

بهینه‌سازی فرآیند استخراج مواد مؤثر تغاله پرتقال با استفاده از آب تحت بحرانی

نیلوفر قاسمپور^۱، امیرحسین الهامی راد^۲، مجید جوانمرد داخلی^{۳*}، الهام آذرپژوه^{۴*} و محمد آرمین^۵

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

^۲دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

^{۳*}دانشیار گروه فناوری مواد غذایی، مؤسسه مهندسی شیمی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST)، تهران، ایران

^{۴*}دانشیار پژوهش بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، مشهد، ایران

^۵استادیار گروه کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

چکیده

پژوهش حاضر با هدف استفاده بهینه از تغاله پرتقال به‌عنوان پسماند کشاورزی و کارخانه‌های تولید آب پرتقال و استخراج ترکیبات زیست‌فعال (ضدآکسایشی و ضد میکروبی) اجرا گردید. به‌منظور بهینه‌سازی راندمان استخراج، میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره استخراج‌شده با آب تحت بحرانی از طرح مرکزی وجه‌محور Face-Centered CCD استفاده شد. دمای استخراج (۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۶۰ درجه سلسیوس) و زمان استخراج (۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه) به‌عنوان متغیرهای استخراج ترکیبات زیست‌فعال در نظر گرفته شدند. بر اساس مدل‌های حاصل، شرایط بهینه استخراج شامل دمای ۱۴۲/۸۷ درجه سلسیوس و زمان ۳۹/۹۷ دقیقه تعیین شد. در این شرایط، بازده استخراج ۱۳/۹۴ درصد، میزان ترکیبات فنلی کل ۴۵۴/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم و قدرت مهار رادیکال آزاد ۵۱/۷۸ درصد به دست آمد. استخراج در نقطه بهینه نتایج به‌دست آمده را تأیید کرد. علاوه بر این، عصاره استخراج‌شده دارای خواص ضد میکروبی مؤثر بود، به‌طوری‌که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره علیه قارچ پنی‌سیلیوم سیتربنیوم و اسپرژیلوس نایجر به ترتیب ۱۰ و ۵ درصد بود، در حالی‌که این مقدار برای داروی فلوکنازول ۱ درصد گزارش شده است. این مطالعه کارایی بالای فرآیند آب تحت بحرانی را در استخراج ترکیبات زیست‌فعال از ضایعات کشاورزی به اثبات رساند و آن را به‌عنوان روشی سازگار با محیط‌زیست و مؤثر برای تولید ترکیبات ارزشمند معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: تغاله پرتقال، آب تحت بحرانی، ترکیبات فنلی، ضد میکروبی

مقدمه

نقش مهمی در طولانی شدن عمر نگهداری مواد غذایی و کاهش ضایعات دارد. صدها ترکیب افزودنی سنتزی از سوی سازمان‌های مسئول، به‌عنوان ترکیبات مجاز و قابل استفاده در مواد خوراکی معرفی شده‌اند، اما کاربرد آن‌ها در مواد غذایی به دلیل ایمن نبودن محدود است (Gokoglu, N. 2019). از این رو، طی سال‌های اخیر توجه به یافتن افزودنی‌های طبیعی

اهمیت استفاده از افزودنی‌های مختلف با هدف‌های گوناگون در تهیه فرآورده‌های غذایی مختلف به حدی است که بدون بهره‌گیری از آن‌ها تولید و مصرف بسیاری از فرآورده‌های غذایی تقریباً ناممکن می‌شود. یکی از مهم‌ترین افزودنی‌های غذایی، ترکیبات ضدآکسایشی و ضد میکروبی سنتزی است که

گیاهان وجود دارند و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در صنایع غذایی و دارویی اهمیت زیادی یافته‌اند (Huang, et al. 2020). اثر ترکیبات فنلی تفاله پرتقال بر جلوگیری از رشد میکروب‌ها از طریق تغییر در دیواره سلولی و آزادسازی ماکرومولکول‌ها از درون سلول، مشخص شده است (Maran, et al. 2017).

با وجود شناخت مزایای نهفته ترکیبات زیست‌فعال، بازیابی مؤثر آن‌ها وابسته به روش‌های استخراج مناسب و کارآمد است. برای یافتن فناوری‌های جدید و بدون ایجاد آلودگی زیست‌محیطی تلاش‌های زیادی شده است (Zema, et al. 2018). در این زمینه سه روش غرقابی، امواج فراصوت و آب تحت بحرانی به‌عنوان روش‌های مؤثر شناخته شده‌اند که می‌توانند کارایی استخراج را افزایش و زمان فرآیند را کاهش دهند (Lv, et al. 2015؛ Chemat, et al. 2019). با افزایش قیمت انرژی، تحقیقات برای بهبود روش‌های استخراج در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی نیز رو به افزایش است.

استخراج با آب تحت بحرانی روشی است دوستدار محیط‌زیست زیرا از آب به‌عنوان محیط استخراج استفاده می‌کند که حلالی غیرسمی، غیرقابل اشتعال و سازگار با محیط‌زیست است و گازهای گلخانه‌ای یا زباله تولید نمی‌کند. در این روش، آب در حالت تحت بحرانی (در دماها و فشارهای پایین‌تر از نقاط بحرانی به ترتیب کمتر از ۲۲/۱ مگاپاسکال و کمتر از ۳۷۴/۱۵ درجه سلسیوس) استفاده می‌شود. هنگامی که دما و فشار تغییر می‌کنند، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب (به‌ویژه ثابت دی‌الکتریک) نیز تغییر می‌کند که این امر امکان استخراج انتخابی ترکیبات قطبی، نیمه‌قطبی، ضعیف‌قطبی و غیرقطبی را فراهم می‌آورد. علاوه بر این، آب زیر بحرانی می‌تواند نسبت به آب محیطی واکنش‌پذیرتر و خورنده‌تر باشد و می‌تواند هیدرولیز، اکسیداسیون و دیگر مسیرهای تخریب برخی اجزا را کاتالیز کند (Zhang, et al. 2020).

(ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی) مخصوصاً از محصولات جانبی صنایع غذایی مانند پوست و دانه انگور، پوست و پالپ مرکبات، تفاله سیب و انار، ضایعات پوست سیب‌زمینی، ضایعات پیاز و پوسته دانه‌ها که توانایی جایگزینی با انواع سنتزی در مواد غذایی را داشته باشند معطوف شده است.

پرتقال به خانواده روتاسه^۱ و راسته ساپیندالس^۲ تعلق دارد و در نواحی معتدل شمال ایران، از جمله استان‌های گیلان و مازندران و همچنین در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جنوب کشور مانند خوزستان، بوشهر و هرمزگان کشت می‌شود. صنعت فرآوری پرتقال محصولاتی جانبی مانند تفاله را تولید می‌کند که وزن آن‌ها تقریباً بین ۵۵ تا ۶۰ درصد از کل وزن میوه‌ها را شامل می‌شود و منبع خوبی از پلی‌فنول‌ها، پکتین و روغن‌های اساسی هستند (Varmie, and Thakur 2021). تفاله پرتقال همچنین دارای رطوبت و قندهای انحلال‌پذیر بالایی است و بسیار مستعد تخمیر و تجزیه شدن توسط میکروارگانیسم‌ها است؛ بنابراین، مدیریت نادرست این محصولات جانبی می‌تواند تهدیدی باشد برای سلامت انسان، اقتصاد و محیط‌زیست. طی چند سال اخیر، گام‌های قانونی متعددی برای مدیریت مناسب این محصولات برداشته شده است (FAO 2017؛ Panwar, et al. 2021).

محصولات جانبی پرتقال، حاوی ترکیبات زیست‌فعال مختلفی مانند پکتین، فیبر غذایی، ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسانس‌ها هستند که در حوزه‌های مختلف مانند صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی و نساجی کاربرد دارند. این ترکیبات علاوه بر خواص کاربردی، دارای اثر درمانی چون خاصیت ضدسرطانی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری نیز هستند. این ترکیبات همچنین فعالیت‌های ضدتجمع پلاکت، ضدالتهابی و ضدویروسی نیز دارند (Majerska, et al. 2019؛ Papoutsis, et al. 2018؛ Putnik, et al. 2017). ترکیبات فنلی دسته‌ای از ترکیبات زیستی هستند که به‌طور طبیعی در

² Sapindales

¹ Rutaceae

آنتی‌اکسیدانی بالا. اسوارک- گاجی و همکاران (Švarc-Gaji, et al. 2017) از آب تحت بحرانی در دو مرحله برای استخراج فلاوانون‌ها در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس در مرحله اول و هیدرولیز زیست‌توده باقیمانده در دماهای بالای ۲۰۰ درجه سلسیوس در مرحله دوم به‌منظور به دست آوردن مونوساکاریدها و دی‌ساکاریدها استفاده کردند. مطمئناً برای دستیابی به بهترین شرایط عملیاتی و استفاده از فرآیند آب تحت بحرانی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از تفاله پرتقال نیاز به مطالعه بیشتر و توسعه مدل‌های مناسب‌تر خواهد بود. بنابراین با توجه به اهمیت استفاده بهینه از پسماند محصولات کشاورزی و کارخانه‌های صنایع غذایی (مانند کارخانه‌های تولید آب پرتقال) و استخراج ترکیبات زیست‌فعال از آن‌ها، پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال با فرآیند آب تحت بحرانی (به‌عنوان یک فناوری سبز و کارآمد) تحت تأثیر دما و زمان و بررسی فعالیت ضد میکروبی (ضد قارچی) عصاره استخراج شده در نقطه بهینه در شرایط برون‌تنی به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

مواد

تفاله پرتقال از کارخانه افشیره شهرستان تنکابن واقع در استان مازندران خریداری و بلافاصله در آون با دمای ۴۵ درجه سلسیوس تا رسیدن به رطوبت کمتر از ۱۴ درصد خشک شد. نمونه‌های خشک شده با آسیاب آزمایشگاهی پودر و اندازه ذرات آن با استفاده از الک با مش ۴۰ میکرومتر تنظیم و تا زمان آغاز آزمون‌ها در فریزر با دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید. دیگر مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل اتانول ۹۶ درصد، اسید کلریدریک (۳۷ درصد)، کلرید سدیم (۹۹/۵ درصد)، نیترات منیزیم، محیط کشت میکروبی، رادیکال ۲ و ۲- دی فنیل ۱-۱- پیکرو دی هیدرازیل^۲ (۹۵ درصد)،

بالین‌حال، چالش‌هایی در به‌کارگیری این روش وجود دارد از جمله، حساسیت بالا به شرایط عملیاتی (دما، زمان، فشار، جریان آب)، نیاز به تجهیزات خاص با مقاومت بالا و احتمال تخریب برخی ترکیبات حساس در دماهای بالا. همچنین، ویژگی‌های ماده اولیه مانند اندازه ذرات و شرایط نگهداری می‌تواند تأثیر زیادی بر کارایی استخراج داشته باشد. بنابراین، بهینه‌سازی با هدف بالا بردن قابلیت اجرایی و بازده استخراج بدون افزایش هزینه‌ها بسیار بااهمیت است. روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی و آماری است که به‌منظور توسعه دادن و بهینه کردن فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ موردنظر به‌واسطه تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد و در تحقیقات متعددی برای بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیبات زیست‌فعال از منابع مختلف استفاده شده است (Ibrahim, et al. 2018; Munir, et al. 2019; Zhao, et al. 2019).

مطالعات بسیار کمی درباره استخراج مواد مؤثر به روش استخراج با آب تحت بحرانی از پوست پرتقال وجود دارد. لاجوس-پرس و همکاران (Lachos-Perez, et al. 2018) تأثیر پارامترهای عملیاتی آب تحت بحرانی (دما و میزان جریان آب در یک فرآیند مداوم) را بر فلاوونوئیدها از پوست پرتقال بدون چربی بررسی کردند و نشان دادند حداکثر بازده هسپریدین ($11/39 \pm 0/51$ میلی‌گرم در گرم عصاره) و ناریوتین ($21/98 \pm 0/51$ میلی‌گرم در گرم عصاره) در دما و شدت جریان ۱۵۰ درجه سلسیوس و ۱۰ میلی‌لیتر در دقیقه به دست می‌آید. این بازده‌ها تقریباً ۲۱ درصد از کل میزان این فلاوانون‌ها را در عصاره‌ها تشکیل دادند و سبب تولید خالص‌ترین عصاره‌ها شدند. مقایسه نتایج حاصل از روش آب تحت بحرانی با روش استخراج سنتی نشان داد روش آب تحت بحرانی روشی است بسیار کارآمد برای بازیابی ترکیبات زیست‌فعال با فعالیت

² 2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

¹ RSM: Response surface method

معرف فولین سیوکالچو^۱، کلریدپتاسیم (۹۹ درصد)، کلرید آلومنیوم (۹۹ درصد)، هیدروکسید سدیم (۹۸ درصد)، متانول (۹۹/۸ درصد) از شرکت‌های سیگما و مرک خریداری شدند.

استخراج با آب تحت بحرانی

برای استخراج از دستگاه طراحی و ساخته شده توسط

آزمایشگاه فناوری‌های نوین موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی مشهد استفاده گردید. دستگاه شامل تانک آب دیونیزه، پمپ (Comet type: MTP AX 2.70m) برای تأمین فشار، محفظه استخراج با ظرفیت ۱۴۰ میلی‌لیتر، کوپل گرم‌کننده

محفظه، فشارسنج و کنترل کننده دیجیتالی بود. شرایط هر

آزمون شامل دما، زمان و فرکانس قرار گرفتن تحت آب فوق

بحرانی، بر اساس سطوح متغیرهای پیش‌بینی‌شده در طرح

مرکزی وجه‌محور^۲ با $\alpha = 1$ با ۳ تکرار در نقطه مرکزی مطابق

جدول ۱ در نظر گرفته شد. به‌منظور استخراج نمونه‌ها، از آب

دیونیزه استفاده شد. دما و فشار مناسب با استفاده از جدول‌های

ترمودینامیکی تعیین گردید. زمان لازم برای رسیدن دمای

محفظه به ۱۱۰، ۱۴۰ و ۱۷۰ درجه سلسیوس، به ترتیب حدود

۶، ۷ و ۸ دقیقه بود. پس از رسیدن به دمای موردنظر، استخراج

در زمان‌های مختلف (۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه) دنبال شد. پس از

اتمام استخراج، دمای عصاره حاصل توسط سیستم خنک -

کننده با استفاده از جریان آب سرد، کاهش یافت. پس از آن،

عصاره با استفاده از کاغذ واتمن (واتمن شماره ۴) تحت خلأ

صاف و در خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجه سلسیوس

با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی ۲۰ ساعت خشک شد. نمونه-

های خشک‌شده تا زمان آغاز آزمایش‌های بعدی، در تاریکی و

در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند. روی عصاره

استخراج شده آزمون‌های تعیین راندمان استخراج، اندازه‌گیری

میزان ترکیبات فنی و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد اجرا شد.

قارچ‌های مورد مطالعه شامل پنسیلیوم سیترونیوم (M20355) و اسپیرژیلوس نایجر (PTCC5009) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی - صنعتی ایران تهیه گردید.

استخراج ترکیبات زیست‌فعال از تفاله پرتقال استخراج به

روش ماسراسیون

مخلوط پودر تفاله پرتقال خشک‌شده و حلال آبی-

الکلی (۷۰ درصد اتانول - ۳۰ درصد آب، نسبت ۱ به ۱۰

(وزنی/حجمی) ماده خشک به حلال) به مدت ۲۴ ساعت در

مکانی تاریک و در دمای اتاق با همزن مغناطیسی (مدل RCT

Basic, IKA, ساخت آلمان) هم زده شد. محلول تحت خلأ

صاف گردید و عملیات استخراج روی مواد باقیمانده روی صافی

به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه یافت. محلول‌های صاف شده

حاصل از مرحله اول و دوم استخراج با هم مخلوط و با تبخیر

کننده دوار تحت خلأ (مدل Laborota 4000 efficient، ساخت

آلمان) تحت دمای ۴۵ درجه سلسیوس تا حد آگیری کامل

تغلیظ و با خشک‌کن انجمادی خشک گردید. برای جلوگیری

از کف کردن و نیز به‌منظور رسیدن به دمای مناسب برای ورود

به خشک‌کن انجمادی، محلول تغلیظ شده به مدت ۱۹ ساعت

در فریزر با دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری و سپس به

خشک‌کن انجمادی (مدل Operon FDB- 550، ساخت

کشور کره) منتقل شد. نمونه‌ها (حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر) در

خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجه سلسیوس با فشار

۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی ۲۰ ساعت خشک شدند. نمونه‌های

¹ Folin Ciocalhieu reagent

² Face-Centered CCD

بهبودسازی فرآیند استخراج مواد مؤثر تفاله پرتقال با استفاده از آب تحت بحرانی

جدول ۱- تیمارهای تصادفی آزمایش (واقعی و پیش بینی شده)، داده‌های تجربی، مقادیر پیش‌بینی شده و مقادیر اختلاف در استخراج ترکیبات زیست‌فعال از تفاله پرتقال به روش آب تحت بحرانی
 Table 1 — Randomized experimental treatments (actual and predicted) و Experimental data, predicted values, and residuals for the extraction of bioactive compounds from orange pomace using subcritical water extraction

شماره	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	بازده استخراج (Yield) (مقدار واقعی)	بازده استخراج (Yield) (مقدار پیش‌بینی شده)	مقادیر اختلاف	میزان ترکیبات فنلی کل (TPC) (مقدار واقعی)	میزان ترکیبات فنلی کل (TPC) (مقدار پیش‌بینی شده)	مقادیر اختلاف	قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH) (مقدار واقعی)	قدرت گیرندگی رادیکال آزاد DPPH (مقدار پیش‌بینی شده)	مقادیر اختلاف
1	110(1)	30(0)	10.76	11.15	-0.3894	91.43	93.85	-2.42	28.22	30.22	-1.99
2	170(+1)	40(+1)	11.39	11.53	-0.1481	368.25	369.59	-1.34	38.41	38.41	0.0000
3	140(0)	40(+1)	14.60	14.84	-0.2422	457.19	457.17	0.0153	52.44	53.39	-0.9539
4	110(1)	20(1)	12.22	12.22	-0.0008	174.13	173.04	1.09	17.00	16.00	0.9961
5	140(0)	30(0)	13.93	13.29	0.6388	192.78	200.57	-7.79	38.89	39.18	-0.2883
6	170(+1)	30(0)	10.26	9.98	0.2772	73.56	70.64	2.92	24.20	24.20	0.0000
7	140(0)	30(0)	12.85	13.29	-0.4433	198.19	200.57	-2.38	41.21	39.18	2.03
8	110(1)	40(+1)	13.09	12.70	0.3903	309.44	308.11	1.33	45.42	44.43	0.9961
9	170(+1)	20(1)	10.92	11.05	-0.1291	63.57	65.15	-1.58	9.99	9.99	0.0000
10	140(0)	20(1)	14.49	14.36	0.1299	237.90	237.41	0.4853	24.01	24.97	-0.9539
11	140(0)	30(0)	13.21	13.29	-0.0833	210.23	200.57	9.66	39.34	39.18	0.1617

بازده استخراج

در این رابطه: %A درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH،
A_c جذب شاهد و A_s جذب نمونه است (Brand-Williams, et al. 1995).

از تقسیم وزن عصاره تغلیظ شده بر وزن ماده اولیه، مقدار کل ماده خشک عصاره استخراج شده محاسبه و به صورت درصد بیان شد (Saberian, et al. 2017).

ارزیابی حداقل غلظت مهارکنندگی^۱

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره استخراج شده در شرایط بهینه، از یک سری ۲۰ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد. هجده (۱۸) لوله برای بررسی رقت‌های مختلف عصاره (۰.۲۵، ۰.۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر) به همراه محیط کشت، نرمال سالین و سوسپانسیون میکروبی (با غلظت ۱.۵ × ۱۰^۶) در نظر گرفته شد. یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت دارویی حاوی فلوکنازول به همراه سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بود. لوله بیستم به‌عنوان کنترل رشد شامل محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بدون افزودن عصاره یا دارو در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها برای قارچ‌های مورد مطالعه به‌طور جداگانه انجام گرفت. پس از کشت، لوله‌های حاوی قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Penicillium citrinum* به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آنکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد بررسی شدند. برای تعیین میزان کدورت از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-1600A) در

طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. (Vanden, et al. 1991)

تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور بررسی اثر متغیرهای فرایند در استخراج با کمک آب تحت بحرانی بر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده از تفاله پرتقال، از طرح مرکب مرکزی استفاده شد. این طرح شامل دو متغیر در سه سطح و سه تکرار بود. تیمارهای حاصل در جدول ۱ ذکر شده‌اند. برای طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (Design Expert 11)، تولید شرکت

$$(۱) \quad \text{بازده استخراج} = \frac{\text{وزن عصاره تغلیظ شده}}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

تعیین ترکیبات فنلی

ترکیبات فنلی کل بر اساس روش فولین سیو کالچو اندازه‌گیری شد (Usenik, et al. 2008). به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (رقیق شده با متانول ۱:۱۰ حجمی / حجمی) ۶ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فنل سیوکالچو اضافه گردید، پس از ۸ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲۰ درصد وزنی / حجمی) افزوده و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به‌منظور تکمیل واکنش نگهداری شد. جذب آن در ۷۶۵ نانومتر با استفاده از طیف‌سنج (A UV-1600) خوانده شد. میزان ترکیبات فنلی کل موجود در نمونه از روی منحنی استاندارد (اسیدگالیک در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۹۵۰ میلی‌گرم در لیتر) تعیین و بر اساس میلی‌گرم اسیدگالیک در صد گرم نمونه گزارش گردید.

اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

محلول ۰.۰۰۶ درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول تهیه شد. ۰.۱ میلی‌لیتر از عصاره تفاله پرتقال با ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH و ۲.۹ میلی‌لیتر متانول مخلوط گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب آن در طول موج ۵۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. متانول برای تنظیم صفر دستگاه و محلول DPPH-متانول به‌عنوان شاهد استفاده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد بر اساس رابطه (۲) محاسبه گردید.

$$(۲) \quad A\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

^۱ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

اصلاح‌شده را داشته باشد. برای بررسی همخوانی مدل‌های پیشنهادی و ارزیابی آماری معنی‌داری متغیرهای مدل، از تجزیه و تحلیل واریانس و رگرسیون استفاده شد. بر اساس شاخص P مدل‌ها و معادلات بررسی گردیدند. در این تحلیل، ضریب تبیین برای راندمان استخراج، میزان ترکیبات فنولی کل و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد در فرآیند آب تحت بحرانی به ترتیب ۰/۹۵، ۰/۹۹ و ۰/۹۹ گزارش شد. به‌طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که مدل‌های مورد استفاده می‌توانند برای تخمین شرایط بهینه استخراج عصاره از تفاله پرتقال به کار روند.

نمودارهای ارزیابی مدل

شکل ۱- الف نمودار نرمال باقیمانده‌ها را نمایش می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نقاط روی یک خط راست قرار دارند و از توزیع نرمال پیروی می‌کنند که صحت مدل‌ها را برای پاسخ‌ها مجدداً تأیید می‌کند. بر اساس نمودار مقادیر داده‌های تجربی در برابر مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل‌ها (شکل ۱-ب)، مشاهده می‌شود که نقاط نیز روی یک خط قرار دارند که نشان‌دهنده برازش خوب مدل‌ها با داده‌های تجربی است. نمودار باقیمانده‌ها برحسب مقادیر پیش‌بینی شده (شکل ۱-ج) نشان می‌دهد که نقاط در بین دو خط قرار دارند که این نیز تأییدی بر برازش مناسب مدل‌ها با داده‌هاست. نمودار لایه‌های داده ۲ (شکل ۱-د) نیز نشان‌دهنده این است که لایه‌ها با خط ۱ فاصله دارند. لایه‌هایی که به ۱ نزدیک می‌شوند، یا برابر با ۱ هستند، نشان می‌دهند که آن نقطه بر مدل تأثیر خواهد گذاشت. از این‌رو، طراحی مناسب باید از لایه‌های نزدیک به ۱ اجتناب کند.

Stat-Ease Inc. ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای وابسته در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل، نمودار سطوح آن‌ها با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت رسم شد. به‌منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده، آزمون ضعف برازش، ضریب تغییرات، مقادیر ضریب تبیین، ضریب تبیین تعدیل شده و مدل احتمال تعیین شدند. مدل‌های به‌دست آمده از بررسی رفتار متغیرها بر خصوصیات عصاره‌های استخراج‌شده، به‌منظور بهینه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. بهینه‌سازی با هدف به دست آوردن عصاره با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی و با بهره‌گیری از روش تابع مطلوبیت^۱ موجود در نرم‌افزار دیزاین اکسپرت صورت گرفت. عصاره‌گیری تحت شرایط بهینه پیشنهادی اجرا گردید و خصوصیات عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. به‌منظور تأیید صحت مدل‌ها، نتایج پیشگویی شده و تجربی با نمونه شاهد با نرم‌افزار MStatC و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) مقایسه شدند.

نتایج

تعیین مدل مناسب

به‌منظور تعیین مدل تجربی برای پیش‌بینی پاسخ‌ها، معادلات چندجمله‌ای شامل مدل‌های خطی، دو فاکتوری و تعاملی، درجه ۲ و درجه ۳، بر داده‌های به‌دست آمده از روش سطح پاسخ برازش شدند. پس‌از آن، این مدل‌ها مورد تحلیل آماری قرار گرفتند (جدول ۲). لازم است گفته شود از نظر آماری مدلی مناسب به حساب می‌آید که آزمون عدم برازش آن غیرمعنی‌دار باشد و بالاترین ضریب تبیین و ضریب تبیین

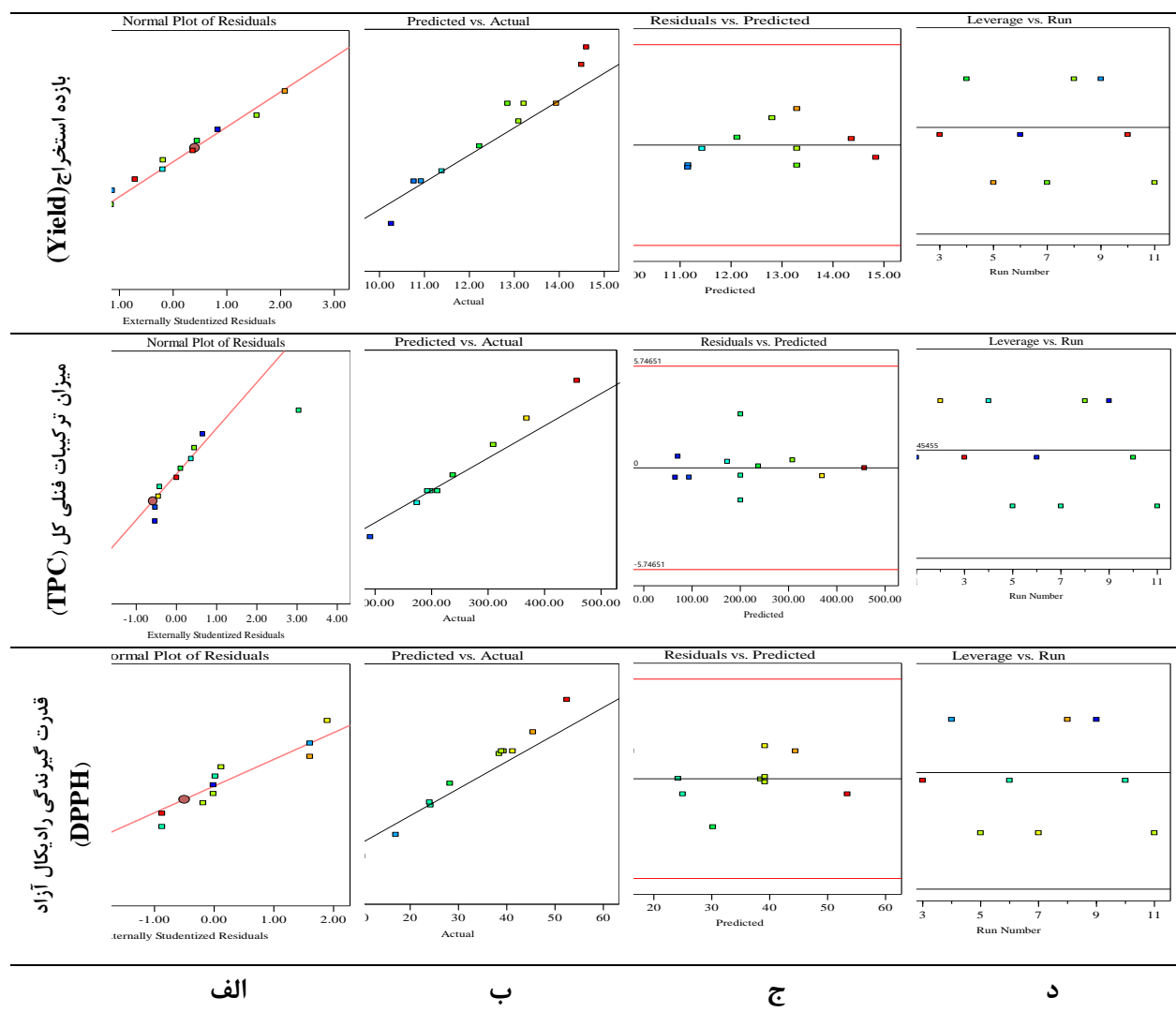
² Leverage

¹ Desirability Function

جدول ۲- تجزیه و تحلیل واریانس برای مدل‌های پیش‌بینی شده بر متغیرهای پاسخ عصاره تفاله پرتقال

Table 2 - Analysis of Variance (ANOVA) for the Predicted Models on the Response Variables of Orange Pomace Extract

قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH)		میزان ترکیبات فنلی کل (TPC)		بازده استخراج (Yield)		درجه آزادی	منبع
ارزش P	مجموع مربعات	ارزش P	مجموع مربعات	ارزش P	مجموع مربعات		
درجه دوم		درجه دوم		درجه دوم			مدل انتخابی
0.00	1656.84	< 0.0001	152000	0.00	22.19	5	مدل
0.01	54.28	0.0053	807.82	0.03	2.05	1	دمای استخراج (A)
0.00	1211.83	< 0.0001	7241.69	0.26	0.04	1	زمان استخراج (B)
1.00	0.00	< 0.0001	7171.55	0.68	0.04	1	AB
0.00	363.48	< 0.0001	35466.97	0.00	18.82	1	A ²
0.97	0.00	< 0.0001	54540.32	0.01	4.35	1	B ²
	12.2		181.5		1.06	5	باقیمانده
0.35	8.98	0.958	21.92	0.72	0.46	3	ضعف برازش
	3.03		159.58		0.61	2	خطای خالص
	1668.86		152000		23.25	10	مجموع
							پارامترهای ارزیابی مدل
	0.99		0.99		0.95		ضریب تبیین
	0.98		0.99		0.91		ضریب تبیین تعدیل شده (Adjusted R ²)
	0.95		0.99		0.75		ضریب تبیین پیشگویی شده (Predicted R ²)
	37.91		88.10		14.27		دقت کافی (Adeq Precision)
	1.55		6.02		0.46		انحراف معیار
	32.65		216.06		12.52		میانگین
	4.75		2.79		3.68		ضریب تغییرات (درصد)



شکل ۱- نمودارهای ارزیابی مدل برای پاسخ‌های بازده استخراج، Yield؛ ترکیبات فنلی کل، TPC؛ قدرت گیرندگی رادیکال آزاد DPPH (الف)، توزیع نرمال باقیمانده، (ب) نمودار داده‌های تجربی در برابر مقادیر پیش‌بینی شده (ج) نمودار باقیمانده‌ها برحسب مقادیر پیش‌بینی شده، (د) نمودار لایه‌های داده

Figure 1 - Model Evaluation Charts for the Response Variables: Extraction Yield (Yield), Total Phenolic Compounds (TPC), and Free Radical Scavenging Capacity (DPPH)

(a) Normal distribution of residuals; (b) Plot of experimental data versus predicted values; (c) Residuals plot against predicted values; (d) Data leverage plot

اثر پارامترهای استخراج بر بازده استخراج ترکیبات زیست فعال

روند تغییر بازده استخراج ترکیبات زیست فعال در روش آب تحت بحرانی با توجه به مولفه‌های استخراج و به صورت نمودار رویه پاسخ در شکل ۲ و مدل پیش‌بینی نهایی برای بازده استخراج (Yield، %) با استفاده از ضریب‌ها و حذف جملات تعامل غیرمعتبر در رابطه ۳ ارائه شده است.

$$\text{رابطه ۳} \quad \text{Yield (\%)} = +13.29 - 0.5850 A + 0.2403 B - 2.73 A^2 + 1.31 B^2$$

نتایج به دست آمده از این پژوهش اثر معنی دار دمای استخراج، مجذور اثرهای دمای استخراج و زمان استخراج را نشان می‌دهد (جدول ۲). بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌های راندمان استخراج ترکیبات زیست فعال استخراج شده با روش آب تحت بحرانی نشان می‌دهد که معادله حاصل از ضریب تبیین (۰/۹۵) و ضریب تبیین تعدیل شده (۰/۹۱) بالا و با اختلاف کمتر از ۰/۲ برای پیشگویی برخوردار است. اندازه‌گیری دقت کافی^۱، نسبت سیگنال به نویز را نشان می‌دهد. نسبت بالای ۴ مطلوب است. نسبت برابر با ۱۴/۲۶۵ نشان دهنده یک سیگنال کافی و مناسب بودن مدلی است که انتخاب شده است. نمودار سطح پاسخ تأثیر آب تحت بحرانی (دما و زمان استخراج) بر بازده استخراج ترکیبات زیست فعال عصاره تفاله پرتقال در شکل ۲ نشان داده شده است. در این شکل مشاهده می‌شود افزایش راندمان استخراج ترکیبات زیست فعال با افزایش دما تا ۱۴۰ درجه سلسیوس افزایش و در دماهای بالاتر راندمان استخراج کاهش می‌یابد. دما یکی از پارامترهای مهم و تأثیرگذار بر کارایی و گزینش‌پذیری استخراج در روش آب تحت بحرانی است. افزایش دما از سویی باعث شکسته شدن

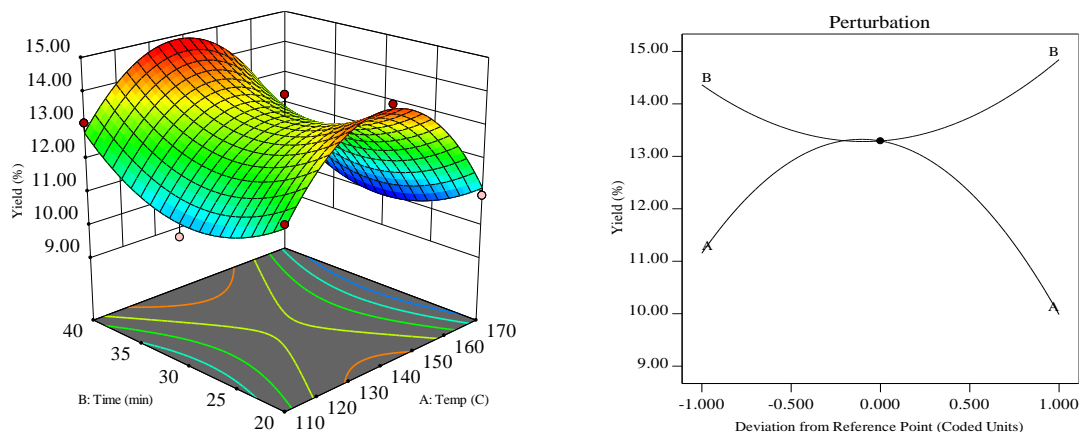
نیروهای منسجمی می‌شود (مانند پیوند هیدروژنی، نیروهای وندروالس، پیوندهای دوقطبی- دوقطبی) که ذرات را درون ماتریکس تفاله پرتقال پیوند می‌دهند و از سویی دیگر افزایش دما با کاهش گرانیوی حلال، نفوذ حلال به درون ذرات ماتریکس را افزایش می‌دهد و در نتیجه سبب بهتر شدن فرآیند استخراج می‌گردد (Shitu, et al. 2015؛ Cheng, et al. 2021؛ Pinto, et al. 2021). گزارش شده است افزایش دما از ۲۵ به ۲۰۰ درجه سلسیوس ثابت دی‌الکتریک آب را از ۷۵ به ۳۵ کاهش می‌دهد که نزدیک به ثابت دی‌الکتریک متانول و اتانول است. دماهای بالا می‌تواند باعث تخریب برخی ترکیبات حساس به حرارت شود. باین حال، تخریب اجزای استخراج شده تنها به دما وابسته نیست، بلکه به زمان قرارگیری نیز بستگی دارد که می‌تواند بر کارایی استخراج تأثیر بگذارد (Cheng, et al. 2020).

همان‌طور که از شکل ۲ مشاهده می‌شود، راندمان استخراج ترکیبات زیست فعال با بیشتر شدن زمان استخراج از ۲۰ به ۳۰ دقیقه به میزان جزئی کاهش و بعدازآن با افزایش دما تا ۴۰ دقیقه با شیب تندی افزایش می‌یابد. این پدیده احتمالاً به دلیل فرآیند وابسته به زمان استخراج است که سبب خروج تدریجی ترکیبات زیست فعال از تفاله پرتقال شده است.

اثر پارامترهای استخراج بر میزان ترکیبات فنلی

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود دمای استخراج، زمان استخراج و مجذور اثر دمای استخراج و زمان استخراج و اثر متقابل متغیرها اثر معنی داری بر میزان ترکیبات فنلی دارند. مدل پیش‌بینی نهایی برای ترکیبات فنلی کل (TPC, Mg/g) با استفاده از ضریب‌ها در رابطه ۴ ارائه شده است.

¹ Adeq Precision



شکل ۲- نمودار سه‌بعدی و تغییرات حول نقطه مرکزی بازده استخراج ترکیبات زیست‌فعال (Yield، درصد) عصاره تفاله پرتقال تحت تأثیر دما (درجه سلسیوس) و زمان (دقیقه)

Figure 2 - 3D Plot and Variations Around the Central Point for the Extraction Yield of Bioactive Compounds (Yield, %) from Orange Pomace Extract Under the Influence of Temperature (°C) and Time (Minutes)

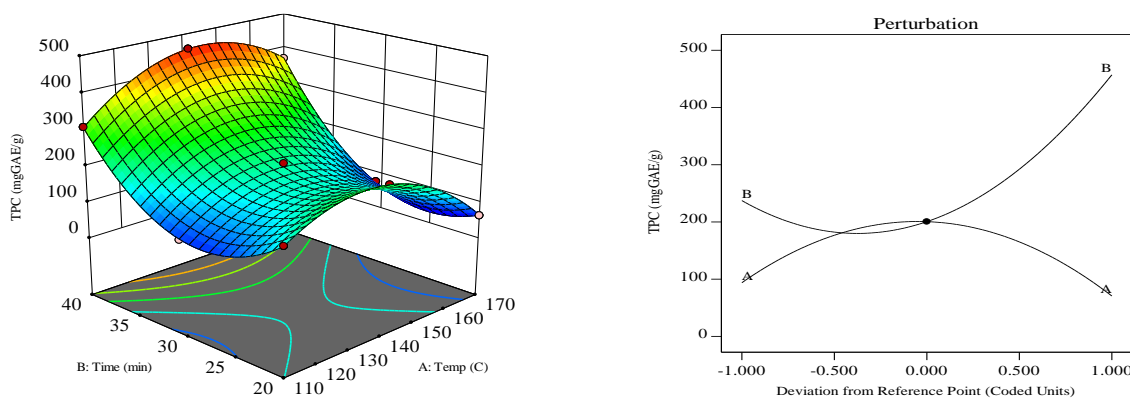
$$\text{TPC (Mg GAE/g)} = +200.57 - 11.60 A + 109.88 B + 42.34 AB - 118.32 A^2 + 146.73 B^2$$

رابطه ۴

در انتقال جرم و آزادسازی ترکیبات فنلی می‌شود (Ibrahim, et al. 2019). علاوه بر این، افزایش دما می‌تواند به نرم شدن ساختار سلولی گیاه و شکستن پیوند میان ترکیبات فنلی و ماکرومولکول‌هایی مانند پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها کمک کند و منجر به افزایش آزادسازی این ترکیبات گردد می‌گردد (Pinto, et al. 2021؛ Cheng, et al. 2021؛ Shitu, et al. 2015). با این حال، در دماهای بالاتر از ۱۳۵ درجه سلسیوس، کاهش میزان ترکیبات فنلی استخراج شده ممکن است ناشی از تخریب حرارتی این ترکیبات حساس، پلیمریزاسیون، یا واکنش‌های اکسایشی باشد که سبب کاهش خلوص و مقدار ترکیبات قابل اندازه‌گیری در عصاره می‌شود. این روند کاهش در دماهای بالا، در مطالعات متعددی نیز گزارش شده است که برای استخراج ترکیبات پلی‌فنلی از منابع گیاهی از آب تحت بحرانی استفاده کرده‌اند می‌گردد (Kumar, et al. 2011؛ Ahmadian-Kouchaksaraie, et al. 2016).

بررسی مدل به دست آمده برای پیش‌بینی میزان ترکیبات فنلی نشان می‌دهد که مدل حاصل دارای ضریب تبیین (۰.۹۹) و ضریب تبیین تعدیل شده (۰.۹۹) بالا و از نظر آماری معنادار است (جدول ۲). ضریب تغییرات آن در محدوده قابل قبول (۲.۷۹) قرار دارد و آزمون عدم برازش آن معنادار نیست ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است. با توجه به معنی دار بودن اثر درجه دوم دمای استخراج (جدول ۲) و تحلیل نمودار سطح پاسخ (شکل ۳)، مشاهده می‌شود که با افزایش دما تا حدود ۱۳۵ درجه سلسیوس، میزان استخراج ترکیبات فنلی از تفاله پرتقال روند افزایشی دارد، اما در دماهای بالاتر این مقدار به تدریج کاهش می‌یابد. این افزایش اولیه را می‌توان به کاهش قطبیت آب در شرایط تحت بحرانی نسبت داد که موجب افزایش قابلیت انحلال ترکیبات نیمه‌قطبی مانند فنول‌ها می‌شود. کاهش گرانشی و تنش سطحی آب در دماهای بالا باعث تسهیل نفوذ حلال به درون ماتریس گیاهی، تسریع

استخراج ترکیبات فنلی در دماهای بالاتر از ۱۴۵ درجه سلسیوس در پژوهش حاضر نیز می‌تواند به دلیل تجزیه و تخریب حرارتی ترکیبات فنلی باشد (Cheng, et al. 2020). شکل ۳ نشان می‌دهد افزایش پارامتر زمان (تا حدود ۳۵ دقیقه) در ابتدا منجر به کاهش جزئی میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال می‌شود که احتمالاً به دلیل فرآیند وابسته به زمان استخراج است که سبب افزایش تخریب این ترکیبات در زمان‌های استخراج بالاتر می‌شود (Pintu, et al. 2021).



شکل ۳- نمودار سه‌بعدی و تغییرات حول نقطه مرکزی میزان ترکیبات فنلی (TPC، میلی‌گرم بر صد گرم) عصاره تفاله پرتقال تحت تأثیر دما (درجه سلسیوس) و زمان (دقیقه)

Figure 3 - 3D Plot and Variations Around the Central Point for Total Phenolic Compounds (TPC, mg/100 g) in Orange Pomace Extract Under the Influence of Temperature (°C) and Time (Minutes)

اثر پارامترهای استخراج بر قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

۲. مدل پیش‌بینی نهایی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH، درصد) با استفاده از ضریب‌ها در رابطه ۵ و نمودار سطح پاسخ در شکل ۴ ارائه شده است.

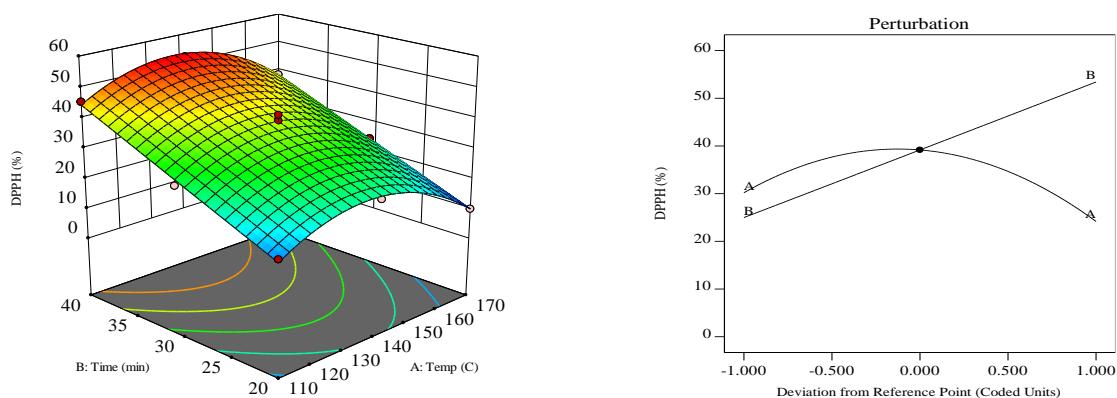
$$\text{DPPH} = +39.16 - 3.01 A + 14.21 B - 11.98 A^2$$

رابطه ۵ با توجه به نمودار سطح پاسخ (شکل ۴)، افزایش دمای استخراج تا حدود ۱۴۵ درجه سلسیوس منجر به افزایش معنی‌دار درصد بازدارندگی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره‌های استخراج‌شده در ۱۴۵ درجه سلسیوس احتمالاً ناشی از وقوع واکنش‌های مختلف در شرایط آب زیر بحرانی است که می‌تواند منجر به تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی یا احیاکننده، از جمله ترکیبات حاصل از واکنش میلارد، شود

بررسی معادله به‌دست‌آمده برای درصد بازدارندگی رادیکال آزاد نشان می‌دهد که معادله حاصل دارای ضریب تبیین (۰/۹۹) و ضریب تبیین تعدیل شده (۰/۹۸) بالا و معنی‌دار برای پیشگویی آن است. آزمون ضعف برازش آن معنی‌دار ($P > 0.05$) نیست و ضریب تغییرات آن نیز پایین (۴/۷۵) است که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل ارائه شده است. مقدار عددی دقت کافی (نسبت سیگنال به نویز) نسبت بسیار بالاتر از ۴ را نشان می‌دهد (۳۷/۹۱) که نشان‌دهنده یک سیگنال کافی و مناسب بودن مدل انتخاب شده است (جدول

بهینه‌سازی فرآیند استخراج مواد مؤثر تفاله پرتقال با استفاده از آب تحت بحرانی

(Plaza, et al. 2013). کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره در دماهای بالاتر احتمالاً به تخریب پلی‌فنول‌های حساس به حرارت در اثر حرارت‌دهی طولانی‌مدت نسبت داده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، اثر زمان استخراج بر درصد بازدارندگی رادیکال آزاد نیز به صورت خطی است؛ بنابراین، پارامتر زمان استخراج به‌طور خطی سبب افزایش معنی‌دار درصد بازدارندگی شده است. پیش‌تر گفته شد این پدیده به احتمال زیاد به دلیل تخریب ترکیبات آنتی-اکسیدان‌های حساس به حرارت است که در زمان‌های طولانی در معرض حرارت قرار گرفته‌اند.



شکل ۴- نمودار سه‌بعدی و تغییرات حول نقطه مرکزی درصد بازدارندگی رادیکال آزاد (DPPH، درصد) عصاره تفاله پرتقال تحت تأثیر دما (درجه سلسیوس) و زمان (دقیقه)

Figure 4 - 3D Plot and Variations Around the Central Point for Free Radical Scavenging Inhibition Percentage (DPPH, %) in Orange Pomace Extract Under the Influence of Temperature (°C) and Time (Minutes)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌شود (شکل ۵). برای حصول اطمینان از درست بودن شرایط، آزمایش در شرایط بهینه تکرار شد و پاسخ‌های به‌دست آمده در جدول ۳ نشان داده شده است. نبود تفاوت معنی‌دار مدل‌ها و مشاهدات تجربی، کارایی مدل‌ها را به‌خوبی اثبات می‌کند.

نتایج تحقیق همچنین نشان می‌دهد شرایط بهینه استخراج با آب تحت بحرانی، در مقایسه با روش ماسراسیون، سبب بهبود قابل‌توجه بازده استخراج، بهبود میزان ترکیبات فنلی کل و بالا رفتن قدرت گیرندگی رادیکال آزاد می‌شود. در شرایط بهینه، بازده استخراج به ۱۳/۹۴ درصد رسید که به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از بازده ۴/۱۶ درصد در روش ماسراسیون

بهینه‌سازی روش استخراج با آب تحت بحرانی شرایط بهینه استخراج عصاره تفاله پرتقال در فرآیند آب زیر بحرانی با استفاده از بهینه‌یابی عددی و نموداری در نرم‌افزار تعیین شد. در این فرآیند، بهینه‌سازی راندمان استخراج، افزایش میزان ترکیبات فنلی کل و تقویت قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد به‌عنوان اهداف اصلی در تجزیه و تحلیل‌های آماری در نظر گرفته شدند و بدین‌گونه شرایط برای دنبال کردن فرآیند بهینه از روش سطح پاسخ با استفاده از تابع مطلوبیت به‌دست آمد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که در دمای استخراج ۱۴۲/۸۷ درجه سلسیوس و زمان استخراج ۳۹/۹۷ دقیقه، عصاره با بالاترین درجه مطلوبیت، بالاترین بازده و بیشترین

دارد. این تفاوت‌ها به ماهیت ترکیبات فنلی و شرایط استخراج مربوط می‌شود.

بررسی قدرت ضد میکروبی عصاره استخراج شده در شرایط بهینه با آب تحت بحرانی

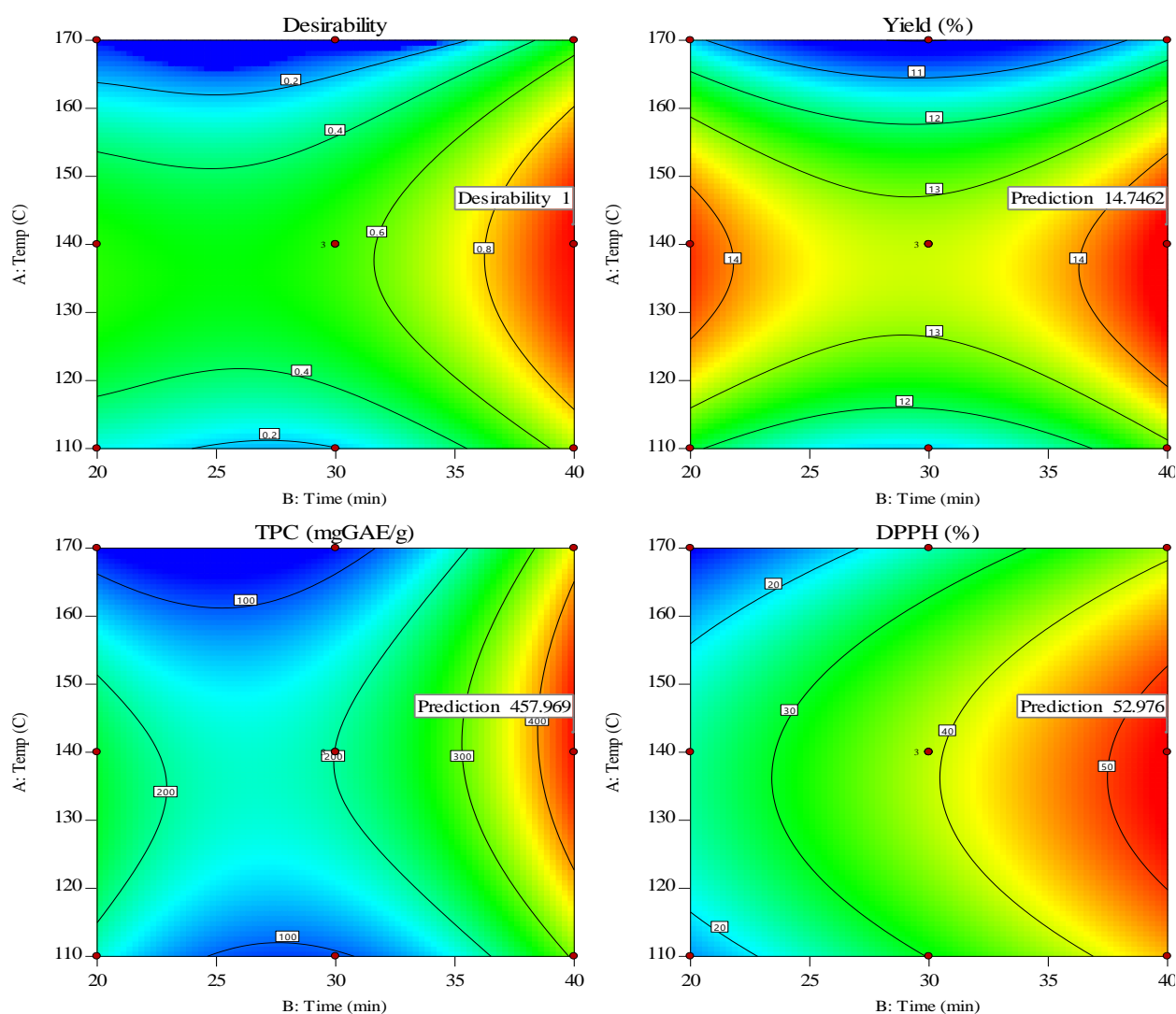
نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره تفاله پرتقال در جدول ۳ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره تفاله پرتقال در غلظت ۱۰ درصد برای قارچ پنی‌سیلیوم سیترنیوم و ۵ درصد برای آسپرژیلوس نیجر است در حالی که حداقل غلظت بازدارندگی فلوکنازول علیه این قارچ‌ها ۱ درصد است. خواص بازدارندگی از رشد میکروب‌ها توسط عصاره تفاله پرتقال، مربوط به ترکیبات فنلی است که در حلال‌های قطبی انحلال پذیرند. اثر ضد میکروبی ترکیبات فنلی از طریق تشکیل کمپلکس با غشای خارجی باکتری‌ها و پروتئین‌های انحلال پذیر است که به غشا متصل‌اند. این ترکیبات با نفوذ در غشای سلولی و شکستن آن باعث ایجاد اثر ضد میکروبی می‌شوند (Deshpande, et al. 2013). پیش‌تر گفته شد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره تفاله پرتقال برای قارچ پنی‌سیلیوم سیترنیوم در غلظت ۱۰ درصد و برای آسپرژیلوس نیجر در غلظت ۵ درصد مشاهده می‌شود، در حالی که حداقل غلظت بازدارندگی فلوکنازول علیه این قارچ‌ها ۱ درصد است. خواص بازدارندگی از رشد میکروب‌ها توسط عصاره تفاله پرتقال مربوط است به ترکیبات فنلی انحلال پذیر در حلال‌های قطبی. اثر ضد میکروبی ترکیبات فنلی از طریق تشکیل کمپلکس با غشای خارجی باکتری‌ها و پروتئین‌های متصل به غشا صورت می‌گیرد. این ترکیبات با نفوذ به داخل غشای سلولی و ایجاد شکست در ساختار آن، منجر به نشت محتویات سلول و مرگ میکروبی می‌شوند (Lobiuc, et al. 2023).

است. میزان ترکیبات فنلی کل در روش آب تحت بحرانی ۴۵۴/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در صدگرم اندازه‌گیری شد، در حالی که این مقدار در روش ماسراسیون تنها ۱۴۰/۲۳ میلی‌گرم گالیک اسید در صد گرم بوده است. قدرت گیرندگی رادیکال آزاد نیز در روش آب تحت بحرانی به ۵۱/۷۸ درصد رسید، در حالی که این مقدار در روش ماسراسیون تنها ۲۳/۵۸ درصد است. نتایج به دست آمده حاکی از برتری روش استخراج با آب تحت بحرانی نسبت به روش ماسراسیون است. این روش نه تنها بازده و کیفیت عصاره بهتری فراهم می‌کند، بلکه روشی است سازگار با محیط زیست که از حلال‌های شیمیایی استفاده نمی‌کند. اما، انتخاب روش استخراج مناسب وابسته است به نوع ترکیبات هدف، حساسیت آن‌ها نسبت به حرارت و ساختار ماتریس گیاهی. مطالعات ماسالا و همکاران (Masala et al. 2024) نشان می‌دهد در روش استخراج ترکیبات فنلی از ضایعات گل زعفران به کمک امواج فراصوت با استفاده از مخلوط اتانول-آب (۵۰:۵۰) بیشترین میزان فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (۴/۶۷ ± ۹۳/۴۳ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) به دست می‌آید. در حالی که در روش استخراج با آب تحت بحرانی با استفاده از اتانول ۹۶ درصد در دمای ۱۲۵ درجه سلسیوس، نتایج کمی پایین‌تر است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که روش استخراج به کمک امواج فراصوت در استخراج ترکیبات حساس به حرارت مؤثرتر است، در حالی که روش استخراج با آب تحت بحرانی برای استخراج ترکیبات مقاوم‌تر به حرارت مناسب‌تر است. سولجمانوویچ و همکاران (Sulejmanović, et al. 2024)، استخراج ترکیبات فنلی از پودر زنجبیل خام را با استفاده از فرآیند آب تحت بحرانی و با کمک امواج فراصوت مقایسه کردند و نشان دادند که روش استخراج با آب تحت بحرانی بازده بالاتری در استخراج ترکیبات فنلی

جدول ۳- مقادیر پیش‌بینی شده و مشاهده شده ویژگی‌های مختلف در شرایط بهینه استخراج با آب تحت بحرانی
 Table 3 - Predicted and Observed Values of Various Characteristics Under Optimal Extraction Conditions Using Subcritical Water

قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH)	میزان ترکیبات فنلی کل (TPC)	بازده استخراج (Yield)	
52.98 a	457.97 a	14.75 a	مقادیر پیش بینی شده
51.78±2.56 a	454.80±3.95 a	13.94±0.72 a	مقادیر آزمایش شده
23.58±0.72 b	140.23±2.67 b	4.16±0.32 b	استخراج به روش ماسراسیون

حروف یکسان در هر ستون، نشان دهنده نبود اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) است.



شکل ۵- بهینه‌یابی نموداری استخراج با آب تحت بحرانی

Figure 5 - Graphical Optimization of Extraction Using Subcritical Water

جدول ۶- حداقل غلظت بازدارندگی عصاره تفاله پرتقال استخراج شده بهینه با فرآیند آب زیر بحرانی در مقایسه با فلوکنازول

Table 6 – Minimum Inhibitory Concentration of Optimally Extracted Orange Pomace Using the Subcritical Water Process Compared with Fluconazole

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)						نمونه
%10	%5	%2	%1	%0.5	%0.25	
100	92	58	31	0	0	غلظت عصاره تفاله پرتقال برای قارچ پنی سیلیوم سیترازیوم
100	100	90	68	35	0	غلظت عصاره تفاله پرتقال برای قارچ اسپرژیلوس نایجر
100	100	100	100	92	55	فلوکنازول برای قارچ پنی سیلیوم سیترازیوم
100	100	100	100	89	56	فلوکنازول برای قارچ اسپرژیلوس نایجر

نتیجه‌گیری کلی

خواص ضد میکروبی عمدتاً به دلیل ترکیبات فنلی موجود در عصاره است که می‌توانند با تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها عمل کنند. این پژوهش تأیید کرد که فرآیند آب تحت بحرانی می‌تواند جایگزینی مناسب برای روش‌های استخراج سنتی باشد که نه تنها بازده و کیفیت عصاره را افزایش می‌دهد، بلکه به دلیل استفاده از آب به‌عنوان حلال، به حفظ محیط زیست نیز کمک می‌کند. این دستاوردها می‌توانند در صنایع غذایی، داروسازی و دیگر کاربردهای مرتبط با ترکیبات زیست‌فعال به کار روند.

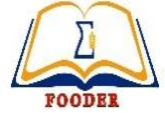
این پژوهش نشان داد که روش استخراج با آب تحت بحرانی ابزاری کارآمد و دوست‌دار محیط‌زیست برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از ضایعات پوست پرتقال است. استفاده از روش آماری سطح پاسخ، امکان بهینه‌سازی شرایط استخراج را از جمله دما و زمان فراهم کرد که در دمای ۱۴۲/۸۷ درجه سلسیوس و زمان ۳۹/۹۷ دقیقه، بیشترین بازده استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌شود. عصاره استخراج شده در شرایط بهینه، خواص ضد میکروبی مؤثری را علیه قارچ‌های پنی سیلیوم سیترازیوم و اسپرژیلوس نایجر نشان داد. این

منابع

- Ahmadian-Kouchaksaraie, Z. Niazmand, R. and Najaf Najafi, M. 2016. Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidants from Crocus sativus petals of saffron industry residues: Box-Behnken design and principal component analysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 36, 234-244. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.005>
- Brand-Williams, W. Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Chemat, F. Abert Vian, M. Ravi, H. K. Khadhraoui, B. Hilali, S. Perino, S. and Fabiano-Tixier, A. S. 2019. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*. 24(16), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Cheng, Y. Xue, F. Yu, S. Du, S. and Yang, Y. 2021. Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*. 26(13), 4004. <https://doi.org/10.3390/molecules26134004>
- Deshpande, S. N. 2013. Preliminary phytochemical analysis and in vitro investigation of antibacterial activity of *Acacia nilotica* against clinical isolates. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1, 23-27.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. Processed statistical bulletin 2016. Rome, Italy: FAO.
- Gokoglu, N. 2019. Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99(5), 2068-2077. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9416>
- Huang, L. Liu, J. Addy, M. Ding, B. Cheng, Y. Peng, P. and Ruan, R. 2020. Physicochemical and emulsifying properties of orange fibers stabilized oil-in-water emulsions. *LWT Food Science and Technology*. 133, 110054. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110054>
- Ibrahim, S. Santos, R. and Bowra, S. 2019. Optimization of subcritical water mediated extraction of apple pomace polyphenolics and their antioxidant activity. *Journal of Chromatography Separation Techniques*. 9(5), 1-10.
- Kumar, M. Y. Dutta, R. Prasad, D. and Misra, K. 2011. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 127(3), 1309-1316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.088>
- Lachos-Perez, D. Baseggio, A. M. Mayanga-Torres, P. C. Junior, M. R. M. Rostagno, M. A. Martínez, J. and Forster-Carneiro, T. 2018. Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. *The Journal of Supercritical Fluids*. 138, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.015>
- Lobiuc, A. Pavăl, N.E. Mangalagiu, I. I. Gheorghită, R. Teliban, G.C. Amăriucăi-Mantu, D. and Stoleru, V. 2023. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*. 28(3), 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>
- Ly, X. Zhao, S. Ning, Z. Zeng, H. Shu, Y. Tao, O. and Liu, Y. 2015. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*. 9, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0145-9>
- Majerska, J. Michalska, A. and Figiel, A. 2019. A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*. 88, 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.021>
- Maran, J. P. Priya, B. Al-Dhabi, N. A. Ponmurugan, K. Moorthy, I. G. and Sivarajasekar, N. 2017. Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of *Musa balbisiana*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 35, 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.019>
- Masala, V. Jokić, S. Aladić, K. Molnar, M. and Tuberoso, C. I. G. 2024. Exploring phenolic compounds extraction from saffron (*C. sativus*) floral by-products using ultrasound-assisted extraction, deep eutectic solvent extraction, and subcritical water extraction. *Molecules*. 29(11), 2600. <https://doi.org/10.3390/molecules29112600>
- Panwar, D. Saini, A. Panesar, P. S. and Chopra, H. K. 2021. Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: Progress towards circular economy. *Trends in Food Science & Technology*. 111, 549-562. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.018>
- Papoutsis, K. Pristijono, P. Golding, J. B. Stathopoulos, C. E. Bowyer, M. C. Scarlett, C. J. and Vuong, Q. V. 2018. Screening the effect of four ultrasound-assisted extraction parameters on hesperidin and phenolic acid content of aqueous citrus pomace extracts. *Food Bioscience*. 21, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.001>
- Pinto, D. Vieira, E. F. Peixoto, A. F. Freire, C. Freitas, V. Costa, P. and Rodrigues, F. 2021. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*. 334, 127521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521>
- Putnik, P. Bursać Kovačević, D. Režek Jambrak, A. Barba, F. J. Cravotto, G. Binello, A. and Shpigelman, A. 2017. Innovative "green" and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes—A review. *Molecules*. 22(5), 680. <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>

- Saberian, H. Hosseini, F. and Bolourian, Sh. 2017. Optimization of extraction condition of chlorophyll from alfalfa and investigating its quality and quantity properties in comparison to different plant resources. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 14(71), 47-57.
- Shitu, A. Izhar, S. and Tahir, T. M. 2015. Sub-critical water as a green solvent for production of valuable materials from agricultural waste biomass: A review of recent work. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 7(1), 42-48. <https://doi.org/10.2174/2212798407666150401103712>
- Sulejmanović, M. Milić, N. Mourtzinou, I. Nastić, N. Kyriakoudi, A. Drljača, J. and Vidović, S. 2024. Ultrasound-assisted and subcritical water extraction techniques for maximal recovery of phenolic compounds from raw ginger herbal dust toward in vitro biological activity investigation. *Food Chemistry*. 437, 137774. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137774>
- Švarc-Gajić, J. Cvetanović, A. Segura-Carretero, A. Linares, I. B. and Mašković, P. 2017. Characterisation of ginger extracts obtained by subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*. 123, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.010>
- Vanden, D. A. Vlietinck, A. J. Dey, P. M. and Harborne, J. B. 1991. *Methods in plant biochemistry: Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. London: Academic Press.
- Varmie, E. B. and Thakur, M. 2021. Utilization of citrus processing waste: A review. *Pharmaceutical Innovation Journal*. 10, 682-697.
- Zema, D. A. Calabrò, P. S. Folino, A. Tamburino, V. Zappia, G. and Zimbone, S. M. 2018. Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*. 80, 252-273. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>
- Zhang, J. Wen, C. Zhang, H. Duan, Y. and Ma, H. 2020. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 95, 183-195. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>
- Zhao, T. Luo, L. Zhang, X. Zhang, W. and Qu, H. 2019. Subcritical water extraction of bioactive compounds from Radix Puerariae and optimization study using response surface methodology. *Chemical Engineering Communications*. 206(9), 1218-1227. <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1555533>



Original Research

Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Orange Pomace Using Subcritical Water

Nilofar Ghasempour, Amir Hossein Elhami Rad, Majid Javanmard Dakheli*, Elham Azarpazhooh* and Mohammad Armin

*Corresponding Author: Associate Professor, Department of Agricultural Engineering, Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, Khorasan, Iran.

Associate Professor, Food Technology Group, Chemical Engineering Institute, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

Email: azarpazhooh@gmail.com - mjavanir@yahoo.com

Received: 9 February 2025 Accepted: 14 December 2025

[http://doi: 10.22092/fooder.2026.368574.1416](http://doi.org/10.22092/fooder.2026.368574.1416)

Extended Abstract

Abstract

This study was conducted to optimize the utilization of orange pomace as an agricultural by-product from orange juice processing plants and to extract bioactive compounds (antioxidant and antimicrobial). To optimize extraction efficiency, a face-centered central composite design (Face-Centered CCD) was used to evaluate the phenolic content and antioxidant activity of the subcritical water extract. Extraction temperature (120, 140, and 160 °C) and extraction time (20, 30, and 40 min) were considered as the key variables for recovering bioactive compounds. Based on the developed models, the optimal extraction conditions were determined as a temperature of 142.87 °C and a time of 39.97 min. Under these conditions, the extraction yield was 13.94%, total phenolic content was 454.80 mg gallic acid/100 g, and free radical scavenging activity was 51.78%. Extraction at the optimum point confirmed the predicted results. Moreover, the obtained extract exhibited effective antimicrobial properties, such that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract against *Penicillium citrinum* and *Aspergillus niger* was 10% and 5%, respectively, whereas this value has been reported as 1% for fluconazole. Overall, this study demonstrated the high efficiency of the subcritical water process in extracting bioactive compounds from agricultural residues and introduced it as an environmentally friendly and effective method for producing valuable compounds.

Introduction

The effective utilization of agricultural and industrial byproducts, particularly orange pomace generated by juice production facilities, is of significant economic and environmental importance. This waste is rich in bioactive compounds, including phenolic antioxidants and antimicrobial agents. However, conventional extraction methods often involve organic solvents, which pose environmental and health concerns. Subcritical water extraction (SWE) has emerged as a green and efficient alternative, utilizing water at elevated temperatures and pressures below its critical point to modify its polarity and extraction properties. This study aimed to optimize the SWE process for recovering bioactive compounds from orange pomace and to evaluate the antioxidant and antimicrobial properties of the resulting extract.

Materials and Methods

Orange pomace was obtained from a processing plant in Mazandaran province, Iran. The material was dried, ground, and sieved. A central composite face-centered design (CCD) with two independent variables—extraction temperature (110, 140, 170°C) and time (20, 30, 40 minutes)—was employed to optimize the extraction process. The dependent variables were extraction yield, total phenolic content (TPC), and free radical scavenging activity (DPPH assay). Extraction was performed using a custom-built subcritical water apparatus. The TPC was determined by the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity was assessed via the DPPH radical scavenging assay. The antimicrobial efficacy of the extract obtained under optimal conditions was evaluated against *Penicillium citrinum* and *Aspergillus niger* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and compared with fluconazole. Data were analyzed using Design Expert software and Response Surface Methodology (RSM).

Results and Discussion

The fitted models for extraction yield, TPC, and DPPH activity were statistically significant ($p < 0.05$) with high coefficients of determination ($R^2 = 0.95, 0.99, \text{ and } 0.99$, respectively). The ANOVA results indicated that both temperature and time significantly influenced the extraction of bioactive compounds. The interaction between these variables was significant for TPC. The optimal extraction conditions, determined through numerical optimization, were a temperature of 142.87°C and a time of 39.97 minutes. Under these conditions, the predicted and experimental values were in close agreement: an extraction yield of 13.94%, a TPC of 454.80 mg GAE/100g, and a DPPH inhibition of 51.78%. The SWE process was significantly more efficient than conventional maceration, which yielded only 4.16%, 140.23 mg GAE/100g, and 23.58% for the same parameters, respectively. The bioactive extract demonstrated notable antifungal activity, with MIC values of 10% and 5% against *P. citrinum* and *A. niger*, respectively, while fluconazole showed an MIC of 1%. The antimicrobial properties are attributed to the phenolic compounds in the extract, which can disrupt microbial cell membranes.

Conclusion

This study successfully optimized the SWE process for extracting valuable bioactive compounds from orange pomace. The method proved to be a highly efficient and environmentally friendly alternative to traditional solvent-based extraction. The optimized extract exhibited strong antioxidant and significant antifungal properties, highlighting its potential as a natural preservative or bioactive ingredient in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. The use of RSM provided a robust framework for process optimization, ensuring maximum recovery of target compounds.

Keywords: Orange Pomace, Sub Critical Water, Phenolic compound, Antimicrobial