

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان نارینجین در میوه‌ی ۱۴ رقم مرکبات در واکنش به تنش یخ‌زدگی Investigation of Naringin Content and Antioxidant Activity in 14 Citrus Fruit Varieties in Response to Freezing Stress

جواد فتاحی مقدم^{۱*}، معصومه کباشکوریان^۲ و یحیی تاجور^۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۶

چکیده

در این پژوهش از میوه‌ی ۱۴ نوع مرکبات آسیب دیده در اثر وقوع یخبندان و هم‌چنین ۶ رقم شاهد (بدون یخ‌زدگی) موجود در کلکسیون ژرم‌پلاسِم موسسه تحقیقات مرکبات کشور استفاده شد. پس از ارزیابی اولیه، بخش‌های مختلف میوه از جمله پوست (فلاودو و آلبدو)، گوشت (بخش‌های خوراکی میوه) به‌طور مجزا و پس از عمل استخراج، نمونه‌ها به فریزر ۸۰- منتقل شدند. خصوصیات مورد ارزیابی شامل تعداد بذر، ضخامت پوست، TSS/TA، TA، TSS، فنل کل پوست و گوشت، فعالیت آنتی‌رادیکالی پوست و گوشت، میزان نارینجین پوست و گوشت بود. نتایج نشان داد که بین ضخامت پوست و میزان نارینجین رابطه مثبت و معنی‌داری وجود داشت. میزان فنل پوست و گوشت میوه‌های سالم بالاتر از انواع سرما دیده بود. بین میزان فنل گوشت و پوست و فعالیت آنتی‌رادیکالی رابطه‌ای مثبت و معنی‌دار وجود داشت. میزان نارینجین در هر دو بافت میوه‌های سرمادیده بیشتر از شاهد‌ها بود. چنانچه رقم انشو معیاری برای مقاومت به سرما باشد مشاهده شد که میزان نارینجین در آن کمتر از سایر انواع مرکبات مواجه‌شده با سرما بود. هم‌چنین مشخص شد که نارینجین یکی از عوامل اصلی تلخی میوه در شرایط سرمای زیر صفر است که قابلیت استخراج در صنایع تبدیلی از میوه‌های یخ‌زده را دارد.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌رادیکالی، فنل، نارینجین، یخ‌زدگی

۱. استادیار بخش فنی و مهندسی، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

۲. محقق بخش فنی و مهندسی، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

۳. استادیار بخش اصلاح بذر و نهال، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

Email: j.fattahi@areo.ir

*: نویسنده مسئول

مرکبات در مناطق فاقد یخبندان بین عرض‌های جغرافیایی ۴۰ درجه شمالی و جنوبی، در زمین‌هایی با خاک مناسب، رطوبت کافی و در صورت عدم یخبندان تولید می‌شود. در شمال ایران با تاثیر از تعادل دمایی ناشی از وجود دریای مازندران، مرکبات در سطح گسترده‌ای کشت می‌شود به طوری که رتبه‌ی اول سطح زیر کشت و تولید را در کشور داراست. مرکبات به‌عنوان درختان همیشه‌سبز حساس به سرما، به دمای 1°C - درجه‌ی سانتی‌گراد و پائین‌تر آسیب‌پذیر هستند. خطر یخ‌زدگی هر چند سال طی زمستان در نواحی مهم پرورش مرکبات در سواحل دریای مازندران رخ می‌دهد (فتوحی‌قزوینی و فتاحی‌مقدم، ۱۳۸۹). در زمستان ۱۳۸۶ بارش برف سنگین و یخبندان، علاوه بر خسارت فراوان به شاخه‌های حامل میوه مرکبات، باعث تلخی شدید در میوه‌های سرمازده شد.

تلخی یکی از عوامل مهم کاهش کیفیت مرکبات و محصولات فرآوری‌شده است که اصولاً به‌وسیله دو گروه مواد فیتوشیمیایی فلاونوئیدها و لیمونوئیدها ایجاد می‌شود. فلاونون‌ها گروه غالب فلاونوئیدها در مرکبات هستند (برهو^۱، ۲۰۰۰). فلاونوئیدها علاوه بر تاثیر روی طعم میوه، در حفظ سلامتی و درمان بیماری‌های عروقی و استخوان‌ها نقش داشته و دارای خاصیت ضدسرطان و جهش، ضدآلرژی، ضدالتهاب و دارای اثرات ضد میکروبی هستند. با اینکه بعضی اثرات مربوط به سلامتی ممکن است به‌وسیله ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات ایجاد شود لیکن نحوه عمل آنها به‌طور کامل شناخته نشده است. گونه‌های مرکبات به دلیل دارا بودن مقادیر زیاد فلاونون‌ها در رژیم غذایی انسان و صنایع غذایی و دارویی قابل توجه هستند (هسو و همکاران^۲، ۱۹۹۸).

تلخی ایجاد شده به‌وسیله فلاونون‌گلوکوزیدها که به‌طور معمول در گونه‌های مرکبات تلخ (گریپ‌فروت، نارنج و پوملو) مشاهده می‌شود نباید با تلخی ایجاد شده به‌وسیله تری‌ترین لیمونین که در هر دو گونه‌های تلخ و غیرتلخ وجود دارد و با تخریب سلول در شرایط یخ‌زدگی ایجاد می‌شود، اشتباه گرفته شود. هم‌چنین تلخی فلاونوئیدی ممکن است به‌وسیله یک یا بیش از چهار فلاونون‌نئوهسپریدوزیدی که در گونه‌های مرکبات مربوط به پوملو تجمع می‌یابد ایجاد شود. نارینجین عمده‌ترین ترکیب ایجادکننده تلخی در میان ترکیبات

فلاونوئیدی در گریپ‌فروت است و در مقابل نئوهسپریدین به مقادیر نسبتاً بیشتر در نارنج یافت می‌شود. ترکیبات تلخ دیگری از جمله نئواریوسیتین و پونسیرین در مقادیر نسبتاً کمی در آبمیوه‌های مرکبات وجود دارد (موریگوچی^۳ و همکاران، ۲۰۰۳؛ موریگوچی و همکاران، ۲۰۰۱ و پترسون^۴ و همکاران، ۲۰۰۶). بذور نیز به دلیل اینکه حاوی ترکیبات تلخ چون لیمونین و نارینجین هستند ممکن است در تلخی میوه موثر باشند (پچایونگ‌ونگدی و هارونکیت^۵، ۲۰۰۹). در شرایطی که میوه‌ی مرکبات در دماهای سرد و نه یخ‌زدگی قرار گیرند سلول‌های بافت آلبدو آسیب می‌بینند. در این حالت بیشتر علائم ناشی از آسیب‌های فیزیولوژیکی در پوست ظاهر می‌شود. در شرایط سخت‌تر میزان زیادی از انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شود که بقای سلول را به مخاطره می‌اندازد (گوزالبس^۶ و همکاران، ۲۰۰۴).

به‌نظر می‌رسد در شرایط سرمای شدید منتهی به یخ‌زدگی، میزان ترکیبات فنلی در میوه افزایش می‌یابد. گزارش شده است که بین این ترکیبات و آنزیم پلی‌فنل-اکسیداز و میزان گرانوله‌شدن ترکیبات فنلی رابطه وجود دارد. فعالیت این آنزیم در میوه‌های گرانوله شده کمتر بود (شارما^۷ و همکاران، ۲۰۰۶). به‌طور کلی بین سطوح تولید این ترکیبات در میوه به‌طور طبیعی و میزان مقاومت به انواع تنش‌ها به‌ویژه آسیب یخ‌زدگی رابطه مستقیم وجود دارد. واکنش میوه در شرایط سرما و یخ‌زدگی در تولید ترکیبات فلاونوئیدی می‌تواند بیانگر مقاومت آن رقم به این شرایط نیز باشد. این پژوهش بر اساس سوالاتی که در زمان وقوع یخ‌زدگی میوه‌ی مرکبات مطرح شد طراحی شد. میوه‌ی غالب انواع مرکبات در اثر یخ‌زدگی پلاسمولیز و تلخ شدند. اولاً دلیل تلخی میوه و نوع ترکیب مربوطه مشخص نبود. دوم اینکه آیا بین میزان آسیب یخ‌زدگی میوه و سایر ترکیبات چون اسیدیت، قند، تعداد بذور، ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌رادیکالی و میزان نارینجین تولیدی رابطه‌ای وجود دارد؟ از طرفی آیا چنین میوه‌هایی قابلیت استفاده در صنایع دارویی و یا فرآوری را دارند؟ آیا با اندازه‌گیری این ترکیبات، می‌توان به‌طور غیرمستقیم میزان مقاومت به سرما و یا یخ‌زدگی انواع مرکبات را نیز برآورد کرد؟ این پژوهش با هدف پاسخ به سوالات مطرح شده انجام شد.

3. Moriguchi *et al.*

4. Peterson *et al.*

5. Pichaiyongvongdee and Haruenkit

6. Gosalbes *et al.*

7. Sharma *et al.*

1. Berhow

2. Hsu *et al.*

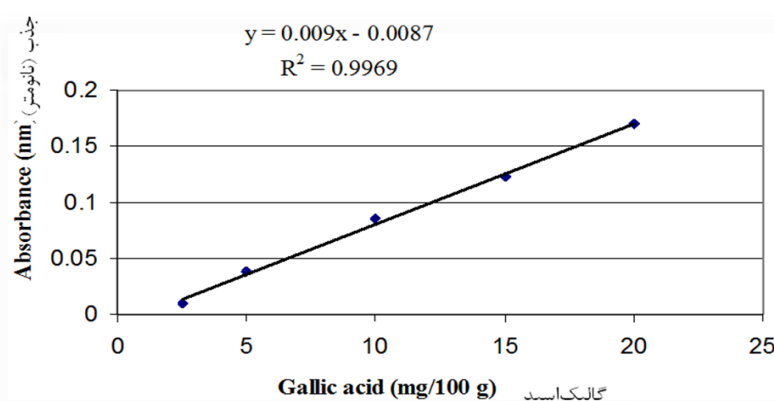
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از میوه‌ی ۱۴ نوع مرکبات آسیب دیده در اثر وقوع یخبندان و هم‌چنین ۶ نوع شاهد (بدون یخ‌زدگی) که همگی روی پایه‌ی نارنج و با عمر ۱۵ سال در قطعه‌ی کلکسیون تحقیقاتی موسسه تحقیقات مرکبات کشور (هر رقم شامل ۵ درخت روی ردیف) واقع بودند نمونه‌گیری شد. مرکبات مورد استفاده شامل پرتقال‌های تامسون، مارس، هاملین، سالوستیانا، سانگینلو، تاراگو، مورو، سانگین و محلی سیاورز، نارنگی‌های پیچ، کلمانتین و انشو، لیموگلاب، لیموترش و لیموشیرین بود.

اندازه‌گیری TSS/TA و TA.TSS

میزان TSS میوه بر حسب درصد، توسط دستگاه رفرکتومتر چشمی (مدل Atago - ATC-20 ساخت ژاپن)، در دامنه ۰-۲۰ درصد اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری TA، مخلوط ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره میوه با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و با استفاده از دو قطره شناساگر فنل فتالین با سود یک دهم نرمال تا ظهور رنگ صورتی روشن تیتر شد. از حاصل ضرب عدد تیتراسیون در ۰/۰۶۴ میزان TA بر حسب درصد سیتریک اسید به‌دست آمد.



شکل ۱: منحنی جذب غلظت‌های مختلف محلول استاندارد گالیک‌اسید

Fig 1: The standard curve of different gallic acid solution

بلانک آب دی‌یونیزه به جای عصاره اضافه شد. میزان جذب مخلوط واکنش بعد از ۱۲۰ دقیقه نگهداری در شرایط بدون نور، در طول موج ۷۶۵ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (مدل ND-1000 ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید (۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به‌دست آمد.

فنل کل

استخراج ترکیبات فنلی انواع خونی با مخلوط متانول و استیک اسید به نسبت ۱۵ : ۸۵ درصد و جهت انواع غیرخونی (بلاند) از متانول به نسبت ۱:۳ به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. پس از این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Hettich-Mikro 200R ساخت آلمان) شدند. قسمت روشناور نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میزان فنل کل با روش Folin-Ciocalteu و اسپکتروفوتومتری انجام شد (می‌بزر^۱ و همکاران، ۲۰۰۳). در این روش ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی آبمیوه یا پوست میوه با ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین (۰/۵٪) مخلوط شده پس از ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۷ درصد بی‌کربنات سدیم به آن اضافه شد. در نمونه‌ی

1. Meyers *et al.*

از آن انواع پیچ، لیموگلاب، لیموترش، کلمانتین و مارس نیز بذور قابل توجهی داشتند. معمولاً میوه‌های با بذر بیش از ۵ عدد جزء انواع بذردار محسوب می‌شوند. انواع خونی و تامسون جزء کم‌بذرت‌ترین بودند.

بذور به دلیل اینکه حاوی ترکیبات تلخ چون لیمونین و نارینجین است ممکن است در تلخی میوه موثر باشد. چرا که گزارش شده در بذور انواع مختلف پوملو میزان نارینجین در دامنه‌ی ۲۹۳/۰۳ تا ۴۲۶/۶۶ میکروگرم در گرم و میزان لیمونین ۱۳۷۵/۳۱ تا ۲۴۴۳/۴۶ میکروگرم در گرم است (پیچ‌ایونگ‌ونگدی و هارونکیت، ۲۰۰۹). در این آزمایش بر اساس جدول ۲، بین تعداد بذر و سایر خصوصیات به‌ویژه فنل کل همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد.

ضخامت پوست

ضخامت پوست از جمله شاخص‌هایی است که ممکن است در میزان آسیب‌پذیری میوه به سرما موثر باشد. لیموگلاب، تامسون، سانگین، سانگینلو و مارس دارای متوسط ضخامت پوست بیش از ۵ میلی‌متر بود (شکل ۴). البته بخشی از تفاوت‌ها به نوع رقم مرتبط است. عمده ترکیبات تلخ در پوست مرکبات وجود دارد و معمولاً بیشتر از گوشت است. با توجه به جدول ۲، بین ضخامت پوست و میزان نارینجین گوشت رابطه مثبت و معنی‌داری ($r^2 = 0.58$) وجود داشت. ضخامت پوست با میزان نارینجین پوست رابطه‌ای مثبت داشت ولی معنی‌دار نبود ($r^2 = 0.14$).

طی گزارشی میزان نارینجین در پوست انواع مختلف پوملو در دامنه‌ی ۱۰/۰۶ تا ۲۸/۵۱ میلی‌گرم در گرم بود. ترکیب تلخ لیمونین نیز هم در آلبو و هم فلاودو وجود دارد (پیچ‌ایونگ‌ونگدی و هارونکیت، ۲۰۰۹). بر اساس پژوهشی دیگر، پوست لمون غنی از نارینجین بود. به‌علاوه غلظت این ترکیبات در پوست و گوشت و یا بسته به رقم متفاوت بود. با اینکه نارینجین در بذور و پوست لمون یافت شد ولی در عصاره‌ی این میوه‌ها موجود نبود (وقی و داورنیر، ۱۹۹۷).

ظرفیت آنتی‌رادیکالی به روش مهار رادیکال‌های DPPH
از روش برند-ویلیامز^۱ و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییر استفاده شد. قدرت مهار رادیکال ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل توسط عصاره نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. فعالیت مهار رادیکال DPPH از فرمول درصد فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال $(1 - A_S/A_C)$ (DPPH=۱۰۰) محاسبه شد. در این معادله A_C جذب رادیکال DPPH بدون عصاره به‌عنوان کنترل، A_S جذب DPPH به‌علاوه نمونه و از متانول به‌عنوان بلانک استفاده شد. درصد بازدارندگی برای هر نمونه در سه تکرار محاسبه شد.

اندازه‌گیری نارینجین به روش تجزیه HPLC

به‌منظور استخراج نارینجین از متانول مخصوص HPLC استفاده شد. اندازه‌گیری نارینجین به‌وسیله روش HPLC انجام شد. سیستم مورد استفاده مدل Waters 1525 با پمپ از نوع Binary و دتکتور با مشخصات Waters 2487, Dual λ Absorbance بود. ستون این سیستم به‌طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر با منافذی به اندازه ۵ میکرومتر بود. حلال A شامل آب مقطر و حلال B محلول متانول بود. حجم تزریقی برابر ۶۰ میکرولیتر بود. به‌طور خلاصه برنامه‌گردایان در دو طول موج ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر برای حلال‌های A و B به ترتیب در زمان شروع ۹۵ و ۵، تا ۱۰ دقیقه ۹۰ و ۱۰، تا ۳۰ دقیقه ۶۰ و ۴۰، تا ۴۰ دقیقه ۴۵ و ۵۵، تا ۴۵ دقیقه ۲۰ و ۸۰، و تا ۵۰ دقیقه صفر و ۱۰۰ تعریف شد.

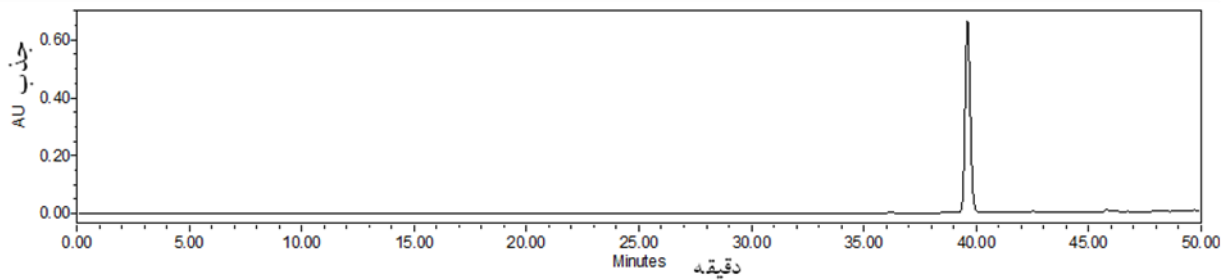
تجزیه‌ی آماری داده‌ها

داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه‌ی واریانس و میانگین‌های حاصل با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C مقایسه شدند. جهت تعیین همبستگی بین صفات از نرم‌افزار آماری SPSS-16 استفاده شد.

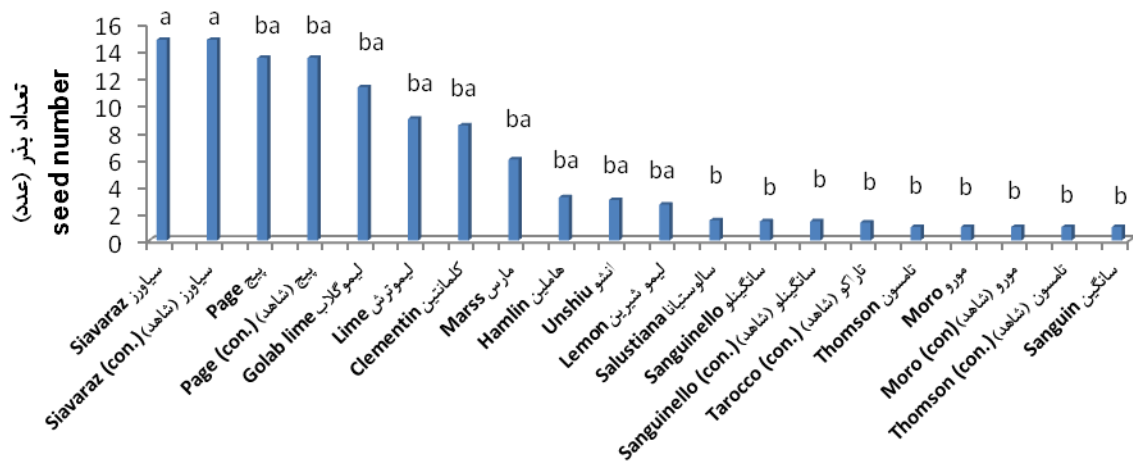
نتایج و بحث

تعداد بذر

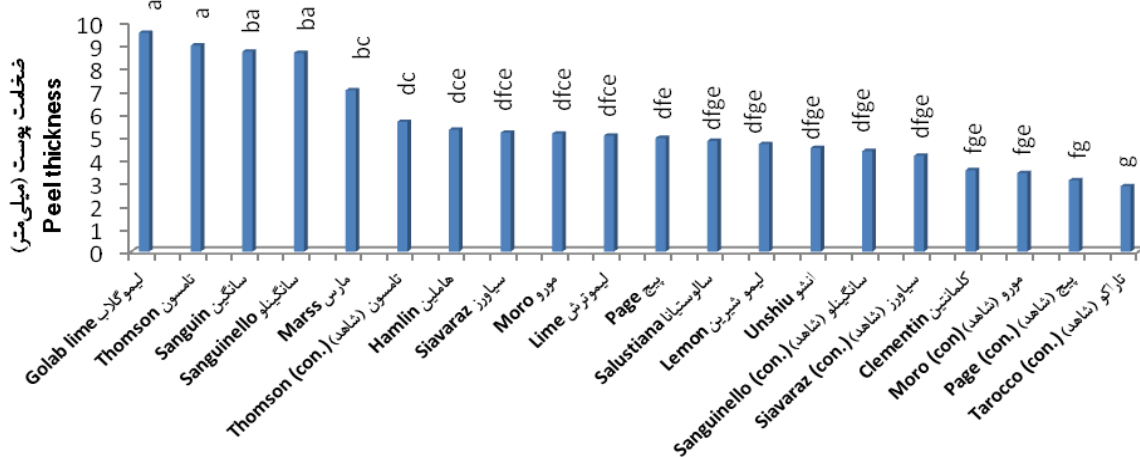
انواع مرکبات مورد مطالعه از نظر میزان بذر دسته‌بندی شدند (شکل ۳). بر این اساس سیاورز دارای بیشترین بذر بود و بعد



شکل ۲: کروماتوگرام استاندارد نارینجین
Fig 2: Chromatogram of naringin standard



شکل ۳: تعداد بذر در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات
Fig 3: Seed number of frozen and unfrozen citrus kinds



شکل ۴: ضخامت پوست در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات
Fig 4: Peel thickness of frozen and unfrozen citrus kinds

مواد جامد محلول (TSS)

با مقایسه‌ی میزان TSS انواع سرمازده و نزده مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین برخی ارقام وجود داشت به طوری که کلماتین و انشو میزان قند بالاتری نسبت به سایر انواع مرکبات داشتند (شکل ۵). در منابع به کاهش این میزان در شرایطی که دما پایین است اشاره شده است (گونزالس^۱ و همکاران، ۲۰۰۲). کاهش TSS میوه احتمالاً به دلیل کاهش در تنفس و فعالیت متابولیسم در این شرایط است. همچنین کاهش در تنفس، میزان ساخت و استفاده از متابولیت‌ها را کاهش داده که منجر به کاهش TSS (به دلیل کاهش تبدیل کربوهیدرات‌ها به قند) می‌شود (محمود^۲ و همکاران، ۲۰۰۸). در این آزمایش وقتی مقدار TSS نمونه‌های یخ‌زده و یخ‌نزده با هم مقایسه شدند چنین تغییرات فاحشی وجود نداشت که ممکن است به دلیل زمان رویداد یخ‌زدگی باشد که میوه‌ها به مرحله‌ی رسیدگی کامل رسیده بودند و میزان TSS آنها به حد ثابت رسیده بود.

اسید قابل تیتر TA

در بین ارقام مورد مطالعه، علی‌رغم یخ‌زدگی که سبب کاهش اسیدهای آلی می‌شود، لیموترش در صدر قرار داشت. بعد از آن نمونه‌ی شاهد سیاورز قرار داشت. لیموشیرین از پایین‌ترین مقدار اسید برخوردار بود. رقم انشو که به سرما مقاوم است جایگاه متوسطی داشت (شکل ۶). البته دلیل کاهش مقدار اسید در انشو یخ‌زدگی نبوده است بلکه باقی‌ماندن بیش از حد میوه روی درخت است (انشو رقمی زودرس است). بر اساس منابع در این حالت اسیدهای آلی به تدریج به مصرف متابولیسم میوه می‌رسند (محمود و همکاران، ۲۰۰۸). به‌طور کلی گزارش شده است که TA بالا، میوه را در برابر عوامل تنش‌زا محافظت می‌کند. در عصاره مرکبات، سیتریک اسید غالب بوده و ممکن است چنین نقشی داشته باشد (استیو^۳ و همکاران، ۲۰۰۵). در این آزمایش کاهش TA در بیشتر میوه‌های یخ‌زده مشاهده شد. ممکن است علت کاهش شدید TA در اثر یخ‌زدگی، اکسید شدن اسیدهای آلی نیز باشد که به تجزیه شدن حساس هستند (مونسلیس^۴، ۱۹۸۶).

نسبت TSS/TA

همان‌طور که در فوق مشاهده شد میزان TSS نسبت به TA کمتر تحت تأثیر پدیده‌ی سرمازدگی قرار گرفت. بنابراین آنچه تعیین‌کننده این صفت بود میزان TA خواهد بود که در انواع مرکبات چون لیموشیرین، کلماتین، هاملین و پیچ کمترین بود (شکل ۷). معمولاً نسبت این دو شاخص بیان‌کننده طعم و مزه میوه است. در تحقیقی گزارش شد که افزایش در نسبت TSS/TA به دلیل کاهش در میزان TA و ثابت بودن میزان TSS در مرحله زمانی خاص است (پایلی^۵ و همکاران، ۲۰۰۴).

فنل کل پوست و گوشت

با توجه به شکل‌های ۸ و ۹ مشاهده می‌شود که میزان فنل پوست و گوشت میوه‌های بدون آسیب یخ‌زدگی بالاتر از انواع سرمادیده بود. بعد از این، به ترتیب کلماتین، سیاورز و انشو جای گرفت. در بافت گوشت نیز همین حالت مشاهده شد ولی قابل توجه اینکه ارقام خونی سانگین، سانگینلو و مورو بعد از شاهد‌ها قرار گرفتند. به نظر می‌رسد دلیل بالابودن فنل در ارقام خونی در شرایط یخ‌زدگی، وجود آنتوسیانین باشد که در گوشت خونی‌ها وجود دارد.

در این آزمایش بالابودن فنل در میوه‌های شاهد مشابه با یافته‌های شوفیان^۶ و همکاران (۲۰۱۱) بود که ترکیبات فنلی پنج میوه‌ی گرمسیری را به صورت تازه و خشک انجمادی بررسی کردند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میوه‌های تازه و یخ‌زده از نظر فنل کل وجود داشت طوری‌که میوه‌های یخ‌زده میزان فنل بالاتری نسبت به یخ‌زده‌ها داشتند. میزان تنفس نیز در میزان فنل تأثیر دارد. گزارش شده است که تسریع در تنفس منجر به تولید میزان فنل بالا در میوه‌ها شد (جاواندها^۷ و همکاران، ۲۰۰۹).

5. Pailly et al.

6. Shofian et al.

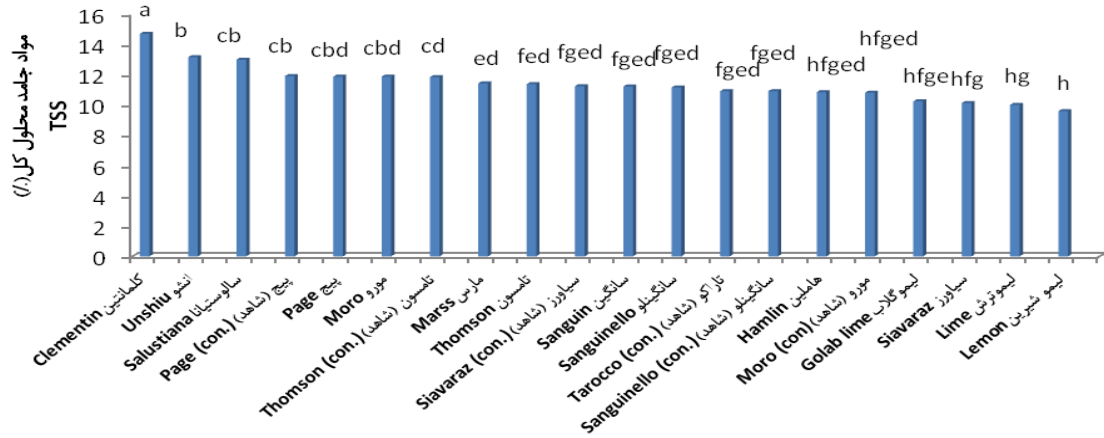
7. Jawandha et al.

1. Gonzalez et al.

2. Mahmud et al.

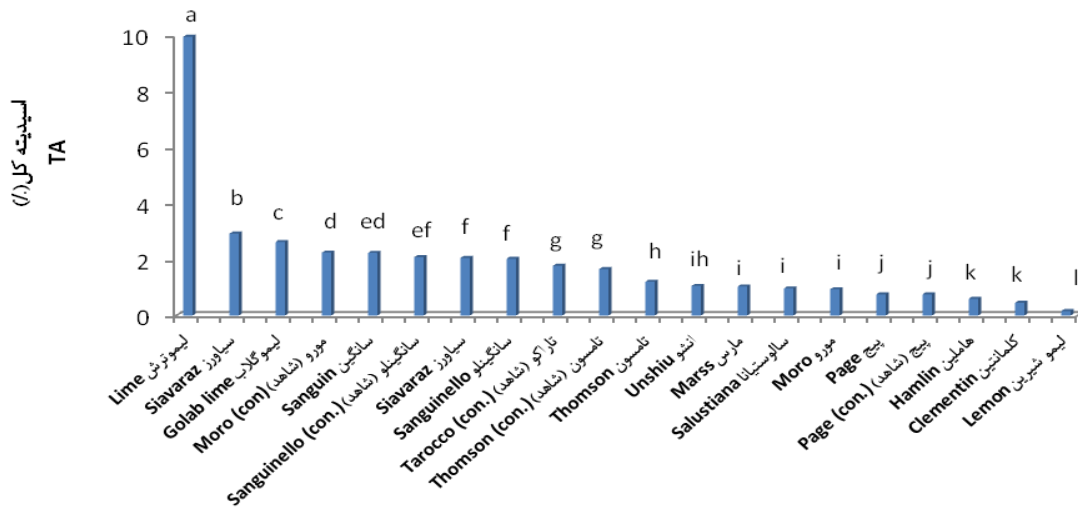
3. Esteve et al.

4. Monselise



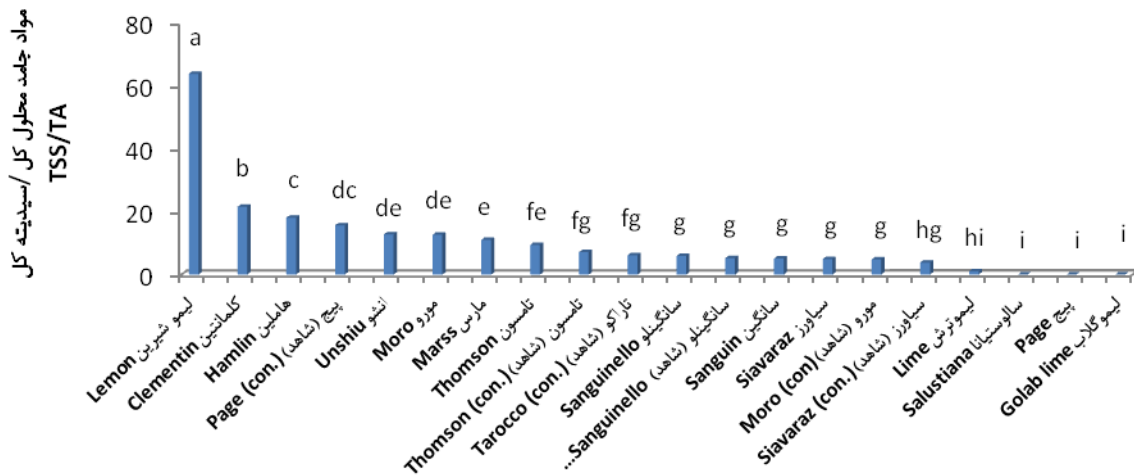
شکل ۵: میزان TSS در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 5: Total soluble solids of frozen and unfrozen citrus kinds



شکل ۶: میزان TA در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 6: Titratable acidity of frozen and unfrozen citrus kinds



شکل ۷: نسبت TSS/TA در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 7: TSS/TA ratio of frozen and unfrozen citrus kinds

دی‌فنل هیدروکسیلاسیون نموده و در ادامه دی‌فنل را به کوئینون‌ها اکسیداسیون می‌کند. معمولاً اکسیداسیون در مقایسه با هیدروکسیلاسیون سریع‌تر بوده که منجر به کاهش ترکیبات فنلی و به تبع آن فعالیت آنتی‌رادیکالی می‌شود (واموس-ویگازو^۵، 1981). همبستگی زیادی بین فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وجود داشت که نشان می‌دهد فنل‌ها ترکیب غالب تعیین‌کننده‌ی فعالیت آنتی‌رادیکالی در میوه‌ها هستند. نتایج گزارش‌های قبلی نیز موید نتایج این آزمایش است مبنی بر اینکه فنل‌های موجود در عصاره‌ی گیاهان دارویی و آروماتیک به‌طور معنی‌داری با فعالیت مهار رادیکال‌های ABTS^۶ همبستگی داشتند (میلیاسکاس^۷ و همکاران، 2004). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دیگری بویژه از نوع محلول در چربی وجود دارند که در مقاومت به سرما نقش داشته ولی قادر به مهار رادیکال‌های DPPH نیستند. بنابراین هرگونه رابطه‌ی مثبت بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت به سرمای یک رقم بستگی به نوع ترکیب آنتی‌اکسیدانی محلول در آب و یا چربی دارد. هرچند ممکن است این واکنش‌ها در حالت یخ‌زدگی با حالت سرمازدگی فرق نماید.

میزان نارینجین پوست و گوشت

بر اساس نتایج مقایسه‌ی میانگین میزان نارینجین در بافت گوشت میوه‌های یخ‌زده و نرزه مشخص شد که در هر دو بافت این ترکیب در میوه‌های یخ‌زده بیشتر از شاهد‌ها بود (شکل‌های ۱۲ و ۱۳). چنانچه رقم انشوی معیاری برای مقاومت به یخ‌زدگی باشد مشاهده می‌شود که میزان نارینجین در آن کمتر از سایر انواع به جز یخ‌نرزه‌ها است. پس میزان نارینجین و در پی آن تلخی میوه می‌تواند نشانگر میزان آسیب یخ‌زدگی میوه نیز باشد. البته طبقه‌بندی انواع مرکبات بر اساس نارینجین موجود در گوشت و پوست تا حدودی فرق می‌کند لیکن رقم انشوی جایگاه ثابتی دارد. بر این اساس پوست رقم سانگینلو و گوشت رقم سانگین محتوای نارینجین بالاتری داشتند. نتایج مغایر نیز در حالت یخ‌زدگی تدریجی پیاز گزارش شده است. بر این اساس پدیده‌ی یخ‌زدگی سبب کاهش سطوح فلاونول‌ها شد. در مقابل وقتی یخ‌زدگی به سرعت انجام شد (خشک‌انجماد) مقدار فلاونول‌ها افزایش یافت که به دلیل آزادسازی ترکیبات فنلی از ماتریکس بود (پرز-گریگوریا^۸ و همکاران، 2011).

دلیل این پدیده را تبدیل نشاسته به قندهای ساده بیان نمودند که به دنبال آن فنل کل نیز افزایش یافته است (کیم^۱ و همکاران، 2009). ممکن است کاهش تنفس ناشی از دمای پایین و به دنبال آن کاهش کربوهیدرات‌دلیلی بر کاهش فنل میوه‌های یخ‌زده باشد. احتمالاً در مراحل یخ‌زدگی، سلول‌های میوه تخریب شده که سبب تجزیه‌ی آنزیم‌هایی معین، سوبسترها و فعال‌سازها می‌شود (چانگ^۲ و همکاران، 2006؛ آشیه و سیمپسون^۳، 1996). به‌علاوه بعد از گرم‌شدن بافت برخی آنزیم‌ها فعال شده که سبب قهوه‌ای شدن بافت در اثر تجزیه‌ی ترکیبات فنلی می‌شود (آشیه و سیمپسون، 1996). اینها همه می‌تواند دلیلی برای کاهش فنل کل در نمونه‌های یخ‌زده باشد.

فعالیت آنتی‌رادیکالی پوست و گوشت میوه

بیشترین فعالیت آنتی‌رادیکالی در بافت پوست مربوط به انواع سیورز و لیموشیرین یخ‌زده و در بافت گوشت مربوط به لیموشیرین و لیموترش یخ‌زده بود (شکل‌های ۱۰ و ۱۱). با بررسی همبستگی بین میزان ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (جدول ۲) مشخص شد که بین میزان فنل گوشت و پوست و فعالیت آنتی‌رادیکالی رابطه‌ای مثبت و معنی‌دار وجود داشت. فنل در میوه‌های شاهد و آنها که نسبتاً به سرما مقاومت نشان دادند بالاتر بود. فقط ارقام خونی و لیموها نیز جدای از مسئله‌ی مقاومت به سرما، از فنل بالاتری برخوردار بودند. منتها رقم انشوی به دلیل مقاومت بالا به سرما از میزان فنل بالا و ظرفیت آنتی‌رادیکالی بالاتری نیز برخوردار بود. هرگونه کاهش در آسیب‌های سرمایی به دلیل نقش فعالی است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تقابل با رادیکال‌های آزاد بازی می‌کنند. به‌علاوه اثر شوک دمایی سرد روی افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز گزارش شده است (زیونگ^۴ و همکاران، 2006).

میزان مهار رادیکال‌های DPPH در انواعی چون انبه بطور معنی‌داری تحت تنش سرما افزایش یافت ولی در سایر انواع تفاوتی وجود نداشت (شوفیان و همکاران، 2011). در گوجه‌فرنگی نیز تفاوت معنی‌دار در میزان مهار رادیکال‌ها در نمونه‌های یخ‌زده و نرزه مشاهده نشد (چانگ و همکاران، 2006). میوه‌هایی که دچار یخ‌زدگی شده‌اند مستعد قهوه‌ای شدن در اثر اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط فعالیت آنزیم‌هایی چون پلی‌فنل اکسیداز هستند که مونوفنل‌ها را به

5. Vamos-Vigyazo

6. 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)

7. Miliauskas et al.

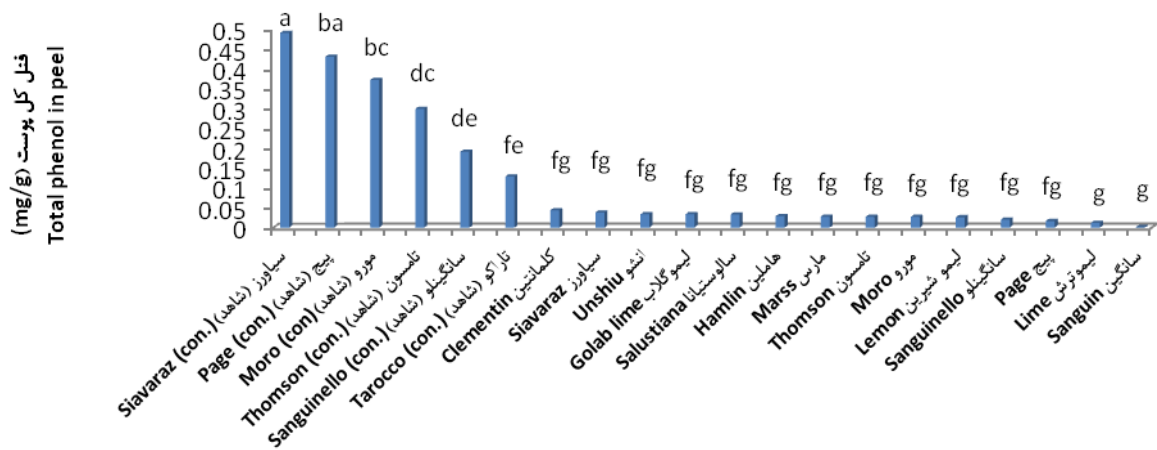
8. Perez-Gregorio et al.

1. Kim et al.

2. Chang et al.

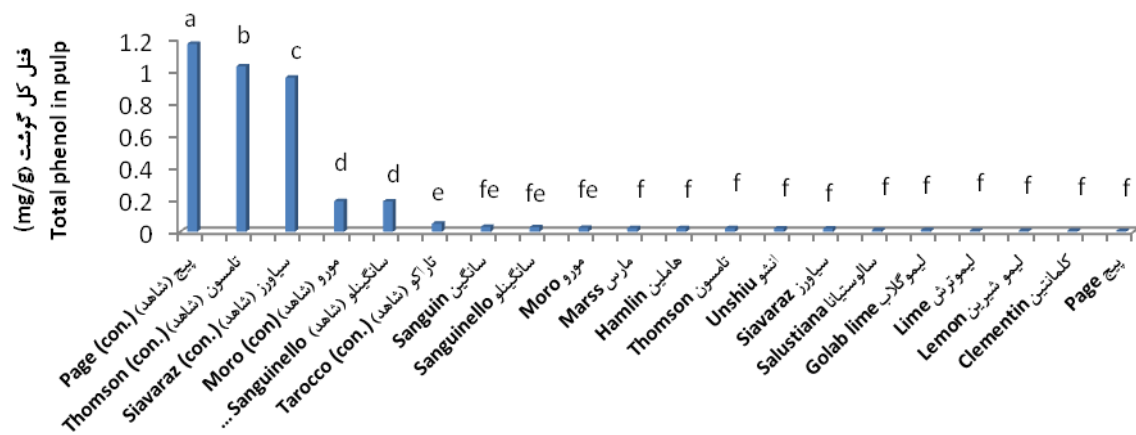
3. Ashie and Simpson

4. Xiong et al.



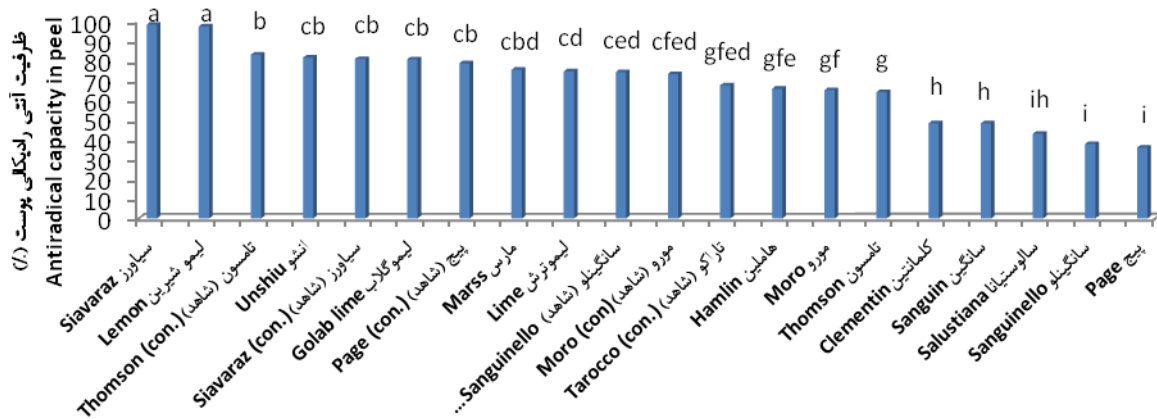
شکل ۸: میزان فنل کل پوست در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 8: Total phenolics in peel of frozen and unfrozen citrus kinds



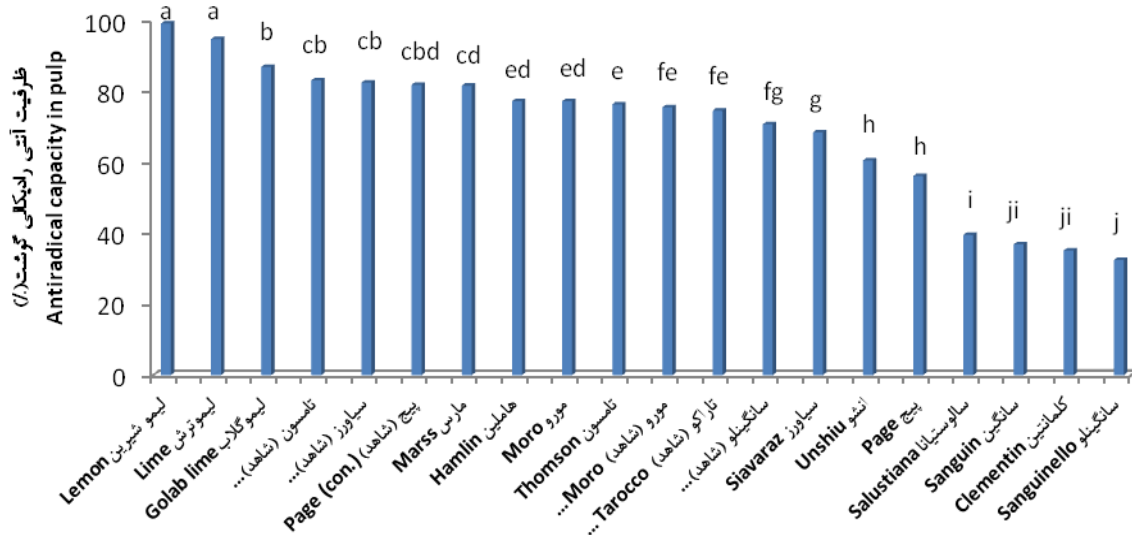
شکل ۹: میزان فنل کل گوشت در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 9: Total phenolics in pulp of frozen and unfrozen citrus kinds



شکل ۱۰: ظرفیت آنتی‌رادیکالی پوست در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 10: Antiradical capacity in peel of frozen and unfrozen citrus kinds



شکل ۱۱: ظرفیت آنتی‌رادیکالی گوشت در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات

Fig 11: Antiradical capacity in pulp of frozen and unfrozen citrus kinds

تفاوت در مقدار این ترکیبات در پوست و گوشت در گزارش‌های قبلی نیز آمده است. در گزارشی میزان نارینجین را در پوست انواع مختلف پوملو در دامنه‌ی ۱۰/۰۵۶ تا ۲۸/۵۰۸ میلی‌گرم در گرم بود در حالیکه در گوشت به مقدار کمتر و در دامنه‌ی ۰/۲۴۳ تا ۰/۳۸۶ میلی‌گرم در گرم بود. در این آزمایش نیز مشاهده شد که متوسط نارینجین در گوشت کمتر از پوست بود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نوع ترکیب عامل تلخی در میوه‌های سرمازده و یا یخ‌زده مشخص شد (نارینجین) که به مدیران بخش فرآوری از طریق انتخاب نوع ماده‌ی تلخ‌زدا و یا نحوه‌ی جداسازی آن کمک خواهد نمود. پدیده‌ی کاهش فنل در میوه‌های یخ‌زده مشخص نمود که میوه‌ها به شدت بعد از رفع سرما و گرم‌شدن مجدد پلاسمولیز شده (مشاهدات عینی) و استفاده از چنین میوه‌هایی جهت استحصال کنسانتره نمی‌تواند اقتصادی باشد. به دلیل بالا بودن میزان ترکیبات تلخ چون نارینجین در بافت‌های یخ‌زده، به شرط مهیا بودن ادوات استخراج، می‌توان آن را جداسازی نموده و به‌عنوان یک ترکیب ارزشمند در اختیار صنایع دارویی و بهداشتی قرار داد.

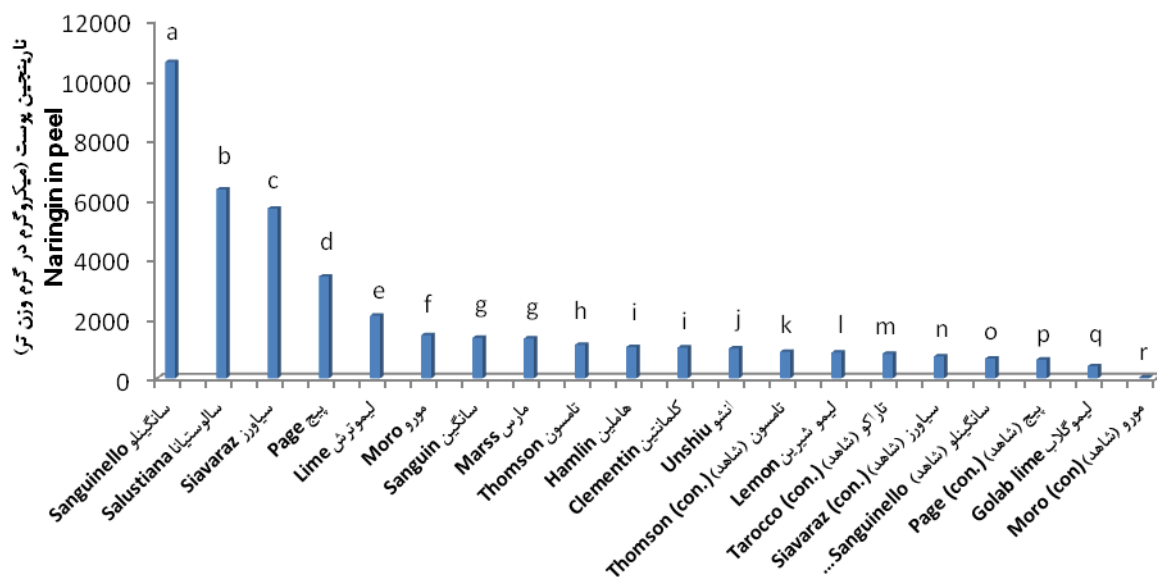
سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۸۷۰۰۲-۱۷-۱۷-۲ است که بدین‌وسیله از حمایت مالی موسسه تحقیقات مرکبات کشور سپاسگزاری می‌شود.

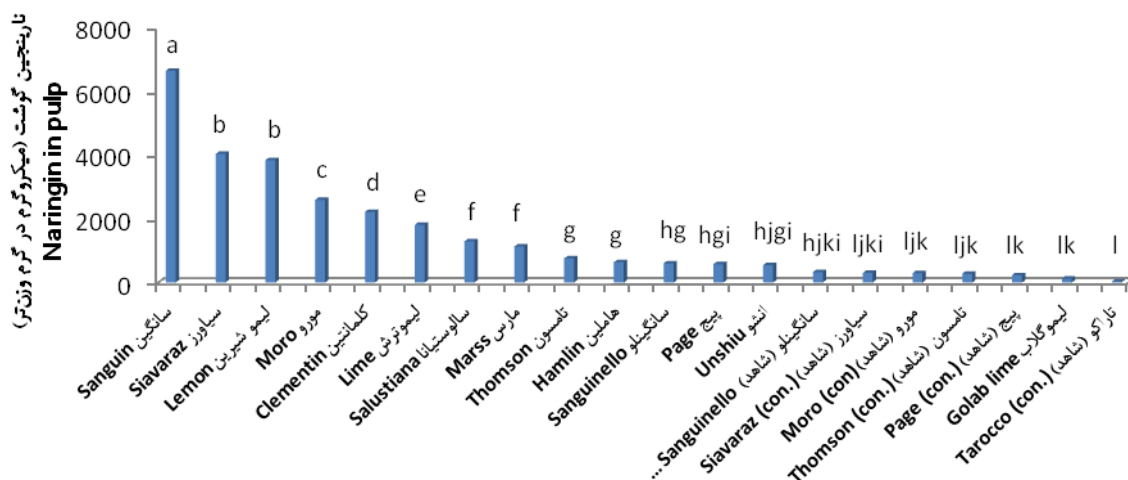
میزان نارینجین پوست و گوشت

بر اساس نتایج مقایسه‌ی میانگین میزان نارینجین در بافت گوشت میوه‌های یخ‌زده و زده مشخص شد که در هر دو بافت این ترکیب در میوه‌های یخ‌زده بیشتر از شاهد‌ها بود (شکل‌های ۱۲ و ۱۳). چنانچه رقم انشو معیاری برای مقاومت به یخ‌زدگی باشد مشاهده می‌شود که میزان نارینجین در آن کمتر از سایر انواع به جز یخ‌نزده‌ها است. پس میزان نارینجین و در پی آن تلخی میوه می‌تواند نشانگر میزان آسیب یخ‌زدگی میوه نیز باشد. البته طبقه‌بندی انواع مرکبات بر اساس نارینجین موجود در گوشت و پوست تا حدودی فرق می‌کند لیکن رقم انشو جایگاه ثابتی دارد. بر این اساس پوست رقم سانگینلو و گوشت رقم سانگین محتوای نارینجین بالاتری داشتند. نتایج مغایر نیز در حالت یخ‌زدگی تدریجی پیاز گزارش شده است. بر این اساس پدیده‌ی یخ‌زدگی سبب کاهش سطوح فلاونول‌ها شد. در مقابل وقتی یخ‌زدگی به سرعت انجام شد (خشک‌انجماد) مقدار فلاونول‌ها افزایش یافت که به دلیل آزادسازی ترکیبات فنلی از ماتریکس بود (پرز-گریگوریا و همکاران، ۲۰۱۱).

نارینجین از جمله فلاونوئیدهای تلخ است که برای اولین بار در گریپ‌فروت مشاهده شد (پیچ‌ایونگ‌ونگدی و هارونکیت، ۲۰۰۹). نارینجین بعد از اینکه ساخته می‌شود در میوه و برگ‌ها منتقل نمی‌شود. لیمونین و نارینجین بطور هم‌گرا در بیشتر انواع مرکبات وجود دارند لیکن مقدار آنها متفاوت است. بنابراین لیمونین نیز در تلخی ایجاد شده نقش دارد. نارینجین در مقادیر زیاد سبب تلخی می‌شود. بیشترین میزان نارینجین در آلبدو و کمترین میزان در عصاره‌ی برخی انواع پوملو یافت شد (پیچ‌ایونگ‌ونگدی و هارونکیت، ۲۰۰۹).



شکل ۱۲: میزان نارینجین پوست در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات
 Fig 12: The amount of Naringin in peel of frozen and unfrozen citrus kinds



شکل ۱۳: میزان نارینجین گوشت در میوه‌ی یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات
 Fig 13: The amount of Naringin in pulp of frozen and unfrozen citrus kinds

جدول ۱: همبستگی بین صفات ارزیابی میوه‌های یخ‌زده و یخ‌نزده (شاهد) انواع مرکبات
Table1: Correlation between some parameters in frozen and unfrozen citrus fruit

	نارینجین پوست Naringin in peel	نارینجین گوشت Naringin in pulp	تعداد بذر Seed number	ضخامت پوست Peel thickness	TSS	TA	TSS/TA	فنل کل پوست Total phenolics in peel	فنل کل گوشت Total phenolics in pulp	ظرفیت آنتی‌رادیکالی پوست Antiradical capacity in peel	ظرفیت آنتی‌رادیکالی گوشت Antiradical capacity in pulp
نارینجین پوست	1										
نارینجین گوشت	0.69**	1									
تعداد بذر	- 0.02	- 0.13	1								
ضخامت پوست	0.14	0.58**	0.18	1							
TSS	- 0.21	- 0.26	0.26	- 0.14	1						
TA	0.05	- 0.24	0.14	0.16	- 0.24	1					
TSS/TA	- 0.39	- 0.19	- 0.27	- 0.27	- 0.29	- 0.22	1				
فنل کل پوست	0.43*	- 0.10	0.06	- 0.29	0.33	0.43*	- 0.29	1			
فنل کل گوشت	0.34	- 0.13	- 0.17	- 0.24	0.36	0.36	- 0.39	0.87**	1		
ظرفیت آنتی‌رادیکالی پوست	0.14	- 0.11	- 0.31	- 0.12	0.20	0.29	- 0.35	0.57**	0.82**	1	
ظرفیت آنتی‌رادیکالی گوشت	0.36	- 0.08	- 0.27	- 0.19	0.23	0.24	- 0.31	0.53*	0.76**	0.55**	1

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

- Ashie, I. N. A. and Simpson, B. K. 1996. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. *Food Research International*, 29: 569-575.
- Berhow, M. A. 2000. Effects of early plant growth regulator treatments on flavonoid levels in grapefruit. *Plant Growth Regulation*, 30: 225-232.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wissen and Technology*, 28: 25-30.
- Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y. and Liu, Y. C. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77:478-485.
- Esteve M. J., Frigola, A., Rodrigo, C. and Rodrigo, D. 2005. Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1413-1422.
- Fattahi Moghadam, J., Fotouhi, R., Bakhshi, D. and Aghajanzadeh, S. 2009. Fruit quality, anthocyanin, and cyanidin 3-glucoside concentrations of several Blood orange varieties grown in different areas of Iran. *Hort. Environmental and Biotechnology*, 50: 1-5.
- Fotouhi Ghazvini, R. and Fattahi Moghadam, J. 2010. *Citrus growing in Iran*. Guilan University Press, 305 pp.
- Gonzalez, E. M., de Ancos, B. and Cano, P. M. 2002. Preservation of raspberry fruits by freezing: physical, physico-chemical and sensory aspects. *European Food Research and Technology*, 215 (6): 497-503.
- Gosalbes, M. J., Zacarias, L. and Lafuente, M. T. 2004. Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 33: 219-228.
- Hsu, W. J., Berhow, M., Roberson, G. H. and Hasegawa, Sh. 1998. Limonoids and flavonoids in juices of Oroblanco and Melogold Grapefruit hybrids. *Journal of Food Science*, 63(1): 57- 60.
- Jawandha, S. K., Mahajan, B. V. C. and Gill, P. S. 2009. Effect of pre-harvest treatments on the cellulase activity and quality of Ber fruit under cold storage conditions. *Natural Science Biology*, 1(1): 88-91.
- Kim D. G., Burks, T. F., Qin, J. and Bulanon, D. M. 2009. Classification of grapefruit peel diseases using color texture feature analysis. *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*, 3: 41-51.
- Mahmud, T. M. M., Al Eryani-Raqeeb, A., Syed Omar, S. R., Mohamed Zaki, A. R. and Al Eryani, A. R. 2008. Effects of different concentrations and applications of Calcium on storage life and physicochemical characteristics of Papaya (*Carica papaya* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3: 526-533.
- Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P. and Liu, R. H. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6887-6892.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and van-Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237.
- Monselise, S. P. 1986. Citrus. In: Monselise S. P. (ed), *Handbook of Fruit Set and Development*, pp.87-108. CRC Press, Boca Raton.
- Moriguchi, T., Kita, M., Hasegawa, S. and Omura, M. 2003. Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 1: 22-25.
- Moriguchi, T., Kita, M., Tomono, Y., Endo-Inagaki, T. and Omura, M. 2001. Gene expression in flavonoid biosynthesis: correlation with flavonoid accumulation in developing citrus fruit. *Physiologia Plantarum*, 111: 66-74.
- Ooghe, W. C. and Detavernier, C. M. 1997. Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis* by flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1633-1637.
- Pailly, O., Tison, G. and Amouroux, A. 2004. Harvest time and storage conditions of star ruby grapefruit (*Citrus paradise* Macf.) for short distance summer consumption. *Postharvest Biology and Technology*, 34: 65-73.
- Perez-Gregorio, M. R., Regueiro, J., Gonzalez-Barreiro, C., Rial-Otero, R. and Simal-Gandara, J. 2011. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red anions and subsequent storage. *Food Control*, 22: 1108-1113.
- Peterson J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. and Holden, J. M. 2006. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 : S66-S73.
- Pichaiyongvongdee, S. and Haruenkit, R. 2009. Comparative studies of limonin and naringin distribution in different parts of pummelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] cultivars grown in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Sciences)*, 43: 28-36.
- Sharma, R. R., Singh, R. and Saxena, S. K. 2006. Characteristics of citrus fruits in relation to granulation. *Scientia Horticulturae*, 111: 91-96.
- Shofian, N. M., Hamid, A. A. Osman, A. Saari, N., Anwar, F., Pak Dek, M. S. and Hairuddin, M. R. 2011. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 4678-4692.
- Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Review of Food Sciences Netherlands*, 15: 49-127.

Xiong, B., Rui, Y., Zhang, M., Shi, K., Jia, S., Tian, T., Yin, K., Huang, H., Lin, S., Zhao, X., Chen, Y. Chen, Y.G., Lin, S. C. and Meng, A. 2006. Tob1 controls dorsal development of zebrafish embryos by antagonizing maternal beta-catenin transcriptional activity. *Development Cell*, 11:225-238.

Investigation of Naringin Content and Antioxidant Activity in 14 Citrus Fruit kinds in Response to Freezing Stress

Fattahi Moghadam^{1*}, J. Kiaeshkevarian², M. and Tajvar³, Y.

Abstract

In this study, fruits of 14 citrus varieties which damaged by freezing and 6 non damaged fruits which obtained from commercial trees were collected from germplasm collection of Citrus Research Institute. After initial evaluation, two main parts of fruit tissues were separated (peel and pulp) and after extraction procedures stored at -80 °C. Evaluating characteristics included number of seeds, peel thickness, TSS, TA, TSS/TA, total phenol, antiradical activity and amount of naringin. The results showed that the peel thickness had a positive and significant correlation with naringin content. Phenolic compounds of peel and pulp taken from non damaged fruits was higher than thus damaged fruits under freezing conditions. There were a significant correlation between peel and pulp Phenolics and antiradical activity. Naringin levels in both tissues were higher in frozen fruits than non damaged fruits. Unshiu which is known as a resistance variety to chilling injury had lower rate of naringin than other damaged fruits. Conclusion, naringin was a main compound in bitter fruits under freezing conditions, which is capable used in the processing industries.

Keywords: Antiradical capacity, Phenol, Naringin, Freezing

1. Assistant professor, Department of Technical and Engineering, Iran Citrus Research Institute, Ramsar

2. Researcher, Department of Technical and Engineering, Iran Citrus Research Institute, Ramsar

3. Assistant professor, Department of Seed and Plant breeding, Iran Citrus Research Institute, Ramsar

*: Corresponding author Email: J.fattahi@areo.ir