

بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال از تفاله انگور سیاه سردشت به روش‌های فراصوت و غرقابی با استفاده از متدولوژی سطح پاسخ

سارا متینی^۱، سیدعلی مرتضوی^{۲*}، علیرضا صادقیان^۳، اکرم شریفی^۴

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۳- استادیار، انستیتوی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

۴- گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۰۲)

چکیده

انگور سیاه قرمز (*Vitis Viniferae cv Rash*) یکی از مهم‌ترین ارقام انگور در استان آذربایجان غربی است که عمدتاً جهت تولید آب انگور مورد استفاده قرار می‌گیرد. تفاله انگور سیاه سردشت منبع ارزان و غنی از ترکیبات زیست فعال است. در این تحقیق فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال موجود در تفاله انگور سیاه سردشت با استفاده از دو روش غرقابی و فراصوت و بهینه‌سازی فرایندهای استخراج به روش سطح پاسخ انجام گرفت. جهت پیش‌بینی رفتار نمونه‌ها، مدل چندجمله‌ای درجه‌ی دوم و از طرح مربع مرکزی برای بهینه‌سازی شرایط استخراج به روش غرقابی و فراصوت مورد استفاده قرار گرفت، تأثیر شرایط عملیاتی (دما و زمان) بر محتوی ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش سطح پاسخ ارزیابی شد. شرایط بهینه به شرح زیر بود: مدت زمان ۲۴ ساعت و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای استخراج به روش غرقابی و مدت زمان ۱۵ دقیقه و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای استخراج به کمک فراصوت. در این شرایط، برای استخراج به روش غرقابی میزان ترکیبات فنلی ۹۶۷۷۹ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره، آنتوسیانین ۱۱۸/۳۴۵ میلی‌گرم در لیتر و فعالیت آنتی‌اکسیدان ۵۵/۴۹۱۹ درصد و برای استخراج به کمک فراصوت، ترکیبات فنلی ۱۱۴/۱۱۵ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره، آنتوسیانین ۱۲۱/۶۴۵ گرم در لیتر و فعالیت آنتی‌اکسیدان ۶۴/۸۹ درصد بود. نتایج این تحقیق نشان داد که روش فراصوت نسبت به غرقابی روش بهتری جهت استخراج ترکیبات زیست فعال تفاله انگور سیاه سردشت هست، همچنین می‌توان راندمان استخراج انگور سیاه را با بهینه‌سازی فرایند استخراج توسط روش سطح پاسخ افزایش داد.

کلید واژگان: آنتوسیانین، غرقابی، ترکیبات فنلی، روش سطح پاسخ، استخراج به کمک فراصوت، انگور سیاه سردشت

*مسئول مکاتبات: morteza1937@yahoo.com

۱- مقدمه

انگور به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات زیست فعال شناخته شده است. درصد رطوبت آن از ۵۰ تا ۷۲ درصد، محتوای لیگنین آن بین ۱۶/۸ تا ۲۴/۲ درصد و پروتئین آن پایین‌تر از ۴ درصد است. انگور برداشت شده عمدتاً جهت تولید آب‌انگور مورد مصرف قرار می‌گیرد و تفاله انگور یکی از محصولات جانبی با ارزش کارخانجات فراوری انگور می‌باشد. مواد پکتیکی، پلیمرهای اصلی تشکیل‌دهنده دیواره سلولی در تفاله انگور هستند. تفاله انگور حاوی پلی‌فنل‌ها (آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، فلاوانول‌ها، فنولیک اسید و زورراتول، اسیدسیتریک) است [۱]. ترکیبات فنلی موجود در انگور دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی است که از سرطان و آترواسکلروز جلوگیری می‌کند [۲]. ثابت شده است که آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنولی در انگور قرمز و سیاه اثرات مثبتی بر سلامت به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارند. ترکیبات آنتوسیانین‌موجود در انگور به عنوان رنگ‌دانه طبیعی شناخته شده‌اند و می‌توانند در محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرند [۳].

انگور سیاه سردشت (*Vitis Viniferae cv. Rash*) یکی از واریته‌های انگور است که به‌صورت طبیعی در مناطق کوهستانی شهرستان سردشت رشد می‌کند. انگورهای سیاه سردشت به دلیل رشد طبیعی و استفاده نکردن از کودها و سموم شیمیایی ارزش غذایی بالایی دارند. در تفاله و گوشت انگور سیاه، مقدار زیادی ویتامین C، بتاکاروتن، ویتامین E و آنتوسیانین وجود دارد. انگور سیاه سردشت عمدتاً برای تولید آب انگور در ایران استفاده می‌شود. تفاله انگور سیاه منبع ارزانی از ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها هستند که استخراج بهینه آن‌ها می‌تواند مزایای اقتصادی به همراه داشته باشد.

انتخاب روش مناسب برای استخراج ترکیبات زیست فعال از ماتریکس با حداقل ناخالصی و همچنین حفظ فعالیت بیولوژیکی آن در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. برای استخراج ترکیبات زیست فعال، چندین روش سنتی و مدرن مورد استفاده قرار گرفته است. تکنیک‌های سنتی اغلب زمان‌بر بوده و نیاز به مقدار زیادی از حلال‌ها دارد. علاوه بر این، بسیاری از مواد فعال ممکن است هنگام استخراج از بین بروند [۴]. در سال‌های اخیر، روش‌های مختلف استخراج که باعث کاهش مصرف حلال و سرعت بخشیدن به فرآیند

استخراج شده است، از جمله استخراج به کمک فراصوت [۵]، حرارت دادن اهمی [۶]، میدان الکتریکی پالسی [۷]، ماکروویو [۸]، سیال فوق بحرانی [۹] و حلال‌های شتاب‌دهنده [۱۰] مورد مطالعه قرار گرفته است. در بین روش‌های مورد استفاده، استخراج به کمک فراصوت به دلیل سادگی و تجهیزات کم‌هزینه، جهت استخراج ترکیبات گیاهی به منظور کوتاه کردن زمان استخراج، کاهش مصرف حلال، افزایش بازده استخراج و بهبود کیفیت عصاره‌ها استفاده شده است [۵].

روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از روش‌های آماری برای طراحی آزمایش‌ها، مدل‌سازی و بررسی اثر فاکتورها بر نتایج نهایی و در نهایت بهینه‌سازی فرایند می‌باشد. یکی از مزیت‌های این روش، کم کردن تعداد آزمایش‌های موردنیاز برای به دست آوردن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل آماری می‌باشد. این روش به‌طور گسترده‌ای در مطالعات بهینه‌سازی چند متغیره در فرآیندهای مهندسی، تحقیقات صنعتی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱].

پژوهش‌هایی در زمینه استخراج ترکیبات زیست فعال از انگور با روش‌های مختلف به چاپ رسیده است، بورین و همکاران (۲۰۱۴) ترکیبات زیست فعال تفاله انگور قرمز و سفید را در شرایط متفاوت با استفاده از حلال‌های مختلف استخراج کردند. نتایج نشان داد استخراج با اتانول بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با دیگر حلال‌ها داشت. نتایج HPLC نشان داد که گالیک اسید و سینامیک اسید ترکیبات فنولی اصلی در تفاله انگور بودند [۱۲]. پورعلی و همکاران (۲۰۱۴) نیز ترکیبات فنولی تفاله انگور را با استفاده از روش فولین سیوکالته Folin-Ciocalteu تعیین مقدار کردند. محتوای ترکیبات فنولی از تفاله انگور ۸/۳۳ میلی‌گرم تانیک اسید بود. بالاترین ترکیبات فنولی در عصاره دانه انگور (۱۱۶/۷۳ گرم اسید گالیک / ۱۰۰ گرم)، عصاره تفاله انگور (۷۵/۲۰ گرم اسید گالیک / ۱۰۰ گرم) و عصاره کل انگور (۴۸/۰۴ گرم اسید گالیک / ۱۰۰ گرم) تعیین شد [۱].

پژوهش‌های متعددی در خصوص انگور سیاه سردشت منتشر شده است. حیدری و همکاران (۲۰۰۴) آنتوسیانین‌های میوه انگور سیاه سردشت را با استفاده از ستون رزین تعویض کاتیونی خالص‌سازی کرده و با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان آنتوسیانین‌های انگور سیاه سردشت در حدود ۸۰ mg/L

۵ گرم نمونه تفاله خشک‌شده، با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ مخلوط شده و در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های (۱۲، ۱۸، ۲۴ ساعت) توسط دستگاه همزن مغناطیسی با دور ۲۱۰rpm هم زده شدند. سپس عصاره استخراج‌شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ و پمپ خلأ از مواد جامد گیاهی جدا گردید و در مرحله بعد به‌منظور حذف حلال، عصاره‌های صاف‌شده در دستگاه روتاری (Model EI141, Buchi, Switzerland) تحت عملیات تقطیر در خلأ تا رسیدن به درصد ماده جامد کل ثابت $14 \pm 0.2\%$ (تعیین‌شده با استفاده از رفاکتومتر دیجیتالی مدل Atago-RX-5000a، ساخت شرکت آتاگوی ژاپن) قرار گرفتند. سپس درب پلیت‌ها بسته و با فویل آلومینیومی پوشانده شد و در ۴درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمون نگهداری شدند [۱۵].

۲-۴- استخراج به کمک فراصوت

پودر تفاله انگور از فریزر خارج‌شده و با حلال اتانول (۹۵٪) - اسیدکلریدریک (۱/۵ مولار) به نسبت ۱ به ۸ باهم مخلوط شدند و درون دستگاه حمام اولتراسونیک Heilscher (Germany Model Up200 h) در دماهای مختلف (۳۵، ۴۵، ۵۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های (۱۵، ۲۲/۵۰، ۳۰) و در معرض طول‌موج ثابت ۳۵kHz و توان ۳۰۰ وات قرار گرفتند. سپس عصاره استخراج‌شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۵ (Slow) و پمپ خلأ از مواد جامد گیاهی جدا گردید و در مرحله بعد به‌منظور حذف حلال، عصاره‌های حاصل در دستگاه روتاری (Model EI141, Buchi, Switzerland) تحت عملیات تقطیر در خلأ قرار گرفتند. درنهایت عصاره به پلیت‌های شیشه‌ای منتقل‌شده و روی حمام آب (Model LAUDA E200, Germany) در دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد باقی‌مانده حلال حذف و عصاره خشک گردید. سپس درب پلیت‌ها بسته و با فویل آلومینیومی پوشانده شد و در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمون نگهداری شدند [۱۶].

۲-۵- اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی

مقدار کل ترکیبات فنلی به روش فولین سیوکالته تعیین شد. به‌این‌ترتیب که مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۱۰ درصد فولین سیوکالته مخلوط شد و بعد از ۳ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ درصد کربنات سدیم (۷۵)

۳/۵۸ ± ۱۱/۱۷ بود [۱۳]. علمی کشتیان و اسمعیلی (۲۰۱۹) استخراج ترکیبات فنلی موجود در پوست انگور سیاه سردشت را با استفاده از فراصوت و آب زیر بحرانی مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه، ترکیبی از فراصوت با قدرت ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۱ کیلوهرتز و آب زیر بحرانی در ۱۰۰-۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲۰-۴۰ بار برای استخراج ترکیبات فنلی از پوست انگور سیاه سردشت در مدت زمان استخراج ۱۵-۳۰ دقیقه به‌کار گرفته شد. نتایج نشان داد که دما، فشار، زمان و استفاده از فراصوت بر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده اثر معنی‌داری داشت. بیشترین میزان استخراج کل فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدان‌ها، رنگ و عملکرد استخراج، در بالاترین دما، فشار و زمان استخراج همراه با پیش‌تیمار فراصوت انجام شد [۱۴].

در مطالعه حاضر، فرایند استخراج ترکیبات زیست‌فعال موجود در تفاله انگور سیاه سردشت با استفاده از دو روش غرقابی و فراصوت و بهینه‌سازی فرایندهای استخراج به روش سطح پاسخ انجام گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی نمونه‌ها

تفاله انگور سیاه سردشت از ضایعات کارخانه آبیگری پاکدیس ارومیه تهیه شد. سپس توسط آون تحت خلأ (Lab Tech, South Korea) در دمای ۴۵°C خشک و توسط خردکن برقی (Black & Decker Model no. JBG60, USA) به‌دقت خرد شد و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش ۸۰ الک گردید. پودر به‌دست‌آمده تا پایان آزمایش‌ها در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای فریزر (۱۸°C-) نگهداری شد. کلیه آزمایش‌ها این تحقیق با استفاده از مواد شیمیایی ساخت شرکت آلمانی مرک (Merk) انجام گرفت.

۲-۲- تهیه عصاره

با توجه به نتایج مطالعات پیشین [۱۵] اتانول به‌عنوان حلال استخراج‌کننده انتخاب شد و عصاره با استفاده از روش‌های زیر استخراج گردید:

۲-۳- استخراج با استفاده از روش غرقابی

میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ مولار به ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره سانتریفوژ شده اضافه گردید و در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت نگهداری شد. جذب نمونه های تهیه شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج اندازه گیری شد و اسید کلریدریک ۱ مولار به عنوان نمونه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت غلظت آنتوسیانین ها (میلی گرم بر میلی لیتر) از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Total anthocyanins (mg/ml)} = A \times D \times 1000 / B$$

در رابطه فوق؛ A، B به ترتیب جذب نمونه و محلول malvidin-3-glucoside٪ است و D فاکتور رقت است.

۸-۲- طراحی آزمایش ها

پارامترهای فرایند استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. برای این منظور از طرح مرکب مرکزی با تعداد ۱۱ تیمار و ۳ تکرار در نقاط مرکزی استفاده گردید. فاکتورهای متغیر در فراصوت شامل دما (A: ۳۵-۵۵ درجه سانتی گراد) و زمان (B: ۱۵-۳۰ دقیقه) و در غرقابی دما (A: ۲۵-۳۵ درجه سانتی گراد) و زمان (B: ۱۲-۲۴ ساعت) بود. مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل مورد استفاده در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار ۷.۵.۱ Design expert انجام شد. داده های تجربی با کمک مدل چند جمله ای درجه دوم برای هر یک از روش های استخراج به طور جداگانه به صورت زیر برآزش شدند:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{12}AB$$

در معادله فوق، Y بیانگر پاسخ های مورد نظر شامل محتوای ترکیبات فنولی (میلی گرم اسید گالیک در ۱۰۰ میلی لیتر)، میزان آنتوسیانین (میلی گرم در لیتر)، درصد فعالیت آنتی اکسیدانی و b_n نشان دهنده ضرایب رگرسیون هست. این ضرایب اثرات خطی، دو جمله ای و نیز اثرات متقابل فاکتورهای متغیر فرایند را بیان می کنند. مقادیر A و B به ترتیب نشان دهنده فاکتورهای مستقل فرایند شامل دما و زمان هستند.

گرم در لیتر) به آن اضافه، سپس جذب نمونه در دستگاه اسپکتروفتومتر (SINCO, Seoul, South Korea) در ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک موجود در ۱۰۰ میلی لیتر عصاره استخراجی گزارش گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از رقت های ۷۰۰-۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک استاندارد به صورت هفت نقطه ای استفاده شد [۱۷].

۶-۲- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

استخراج شده به روش DPPH

خاصیت آنتی رادیکالی عصاره استخراج شده بر اساس توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون در عصاره های اتانولی یا میزان بی رنگ کردن محلول بنفش 2-2 دی فنیل-۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد سنجش قرار گرفت [۱۷]. ابتدا عصاره اتانولی با مخلوط کردن ۱۰ میلی لیتر عصاره استخراجی با ۴۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد و ۴ ساعت هم زدن و دو بار صاف کردن تولید شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از این عصاره به ۳/۵ محلول ۰/۰۴ درصد DPPH در اتانول اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه تاریک گذاری در دمای اتاق، جذب نمونه هادر طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{TAA (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

۷-۲- اندازه گیری آنتوسیانین به روش pH

افتراقی

روش معرفی شده توسط ایلند و همکاران (۱۹۶۸) [۱۸] و اصلاح شده توسط غفور و همکاران (۲۰۰۹) [۱۹] برای اندازه گیری آنتوسیانین ها مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که ۱ میلی لیتر از نمونه با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۵۰٪ مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (مدل Centric 150، کمپانی دامل Domel) گردید. سپس ۳/۸

Table 1 Coded levels of independent variables used in the RSM design for maceration method

Independent variables	Coded levels		
	+1	0	-1
Temperature (A °C)	25	30	35
Time(B h)	12	18	24

Table 2 Coded levels of independent variables used in the RSM design for ultrasound assisted extraction method

Independent variables	Coded levels		
	+1	0	-1
Temperature (A °C)	35	45	55
Time(B min)	15	22	30

همانطوریکه در جدول ۳ نشان داده شده است، جملاتخطی زمان (B) و دمای استخراج (A) بیشترین تأثیر معنی‌دار را بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده داشته‌اند (شکل ۱). اثر معنی‌داری بر روی فاکتورهای مربع دما (A^2)، زمان (B^2) یا اثر متقابل دما و زمان، بر روی قدرت آنتی‌اکسیدانی (AB) مشاهده نشد. به همین دلیل این پارامترها از مدل حذف شد (جدول ۳). با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش شده برای این پاسخ به صورت زیر می‌باشد.

$$Y = + 51.38 + 2.17 A + 1.95 B$$

بر اساس یافته‌های ارائه شده در جدول ۳ ضریب رگرسیون ($R^2 = 0.75$) مدل پیش‌بینی شده و عدم تناسب ($P = 0.3185 > 0.05$)، مدل پیشنهادی می‌تواند پاسخ دقیق را پیش‌بینی کند. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. افزایش دما و زمان استخراج باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- برازش مدل

مدل مناسب با توجه به معنی‌دار بودن آزمون F ($P \leq 0.05$) و معنی‌دار نبودن فقدان برازش ($P \leq 0.05$) و همچنین مقادیر R^2 و R^2 تعدیل شده و ضریب تغییرات انتخاب شد. با توجه به جداول تجزیه واریانس می‌توان دریافت که مدل برازش داده شده برای تمام پارامترهای مورد بررسی کاملاً معنی‌دار است ($P \leq 0.01$) جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه به جدول تجزیه واریانس، جملات فاقد آزمون F معنی‌دار ($P \geq 0.05$) از مدل حذف و سایر جملات که دارای اختلاف معنی‌دار بودند، در مدل حفظ شدند [۲۰].

۳-۲- تأثیر دما و زمان در روش استخراج به روش غرقابی روی قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره

Table 3. Regression coefficients, R^2 , and P for dependent variables (maceration methods), all the factors with non-significant F- test values were removed from the model.

Regression coefficient of variables	Antioxidant activity (%)	TPC (mg GAE/100 ml)	Anthocyanins content (mg/ml)
b_0 (intercept)	51.38	87.96	97.28
$b_1(A)$	2.17*	1.57*	6.7*
$b_1(B)$	1.95*	7.25*	-
$b_{11}(A^2)$	-	-	12.53*
$b_{22}(B^2)$	-	-	-
$b_{12}(AB)$	-	-	4*
R^2	0.75	0.80	0.98
Lack of Fit	0.3185 ^{ns}	0.0703 ^{ns}	0.8481 ^{ns}
P or probability	0.0141*	0.0003*	0.0001*

ترکیبات فنولی شده که این اثرات، می‌تواند انتقال جرم را بهبود دهد. این امر نیز افزایش میزان استخراج ترکیبات فوق در دماهای بالاتر استخراج را به دنبال دارد [۲۲].

بر اساس یافته‌های فوق، اثر دما و زمان بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابه تأثیر این پارامترها بر روی ترکیبات فنلی بوده است. گزارش شده است که میزان ترکیبات فنولی تأثیر بسزایی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که این امر به دلیل قابلیت احیاکنندگی بالای این ترکیبات و نیز توانایی دادن هیدروژن به رادیکال‌های فعالی نظیر DPPH می‌باشد [۲۴].

با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش داده‌شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = +.87/96 + 1/57A + .7/25B$$

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۸۰ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش ۰/۰۷۰۳ بود. این مقادیر نشان می‌دهد که مدل ارائه‌شده می‌تواند به خوبی پاسخ موردنظر را پیش‌بینی نماید.

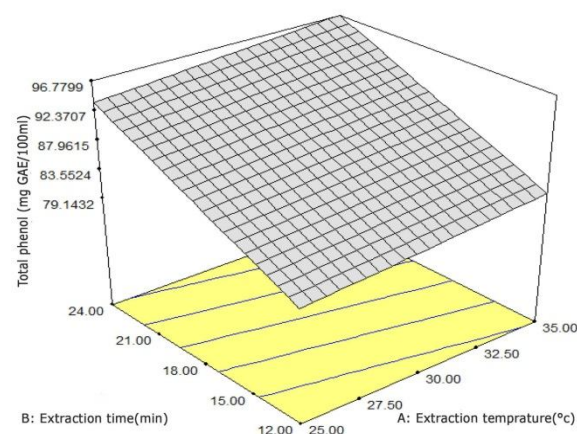


Fig 2 The effects of independent variables (maceration time and temperature) on the level of TPC

۳-۴- تأثیر دما و زمان در روش استخراج به

روش غرقابی روی محتوای آنتوسیانین

در شکل ۳ اثر فاکتورهای مستقل دما و زمان استخراج بر میزان استخراج آنتوسیانین نشان داده شده است. افزایش دمای استخراج منجر به افزایش بازده استخراج آنتوسیانین‌ها شد؛ اما زمان تأثیر کمتری بر پاسخ موردنظر داشت. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، جمله درجه دوم دما (A^2) بیشترین تأثیر مثبت، جمله A و جمله اثر متقابل (A-B) نیز اثر مثبت بر میزان آنتوسیانین داشتند؛ اما جملات خطی زمان (B) و نیز

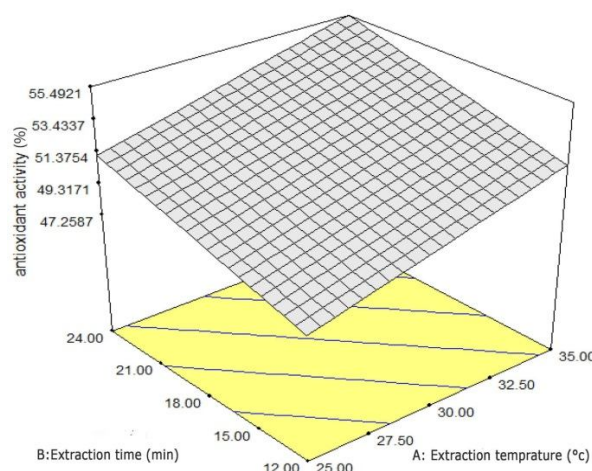


Fig 1 The effects of independent variables (maceration time and temperature) on the level of antioxidant activity.

بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش استخراج به روش غرقابی در شرایط استخراج ۳۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت قابل استحصال است. نتایج تحقیق Azizah و روسلاوتی (۱۹۹۹) نیز نشان داد که ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراج‌شده در دماهای بالا (به جز بالای ۹۰ درجه سانتی‌گراد) پایدار بودند [۲۱]؛ بنابراین تأثیر مثبت دماهای بالا در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی نیز قابل توجه می‌باشد.

۳-۳- تأثیر دما و زمان در روش استخراج به

روش غرقابی روی محتوای ترکیبات فنلی

عصاره

جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که جملات خطی زمان (B) و دمای استخراج (A) تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی داشتند. شکل ۲ اثر فاکتورهای مستقل بر میزان ترکیبات فنولی را نشان می‌دهد که افزایش دما و زمان منجر به افزایش بازده استخراج ترکیبات فنولیک شده است. با بررسی مقادیر عددی ضرایب برای دما و زمان می‌توان دریافت که زمان تأثیر بیشتری بر میزان استخراج ترکیبات فنولی داشته است. اثر مشاهده‌شده توسط زمان را می‌توان به افزایش مدت زمان انتقال جرم نسبت داد [۲۲]. اثر مثبت دما در افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی نیز توسط محققین زیادی به اثبات رسیده است [۲۳]. در واقع دماهای بالاتر استخراج می‌تواند منجر به نرم شدن بافت گیاهی، تخریب اتصالات ترکیبات فنولی با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها و افزایش قابلیت انحلال

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی‌شده در مورد پاسخ فوق ۰/۹۸ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش نیز ۰/۸۴۸۱ بود؛ بنابراین مدل ارائه شده در معادله‌ی فوق برازش مناسبی برای پاسخ مورد نظر ارائه می‌دهد.

۳-۵- تأثیر دما و زمان در روش استخراج به کمک فراصوت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

عصاره تفاله انگور که توسط استخراج به کمک فراصوت به دست آمد، دارای پتانسیل بالایی برای مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود. جمله خطی دمای استخراج (A) بیشترین تأثیر مثبت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی را داشت؛ اما جمله خطی زمان استخراج (B) تأثیر معناداری در مدل برازش داده شده نداشت (شکل ۴، جدول ۴). این نتایج با داده‌های حاصل از شرایط استخراج میوه انجیر موافقت خوبی دارد [۲۵]. توانایی استفاده از فراصوت برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال به منظور بهبود قابلیت استخراج و کاهش زمان فرایند به اثبات رسیده است [۲۶]. نتایج تحقیق التیمی و همکاران (۲۰۱۶) بر روی استخراج ترکیبات فنلیه کمک فراصوت از هلو و کدو تنبل نشان داد که بیشترین میزان DPPH زمانی حاصل شد که زمان استخراج ۲۵.۷۱ دقیقه و راندمان استخراج به ترتیب ۵۶.۰۱٪ بود [۲۵]. این یافته‌ها با نتایج حسینی و همکاران (۲۰۱۲) نیز مطابقت داشت [۲۸] که نشان دادند که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به افزایش قدرت فراصوت و زمان مناسب برای شکافت دیواره سلولی است که منجر به افزایش انتقال جرم در غشای سلولی می‌شود.

جملات درجه دوم زمان (B^2) تأثیر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین در محدوده تعریف شده نداشتند و از مدل حذف شدند. نتایج نشان داد که بالاترین میزان استخراج آنتوسیانین‌ها در مدت‌زمان بالاتر حاصل شده است.

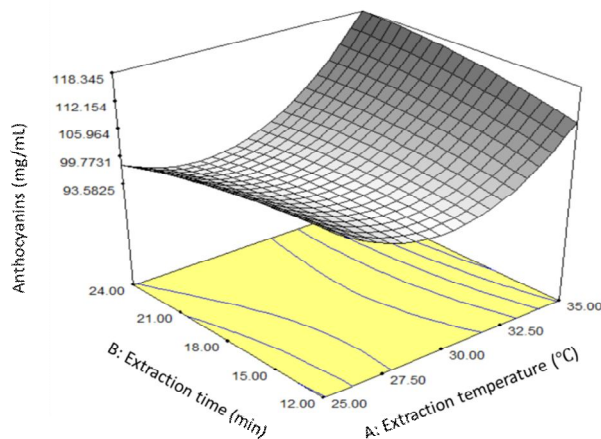


Fig 3 The effects of independent variables (maceration time and temperature) on the level of anthocyanins content

دلیل این امر را می‌توان به افزایش مدت‌زمان انتقال جرم نسبت داد [۱۶]. مشاهده فوق با نتایج حاصل از تحقیق Chumsri و همکاران (۲۰۰۸) در مورد چای ترش کاملاً همخوانی دارد [۲۴]. این محققین نیز کاهش میزان آنتوسیانین استخراج‌شده در دما و زمان‌های طولانی استخراج را گزارش کردند. تخریب آنتوسیانین‌ها به فاکتورهای متعددی نظیر pH، دما حضور ویتامین ث و اکسیژن بستگی دارد [۲۵]. معادله برازش داده‌شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = +97.28 + 6.7A + 12.53 A^2 + 4 AB$$

Table 4 Regression coefficients, R^2 , and P for dependent variables (ultrasound assisted extraction methods), all the factors with non-significant F- test values were removed from the model.

Regression coefficient of variables	Antioxidant activity (%)	TPC (mg GAE/100 ml)	Anthocyanins content (mg/ml)
b_0 (intercept)	57.01	100.19	113.48
$b_1(A)$	8.85*	5.05*	5.16*
$b_1(B)$	-	8.87*	-
$b_{11}(A^2)$	-	-	-5.41*
$b_{22}(B^2)$	-	-	-
$b_{12}(AB)$	-	-	-8.15*
R^2	0.71	0.71	0.85
Lack of Fit	0.1409 ^{ns}	0.2624 ^{ns}	0.7964 ^{ns}
P or probability	0.0033*	0.0268*	0.0090*

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۷۱ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش ۰/۲۶۲۴ بود.

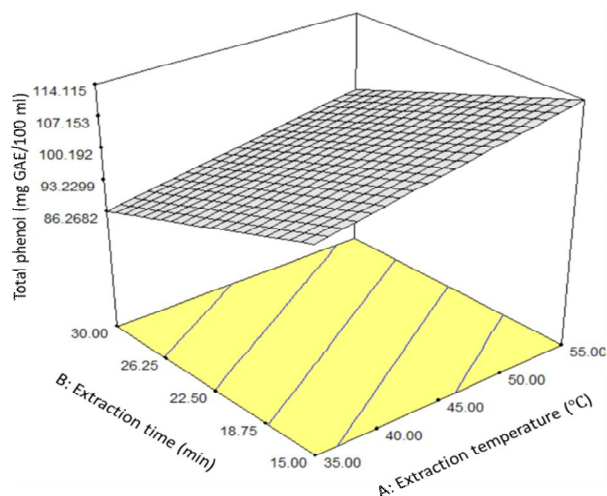


Fig 5 The effects of independent variables (ultrasound assisted extraction time and temperature) on the level of TPC

۳-۷- تأثیر دما و زمان در روش استخراج به روش اولتراسونیک روی محتوای آنتوسیانین

در شکل ۶ اثر فاکتورهای مستقل بر میزان آنتوسیانین نشان داده شده است. در مورد آنتوسیانین نیز افزایش فاکتور دمای استخراج منجر به افزایش بازده آنتوسیانین شد. با بررسی جدول تجزیه واریانس (جدول ۶) می‌توان دریافت که تنها جملاتخطی (A) و درجه‌ی دوم دما (A^2) و نیز جمله خطی اثر متقابل دما و زمان (AB) تأثیر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین داشتند. استفاده از فراصوت برای استخراج ترکیبات گیاهی از قبیل آنتوسیانین‌ها به‌عنوان یک روش کارآمد برای به تخریب دیواره‌های سلولی، افزایش سرعت انتقال جرم گزارش شده است [۳۱].

معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = +113.48 + 5.16 A - 5.41 A^2 - 8.15 AB$$

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۸۵ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش نیز ۰/۷۹۶۴ بود؛ بنابراین مدل ارائه شده در معادله‌ی فوق برازش مناسبی برای پاسخ مورد نظر ارائه می‌دهد.

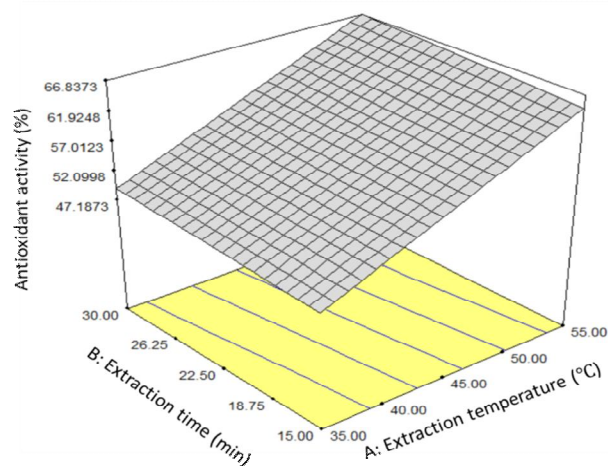


Fig 4 The effects of independent variables (ultrasound assisted extraction time and temperature) on the level of antioxidant activity.

با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = + 57.01 + 8.85 A$$

ضریب تبیین (R^2) مدل پیش‌بینی شده در مورد پاسخ فوق ۰/۷۱ و مقدار P برای آزمون فقدان برازش ۰/۱۴۰۹ بود.

۳-۶- تأثیر دما و زمان در روش استخراج به روش فراصوت روی محتوای ترکیبات فنولی

شکل ۵ اثر زمان و دمای استخراج به روش اولتراسونیکاسیون، بر محتوای ترکیبات فنولی عصاره استخراج شده از تفاله انگور سیاه سردشت را نشان می‌دهد. پارامتر خطی زمان (B) و دمای استخراج تأثیر معنی‌داری بر روی میزان ترکیبات فنولی داشتند (جدول ۴). افزایش دما و زمان منجر به افزایش بازده استخراج ترکیبات فنولی شد افزایش دما می‌تواند منجر به افزایش فشار بخار ترکیبات قابل استخراج شده و در نتیجه سبب افزایش تمایل این ترکیبات به خروج از دیواره سلولی شود [۲۹]. با افزایش زمان سونیکاسیون از ۱۰ دقیقه به ۲۵/۶۷ دقیقه میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از هلو و کدوتنبل نیز افزایش نشان داد [۲۷]. کو و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که با افزایش زمان سونیکاسیون از ۵ دقیقه تا ۱۵ دقیقه راندمان استخراج ترکیبات فنولی از عناب افزایش می‌یابد [۳۰].

با توجه به پارامترهای دارای اثر معنی‌دار، معادله برازش داده شده در مورد این پاسخ به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = + 100.19 + 5.05 A \sqrt{A} - B$$

۳-۸- بهینه‌سازی شرایط استخراج

شرایط بهینه فرآیند استخراج به روش غرقابی و استخراج به کمک فراصوت برای استحصال آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انگور سیاه سردشت به روش سطح پاسخ در جدول ۵ ارائه شده است. این مطالعه نشان داد که استخراج به کمک فراصوتیک روش مؤثر برای استخراج ترکیبات زیست فعال از تفاله انگور سیاه‌سردشت با استفاده از دما و زمان قابل قبول است. در روش استخراج با کمک التراسوند، ویژگی‌های فیزیکی (تخریب دیواره سلول‌های گیاهی و افزایش انتشار ترکیبات فنلی) و شیمیایی ماتریس گیاهی ممکن است توسط فرکانس التراسوند تحت تأثیر قرار گیرد.

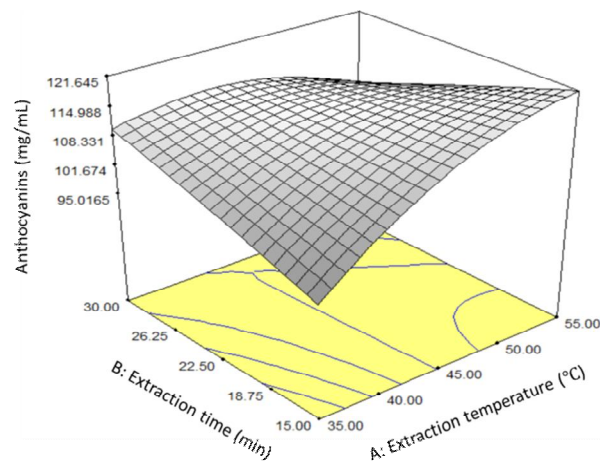


Fig 6 The effects of independent variables (ultrasound assisted extraction time and temperature) on the level of anthocyanins content

Table 5 The optimum ME and UAE conditions

	Temperature (°C)	Time (min)	Antioxidant activity (%)	TPC(mg GAE/100ml)	Total anthocyanins (mg/ml)	Desirability
ME	35	24	55.49	96.779	118.345	0.966
UAE	55	15	64.89	114.115	121.645	0.82

موفقیت به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات زیست فعال تفاله انگور سیاه سردشت مورد استفاده قرار گرفت.

۵- منابع

- [1] Pourali, A., Afrouziyeh, M. and Moghaddaszadeh-ahrabi, S., 2014. Extraction of phenolic compounds and quantification of the total phenol of grape pomace. *Eur J Exp Bio*, 4(1), pp.174-176.
- [2] Khodaei, J. and Akhijahani, H.S., 2012. Some physical properties of Rasa grape (*Vitis vinifera* L.). *World Applied Sciences Journal*, 18(6), pp.818-825.
- [3] Sharifi, A., Niakousari, M., Mortazavi, S.A. and Elhamirad, A.H., 2019. High-pressure CO₂ extraction of bioactive compounds of barberry fruit (*Berberis vulgaris*): process optimization and compounds characterization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), pp.1139-1146.
- [4] Aspé, E. and Fernández, K., 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-

۴- نتیجه گیری کلی

انگور سیاه سردشت یکی از مهم‌ترین ارقام انگور در استان آذربایجان غربی است و به‌طور عمده برای تولید آب انگور استفاده می‌شود. تفاله انگور سیاه منبع ارزانی از ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها هستند که مزایای اقتصادی مهمی را به وجود می‌آورند. در این تحقیق شرایط استخراج مواد زیستی از تفاله انگور سیاه پوست سردسته به‌صورت زیر بهینه شد: زمان استخراج ۲۴ ساعت و دما ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای استخراج به روش غرقابی و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه برای استخراج به کم فراصوت. در این شرایط، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌دست‌آمده با روش‌های غرقابی و فراصوت به ترتیب ۹۶/۷۷۹ میلی‌گرم / ۱۰۰ GAE / میلی‌لیتر، ۱۱۸.۳۴۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۵۵.۴۹ درصد و ۱۱۴.۱۱۵ میلی‌گرم / ۱۰۰ GAE / میلی‌لیتر، ۱۲۱.۶۴۵ میلی‌گرم / لیتر، ۶۴/۸۹ درصد بود. این مطالعه نشان داد که استخراج به کمک فراصوتیک روش مؤثر برای استخراج ترکیبات زیست فعال از تفاله انگور سیاه‌سردشت است. روش سطح پاسخ با

- pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, p.e14071.
- [15] Rouhani, S., VALIZADEH, N. and Salimi, S., 2009. Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of *Curcuma Longa* L. *Color Colorants Coat*, 2: 103-113.
- [16] Sharifi, A., Niakousari, M., Mortazavi, S.A. and Elhamirad, A.H., 2019. High-pressure CO₂ extraction of bioactive compounds of barberry fruit (*Berberis vulgaris*): process optimization and compounds characterization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), pp.1139-1146.
- [17] Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Rodríguez, K., Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., López, J. and Perez-Won, M., 2009. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117(4), pp.647-653.
- [18] Iland, P.G., Cynkar, W., Francis, I.L., Williams, P.J. and Coombe, B.G., 1996. Optimisation of methods for the determination of total and red - free glycosyl glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2(3), pp.171-178.
- [19] Ghafour, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y. and Jo, I.H., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), pp.4988-4994.
- [20] Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F. and Mortazavi, S.A., 2012. Multi-objective optimization of osmotic-ultrasonic pretreatments and hot-air drying of quince using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), pp.2098-2110.
- [21] Azizah, A.H., Ruslawati, N.N. and Tee, T.S., 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, 64(2), pp.199-202.
- [22] Gan, C.Y. and Latiff, A.A., 2011. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food chemistry*, 124(3), pp.1277-1283.
- radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Industrial Crops and Products*, 34(1), pp.838-844.
- [5] Maran, J.P., Manikandan, S., Nivetha, C.V. and 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, pp.S1145-S1157.
- [6] Brochier, B., Mercali, G.D. and Marczak, L.D.F., 2016. Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT*, 74, pp.396-403.
- [7] El Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N. and Maroun, R., 2013. Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), pp.1281-1289.
- [8] Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K. and O'Keefe, S., 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), pp.1185-1192.
- [9] Vatai, T., Škerget, M. and Knez, Ž., 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), pp.246-254.
- [11] Chang, C.Y., Lee, C.L. and Pan, T.M., 2006. Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(4), p.654.
- [12] Burin, V.M., Ferreira-Lima, N.E., Panceri, C.P. and Bordignon-Luiz, M.T., 2014. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, pp.155-163.
- [13] Heidari, R., Khalafi, J. and Dolatabadzadeh, N., 2004. Anthocyanin pigments of siahe sardasht grapes. *J. Sci. (Islamic Republic of Iran)*, 15(2), pp.113-117.
- [14] Elmi Kashtiban, A. and Esmaili, M., 2019. Extraction of phenolic compounds from Siah - Sardasht grape skin using subcritical water and ultrasound

- [28] Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C.P., Martin-Diana, A.B. and Barry-Ryan, C., 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(3), pp.582-590.
- [29] Reverchon, E. and De Marco, I., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), pp.146-166.
- [30] Qu, C., Yu, S., Luo, L., Zhao, Y. and Huang, Y., 2013. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* Mill. by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 7(1), p.160.
- [31] Barba, F.J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N. and Vorobiev, E., 2015. Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), pp.1139-1148.
- [23] Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J.C., Bryan, M. and Wu, Y., 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J. Food Agric. Environ*, 1(2), pp.42-47.
- [24] Chumsri, P., Sirichote, A. and Itharat, A., 2008. Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 30.
- [25] Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M. and Velić, D., 2011. Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), pp.195-199.
- [26] Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. and Wang, Z., 2007. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), pp.767-778.
- [27] Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary, R., Dasari, M.R. and Lightfoot, D.A., 2016. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins. *PLoS One*, 11(2), p.e0148758.

Optimization of Ultrasound Assisted and Maceration Extraction of Bioactive Compounds of Sardasht Black Grape residue by using Response Surface Methodology

Matini, S. ¹, Mortazavi, S. A. ^{1*}, Sadeghian, A. R. ², Sharifi, A. ³

1. Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
2. Department of Food processing, Research Institute of food science and technology (RIFST), Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

(Received: 2019/07/14 Accepted:2019/08/24)

Sardasht black grape (*Vitis Viniferae cv. Rash*) is one of the most important grape cultivars in west Azerbaijan province in Iran that mainly used for grape juice production. Black grape residues are a cheap source of bioactive compounds. In this research ultrasound-assisted (UAE) and maceration extraction (ME) were applied for bioactive compounds extraction of Sardasht black grape residues. A central composite design was used to obtain the optimal conditions of UAE and ME; the effects of operating conditions (temperature and time) on phenolic compounds, anthocyanin content and antioxidant activity were studied through response surface methodology (RSM). Optimized conditions were as follows: extraction time was 24 h, and temperature was 35°C for ME and 55°C and 15 min for UAE. Under these conditions the phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity obtained by ME and UAE methods were 96.779 mg GAE/100 ml, 118.345 mg/L, 55.49% and 114.115 mg GAE/100 ml, 121.645 mg/L, 64.89%, respectively. This study provides evidence that UAE is an effective technique for the extraction of bioactive compounds from Sardasht black grape residues.

Keywords: Anthocyanins, Maceration, Phenolic compounds, Response surface methodology, Sardasht black grape, Ultrasound-assisted extraction

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