جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۷، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۴۳۰-۴۱۹ (۱۳۹۰)

ارزیابی برخی عوامل مؤثر بر میزان عصاره و ترکیب‌های فنولی پوست سبز گردو (*Juglans regia* L.)

مریم رحیمی‌پناه[۱*]، منوچهر حامدی[۲] و مژگان میرزاپور[۳]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، پست الکترونیک: maryam_rahimi_63@yahoo.com

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳- کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۹

چکیده

پوست سبز گردو حاوی ترکیب‌های فنولی می‌باشد که باعث کاهش بیماریهای قلبی- عروقی، جلوگیری از اکسایش LDL در سلول، جلوگیری از سرطان‌های مختلف و جلوگیری از جهش‌زایی، جلوگیری از فعالیت اکسایش لیپیدها گردیده و به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، اثر چند عامل شامل آنزیم‌بری، غلظت حلال، زمان برداشت، زمان استخراج و روش استخراج بررسی گردید. ترکیب‌های فنولی پوست سبز گردو، با استفاده از متانول خالص، ۸۰ ٪ و ۶۰ ٪ و به روشهای خیساندن، سوکسله، فراصوت و مایکروویو از پوست سبز گردوی برداشت شده در تیر، مرداد و شهریورماه استخراج گردید. نتایج نشان داد که تیمار آنزیم‌بری به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) بر میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده تأثیر دارد. همچنین بهترین زمان برداشت پیش از رسیدن کامل میوه گردو و در ماه تیر بود. بنابراین استخراج به روش مایکروویو و با متانول ۶۰٪ به‌طور معنی‌داری نسبت به روشهای دیگر مؤثرتر است.

واژه‌های کلیدی: پوست سبز گردو، استخراج، بهینه‌سازی، آنزیم‌بری، ترکیب‌های فنلی.

مقدمه

گردو از درختان بسیار مهم و ارزشمند می‌باشد که در بسیاری از نقاط جهان یافت می‌شود، در ایران این گیاه از ارتفاع ۲۶ متر پایین‌تر از سطح دریا در مازندران، و تا ارتفاع بیش از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا در چهارمحال و بختیاری رویش داشته و بجز استان‌های ساحلی خلیج فارس و دریای عمان در سایر استان‌های کشور کشت می‌گردد. گردو متعلق به رده‌ی نهان‌دانگان، زیر رده‌ی دولپه‌ای‌ها، راسته‌ی Amentales، خانواده‌ی Juglandaceae و جنس *Juglans* می‌باشد و میوه آن شفت می‌باشد. تمام قسمت‌های گردو ازجمله پوست سبز میوه حاوی ترکیب‌های دارویی زیادی بوده و اثر مفیدی بر سلامت انسان دارد (طباطبایی و همکاران، ۱۳۷۱).

تعداد ۱۳ ترکیب فنولی شامل: هیدروکسی‌سینامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسی‌بنزوئیک اسیدها (اسید گالیک،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اسید الاژیک، اسید پروتوکاتئیک، اسید سیرینژیک و اسید وانیلیک)، فلاونوئیدها (کاتکین، اپی‌کاتکین، میرستن) و ژوگلون در گردو شناسایی شده‌است. در بین این ترکیب‌ها ژوگلون بیشترین میزان را دارد و ترکیب اصلی موجود در پوست سبز گردو است (Stampar *et al*., 2006).

مواد شیمیایی گیاهی همچون ترکیب‌های فنولی به علت دارا بودن خواص سودمندی مانند خاصیت ضدرادیکالی، قابلیت پیشگیری از اکسایش LDL و سختی سرخرگ‌ها، خاصیت ضدسرطانی، خاصیت ضداکسایش و نیز فعالیت ضدمیکروبی دارند و برای سلامت انسان مفید هستند (Pereira *et al*., 2007؛ Pereira *et al*., 2008؛ Oliveira *et al*., 2008).

پلی‌فنول‌های گیاهی دارای عملکردهای مختلفی هستند و می‌توانند به‌عنوان یک عامل کاهنده عمل کنند. بعضی از پلی‌فنول‌ها می‌توانند با چنگالی کردن یون‌های فلزی مانند آهن و مس فعالیت ضداکسایشی از خود نشان داده و توان فلزها را برای تولید بنیان‌های آزاد کاهش دهند. پوست سبز گردو به علت دارا بودن ترکیب‌های فنولی قدرت ضداکسندگی قوی و نیز خاصیت ضدمیکروبی به خصوص بر علیه باکتریهای گرم مثبت دارد (Oliveira *et al*., 2008).

مطالعات نشان می‌دهد که عوامل مختلفی بر درصد و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره استخراجی از پوست سبز گردو مؤثر هستند. مقدار ترکیب‌های فنولی در گیاهان تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند عوامل ژنتیکی، شرایط محیطی و شرایط نگهداری قرار گرفته و حتی بین واریته‌های زراعی یک گونه متغیر هستند. همچنین میزان رسیدن و زمان برداشت بر محتوای فنولی مؤثرند (Jakopic *et al*., 2007).

در این مطالعه تأثیر بعضی از عوامل مؤثر بر درصد استخراج عصاره و میزان ترکیب‌های فنولی موجود در پوست سبز گردو بررسی و بهترین شرایط که قادر به استخراج بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی می‌باشد، تعیین گردید. پارامترهای مورد بررسی در این تحقیق عبارت بودند از: زمان برداشت، زمان‌های مختلف استخراج، آنزیم‌بری بافت، غلظت‌های مختلف حلال و روشهای گوناگون استخراج (خیساندن، سوکسله، فراصوت و مایکروویو).

مواد و روشها

نمونه‌برداری

میوه‌های گردو از باغ تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران واقع در محمدشهر کرج برداشت شد. به منظور بررسی اثر زمان برداشت بر محتوای ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو، برداشت در سه مرحله و در روزهای هفتم ماههای تیر، مرداد و شهریور سال انجام شد. همه نمونه‌ها پیش از طلوع آفتاب برداشت شدند.

گردوها از نوع خوشه‌ای و دارای ارتفاع کم بودند. عمر درخت‌ها حدود ده سال بود و عمل هرس کردن درختان در مواقع لازم انجام شده بود. در ضمن از هیچ‌گونه آفت‌کش شیمیایی استفاده نشده بود.

در همه مراحل گردوهای کاملاً سالم، به‌صورت دست‌چین، بدون هیچ‌گونه آسیبی به پوست سبز و به صورت کاملاً تصادفی برداشت شدند. نمونه‌ها پس از برداشت و تا پایان جداسازی پوست سبز، در دمای ۴°C نگهداری شدند.

آنزیم‌بری

برای آنزیم‌بری، تیمار گرمایی در آب با دمای ۹۰ ± ۱°C

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و مدت زمان ۵ دقیقه بر روی گردوها به‌صورت کامل و همراه با پوست سبز انجام شد. زمان آزمون پس از آزمون کنترل فعالیت آنزیم پراکسیداز، به‌عنوان شاخص کفایت آنزیم‌بری (FAO Agricultural Service Bulletin (NO.119), 1995) تعیین گردید. نمونه‌ها، بلافاصله پس از خروج از آب داغ، به یک ظرف دارای آب و یخ (دمای ۰°C) منتقل شدند.

آزمون کنترل فعالیت آنزیم پراکسیداز

پوست‌های سبز گردوها توسط یک چاقو کاملاً از سطح گردو تراشیده شد و در یک ظرف آزمایشگاهی برای تعیین نمونه میانگین خرد شدند. از نمونه میانگین حدود ۱۰ تا۲۰ گرم در یک لوله آزمایش متوسط ریخته شد، سپس روی این نمونه ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، یک میلی‌لیتر محلول گایاکول ٪۱ و ۱/٦ میلی‌لیتر محلول پروکسید ریخته شد و محتوای لوله آزمایش خوب مخلوط گردید. پیدایش تدریجی رنگ صورتی کمرنگ نشان‌دهنده‌ی ناکامل بودن غیرفعال‌سازی پروکسیداز بود و واکنش مثبت به‌شمار می‌رفت. اگر پس از ۵ دقیقه تغییر رنگی در بافت دیده نمی‌شد، واکنش منفی بود که نشانگر غیرفعال شدن آنزیم پروکسیداز بود.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای استخراج ترکیب‌های فنولی

گردوهای هر دو دسته (آنزیم‌بری شده و آنزیم‌بری نشده) پوست‌گیری شدند. پوست‌های سبز جدا شده در زیر پنکه، در یک محیط دور از نور و در دمای محیط خشک شدند.

پوست‌های سبز پس از خشک شدن کامل، به کمک یک خردکن برقی به دقت خرد شدند و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش ۲۰ الک شدند. گرد بدست‌آمده تا پایان آزمایش‌ها در ظروف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ و در دمای یخچال (حدود ٤°C) نگهداری شد.

استخراج ترکیب‌های فنولی

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، استخراج به روش خیساندن (پرکولاسیون) در زمان‌های ۲۰ دقیقه، ۱، ۳، ٦ و ۲٤ ساعت بر روی یک نمونه ثابت (نمونه برداشت اول و آنزیم‌بری شده) انجام شد و پس از تعیین درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی، زمان بهینه استخراج به روش خیساندن تعیین گردید.

سپس به منظور بررسی تأثیر آنزیم‌بری بر میزان استخراج و ترکیب‌های فنولی، استخراج به روش خیساندن و در مدت زمان بهینه تعیین شده، بر روی نمونه‌های آنزیم‌بری شده و آنزیم‌بری نشده انجام گردید.

به منظور بررسی اثر زمان برداشت، استخراج و مقایسه ترکیب‌های فنولی از نمونه‌های برداشت شده در زمان‌های مختلف (تیر، مرداد و شهریورماه و همگی آنزیم‌بری شده) طبق روش بیان شده (خیساندن در زمان بهینه) صورت گرفت. همچنین اثر غلظت‌های مختلف حلال با استفاده از متانول خالص، ۸۰ و ٦۰ درصد تعیین گردید. سپس از نمونه دارای بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی و به کمک بهترین حلال، استخراج به روش سوکسله، فراصوت و مایکروویو انجام شد و درنهایت با مقایسه میزان فنول تام استخراج شده در روشهای گوناگون، بهترین روش استخراج انتخاب گردید.

در مورد تعیین اثر غلظت حلال و روش استخراج، به علت وجود آب در حلال و عدم اطمینان از خشک شدن کامل عصاره (در دمای کمتر از ٤۰°C) تنها میزان ترکیب‌های فنولی بررسی گردید.

استخراج به روش خیساندن

عمل استخراج با افزودن ۲۰ میلی‌لیتر متانول بر یک گرم نمونه با استفاده از دستگاه همزن مغناطیسی انجام شد. پس از پایان زمان تعیین شده، محتوی ارلن در یک ارلن دارای وزن ثابت (برای تعیین درصد عصاره) توسط کاغذ صافی S&S شماره ۵۸۹[1] صاف گردید. باقیمانده روی صافی بر ظرف اولیه برگردانده شد و توسط ۲۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط و توسط همان کاغذ صافی به عصاره صاف شده قبلی افزوده شد. عمل شستشو دو بار تکرار گردید. سپس عصاره صاف شده در دمای کمتر از ۴۰°C به کمک دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ خشک گردید. در ادامه درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره اندازه‌گیری شد.

استخراج به روش سوکسله

در این روش حدود ۷/۵ گرم نمونه، درون کارتوش قرار داده شد و به دستگاه سوکسله متصل گردید و پس از اضافه نمودن مقدار مناسب (حدود ۱۵۰ میلی‌لیتر) حلال به نمونه، استخراج طی ٦ ساعت انجام شد. سپس حلال در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ، کاملاً تبخیر و درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی موجود در آن تعیین گردید.

استخراج به روش فراصوت

۲۰ میلی‌لیتر حلال به یک گرم نمونه افزوده شد و بعد در حمام دستگاه فرا صوت قرار گرفت. توان دستگاه ۲۰٪، فرکانس ۱۳۰ کیلوهرتز و زمان استخراج ۲۰ دقیقه تنظیم گردید (Zhang *et al*., 2009). پس از پایان عمل استخراج عصاره بدست‌آمده، توسط کاغذ صافی S&S شماره ۵۸۹[1] در یک ارلن دارای وزن ثابت صاف گردید و بعد حلال در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ کاملاً تبخیر و درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی موجود در آن تعیین گردید.

استخراج به روش مایکروویو

یک گرم نمونه در یک ارلن کوچک ریخته شد و پس از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر حلال مناسب، به مدت ۹۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. پس از این مدت استخراج به کمک دستگاه مایکروویو انجام شد. توان دستگاه ۱۰٪ و مدت زمان استخراج ٤ دقیقه تنظیم شد. البته پس از هر ۱ دقیقه به منظور جلوگیری از افزایش دما، نمونه از دستگاه خارج و درون یخچال قرار داده شد تا دما به کمتر از ۳۰°C برسد (Pan *et al*., 2003).

تعیین درصد استخراج عصاره

یک ارلن دارای وزن ثابت توزین گردید، سپس عصاره متانولی در آن صاف و به کمک تبخیرکننده تحت خلأ، تبخیر شد. پس از اطمینان از تبخیر کامل حلال و خشک شدن عصاره، دوباره ارلن توزین شد و درصد استخراج محاسبه گردید.

آنالیز کمّی فنول تام موجود در عصاره متانولی پوست سبز گردو به روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتو

برای آنالیز کمی پلی‌فنول‌های تام موجود در عصاره، یک میلی‌لیتر عصاره رقیق شده با یک میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. پس از ۳ دقیقه یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم سیر شده به مخلوط افزوده شد و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. واکنش در محیط تاریک به مدت ۹۰ دقیقه انجام گردید و سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در ۷۲۵ نانومتر

خوانده شد (Singleton & Rossi, 1965؛ Oliveira *et al.*, 2008). برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک در غلظت‌های ۰ تا ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج براساس میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم نمونه خشک شده بیان شد.

تجزیه آماری

نتایج به روش تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی از سه تکرار جداگانه آزمایش‌ها و به کمک نرم‌افزار آماری (SAS (۹/۱-۲۰۰۴ بدست آمدند. سطح معنی‌داری در $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمام نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (SE) گزارش شدند.

نتایج

تأثیر زمان استخراج بر درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

برای تعیین زمان بهینه استخراج ترکیب‌های فنولی به روش خیساندن، استخراج در زمان‌های ۲۰ دقیقه، ۱، ۳، ٦ و ۲٤ ساعت انجام شد و درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده اندازه‌گیری شد (نتایج در جدول ۱ نشان داده شده‌است).

جدول ۱- تأثیر زمان استخراج بر درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

زمان استخراج در روش خیساندن	درصد استخراج	میزان فنول تام (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)
۲۰ دقیقه	۳۳/۳ ± ۰/۳ c	۷۰۰/۳۳ ± ۲۱/۲ b
۱ ساعت	۳٦ ±۰ b	۷۱۱/٦٦ ± ۲۰/۲ b
۳ ساعت	۳۹ ± ۰/۵ a	۲۰۹۷/۵۰ ± ۵۵/۲ a
٦ ساعت	۳۸/٦ ± ۰/۳ a	۲۱۰۲/۱۳ ± ٤۸/۰ a
۲٤ ساعت	۳۹/٦ ± ۰/٦ a	۲۱۷۸/٦۳ ± ۵۸/٦ a

نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (SE) مربوط به سه بار تکرار جداگانه آزمایش و براساس هم ارزی با اسید گالیک محاسبه و نشان داده شده‌اند. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

طبق نتایج بدست‌آمده با افزایش زمان استخراج، درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی افزایش یافت. پس از آنالیزهای آماری، مشخص شد که افزایش زمان استخراج منجر به افزایش ترکیب‌های فنولی گردید، ولی در زمان‌های ۳، ٦ و ۲٤ ساعت تفاوت معنی‌داری در درصد استخراج و نیز میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده مشاهده نگردید. همچنین، در زمان‌های ۲۰ دقیقه و ۱ ساعت در مورد فنول تام استخراج شده تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. البته استخراج در زمان ۲۰ دقیقه نسبت به یک ساعت، به‌طور معنی‌داری درصد عصاره کمتری استخراج شد. با توجه به نتایج بدست‌آمده زمان بهینه استخراج برای مراحل بعدی، ۳ ساعت انتخاب گردید. در زیر جدول آنالیز واریانس داده‌های حاصل از تیمار زمان استخراج آورده شده‌است (جدول ۲).

جدول ۲- آنالیز واریانس اثر زمان استخراج بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
تیمار	٤	٧٢٧٢٥٩٧/٨	١٨١٨١٤٩/٤	٣١٣/٥	٠/٠٠٠
خطا	١٠	٥٧٩٨٦/٤	٥٧٩٨/٦		
مجموع	١٤	٧٣٣٠٥٨٤/٣			

تأثیر عمل آنزیم‌بری بر درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

همان‌طورکه در جدول ۳ مشاهده می‌گردد، درصد استخراج و میزان فنول تام در نمونه‌های آنزیم‌بری شده نسبت به نمونه‌های آنزیم‌بری نشده به‌طور معنی‌داری بیشتر است. در جدول ٤ آنالیز واریانس داده‌های حاصل از تیمار آنزیم‌بری آورده شده‌است.

جدول ۳- اثر آنزیم‌بری بر درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

نمونه	درصد استخراج	میزان فنول تام (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)
آنزیم‌بری شده	٣٩ ± ٠/٥ a	٢٠٩٧/٥ ± ٥٥/٢ a
آنزیم‌بری نشده	٣٦ ± ٠b	١٨٧١/٥ ± ٥٠/٤ b

نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (SE) مربوط به سه بار تکرار جداگانه آزمایش و براساس هم ارزی با اسید گالیک محاسبه و نشان داده شده‌اند. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

جدول ٤- آنالیز واریانس اثر آنزیم‌بری بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
تیمار	١	٧٦٦١٤/٠	٧٦٦١٤/٠	٩/١٣	٠/٠٣
خطا	٤	٣٣٥٨١/٠٩	٨٣٩٥/٢		
مجموع	٥	١١٠١٩٥/٠٩			

تأثیر زمان برداشت بر درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

اثر زمان برداشت میوه گردو بر میزان ترکیب‌های فنولی موجود در پوست سبز گردو در جدول ۵ نشان داده شده‌است. نتایج نشان می‌دهند که زمان برداشت به‌طور معنی‌داری بر درصد استخراج و میزان فنول تام موجود در پوست سبز گردو مؤثر است.

جدول ٥- تأثیر زمان برداشت بر درصد استخراج و میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

نمونه	درصد استخراج	میزان فنول تام (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)
برداشت اول (تیرماه)	۳۹ ± ۰/٥ a	۲۰۹۷/٥ ± ٥٥/۲ a
برداشت دوم (مرداد ماه)	۳٤/۳۳ ± ۰/٦ b	۱٥٥۲/٥۳۸ ± ٤۷/۲ b
برداشت سوم (شهریور ماه)	۲٥/٦٦ ± ۰/۳ c	۱۳۷۹/۰٤ ± ۱۰۹/۱ b

نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (SE) مربوط به سه بار تکرار جداگانه آزمایش و براساس هم ارزی با اسید گالیک محاسبه و نشان داده شده‌اند. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

درصد استخراج ترکیب‌های موجود در پوست سبز گردو از تیرماه تا شهریور و با افزایش میزان رسیدن میوه به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. زمان برداشت بر میزان ترکیب‌های فنولی نیز تأثیر داشته و بیشترین مقدار این ترکیب‌ها در اولین زمان برداشت (تیر) بود. به‌طوری که در این زمان میوه گردو به‌طور کامل نرسیده و پوست چوبی در حال سفت شدن است. برداشت دوم (مرداد) نسبت به برداشت سوم (شهریور) ترکیب‌های فنولی بالاتری را در پوست سبز گردو نشان داد، ولی اختلاف معنی‌داری بین ترکیب‌های فنولی این دو برداشت وجود نداشت. در زیر جدول آنالیز واریانس داده‌های حاصل از تیمار زمان برداشت آورده شده‌است (جدول ٦).

جدول ٦- آنالیز واریانس اثر زمان برداشت بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
تیمار	۲	۸٤۳۲٦٦/٥	٤۲۱٦۳۳/۲	۲٤/٥۲	۰/۰۰۱۳
خطا	٦	۱۰۳۱٦۸/٥	۱۷۱۹٤/۷		
مجموع	۸	۹٤٦٤۳٥/۱			

جدول ۷- تأثیر غلظت حلال بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

غلظت حلال	میزان فنول تام (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)
متانول ٦۰٪	۲۷۸۱/٦٦ ± ۳٥/۱ a
متانول ۸۰٪	۲۳۱۳/۲٦ ± ۳۹/٥ b
متانول ۱۰۰٪	۲۰۹۷/٥ ± ٥٥/۲ c

نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (SE) مربوط به سه بار تکرار جداگانه آزمایش و براساس هم ارزی با اسید گالیک محاسبه و نشان داده شده‌اند. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

تأثیر غلظت حلال بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

نتایج حاصل از تیمار استفاده از متانول با غلظت‌های متفاوت بر میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده از پوست سبز گردو در جدول شماره ۷ نشان داده شده‌است.

این نتایج نشان می‌دهد که بین میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده از پوست سبز گردو توسط متانول ۱۰۰٪، ۸۰٪ و ۶۰٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با کاهش غلظت متانول از ۱۰۰٪ به ۶۰٪ میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده افزایش می‌یابد. در زیر جدول آنالیز واریانس داده‌های حاصل از تیمار غلظت حلال آورده شده‌است (جدول ۸).

جدول ۸- آنالیز واریانس اثر غلظت حلال بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معناداری
تیمار	۲	۷۳۴۰۴۰/۸	۳۶۷۰۲۰/۴	۶۲/۶۷	۰/۰۰۰
خطا	۶	۳۵۱۳۸/۸	۵۸۵۶/۴		
مجموع	۸	۷۶۹۱۷۹/۶			

جدول ۹- تأثیر روش استخراج بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

روش استخراج	میزان فنول تام (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم)
مایکروویو (۴ دقیقه)	۳۴۲۸/۱۱ ± ۱۳۵/۸ a
فراصوت (۱۵ دقیقه)	۳۰۰۸/۲۸ ± ۷۹/۰ b
سوکسله (۶ ساعت)	۲۹۹۷/۳ ± ۶۰/۱ b
خیساندن (۳ ساعت)	۲۷۸۱/۶۶ ± ۳۵/۳ b

نتایج براساس میانگین ± خطای استاندارد (SE) مربوط به سه بار تکرار جداگانه آزمایش و براساس هم ارزی با اسید گالیک محاسبه و نشان داده شده‌اند.
حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

تأثیر روش استخراج بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

به منظور بررسی اثر روش استخراج بر میزان استخراج ترکیب‌های فنولی موجود در پوست سبز گردو، از روشهای خیساندن، سوکسله، فراصوت و مایکروویو استفاده شد. نتایج بدست آمده در جدول ۹ نشان داده شده‌اند.

از نظر میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده از پوست سبز گردو، بین روش استخراج با کمک مایکروویو نسبت به دیگر روشهای استخراج تفاوت معنی‌داری وجود دارد. استفاده از مایکروویو باعث استخراج میزان بیشتری از ترکیب‌های فنولی از پوست سبز گردو می‌شود. پس از مایکروویو به‌ترتیب استخراج به کمک دستگاه فراصوت،

سوکسله و روش خیساندن ترکیب‌های فنولی بالاتری را استخراج می‌کنند، ولی بین این سه روش تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در زیر جدول آنالیز واریانس داده‌های حاصل از تیمار روش استخراج آورده شده‌است (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- آنالیز واریانس اثر روش استخراج بر میزان ترکیب‌های فنولی عصاره پوست سبز گردو

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معناداری
تیمار	۳	٦٥٨٢٩٦/٦	۲۱۹٤۳۲/۲	۹/۹	۰/۰۰٤
خطا	۸	۱۷۷۲٥۸/٤	۲۲۱٥۷/۳		
مجموع	۱۱	۸۳٥٥٥٥/۰			

بحث

همان‌گونه که بیان شد، نتایج نشان داد که افزایش زمان استخراج منجر به افزایش میزان ترکیب‌های فنولی می‌گردد ولی با توجه به آنالیزهای آماری زمان بهینه استخراج ۳ ساعت تعیین گردید.

در عمل آنزیم‌بری پوست سبز گردو، پس از تیمار گرمایی، آزمون کنترل فعالیت پراکسیداز انجام شد و از غیرفعال بودن پراکسیداز اطمینان حاصل شد. با توجه به اینکه این آنزیم مقاومت حرارتی بالایی دارد، با غیرفعال شدن آن می‌توان مطمئن شد که آنزیم‌های موجود در پوست سبز گردو غیرفعال شده‌اند. بسیاری از این آنزیم‌ها در عمل قهوه‌ای شدن آنزیمی نقش داشته و سوبسترای آنها ترکیب‌های فنولی هستند و در صورت حضور این آنزیم‌ها، ترکیب‌های فنولی تجزیه شده و از بین می‌روند. نتایج با نشان دادن میزان بالاتر ترکیب‌های فنولی و درصد استخراج در نمونه‌های آنزیم‌بری شده نسبت به نمونه‌های آنزیم‌بری نشده، مشخص می‌کند که تیمار گرمایی در غیرفعال کردن آنزیم‌های موجود در پوست سبز گردو و جلوگیری از تأثیر آنها بر ترکیب‌های فنولی و از بین بردن آن مؤثر است. همچنین به علت نرم شدن بافت در طول زمان آنزیم‌بری، درصد استخراج نیز افزایش می‌یابد.

در مورد اثر زمان برداشت، نتایج بدست‌آمده از تحقیق صورت گرفته با نتایج حاصل از تحقیق‌های دیگر در این زمینه (Alamprese *et al*., 2005؛ Alampres & Pompei, 2005؛ Stampar *et al*., 2006) و نیز مطالعات Jakopic و همکاران (۲۰۰۷) که اثر زمان برداشت بر میزان ترکیب‌های فنولی موجود در پوست سبز گردو و همچنین نوشیدنی حاصل از میوه گردو (قبل از سفت شدن پوست چوبی همراه با پوست سبز) را بررسی کرده‌اند، تطابق دارد. در همه این پژوهش‌ها بیان شده‌است که برای داشتن نوشیدنی با بالاترین میزان ترکیب‌های فنولی بهتر است میوه گردو در اواخر ماه ژوئن برداشت شود. اولین برداشت در تحقیق کنونی در هفتم تیرماه بود که مصادف با اواخر ماه ژوئن است. همچنین تحقیق Stampar و همکاران (۲۰۰٦) نشان می‌دهد که در برداشت‌های بعدی (جولای و اگوست) که تقریباً همزمان با برداشت‌های دوم و سوم تحقیق حاضر بود، تفاوت معنی‌داری بین ترکیب‌های فنولی موجود در پوست سبز گردو دیده نشد.

نتایج به خوبی نشان می‌دهد که برای داشتن بالاترین میزان ترکیب‌های فنولی در پوست سبز گردو، برداشت باید پیش از رسیدن کامل میوه صورت گیرد و با افزایش میزان رسیدن، میزان ترکیب‌های فنولی و نیز درصد عصاره استخراجی کاهش می‌یابد که می‌تواند به علت تغییراتی باشد که در طول دوره رشد در گیاه رخ می‌دهد.

در بررسی اثر غلظت حلال، مشخص شد که با کاهش غلظت متانول از ۱۰۰٪ به ۶۰ ٪ میزان ترکیب‌های فنلی استخراجی افزایش می‌یابد. این موضوع می‌تواند به دلیل تغییر میزان قطبیت حلال باشد. به‌طوری که با ترکیب دو حلال آب و متانول در جایی که غلظت متانول به ۶۰٪ می‌رسد حلال، بیشینه توان حل‌کنندگی ترکیب‌های فنولی را پیدا می‌کند. به‌گونه‌ای که می‌توان گفت در این شرایط ترکیب‌هایی که در آب یا متانول خالص به تنهایی قادر به حل شدن نبودند، حل می‌شدند. در این مطالعه از متانول استفاده شد و از حلال‌های آلی دیگری استفاده نشد، به این دلیل که در پژوهش‌های صورت گرفته (Goli *et al.*, 2005؛ Zhang *et al.*, 2009؛ Lai *et al.*, 2009) نشان داده شده که متانول از دیگر حلال‌ها مانند آب، اتانول، استونیتریل، هگزان و اتیل استات در استخراج ترکیب‌های فنولی مؤثرتر است. نتیجه ما با نتایج بدست‌آمده از تحقیق Zhang و همکاران (۲۰۰۵) تطابق دارد. این محققان از متانول با غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درصد برای استخراج ترکیب‌های فنولی استفاده کرده و بیان کرده‌اند که متانول ۶۰٪ از حلال‌های دیگر مؤثرتر است.

نتایج نشان داد که بهترین روش جهت استخراج، استفاده از مایکروویو می‌باشد. پس از مایکروویو به‌ترتیب استخراج به کمک دستگاه فراصوت، سوکسله و روش خیساندن ترکیب‌های فنولی بالاتری را استخراج می‌کنند، ولی بین این سه روش تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در تحقیق انجام شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شده‌است که استخراج به کمک مایکروویو در مدت ۵ دقیقه نسبت به استخراج به روشهای خیساندن و فراصوت کارایی بالاتری در استخراج ترکیب‌های آلکالوئیدی دارد. همچنین در تحقیق انجام شده دیگری (Goli *et al.*, 2005) نشان داده شده‌است که بین میزان ترکیب‌های فنولی استخراج شده در روش استخراج به کمک حلال (خیساندن) در مدت زمان ۶ ساعت و استخراج به کمک فراصوت در مدت زمان ۴۵ دقیقه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد؛ که این تحقیقات نتایج ما را تأیید می‌کند.

به‌طورکلی نتایج نشان دادند که برای استخراج بیشترین میزان از پوست سبز گردو، باید گردو در تیرماه برداشت شده، آنزیم‌بری شود و بعد ترکیب‌های فنلی با متانول ۶۰٪ و به روش مایکروویو استخراج شود.

بنابراین پیشنهاد می‌شود که روشهای دیگر استخراج و خشک کردن مورد بررسی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- طباطبایی، م.، دهلوی، ا. و افراسیاب‌احمدی، ع.ر.، ۱۳۷۱. گردو، هیکوری و پکان. انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران، ۴۳۲ صفحه.
- Alamprese, C. and Pompei, C., 2005. Influence of processing variables on some characteristics of nocino liqueur. Food Chemistry, 92(2): 203-209.
- Alamprese, C., Pompei, C. and Scaramuzzi, F., 2005. Characterization and antioxidant activity of nocino liquer. Food Chemistry, 90(4): 495-502.
- Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A., 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio *(Pistachia vera)* hull extracts. Food Chemistry, 92(3): 521-525.
- Jakopic, J., Colaric, M., Veberic, R., Hudina, M., Solar, A. and Stampar, F., 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur?. Food Chemistry, 104(1): 100-105.

- Lai, Ph., Li, K.Y., Lu, Sh. and Chen, H.H., 2009. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. Food Chemistry, 117(3): 538-544.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L. and Pereira, J.A., 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology, 46(7): 2326-2331.
- Pan, X., Niu, G. and Liu, H., 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing, 42(2): 129-133.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A. and Estevinho, L., 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Food and Chemical Toxicology, 46(2): 2103-2111.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11): 2287-2295.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16(3): 144-158.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R. and Colaric, M., 2006. Traditional walnut liqueur-cocktail of phenolics. Food Chemistry, 95(4): 627-631.
- Zhang, F., Chen, B., Xiao, S. and Yao, S.Z., 2005. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. Separation and Purification Technology, 42: 283-290.
- Zhang, H.F., Yang, X.H., Zhao, L.D. and Wang, Y., 2009. Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10(1): 54-60.

Analysis of some factors affecting the phenolic compounds extracted from green husk of walnut (*Juglans regia* L.)

M. Rahimipanah[1*], M. Hamedi[2] and M. Mirzapour[2]

1*- Corresponding author, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Engineering and Technology, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran E-mail: maryam_rahimi_63@yahoo.com
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Engineering and Technology, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: March 2010 Revised: July 2010 Accepted: August 2010

Abstract

Walnut green husk contains phenolic compounds which reduce cardiovascular diseases, prevent the risk of many cancers and LDL oxidation. Also they have antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties. In this research, effects of different parameters including blanching, solvent concentration, harvest time, extraction time and method were examined on amount of extraction and phenolic compound of walnut green husk. Walnuts were picked at three times (June, July and August) and half of them were blanched. Phenolic compounds of this sample were extracted with different concentrations of methanol (100%, 80%, and 60%) and different extraction methods (maceration, soxhlet, ultrasound, and microwave). Results showed that blanching treatments significantly affected the total phenolics ($p < 0.05$), and the blanched samples obtained in June and were extracted with 60% methanol in microwave had the highest phenolics.

Key words: Walnut green husk, blanching, optimization, phenolic compounds.