



تأثیر بکارگیری پیش تیمار فراصوت و آنزیم پکتیناز بر بازده استخراج و خواص آنتی اکسیدانی عصاره

پلی فنلی ضایعات غوره (*Vitis vinifera*)

بهرام حسنی^۱، فخری شهیدی^۲، سید علی مرتضوی^۳، محبت محبی^۴، رضا فرهوش^۵
۱- دانشجوی دکتری، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- ۴، ۳، ۲- استاد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

امروزه استخراج و بکارگیری ترکیبات فعال زیستی از پسماندهای کشاورزی و غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیق حاضر اثر تیمار آنزیمی، فراصوت و اثر توام تیمار آنزیمی و امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات فنلی ضایعات غوره انجام شد به طوری که از ۲ آنزیم پکتیناز (پکتینکس اولتراکالر و پکتینکس یلدمش) در سطوح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم و فراصوت (زمان‌های ۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و (شدت صوت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد) استفاده شد. اثر تیمار آنزیمی، فراصوت و اثر توام تیمار آنزیمی و فراصوت بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده، بالاترین بازده استخراج متعلق به آنزیم یلدمش بود و با افزایش شدت صوت، بازده استخراج به طور معنی‌داری افزایش یافت. از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش بازده استخراج شد ($p \leq 0.01$). به طوری که بالاترین بازده استخراج در نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه مشاهده شد ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین فلاونوئید، فنل تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ABTS، FRAP، DPPH) متعلق به آنزیم یلدمش بود و با افزایش شدت صوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$). از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد ($p \leq 0.01$). بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه بود و به عنوان تیمار برتر معرفی شد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۳۱

کلمات کلیدی:

غوره،

پکتیناز،

فراصوت،

محتوای فنل کل،

ضایعات

DOI: 10.22034/FSCT.20.142. 196

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.142.13.3

* مسئول مکاتبات:

morteza1937@yahoo.com

fshahidi@um.ac.ir

۱- مقدمه

طبق گزارشات پسماندهای غذایی میوه‌ها و سبزیجات، بین ۲۰ تا ۴۰ درصد در تولیدات اولیه کشاورزی تخمین زده شده است که طی مراحل تولید و تا رسیدن به مصرف کننده نهایی ادامه می‌یابد [۱]. طیف گسترده‌ای از فرآورده‌های جانبی فرآوری میوه‌ها و سبزیجات به ویژه در صنعت تولید آب میوه شامل برگ، پوست، تفاله است که مقدار زیادی از آن‌ها بلا استفاده باقی می‌ماند [۲]. ترکیبات فعال زیستی استخراج شده از پسماندهای غذایی-کشاورزی می‌توانند به عنوان منابع ترکیبات آنتی‌اکسیدان استفاده شوند و یا در توسعه محصولات فراسودمند مورد استفاده قرار گیرند [۳]. تفاله انگور عمدتاً از پوست انگور، دانه‌ها، ساقه و تفاله باقی مانده تشکیل شده است [۴]. تقریباً ۹ میلیون تن از این ضایعات در سال در جهان تولید می‌شود که حدود ۲۰ درصد وزنی بر وزن کل انگور مورد استفاده در تولید آب میوه و شراب است [۵]. در مورد ترکیبات فنلی، میانگین لیگنین ۱۷-۲۴٪ وزنی بر وزن گزارش شده است [۶]. تانن-های تغلیظ شده (پروآنتوسیانیدین‌ها) دسته اصلی دیگری از پلی‌فنل‌های موجود در تفاله هستند، همراه با سایر ترکیبات فنلی کوچک که دارای اثرات سلامت‌بخشی بالا نظیر فعالیت‌های محافظت‌کننده قلبی، محافظت‌کننده عصبی، ضد التهابی، ضد سرطانی و ضد میکروبی هستند. در این میان، فراوان‌ترین اسیدهای فنلیک (کافئیک، گالیک، پروتوکاتچونیک، اسید ۴-هیدروکسی بنزوئیک و سیرینگیک)، هیدروکسی تیروزول و فلاونوئیدها، عمدتاً مشتقات کاتچین و اپی‌کاتچین و همچنین آنتوسیانین‌ها هستند [۴]. استخراج پلی‌فنل‌ها از پسماندهای غذایی/دارویی به کمک آنزیم (EAE) نیز گزارش شده است که بر اساس توانایی آنزیم‌هایی نظیر سلولاز، β -گلوکوزیداز، زایلاناز، بتا-گلوکوناز و پکتیناز در تخریب ساختار دیواره سلولی و پلیمریزه کردن پلی‌ساکاریدهای

دیواره سلولی گیاه استوار است که منجر به آزاد شدن ترکیبات متصل می‌شود. ویژگی آنزیم‌ها در افزایش فعالیت زیستی عصاره‌ها بواسطه هیدرولیز ترکیبات با وزن مولکولی بالا به وزن مولکولی پائین‌تر تعیین می‌شود. استفاده از آب به عنوان حلال در EAE به جای مواد شیمیایی آلی، EAE را به یک فناوری دوستدار محیط زیست در استخراج ترکیبات زیست فعال تبدیل می‌کند. کاربردهای EAE در استخراج ترکیبات پلی‌فنلی از ضایعات انگور، پوست سبز پسته و پوست انار گزارش شده است. پکتینکس مخلوطی از چندین نوع پکتیناز است که عمدتاً جهت تیماردهی خمیر میوه و سبزیجات و ماسراسیون بافت‌های گیاهی طراحی شده است. پکتینکس توسط یک سویه انتخاب شده از قارچ *Aspergillus niger* تولید می‌شود. در میان برخی از فرآورده‌های آنزیمی تجاری، آنزیم‌های پکتینکس یلدمش و پکتینکس اولتراکالر با فعالیت پکتیناز بالا شناخته می‌شوند. پکتینکس یلدمش آنزیمی است که هم در اولین له کردن و هم در عملیات له کردن تفاله استفاده می‌شود و به طور انتخابی پکتین را تجزیه می‌کند تا ویسکوزیته را کاهش دهد. طی له کردن اول، باعث افزایش قابل ملاحظه بازده در فراوری آب میوه‌ها می‌شود. در عملیات له کردن تفاله دوم، بالاترین بازده آب میوه را دارد. پکتینکس اولتراکالر جهت له کردن و آبرگیری بدون استفاده از گلیکوزیدازهای تخریب‌کننده رنگ مورد استفاده قرار می‌گیرد و در نتیجه رنگ شدیدتر و ثبات رنگ بهبود می‌یابد. همچنین باعث افزایش بازده آبمیوه و فیلتراسیون بهتر می‌شود [۷]. فن-آوری استخراج با امواج فراصوت بطور گسترده‌ای در استخراج روغن، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و فلاونوئیدها از گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان می‌دهد که این فن‌آوری بازده زیاد و انرژی مصرفی پایینی داشته و مانع از تخریب ترکیبات موثر می‌شود [۸]. سامانه‌هایی که با این امواج کار می‌کنند به دو صورت حمام و پروب هستند که در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی قابل استفاده می-

آنزیم‌ها در استخراج ترکیبات مذکور، در تحقیق حاضر تاثیر بکارگیری پیش تیمار فراصوت و آنزیم پکتیناز بر بازده استخراج و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پلی‌فنلی ضایعات غوره (*Vitis vinifera*) مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و تجهیزات

تفاله غوره (*Vitis vinifera*) از کارخانه‌های تولید آبغوره تهیه شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده جهت آنالیزهای شیمیایی از برند مرک آلمان بودند. دستگاه‌های مورد استفاده، HPLC (Zwick، آلمان)، آن تحت خلاء (Memmert، آلمان)، اسپکتروفتومتر (Frasvot Ultrasonic cleaner, baker، چین)، تیخیر کننده دوار تحت خلاء (EYELA، ژاپن)، pH متر (Hanna HI98127، چین) بود.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده‌سازی تفاله غوره

تفاله‌ها بلافاصله پس از فرایند آگیری، جمع‌آوری شد. این تفاله‌ها تا زمان خشک کردن در حالت انجماد نگه‌داری شدند. خشک کردن تفاله‌ها در دمای اتاق و در مدت زمان تقریبی ۴۸ ساعت انجام شد تا رطوبت آن‌ها به حدود ۱۰٪ برسد. سپس تفاله خرد شده و الک شدند تا ذرات دارای ابعاد بین ۰/۶ تا یک میلی‌متر انتخاب شوند [۱۶].

۲-۲-۲- استخراج عصاره پلی‌فنلی

۲-۲-۲-۱- استخراج با آنزیم

تفاله غوره تحت تاثیر سه سطح (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از دو نوع آنزیم پکتیناز (پکتینکس اولتراکالر و پکتینکس یلدمش، نووزیمز، دانمارک) قرار گرفت. لازم به ذکر است که با در نظر گرفتن فعالیت آنزیم‌ها غلظت مشخص آنها مورد استفاده قرار گرفت. اعلام شده آنزیم

باشند [۹]. امواج فراصوت باعث انتشار بیشتر حلال در مواد سلولی می‌شود و بنابراین انتقال جرم و اختلال در دیواره سلولی را بهبود می‌بخشد تا آزادسازی اجزای زیست فعال را تسهیل کند [۱۰]. امواج فراصوت از افزایش دما و تخریب حرارتی ترکیبات زیست فعال جلوگیری می‌کند. همچنین در کاهش زمان استخراج، استفاده از مقادیر پائین‌تر حلال، کاهش هزینه‌های فرآیند و بهره‌مندی از اتوماسیون سطح بالا نقش موثر دارد. فراصوت در استخراج پلی‌فنل‌ها از پسماندهای صنعت شراب سازی نظیر استخراج آنتوسیانین‌ها از تفاله انگور قرمز و شراب، ترانس رسوراترول از ضایعات انگور قرمز، و پلی‌فنل‌ها از تفاله انگور قرمز مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱]. فراصوت در بازیابی پلی‌فنل‌ها از ضایعات سیب، مرکبات، گوجه‌فرنگی و ضایعات پیاز، ضایعات زیتون، ضایعات پوست سیب زمینی، تفاله هویج (سیاه)، سبوس گندم و پوسته ماش گزارش شده است [۱۲، ۱۳]. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کائیتاسیون مربوط می‌شود که طی آن حباب‌های بسیار ریزی در توده مایع تشکیل شده و به سرعت تا یک اندازه بحرانی رشد می‌کنند و سپس منفجر می‌گردند. انفجار این حباب‌ها اغلب با آزاد شدن مقادیر بالای انرژی همراه است که به شکل تنش برشی به محیط اطراف اعمال می‌شود [۱۴]. انفجار حباب‌ها باعث ایجاد اغتشاشات شدید موضعی و تلاطم‌های گرداب گونه شده که از این طریق انتقال جرم را افزایش می‌دهد. شایان ذکر است که مطالعات انجام شده توسط محققان مختلف مشخص ساخته است که انفجار حباب‌ها در مجاورت ذرات جامد نامتقارن می‌باشد به طوری که موجب می‌شود جریانی از مایع با سرعت بسیار زیاد به سمت سطح ذرات کشیده شود. اصابت این میکروجت‌ها به سطح، منجر به سایش، شکستگی و تخریب آن می‌گردد [۱۵]. با توجه به مقادیر قابل ملاحظه محتوای فنل کل در پسماندهای کشاورزی نظیر ضایعات غوره و نقش موثر پیش‌تیمارهایی نظیر فراصوت و یا به کارگیری

واتمن (شماره ۱) صاف شد تا ذرات معلق آن حذف شود. آنگاه میزان ترکیبات فنلی بر اساس روش (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شد. میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسید گالیک به عنوان استاندارد، ترسیم گردید. محتوای فنل کل موجود در نمونه بر اساس اکی والان اسید گالیک گزارش شد [۱۹].

۲-۲-۳-۲ تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با روش‌های مختلف

مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

خاصیت آنتی رادیکالی عصاره استخراج شده بر اساس توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در عصاره‌های اتانولی یا میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲-۲ دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) در متانول مورد سنجش قرار گرفت [۲۰].

روش FRAP

این آزمون بر اساس توانایی احیا یون آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به یون آهن دو ظرفیتی انجام شد. آهن دو ظرفیتی حاصل در pH اسیدی و در حضور معرف TPTZ، تشکیل Fe-TPTZ داده که رنگ آبی داشته و شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ نانومتر و با اسپکتروفتومتر قابل اندازه‌گیری است. برای این کار غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نمونه برداشته به حجم نهایی ۲ ml محلول TPTZ که حاوی ۱۰ ml محلول FRAP در (40 mM HCl) کلرید آهن ۲۰ mM و بافر استات ۳۰۰ mM با pH = ۳/۶ بود، اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار داده شده و شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ nm در مقابل بلانک قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از سولفات آهن با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ میکرومولار استفاده و قدرت آنتی‌اکسیدانی بر اساس

پکتینکس اولتراکالر PECTU/ml10000 و فعالیت اعلام شده آنزیم پکتینکس یلدمش PEU/g7/3 است. برای اثر بخشی آنزیم‌ها، در دمای بهینه فعالیت آنزیم‌ها (۵۵ درجه سانتی‌گراد) در زمان‌های متفاوت ۴۰، ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری انجام شد. بعد از گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار می‌گیرند تا آنزیم پکتیناز غیر فعال شود. سپس عصاره تحت خلاء صاف شد و عصاره غوره داخل ظروف شیشه‌ای تیره بسته‌بندی، در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا برای آزمایش‌ها استفاده شوند. عصاره صاف شده ابتدا توسط تبخیر کننده دوار تحت خلاء، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و عصاره تغلیظ شده، کف پلیت‌های ۱۵ سانتی‌متری ریخته و در آن خلاء در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. عصاره خشک شده از کف پلیت‌ها تراشیده و درون شیشه‌های مک کاردی درب‌دار که توسط فویل آلومینیومی در برابر نفوذ نور محافظت شده‌اند، تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۷].

۲-۲-۲-۲ استخراج با کمک امواج فراصوت

نمونه‌های تفاله غوره تحت تاثیر امواج فراصوت فرایند صوت دهی با فرکانس ۲۵ کیلوهرتز در زمان‌های ۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه، و شدت صوت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد قرار گرفت [۱۸]. در مرحله بعد نمونه‌های تیمار شده به روش آنزیمی همزمان تحت تاثیر امواج فراصوت نیز قرار گرفت تا اثر تیمار آنزیمی، امواج فراصوت و اثر توام تیمار آنزیمی و امواج فراصوت روی محتوای ترکیبات فنلی استخراج شده بررسی شود.

۲-۲-۳-۲ آزمون‌های انجام شده بر روی عصاره

۲-۲-۳-۲-۱ تعیین بازده استخراج

بازده استخراج بر اساس محتوای فنل کل موجود در ۱۰۰ گرم تفاله غوره بود. به طوری که پس از حذف حلال از عصاره اتانولی، آن را با آب مخلوط کرده و توسط کاغذ

میزان معادل میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید [۲۴].

۲-۲-۵ شناسایی ترکیبات استخراج شده در نمونه بهینه

بررسی کمی و کیفی و شناسایی ترکیبات فنلی موجود در عصاره استخراج شده بهینه تفاله غوره با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. ستون (۵ μm و ۴/۶ mm * ۲۵۰ mm) ODS C₁₈، برای جداسازی تحلیلی و آشکارساز آرایه دیودی (DAD) در سیستم HPLC (Agilent 1260 infinity) استفاده شد. جهت تشخیص و کمی سازی ترکیبات فنلی غلظت‌های استاندارد ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر برای منحنی‌های کالبراسیون اسید گالیک، اسید وانیلیک، اسید کافتریک، کافئیک اسید، اسید p-کوماریک، اسید فرولیک، اسید سیناپیک، کورستین و اپیکاتچین استفاده شد. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر برای منحنی‌های کالبراسیون کاتچین، اپی‌گالوکاتچین و اپی‌گالوکاتچین گالات استفاده شد. عصاره‌ها با متانول رقیق شده و قبل از آنالیز HPLC از طریق فیلتر سرنگ PTFE ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شدند. سپس نمونه‌ها مستقیماً به سیستم HPLC تزریق شدند [۲۵].

۲-۲-۴ روش تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه شدند. تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. آزمون‌های آماری نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ برای تمامی مقایسه‌های داده‌ها در نظر گرفته شد.

مقیاس میکرو مول Fe^{+2} بیان شد. از ترکیب آنتی‌اکسیدانی کوئرستین^۱ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۱].

روش TEAC

برای تهیه رادیکال ۲و۲-آزینو بیس-۳-اتیل بنزو تیازولین ۶- سولفونیک اسید^۲ (ABTS)، ابتدا یک محلول آبی از به غلظت ۷ میلی‌مول تهیه شد. به این محلول ABTS، پتاسیم پرسولفات اضافه شده تا غلظت نهایی آن به ۲/۴۵ میلی‌مول در محلول برسد. محلول حاصل در شرایط دمای اتاق و تاریکی به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. در این مدت از مولکول ABTS رادیکال کاتیون ABTS تولید شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها را با پیت برداشته و با ۲ میلی‌لیتر از محلول ABTS^{+} درکوت مخلوط گردیده، سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر در زمان های ۲، ۴ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط کردن خوانده شد. نتایج بصورت عدد TEAC قدرت مهار رادیکال ABTS نمونه‌ها براساس استاندارد Trolox بیان شد [۲۲].

۲-۲-۳ اندازه گیری اسیدیته کل و pH

اسیدیته کل به روش تیتراسیون و اندازه گیری pH با استفاده از pH متر برای عصاره‌های استخراج شده انجام شد [۲۳].

۲-۲-۴ تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل

از روش رنگ‌سنجی کلرور آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصار (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آلومینیوم ملرید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از استت پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط ۳۰ دقیقه پس از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. از کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس

1
2-202-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

۳- نتایج و بحث

۳-۱ نتایج آزمون‌های عصاره پلی‌فنلی استخراج شده تحت فراصوت و آنزیم‌های پکتولیتیک

۳-۱-۱ بازده استخراج

نتایج تحقق حاضر نشان داد که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آن‌ها، بر روی بازده استخراج عصاره پلی‌فنلی معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر زمان استخراج (۶۹۲/۶۵۸) بر روی تغییرات بازده استخراج ترکیبات پلی‌فنلی نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.05$). بالاترین بازده استخراج متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه بود ($p \leq 0.01$). پس از آن نمونه‌های استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۶۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه و پس از آن نمونه استخراج شده توسط آنزیم اولتراکالر و تحت فراصوت در شدت صوت ۶۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه دارای بالاترین بازده استخراج بودند ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین‌ترین بازده استخراج بود ($p \leq 0.01$). در مقالات گزارش شده است که شدت فراصوت تأثیر مثبتی بر بازده پلی‌فنل‌ها دارد که به دلیل برخورد مولکول‌ها در هنگام افزایش قدرت فراصوت نسبت داده شده است که آزادسازی ترکیبات فنلی را تسهیل می‌کند. امواج فراصوت باعث ایجاد حباب‌های ریز هوا در داخل محیط مایع و سپس ترکیدن آن‌ها می‌شود که به این پدیده کاویتاسیون می‌گویند. ترکیدن غیرمقارن این حباب‌ها در نزدیکی ماده غذایی باعث انتقال جریان‌های سریع و فورانی از امواج صوتی به سطح آن شده و با ایجاد

انقباض و انبساط‌های پی در پی در آن و همچنین بر اساس تئوری‌های موجود در فرآیندهای استخراج، در اثر انفجار حبابچه‌ها در فرآیند صوت دهی در محلول آبی، تخریب دیواره سلولی و همچنین ایجاد کانال‌های باریک میکروسکوپی در بافت گیاهی صورت گرفته که در نهایت باعث خروج آسانتر آب از داخل محصول و به همراه آن، خروج مواد مؤثره گیاهی می‌شود [۲۶]. Balasubramaniam و همکاران (۲۰۱۹)، در بررسی اثر فاکتور زمان بر بازده استخراج ترکیبات پلی‌فنلی بیان نمودند که بازده استخراج در ۳۰ دقیقه به حداکثر رسید و بیشتر کاهش یافت و اذعان نمودند که استخراج طولانی مدت در دماهای بالا می‌تواند سطح انتشار، سرعت انتشار را کاهش داده و منجر به پلیمریزاسیون یا تخریب پلی‌فنل‌های حساس به حرارت شود و در نتیجه ممکن است بازده را کاهش دهد. از طرفی افزایش توان از ۲۵۰ به ۵۰۰ وات منجر به افزایش بازده شد [۲۷]. مشاهدات انجام شده توسط Chavan و Singhal (۲۰۱۳) بیانگر افزایش بازده پلی‌فنلی آرکانات با افزایش زمان فراصوت تا ۳۵ دقیقه بود که البته پس از آن کاهش بازده استخراج مشاهده شد [۲۸]. Teh و Brich (۲۰۱۴) استنباط کردند که استخراج با کمک صوت‌دهی به مدت ۲۰ دقیقه منجر به بازده بالایی از فنل‌ها و محتویات فلاونوئیدی از کیک‌های دانه کلزا می‌شود که پس از آن کاهش در محتوا نسبت به زمان وجود داشت [۲۹]. اما در تحقیق حاضر با افزایش مدت زمان صوت دهی از ۱۰ تا ۴۰ دقیقه، بازده استخراج به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج تحقیق حاضر مطابق با گزارش‌های Lingzhu و همکاران (۲۰۱۵) بود که طی استخراج پلی‌فنل‌های کاکل ذرت، بیان نمودند با افزایش

۲۵ به ۱۲۵ وات، بازده ۱۶/۶٪ افزایش یافت [۳۶]. علاوه بر افزایش استخراج پلی فنل‌ها، مشاهده شد که رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^*) که در شدت صوت بالا تولید می‌شوند به ویژه در حضور محتوای آب بالا می‌توانند با فنل‌ها واکنش دهند و منجر به تجزیه آن‌ها گردند بنابراین باید احتیاط کرد تا از تخریب پلی فنل‌ها بواسطه بکارگیری شدت صوت بالا جلوگیری شود [۳۷، ۳۸].

توان فراصوت، بازده استخراج افزایش یافت که ثابت می‌کند که قدرت و فرکانس فراصوت نقش پویایی در استخراج پلی فنل‌ها ایفا می‌کند [۳۰]. Martino و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی تاثیر مایکروویو، فراصوت و سوکسله در استخراج کومارین و ترکیبات مشابه از گیاه شبدر بیان نمودند که طی استخراج با فراصوت، بهترین حالت استخراج در نتیجه زمان ۶۰ دقیقه و استفاده از حلال اتانول حاصل شد که در مقایسه با روش سوکسله، بازدهی استخراج (کمی و کیفی) بیشتر داشت [۳۱]. Jimenez و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی تاثیر استخراج روغن از دانه‌های آسیاب شده زیتون توسط امواج فراصوت با قدرت بالا، بیان نمودند که در حضور این امواج، دیواره سلول‌ها و بافت‌های گیاهی تخریب شده و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (توکوفرول‌ها، پلی فنل‌ها) و رنگدانه‌های (کلروفیل و کاروتنوئید) بیشتری به داخل روغن راه یافتند که منجر به افزایش ارزش تغذیه‌ای روغن مورد نظر شدند [۳۲]. طبق یافته‌های محققان عملکرد دوگانه هیدرولیز توسط آنزیم‌ها به همراه فراصوت، منجر به استخراج عصاره‌هایی با محتوای بیشتر فنل کل بیشتر نسبت به پیش تیماردهی با آنزیم ایجاد می‌کند که به آزادسازی بیشتر فنل‌های متصل و غیر متصل نسبت داده شده است [۳۳]. طبق یافته‌های محققان، افزایش اثر کاویتاسیون بواسطه افزایش شدت فراصوت در عصاره پوست میوه نفلیلوم لاپاسنوم^۱ و همچنین در دانه‌های انگور زمانی که شدت صوت از ۵۰ W به ۱۵۰ W افزایش یافت، شد که نهایتاً منجر به افزایش محتوای فنل کل گشت [۳۴].

[۳۵]. شدت‌های مختلف اولتراسوند در استخراج پلی فنل‌ها از برگ‌های له شده چای استفاده شد و با افزایش توان از

1-Nephelium lappaceum

Table 1. Analysis of variance of the effect of treatments on Extraction efficiency of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	111.006	55.503	2.637	0.000 **
UltraSound intensity	2	17.432	8.716	414.064	0.000 **
extraction time	2	29.160	14.580	692.658	0.000 **
Enzyme x sound intensity	4	0.406	0.102	4.826	0.002 **
Enzyme × time	4	0.838	0.210	9.955	0.000 **
UltraSound intensity x time	4	0.642	0.161	7.628	0.000 **
Enzyme × sound intensity × time	8	0.734	0.092	4.358	0.000 **
error	54	1.137	0.021		
Total	81	8170.412			

**Significance at 1% probability level, *Significance at 5% probability level

مدت ۲۵ دقیقه بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای بالاترین میزان pH بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، پائین‌ترین pH متعلق به آنزیم یلدمش بود ($p \leq 0.01$) و با افزایش شدت صوت، pH به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0.01$). از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به کاهش معنی‌دار pH شد ($p \leq 0.01$). که شاید بتوان علت این امر را به بازده استخراج و محتوای فنل تام عصاره‌های مورد نظر با گذشت زمان نسبت داد که منجر به کاهش pH نمونه‌ها شده است.

۳-۲-۳ ارزیابی نتایج pH

نتایج تحقق حاضر نشان داد که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آن‌ها، بر pH معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر شدت صوت (۱۴۶/۵۱۴) بر روی تغییرات pH نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.01$) و اثر متقابل آنزیم × زمان (۲/۹۵۹) پائین‌ترین اثر را بر میزان pH داشت ($p \leq 0.05$). پائین‌ترین میزان pH متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه و نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به

Table 2. Analysis of variance of the effect of treatments on pH of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	0.582	0.291	6.366 E3	0.000 **
UltraSound intensity	2	0.013	0.007	146.514	0.000 **
extraction time	2	0.145	0.073	1.590 E3	0.000 **
Enzyme x sound intensity	4	0.002	0.001	12.324	0.000 **
Enzyme × time	4	0.001	0.000	2.959	0.028 **
UltraSound intensity x time	4	0.009	0.002	49.662	0.000 **
Enzyme × sound intensity × time	8	0.002	0.000	4.986	0.000 **
Error	54	0.002	4.568 E-5		
Total	81	1504.903			

**Significance at 1% probability level, *Significance at 5% probability level

۳-۳-۳ ارزیابی نتایج اسیدیته

دقیقه و نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین‌ترین میزان اسیدیته بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین اسیدیته متعلق به آنزیم یلدمش بود ($p \leq 0.01$) و با افزایش شدت صوت، اسیدیته به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$). از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش معنی‌دار اسیدیته شد ($p \leq 0.01$).

نتایج تحقق حاضر نشان داد که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج و اثر متقابل آنزیم \times شدت صوت بر اسیدیته معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، نوع آنزیم (۵۰۵/۳۶۸) بر روی تغییرات اسیدیته نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.01$) و اثرات متقابل آنزیم \times زمان، شدت صوت \times زمان، آنزیم \times شدت صوت \times زمان بر میزان اسیدیته معنی‌دار نبود ($p \geq 0.05$). بالاترین میزان اسیدیته متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰

Table 3. Comparison of Extraction efficiency, pH and acidity mean of sour grape waste extracts

Enzyme type	UltraSound intensity (%)	Time (min)	Extraction efficiency (%)	pH	Acidity (%)
<i>Without Enzyme</i>	30	10	7.26 \pm 0.08 ^g	4.51 \pm 0.01 ^a	0.426 \pm 0.008 ^k
		25	7.57 \pm 0.32 ^{pq}	4.44 \pm 0.01 ^b	0.431 \pm 0.008 ^{jk}
		40	8.05 \pm 0.12 ^o	4.39 \pm 0.01 ^c	0.444 \pm 0.007 ^{ij}
	60	10	7.89 \pm 0.06 ^{op}	4.49 \pm 0.01 ^a	0.426 \pm 0.008 ^k
		25	8.47 \pm 0.07 ⁿ	4.39 \pm 0.01 ^c	0.426 \pm 0.008 ^k
		40	9.24 \pm 0.08 ^k	4.38 \pm 0.00 ^c	0.439 \pm 0.008 ^{jk}
	90	10	8.03 \pm 0.10 ^o	4.44 \pm 0.01 ^b	0.426 \pm 0.008 ^k
		25	8.65 \pm 0.01 ^m	4.38 \pm 0.01 ^c	0.431 \pm 0.007 ^{jk}
		40	9.26 \pm 0.12 ^j	4.38 \pm 0.00 ^c	0.439 \pm 0.008 ^{jk}
<i>Pectinex Ultra ColorEnzyme</i>	30	10	9.04 \pm 0.02 ^l	4.36 \pm 0.00 ^d	0.457 \pm 0.007 ^{hi}
		25	9.95 \pm 0.03 ⁱ	4.29 \pm 0.00 ^f	0.465 \pm 0.008 ^{gh}
		40	10.52 \pm 0.34 ^{fg}	4.24 \pm 0.01 ^{hi}	0.495 \pm 0.007 ^{cd}
	60	10	9.68 \pm 0.08 ^j	4.36 \pm 0.00 ^d	0.474 \pm 0.013 ^{defgh}
		25	10.69 \pm 0.05 ^f	4.27 \pm 0.01 ^g	0.478 \pm 0.007 ^{efg}
		40	11.86 \pm 0.02 ^b	4.22 \pm 0.01 ⁱ	0.490 \pm 0.008 ^{de}
	90	10	10.23 \pm 0.09 ^{gh}	4.33 \pm 0.00 ^e	0.482 \pm 0.007 ^{def}
		25	11.19 \pm 0.18 ^{de}	4.25 \pm 0.01 ^{gh}	0.495 \pm 0.007 ^{cd}
		40	11.69 \pm 0.17 ^{bc}	4.25 \pm 0.01 ^{gh}	0.507 \pm 0.008 ^{bc}
<i>Pectinex YildMASH.</i>	30	10	9.69 \pm 0.17 ^j	4.30 \pm 0.01 ^f	0.469 \pm 0.008 ^{fgh}
		25	10.66 \pm 0.19 ^f	4.22 \pm 0.01 ⁱ	0.488 \pm 0.010 ^{de}
		40	11.08 \pm 0.10 ^{de}	4.17 \pm 0.01 ^k	0.490 \pm 0.008 ^{de}
	60	10	10.07 \pm 0.09 ^{hi}	4.29 \pm 0.00 ^f	0.495 \pm 0.007 ^{cd}
		25	11.24 \pm 0.06 ^d	4.19 \pm 0.00 ^j	0.497 \pm 0.010 ^{cd}
		40	11.76 \pm 0.08 ^b	4.19 \pm 0.00 ^j	0.516 \pm 0.015 ^{abc}
	90	10	10.81 \pm 0.30 ^{ef}	4.24 \pm 0.01 ^{hi}	0.508 \pm 0.007 ^{bc}
		25	11.48 \pm 0.10 ^c	4.19 \pm 0.01 ^j	0.521 \pm 0.007 ^{ab}
		40	12.08 \pm 0.14 ^a	4.17 \pm 0.01 ^k	0.529 \pm 0.008 ^b

*Results are reported as mean \pm standard deviation. The presence of at least one similar Latin letter in each column indicates that there is no significant difference between the values at the 95% confidence level.

Table 4. Analysis of variance of the effect of treatments on acidity of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	0.070	0.035	505.368	0.000 **
UltraSound intensity	2	0.005	0.002	36.265	0.000 **
extraction time	2	0.006	0.003	43.699	0.000 **
Enzyme x sound intensity	4	0.003	0.001	12.270	0.000 **
Enzyme × time	4	0.000	0.000	1.652	0.175 ^{ns}
UltraSound intensity x time	4	0.000	6.969E-5	1.013	0.409 ^{ns}
Enzyme × sound intensity × time	8	0.000	6.244E-5	0.907	0.517 ^{ns}
error	54	0.004	6.881E-5		
Total	81	18.140			

**Significance at 1% probability level, ns: Not significance

متعلق به آنزیم یلدمش بود و با افزایش شدت صوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$). از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) شد ($p \leq 0.01$). که علت این امر را می‌توان به میزان ترکیبات فنلی آن نسبت داد. پلی‌فنل‌ها به دلیل توانایی انجام یک سری واکنش‌های اکسیداسیون و احیا و به دلیل اثرات رزونانس محلی در حلقه‌های فنیل شناخته شده‌اند. پلی‌فنل‌ها به دلیل ساختارهای شیمیایی متنوع، از ساده تا پیچیده، آنتی‌اکسیدان‌های کارآمدتری در نظر گرفته می‌شوند [۳۹]. مطالعات متعددی در زمینه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌های گیاهی استخراج شده با تیماردهی فراصوت انجام شده است [۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳]. ارزش سنجش TEAC عصاره گل *Limonium sinuatum* به دست آمده با استفاده از فراصوت بالاتر از روش خیساندن و سوکسله بود [۴۴]. مطالعات دیگر همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از عصاره‌های استخراج شده با فراصوت از منابع مختلف گیاهی را در مقایسه با روش‌های مرسوم نشان داد. با توجه به گزارشات Teh و Birch (۲۰۱۴)، فنل‌ها و فلاونوئیدهای استخراج شده با کمک امواج فراصوت از یک‌های بدون چربی کتان و دانه‌های کلزا به میزان دو

۳-۳-۴ ارزیابی نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مختلف

۳-۳-۴-۱ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

نتایج تحقق حاضر نشان داد که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آن‌ها، بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر متقابل آنزیم × زمان (۷۹/۲۸۲) بر روی تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.01$). بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه و نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH)

برابر روش‌های استخراج معمولی دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بالاتری بودند، این نتایج با ترجیح تیماردهی با فراصوت در استخراج پلی‌فنل‌ها از گیاهان در مقایسه با روش‌های سنتی مطابقت دارد [۲۹].

Table 5. Analysis of variance of the effect of treatments on antioxidant capacity (DPPH) of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	1466.207	733.104	3.038 E3	0.000 **
UltraSound intensity	2	619.446	309.723	1.284 E3	0.000 **
Extraction time	2	1683.741	841.871	3.489 E3	0.000 **
Enzyme × ultrasound intensity	4	61.950	15.488	64.181	0.000 **
Enzyme × time	4	76.525	19.131	79.282	0.000 **
UltraSound intensity × time	4	37.346	9.336	38.691	0.000 **
Enzyme × ultrasound intensity × time	8	39.955	4.994	20.697	0.000 **
Error	54	13.031	0.241		
Total	81	93447.047			

**Significance at 1% probability level

صوت ۹۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) متعلق به آنزیم یلدمش بود ($p \leq 0.01$) و با افزایش شدت صوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$) از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) شد ($p \leq 0.01$).

۳-۳-۴-۲ میزان احیاءکنندگی آهن (روش FRAP)

نتایج تحقق حاضر نشان داد که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آن‌ها، بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر متقابل آنزیم × شدت صوت × زمان (۱۱۴/۶۷۶) بر روی تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.01$). بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میزان احیاءکنندگی آهن، روش FRAP) متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه و نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت

Table 6. Analysis of variance of the effect of treatments on antioxidant capacity (FRAP) of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	0.001	0.000	1.723 E-4	0.000 **
UltraSound intensity	2	0.000	0.000	6.582 E-3	0.000 **
Extraction time	2	0.001	0.001	2.451 E-4	0.000 **
Enzyme × ultrasound intensity	4	1.720 E-5	4.301 E-6	175.057	0.000 **
Enzyme × time	4	7.867 E-5	1.967 E-5	800.553	0.000 **
UltraSound intensity × time	4	6.858 E-6	1.715 E-6	69.789	0.000 **
Enzyme × ultrasound intensity × time	8	2.254 E-5	2.817 E-6	114.676	0.000 **
Error	54	1.327	2.457 E-8		
Total	81	0.086			

**Significance at 1% probability level

معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) شد ($p \leq 0.01$) و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تأثیر شرایط استخراج به کمک فراصوت بر کیفیت عصاره‌های به‌دست‌آمده از گیاه مزمرینتموم^۱ بیان نمودند که برای دو حلال مورد استفاده، مدت زمان استخراج بیشتر محتوای پلی‌فنل بالاتری را به همراه داشت به طوری که مدت زمان بیشتر فراصوت (۱۰ دقیقه)، عصاره‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر را به همراه داشت و به طور کلی بیان نمودند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی *M. edule* به شدت تحت تأثیر ماهیت حلال استخراج‌کننده و مدت زمان استخراج فراصوت قرار دارد [۴۵].

۳-۳-۴-۳ روش جذب رادیکال ABTS

نتایج تحقق‌حاضر نشان داد که تأثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آن‌ها، بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر نوع آنزیم (۹۳۷/۰۱۹) بر روی تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.05$). بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه و نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) متعلق به آنزیم یلدمش بود ($p \leq 0.01$) و با افزایش شدت صوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (روش جذب رادیکال ABTS) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$) از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش

1- Mesembryanthemum edule

Table 7. Analysis of variance of the effect of treatments on antioxidant capacity (ABTS) of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	1708.859	854.430	937.019	0.000 **
UltraSound intensity	2	1527.021	736.511	837.312	0.000 **
Extraction time	2	3567.585	1783.793	1.956 E3	0.000 **
Enzyme × ultrasound intensity	4	134.001	33.500	36.738	0.000 **
Enzyme × time	4	348.571	87.143	95.566	0.000 **
UltraSound intensity × time	4	315.708	78.927	86.556	0.000 **
Enzyme × ultrasound intensity × time	8	218.851	27.356	30.001	0.000 **
Error	54	49.240	0.912		
Total	81	120313.810			

**Significance at 1% probability level

Table 8. Comparison of antioxidant capacity mean of sour grape waste extracts

Enzyme type	UltraSound intensity (%)	Time (min)	DPPH (mg/mL)	FRAP (mg/g)	ABTS (mg/mL)
<i>Without Enzyme</i>	30	10	53.27±0.01 ^a	0.0184±0.0002 ^p	69.77±1.59 ^a
		25	41.14±0.35 ^c	0.0284±0.0001 ^m	44.06±1.68 ^c
		40	36.94±0.49 ^d	0.0310±0.0001 ^j	37.58±1.22 ^{efg}
	60	10	44.24±1.45 ^b	0.0208±0.0001 ^o	54.84±1.90 ^b
		25	36.29 ±0.27 ^{de}	0.0300±0.0002 ^k	38.64±0.47 ^{de}
		40	32.34 ±0.58 ^{gh}	0.0333±0.0002 ^{fg}	33.99±0.38 ^h
<i>Pectinex Ultra ColorEnzyme</i>	90	10	40.74±0.60 ^c	0.0239±0.0001 ⁿ	43.00±1.59 ^c
		25	33.25±0.46 ^g	0.0316±0.0001 ^h	36.05±0.42 ^g
		40	30.11±0.33 ^j	0.0352±0.0001 ^d	31.04±0.31 ^j
	30	10	41.38±1.07 ^c	0.0242±0.0002 ⁿ	52.88±2.51 ^b
		25	34.44±0.41 ^f	0.0313±0.0001 ⁱ	37.79±0.94 ^{ef}
		40	28.74±0.28 ^k	0.0343±0.0001 ^e	33.39±0.38 ^h
<i>Pectinex YildMASH.</i>	60	10	40.86±0.78 ^c	0.0283±0.0002 ^m	44.25±1.13 ^c
		25	32.30±0.32 ^h	0.0329±0.0003 ^g	35.95±0.75 ^g
		40	27.16±0.13 ^l	0.0368±0.0002 ^c	30.99±0.32 ^j
	90	10	36.08±0.46 ^{de}	0.0299±0.0001 ^k	39.51±0.53 ^d
		25	26.64±0.12 ^m	0.0371±0.0001 ^c	27.09±0.25 ^l
		40	26.40±0.07 ^m	0.0371±0.0001 ^c	26.81±0.24 ^l
30	10	35.98±0.26 ^e	0.0293±0.0002 ^l	43.25±0.65 ^c	
	25	31.53±0.20 ⁱ	0.0332±0.0001 ^g	31.68±0.35 ^{ij}	
	40	27.18±0.14 ^l	0.0355±0.0003 ^d	29.78±0.31 ^k	
	60	10	32.11±0.36 ^h	0.0336±0.0002 ^f	36.56±0.46 ^{fg}
		25	26.20±0.50 ^m	0.0390±0.0002 ^b	33.38±0.39 ^h
		40	25.43±0.25 ⁿ	0.0394±0.0002 ^b	32.29±0.36 ⁱ
90	10	30.21±0.18 ^j	0.0332±0.0001 ^g	34.06±0.40 ^h	
	25	23.25±0.11 ^o	0.0402±0.0003 ^a	23.79±0.21 ^m	
		40	23.05±0.10 ^o	0.0404±0.0001 ^a	23.57±0.19 ^m

*Results are reported as mean ± standard deviation. The presence of at least one similar Latin letter in each column indicates that there is no significant difference between the values at the 95% confidence level.

۳-۳-۴ ارزیابی نتایج فلاونوئید کل

نتایج تحقق حاضر نشان داد که که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آنها، بر روی فلاونوئید کل بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر متقابل آنزیم × زمان (۴۷/۰۲۲) بر روی تغییرات فلاونوئید کل) نسبت به سایر فاکتورها معنی دارتر بود ($p \leq 0.01$). بالاترین میزان فلاونوئید کل متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه بود و پس از آن نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه دارای بالاترین میزان فلاونوئید کل بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین ترین فلاونوئید کل بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین فلاونوئید کل متعلق به آنزیم یلدمش بود ($p \leq 0.01$) و با افزایش شدت صوت، فلاونوئید کل به طور معنی داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$) از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش معنی دار فلاونوئید کل شد ($p \leq 0.01$). فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات پلی فنلی هستند که در گیاهان به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شوند. فلاونوئیدها به طور گسترده در میوه‌ها، سبزیجات و سایر محصولات غذایی یافت می‌شوند. آنها اثرات بیوشیمیایی مطلوبی بر بیماری‌های متعدد (مانند بیماری های قلبی

عروقی، تصلب شرایین) و همچنین سایر فعالیت‌های زیستی (مانند ضد التهاب، ضد پیری) دارند [۴۶، ۴۷]. فعالیت بیولوژیکی اصلی فلاونوئیدها که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدی می‌تواند از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد از طریق مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مهار اکسیدازها (مانند گزانتین اکسیداز [XO]، سیکلواکسیژناز [COX]، لپوکسیژنازیت [PI3Kinophos]) جلوگیری کند و منجر به کاهش رادیکال‌های α -توکوفرل شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئید می‌تواند سطوح اسید اوریک، فعالیت کیلیت فلزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با وزن مولکولی کم را برای کاهش استرس اکسیداتیو افزایش دهد [۴۸]. Wang و همکاران (۲۰۲۳) در بررسی تاثیر فراصوت همراه با تیمار اسید γ -آمینو بوتیریک GABA اگزوزن بر متابولیت‌های پلی فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماش طی جوانه زنی، دانه‌های ماش با ترکیبی از فراصوت و GABA بیان نمودند که تیمارهای ترکیبی به طور قابل توجهی محتوای پلی فنل ها و فلاونوئیدهای آزاد جوانه های ماش را بسته به مدت زمان جوانه زدن افزایش دادند. علاوه بر این، یک همبستگی مثبت بین محتوای پلی فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی *in vitro* جوانه ماش یافت شد [۴۹].

Table 9. Analysis of variance of the effect of treatments on antioxidant capacity (ABTS) of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	1708.859	854.430	937.019	0.000**
UltraSound intensity	2	1527.021	736.511	837.312	0.000**
Extraction time	2	3567.585	1783.793	1.956 E3	0.000**
Enzyme × ultrasound intensity	4	134.001	33.500	36.738	0.000**
Enzyme × time	4	348.571	87.143	95.566	0.000**
UltraSound intensity × time	4	315.708	78.927	86.556	0.000**
Enzyme × ultrasound intensity × time	8	218.851	27.356	30.001	0.000**
Error	54	49.240	0.912		
Total	81	120313.810			

**Significance at 1% probability level

ترکیبات فنلی شده است [۵۱، ۵۰]. از دلایل استخراج پائین ترکیبات فنلی از انگور به شراب، حتی در هنگام بکارگیری برخی آنزیم‌ها، برهمکنش بین ترکیبات فنلی استخراج شده و دیواره‌های سلولی پوست و پالپ معلق مطرح شده است. اجزای دیواره سلولی تمایل بالایی به ترکیبات فنلی نشان می‌دهند و آنها را در ساختار خود جذب می‌کنند [۵۲، ۵۳، ۵۴]. پلی‌ساکاریدهای ساختاری که دارای بالاترین میل ترکیبی با ترکیبات فنلی هستند عبارتند از پکتین، همی سلولز و تا حدی سلولز [۵۵]. بنابراین، با خرد کردن انگور، ترکیبات فنلی استخراج می‌شوند، اما مقدار زیادی از مواد دیواره سلولی معلق نیز تولید می‌شود. مطالعات Osete-Alcaraz و همکاران (۲۰۲۰) و همکاران، (۲۰۱۰) نشان داد که ترکیبات فنلی به مواد سلولی معلق متصل می‌شوند. هنگامی که این اتصال رخ داد، این فعل و انفعالات ممکن است غلظت فنلی را شراب نهایی کاهش دهند [۵۶، ۵۷]. Osete-Alcaraz و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که وقتی دیواره سلولی پوست انگور خالص شده با آنزیم‌های پکتولیتیک خالص یا تجاری مبتنی بر پکتولیتیک تماس پیدا می‌کند، درجه قابل توجهی از دپکتینیزاسیون دیواره‌های سلولی، دیواره‌های سلولی را برای انتشار ترکیبات فنلی باز می‌کند [۵۸]. نتایج مشابهی در نمونه‌های

۳-۳-۴-۵ ارزیابی نتایج تعیین مقدار فنل کل

نتایج تحقق حاضر نشان داد که تاثیر نوع آنزیم، شدت صوت، زمان استخراج، اثرات متقابل آنها، بر روی فنل کل بود ($p \leq 0.01$). با توجه به فاکتور F، اثر زمان استخراج (۹۵۱/۰۱۶) بر روی تغییرات فنل کل نسبت به سایر فاکتورها معنی‌دارتر بود ($p \leq 0.01$). بالاترین میزان فنل کل متعلق به نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقیقه بود و پس از آن نمونه استخراج شده توسط آنزیم یلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه دارای بالاترین میزان فنل کل بود ($p \leq 0.01$). نمونه فاقد آنزیم و تحت فراصوت در شدت صوت ۳۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه دارای پائین‌ترین فنل کل بود ($p \leq 0.01$). طبق نتایج به دست آمده، بالاترین فنل کل متعلق به آنزیم یلدمش بود ($p \leq 0.01$) و با افزایش شدت صوت، فنل کل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.01$) از طرفی افزایش زمان استخراج، منجر به افزایش معنی‌دار فنل کل شد ($p \leq 0.01$). نتایج تحقیقات مختلفی نشان داده است که آنزیم‌های مختلف جهت بکارگیری در ماتریس‌های مختلف فنلی مناسب هستند و بکارگیری این آنزیم‌ها تنها به بهبود

با افزايش زمان صوت دهى از ۱۰ به ۱۲۰ دقيقه افزايش يافت. افزايش مقدار تركيبات فنلى استخراج شده با افزايش زمان فراصوت به تأثير امواج فراصوت بر شكستگى ديواره سلولى نمونه و در نتيجه افزايش سطح مشترک بين حلال و ديواره سلولى نسبت داده شد [۶۲]. علاوه بر اين، با افزايش زمان فراصوت، برهمکنش تركيبات فنلى با تركيبات پروتئين و پلى ساكاريد تضعيف شد. اين پديده منجر به تحويل بيشر تركيبات فنلى از نمونه گياه به حلال شد [۶۳]. با افزايش غلظت پكتيناز، مقدار تركيبات فنلى کاهش يافت. احتمالاً استفاده از غلظت‌هاى بالاي آنزيم‌هاى پكتيناز بر استخراج كل تركيبات فنلى عصاره‌ها تأثير منفى مى‌گذارد و تركيبات فنلى نهايى را از بين مى‌برد يا کاهش مى‌دهد [۶۴]. Khan و همكاران (۲۰۱۰) در بررسى استخراج تركيبات پلى فنلى پوست پرتقال با استفاده از فرآيند فراصوت بيان نمودند كه با افزايش زمان استخراج از ۱۰ به ۶۰ دقيقه، TPC به تدريج افزايش يافت [۶۵]. طبق گزارشات محققان فراصوت نه تنها منجر به افزايش بازده استخراج پلى فنل‌ها مى‌شود، بلكه باعث حفظ و افزايش فعاليت بيولوژيكي عصاره‌هاى پلى فنلى در مقايسه با روش‌هاى خيساندن سنتى و استخراج توسط سوکسله مى‌شود [۶۶].

انگور توسط Zietsman و همكاران (۲۰۱۵) به دست آمد كه منجر به تغييرات در پوست دانه‌هاى انگور در طى خيساندن و تخمير در حضور آنزيم‌ها رخ داد و محققان مشاهده كردند كه در حضور آنزيم‌ها، دپكتينيزاسيون ديواره‌هاى سلولى افزايش يافته و از هم باز مى‌شوند [۵۹]. Lu و همكاران (۲۰۱۷) دريافتند كه آنزيم‌هاى مخلوط/كمپلكس استخراج فنلىك از برگ‌هاى گواوا را نسبت به آنزيم تك سلولاز بهبود بخشیده است [۶۰]. همچنين مشتاق و همكاران، (۲۰۱۵) بيان نمودند كه استخراج فوق بحراني به كمك آنزيم (سلولاز، پكتيناز و پروتئاز) منجر به افزايش دو برابري پلى فنل‌هاى استخراج شده از پوست انار شد [۶۱]. Balasubramaniam و همكاران (۲۰۱۹)، بيان نمودند كه محتوای پلى فنل كل به طور چشمگيرى با افزايش غلظت آنزيم تا ۱۵۰۰ U افزايش يافت و پس از آن سطوح فنلى کاهش يافت و علت اين امر به محدود شدن سوبسترا در غلظت‌هاى بالاتر آنزيم‌ها نسبت داده شد. هدف از پيش تيمار دهى با آنزيم، برهم زدن ساختار ديواره سلولى گياه با تضعيف/تجزيه شبكه سلولزى- فنلى است تا امكان آزادسازى و بازيايى مواد زيست فعال فنلى فراهم شود [۲۷]. Shahram و همكاران (۲۰۱۸)، در بررسى اثر غلظت پكتيناز، زمان صوت دهى و pH بر استخراج تركيبات فنلى از ضايعات فرآورى پرتقال بيان نمودند كه در غلظت ۰ درصد پكتيناز، TPC عصاره‌ها

Table 10. Analysis of variance of the effect of treatments on antioxidant capacity (ABTS) of sour grape waste extracts

Source of changes	DF	sum of the squares	mean of the squares	F	Sign
Enzyme type	2	1708.859	854.430	937.019	0.000**
UltraSound intensity	2	1527.021	736.511	837.312	0.000**
Extraction time	2	3567.585	1783.793	1.956 E3	0.000**
Enzyme × ultrasound intensity	4	134.001	33.500	36.738	0.000**
Enzyme × time	4	348.571	87.143	95.566	0.000**
UltraSound intensity × time	4	315.708	78.927	86.556	0.000**
Enzyme × ultrasound intensity × time	8	218.851	27.356	30.001	0.000**
Error	54	49.240	0.912		

Total 81 120313.810

**Significance at 1% probability leve

Table 11. Comparison of total phenol&flavonoid mean of sour grape waste extracts

Enzyme type	UltraSound intensity (%)	Time (min)	Total flavonoid (mg/mL)	Total phenol (mg/mL)	
<i>Without Enzyme</i>	30	10	2.44±0.02 ^u	5.11±0.02 ^u	
		25	2.55±0.02 ^t	5.23±0.03 ^t	
		40	2.70±0.02 ^r	5.44±0.03 ^r	
	60	10	2.66±0.01 ^s	5.32±0.02 ^s	
		25	2.75±0.01 ^q	5.51±0.03 ^q	
		40	2.88±0.02 ^p	5.73±0.03 ^o	
	90	10	2.86±0.02 ^p	5.60±0.04 ^p	
		25	3.00±0.02 ^o	5.97±0.02 ⁿ	
		40	3.12±0.04 ⁿ	6.18±0.04 ^m	
<i>Pectinex Ultra Color Enzyme</i>	30	10	3.77±0.03 ^m	7.83±0.02 ^l	
		25	3.96±0.01 ^l	8.09±0.04 ^k	
		40	4.20±0.01 ^j	8.38±0.03 ^j	
	60	10	3.92±0.03 ^l	8.14±0.02 ^k	
		25	4.17±0.04 ^{jk}	8.35±0.03 ^j	
		40	4.25±0.01 ⁱ	8.64±0.18 ^{hi}	
	90	10	4.37±0.04 ^h	8.56±0.06 ⁱ	
		25	4.50±0.02 ^g	8.98±0.05 ^g	
		40	4.54±0.02 ^{fg}	9.10±0.05 ^f	
	<i>Pectinex YildMASH.</i>	30	10	4.16±0.01 ^k	8.30±0.02 ^j
			25	4.35±0.02 ^h	8.63±0.02 ⁱ
			40	4.60±0.04 ^{ef}	9.12±0.03 ^f
60		10	4.62±0.03 ^e	8.83±0.03 ^h	
		25	4.83±0.01 ^c	9.32±0.06 ^d	
		40	4.83±0.06 ^c	9.50±0.04 ^c	
90		10	4.72±0.02 ^d	9.21±0.04 ^e	
		25	5.17±0.02 ^b	9.88±0.05 ^b	
		40	5.21±0.01 ^a	9.99±0.04 ^a	

*Results are reported as mean ± standard deviation. The presence of at least one similar Latin letter in each column indicates that there is no significant difference between the values at the 95% confidence level.

اسید^۱(۴۶/۶۵)٪، کاتچین^۳ (۴/۸۵)٪، اپی گالوکاتچین^۴ (۱/۶/۳۴)٪، اسید وانیلیک^۵ (۲/۴۷)٪، کافئیک^۶ (۱/۰۸)٪، اپی گالوکاتچین گالات^۷ (۱/۲۷)٪، اپی کاتچین^۸ (۱/۷۹)٪، اسید P-کوماریک^۹ (۰/۱۵)٪، اسید فرولیک^۱ (۰/۲۷)٪.

- 2- Caftaric acid
- 3- Catechin
- 4- Epigallocatechin
- 5- Vanillic acid
- 6- Caffeic acid
- 7- Epigallocatechin gallate
- 8- Epicatechin
- 9- p-Cumaric acid

۳-۳-۴-۶ نتایج آنالیز ترکیبات فنلی عصاره ضایعات

HPLC غوره توسط دستگاه

عصاره‌های استخراج شده جهت شناسایی ترکیبات فنلی به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شده و مقدار و نوع ترکیبات فنلی مشخص آن شد. ترکیبات فنلی عصاره‌ها همراه با درصد فراوانی هر جزء در جدول ۱۲ ارائه گردیده است. نتایج بررسی ترکیبات فنلی عصاره‌ها نشان داد که تعداد ۱۲ ترکیب فنلی در عصاره ضایعات غوره شناسایی شدند که عبارت بودند از اسید گالیک^۱ (۱/۲۳)٪، کافتاریک

1- Gallic

Table 12. The results of the type and amount of phenolic compounds of sour grape waste extracts

Type of compound ($\mu\text{g/g.dw}$)	Quantity (%)	Rt (min)
Gallic acid	1.23	4.81
Caftaric acid	46.65	5.85
Catechin	4.85	6.33
Epigallocatechin	6.34	6.77
Vanillic acid	2.47	8.04
Caffeic acid	1.08	8.41
Epigallocatechin gallate	1.27	9.22
Epicatechin	1.79	9.75
p-Cumaric acid	0.15	10.24
Ferolic acid	0.27	11.02
p-Cinapic acid	0.24	11.57
Quercetin	0.35	12.11

۴-نتيجه گيرى

نتايج تحقيق حاضر نشان داد كه بالاترين بازده استخراج متعلق به آنزيم يلدمش بود و با افزايش شدت صوت، بازده استخراج به طور معنى داري افزايش يافت. از طرفى افزايش زمان استخراج، منجر به افزايش بازده استخراج شد. به طوري كه بالاترين ميزان بازده استخراج در نمونه استخراج شده توسط آنزيم يلدمش و تحت فراصوت در شدت صوت ۹۰ درصد به مدت ۴۰ دقيقه مشاهده شد. طبق نتايج به دست آمده، بالاترين فلاونويد، فنل تام و فعاليت آنتى-اكسيدانى متعلق به آنزيم يلدمش بود و با افزايش شدت صوت، فعاليت آنتى-اكسيدانى به طور معنى داري افزايش يافت. از طرفى افزايش زمان استخراج، منجر به افزايش معنى دار فعاليت آنتى-اكسيدانى شد. به طور كللى مى توان بيان نمود با بكارگرى آنزيم پكتيناز به همراه فراصوت در زمان و شدت صوت مناسب مى توان ميزان فنل تام و فعاليت آنتى-اكسيدانى عصاره هاى پلى فنلى را افزايش داد.

اسيد P-سيناپيك^۲ (۰/۲۴٪)، كوئريستين^۳ (۰/۳۵٪). Guler و همكاران (۲۰۱۸) در بررسى تغييرات تركيبات فنلى و فعاليت آنتى اكسيدانى آب غوره در طى توليد كنسانتره، توسط HPLC، تركيبات پلى فنلى اسيد گاليك، كاتچين، ابي گالوكاتچين، اسيد وانيليك، ابي گالوكاتچين گالات، ابي-كاتچين، كافتاريك اسيد، اسيد كافنيك، اسيد p-كوماريك، اسيد فروليك، سيناپيك و كوئريستين را در آن گزارش نمودند [۶۷].

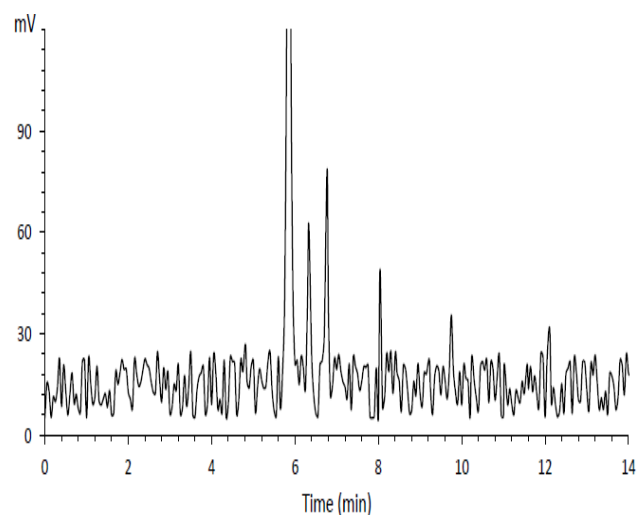


Chart 1. HPLC spectrum of phenolic compounds of of sour grape waste extracts

- 1- Ferolic acid
- 2- Cinapic acid
- 3- Quercetin

۵- تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (گرنه ۳/۳۷۰۹۰) انجام شده است.

peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food chemistry*.127(2), 807-821.

[11] Chakraborty, S., Uppaluri, R., & Das, C. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter gourd using response surface methodology (RSM). *Food and Bioproducts Processing*, 120(10), 114-122.

[12] Chakraborty, S., Uppaluri, R., & Das, C. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter gourd using response surface methodology (RSM). *Food and Bioproducts Processing*, 120(2), 114-122.

[13] Guzmán-Maldonado SH, Morales-Montelongo AL, Mondragón-Jacobo C, Herrera-Hernández G, Guevara-Lara F, Reynoso-Camacho R. (2010). Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from Central-México Region. *J Food Sci*. 75(2), 485-92.

[14] Cheok CY, Mohd Adzahan N, Abdul Rahman R, Zainal Abedin NH, Hussain N, Sulaiman R, et al. Current trends of tropical fruit waste utilization. *Crit Rev Food Sci Nutr*. (2018) 58:335-61. doi: 10.1080/10408398.2016.1176009

[15] Ji, J. B., Lu, X. H., Cai, M. Q., & Xu, Z. C. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(5), 455-462.

[16] Shotipruk, A., Kaufman, P. B., & Wang, H. Y. (2001). Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable menthaxpiperata using ultrasonic extraction. *Biotechnology progress*, 17(5), 924-928.

[17] Öncül, N., & Karabiyikli, Ş. (2015). Factors affecting the quality attributes of unripe grape functional food products. *Journal of Food Biochemistry*, 39(6), 689-695.

[18] Oszmiański, J., Wojdyło, A., & Kolniak, J. (2011). Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry*, 127(2), 623-631.

[19] Dehghan Thanha, Rahela, Mahdian, Elham, Amini Fard, Mohammad Hossein, Bayat, Hassan, & Garajian, Reza. (2018). Optimizing the extraction conditions of red pepper phenolic compounds using

۶- منابع

[1] FAO. The State of Food and Agriculture (2019). Moving forward on Food Loss and Waste Reduction; FAO: Rome, Italy.

[2] Amaya-Cruz, D. M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M. A., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods*, 17(2), 93-102.

[3] Socaci, S. A., Farcas, A. C., Vodnar, D. C., & Tofana, M. (2017). Food wastes as valuable sources of bioactive molecules. *Superfood and Functional Food—The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*. Rijeka, Croatia: InTech, 23(1), 75-93.

[4] Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295-315.

[5] Mourtzinis, I., & Goula, A. (2019). Polyphenols in agricultural byproducts and food waste. In *Polyphenols in plants* 22(1), 23-44.

[6] Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678.

[7] Panzella, L., Petriccione, M., Rega, P., Scortichini, M., & Napolitano, A. (2013). A reappraisal of traditional apple cultivars from Southern Italy as a rich source of phenols with superior antioxidant activity. *Food chemistry*, 140(4), 672-679.

[8] Chen, W. Q., Zhang, L., Liu, Y. F., Chen, L., Ji, X. P., Zhang, M., & Zhang, Y. (2007). Prediction of atherosclerotic plaque ruptures with high-frequency ultrasound imaging and serum inflammatory markers. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(5), 836-844.

[9] Wu, F., Chen, W. Z., Bai, J., Zou, J. Z., Wang, Z. L., Zhu, H., & Wang, Z. B. (2001). Pathological changes in human malignant carcinoma treated with high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*. 27(8), 1106-1099

[10] Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*)

- ultrasound waves using the response surface method. *Innovation in Food Science and Technology*, 11(1), 87-97.
- [20] Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food research international*, 44(1), 217-224.
- [21] Hatamnia, A. A., Abbaspour, N., & Darvishzadeh, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food chemistry*, 145(1), 306-311.
- [22] Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*, 114(1), 310-316.
- [23] Öncül, N., & Karabiyikli, Ş. (2015). Factors affecting the quality attributes of unripe grape functional food products. *Journal of Food Biochemistry*, 39(6), 689-695.
- [24] Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis* 10(1), 178-182.
- [25] Guler, A., TOKUŞOĞLU, Ö. & Artik, N. (2018). Alterations on phenolic compounds and antioxidant activity during sour grape juice concentrate processing. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 33(2).
- [26] Fuente -Blanco, S. d. I., Sarabia, E. R. -F. d., Acosta -Aparicio, V. M., Blanco -Blanco, A., Gallego -Juarez, J. A. (2006). Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics*, 44 (2), 523 -527.
- [27] Balasubramanian, S., Efimova, T., & Eckert, R. L. (2002). Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 1828-1836.
- [28] Chavan, Y. V., & Singhal, R. S. (2013). Separation of polyphenols and arecoline from areca nut (*Areca catechu* L.) by solvent extraction, its antioxidant activity, and identification of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2580-2589
- [29] Teh, S. S., & Birch, E. J. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 346-353.
- [30] L. Lingzhu, W. Lu, C. Dongyan, L. Jingbo, L. Songyi, Y. Haiqing, Y. Yuan, Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from maize filaments by response surface methodology and its identification. *J. Appl. Botany. Food Qual.* 88(1), 152-163 (2015).
- [31] Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., & Collina, S. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of chromatography A*, 1125(2), 147-151.
- [32] Jiménez, A., Beltrán, G., & Uceda, M. (2007). High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics sonochemistry*, 14(6), 725-731.
- [33] Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30(1), 37-44.
- [34] Maran, J. P., Manikandan, S., Vigna, N. C., & Dinesh, R. (2017). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), S1145-S1157.
- [35] Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24(4), 1076-1080.
- [36] Van Man, P., Anh Vu, T., & Chi Hai, T. (2017). Effect of ultrasound on extraction of polyphenol from the old tea leaves. *Annals Food Science and Technology*, 18(1), 44-50.
- [37] Fernando, C. D., & Soysa, P. (2015). Extraction kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing. *Nutrition Journal*, 14, 1.
- [38] Phan, L. H. N., Nguyen, T. N. T., & Le, V. V. M. (2012). Ultrasonic treatment of mulberry C.S. Dzah, et al. *Food Bioscience* 35 (2020) 100547 8 (*Morus alba*) mash in the production of juice with high antioxidant level. *Journal of Science and Technology*, 50, 204-209.
- [39] Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- [40] Schubert, S. Y., Lansky, E. P., & Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 11-17.
- [41] Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. *Fitoterapia*, 83(1), 6-12.

- [42] Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., & Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J. Food Agric. Environ*, 1(2), 42-47.
- [43] Loomis, W. D., & Battaile, J. (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, 5(3), 423-438.
- [44] Xu, D. P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., & Li, H. B. (2017). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chemistry*, 217, 552-559.
- [45] Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M. E., Abdelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243-249.
- [46] Guven, H., Arici, A., & Simsek, O. (2019). Flavonoids in our foods: a short review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 3(2), 96-106.
- [47] Gentile, D., Fornai, M., Pellegrini, C., Colucci, R., Blandizzi, C., & Antonioli, L. (2018). Dietary flavonoids as a potential intervention to improve redox balance in obesity and related co-morbidities: a review. *Nutrition research reviews*, 31(2), 239-247.
- [48] Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A. (2018). The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1054-1112.
- [49] Wang, L., Li, X., Gao, F., Liu, Y., Lang, S., Wang, C., & Zhang, D. (2023). Effect of ultrasound combined with exogenous GABA treatment on polyphenolic metabolites and antioxidant activity of mung bean during germination. *Ultrasonics Sonochemistry*, 94(2), 106-113.
- [50] Salmon J.M., Vuchot P., Doco T., Moutounet M. Maintenance and protection of yeast morphology by contact with wine polyphenols during simulation of wine aging on lees. *J. Food Science*. 68(2),1782-1787.
- [51] Masino F., Montevecchi G., Arfelli G., Antonelli A. (2008). Evaluation of the combined effects of enzymatic treatment and aging on lees on the aroma of wine from Bombino bianco grapes. *J. Agric. Food Chem*. 56(3),9495-9501.
- [52] Osete-Alcaraz A., Bautista-Ortín A.B., Ortega-Regules A.E., Gómez-Plaza E. (2019). Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification. *Food Bioproc. Tech*; 12(1),1330-1339.
- [53] Bi, J., Yang, Q., Sun, J., Chen, J., & Zhang, J. (2011). Study on ultrasonic extraction technology and oxidation resistance of total flavonoids from peanut hull. *Food Science and Technology Research*, 17(3), 187-198.
- [54] Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology*, 51(1), 112-120.
- [55] Zimman, A., Joslin, W. S., Lyon, M. L., Meier, J., & Waterhouse, A. L. (2002). Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(2), 93-98.
- [56] Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2520-2528.
- [57] Gallego, L., Del Alamo, M., Nevares, I., Fernández, J. A., De Simón, B. F., & Cadahía, E. (2012). Phenolic compounds and sensorial characterization of wines aged with alternative to barrel products made of Spanish oak wood (*Quercus pyrenaica* Willd.). *Food science and technology international*, 18(2), 151-165.
- [58] Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A. E., & Gómez-Plaza, E. (2019). Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 1330-1339.
- [59] Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., Trygg, J., & Vivier, M. A. (2015). Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2798-2810.
- [60] Ruiz-Garcia, M., & Pinedo-Castro, M. O. (2010). Molecular systematics and phylogeography of the genus *Lagothrix* (Atelidae, Primates) by means of the mitochondrial COII gene. *Folia Primatologica*, 81(3), 109-128.

[61] Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35(2), 100-127.

[62] Szydłowska-Czerniak, A., & Tułodziecka, A. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction procedure to determine antioxidant capacity of rapeseed cultivars. *Food Analytical Methods*, 8(3), 778–789.

[63] Liu, B., Ma, Y., Liu, Y., Yang, Z., & Zhang, L. (2013). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Adinandra nitida* Leaves. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 1045–1051.

[64] Shahram, H., Taghian Dinani, S., Amouheydari, M. (2019) "Effects of pectinase concentration, ultrasonic time, and pH of an ultrasonic-assisted

enzymatic process on extraction of phenolic compounds from orange processing waste." *Journal of Food Measurement and Characterization* 13(1), 487-498.

[65] Ghaderi, N., & Siosemardeh, A. (2011). Response to drought stress of two strawberry cultivars (cv. Kurdistan and Selva). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2), 6-12.

[66] Khan, I., Yousif, A., Johnson, S. K., & Gamlath, S. (2013). Effect of sorghum flour addition on resistant starch content, phenolic profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta. *Food Research International*, 54(1), 578-586.

[67] Guler, A., TOKUŞOĞLU, Ö., & Artik, N. (2018). Alterations on phenolic compounds and antioxidant activity during sour grape juice concentrate processing. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 33(2), 111-117.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir



Scientific Research

The effect of using ultrasound pretreatment and pectinase enzyme on the extraction efficiency and antioxidant properties of the polyphenolic extract of *sour grape (Vitis vinifera)* waste

Bahram Hasani¹, Fakhri Shahidi^{2*}, Seyed Ali Mortazavi^{3*}, Mohebbat mohebbi⁴, Reza Farhoosh⁵

1- PhD student, Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4,3,2,5- Professor, Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ABSTRACT

Today, the extraction and use of biologically active compounds from agricultural and food wastes has received much attention. In the present research, the effect of enzyme treatment, ultrasound and the combined effect of enzyme treatment and ultrasound on the extraction of phenolic compounds of sour grape wastes was done so that 2 pectinase enzymes (Pectinex Ultracolor and Pectinex Yildamesh) at levels of 10, 20 and 30 mg/kg and ultrasound (times 10, 25 and 40 minutes) and (sound intensity 30, 60 and 90%) were used. The effect of enzyme treatment, ultrasound and the combined effect of enzyme treatment and ultrasound were investigated. According to the obtained results, the highest extraction efficiency belonged to Yaldemesh enzyme and with increasing sound intensity, the extraction efficiency increased significantly. On the other hand, increasing the extraction time led to an increase in extraction efficiency ($p \leq 0.01$). So that the highest extraction efficiency was observed in the sample extracted by Yaldemesh enzyme and under ultrasound at 90% sound intensity for 40 minutes ($p \leq 0.01$). According to the obtained results, the highest flavonoid, total phenol and antioxidant activity (DPPH, FRAP, ABTS) belonged to Yaldemesh enzyme, and with increasing sound intensity, antioxidant activity increased significantly ($p \leq 0.01$). On the other hand, increasing the extraction time led to a significant increase in antioxidant activity ($p \leq 0.01$). The highest antioxidant activity belonged to the sample extracted by Yaldemesh enzyme and subjected to ultrasound at a ultrasound intensity of 90% for 40 minutes and was introduced as the best treatment.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/7/22

Accepted: 2023/8/22

Keywords:

Sour grape,
Pectinase,
Ultrasound,
Polyphenol,
Waste

DOI: 10.22034/FSCT.20.142.196

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.142.13.3

*Corresponding Author E-Mail:
morteza1937@yahoo.com

fshahidi@um.ac.ir