

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

2. M.Sc in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

(Received: 2016/07/12 Accepted: 2016/12/27)

This study was conducted to optimize valuable bioactive compounds extraction from mulberry leaves using agitated solvent extraction through Box-Behnken response surface methodology. The effects of process independent variables including temperature (25-45 °C), agitation intensity (100-300 RPM) and extraction time (2-6 h) on the extraction yield of valuable bioactive compounds were studied. In this study, the optimized conditions aimed to obtain highest extraction yield were 38 °C, 235 RPM and 5 h of extraction time. Under these conditions, the extraction yield was 20.05%. The results revealed that the model obtained explains the relationship between the independent variables and response very well and also suitable for predicting extraction yield using any combination of values for the independent variables. Antioxidant activity of extract obtained under optimized conditions was determined using Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) and Hydrogen peroxide (H₂O₂) assays. The total phenolic content (TPC) of the extract was determined by Folin-Ciocalteu reagent. The TPC and antioxidant activity measured using DPPH and H₂O₂ assays were 38.12±0.15 mg GAE/g extract, 66.54±0.12% and 4.87±0.16%, respectively. Finally, the results obtained were compared with the results of Soxhlet extraction method. The results revealed that applying agitated solvent extraction led to obtain more extraction yield with higher antioxidant activity within shorter extraction time.

Keywords: Mulberry leaves, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Optimization, Response surface methodology.

* Corresponding Author E-Mail Address: mandanabimakr@yahoo.com