

بهبود دسترسی زیستی پلی فنل‌های پوست انار با تشکیل کمپلکس الحاقی با بتاسیکلودکسترین (β -CD)

سارا کلانتری^۱، لیلا روفه گری نژاد^۲، سجاد پیرسا^{۳*}، مهدی قره‌خانی^۲

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۰۲)

چکیده

با توجه به مشکلات زیست محیطی، ایمنی، سمیت و ویژگی‌های ارگانولپتیکی نامطلوب عصاره‌های استخراجی با حلال‌های آلی جهت استفاده در سیستم‌های غذایی، جایگزینی این روش‌ها با روش‌های استخراج آبی با راندمان بالای استخراج بیش از پیش مورد نیاز است. در مطالعه حاضر کارایی کاربرد همزمان محلول آبی بتاسیکلودکسترین (β -CD) و روش اولتراسوند جهت استخراج ترکیبات پلی فنلی غیرفلاونوئیدی از پوست انار در مقایسه با روش استخراج آبی مورد بررسی قرار گرفت. روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط استخراج انجام گرفت. آزمون‌ها بر مبنای طرح Box-Behnken با سه متغیر مستقل شامل دما (۷۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۴۰-۱۰ دقیقه) و غلظت محلول β -CD (۸/۱-۰ درصد) طراحی شدند. شرایط بهینه استخراج، دمای ۷۶/۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۸/۱۵ دقیقه و غلظت ۸/۱ درصد از β -CD تعیین شد که تحت این شرایط بیشترین میزان ترکیبات پلی فنلی غیرفلاونوئیدی ۷۷/۷۵ mgGAE/gDW و بازده استخراج ۸۱/۴۲ درصد بود. همچنین نتایج آزمون‌های FTIR و SEM نیز صحت تشکیل کمپلکس الحاقی مابین ترکیبات پلی فنلی پوست انار و بتاسیکلودکسترین را تایید نمودند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از محلول β -CD به همراه فرایند اولتراسوند به عنوان یک روش ایمن و کارا می‌تواند جایگزین روش‌های دیگر استخراج جهت بهبود استخراج ترکیباتی با ارزش تغذیه‌ای بالا شود.

کلید واژگان: بتاسیکلودکسترین، اولتراسوند، پوست انار، ترکیبات زیست فعال، ترکیبات فنلی غیرفلاونوئیدی

* مسئول مکاتبات: s.pirsa@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر توجه زیادی به ضایعات محصولات کشاورزی به منظور دستیابی به منابع جدید و ارزان قیمت ترکیبات زیست فعال طبیعی معطوف گردیده است که این امر لزوم انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه را ضروری می‌سازد [۱]. در ایران نیز ۳۵ درصد تولیدات کشاورزی به ضایعات تبدیل می‌شود از جمله این ضایعات، پسماندهای کارخانجات و مراکز تولید آبمیوه و کنسانتره می‌باشد که دارای ترکیبات مفید و سلامت‌بخش بوده و می‌توانند کاربردهای زیادی در صنایع غذایی داشته باشند. ترکیبات فنلی از مهمترین ترکیبات موجود در این پسماندها می‌باشد که استخراج این ترکیبات طبیعی و کاربرد آنها در صنایع غذایی سبب تولید محصولات غذایی مفید با خواص سلامت‌بخشی بالا خواهد شد [۲]. هنگام آبیگری از میوه انار در کارخانه‌های تولید آبمیوه، بخش زیادی از ضایعات میوه انار که بسته به رقم آن از ۳۰ تا ۶۰ درصد متغیر است را پوست میوه تشکیل می‌دهد. این نکته لزوم استفاده صنعتی و بهینه از چنین حجم وسیعی از ضایعات را روشن می‌نماید [۳]. پوست انار دارای کاربردهای درمانی گسترده‌ای از جمله: خاصیت ضدسرطانی، ضدالتهابی، ضدجوش‌زائی، ضددیابتی، حفاظت کلیوی و آنتی‌آترواسکلروتیک می‌باشد که اغلب این اثرات سلامت‌بخشی ناشی از حضور مقادیر بالای ترکیبات فنولیک در پوست میوه انار می‌باشد [۴]. جهت استفاده از مزایای ترکیبات عملگرایی موجود در پوست انار بایستی بافت سلولزی و سخت پوسته متلاشی شده و عصاره آن استخراج گردد. ولی استخراج ترکیبات زیست فعال از ضایعات کشاورزی با روش‌های معمول نیاز به صرف زمان طولانی و مقدار حلال زیادی دارند که ضمن سمی بودن دارای مخاطرات زیست محیطی فراوانی هستند. بنابراین نیاز به روش‌های استخراج جدید با زمان استخراج کوتاه‌تر، مصرف حلال آلی کمتر با ایجاد آلودگی کمتر تحت عنوان استخراج سبز بیش از پیش افزایش یافته است [۵]. اگر چه آب حلال موثری در استخراج مقادیر زیادی از ترکیبات زیست فعال می‌باشد، اما در استخراج برخی از این ترکیبات ناکارآمد می‌باشد. بنابراین کاربرد برخی ترکیبات از جمله β -CD در جهت افزایش راندمان استخراج ترکیبات زیست فعال از باقی‌مانده های گیاهی

ضروری به نظر می‌رسد [۶]. سیکلودکسترین‌ها جزء الیگوساکاریدهای حلقوی شکل می‌باشند که شامل واحدهای گلوکزی با پیوندهای آلفا ۱ و ۴ گلوکوپیرانوزی هستند که گاهی آنها را دکسترین‌های شاردینگر، سیکلوآمیلوز یا سیکلوگلوکان نیز می‌خوانند و اغلب توسط اصلاح آنزیمی (گلیکوزیل ترانسفراز) انواع نشاسته (سبب زمینی، ذرت، برنج) در مقایس صنعتی و با خلوص بالا تولید می‌شوند و اولین بار از طریق هضم نشاسته با باکتری باسیلوس ماسرانس^۱ بدست آمد. این ترکیبات عموماً بصورت ایمن (GRAS^۲) شناخته می‌شوند و به دلیل کارایی‌شان در تشکیل کمپلکس الحاقی^۳ با ترکیبات پلی فنلی و افزایش پایداری، حلالیت، دسترسی زیستی این ترکیبات در صنایع غذایی بکار برده می‌شوند [۷]. هر سیکلودکسترین دارای شکلی شبیه مخروط ناقص است که ساختار فضایی آن باعث به وجود آمدن سطح آبدوست و حفره آبیگری می‌شود که اینحالت منجر به ایجاد کمپلکس الحاقی می‌شود [۸]. همچنین بکارگیری روش نوین امواج فراصوت یکی از مهمترین روش‌های استحصال ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی است که نسبت به روش‌های متداول، دارای کارایی بالاتر، ارزاتر، زمان عصاره‌گیری و مصرف حلال کمتر می‌باشد [۹]. استخراج سبز یک روش موثر و سازگار با محیط زیست جهت استخراج ترکیبات طبیعی و با ارزش است [۶]. جایگزینی حلال های آلی با استخراج آبی بدون تاثیر منفی بر روی محصول استخراجی از مهمترین مسائل پیش رو در زمینه استخراج ترکیبات فنلی است که با استفاده از محلول بتاسیکلودکسترین امکان‌پذیر می‌شود [۱۰]. کاربرد روش جدید استخراج سبز ترکیبات زیست فعال با استفاده از محلول β -CD همراه با اولتراسوند در مقایسه با استفاده از حلال‌های آلی، روشی بسیار اقتصادی، ایمن، سریع با کاربرد حداقل میزان ترکیبات شیمیایی مضر همراه با کمترین ریسک آلودگی محصول و محیط زیست می‌باشد [۱۱]. با در نظر گرفتن فواید تغذیه‌ای، کاربردی و تکنولوژیکی ترکیبات زیست فعال حاصل از پوست انار، ارائه روش‌های کاربردی و ایمن و بهینه‌سازی آنها برای استخراج ترکیبات مفید موجود در پوست انار به عنوان ضایعات، در صنایع غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. تا کنون تحقیقی در

1. Bacillus macerans
2. Generally recognized as safe
3. Inclusion complex

Table 1 Gross chemical composition of pomegranate peel (on dry weight basis)

Parameter	Content(%)
Moisture	6.2
Ash	3.88
Fat	0.52
protein	3.86
fiber	11.2
Carbohydrate	85.54

زمینه استفاده همزمان از فرایند اولتراسوند و محلول β -CD جهت بهبود استخراج آبی ترکیبات پلی فنلی از پوست انار انجام نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی بهبود شرایط استخراج سبزی ترکیبات پلی فنلی غیرفلاونوئیدی از پوست انار و بررسی کارایی روش فوق در افزایش راندمان استخراج این ترکیبات از پوست انار انجام گرفت.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد اولیه

میوه‌های سالم و رسیده انار (رقم ملس فارس) جهت پوست‌گیری از بازار محلی در شهر ارومیه خریداری شد. استات پتاسیم (Qualikems) ساخت کشور هندوستان، معرف فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteu)، کلرید آلومینیوم و متانول از شرکت مرک آلمان، بتاسیکلودکسترین (β -Cyclodextrin)، اسیدگالیک، کوئرستین، کربنات سدیم و سایر استانداردهای مورد نیاز از شرکت سیگما آمریکا بود. کلیه ترکیبات شیمیایی و معرف‌ها دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

۲-۲-روش‌ها

۲-۱-۱-آماده‌سازی نمونه

میوه‌های سالم و رسیده انار با آب مقطر شسته و کاملاً خشک گردید. در مرحله بعد پوست انار به دقت از بخش خوراکی انار جدا شده و در محلی به دور از نور مستقیم آفتاب در دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته تا رسیدن به وزن ثابت کاملاً خشک شد. پوست‌های خشک شده انار با استفاده از آسیاب برقی کاملاً خرد شد و سپس جهت بدست آوردن پودری با اندازه ذرات یکنواخت از الک آزمایشگاهی با مش ۴۰ میکرومتر عبور داده شد و پس از آنالیز پوست انار مورد استفاده از نظر پارامترهای ذکر شده در جدول ۱ تا زمان استفاده در بسته‌بندی نایلونی در یخچال نگهداری شد.

۲-۲-۲-روش عصاره‌گیری

جهت استخراج ترکیبات پلی فنلی از پوست انار از حمام اولتراسونیک (مدل Elma، ساخت کشور آلمان) با فرکانس ثابت ۴۰ کیلو هرتز و انرژی ۱۰۰ وات استفاده گردید. حلال‌های مورد استفاده جهت استخراج شامل آب و محلول ۹/۰ و ۸/۱ درصد از β -CD بود. جهت تهیه محلول β -CD در غلظت‌های ذکر شده، مقدار مورد نظر از ترکیب بتاسیکلودکسترین را با آب مقطر در بن‌ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، تا حل شدن کامل بتاسیکلودکسترین به حالت همزده قرار داده شد. مقدار ۱۰ گرم از پودر پوست خشک شده انار وزن شد و با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های ذکر شده به نسبت (۱۰:۱) طبق شرایط دمایی و زمانی تعیین شده استخراج گردید. برای اینکه عصاره‌های پوست انار در داخل ارلن‌های مورد استفاده طی فرایند استخراج در معرض نور قرار نگیرد بدنه و دهانه ارلن‌های مورد استفاده کاملاً با فویل آلومینیومی پوشانده شد. عصاره‌های استخراجی بعد از اتمام فرایند استخراج با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و در نهایت مایع شفاف جدا شده که همان عصاره استخراج شده است از نظر ویژگی‌های کیفی مورد بررسی قرار گرفت و پس از بهینه‌سازی شرایط استخراج، عصاره بهینه شده با استفاده از روش فریزدراینگ (Dena vacuum industry, FD-5005-BT, Iran) خشک شد و سپس از نظر آزمون‌های DSC، FTIR و SEM مورد بررسی قرار گرفت.



Fig 1 pure pomegranate peel extract powder (a) inclusion complex of β -CD and pure pomegranate peel extract powder (b) β -CD powder (c)

۲-۲-۴-اندازه گیری بازده کمی استخراج

درصد بازده کمی استخراج با تقسیم کردن عدد وزن عصاره خشک بدست آمده از هر تیمار بر میزان اولیه نمونه (۱۰ گرم پوست انار) ضربدر ۱۰۰ بدست آمد.

۲-۲-۵- بررسی خواص حرارتی

جهت بررسی خواص حرارتی نمونه‌ها از DSC (perkin jade, Elmer ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. کالیبراسیون دستگاه توسط ایندیوم و نقره صورت گرفت. ظرف آلومینیومی خالی به عنوان مرجع و ازت بعنوان اتمسفر مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌هایی با وزن تقریبی 0/03 گرم با سرعت $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ در گستره دمایی 30°C تا 380°C حرارت داده شدند.

۲-۲-۶- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

(FT-IR)

طیف FTIR نمونه‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (Shimadzu ir-prestige21) در محدوده عدد موجی $4000-500\text{ cm}^{-1}$ و در تفکیک‌پذیری 4 cm^{-1} مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با KBr مخلوط شده و تحت فشار قرار گرفتند. در اثر فشار KBr ذوب شده و ترکیب مورد نظر را به صورت ماتریس در می‌آورد. قرص KBr حاصل، در نگهدارنده دستگاه طیف‌سنج قرار داده شد و طیف عبوری آن ثبت گردید.

۲-۲-۷- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مورفولوژی پودرهای لیوفیلیزه عصاره‌های استخراجی از پوست انار و بتاسیکلودکسترین خالص توسط میکروسکوپ الکترونی

۲-۲-۳-اندازه گیری ترکیبات پلی فنلی غیرفلانوئیدی

جهت اندازه‌گیری ترکیبات پلی فنلی غیرفلانوئیدی ابتدا مقدار کل ترکیبات پلی فنلی به روش فولین سیوکالتیو محاسبه شد. جهت محاسبه، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره استخراجی با ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو کاملاً مخلوط شد بعد از ۳ الی ۵ دقیقه ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۵/۷ درصد به مخلوط اضافه گردید و پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر ورتکس کامل انجام گرفت و محلول مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در محل تاریک قرار داده شد سپس جذب هر کدام از نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. از اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده گردید. معادله خط با ضریب همبستگی بالا بصورت (Y = 0.0136x - 0.0041, $R^2=0.998$) بدست آمد [۱۲].

همچنین میزان فلانوئید کل نمونه‌ها بر اساس روش رنگ‌سنجی با کلرید آلومینیوم انجام گرفت. جهت محاسبه ۵/۰ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۵/۰ میلی‌لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط شد و ۳ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب هر کدام از نمونه‌ها در طوج موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. و از کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده گردید. معادله خط با ضریب همبستگی بالا بصورت (Y = 0.0135x - 0.0288, $R^2=0.993$) بدست آمد [۱۳]. و در نهایت میزان ترکیبات فنلی غیرفلانوئیدی از کسر میزان ترکیبات فنلی کل از میزان ترکیبات فلانوئیدی محاسبه گردید و بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم نمونه خشک پوست انار گزارش شد (mgGAE/gDW).

بعدی با نرم افزار Design expert.7.5.1 انجام شد. بدین منظور معادلات ریاضی چند جمله‌ای درجه دوم با استفاده از آنالیز رگرسیون بر روی متغیرهای وابسته در مدل زیر برازش شدند:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC$$

در معادله فوق Y بیانگر پاسخ‌های مورد نظر شامل بازده استخراج و ترکیبات فنولی غیرفلاونوئیدی و β_n نشان دهنده ضرایب رگرسیون می باشد. این ضرایب اثرات خطی، دو جمله‌ای و نیز اثرات متقابل فاکتورهای متغیر فرآیند را بیان می‌کنند. مقادیر A ، B و C نیز به ترتیب نشان دهنده فاکتورهای مستقل فرآیند بودند.

رویشی (EM3200- KYKY) در ولتاژ شتاب دهنده از 10 تا 20 کیلو ولت، مورد بررسی قرار گرفت. قبل از مشاهده، سطح نمونه‌ها بوسیله لایه نازکی از طلا توسط پوشش‌دهی با مکانیسم کندپاش پوشش داده شدند.

۲-۸- طراحی آزمایشات

پارامترهای فرآیند استخراج ترکیبات پلی‌فنلی از پوست انار با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شدند. بدین منظور از طرح Box-Benhken شامل سه متغیر دما، زمان و غلظت محلول β -CD به تعداد ۱۵ تیمار و ۳ تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. سطوح متغیرهای مستقل و کدهای مربوطه در جدول ۲ ذکر شده است. سپس بر اساس تعداد فاکتورها و سطوح آنها جدول طرح آماری معین شد. معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p \leq 0.05$) مورد بررسی قرار گرفت و تجزیه تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای سه

Table 2 Independent variable of the process and their corresponding levels

Independent variable	Symbols	Levels		
		-1	0	1
Tempetature (°C)	A	30	50	70
Time(min)	B	10	25	40
β -CD concentration(gr/100ml)	C	0	0.9	1.8

Table 3 Experimental design and response values

Run	A: Temperature (°C)	B: Time (min)	C: β -CD (gr/100ml)	Extraction efficiency(%)	Non-flavonoid phenols (mgGAE/gDW)
1	50	25	0.9	43.13	49.98
2	30	25	1.8	34.17	64.07
3	70	40	0.9	44.83	76.31
4	50	40	1.8	38.22	47.39
5	30	25	0	33.35	59.05
6	50	25	0.9	43.33	57.81
7	70	10	0.9	43.56	68.67
8	50	10	1.8	50.57	95.67
9	50	40	0	45.75	47.91
10	30	40	0.9	30.81	89.19
11	70	25	0	39.14	54.50
12	30	10	0.9	34.83	89.24
13	50	10	0	37.12	43.47
14	50	25	0.9	43.83	52.83
15	70	25	1.8	44.14	80.53

حرارتی ترکیبات زیست فعال منجر به کاهش راندمان استخراج می‌شود. این تاثیر دوگانه دما بر عملکرد کمی جداسازی ترکیبات با ارزش زیست فعال در مطالعات متعددی بررسی شده و نتایج مشابهی بدست آمده است [۱۴].

۵۰ درجه سانتی‌گراد بر عملکرد کمی استخراج افزوده شد. سپس در ادامه با افزایش میزان دما تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد از میزان کارایی استخراج کاسته می‌شود. افزایش دما سبب افزایش ضریب نفوذ حلال و در نتیجه بهبود راندمان استخراج می‌شود. اما از سوی دیگر استفاده از دماهای بالا به دلیل تخریب‌پذیر بودن

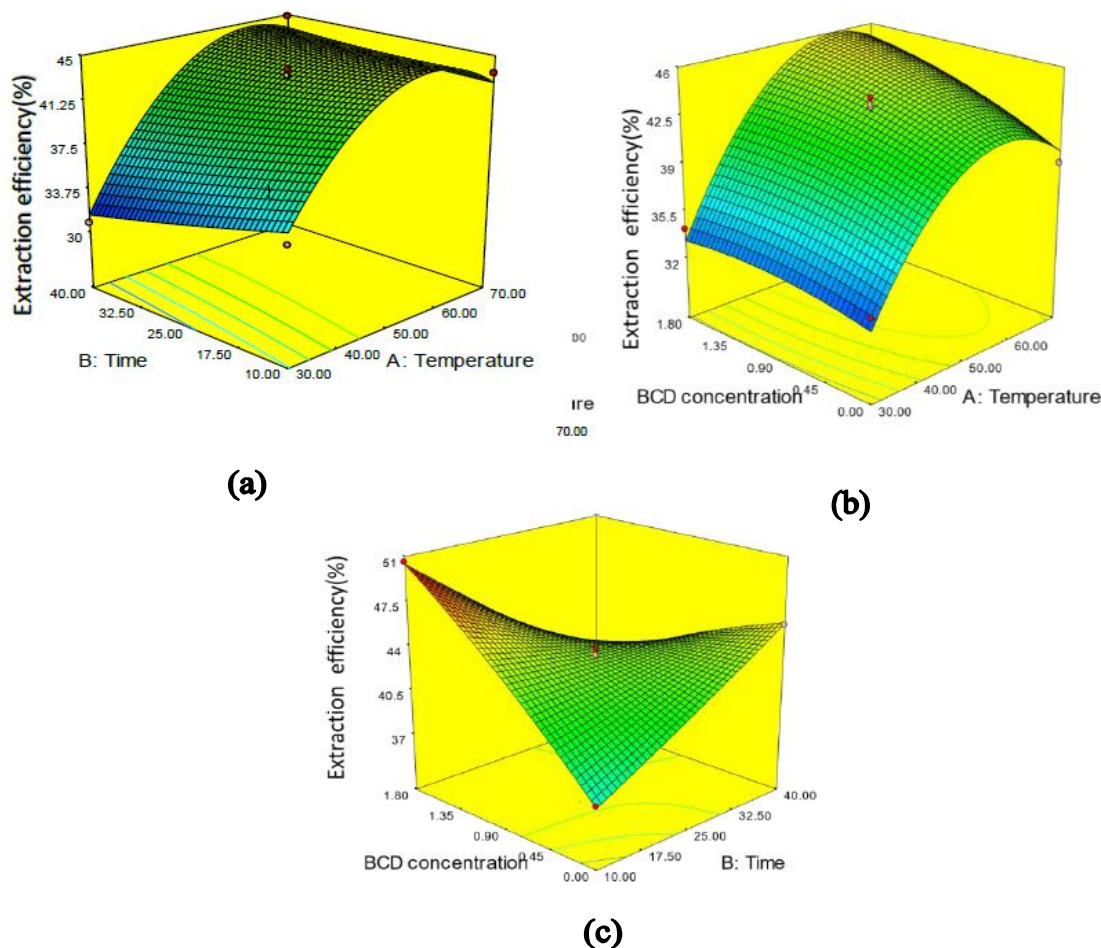


Fig 2 Contour plot for the effect of (a) time and temperature (b) β -CD concentration and temperature (c) β -CD concentration and time on extraction efficiency(%)

با افزایش غلظت β -CD در حلال افزایش کارایی استخراج مشاهده شد که در نتیجه ایجاد کمپلکس الحاقی مابین ساختار این ترکیبات و β -CD می‌باشد که سبب افزایش قابلیت انحلال آنها در آب و در نتیجه افزایش راندمان استخراج این ترکیبات شده است [۱۶]. بیشترین میزان بازده کمی استخراج به میزان ۵۷/۵۰ درصد در تیمار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۰ دقیقه و غلظت ۸/۱ درصد β -CD مشاهده شد.

با افزایش زمان استخراج نیز بر میزان عملکرد کمی استخراج افزوده شد. افزایش زمان از طریق افزایش زمان انتقال جرم ترکیبات حل شونده از ماتریس گیاهی به حلال منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود ولی تاثیر این افزایش معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$) که این امر احتمالاً به علت اشباع شدن حلال با ترکیبات استخراج شده و صفر شدن شیب غلظت و متوقف شدن اثر حلال با گذشت زمان می‌باشد [۱۵]. همچنین

ارائه شده در معادله‌ی فوق برازش مناسبی برای پاسخ مورد نظر ارائه داد (جدول ۴). تأثیر متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر محتوای ترکیبات فنلی غیر فلاونوئیدی استخراجی از پوست انار بصورت سطح پاسخ سه‌بعدی (شکل ۳) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده شد با افزایش دما از ۳۰ تا میزان ۵۰ درجه سانتی‌گراد میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنلی غیر فلاونوئیدی کاهش یافت اما با افزایش بیشتر دما تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد یک روند افزایشی در میزان استخراج این ترکیبات مشاهده گردید. علت افزایش میزان استخراج این ترکیبات با افزایش دما این است که در واقع دماهای بالاتر می‌تواند منجر به نرم شدن بافت گیاهی، تخریب اتصالات ترکیبات فنولی با پروتئین و پلی‌ساکاریدها و افزایش قابلیت انحلال ترکیبات فنولی شده که این اثرات، می‌تواند انتقال جرم را بهبود بخشد و سبب افزایش میزان استخراج ترکیبات فوق در دماهای بالای استخراج شود [۱۴].

۲-۳- تأثیر متغیرهای فرایند بر محتوای ترکیبات فنولی غیرفلاونوئیدی

طبق جدول تجزیه واریانس جملات خطی غلظت β -CD (C) و اثر درجه دوم دما در سطح ($P \leq 0.05$) تأثیر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنلی غیر فلاونوئیدی داشتند. با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای غلظت β -CD می‌توان دریافت که β -CD تأثیر مثبت و معنی‌دار بر میزان استخراج ترکیبات فنولی غیر فلاونوئیدی داشت اما اثر درجه دوم دما معنی‌دار و منفی بود. بنابراین با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله کلی مدل درجه دوم برای پاسخ ترکیبات فنولی غیر فلاونوئیدی، به صورت رابطه ۲ گزارش شد.

رابطه (۲) $Y = -28.1 + 91.9C - 0.13A^2$
ضریب تبیین R^2 مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۸۵ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش نیز ۰/۰۷ بود بنابراین مدل

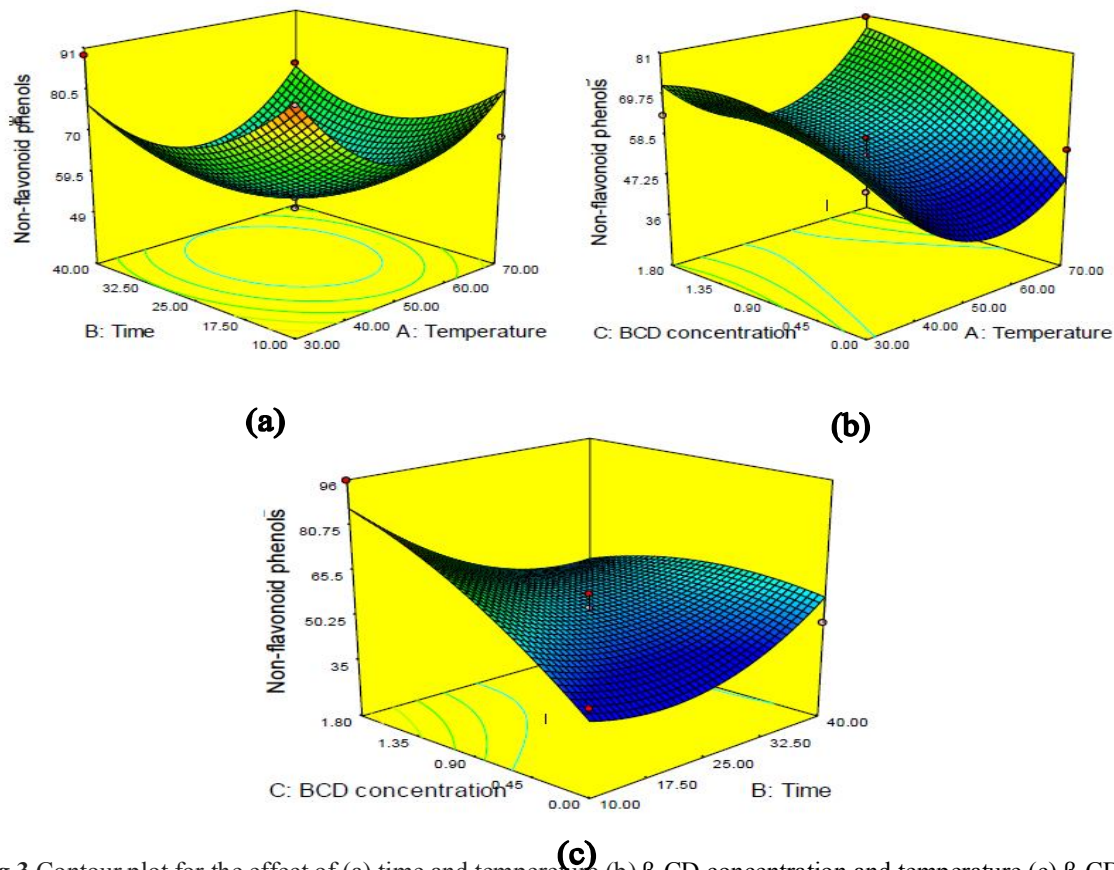


Fig 3 Contour plot for the effect of (a) time and temperature (b) β -CD concentration and temperature (c) β -CD concentration and time on Non-flavonoid phenolic compounds

دقیقه کاهش مختصری در میزان استخراج ترکیبات فنلی غیرفلاونوئیدی ایجاد شد که علت این کاهش احتمالاً به دلیل

در مورد تأثیر زمان بر میزان استخراج ترکیبات فنلی غیرفلاونوئیدی ملاحظه گردید که با افزایش زمان استخراج تا ۲۵

از تفاله هلو [۱۹]، از گونه های مختلف انگور [۲۰]، گیاه *Sideritis scardica*، تفاله و میوه انگور قرمز [۶] و تفاله سیب [۲۱] انجام گرفته است که نتایج همگی گویای افزایش راندمان استخراج ترکیبات پلی فنلی با استفاده از ترکیب β -CD طی فرایند استخراج بود. از بین تیمارهای انجام گرفته در مطالعه حاضر بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی غیرفلاونوئیدی به میزان $95/77 \text{ mgGAE/gDW}$ مربوط به تیمار با دمای 50°C درجه سانتی گراد و زمان 10 دقیقه و غلظت $8/1$ درصد از β -CD بود.

۳-۳- بهینه سازی

در فرایند استخراج ترکیبات پلی فنلی غیرفلاونوئیدی از پوست انار دستیابی به بیشترین میزان ترکیبات فنولی غیرفلاونوئیدی و بازده کمی استخراج به عنوان اهداف مورد نظر آزمایشات در تجزیه و تحلیل آماری مورد نظر قرار گرفت. شرایط عملیاتی بهینه، با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی انجام شد. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه سازی، سطوح پاسخ و مستقل متغیرهای تنظیم گردید. با استفاده از تکنیک تابع مطلوبیت بهترین پاسخها بدست آمد. شرایط بهینه استخراج دمای $77/55^\circ\text{C}$ درجه سانتی گراد، زمان $38/15$ دقیقه و غلظت $8/1$ درصد از β -CD بود که تحت این شرایط بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی غیر فلاونوئیدی $77/75 \text{ mgGAE/gDW}$ و بازده کمی استخراج $81/42$ درصد بود. مطلوبیت بدست آمده تحت شرایط بهینه برای متغیرها و پاسخهای مورد بررسی نیز $76/0$ بود.

۳-۴- بررسی طیف سنجی مادون قرمز تبدیل

فوریه (FTIR)

طیف سنجی FTIR اغلب به عنوان یک ابزار مناسب جهت تعیین گروههای عاملی خاص و یا پیوندهای شیمیایی که در یک ماده وجود دارد، مورد استفاده قرار می گیرد. نتایج طیف سنجی مادون قرمز عصاره استخراجی تحت شرایط بهینه با استفاده از بتاسیکلودکسترین، عصاره استخراجی تحت شرایط بهینه با آب (بدون حضور بتاسیکلودکسترین) و بتاسیکلودکسترین خالص در شکل ۳ نشان داده شده است. در ترکیب شیمیایی بتاسیکلودکسترین پیکهای مربوط به اعداد جذبی 2923 ، 3410 ، 1158 ، 1028 و 1078 به ترتیب مربوط به باندهای کششی O-H، باندهای کششی C-H، باندهای کششی گروه کربونیل C=O، باندهای کششی نامتقارن پل C-O-C و ارتعاشات اسکلتی

اشباع شدن حلال از ترکیبات پلی فنلی و کاهش اثر حلال در میزان استخراج این ترکیبات می باشد ولی با افزایش زمان استخراج تا 40 دقیقه، میزان استخراج ترکیبات فنلی غیرفلاونوئیدی افزایش یافت که احتمال داده می شود یکی از دلایل افزایش مقدار این ترکیبات، تجزیه پلی فنل های سنگین وزن به انواع با وزن مولکولی کمتر باشد در نتیجه تماس طولانی تر این ترکیبات تحت دمای بالای استخراج باشد [۱۵]. در مورد تاثیر غلظت محلول β -CD بر میزان استخراج ترکیبات پلی فنلی مشاهده می شود (شکل ۱) که با افزایش غلظت β -CD در حلال مورد استفاده میزان استخراج ترکیبات فنلی کل به میزان معنی داری ($p \leq 0/05$) افزایش یافت. بتاسیکلودکسترین به دلیل تشکیل کمپلکس الحاقی از طریق حفره لیوفیل خود با پلی فنل های هیدروفیل سبب افزایش قابلیت انحلال آنها در آب می شود [۱۶]. زیرا بیشتر ترکیبات پلی فنلی ترکیبات غیر قطبی آروماتیک می باشند که در حلال های قطبی نظیر آب حلالیت پایینی دارند بنابراین میزان استخراج این ترکیبات با آب بسیار پایین است. همچنین در تحقیقات دیگر انجام گرفته در این زمینه بر هم کنش مابین β -CD با ترکیبات پلی فنلی را در نتیجه نفوذ β -CD در غشا سلولی این ترکیبات جهت اتصال با محل های هدف عنوان شده در این حالت همچنین ویژگی های بیوشیمیایی و بیولوژیکی ملکول های مهمان نیز بطور موثری تغییر می یابد و در نتیجه قابلیت نفوذپذیری، انحلال و دسترسی زیستی ترکیبات فوق افزایش می یابد [۱۷]. میزان غلظت مورد نیاز از محلول β -CD جهت تشکیل کمپلکس الحاقی مابین β -CD و ترکیبات زیست فعال موجود در منابع گیاهی بستگی به حداکثر میزان حلالیت این ترکیب در آب دارد. در مطالعه حاضر حداکثر غلظت محلول β -CD مورد استفاده در فرایند استخراج $8/1$ درصد در نظر گرفته شد که این میزان بر اساس حداکثر حلالیت این ترکیب در آب در نظر گرفته شده است [۱۸] اندازه حفره غیر قطبی β -CD برای جایگزینی ترکیبات آروماتیک و هتروسیکلیک با جرم مولی 800 - 200 گرم در مول مناسب می باشد. وزن ملکولی فنولیک اسیدها و فلاونول ها به ترتیب $354-194$ و $464-302$ گرم در مول می باشد بنابراین حفره هیدروفوب β -CD محیط مناسبی جهت ایجاد کمپلکس الحاقی با این ترکیبات می باشد در نتیجه این امر میزان استخراج این ترکیبات در نتیجه افزودن ترکیب β -CD به آب به عنوان حلال استخراجی افزایش می یابد [۶]. تحقیقات مشابهی نیز در زمینه افزایش راندمان استخراج ترکیبات پلی فنلی

جذبی ۲۳۴۵ در عصاره استخراجی تحت شرایط بهینه با آب در طیف های مربوط به عصاره استخراجی با بتاسیکلودکسترین حذف شده اند و پیک های جدیدی در محدوده اعداد جذبی ۱۰۷۸ و ۱۱۵۴ ایجاد شده است که به ترتیب مربوط به ارتعاشات اسکلتی کششی گروه کربونیل C-O و باندهای کششی گروه کربونیل C-O می باشد که همگی گویای ایجاد پیوندهای جدید بین ترکیبات پلی فنلی پوست انار با ساختار بتاسیکلودکسترین در عصاره استخراجی با این ترکیب می باشد [۲۳].

کششی گروه کربونیل C-O می باشد [۲۲]. پیک های مربوط به اعداد جذبی ۳۴۱۰، ۲۹۲۳، ۱۰۲۸ و ۱۱۵۸ در ترکیب شیمیایی بتاسیکلودکسترین خالص، با باندهای مربوط به اعداد جذبی ۳۴۰۵، ۲۹۲۷ و ۱۱۵۴ در عصاره بهینه استخراجی با بتاسیکلودکسترین جایگزین شده است و باندهای مربوط به محدوده جذبی ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ حذف شده اند. این تغییرات احتمالاً نشان دهنده تشکیل پیوندهای هیدروژنی داخل ملکولی بین ترکیبات فنلی عصاره استخراجی از پوست انار با بتاسیکلودکسترین می باشد. همچنین باندهای مربوط به عدد

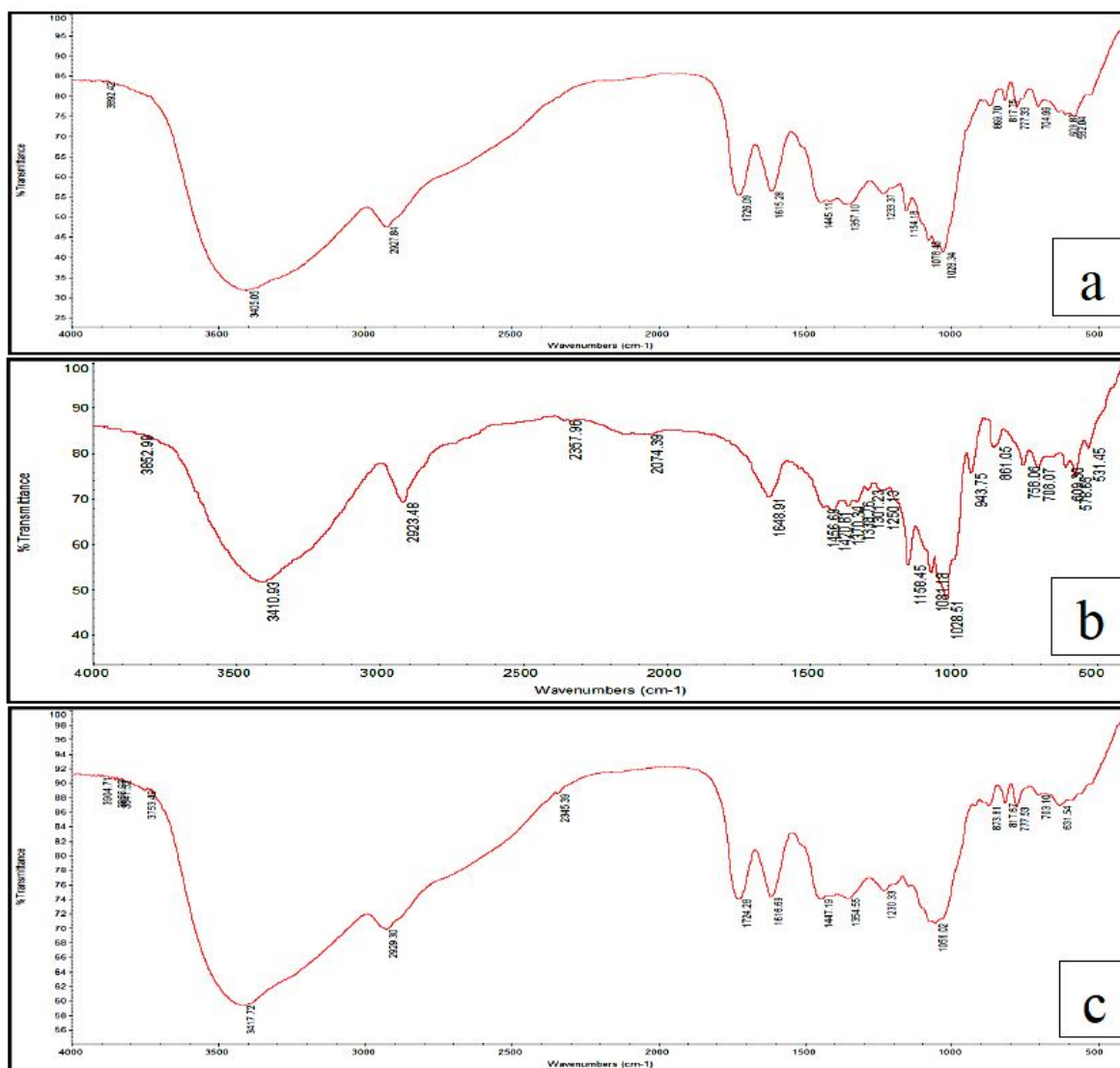


Fig 3 FT-IR spectra of pure pomegranate peel extract (a) β -CD alone (b) and inclusion complex of β -CD and pure pomegranate peel extract (c)

که احتمالاً کاربرد محلول بتاسیکلودکسترتین در استخراج ترکیبات پلی فنلی از پوست انار سبب تغییر برخی ویژگی‌های حرارتی از جمله محل پیک‌های اندوترمی و نقطه ذوب شد [۲۵]. مقایسه ترموگرام مربوط به عصاره استخراجی با آب تحت شرایط بهینه و عصاره استخراجی با بتاسیکلودکسترتین تحت شرایط بهینه نشان می‌داد که شروع ذوب عصاره استخراجی با بتاسیکلودکسترتین در دمای بالاتری نسبت به عصاره استخراجی با آب بود که همگی گویای حفاظت هسته فنلی توسط ماتریکس بتاسیکلودکسترتین در نتیجه تشکیل کمپلکس الحاقی بود. Araújo و همکاران (2007) رفتار مشابهی را در زمانی که داروها را با-HP-β-CD انکپسوله نموده بودند مشاهده کردند [۲۶].

۳-۵- بررسی خواص حرارتی (DSC)

ترموگرام مربوط به عصاره استخراجی با آب تحت شرایط بهینه، عصاره استخراجی با بتاسیکلودکسترتین تحت شرایط بهینه و بتاسیکلودکسترتین خالص در شکل ۴ نشان داده شد. در ترموگرام مربوط به عصاره استخراجی با آب (بدون حضور بتاسیکلودکسترتین) تحت شرایط بهینه، پیک اندوترمی در محدوده دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید ولی در ترموگرام مربوط به β-CD خالص پیک‌های اندوترمی در محدوده دمایی ۱۳۱ و ۳۳۰ درجه سانتی‌گراد ملاحظه گردید که به ترتیب احتمالاً به دلیل حذف مولکول‌های آب و تجزیه حرارتی β-CD می‌باشد [۲۴]. همه این پیک‌ها در ترموگرام عصاره استخراجی با بتاسیکلودکسترتین تحت شرایط بهینه استخراج حذف شده بودند.

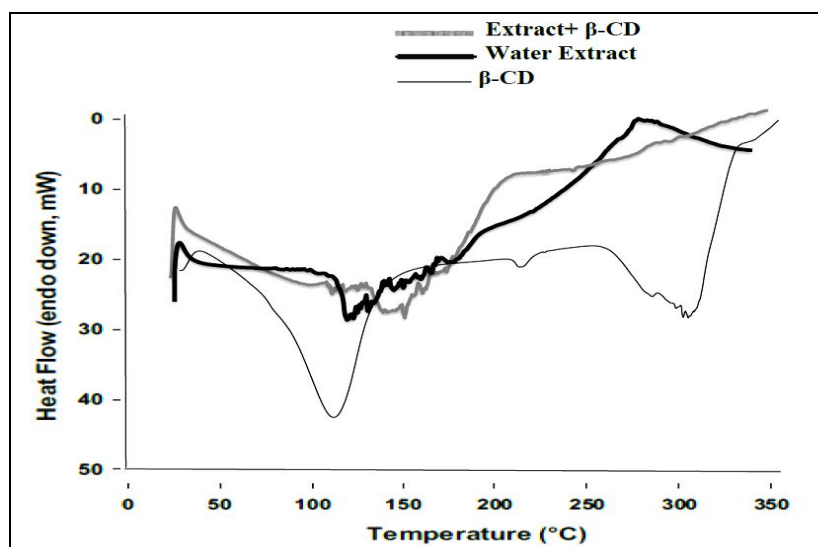


Fig 4 Thermograms of pure pomegranate peel extract (a) β-CD alone (b) and inclusion complex of β-CD and pure pomegranate peel extract (c)

مولکول‌های CDS است. تصویر (b) پس از فرایند کپسوله‌سازی، (Extract+β-CD) ظهور ذرات با شکل نامنظم که مشخصه کپسول β-CDS حاصل از لیوفیلیزاسیون است، مشاهده می‌شود. تصویر (c) ویژگی‌های آمورف و همگن را نشان می‌دهد و با عصاره غیر تصفیه و استخراج شده با آب مرتبط است. محققان مختلف خصوصیات مشابهی را در انکپسولاسیون داروها و ترکیبات پلی فنلی مشاهده نموده‌اند [۲۶].

۳-۶- بررسی مورفولوژی ذرات عصاره (SEM)

شکل ۵ تصاویر SEM، بتاسیکلودکسترتین خالص β-CD، عصاره استخراجی تحت شرایط بهینه با بتاسیکلودکسترتین خالص (Extract+β-CD) و عصاره استخراجی تحت شرایط بهینه با آب (Water Extract) را نشان می‌دهد. تصویر (a) پلیمر خالص β-CD به صورت ورقه‌های با اندازه ذرات مختلف را نشان می‌دهد، که اینحالت نشان دهنده ویژگی مشخصی از

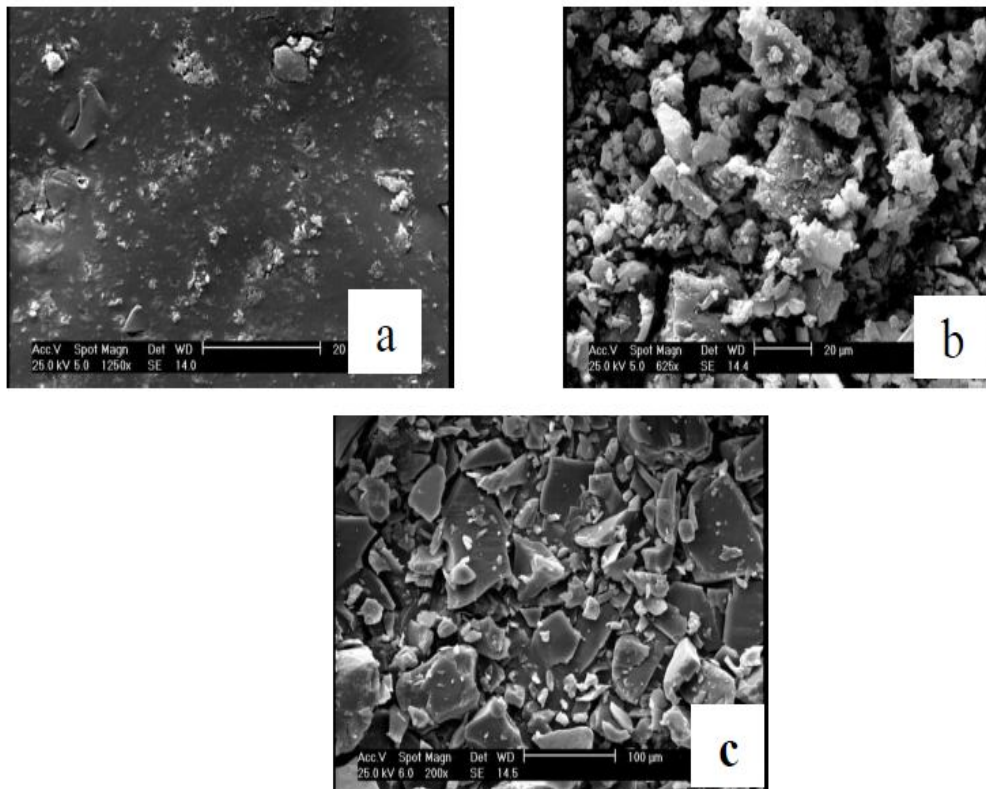


Fig 5 SEM micrographs: pure pomegranate peel extract (a) β -CD alone (b) and inclusion complex of β -CD and pure pomegranate peel extract (c)

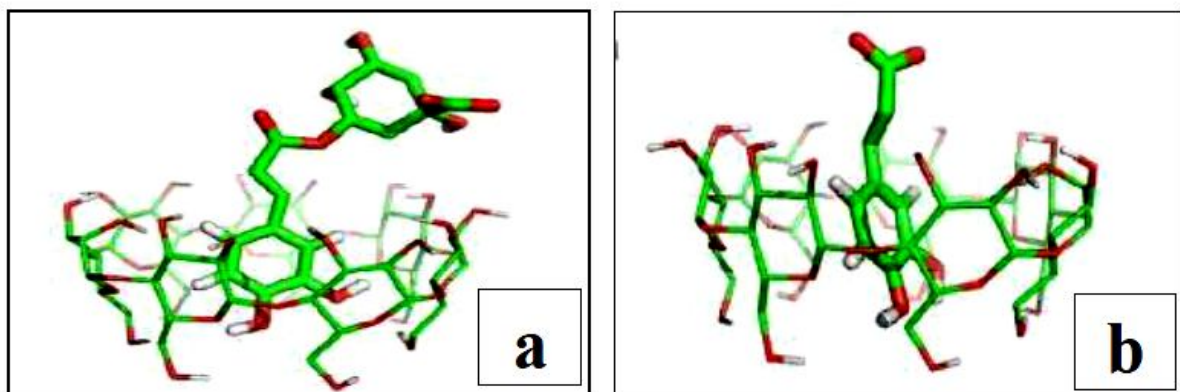


Fig 6 Inclusion complexes of β -cyclodextrin with Chlorogenic acid (a) and Caffeid acid (b)

استخراج ترکیبات زیست فعال مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بهینه‌سازی فرایند استخراج با استفاده از فرایند اولتراسوند و تشکیل کمپلکس الحاقی با β -CD، از روش سطح پاسخ بر پایه طرح Box-Behnken و با استفاده از سه متغیر مستقل شامل دما، زمان و غلظت محلول β -CD استفاده گردید. شرایط بهینه

۴- نتیجه‌گیری

استفاده از محلول β -CD به عنوان محیط استخراج، می‌تواند به عنوان یک تکنیک استخراج سبز با استفاده از حلال آب باشد. در مطالعه حاضر بهینه‌سازی استخراج سبز ترکیبات پلی‌فنلی غیرفلاونوئیدی از پوست انار به عنوان یک منبع طبیعی برای

- Analytica Chimica Acta, 732, 100–104.
- [6] Ratnasooriya, C. C & Rupasinghe, H. P. V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes & their pomace using β -cyclodextrin, Food Chemistry, 134, 625-136.
- [7] Szente, L., & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrine as food ingredient, Trend in food science & Technology, 15, 137-142.
- [8] Basilio, N., Fernandes, A., de Freitas, V., Gago, S., & Pina, F. (2013). Effect of β -cyclodextrin on the chemistry of 3',4',7-trihydroxyflavylum, New Journal of Chemistry, 37(10), 3166-3173.
- [9] Paniwnyk, L. (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*, Journal of Ultrasonics Sonochemistry, 2(0), 899–031.
- [10] Chemat, F., Vian, M.A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural product: concept & principles, International journal of molecular science, 13(7), 8615-8627.
- [11] Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds, Carbohydrate polymers, 101, 121-135.
- [12] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology & Viticulture, 16(3), 144-158.
- [13] Djeridane A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocher, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, Food Chemistry, 97(4), 654-660.
- [14] Ya-Qin, M. A & Jian-Chu, C. h. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound, Journal of Ultrasonics Sonochemistry, 16, 57-62.
- [15] Rodrigues, S., A. Gustavo, & S. Pinto. (2007). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compound from coconut shell powder by response surface methodology, Ultrasonics Sonochemistry, 15, 95-100.
- [16] Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins & their uses: A review, Process Biochemistry, 93, 6401–3301.
- [17] Pralhad, T & Rajendrakumar, K. (2004). Study of freeze-dried quercetincyclodextrin استخراج دمای ۷۶/۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۵/۳۸ دقیقه و غلظت β -CD ۸/۱ درصد بود. که تحت این شرایط، بیشترین میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنلی غیرفلانوئیدی ۷۵/۷۷ mgGAE/gDW و بازده استخراج ۸۱/۴۲ درصد بود. نتایج آزمون‌های FTIR و SEM تشکیل کمپلکس الحاقی مابین ترکیبات پلی‌فنلی پوست انار و β -CD تایید نمود. با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از β -CD همراه با اولتراسوند سبب افزایش کارایی استخراج ترکیبات پلی‌فنلی غیرفلانوئیدی از پوست انار شد. بنابراین وجود مقادیر بالای ترکیبات زیست فعال در پوست انار و مقرون به صرفه بودن استفاده از آن از نظر اقتصادی با توجه به این که ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان انار در دنیا می‌باشد، پوست انار را به عنوان یک منبع مهم ترکیبات زیست فعال جهت غنی‌سازی محصولات غذایی و تولید محصولات غذایی با ارزش تغذیه‌ای بالا و عملگرا مطرح می‌سازد.

۵- منابع

- [1] Samadloiy, H. R., Azizi, M. H., & Barzegar, M. (2008). Physicochemical quality of seeds of pomegranate cultivar (*Punica granatum* L.) grown in Iran and antioxidative activity of their phenolic component, Journal of Food Science and Technology, 45, 190–192.
- [2] Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Azizi, M. H. (2007). Total phenolic contents & antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts, Journal of Agricultural Sciences & Technology, 9, 35-42.
- [3] Zarezadeh, M, R. (2008). Extraction & identification of nutritional & pharmaceutical compounds from pomegranate peel of three dominant Iranian varieties. M. D. dissertation, Isfahan University of Technology, Isfahan.
- [4] Hassanpour Fard, M., Ghule, A. E., Bodhankar, S. L., & Dikshit, M. (2011). Cardioprotective effect of whole fruit extract of pomegranate on doxorubicin-induced toxicity in rat, Journal of Pharmaceutical Biology, 49(4), 377-380.
- [5] Carrera, C., Ruiz-rodriíguez, A., Palma, M., Barroso, C.G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes,

- [23] Azeez, A. A., Rhee, K. Y., Park, S. J., Kim, H. J., & Jung, D. H. (2013). Application of cryomilling to enhance material properties of carbon nanotube reinforced chitosan nanocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 50, 127-134.
- [24] Kumar-Krishnan, S., Prokhorov, E., Hernández-Iturriaga, M., Mota-Morales, J. D., Vázquez-Lepe, M., Kovalenko, Y., & LunaBárceñas, G. (2015). Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions, *European Polymer Journal*, 67, 242-251.
- [25] Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., Gioxari, A., Chiou, A., & Makris, D. P. (2010). Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract, *Food Science and Technology*, 43, 882-889.
- [26] Araújo, M. V. G., Vieira, E. K. B., Lázaro, G. S., Cogenero, L. S., Ferreira, O. P., & Almeida, L. E. (2007). Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, phase solubility and molecular modeling. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 5752-5759.
- [27] Laine, P., Kylli, P., Heinonen, M., & Jouppila, K. (2008). Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11251-11261.
- binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction & SEM analysis, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 34, 333-339.
- [18] El Darra, N., Hiba N. Rajha, H.N., Debs, E Saleh, F, El-Ghazzawi, I., Louka, N & Maroun, R.G. (2018). Comparative Study between Ethanolic and β -Cyclodextrin Assisted Extraction of Polyphenols from Peach Pomace, *International Journal of Food Science*, doi.org/10.1155/2018/9491681.
- [19] Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. A. (2014). comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462-864
- [20] Korompokis, K., Igoumenidis, P. E., Mourtzinis, I & Karathanos, V. T. (2017). Green extraction and simultaneous inclusion complex formation of *Sideritis scardica* polyphenols. *International Food Research Journal*, 24(3), 1233-1238.
- [21] Parmar, I., Sharma, S., & Rupasinghe, H.P.V. (2015). Optimization of β -cyclodextrine -base extraction from apple pomace using response surface methodology. *Journal of food science & Technology*, 52(4), 2202-2210.
- [22] Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., Gioxari, A., Chiou, A., & Makris, D. P. (2010). Polyphenol characterization & encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract, *LWT - Food Science & Technology*, 43, 882-889.

Improving bioavailability of pomegranate peel polyphenols by forming an inclusion complex with β -cyclodextrin (β -CD)

Kalantari, S. ¹, Roufegarinejad, L. ¹, Pirs, S. ^{2*}, Gharekhani, M. ¹

1. Department of Food Sciences, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2019/07/12 Accepted:2019/08/24)

Due to environmental problems, safety, toxicity and adverse organoleptic properties of extracts with organic solvents for use in food systems, replacement of these methods with high efficiency aqueous extraction methods more than needed. In the present study, the efficacy of simultaneous application of aqueous solution of beta-cyclodextrin (β -CD) and ultrasound method to extract polyphenolic compounds from pomegranate peel was compared with that of aqueous extraction. The response surface method (RSM) was used to optimize extraction conditions. Designed experiments were done based on the Box-Behnken design with three independent variables, including temperature (30, 50 and 70 °C), time (10, 25 and 40 min) and concentration of β -CD solution (0, 0.9 and 1.8 %). The optimum extracting temperature and time and β -CD concentration were 55.7°C, 15.38 min, 1.8% respectively. In the optimum condition, the following characteristics of extracted bioactive compounds were obtained: Non-flavonoid phenols 75.77 (mgGAE/gDW) and extraction efficiency 42.81%. Inclusion complex formation was confirmed by differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and SEM. As a result of this study, aqueous β -CD and UAE as a safe method can be replaced with other extraction methods to improve the extraction of compounds with high nutritional value.

Keywords: β -Cyclodextrine, ultrasound, pomegranate peel, bioactive compounds, Non-flavonoid phenols

*Corresponding Author E-Mail Address: s.pirs@urmia.ac.ir