مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی کارایی رنگ و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره آنتوسیانینی پودر پوست انار حاصل از استخراج با حلال

نیلوفر زاهد[۱]، رضا اسماعیل زاده کناری[۲*]، رضا فرهمندفر[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۲-استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۳-دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶

کلمات کلیدی:

pHافتراقی،

اتانول،

حرارت،

آنتی اکسیدان،

قدرت آنتی اکسیدانی.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.197

* مسئول مکاتبات:

Reza_kenari@yahoo.com

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی رنگ و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آنتوسیانینی پوست انار حاصل از استخراج با حلال بود. در این پژوهش از اتانول اسیدی شده و همچنین ترکیب آب با اتانول اسیدی شده به عنوان حلال استفاده شد. محتوی آنتوسیانین از طریق pH افتراقی، ترکیبات فنولی از روش فولین سیوکالتو، همچنین پایداری رنگ در دما، pH، و زمان بررسی شد و فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق آزمون DPPH صورت گرفت. بیشترین بازده استخراج مربوط به استخراج با حلال (اتانول- آب) با مقدار ۱/٤٤٥ ± ۷٦/۳٥۰٪ بود. نتایج نشان داد بیشترین میزان آنتوسیانین کل اندازه گیری شده مربوط به استخراج با حلال (اتانول- آب) ۰/۰۳۵ ± ۳/۱٤٦ میلی‌گرم سیانیدین-۳ گلوکوزید بر گرم پودر پوست انار بود. نتایج نشان داد اتانول اسیدی شده به عنوان حلال موثرتر از ترکیب آب و اتانول اسیدی شده در استخراج ترکیبات فنولی از پودر پوست انار است. بیشترین میزان ترکیبات فنول کل اندازه گیری شده مربوط به استخراج حلال (اتانول) معادل ٤/۲٤٦ ± ۵۸۹/۳۱۰ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره ثبت شد. پایداری رنگ با افزایش pH کاهش یافت و در عصاره آنتوسیانینی حلال (اتانول- آب) پایداری کمتری مشاهده شد. نتایج تغییرات رنگ بیشتر را در عصاره آنتوسیانینی حلال (اتانول) نسبت به دما نشان داد. عصاره آنتوسیانینی حلال (اتانول- آب) قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH بالاتری نسبت به عصاره آنتوسیانینی حلال (اتانول) داشت.

۱- مقدمه

اخیرا به دلیل نگرانی‌های جدی در مورد پتانسیل سرطان زایی آنتی اکسیدان‌های سنتزی که به طور گسترده ای مورد استفاده قرار گرفته اند، علاقه زیادی به پیدا کردن آنتی‌اکسیدان‌های جدید و ایمن از منابع طبیعی وجود دارد. به تازگی، گیاهان به عنوان منابع فعال بیولوژیکی از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها و ضد سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. اطلاعات علمی درباره خواص آنتی اکسیدانی گیاهان مختلف، به ویژه آن‌هایی که کمتر مورد استفاده در غذا و پزشکی هستند، هنوز کم است. بنابراین، ارزیابی چنین خواص، به ویژه برای یافتن منابع جدید آنتی اکسیدان‌های طبیعی، غذاهای عملکردی و مواد غذایی یک کار جالب و مفیدی می‌باشد [۱]. از سوی دیگر، علاقه به توسعه رنگ‌های غذایی از منابع طبیعی به عنوان جایگزین رنگ‌های سنتزی به دلیل اقدامات قانونی و نگرانی مصرف کننده افزایش یافته است. آنتوسیانین متعلق به گروه گسترده ترکیبات فنولی هستند که به طور کل فلاونوئیدها نامیده می‌شوند. آن‌ها گلیکوزیدهایی از پلی هیدروکسی و پلی متوکسی مشتقات ۲_فنیل بنزو پیریلیوم یا فلاویلیلیوم نمک هستند. آنتوسیانین و همچنین سایر ترکیبات فنولی می‌توانند به عنوان آنتی اکسیدان با اهدای هیدروژن به رادیکال‌ها بسیار واکنشی عمل کنند و از تولید بیشتر محصولات اکسیداسیون جلوگیری کنند [۲]. مصرف آنتوسیانین‌ها تا ۹ برابر بیشتر از دیگر فلاونوئیدهای غذایی در رژیم غذایی محاسبه شده است [۳]. امروزه، مصرف کنندگان به شدت نگران استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی در غذاها هستند. بنابراین آنها تمایل به استفاده از محصولات غذایی ایمن و طبیعی را دارند. انار و پوست آن می تواند چنین نقشی را داشته باشد[٤]. ثابت شده است که پوست انار حاوی مقادیر زیادی ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی است[٥]. انار[1] یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی شناخته شده‌است که حاوی بالاترین غلظت کل پلی‌فنل‌ها نسبت به سایر میوه‌های مورد مطالعه است. استفاده اصلی انار در صنایع غذایی شامل آبمیوه تازه یا نوشیدنی‌های انار است. از آنجایی که عملکرد آب انار کمتر از نصف وزن میوه است، مقدار زیادی از مواد زائد جانبی مثل پوست، هر سال تشکیل می‌شود. زباله‌های فرعی انار به طور سنتی به عنوان خوراک دام مورد استفاده قرار گرفته است. پوست انار را به عنوان یک منبع غنی از آنتی اکسیدان‌ها و مواد فنولی معرفی شده است. ظرفیت آنتی اکسیدانی انار به حضور مواد فنولی مرتبط است. پوست انار دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در بین پوست، پالپ و دانه‌های گیاهی ۲۸ نوع میوه‌های معمولی در چین است [٦]. آنتوسیانین‌ها معمولا با حلال‌های اسیدی تحت شرایط خفیف استخراج می‌شوند [۷]. این سیستم حلال، دیواره و غشای سلولی را تخریب می‌کند، در عین حال آنتوسیانین‌ها را حل می‌کند و آن‌ها را تثبیت می‌کند [۸]. ترکیب آب و اتانول در استخراج ترکیبات فنولی از سیستم حلال تک جز کارآمدتر هستند. به طور خاص ، نسبت های مختلف آب – اتانول مورد آزمایش قرار گرفت و بازده استخراج پلی فنول‌های به دست آمده با ۵۰٪ اتانول در دمای مختلف حدود ۲ برابر بیشتر از بازده استخراج با استفاده از آب خالص بود. مطالعات متعدد اثر بخشی حلال‌های مختلف را برای استخراج و بازیابی ترکیبات آنتی اکسیدانی آزمایش کرده است، و نشان داده شده است که اتانول در مقایسه با آب، استون، هگزان، اتیل استات و متانول بهترین است [۹،۱۰]. عواملی که در انتخاب کاربرد رنگ‌های طبیعی در موادغذایی و نوشیدنی‌ها موثر هستند، شامل: رنگ، مشخصات فیزیکی و شیمیایی ماده‌غذایی، ثبات نسبت به شرایط فرایند تولید و نگهداری می‌باشد [۲]. در این پژوهش از روش حلال اتانول اسیدی شده و ترکیب آب و اتانول اسیدی شده جهت استخراج عصاره آنتوسیانین از پودر پوست انار استفاده شد. تاثیر حلال بر بازده استخراج محتوی آنتوسیانین، ترکیبات فنولی و همچنین پایداری رنگ و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پودر پوست انار مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

ابتدا پوست ۱۰ کیلو میوه انار رقم ساوه پوست قرمز جدا گردید. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط خشک شد و از آسیاب و الک جهت تهیه پودر پوست انار استفاده شد. کلیه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

1 . *Punica granatum*

۲-۲-استخراج با حلال

استخراج با استفاده از روش فولکی و فرانسیس [۱۱] با کمی تغییر انجام شد. ۲۰ گرم پودر پوست انار با ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی شده (۰/۰۱ درصد اسید سیتریک) ترکیب و همچنین ترکیبی از اتانول اسیدی شده و آب با نسبت حجمی ۵۰:۵۰ به مدت ۵ دقیقه با همزن برقی با بیشترین سرعت خیس شد. پس از استخراج تمام عصاره‌ها توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ با قیف بوخنر تحت خلاء فیلتر شدند. عصاره‌ها توسط سانترفیوز یخچال دار به مدت ۵ دقیقه (دمای ۱۰°C با سرعت ۸۰۰۰rpm) سانترفیوز شدند. سپس سوپرناتانت جمع آوری و عصاره داخل آون در دمای ۴۵°C قرار داده شد تا حلال تبخیر شود [۲]. سپس عصاره حاصل از هر استخراج در دمای۱۸°C- نگهداری شد.

۲-۳-محتوی آنتوسیانین کل

تعیین محتوی آنتوسیانین کل (TAC) از روش pH افتراقی[2] [۱۲] محاسبه گردید. ۱ میلی‌لیتر از عصاره آنتوسیانین پوست انار را با ۹ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد سپس با نسبت ۴ به ۱ با محلول بافر پتاسیم کلرید ۱= pH و استات سدیم ۴/۵ =pH ترکیب شد. سپس بعد از ۲۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS(مدل ۱۵۰۲) ثبت گردید.

$$A= (A_{۵۲۰nm} - A_{۷۰۰nm})\, pH_{۱/۰} - (A_{۵۲۰nm} - A_{۷۰۰nm})\, pH_{۴/۵}$$

$$TAC=\frac{A\times MW\times DF\times 1000\times V}{\varepsilon\times L\times M}$$

A= جذب نهایی ، MW= وزن مولکولی سیانیدین ۳ -گلوکوزید[3] (۴۴۹/۲ گرم بر مول) ،DF= عکس رقت، V= حجم استخراج (میلی‌لیتر) ، ε= ضریب جذب مولی سیانیدین ۳-گلوکوزید (۲۹۶۰۰ لیتر بر مول در سانتی‌متر)، L= طول سل (سانتی متر) ، M= وزن پوست خشک انار (گرم)

۲-۴-محتوی ترکیبات فنولی کل

سنجش ترکیبات فنولی از روش فولین سیوکالتو مطابق روش سینگ و همکاران (۱۳) توصیف گردید، محاسبه شد. ابتدا ۱میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۵ میلی‌لیتر معرف فولین فنول ۱۰ برابر رقیق شده مخلوط گردید. ۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد اضافه شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۷°C قرار گرفت و جذب در دمای ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS اندازه‌گیری شد. نتایج نهایی معادل میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰گرم عصاره ذکر شد.

غلظت عصاره=X جذب=Y $Y = ۱/۶۵X+۰/۰۴$

۲-۵-تأثیر pH بر کارایی رنگ آنتوسیانین

صد میلی‌گرم عصاره پودر پوست انار حاصل از استخراج (اتانول) و (اتانول- آب) به۱۰ میلی‌لیتر محلول های آبی در pH= ۲/۰ – ۵/۰ –۷/۰ اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس طیف جذب محلول را در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و میزان رنگ به صورت درصد رنگ محاسبه گشت [۲].

۲-۶-تاثیر دما بر ترکیبات آنتوسیانینی

سنجش کارایی رنگ عصاره آنتوسیانین حاصل از استخراج (اتانول) و (اتانول- آب) طبق روش ایسوز و همکاران [۲] توصیف شد، انجام گشت. صد میلی‌گرم عصاره در ده میلی‌لیتر محلول آبی (pH=۲/۰) ریخته شد و در حمام آب با دماهای مختلف (۲۵، ۴۰ ،۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰°C) قرار داده شد. عصاره‌ها پس از ۳۰ دقیقه، در حمام آب سرد قرار داده شدند و جذب محلول در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و میزان رنگ به صورت درصد رنگ محاسبه گشت [۲].

۲-۷-پایداری حرارتی ترکیبات آنتوسیانینی

صد میلی‌گرم عصاره به ده میلی‌لیتر محلول آبی (pH=۲/۰) اضافه شد و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد برای ۱۸۰ دقیقه نگهداری شد. هر ۳۰ دقیقه نمونه برداری انجام شد و بلافاصله در حمام آب سرد خنک شد و جذب محلول در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانو متر اندازه گیری شد و میزان رنگ به صورت درصد رنگ محاسبه گشت [۲].

۲-۸-ارزیابی مهار رادیکال DPPH

در این بررسی فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌ها و TBHQ با استفاده از DPPH طبق روش ساویز و همکاران [۱۴] انجام

2. pH Differential Metod
3. Cyanidin 3-glucoside

گرفت. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر عصاره با غلظت‌های مختلف به ۱۰ میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت (۱۰۰ میکرو مولار) در متانول اضافه گردید و به شدت تکان داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری عصاره‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر مقابل عصاره شاهد خوانده شد. در این آزمایش از TBHQ با غلظت ppm ۱۰۰ به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$I\% = (A\ blank - A\ sample\ /A\ blank) \times 100$$

۲-۹-تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها در این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/٤ به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه تحلیل گشت و از آزمون دانکن جهت بیان تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵ درصد ($P_{Value} \leq$ ۰/۰۵) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین با انحراف استاندارد بیان شد و به منظور کاهش خطا، آزمایشات در ۳ تکرار انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بازده استخراج

شرایط استخراج با حلال در جدول ۱ آورده شد. در جدول ۲ در سطح اطمینان بالاتر از ۹۵٪ بازده حاصل از استخراج از پودر پوست انار اختلاف معنی‌داری از هم دارند. بیشترین بازده استخراج با اختلاف معنی‌داری مربوط به استخراج با حلال (اتانول- آب) ۱/٤٤٥±۷٦/۳۵۰[a]٪ مشاهده می‌شود. چن و همکاران در پژوهشی اظهار کردند که حلالی که بیشتر برای استخراج فلاونوئیدهای قطبی (آنتوسیانین‌ها) استفاده می شود، مخلوطی از آب و حلال‌های آلی است [۱۵] و بهترین بازده استخراج با غلظت‌های مختلف اتانول (۳۵-۹۰٪) در محلول آبی حاصل می‌شود [۱٦]. در مطالعه ای توسط کناس و همکاران [۱۷] در زمینه اثر نوع حلال بر روی استخراج ترکیبات فنولی پوست انار انجام شد. در این مطالعه از حلال‌هایی مانند اتانول، استون، آب، متانول و ترکیب متانول با آب انجام شد. نتایج نشان داد که انتخاب حلال به طور معنی داری عملکرد استخراج را تحت تأثیر قرار داد. نتایج نشان داد که مخلوط آب / متانول (۵۰:۵۰) بیشترین عملکرد استخراج را به خود اختصاص داده است. با این حال، این حلال گران است، ایمن نیست و برای استفاده به عنوان حلال احتیاط بیشتری نیاز دارد. مالویا و همکاران [۱۸] بیشترین عملکرد را با مخلوط آب / اتانول (۵۰:۵۰) و کمترین عملکرد را با آب گزارش دادند. به همین دلیل، برخی از نویسندگان توصیه می‌کنند با وجود ایمنی و قیمت پایین، آب برای استخراج ترکیبات فنولی مناسب نیست. اخیراً، پژوهشگران تخمین زدند که مخلوط اتانول: آب اسیدی با اسید استیک باعث افزایش عملکرد استخراج می‌شود [۱۹]. نابرابری بین بازده استخراج را می‌توان با تفاوت بین حلالیت فنول‌ها در بین حلال‌ها توضیح داد [۲۰]. استفاده از حلال‌ها در کنار هم عملکرد استخراج فنول‌ها و مولکول‌های آنتی اکسیدان را افزایش می‌دهد [۱۷].

Table 1 Conditions for different extractions of pomegranate peel powder

Extraction	Solvent	Temperature (°C)	Time (min)	Solid/Solvent
$Solvent_{(Ethanol)}$	Ethanol /Citric Acid0.01%	27	5	1:7.5
$Solvent_{(Ethanol\text{-}water)}$	Ethanol/ Water/ Citric Acid0.01%	27	5	1:7.5

Table 2 Efficiency extraction, total anthocyanin and total phenol of different extractions

Extraction	Efficiency Extraction	Total Anthocyanin Content (mg/gPP)	Total Phenolic Content (mg GA/100g E)
$Solvent_{(Ethanol)}$	25.730 ± 1.670^{b}	2.050 ± 0.125^{b}	589.310 ± 4.246^{a}
$Solvent_{(Ethanol\text{-}water)}$	76.350 ± 1.445^{a}	3.146 ± 0.035^{a}	418.707 ± 9.812^{b}

PP: Pomegranate Peel, GA: GalicAcid, E: Extract.Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%.

۳-۲- محتوی آنتوسیانین کل

نتایج در جدول ۲ نشان داد که نوع حلال بر ترکیبات آنتوسیانینی پودر پوست انار در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار است. بیشترین میزان آنتوسیانین اندازه‌گیری شده به روش pH افتراقی از طریق رنگ‌سنجی اسپکتروفتومتری مربوط به حلال (آب و اتانول) معادل ^{a}۰/۰۳۵±۳/۱٤٦ میلی‌گرم بر گرم پودر پوست انار با اختلاف معنی‌داری (P_{Value}<۰/۰۵) مشاهده شد. در پژوهش صورت گرفته توسط ربابه و همکاران [۲۱] مقدار آنتوسیانین در پوست انار ۱/۷-۱/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش دادند که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد.

۳-۳- محتوی ترکیبات فنولی کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره از طریق رنگ سنجی به روش فولین سیوکالتو بررسی شد و در جدول ۲ نشان داده شد. کارایی روش حلال (اتانول) برای ترکیبات فنولی کل ٤/۲٤٦ ± ۵۸۹/۳۱۰ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره با اختلاف معنی‌داری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) بیشتر از حلال (اتانول- آب) ۹/۸۱۲ ± ٤۱۸/۷۰۷ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره بوده است. همچنین نتایج نشان داد اتانول به عنوان حلال موثرتر از ترکیب (اتانول- آب) در استخراج ترکیبات فنولی از پودر پوست انار است. مطالعه‌ای نشان داد که نسبت حلال به جامد از نسبت ۱:۱۰ تا ۱:٤۰ در استخراج منجر به افزایش میزان ترکیبات فنولی استخراج شده از پوست انار می‌شود [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر پلی فنول‌ها ارزیابی شد، نشان داد که استخراج این ترکیبات از پوست انار تحت تأثیر pH حلال است، و در محیط اسیدی نتایج بهتری حاصل شد [۲۳].

۳-٤- تأثیر pH بر کارایی رنگ آنتوسیانین

نتایج در جدول ۳ اثر pH بر پایداری آنتوسیانین را نشان داد. افزایش pH منجر به ناپایداری آنتوسیانین می‌شود و آنتوسیانین‌ها در pH اسیدی پایدار هستند. بیشترین کاهش رنگ مربوط به عصاره حلال (اتانول- آب) در pH=۷ مشاهده می‌شود. بیشترین مقدار نابودی آنتوسیانین در pH=۵، ۱٦٪ و همچنین در pH=۷، ۳۷٪ مربوط به عصاره حلال (اتانول- آب) بود که پایداری رنگ آنتوسیانین را در pH اسیدی ثابت می‌کند. نتایج نشان می‌دهد عصاره آنتوسیانینی حاصل از حلال (اتانول) پایداری بیشتری نسبت به عصاره آنتوسیانینی با حلال (اتانول- آب) دارد. در پژوهشی [۲] بر روی آنتوسیانین هویج بنفش در pH ۱ تا ۱۰ تغییرات رنگ آنتوسیانین گزارش شد که در pH ۵ و ۷ به ترتیب ۱۹ و ٤٦٪ کاهش رنگ آنتوسیانین را گزارش دادند که در pH=۷ تا pH=۱۰ افزایش رنگ آنتوسیانین مشاهده کردند. پایداری عصاره آنتوسیانین حاصل از پوست انار پایداری بیشتری نسبت به عصاره آنتوسیانین هویج بنفش دارد. در پژوهشی [۲٤] پایداری دو آنتوسیانین مبتنی بر سیانیدین (سیانیدین ۳-گلوکوزید و سیانیدین ۳-روتینوزید[4]) پس از استخراج و خالص سازی در دامنه مختلف pH و دما گزارش دادند که در محدوده‌ی اندازه گیری شده هر دو آنتوسیانین با افزایش pH به تدریج کاهش یافتند.

Table 3 Effect of different pHs on the stability of anthocyanin extract

	pH		
Sample	2	5	7
Solvent (Ethanol)	100^{a}	91/943±1.073^{a}	84.113±1.188^{a}
Solvent (Ethanol-Water)	100^{a}	86.014±0.185^{b}	63.113±0.417^{b}

Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%.

۳-۵- اثر دما بر روی کارایی رنگ آنتوسیانین

نتایج اثر دما بر روی کارایی رنگ آنتوسیانین در جدول ٤ نشان داده شد. در عصاره حاصل از حلال (اتانول- آب) بالاترین میزان رنگ در دمای محیط مشاهده شد. در عصاره حاصل از حلال (اتانول) در دماهای ۲۵- ۷۰ ^{0}C کاهش رنگ مشاهده شد. در دماهای بالاتر افزایش رنگ مشاهده شد. بیشترین مقدار رنگ برای عصاره حلال (اتانول) در دمای ۱۰۰ ^{0}C مشاهده شد. بیشترین کاهش آنتوسیانین در دمای ۵۰ و ٦۰ ^{0}C بوده است. علت افزایش رنگ می‌تواند به دلیل پلیمریزاسیون، حضور پرو آنتوسیانین در عصاره باشد. در پژوهشی نویسندگان [۲۵] بیان کردند که ترکیبات پرو آنتوسیانین و فلاوونوئیدی از پوست انار استخراج کردند. در مطالعه انجام شده توسط کامیلگو و همکاران [۲٦] گزارش دادند که محتوی آنتوسیانین مونومر در مارمالاد و مربا هویج سیاه ذخیره شده در ٤ درجه سانتیگراد

4. Cyanidin 3-rotinoside

(۳/٦٪ – ٤۲/٤٪) و ۲۵ درجه سانتیگراد (۲٦/۳٪ –۷۹/۸٪) پس از ۲۰ هفته از زمان ذخیره سازی کاهش می یابد. آنها مشاهده کردند که ذخیره سازی در دماهای بالاتر می‌تواند تخریب آنتوسیانین‌های مونومر را تسریع کند. بنابراین پایداری آنتوسیانین‌ها در طول ذخیره سازی به شدت تحت تاثیر دما قرار می‌گیرد. این موضوع توسط پژوهشگران [۲۷] پشتیبانی شد، که در آن نیمه عمر آنتوسیانین‌های مونومر در عصاره توت ذخیره شده در دمای سرد، نسبت به زمانی که در دمای اتاق (۲۱ درجه سانتیگراد) ذخیره شد، بیشتر بود. از این رو ضروری است که آنتوسیانین‌ها را در دمای سرد به جای دمای اتاق نگهداری کند تا اطمینان حاصل شود که آنتوسیانین‌ها به مدت طولانی پایدار باشند [۲۸].

Table 4 Color percentage of anthocyanin extract at different temperatures (25-100 ^{0}C) at pH 2.0 from ethanol and ethanol-water solvents

	Temperature (^{0}C)							
Sample	25	40	50	60	70	80	90	100
Solvent (Ethanol)	100^a	85.577±0.779^a	84.151±0.317^a	85.485±0.284^a	86.514±0.322^a	107.454±0.323^a	106.171±0.846^a	133.187±0.569^a
Solvent (Ethanol-Water)	100^a	82.168±0.359^b	81.812±0.357^b	81.733±0.401^b	85.415±0.379^b	89.211±0.475^b	91.523±0.489^b	95.132±0.364^b

Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%.

۳-٦-اثر پایداری حرارتی آنتوسیانین

نتایج (جدول ۵) نشان داد، حرارت در بلند مدت منجر به افزایش رنگ در عصاره‌ها می‌شود. بیشترین افزایش رنگ مربوط به عصاره آنتوسیانینی حلال (اتانول) می‌باشد. کاهش رنگ عصاره حلال (اتانول- آب) آن در ٦۰ دقیقه اول ثابت بوده است و زمان تاثیری بر کاهش رنگ نداشته و سپس افزایش رنگ مشاهده شد. پژوهشگران در پژوهشی [۲۹] بر روی آنتوسیانین بیان کردند که درجه حرارت بالا (۹۵ درجه سانتیگراد / ۳ دقیقه) منجر به نابودی ٤۳٪ از کل آنتوسیانین‌های مونومر در مقایسه با مقدار اولیه در پوره بلوبری شد. بنابراین، این ثابت کرد که پایداری آنتوسیانین‌ها به شدت تحت تاثیر دما قرار می‌گیرد. از سویی وضعیت رنگ پلیمره شده بهبود یافت و میزانش از ۱ به ۱۲٪ درصد افزایش یافت. این درجه حرارت بالا نیز توسط پژوهشگران [۳۰] به عنوان تاثیر بر ثبات و شمارش آنتوسیانین‌ها در محصول نهایی دیده شد. برای فرایندهایی که نیاز به دمای بالا دارند، توصیه می‌شود که دوره فرآیند را برای حفظ سطح بالای آنتوسیانین‌های مونومر کاهش دهند. در مطالعه‌ای توسط ولدن و همکاران [۳۱] فرآیند ترکیبی شامل گرما، پاستوریزاسیون و خشک کردن، می‌تواند به طور واضح بر روی آنتوسیانین تاثیر بگذارد و منجر به نابودی آنتوسیانین‌ها شود.

Table 5 Color percentage of anthocyanin compounds in 180 minutes at pH 2.0 and temperature 90 ^{0}C from ethanol and ethanol-water solvents

	Heating Time(min)						
Sample	0	30	60	90	120	150	180
Solvent (Ethanol)	100^a	106.171±0.846^a	141.52±0.788^a	183.928±0.614^a	187.74±0.616^a	198.214±1.002^a	212.28±1.122^a
Solvent (Ethanol-Water)	100^a	91.523±0.489^b	91.202±0.461^b	105.386±0.333^b	118.727±0.688^b	126.597±1.150^b	143.945±0.406^b

Different letter between columns indicate significant statistical difference at level 5%.

۳-۷- ارزیابی مهار رادیکال DPPH

نتایج در نمودار ۱ نشان داده شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش داشت و بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی مربوط به عصاره حلال (اتانول- آب) با IC_{50}= ۰/۸۱٤ ± ۰/۰۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره حلال (اتانول) با اختلاف معنی‌داری کمتر بوده است. درصد مهارکنندگی آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در این آزمون با غلظت ۱۰۰ppm، ٦۰ ٪ محاسبه شد. شون و همکاران [۳۲] بیان کردند فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات پلی فنولی به دلیل

توانایی آن‌ها در اهدای اتم هیدروژن یا الکترون آزاد است. در این مطالعه، سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به غلظت عصاره، نوع ترکیبات فنولی استخراجی و حلال بستگی دارد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده شد فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۹۰۰ppm افزایش یافته است. این نتایج با اسماعیل زاده و همکاران [۳۳] مطابقت داشت که اشاره کردند غلظت عصاره عامل موثری در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی هست.

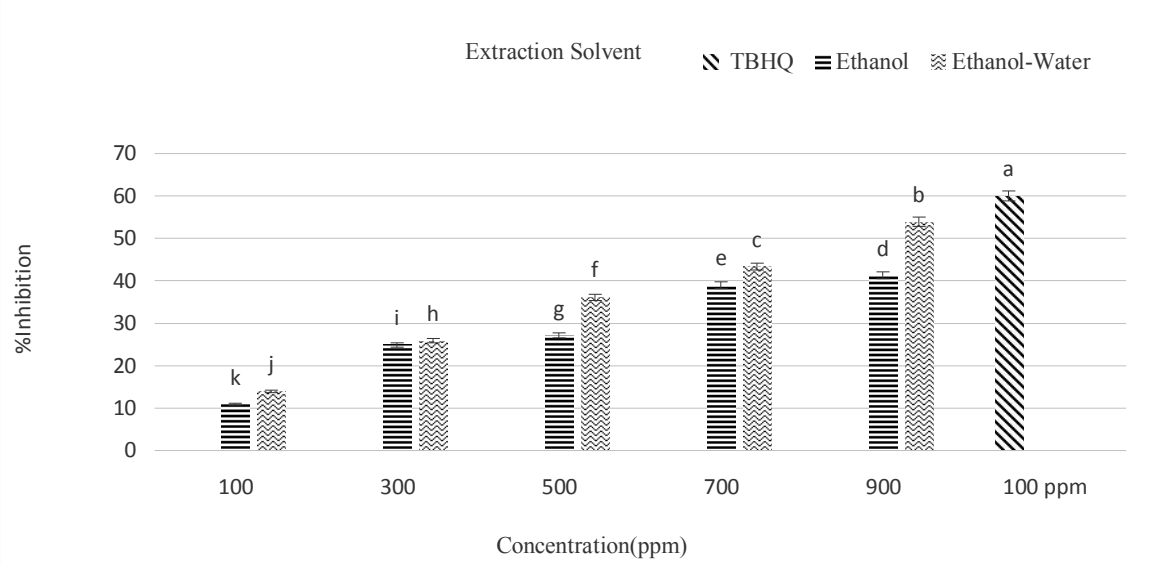

Fig 1 Inhibition of DPPH radicals by extracts (ethanol - water and ethanol) at different concentrations and TBHQ. $P_{Value} \leq 0.05$

٤-نتیجه گیری

با توجه به اهمیت آنتوسیانین و ترکیبات فنولی از نظر رنگ خوراکی و فعالیت آنتی اکسیدانی و همچنین برای استفاده بهینه از ضایعات صنعت غذا در این پژوهش استخراج ترکیبات آنتوسیانین و فنولی از پودر پوست انار به کمک حلال (اتانول) و (اتانول- آب) انجام شد. نتایج نشان داد که استخراج به روش حلال (اتانول- آب) بازده استخراج و همچنین محتوی آنتوسیانین بیشتری نسبت به عصاره حلال (اتانول) دارد. در حالی که محتوی ترکیبات فنولی در حلال (اتانول) بیشتر بود. نوع حلال تاثیر زیادی بر محتوی آنتوسیانین و ترکیبات فنولی می‌گذارد که در نتیجه نقش بسزایی در پایداری رنگ و فعالیت آنتی آکسیدانی عصاره دارد.

٥- منابع

[1] Arabshahi-delouee, S and A. Urooj. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. Journal of Food Chemistry: 1233-1240

[2] Assous, M.T.M., M.M. Abdel-Hady Ghada and M. Medany. 2014. Evaluation of red pigment extracted from purple carrots and its utilization as antioxidant and natural food colorants. Journal of Annals of Agricultural Science: 1-7.

[3] Wallace, T.C. 2011. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. Journal of American Society for Nutrition: 1-7.

[4] Parseh, H., and Shahablavasani, A. 2019. Comparing total anthocyanins, total phenolics and antioxidant activities of extracts (aqueous, organic and anthocyanin) obtained from pomegranate (peel, juice, and seed) and antimicrobial activity of peel extracts on the

four pathogenic bacteria. Journal of Food and Bioprocess Engineering, *2*(1), 7-12.

[5] Javanmard, M., and Akbari, A. 2020. Antimicrobial effects of pomegranate peel extract on Lactobacillus plantarum and shelf life of Thousand Island dressing. Journal of Food and Bioprocess Engineering, 3(1), 7-14.

[6] Kaderides, K., Goula, A. M., and Adamopoulos, K. G. 2015. A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 31: 204-215.

[7] Puértolas, E., Cregenzán, O., Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J., 2013. Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. Journal of Food Chemistry, 136 (3–4), 1330–1336.

[8] Navas, M.J., A.M. Jiménez-Moreno, J.M. Bueno, P. Sáez-Plazaand A.G. Asuero. 2012. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part IV: extraction of anthocyanins. Journal of Critical Reviews in Analytical Chemistry, 42 (4): 313–342.

[9] Galván D'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. Journal of Separation and Purification Technology, 93, 42–47.

[10] Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 239, 70–76.

[11] Fuleki, T., Francis, F.J., 1968. Quantitative method for anthocyanin: extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. Journal of Food Science. 33, 78–82.

[12] KIrca, A. and Cemeroglu, B. 2003. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. Journal of Food Chemistry, 81(4): 583-587.

[13] Singh, R. P., Murthy, K. N. C., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 81–86.

[14] Saviz A., R. Esmaeilzadeh Kenari and M.A. Khalil zadeh Kelagar. 2015. Investigation of Cultivate Zone and Ultrasound on Antioxidant Activity of Fenugreek Leaf Extract. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 4(11S): 174-181

[15] Chen, L., Jin, H., Ding, L., Zhang, H., Li, J., Qu, C., & Zhang, H. 2008. Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from Herba Epimedii. Journal of Separation and Purification Technology, 59(1), 50-57.

[16] Chaves, J. O., M. C. Souza., L. C. Silva., D. Lachos-Perez., P. C. T. Mayanga., A. P. F. Machado., T. Forster-Carneiro., M. Vázquez-Espinosa., A. V. G. Peredo., G. F. Barbero and M. A. Rostagno. 2020. Extraction of Flavonoids from Natural Sources Using Modern Techniques: A review. Journal of Frontiers in Chemistry.

[17] Kennas, A., Aellal-Chibane, H. 2019. Comparison of five solvents in the extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel. The North African Journal of Food and Nutrition Research, (05): 140-147

[18] Malviya, S., Jha, A.A., and Hettiarachchy, N. 2014. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. Journal of Food Science and Technology, 51(12):4132-4137.

[19] Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., and Cesa, S. 2016. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. Journal of Food Chemistry, 202:59-69.

[20] Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Journal of Food Chemistry, (2006), 96(2): 254-60.

[21] Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., and Yang, W. 2010. Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. Journal of Food Science, 75(7), 626–632.

[22] Huang, J., W, He. C, Yan. X, Du., and X. Shi. 2017. Microwave assisted extraction of flavonoids from pomegranate peel and its antioxidant activity. BIO Web of Conferences 8, 0 (2017).

Pigment. Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes. 495-526 pp., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, United States.

[29] Brownmiller, C., Howard, L.R., Prior, R.L., 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. Journal of Food Science. 73 (5), H72–H79.

[30] Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Journal of Biochemical Engineering Journal, 14 (3), 217–225.

[31] Volden, J., Borge, G.I.A., Bengtsson, G.B., Hansen, M., Thygesen, I.E., Wicklund, T., 2008. Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea L. ssp. capitata f. rubra*). Journal of Food Chemistry. 109 (3), 595–605.

[32] Shon, M. Y., T. H. Kim, and N. J. Sung. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of Phellinus baumii (*Phellinus of Hymenochaetoceae*) extracts. Journal of Food Chemistry. 82:593–597.

[33] Esmaeilzadeh Kenari., R, F., Mohsenzadeh & Z., R., Amiri .2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. Food Science and Nutrition, 2(4): 426– 435.

[23] Motikar, P. D., More, P. R., and Arya, S.S. 2020. A novel, green environmentfriendly cloud point extraction of polyphenols from pomegranate peels: a comparative assessment with ultrasound and microwave-assisted extraction. Journal of separation science and technology. 1–12.

[24] Sui, X., Dong, X., & Zhou, W. 2014. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. Journal of Food Chemistry, 163: 163-170.

[25] Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., and Atungulu, G. G. J. T. o. f. s. j. 2011. Extract of phenolics from pomegranate peels. The Open Food Science Journal, 5, 17-25.

[26] Kamiloglu, S., Pasli, A.A., Ozcelik, B., Van Camp, J., Capanoglu, E., 2015. Colour retention, anthocyanin stability and antioxidant capacity in black carrot (*Daucus carota*) jams and marmalades: effect of processing, storage conditions and in vitro gastrointestinal digestion. Journal of Functional Foods, 13, 1–10.

[27] Hellström, J., Mattila, P., Karjalainen, R., 2013. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. Journal of Food Composition and Analysis. 31 (1), 12–19.

[28] Ida, I.M., M.M.J. Yanti, M.N. Norazlina, A.A. Azni, M.P. Alyani and L.L. Hong. 2018. Advanced Natural Food Colorant Encapsulation Methods: Anthocyanin Plant

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of color efficiency and antioxidant power of anthocyanin extract of pomegranate peel powder obtained by solvent extraction

Zahed, N. [1], Esmaeilzadeh Kanari, R.[2]*, Farahmandfar, R. [3]

1. Master student of Food Industry Science and Engineering, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
2. Professor, Department of Food Industry Science and Engineering, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
3. Associate Professor, Department of Food Industry Science and Engineering, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 05/ 21
Accepted 2021/ 06/ 27

Keywords:

pH Differential,
Ethanol,
Heat,
Antioxidant,
Antioxidant power

DOI: 10.52547/fsct.18.117.197

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

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the color and antioxidant activity of anthocyanin extract of pomegranate peel extracted with solvent. In this study, acidified ethanol and also the combination of water with acidified ethanol was used as a solvent. Anthocyanin content was evaluated by differential pH, phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method, as well as color stability at temperature, pH, and time, and antioxidant activity was assessed by DPPH test. The highest extraction efficiency was related to solvent extraction (ethanol-water) with %76.350±1.445. The results showed that the highest amount of total anthocyanin measured related to solvent extraction (ethanol-water) was 3.146 ±0.035 mg cyanidin-3 glucoside per gram of pomegranate peel powder. The results showed that acidified ethanol as a solvent is more effective than the combination of water and acidified ethanol in extracting phenolic compounds from pomegranate peel powder. The highest amount of total phenol compounds measured was related to the extraction of solvent (ethanol) equal to 589.310±4.246 mg gallic acid in 100 g of extract. Color stability decreased with increasing pH and less stability was observed in solvent anthocyanin extract (ethanol-water). The results showed more color changes in solvent anthocyanin extract (ethanol) than temperature. Solvent anthocyanin extract (ethanol-water) had higher DPPH free radical scavenging power than solvent anthocyanin extract (ethanol).