مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و خاصیت ضدقارچی عصاره پوست انار با استفاده از حلال‌های مختلف

الهام آذرپژوه[۱]، شهین زمردی*[۲]، پروین شرایعی[۱]

۱-دانشیار پژوهشی بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

۲*-دانشیار پژوهشی بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت:

تاریخ پذیرش:

کلمات کلیدی:

استخراج،

پوست انار،

حلال،

ترکیبات موثره،

ضد قارچی.

DOI: 10.22034/FSCT.22.161.297.

* مسئول مکاتبات:

s.zomorodi@areeo.ac.ir

چکیده

به منظور بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی ترکیبات عصاره پوست انار، آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل نوع حلال (آب، متانول ۷۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد) و زمان استخراج (۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت) بود. نتایج نشان داد که قدرت احیاکنندگی آهن و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در عصاره‌های استخراج شده با متانول ۷۰ درصد بالاتر از سایر حلال‌ها بود. همچنین با افزایش زمان استخراج در تمام حلال‌های مورد استفاده، مقدار ترکیبات پلی‌فنلی، قدرت احیاکنندگی (FRAP) و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH) به طور معنی‌داری افزایش یافت که افزایش مقدار ترکیبات پلی‌فنلی و FRAP در استفاده از حلال آب بیشترین مقدار اما در حلال متانول کمترین مقدار بود. اما افزایش DPPH در استفاده از حلال اتانل بیشترین مقدار و در حلال متانول کمترین مقدار بود. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد قارچی عصاره متانولی پوست انار نشان داد که عصاره متانولی پوست انار با غلظت ۰/۳ درصد، دارای خاصیت ضدقارچی تقریباً معادل با سوربات پتاسیم با غلظت ۰/۱ درصد بود، به طوری که میانگین قطر هالهٔ عدم رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* تحت تاثیر عصاره پوست انار ۱۷/۷ میلی‌متر و تحت تاثیر سوربات پتاسیم ۱۸/۳ میلی‌متر بود. لذا عصاره پوست انار می‌تواند به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدنی و نگهدارنده طبیعی، جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی مانند سوربات پتاسیم در محصولات غذایی استفاده شود.

۱-مقدمه

امروزه محدودهٔ وسیعی از افزودنی‌ها با اهداف گوناگون در تهیهٔ فرآورده‌های غذایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت این افزودنی‌ها به حدی است که بدون بهره‌گیری از آنها، تولید و مصرف بسیاری از فرآورده‌های غذایی تقریبا غیرممکن می‌شود. یکی از مهمترین افزودنی‌های غذایی، ترکیبات ضداکسایشی و ضدمیکروبی سنتزی است که نقش مهمی در طولانی شدن عمر نگهداری مواد غذایی و کاهش ضایعات دارد. صدها ترکیب افزودنی سنتزی از سوی سازمان‌های مسئول، به عنوان ترکیبات مجاز و قابل استفاده در مواد خوراکی معرفی شده‌اند؛ اما کاربرد آنها در مواد غذایی بدلیل ایمن نبودن محدود می‌باشد. افزودنی‌های طبیعی از بافت‌های مختلف گیاهی و حیوانی استخراج می‌شوند که میزان ترکیبات فعال آنها بسته به نوع منبع متفاوت است. در دنیای امروز توجه ویژه‌ای به استفادهٔ بهینه از ضایعات گیاهی و استخراج ترکیبات زیست فعال (مانند ترکیبات ضد اکسایشی و ضد میکروبی) شده است. عصارهٔ پوست انار منبعی سرشار و غنی از ترکیبات پلی‌فنلی، تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فلاونوئیدی است. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از این منبع ضایعاتی برای تولید ترکیبات زیست فعال، علاوه بر کاهش ضایعات محصولات کشاورزی موجب ایجاد ارزش افزوده و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی نیز خواهد شد [۱, ۲].

در ایران سالیانه، میلیون‌ها دلار ارز جهت واردات موادی همچون انواع اسانس، عصاره و رنگ از کشور خارج می‌شود که این روند هر ساله سیر صعودی دارد. ضایعات و پسماندهای مزارع در دیگر کشورها منبع اصلی تامین موارد مذکور برای صادرات به ایران وکشورهای مشابه می‌باشد. این در حالی است که حجم ضایعات کشاورزی در مزارع و کارخانجات صنایع غذایی کشور قابل تأمل است. این مسئله زمانی اهمیت خود را نشان می‌دهد که بدانیم در کشورهای پیشرفته با جمع‌آوری و فرآوری پسماند از مواد ارزان قیمت آنها را به محصولات با ارزش افزوده بالاتر تبدیل می‌کنند. پسماندهای کارخانجات تولید آب میوه یکی از مهمترین منابع تولید افزودنی‌های غذایی، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی سنتزی می‌باشند که نقش مهمی در طولانی شدن عمر نگهداری مواد غذایی و کاهش ضایعات دارند. استخراج ترکیبات موثر از پسماندها با حداکثر کارایی دارای اهمیت ویژه‌ای است. روش استخراج عصاره‌های گیاهی، از جمله عواملی است که می‌تواند خواص ترکیبات موثر عصاره‌ها را تحت تاثیر قرار دهد [۳-۵].

انار با نام علمی *پونیکاگرانااتوم*[1] از خانواده پونیکاسه[2]، به طور گسترده در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می‌شود [۳, ٦]. ایران مرکز تنوع ارقام و یکی از بزرگترین تولیدکنندگان و صادرکنندگان انار در جهان است. براساس آمارنامه کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، سطح زیر کشت باغات انار در سال ۱۴۰۲ حدود ۹۷ هزار هکتار (۹۲ هزار هکتار بارور و مابقی غیربارور) و تعداد درختان پراکنده انار حدود ٥٦ هزار می‌باشد. متوسط عملکرد هر هکتار باغ انار در همان سال ۹ تن گزارش شده است. یکی از منابع با ارزش برای تولید افزودنی‌های طبیعی پوست انار می‌باشد. پوست انار یکی از مهمترین محصولات جانبی کارخانه‌های فرآوری میوهٔ انار(عمدتاً کارخانه‌های آب انارگیری) است. حدود ۳۰ تا ٤۰ درصد وزن میوهٔ انار را پوست آن تشکیل می‌دهد [۷]. با توجه به افزایش میزان تولید میوهٔ انار، به دلیل افـزایش آگـاهی مصرف کننده از خواص بالقوه و سلامتی بخش آن، لزوم استفاده صنعتی و بهینـه از چنین حجم وسیعی از ضایعات ضروری به نظر می‌رسد. ترکیبات تشکیل دهندهٔ پوست انار در جدول ۱ نشان داده شده است [۸]. میوهٔ انار شامل فلاونوئیدهای متنوعی است که حدود ۰/۲ تا ۱ درصد وزن میوه را به خود اختصاص می‌دهند. پوست انار حاوی بیشترین میزان ترکیبات فنلی در مقایسه با سایر بخش‌های ساختمانی میوه است و حدود ۳۰

1-*Punica granatum*

2-*Punicace*

درصد کل این ترکیبات، مخصوصاً آنتوسیانیدین‌ها [۳] (دلفینیدین [۴]، سیانیدین، پلارگونیدین ۳ گلوکوزید [۵] و پلارگونیدین ۳ و ۵ دی‌گلوکوزید) بسته به نوع و مرحلهٔ رشد میوه، در پوست میوه تجمع یافته و سبب تغییر رنگ پوست می‌شوند [۹].

Table 1. Approximate composition of [۸] pomegranate peel

Compositions	Amount
Moisture (% of dry matter)	69.93
Ash (%)	5.49
crude fiber (%)	3.95
Lignin (%)	4.29
Total phenols (mg/g)	40.53
Vitamin A (µg/g)	14.06
Sodium (mg/kg)	763.66
Calcium (mg/kg)	645.70
Magnesium (mg/kg)	1644.70
Phosphorus (mg/kg)	33.96
Iron (µg/g)	22.6
Copper (µg/g)	6.20
Zinc (µg/g)	8.03
Selenium (µg/g)	ND

ND: not detect

به طور کلی، ترکیبات فنلی پوست انار متنوع بوده و دارای ترکیبات فنلی با وزن مولکولی کم و یا متوسط مانند آنتوسیانین‌ها، گالوتانین‌ها[۶]، اسید هیدروکسی سینامیک، اسید هیدروبنزوئیک[۷] و یا ترکیبات فنلی با جرم مولکولی بالا همانند الایژیتانن[۸]، استرهای گالاژیل[۹] و پروآنتوسیانیدین‌ها می‌باشد. ترکیبات فنلی، به دلیل ساختار شیمیایی خاص خود، دارای خصوصیات ضد اکسایشی و ضدمیکروبی هستند [۱۰]. هر چند ترکیبات فنلی پوست انار، بیشتر از دیدگاه بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته‌اند اما، این ترکیبات دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مهم در موجودات می‌باشند و آثار سودمندی در مبارزه با بیماری‌های مرتبط با تولید رادیکال اکسیژن با غلظت‌های بیش از ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن انسان و اثرات ضدمیکروبی نیز نشان داده‌اند [۱۱]. پوست انار محصولات جانبی فرآوری آب انار هستند. امروزه، پوست انار و عصاره‌های آن در چندین محصول مختلف مانند ماهی [۱۲]، نان [۱۳]، آبمیوه [۱۴]، پودر ماست [۱۵] و غیره مورد آزمایش قرار گرفته‌اند.این علاقه فزاینده به مصرف پوست انار به دلیل خواص مختلف پوست، به ویژه خواص آنتی‌اکسیدانی آن است. در واقع، اکنون به خوبی اثبات شده است که عصاره پوست انار دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد [۱۶]. محتوای کل ترکیبات فنولی عصاره پوست تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از عصاره پالپ گزارش شده است [۱۷]. مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست انار با محتوای فنلی آن‌ها مرتبط است. پلی‌فنل‌ها فراوان‌ترین و گسترده‌ترین گروه‌های متابولیت‌های گیاهی هستند و بخش جدایی‌ناپذیری از رژیم غذایی انسان و حیوان محسوب می‌شوند. فناوری استخراج یک عنصر کلیدی برای توسعه پایدار صنایع غذایی- کشاورزی است [۱۸]. پلی‌فنل‌ها به‌طور سنتی از مواد گیاهی توسط حلال‌های آلی استخراج می‌شوند. با این حال، بهینه‌سازی روش استخراج قبل از هر مطالعه کیفی و کمی، دقت نتایج را تضمین خواهد کرد. در میان متغیرهای استخراج، نسبت حلال به نمونه، نوع حلال، زمان و دمای استخراج، برای اطمینان از کارایی استخراج، آن اهمیت زیادی دارد [۱۹]. انتخاب حلال یک گام مهم برای به دست آوردن عصاره‌هایی با بازده قابل قبول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است [۲۰].

هدف مطالعه حاضر استخراج ترکیبات موثره از پوست انار با استفاده از حلال‌ها و زمان‌های مختلف است تا بتوان بهترین حلال را از نظر بازده استخراج، مقدار ترکیبات فنلی، اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بدست آورد. همچنین اثرات ضدقارچی

3- Anthocyanidins

4 -Cyanidin

5 -Pelargonidin 3-Glucosides

6 -Gallotannins

7- Hydroxybenzoic Acids

8 -Ellagitannins

9 -Gallagyl Esters

عصاره متانولی پوست انار به عنوان یک جایگزین مناسب برای نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم بررسی گردید.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

پوست انار از شرکت آب انار ملس واقع در شهرستان مشهد به مقدار ۵۰ کیلوگرم تهیه و پس از جداسازی ضایعات در فیلم پلی‌اتیلن با دانسیته پایین با ضخامت ۱۴۰ میکرون بسته‌بندی گردید و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل اتانول ۷۰ درصد، متانول، معرف فولین سیوکالچو، معرف DPPH، اسید گالیک، کربنات سدیم، TPTZ، سولفات آهن II و کلرید آهن از شرکت مرک، سیگما- آلدریچ، شارلو و کالدون تهیه شدند.

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱-استخراج ترکیبات موثر پوست انار

استخراج ترکیبات موثر پوست انار با استفاده از حلال‌های اتانول ۷۰ درصد، متانول ۷۰ درصد و آب انجام شد. بدین منظور برای هر آزمایش ۱۰۰ گرم از پوست انار به دقت در یک بشر توزین شد و مقدار ٤۰۰ میلی‌لیتر از هر حلال به بشر اضافه گردید و در دمای اتاق به مدت ۱، ۱۲ و ۲٤ ساعت همزده شد. سپس محلول تحت خلاء صاف گردید و با تبخیر کنندهٔ دوار تحت خلاء (مدل Laborota 4000 efficient، ساخت کشور آلمان) تحت دمای ٤۵ درجهٔ سلسیوس تا آبگیری کامل تغلیظ گردید [۲۱].

۲-۲-۲- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی عصاره

برای تعیین مقدار ترکیبات فنلی، به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره استخراجی با متانول، مقدار ٦ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو اضافه گردید، پس از مدت ۸ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، مقدار ۱/۵۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد وزنی/حجمی اضافه و کاملا مخلوط شد و پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۰ درجه سلسیوس، مقدار جذب آن در طول موج ۷٦۵ نانومتر قرائت گردید.

برای رسم منحنی استاندارد محلول‌هایی با غلظت ۱۰۰ تا ۹۵۰ پی‌پی‌ام از اسید گالیک تهیه و همانند روش تهیه نمونه، جذب محلول‌ها در طول موج ۷٦۵ نانومتر قرائت شد و منحنی استاندارد رسم گردید. مقدار ترکیبات فنلی کل موجود در نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد تعیین شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم نمونه خشک گزارش شد [۲۲].

۲-۲-۳- اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن III [10] (FRAP)

ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره استخراجی در ۲ میلی‌لیتر متانول حل شد و سپس ۳۰ میکرولیتر از آن با ۹۰۰ میکرولیتر محلول FRAP و ۹۰ میکرولیتر آب مقطر در لوله آزمایش مخلوط شد. لوله آزمایش پس از همزدن در بن ماری قرار گرفت و پس از رسیدن دمای آن به ۳۷ درجهٔ سلسیوس، مقدار جذب در مقابل شاهد و در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

برای تهیه منحنی استاندارد محلول‌های با غلظت‌های ۲۰۰تا ۲۰۰۰ میکرومول در لیتر از سولفات آهن II تهیه و جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتربه دست آمد و مقدار آهن II با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد [۲۲].

۲-۲-٤- اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

ابتدا محلول ۰/۰۰٦ درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول تهیه شد. سپس به لوله‌های آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر محلول استخراجی متانولی با غلظت‌های مختلف (بسته به قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد)، یک میلی‌لیتر از محلول DPPH اضافه گردید. لوله‌های آزمایش پس از مخلوط شدن کامل، به مدت یک ساعت در جای تاریک نگهداری شدند

10-Ferric Reducing Activity of Plasma

و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر شاهد قرائت گردید [۲۳].

۲-۲-۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد کپک با استفاده از روش انتشار دیسک

پس از انتخاب مناسب‌ترین غلظت عصاره از پوست انار، تعدادی کاغذ صافی واتمن شماره ۷ با استفاده از پانچ بصورت یکنواخت سوراخ و دیسک تهیه گردید (قطر هر دیسک به طور متوسط ۷ میلی‌متر بود). دیسک‌ها در ظرف مناسب اتوکلاو و خشک شدند. سپس دیسک‌ها بر روی پلیت شیشه‌ای قرار گرفته و با حجم‌های مختلف (۵ تا ۲۵ میکرولیتر) از عصارهٔ پوست انار با غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سوربات پتاسیم با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آغشته و در شرایط استریل خشک شدند.

سپس کپک *آسپرژیلوس نایجر* ATCC-۱۶۴۰۴، در محیط کشت مایع حاوی ۱ درصد گلوکز، ۰/۵ درصد عصاره مخمر و ۰/۵ درصد تریپتون به مدت ۴۸ ساعت تکثیر شد. سپس محیط کشت مایع به صورت یکنواخت بر روی محیط کشت جامد اختصاصی کپک (دکستروز کلرامفینکل آگار) پخش شد. محیط کشت جامد مذکور، برای ۱۰ دقیقه در یخچال برای جذب کشت مایع به محیط جامد قرار داده شد. دیسک‌های تهیه شده با حجم‌های مختلف بر روی محیط کشت جامد قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید [۲].

۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات مربوط در قالب فاکتوریل برپایه کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل حلال (آب، متانول ۷۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد) و زمان استخراج (۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت) بود. میانگین‌های حاصل از انجام آزمون‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند ($P<0/05$). برای رسم منحنی‌ها از نرم‌افزار Microsoft Excel ۲۰۱۳ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر نوع حلال و زمان استخراج بر ترکیبات فنلی عصاره پوست انار

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثرات مستقل حلال و زمان استخراج و تاثیر متقابل آن‌ها بر مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌های استخراج شده از پسماند انار معنی‌دار بود ($P<0/05$). با توجه به شکل ۱ با افزایش زمان استخراج در تمام حلال‌های مورد استفاده، مقدار ترکیبات پلی‌فنلی به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش در استفاده از حلال آب بیشترین مقدار اما در حلال متانول کمترین مقدار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی در اثر استفاده از حلال متانل ۷۰ درصد (۵۳/۰۵) و اتانل ۷۰ درصد (۳۶/۱۱) نسبت به حلال آب (۱۷/۸۷) به ترتیب حدود ۲/۹۶ و ۲ برابر افزایش یابد. همچنین مقدار این ترکیبات در اثر استفاده از حلال متانل ۷۰ درصد (۵۳/۰۵) در مقایسه با حلال اتانل ۷۰ درصد (۳۶/۱۱) حدود ۱/۵ برابر افزایش پیدا کرد. زیرا حلال‌های اتانول و متانول نسبت به آب و متانل نسبت به اتانول قطبیت کمتری دارند و موجب تخریب بیشتر دیواره سلولی شده و منتج به افزایش استخراج بیشتر ترکیبات پلی‌فنلی و آنتوسیانین‌ها می‌شود [۲۴]. متانول به دلیل قطبیت مناسب، قابلیت بالایی در استخراج فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنولی از پوست انار دارد [۲۵].

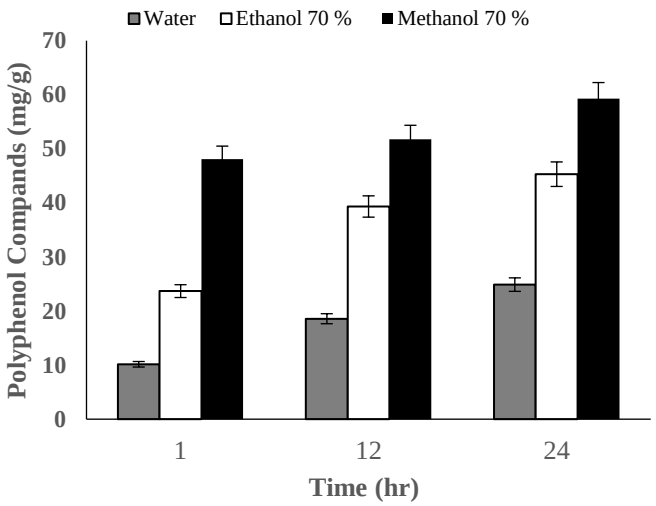

Figure 1. The interaction effect of solvent type and extraction time on the amount of phenolic compounds from pomegranate peel extract

۳-۲- تاثیر نوع حلال و زمان استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار

تعیین قدرت احیاکنندگی آهن، روشی سریع و مناسب برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی ترکیبات شیمیایی است و می‌توان آن را به عنوان شاخصی از قدرت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار داد. در این روش توانایی عصاره‌ها برای احیاء آهن ۳ ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. حضور عوامل احیاءکننده (آنتی‌اکسیدان‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری‌سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فرو می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاءکنندگی عصاره‌های مورد بررسی با تغییر رنگ از آبی به درجات مختلفی از رنگ سبز و زرد همراه است. آنتی‌اکسیدان‌هایی با قدرت احیاکنندگی آهن بالاتر از توانایی بیشتری در پایان دادن به واکنش‌های مخرب زنجیره‌ای رادیکالی برخوردارند. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد از اکسایش لیپیدها ممانعت به عمل می‌آورند.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثرات مستقل حلال و زمان استخراج و اثرات متقابل آن‌ها بر قدرت احیاکنندگی آهن در عصاره‌های استخراج شده از پسماند انار معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). با توجه به شکل ۲ با افزایش زمان استخراج در تمام حلال‌های مورد استفاده، مقدار FRAP به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش در استفاده از حلال آب بیشترین مقدار اما در حلال متانول کمترین مقدار بود.

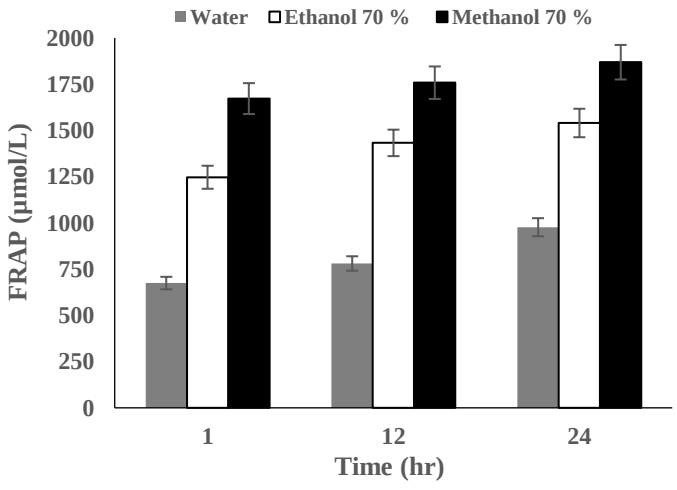

Figure 2. The interaction effect of solvent type and extraction time on the amount of Ferric reducing activity of plasma (RRAP) from pomegranate peel extract

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی در اثر استفاده از حلال متانل ۷۰ درصد و اتانل ۷۰ درصد نسبت به حلال آب به ترتیب حدود ۲/۲۵ و ۱/۲۳ برابر افزایش یابد. همچنین مقدار این ترکیبات در اثر استفاده از حلال متانل ۷۰ درصد در مقایسه با حلال اتانل ۷۰ درصد حدود ۱/۸۳ برابر افزایش پیدا کرد.استخراج با حلال متانول به مدت ۲٤ ساعت بیشترین قدرت احیاکنندگی آهن در عصاره‌های استخراج شده از پسماند را داشت. این نتایج با گزارش ستلودی[11] و همکاران مطابقت داشت [۲٦].

برای تعیین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد آنتی‌کسیدان‌ها از رادیکال‌های آزاد مختلفی مثل رادیکال‌های DPPH، پراکسی، هیدروکسیل و سوپراکسی استفاده می‌شود. بررسی فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد DPPH در اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره خنثی شده و بی‌رنگ می‌گردد. لذا درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود می‌باشد [۲۷].

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات مستقل حلال و زمان و اثرات متقابل آن‌ها بر قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها در عصاره‌های استخراج شده از پسماند انار معنی‌دار بودند (P <۰/۰۵). با توجه به شکل ۳ با افزایش زمان استخراج در تمام حلال‌های مورد استفاده، مقدار DPPH به طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش در استفاده از حلال اتانل بیشترین مقدار اما در حلال متانول کمترین مقدار بود.

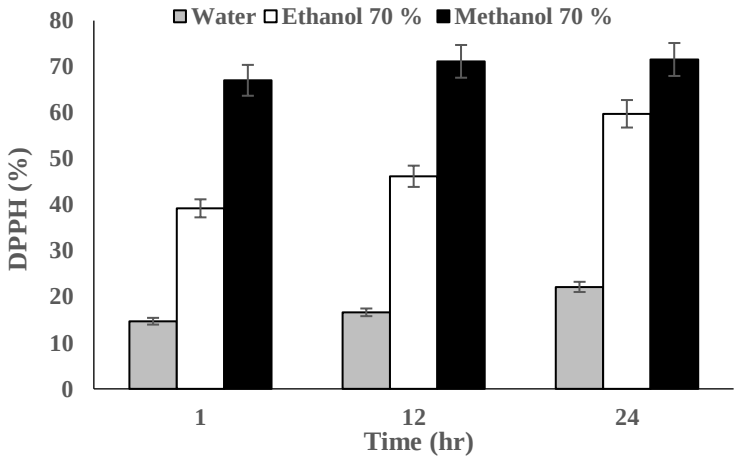

Figure 3. The interaction effect of solvent type and extraction time on the amount of DPPH free radical-scavenging from pomegranate peel extract

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی در اثر استفاده از حلال متانل ۷۰ درصد و اتانل ۷۰ درصد نسبت به حلال آب به ترتیب حدود ۳/۹۳ و ۱/٤٥ برابر افزایش یابد.همچنین مقدار این ترکیبات در اثر استفاده از حلال متانل ۷۰ درصد در مقایسه با حلال اتانل ۷۰ درصد حدود ۲/۷۲ برابر افزایش پیدا کرد. این نتایج با گزارش سینگ و همکاران

11- Setlhodi

مطابقت داشت [۲۸]. استخراج با حلال متانول به مدت ۲٤ ساعت بیشترین قدرت احیاکنندگی آهن در عصاره‌های استخراج شده از پسماند را داشت.

۳-۳- بررسی تاثیر عصارهٔ متانولی پوست انار (استخراج شده در شرایط بهینه) بر بازدارندگی رشد *آسپرژیلوس نایجر*

کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری مواد غذایی است. مواد افزودنی از جمله موادی هستند که بطور عمدی در فرآیند تولید مواد غذایی افزوده شده تا از تغییرات نامطلوب و فساد ناشی از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری و موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی شوند. سوربات پتاسیم از جمله موادی است که در طبقه مواد نگهدارنده قرار داشته و سبب جلوگیری از فساد میکروبی در مواد غذایی و افزایش عمر انبارداری می‌شود. این ماده به عنوان نگهدارنده در نان و سایر محصولات نانوایی، لبنیات، مرباها و شربت‌ها، ترشی‌ها، آب‌میوه‌ها، و میوه‌های خشک قابل استفاده است. سوربات پتاسیم، دمای بالای فرآیند را تحمل نموده و تاثیری بر عطر و طعم مواد غذایی ندارد و با ویتامین‌ها و مواد معدنی و آنزیم‌ها واکنش نمی‌دهد [۲۹]. .مصرف سوربیک اسید و نمک‌های حاصل از آنها به عنوان مواد نگهدارنده در مواد غذایی توسط سازمان‌های تنظیم مقررات بین‌المللی و ملی تعیین می‌شود و مصرف آنها در غلظت بسیار کم توصیه شده است. عوارض مصرف این گونه مواد به صورت اثرات پوستی مانند جوش، کهیر و درماتیت تماسی گزارش شده است. نگرانی‌های مرتبط با ایمنی افزودنی‌های شیمیایی، محدودیت در حدود مجاز مصرف و نیز خطرات احتمالی آنها بر سلامت انسان، تمایل فزاینده‌ای را در خصوص جایگزینی این نوع از ترکیبات با انواع طبیعی را فراهم آورده است. بنابراین، در پژوهش حاضر، اثرات ضدقارچی عصارهٔ متانولی پوست انار به عنوان جایگزین نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم مورد مطالعه قرار گرفت. تاثیر حجم‌های مختلف (۵ تا ۲۵ میکرولیتر) از عصارهٔ استخراج شده با متانول ۷۰ درصد پوست انار (غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با نگهدارندهٔ سنتزی سوربات پتاسیم، بر بازدارندگی از رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* بعد از ۲٤ ساعت نگهداری در ۳۷ درجهٔ سلسیوس، در شکل ٤ و نتایج مربوط به قطر هالهٔ عدم رشد عصارهٔ متانولی پوست انار در جدول ۲ نشان داده شده است.

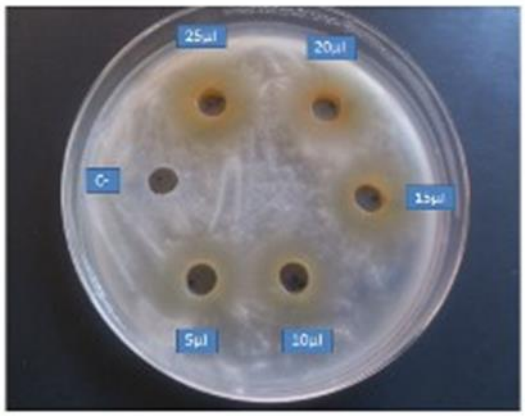

Figure 4- The effect of different amounts of 70% methanol extract of pomegranate peel (concentration 0.3%) on the growth and inhibition of *Aspergillus niger* after 24 hr at 37 °C

همانطوری‌که از جدول ۲ مشاهده می‌شود، میانگین قطر هالهٔ عدم رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* تحت تاثیر عصاره متانولی پوست انار و نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم به ترتیب، ۱۷/۷ و۱۸/۳ میلی‌متر بود. بنابراین، عصارهٔ متانولی پوست انار در غلظت ۰/۳ درصد، دارای خاصیت ضدقارچی تقریباً معادل با اثر ضدقارچی سوربات پتاسیم (در غلظت ۰/۱ درصد) بود. نتایج مشابهی توسط سایر محققان نیز گزارش شده است [۳۰, ۳۱].

Table 2- Comparison of the mean effect of different treatments on the diameter of Aspergillus niger growth inhibition zone

Extract	Diameter of growth inhibition zone (mm)

Pomegranate peel methanolic extract (3000 mg/ml)	17.7±0.28[a]
Methanol 70% (negative control)	ND
Potassium sorbate (1000 mg/ml)	18.3±0.21[a]

The same superscript lower letters (a) beside mean values indicate a not significant difference from each other (t- test, P<0.05). ND: not detect.

سوربات پتاسیم، بر طیف وسیعی از کپک‌ها و مخمرها موثر است. علت این پدیده، به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز در اکسیداسیون اسید چرب، مهار آنزیم‌های حاوی سولفیدریل و در نتیجهٔ جفت نشدن فسفوریلاسیون اکسایشی و مهار کاتالاز و در نتیجه آن افزایش هیدروژن پراکسید در سلول می‌باشد [۳۲]. اثر ضدقارچی عصاره متانولی پوست انار نیز احتمالاً به دلیل ترکیبات فنلی (فلاونوئیدها و تانن) موجود در آن است. ترکیبات فنلی نقش مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند. این ترکیبات اثر ضد میکروبی خود را از طریق اختلال در غشای باکتریایی از طریق تغییر در ترکیب و نفوذپذیری غشای سلولی، استرس اکسیداتیو، مهار تنفس و فرآیندهای انتقال یون اعمال می کند. میزان تاثیر این ترکیبات بسته به نوع ترکیبات فنلی، غلظت ترکیبات فنلی، روش عصاره‌گیری و حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری و غیره متفاوت است [۳۳].

٤-نتیجه گیری کلی

در این پژوهش به بررسی ویژگی‌های انار، استخراج ترکیبات موثره از پوست انار و تاثیر حلال‌ها و زمان‌های مختلف بر مقدار ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و صد قارچی آن پرداخته شده است. نتایج حاصل نشان داد که مقدار ترکیبات پلی‌فنلی کل، قدرت احیاکنندگی آهن و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در روش استخراج با اتانول و متانول بیشتر از استخراج با آب بود. حلال‌های اتانول و متانول به دلیل خاصیت قطبیت کمتر، دیواره سلولی را تخریب کرده و موجب استخراج بیشتر پلی‌فنل‌ها و آنتوسیانین‌ها می‌شوند. همچنین، با افزایش زمان استخراج، مقدار ترکیبات فنلی، قدرت احیاکنندگی آهن و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در تمام حلال‌های مورد استفاده افزایش یافت. همچنین عصاره متانولی پوست انار با غلظت ۰/۳ درصد، دارای خاصیت ضدقارچی تقریباً معادل با سوربات پتاسیم با غلظت ۰/۱ درصد بود، به طوری که میانگین قطر هالهٔ عدم رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* تحت تاثیر عصاره پوست انار ۱۷/۷ میلی‌متر و تحت تاثیر سوربات پتاسیم ۱۸/۳ میلی‌متر بود. لذا عصاره پوست انار می‌تواند به عنوان یک جایگزین طبیعی و موثر برای نگهدارنده‌های شیمیایی مانند سوربات پتاسیم در محصولات غذایی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برای حمایت مالی از این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٥-منابع

[1] Pirsa, S., et al., *Smart film based on chitosan/Melissa officinalis essences/pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage.* Food Additives & Contaminants: Part A, 2020. **37**(4): p. 634-648.

[2] Sharayei, P., et al., *Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel.* Lwt, 2019. **101**: p. 342-350.

[3] Hamedi, F., et al., *Ultrasound-assisted osmotic treatment of model food impregnated with pomegranate peel phenolic compounds: Mass transfer, texture, and phenolic evaluations.* Food and Bioprocess Technology, 2018. **11**: p. 1061-1074.

[4] Hassani, D., I.K. Sani, and S. Pirsa, *Nanocomposite film of potato starch and gum Arabic containing boron oxide nanoparticles and anise hyssop (Agastache foeniculum) essential Oil: investigation of physicochemical and antimicrobial properties.* Journal of Polymers and the Environment, 2024. **32**(4): p. 1972-1983.

[5] Eghbaljoo, H., et al., *Development of smart packaging halochromic films embedded with anthocyanin pigments; recent advances.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023: p. 1-17.
[6] Azarpazhooh, E., et al., *Physicochemical and phytochemical characterization and storage stability of freeze-dried encapsulated pomegranate peel anthocyanin and in vitro evaluation of its antioxidant activity.* Food and Bioprocess Technology, 2019. **12**(2): p. 199-210.
[7] Sharayei, P., E. Azarpazhooh, and H.S. Ramaswamy, *Effect of microencapsulation on antioxidant and antifungal properties of aqueous extract of pomegranate peel.* Journal of food science and technology, 2020. **57**(2): p. 723-733.
[8] Kushwaha, S., M. Bera, and P. Kumar, *Nutritional composition of detanninated and fresh pomegranate peel powder.* IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol, 2013. **7**(1): p. 38-42.
[9] Fischer, U.A., R. Carle, and D.R. Kammerer, *Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn.* Food chemistry, 2011. **127**(2): p. 807-821.
[10] Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.* The Journal of nutritional biochemistry, 2002. **13**(10): p. 572-584.
[11] Dikmen, M., N. Ozturk, and Y. Ozturk, *The antioxidant potency of Punica granatum L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer.* Journal of medicinal food, 2011. **14**(12): p. 1638-1646.
[12] Al-Zoreky, N., *Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels.* International journal of food microbiology, 2009. **134**(3): p. 244-248.
[13] Altunkaya, A., et al., *Antioxidant capacity versus chemical safety of wheat bread enriched with pomegranate peel powder.* Food & function, 2013. **4**(5): p. 722-727.
[14] Ventura, J., et al., *Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels.* Food chemistry, 2013. **136**(1): p. 109-115.
[15] Kennas, A., et al., *Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder.* Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2020. **19**(1): p. 99-108.
[16] Kumar, N., et al., *Effects of drying methods and solvent extraction on quantification of major bioactive compounds in pomegranate peel waste using HPLC.* Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 8000.
[17] Li, B., B. Smith, and M.M. Hossain, *Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method.* Separation and purification technology, 2006. **48**(2): p. 189-196.
[18] Çam, M. and Y. Hışıl, *Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels.* Food chemistry, 2010. **123**(3): p. 878-885.
[19] Singh, M., et al., *Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril.* Journal of Food Science and Technology, 2014. **51**: p. 2070-2077.
[20] Shalini Malviya, S.M., et al., *Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts.* 2014.
[21] Farhoosh, R., J. Tavakoli, and M.H.H. Khodaparast, *Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of Pistacia atlantica in Iran.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008. **85**: p. 723-729.
[22] Arjeh, E., et al., *Phenolic compounds of sugar beet (Beta vulgaris L.): Separation method, chemical characterization, and biological properties.* Food Science & Nutrition, 2022. **10**(12): p. 4238-4246.
[23] Saray Tarkasheh, S., et al., *Investigating the Structural and Physicochemical Properties of Vicia ervilia Protein Isolate/Launaea acanthodes Gum Nanocomposite Film Containing Graphene Oxide Nanoparticles and Silybum marianum Extract Microcapsules.* Journal of Polymers and the Environment, 2024: p. 1-22.
[24] Lapornik, B., M. Prošek, and A.G. Wondra, *Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time.* Journal of food engineering, 2005. **71**(2): p. 214-222.
[25] Mandal, V., Y. Mohan, and S. Hemalatha, *Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for*

medicinal plant research. Pharmacognosy reviews, 2007. **1**(1): p. 7-18.
[26] Setlhodi, R., et al., *Effect of solvent extraction on the antioxidant and phytochemical profiles of ellagitannins from "wonderful" pomegranate peel: an advanced chemometrics analysis.* European Food Research and Technology, 2023. **249**(7): p. 1807-1820.
[27] Nikmaram, P., et al., *Evaluation and prediction of metabolite production, antioxidant activities, and survival of Lactobacillus casei 431 in a pomegranate juice supplemented yogurt drink using support vector regression.* Food science and biotechnology, 2015. **24**: p. 2105-2112.
[28] Singh, J., et al., *Pomegranate peel phytochemistry, pharmacological properties, methods of extraction, and its application: a comprehensive review.* ACS omega, 2023. **8**(39): p. 35452-35469.
[29] Rangan, C. and D.G. Barceloux, *Food additives and sensitivities.* Disease-a-month: DM, 2009. **55**(5): p. 292-311.
[30] Chen, J., et al., *Antimicrobial activity of pomegranate peel and its applications on food preservation.* Journal of Food Quality, 2020. **2020**(1): p. 8850339.
[31] Ismail, T., et al., *Antioxidant, antimicrobial and urease inhibitory activities of phenolics-rich pomegranate peel hydro-alcoholic extracts.* Journal of Food Biochemistry, 2016. **40**(4): p. 550-558.
[32] Buazzi, M.M. and E.H. Marth, *Mechanisms in the inhibition ofListeria monocytogenes by potassium sorbate.* Food microbiology, 1991. **8**(3): p. 249-256.
[33] Das, K., R. Tiwari, and D. Shrivastava, *Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends.* Journal of medicinal plants research, 2010. **4**(2): p. 104-111.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigation of biochemical properties and antifungal activity of pomegranate peel extract using different solvents

Elham Azarpazhooh[1], Shahin Zomorodi[2*], Parvin Sharayei[1]

1- Agricultural Engineering Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
2-Agricultural Engineering Research Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received:

Accepted:

Keywords:

extraction,
pomegranate peel,
solvent,
effective compounds,
Antifungal.

DOI: 10.22034/FSCT.22.161.297.

*Corresponding Author E-

s.zomorodi@areeo.ac.ir

ABSTRACT

The results showed that the Ferric reducing activity of plasma (RRAP) and free radical scavenging activity (DPPH) in extracts obtained with 70% methanol were higher than those with other solvents. Also, in water and methanol solvents, with increasing extraction time, the amount of polyphenol compounds and FRAP were the highest and the lowest, respectively, but the increase of DPPH was the highest in ethanol solvent and the lowest in methanol solvent. The results of the investigation of the antifungal effects of the methanol extract of pomegranate peel (MEPP) showed that this extract with a concentration of 0.3% had an antifungal effect nearly equivalent to that of potassium sorbate at a concentration of 0.1%, so that the mean diameter on the diameter of *Aspergillus niger* growth inhibition zone was 17.7 mm for pomegranate peel extract and 18.3 mm for potassium sorbate. Therefore, pomegranate peel extract can be used in food products as antioxidant compounds and preservatives as a natural and effective alternative to chemical preservatives like potassium sorbate.