بررسی ترکیبات فنول از سبوس برنج به کمک روش امواج رادیویی

ابراهیم عبداللهی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی-گرایش صنایع غذایی دانشگاه آزاد واحد اهواز

Email:Mahsaebm1377@gmail.com

چکیده

ترکیبات فنلی بخش‌هایی از متابولیت‌های ثانویه هستند که بیشتر در گونه‌های گیاهی با تنوع‌های ساختاری بسیار یافت می‌شوند. آنها می توانند به صورت گلیکوزید یا آگلیکون وجود داشته باشند. ترکیبات ماتریسی یا آزاد و عمدتاً شامل ساختارهای پلیمریزه یا مونومر است. علاوه بر این، این ترکیبات به طور جهانی در گیاهان با پایداری متفاوت توزیع نمی شوند. بنابراین، این بررسی عمدتاً بر روی ترکیبات فنلی و چندین روش استخراج که برای به دست آوردن آنها از مواد گیاهی استفاده می شود، تمرکز دارد. بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک، با هدف رسیدن به بالاترین راندمان اسخراج ترکیبات فنولیک، اقدامی موثر در راستای افزایش ارزش افزوده غله برنج است. در این پژوهش شرایط استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از سبوس برنج بهینه سازی شد. آزمایش‌ها مطابق طراحی مرکب مرکزی (CCD) سه متغیره (زمان،ترکیب متانول در آب و توان) انجام شدند. روش ماکروویو به‌عنوان روش استخراجی استفاده شد و روش سطح پاسخ (RSM) به‌عنوان روش بهینه سازی استفاده شد.

کلمات کلیدی: ترکیبات فنول ، امواج رادیویی ، سبوس برنج، آنتی‌اکسیدان

۱. مقدمه

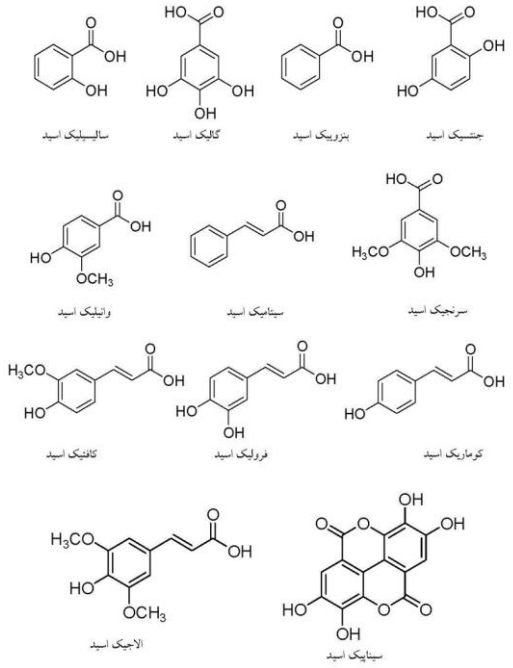
فنول ها یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های حاصـــل از متابولیت ثانویه گیاه هســـتند. آن‌ها به‌عنوان ترکیباتی که حداقل یک گروه هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک یا بنزنی را پذیرفته‌اند تعریف می‌شوند. علاوه بر سیستم حلقه‌ای ممکن است دارای گروه‌های ویژه متیل نیز باشـــند. این ترکیبات دارای خواص بیولوژیکی فراوانی هســـتند و به همین دلیل امروزه بســـیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.ترکیبات با حلقه‌های معطر بیشـــتر یا منفرد که به یک یا چند گروه هیدروکســـیل متصـــل شـــده‌اند، معمولاً فنولیک نامیده می‌شوند. آنها رایج ترین متابولیت های ثانویه گیاهی با بیش از ۸۰۰۰ ساختار شناخته شده هستند. آنها از فنول ساده مانند اسیدهای فنولیک متفاوت هستند. به ترکیبات پیچیده ای مانند تانن ها. این ترکیبات در دفاع گیاه در برابر اشعه ماوراء بنفش (UV)، پاتوژن ها و سایر شکارچیان شرکت می کنند. وجود آنها در تمام اندام های گیاهی آنها را به یک عنصر حیاتی در رژیم غذایی انسان تبدیل می کند. فنولیک ها عمدتاً در میوه ها، حبوبات، سبزیجات، چای، شراب، قهوه یافت می شوند و ویژگی های ارگانولپتیکی غذای گیاهی را به خود اختصـــاص می دهند. به همین ترتیب، ترکیبات فنلی به دلیل تعامل با گلیکوپروتئین بزاق، مســـئول تلخی میوه ها هســـتند. فنولیک ها همچنین می توانند به رنگ بسیاری از سبوس برنج و میوه ها و سبزیجات اضافه شوند. فنولیک ها به دلیل تفاوت در طعم و رنگ مارک های مختلف شـــراب شـــناخته شـــده اند. از بین گیاهان، فنول ها لیگنان ها، تانن ها، اسـیدهای فنولیک، اسـتیلبن ها و فلاونوئیدها هستند. دانه ی برنج پوسته سختی به نام husk دارد که در درون خود از هسته نگهداری می کند.(تصویر۱) پس از حذف پوسته، محصول باقی مانده برنج قهوه‌ای است. پس از حذف سبوس و جنین، آندوسپرم باقی مانده به‌عنوان برنج جلا داده شناخته می‌شود که به‌طور سنتی از همین برنج برای مصرف خوراکی استفاده می‌شود. با این حال بخش سبوس برنج که حذف می‌شود، حاوی مقادیر فراوان فیبر، فیتوکمیکال های زیســـتی از جمله توکوفرول‌ها، توکوترینول‌ها، ارزیانول‌ها، فیبرهای رژیمی، ویتامین‌ها و ترکیبات فنلی هســـتند که برای ســـلامت و تندرســـتی انســـان بســـیار مفید اســـت. ترکیبات شـــیمیایی به فرم‌های آزاد و متصـــل در قســـمت‌های اندوسپرم، سبوس و جنین دانه کامل برنج توزیع شده‌اند. برنج قهوه ای یک برنج سبوس دار است که پوسته بیرونی غیرقابل خوردن آن برداشته شده است. این نوع برنج پوسته یا پوسته بیرونی خود را می ریزد اما لایه سبوس و جوانه باقی می ماند و رنگ قهوه ای یا خرمایی برنج را تشکیل می دهد. برنج سفید همان دانه بدون پوسته، لایه سبوس دار و جوانه غلات است. برنج قرمز، برنج طلایی و برنج سیاه (که برنج بنفش نیز نامیده می شود) همه برنج های کامل با لایه های بیرونی رنگدانه های متفاوت هستند.

تصویر ۱. دانه ی برنج پوسته سختی به نام husk دارد که در درون خود از هسته نگهداری می کند.

مهم‌ترین گروه فیتوکمیکال یافت شده در دانه‌های کامل فنول‌ها، لینگان‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین E، و اینولین‌ها ه ستند. با توجه به این که ع صاره‌ها و ا سانس و ع صاره‌های روغنی، از متابولیت‌های ثانوی گیاهی و ترکیبات عملگر ه ستند. با توجه به ح سا سیت این ترکیبات به حرارت، می‌توان از روش‌های نوین ا ستخراج جهت افزایش بازده ا ستخراج، کاهش زمان ا ستخراج، کاهش میزان م صرف حلال، تقویت کیفیت ا سانس و ع صاره و در نتیجه جلوگیری از آلودگی‌های زی ست محیطی ا ستفاده کرد. مایکروویو امکان ا ستخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد.

مهم‌ترین خواص ترکیبات فنولیک اسیدی

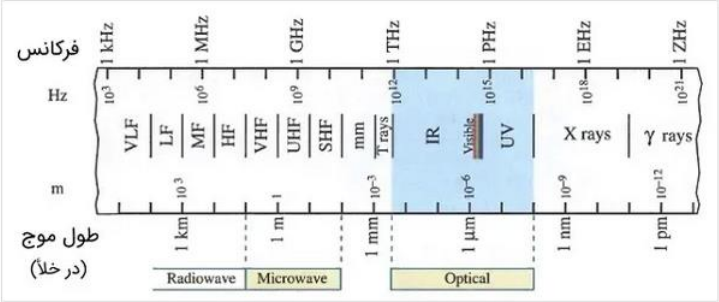
ترکیبات فنولیک ا سیدی(تصویر۲) دارای خواص تسکین درد، ضد فشار خون، ضد التهاب و ارتقای تعدیل روده ا ست. این ترکیبات همچنین در درمان عفونت ادراری و برای التهاب پروستات، التهاب مثانه و میزراه تبسی استفاده می‌شود. از دیگر خواص این ترکیبات که مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان و ضد دیابتی و.... از این ترکیبات اشاره کرد.



تصویر۲.ترکیبات فنولیک.

مایکروویو یا میکروویو ، از ترکیب دو واژه مایکرو یا میکرو(MICRO) ، به معنی کوچک و ویو (WAVE) ، به معنی موج تشکیل شده ا ست و به معنای امواج(ت صویر۳) با طول موج کوتاه و تعداد نو سانات (فرکانس) ب سیار بالا می با شد. مایکروویو نوعی از امواج الکترومغناطیسی است، در واقع امواجی رادیویی با فرکانس بسیار بالا هستند. هر چه فرکانس تشعشع بالاتر رود، طول موج آن

کمترمی شود فرکانس چنین امواجی، بین۳۰۰ مگاهرتز تا چند گیگاهرتز در ثانیه می تواند با شد. برد چنین امواجی کوتاه بوده و در حد چند متر است، ولی میزان نفوذ آن ها نسبتاً بالا است. هر چه فرکانس بیشتر باشد، شدت نفوذ بیشتر ولی برد امواج، کوتاه تر می شود.



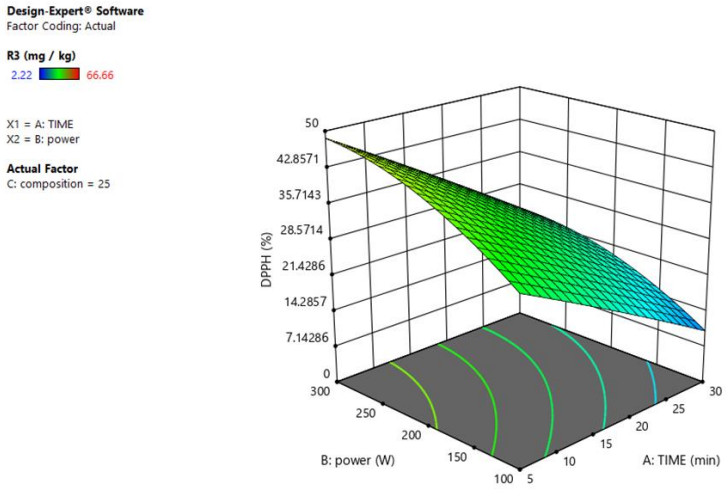
تصویر۳. طیف الکترومغناطیسی از فرکانس‌های پایین در ناحیه رادیویی شروع و تا فرکانس‌های بالا در امواج گاما گسترش می‌یابد. امواج رادیویی فرکانس بالا به امواج مایکروویو یا ریز موج موسوم هستند.

انرژی مایکروویو یک اشعه غیر¬یونیزه کننده است که مهاجرت یون‌ها و چرخش مولکول¬ها با ایجاد یک دو قطبی موجب حرکت مولکول می‌شود و تا زمانی که از دمای بالا استفاده نشده باشد به ساختار مولکول نیز آسیب نمی‌زند. در طول فرایند اشعه دهی، دما و فشار افزایش می‌یابد و همین منجر به تخریب دیواره سلولی می‌شود. Liu و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که استفاده از اشعه مایکروویو موجب ایجاد تورم در دیواره سلولی و نهایتاً منجر به شکست دیواره می‌شود. به دلیل انرژی بالای مایکروویو مورد نیاز و حساسیت حرارتی ترکیبات زیستی، فرایند استخراج با مایکروویو نیاز به بهینه سازی دارد. بیشترین پارامترهایی که برای مدل سازی بهینه سازی مورد استفاده قرار گرفته است، شامل دما، زمان استخراج و نسبت جامد به حلال است. استفاده از مایکروویو باعث افزایش راندمان استخراج ترکیبات زیستی نسبت به سایر روش‌های رایج می‌شود که به دلیل اینتراکشن امواج مایکروویو با مولکول‌های قطبی است که منجر به ایجاد گرما و فشار داخلی مواد جامد می‌شود. استخراج ترکیبات فنولیک از گیاهان مختلف در تحقیقات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. در ۲۰ سال اخیر روش‌های استخراج بسیار زیادی جهت استخراج ترکیبات آلی از مواد جامد مثل خاک، شن‌های رسوبی و یا گیاهان توسعه داده شده است که اکثر آن‌ها شامل استخراج با حلال و سپس آنالیز با کروماتوگرافی گازی یا کروماتوگرافی مایع باکارایی بالا به همراه آشکار سازهای حساس و انتخابی می‌باشند. رایج‌ترین تکنیک‌هایی مورد استفاده شامل استخراج مایع، استخراج فاز جامد، میکرو استخراج فاز جامد، میکرو استخراج حلالی از فضای فوقانی، استخراج با سیال فوق بحرانی، استخراج با مایع تحت فشار، استخراج نقطه ابری و استخراج به کمک ماکروویو می‌باشد. از بین این روش ها، استخراج به کمک مایکروویو، ساده ترین و مقرون به صرفه ترین روش می باشد .در این تکنیک حلال های قطبی مثل آب، متانول یا استون جهت استخراج ترکیبات آلی مورد نظر از ماتریکس های جامد به کار گرفته می شود روش MAE مزایای زیادی نسبت به روش های استخراج مرسوم داراست. دمای استخراج کم تر، حلال مصرفی کم تر و راندمان بازیافت بیش تر از جمله این مزایا می باشد . با این حال پارامترهای فیزیکی چون حلالیت، ثابت دی الکتریک و فاکتورپراکندگی حلال و نمونه باید در نظر گرفته شود. در ابتدا حلال باید قادر باشد آنالیت ها را در خود حل کند. دوم این که حلال دارای ثابت دی الکتریک مناسب باشد تا بتواند انرژی امواج مایکروویو

را جذب کند و باعث افزایش دما شود. به همین دلیل حلال های غیرقطبی در این روش کارایی چندانی ندارند. برای افزایش راندمان بازیافت باید فاکتور پراکندگی بالا با شد چون هرچه این فاکتور بزرگ تر با شد به معنای سریع تر بودن انتقال حرارت ایجاد شده به درون ماتریکس مورد نظر می با شد که منجر به ا ستخراج سریع تر و کامل تر آنالیت می شود. این روش ا ستخراج برای ا ستخراج ترکیبات آلی از بسیاری نمونه‌های زیست محیطی از جمله رسوبات نمونه‌های خاک، نمونه‌های پلیمری، داروها و بسیاری از بافت‌های گیاهی به کار برده می‌شوند.

اثر متقابل زمان و نسبت حلال به نمونه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در ارتباط با اثر متقابل زمان و توان ماکروویو بر میزان ترکیبات فنلانویید کل را نشان می‌دهد، همان‌طور که در این شکل مشاهده می شود در زمان‌های اولیه با افزایش توان ماکروویو میزان ترکیبات فلاونوئید کل عصاره افزایش می یابد. اثر هم‌زمان دو متغیر زمان و توان بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داده شده است در رابطه با اثر متقابل توان و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همان‌طور که در این شکل مشهود می¬باشد با افزایش توان در زمان‌های اولیه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می یابد. با افزایش نسبت نمونه به حلال در زمان تماس کوتاه ترکیبات فنولیک اندکی افزایش و در زمان تماس طولانی کمی کاهش داشتند. علت این نتایج را می‌توان چنین بیان کرد که اثر حلال در زمان تماس طولانی موجب استخراج ترکیبات ناخالص می شود. در استخراج ترکیبات فنولیک از بنه به روش مادون بحرانی نشان دادند تأثیر زمان بر میزان ترکیبات فنولیک به‌صورت تقریباً خطی است و افزایش زمان استخراج، موجب افزایش میزان ترکیبات فنولی عصاره شد. همچنین با افزایش دما نیز، ترکیبات فنولیک تا حدی زیاد می شود اما بین دماهای مختلف تفاوت معنی داری مشاهده نشد(تصویر۴).



٤. اثر متقابل زمان و توان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

اندازه گیری ترکیبات فنل کل

برای محا سبه ترکیبات فنل کل در نمونه‌های ع صاره، از روش ا سپکتوفتومتری ا ستفاده خواهد شد. ml5/0 از محلول ع صاره با ml 5/2 معرف فولین سیوکالتیو ۱۰٪ محلول در آب، و ml 5/2 محلول آبی ۷/۵٪ NaHCO3 مخلوط خواهد شد. مخلوط فوق به مدت ۴۵ دقیقه در شرایط با دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری خواهد شد. جذب هر نمونه محلول با ا سپکتوفتومتر و در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده خواهد شد. اندازه گیری میزان جذب برای هر نمونه در سه تکرار صورت خواهد گرفت و میانگین سه تکرار به‌عنوان نتیجه ثبت خواهد شد. از محلول گالیک ا سید به‌عنوان نمونه ا ستاندارد ا ستفاده و منحنی جذب ر سم خواهد شد، بر مبنای جذب قرائت شده در غلظت گالیک اسید، ترکیبات فنل کل به‌صورت mg of GAE/g of extract بیان خواهند شد.

۲. نتیجه‌گیری

هدف از این پژوهش تعیین بیشینه میزان ترکیبات فنولی کل بود.نتایج حاصل از آنالیز آماری جهت تعیین حالت بهینه آزمون بود. به‌منظور به بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از سبوس برنج از روش سطح پاسخ استفاده کرد. بدین منظور طرح مرکب مرکزی با سطح ۳ مورد استفاده قرار گرفت. برای بهینه سازی از مدت زمان فرایند (۵ تا ۳۰ دقیقه)، قدرت مایکروویو (۱۰۰ تا ۳۰۰ وات) و ترکیب آبی متانول (۰ تا ۵۰٪ متانول در آب) به‌عنوان متغیرهای مستقل استفاده و پاسخ‌های میزان ترکیبات فنلی کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) بررسی شد. آزمایش‌ها به‌منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به‌صورت تصادفی درآمدند. مدل رگرسیونی چند جمله یا درجه دوم به‌منظور پیش بینی پاسخ، در نظر گرفته شد. استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از سبوس برنج بهینه سازی شد. آزمایش‌ها مطابق طراحی مرکب مرکزی (CCD) سه متغیره انجام شدند. روش ماکروویو به‌عنوان روش استخراجی استفاده شد و روش سطح پاسخ (RSM) به‌عنوان روش بهینه سازی استفاده شد. ترکیبات فنولی زیاد موجود در برنج باعث ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در این گیاه می‌شود. پس از بررسی نتایج به دست آمده و مقایسه میان مدل‌های رگرسیونی نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دوم برای تمامی آزمون‌های اندازه گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی دار با سایر مدل‌ها بود؛ و این مدل تنها مدلی بود که فقدان برازش برای آن معنی دار نشده بود.

۳. مراجع

1. *Ganzler, K., A. Salgo, and K. Valkó, Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. Journal of Chromatography A, 1986. 371: p. 299-306.*
2. *Pare, J.J., Microwave-assisted extraction from materials containing organic matter. 1995, Google Patents.*
3. *Rostagno, M.A. and J.M. Prado, Natural product extraction: principles and applications. 2013: Royal Society of Chemistry.*

4. *Kingston, H.M. and L.B. Jassie, Introduction to microwave sample preparation: theory and practice. 1988: American Chemical Society.*
5. *Camel, V., Recent extraction techniques for solid matrices supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. Analyst, 2001. 126(7): p. 1182-1193.*
6. *Wong, M.-K., W. Gu, and T.-L. Ng, Sample preparation using microwave assisted digestion or extraction techniques. Analytical sciences, 1997. 13(Supplement): p. 97-102.*
7. *Young, J.C., Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. 43(11): p. 29042910.*
8. *Letellier, M. and H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds. Analusis, 1999. 27(3): p. 259-270.*
9. *Camel, V., Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2000. 19(4): p. 229-248.*
10. *Hemwimon, S., P. Pavasant, and A. Shotipruk, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda citrifolia. Separation and Purification Technology, 2007. 54(1): p. 44-50.*
11. *Wang, L. and C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology, 2006. 17(6): p. 300-312.*
12. *Fang, X., et al., Optimization of microwave-assisted extraction followed by RPHPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of Chaenomeles sinensis. Journal of separation science, 2010. 33(8): p. 11471155.*
13. *Xiao, W., L. Han, and B. Shi, Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali. Separation and Purification Technology, 2008. 62(3): p. 614-618.*
14. *Kaufmann, B. and P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. Phytochemical analysis, 2002. 13(2): p. 105-113.*
15. *Yu, Y., et al., Nitrogen-protected microwave-assisted extraction of ascorbic acid from fruit and vegetables. Journal of separation science, 2009. 32(23-24): p. 42274233.*
16. *Sharma, U.K., et al., Microwave-assisted efficient extraction of different parts of Hippophae rhamnoides for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Journal of agricultural and food chemistry, 2007. 56(2): p. 374-379.*
17. *Chen, Y., M.-Y. Xie ,and X.-F. Gong, Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from Ganoderma atrum. Journal of Food Engineering, 2007. 81(1): p. 162-170.*
18. *Desai, M., J. Parikh, and P. Parikh, Extraction of natural products using microwaves as a heat source. Separation & Purification Reviews, 2010. 39(1-2); p. 1-32.*
19. *Castro-Vargas, H.I., et al., Extraction of phenolic fraction from guava seeds (Psidium guajava L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. The Journal of Supercritical Fluids, 2010. 51(3): p. 319-324.*
20. *Sun, M. and F. Temelli, Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. The Journal of supercritical fluids, 2006. 37(3): p. 397-408.*
21. *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milkJ. Agric. Food Chem., 48 (2000), pp. 1752-1757, 10.1021/jf000026%2B.*
22. *Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extractionInd. Crop. Prod., 61 (2014), pp. 31-40, 10.1016/j.indcrop.2014.06.035.*

23. *M.J.B. Mengelers, M.B. de Vries, J.H.M. Katan Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man FEBS Lett., 418 (1997), pp. 152-156, 10.1016/s0014-5793(97)01367-7.*