بررسی خصوصیات آنتی‌رادیکالی لیگنین استخراج شده از گونه‌های گیاهی توسط دو روش MWL[1] و DL[2]

علی ابراهیم‌زاده[۱]، رضا اسماعیل‌زاده کناری[۲*]، علی عبدالخانی[۳]

۱- کارشناس ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار رشته‌ی علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار رشته‌ی مهندسی علوم و صنایع چوب و کاغذ دانشکده‌ی منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹٤/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۰۷)

چکیده

امروزه به دلیل فعالیت آنتی‌رادیکالی شناخته‌شده در ترکیبات گیاهی و مشتقات آنها، توجه بسیار زیادی به افزودن آنها به سامانه‌های غذایی و بیولوژیکی شده است. در این تحقیق فعالیت ضدرادیکالی لیگنین به‌عنوان یک پلی‌فنول غیر کربوهیدراتی از منابع مختلف گیاهی استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین مقدار کل لیگنین از روش ، ازروش استاندارد شماره‌ی T222 om- 88H آیین‌نامه‌ی TAPPI استفاده شد که مقدار آن در نراد (۲۷/٤±۰/۳) بیشتر از بقیه گونه ها بود. لیگنین با استفاده از دو روش متفاوت MWL و DL از گونه‌های مختلف علفی (باگاس نیشکر)، پهن برگ (صنوبر) و سوزنی برگ (نراد) لیگنین تهیه شد. بازده استخراج در روش DL بالاتر از MWL در تمام گونه‌ها بود. مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت ضدرادیکالی لیگنین های به دست آمده، به ترتیب با استفاده ازروش فولین سیوکالتیو (Folin-ciocalteu) و رادیکال پایدار۲و۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل(DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که لیگنین استخراج‌شده از باگاس نیشکر در هر دو روش دارای ترکیبات فنولی بالا و فعالیت ضدرادیکالی بالاتری را در مقایسه با دیگر گونه‌های گیاهی داشتند. روش استخراج با DL در تمام نمونه‌ها، قدرت ضدرادیکالی بالاتری را در مقایسه با روش MWL از خود نشان داد کمترین مقدار IC50 (۱/٤±۲۷۸/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) به باگاس و بیشترین IC50 (۰/۷±٦۸۲/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) به صنوبر تعلق داشت.

کلید واژگان: لیگنین، فعالیت ضد رادیکالی، فنل کل، DPPH

1. Milled wood lignin
2. Acidic- dioxan lignin

* مسئول مکاتبات: r. kenari@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

پدیده‌ی اکسیداسیون در طی نگه‌داری و فرایندهای مختلف اعمال‌شده بر روی محصولات غذایی خام و فراوری شده باعث ایجاد تندی و توسعه طعم نامطلوب در آنها می‌شود [۱۰]. اکسیداسیون لیپیدها یک فرایند پیچیده‌ای است که طی آن اسیدهای چرب غیراشباع از طریق یک مکانیسم زنجیره‌ای با اکسیژن وارد واکنش شده و رادیکال آزاد تولید می‌نمایند[۱۲]. رادیکال‌های تولید شده از طریق تخریب ویتامین‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع و سایر ترکیبات باعث افت کیفیت در مواد غذایی می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌منظور جلوگیری از واکنش‌های اکسیداسیون، به محصولات غذایی افزوده می‌شوند. این ترکیبات با جلوگیری از پیشرفت این واکنش‌ها باعث می‌شوند که فرایند اکسید شدن به تاخیر بیافتد. نتایج بسیاری ازگزارشات نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده مانند بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA)، بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT) دارای اثرات سمی بر روی سلامتی می‌باشند، بنابراین جایگزین کردن آنتی‌اکسیدان‌های ایمن و طبیعی به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی درمواد غذایی توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. پلی‌فنول‌ها علاوه‌بر داشتن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی دارای خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی نیز می‌باشند، به همین علت در صنایع غذایی مورد مطالعه بیشتر قرار گرفته اند[۸ و۱٦].

لیگنین یک پلی‌مر متشکل از اجزاء فنلی است که در دیواره‌ی سلولی و قسمت‌های فیبری گیاهان یافت میگردد. این ترکیب فراوان‌ترین و مهمترین پلی‌مر آلی در دنیای گیاهی است که از مونومرهای مختلف p کوماریل (گیاهان علفی)، کانیفریل (سوزنی‌برگان) و سیناپیل الکل (پهن‌برگان) تشکیل شده است[٤ و۱۱]. ویناردل و همکاران (۲۰۰۸) بر روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی لیگنین‌های به دست آمده از گیاهان تحقیق کردند و نتایج آزمایشات نشان داد که این ماده پتانسیل حذف رادیکال‌های آزاد AAPH[1] را به خوبی از خود نشاد می‌دهد [۲۱]. گارسیا[2] و همکاران با استفاده از روش‌های مختلف، لیگنین را استخراج و مورد آنالیز قرار دادند و نتیجه گرفتند که وجود انواع مختلفی از ترکیبات فنولی در ساختار این ماده سبب شده است که لیگنین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و آنتی‌رادیکال با منبع طبیعی و تجدید شدنی در نظر گرفته شود [٦]. لذا افزودن لیگنین به مواد غذایی از پیشرفت واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذایی جلوگیری کرده و به این ترتیب اثرات مثبتی بر روی ماندگاری محصولات غذایی خواهد داشت. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی تاثیر لیگنین گونه‌های گیاهی و روش استخراج لیگنین، بر میزان افزایش فعالیت آنتی‌رادیکالی لیگنین‌های استخراج شده می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق برای استخراج لیگنین از باگاس نیشکر، صنوبر و نراد که به ترتیب گونه‌های علفی، درختیِ پهن‌برگ و سوزنی‌برگ می‌باشند، استفاده شد. نمونه‌ها از گروه صنایع چوب و کاغذ دانشکده‌ی منابع طبیعی دانشگاه شهید رجایی تهیه و برای شناسایی به هرباریوم دانشگاه خوارزمی تهران انتقال داده شدند. ٤-۱دیوکسان برای استخراج و حل‌کردن کامل لیگنین از شرکت مرک آلمان تهیه شد. ارزیابی خصوصیات آنتی رادیکالی و مقدار فنل کل لیگنین به ترتیب با روش‌های دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و فولین‌سیوکالتیو (تهیه شده از شرکت سیگما) انجام شد. از BHA و آسکوربیک اسید (ساخت شرکت مرک آلمان) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد برای مقایسات با لیگنین استفاده شد. سایر مواد آزمایشگاهی با درجه‌ی خلوص بالا از شرکت مجللی ساخت ایران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۱- تعیین مقدار لیگنین کل و بازده استخراج

برای اندازه‌گیری مقدار لیگنین کل موجود در نمونه‌ها، ازروش استاندارد شماره‌ی T222 om- 88H آیین‌نامه‌ی TAPPI استفاده شد [۲۰]. ابتدا ۱ گرم از آرد چوب (بر اساس وزن خشک) عاری از مواد استخراجی در داخل بشر ۵۰ ml ریخته سپس ۱۵ ml اسید سولفوریک ۷۲٪ به آن اضافه گردید. بشر به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرارگرفت و در این مدت هر ۱۰ دقیقه، محلول با همزن شیشه‌ای به هم زده شد، سپس مخلوط اسید و آرد چوب به همراه ٥٦۰ml آب مقطر در حال جوش به داخل بالن ریخته و پس از نصب مبرد و برقراری جریان آب سرد، مجموعه روی هیتر قرار گرفت. محتوای داخل بالن پس از جوش آمدن، به‌مدت ٤ ساعت غلیان ملایم

1. 1 - 2,2-azobis-(2-amidinopropane)-hydrochloride

داده شد و سپس محلول توسط صافی کروزه صاف و با آب مقطر در حال جوش تا زمان خنثی شدن اسید شستشو داده شد. مادهی باقیمانده در بالای صافی، به آون با دمای ١٠٣ درجهی سانتی گراد انتقال و پس از خشک کردن در داخل دسیکاتور به دقت توزین و به این ترتیب درصد لیگنین کل طبق رابطهی زیر محاسبه شد:

١٠٠× وزن خشک آرد چوب / وزن خشک لیگنین = درصد لیگنین

٢-٢-استخراج لیگنین به روش دیوکسانِ اسیدی (DL)

بهمنظور استخراج لیگنین دیوکسان‌اسیدی، از روش فوکوشیما و همکاران (٢٠٠١) با تغییرات و اصلاحات جزئی استفاده شد. ابتدا چوب‌های هر سه نمونه توسط آسیاب دورانی (مدل IKH.S1 ساخت شرکت رچ آلمان)، آسیاب و توسط الک با مش٦٠، آرد چوب مناسب تهیه گردید. برای جداسازی مواد استخراجی و کربوهیدرات‌ها، ابتدا آرد حاصله توسط استون و سپس توسط آب، هر بار بهمدت ٦ ساعت در داخل سوکسله شستشو داده شد. ٢٥ گرم از آرد چوب عاری از مواد استخراجی بههمراه ٩٠ سی‌سی دیوکسان و ١٠ سی‌سی اسید هیدروکلریدریک ٣٧٪ بهمدت ١٠ ساعت در حمام آب گرم شیکر دار (مدل WNB -14 ساخت شرکت ممرت آلمان)، با دمای ٦٧ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس دیوکسان حاوی لیگنین و اسید از کاغذ صافی عبور و در آب مقطر رسوب داده شد. لیگنین حاصله با آب مقطر تا زمان حذف کامل اسید شستشو و در دمای محیط خشک گردید (٥).

٢-٣- لیگنین چوب آسیاب‌شده (MWL)

برای تهیهی لیگنین چوب آسیاب‌شده، روش پیشنهادی لاودر و همکاران (١٩٩٦) مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا چوب نمونه‌های مورد استفاده، با آسیاب معمولی خرد و از الک با مش ٢٠ عبور داده شد. ذرات در داخل کارتوش قرار گرفته و با استون بهمدت ٦ ساعت رفلاکس شد، سپس در دمای محیط خشک و مجددا با آب مقطر با همان شرایط رفلاکس گردید. نمونه ها بهمدت یک هفته در داخل دستگاه آسیاب توپی بهشدت آسیاب شد. مخلوط دیوکسان : آب (٩٦:٤ حجمی) به آرد بهدست آمده از مرحلهی قبلی با نسبت ١ به ١٠ حجمی وزنی اضافه و بهمدت ٢٤ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. پس از صاف کردن، محلول حاوی لیگنین به داخل دستگاه تبخیرکنِ تحت خلاء انتقال و به این ترتیب مقدار زیادی از دیوکسان و آب از محیط خارج شد. باقی ماندهی دیوکسان-آب در دمای محیط خشک شد. به این ترتیب لیگنین خام به دست آمد که حاوی درصدی از کربوهیدرات میباشد[١٤].

٢-٤- خالص سازی لیگنین

بهمنظور خالص‌سازی لیگنین از روش بیورکمن استفاده شد. بر اساس این روش، لیگنین خام بدست آمده از مراحل قبل در اسید استیک ٩٠ درصد و در ٤٠٠ میلی‌لیتر آب (بهنسبت ٩:١) تهنشین گردید. پس از خشک کردن بوسیله خشک‌کن انجمادی، در مقدار ٢٠ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرواتان : اتانول (٢:١، نسبت حجمی) حل و در دی‌اتیل‌اتر تهنشین شد. به این ترتیب لیگنین نسبتاً خالص به دست آمد[٢].

٢-٥- اندازه‌گیری میزان فنل کل لیگنین

برای تعیین مقدار فنول کل لیگنین‌های استخراج‌شده، روش گارسیا و همکاران (٢٠١١) مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب ٠/١ گرم از لیگنین در داخل ١٠٠ میلی‌لیتر از دیوکسان : آب (١:٩) حل و بهمدت ٥ دقیقه بر روی شیکر تکان داده شد. ٢/٥ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتیو (رقیق‌شده با آب مقطر به نسبت ١ به ١٠) بههمراه ٢ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم (٧٥ $g.L^{-1}$) برداشته و به ٠/٥ میلی‌لیتر از دیوکسان حاوی لیگنین اضافه شد. مخلوط بهمدت ٥ دقیقه در حمام آبی با دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. پس از سرد شدن، جذب آن در طول موج ٧٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل EZ201 PerkinElmer ساخت آمریکا)، خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک نمونه گزارش شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید در محدودهی ٤٠٠- ٢٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید[٦].

٢-٦- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان بهوسیلهی دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)

DPPH رادیکال آزاد پایداری است که به راحتی الکترون و یا رادیکال‌های هیدروژن ر ا دریافت می‌کند. از این ترکیب برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصارهها و مواد استخراج شده از گیاهان استفاده می‌شود. در ترکیب این ماده با یک آنتی‌اکسیدان، الکترون از آنتی‌اکسیدان گرفته می‌شود که این

واکنش با تغییر رنگ DPPH از بنفش به زرد همراه می‌باشد. [۱و۱۵] .برای تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی لیگنین، از روش براند–ویلیامز[1] و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد. ابتدا غلظت‌های مختلف از لیگنین درحلال دیوکسان–آب (با نسبت ۹ به ۱ حجمی) تهیه و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های تهیه شده با ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH (mol/L ۵ – ۱۰×۶) مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه گرماخانه‌گذاری در دمای معمولی اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج nm ۵۱۷ مقابل شاهد خوانده شد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از رابطه‌ی زیر به دست آمد[۳ و ۱۸] :

I%= (جذب نمونه – جذب نمونه /جذب نمونه) × ۱۰۰

۲-۷- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با روش فاکتوریل طرح کاملا تصادفی و مقایسه‌ی میانگین چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. برای آنالیز داده‌های به‌دست آمده، از برنامه نرم‌افزاری SASنسخه‌ی شماره‌ی ۹ و برای گروه‌بندی اثرات متقابل از MSTATC استفاده شد. نتایج با احتمال P<۰/۰۱ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر عددی IC50 از روی رگرسیون برازش شده بین نقاط مختلف غلظت با درصد مهار کنندگی متناظر حاصل شد. تمامی نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد بیان شده است.

۳- بحث و نتایج

در این تحقیق از لیگنین سه گونه گیاهی شامل پهن‌برگ، سوزنی‌برگ و علفی با استفاده از دو روش استخراج متفاوت استفاده شد. میزان فنول تام با روش فولین سیوکاتیو بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک از لیگنین پودری بر اساس معادله‌ی خط $y=0.0063x, r^2=0.987$ به‌دست آمد که در اینجا y جذب نمونه و x بیانگر غلظت نمونه می‌باشد[۱۵]. محتوای فنلی برای لیگنین‌های حاصله از گونه های مختلف، در محدوده‌ی بین ۷/٦±۳۳۱/٤-۲/۵±۱٦۹/۲ میلی‌گرم درگرم لیگنین پودری بود و اختلاف کاملا معنی داری (P<۰/۰۱) در مقدار فنل کل لیگنین‌های به‌دست آمده از سه نوع گیاه مشاهده شد و مقدار فنل کل برای باگاس> نراد> صنوبر بود (جدول ۱). در این تحقیق لیگنین باگاس در هر دو روش استخراج، دارای بالاترین ترکیبات فنولی نسبت به لیگنین بقیه‌ی گونه‌های گیاهی بود. لیگنین استخراج‌شده به روش DL در بین تمامی گونه‌ها نسبت به روش MWL دارای مقدار ترکیبات فنولی بالایی بوده و در هر سه نوع گونه گیاهی دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. همچنین لیگنین صنوبر به‌عنوان یک پهن‌برگ، کمترین گروه‌های فنولی را در هر دو روش از خود نشان داد. مقدار فنل کل در لیگنین گونه‌ی نراد نیز از باگاس کمتر ولی در مقایسه با گونه‌ی صنوبر در هر دو روش بالاتر بود. گارسیا و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی لیگنین‌های به‌دست آمده از چند روش مختلف آزمایشاتی را انجام دادند و نتیجه گرفتند که مقدار ترکیبات فنولی در روش‌های مختلف می‌تواند متغیر باشد، که با نتایج ما همخوانی دارد (۵).

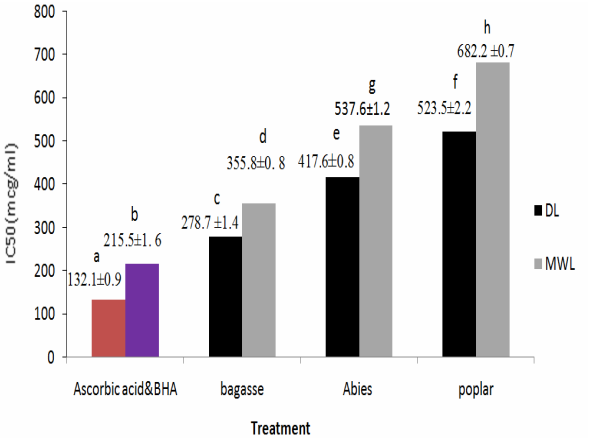

Fig 1 IC50 values for the bagasse, poplar, and abies by two different extraction methods (Acidic-dioxane (DL) and Milled wood (MWL).

خاصیت قوی آنتی‌رادیکالی، مربوط به مقادیر بالای ترکیبات فنولی موجود در ساختار ترکیبات گیاهی می باشد، که با افزایش غلظت و درجه ی هیدروکسیلاسیون، فعالیت مهار کنندگی در برابر رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد[۱۹].در این تحقیق مشخص شد در بین رقم‌های مختلف از گیاهان، لیگنین باگاس دارای قدرت آنتی‌رادیکالی معنی‌داری نسبت به تمام گونه‌های دیگر بود (نمودار۲). در بین روش‌ها نیز DL بهترین روش انتخاب شد (P<۰/۰۱). لیگنین استخراج شده با روش DL در مقایسه با روش MWL خالص‌تر بوده و مقدار کربوهیدارت کمتری دارد، وجود ترکیبات غیر لیگنینی مانند همی‌سلولز ها و سایر کربوهیدرات‌ها باعث کاهش ظرفیت

1. Brand-Williams

آنتی‌اکسیدانی می‌شود. از آنجاییکه این ترکیبات می‌توانند با گروه‌های فنولی لیگنین پیوندهای هیدروژنی بر قرار کنند، بنابراین می‌توانند خصوصیات آنتی‌اکسیدانی لیگنین را تحت تاثیر قرار دهند[٧]. به دلیل حضور مقدار قابل توجهی از کربوهیدرات‌ها و ناخالصی‌های پروتئینی با منشأ آنزیم‌های هیدرولیزکننده در روش استخراج آنزیمی، این روش مورد استفاده قرار نگرفت[٩]. پیوند بین کربوهیدرات‌ها و لیگنین در درختان چوبی بسیار محکم تر از گیاهان علفی می‌باشد، بنابراین در حین استخراج لیگنین، مقدار زیادی از آنها به‌صورت ناخالصی همراه با لیگنین وجود دارند که طی مراحل خالص‌سازی نیز ممکن است اندکی از این ترکیبات در داخل نمونه به‌صورت کمپلکس با لیگنین همراه باشند. همین امر احتمالاً یکی از دلایلی است که باعث کاهش قدرت آنتی‌رادیکالی در نمونه‌های چوبی نسبت‌به گونه‌ی علفی شده است. علاوه‌بر روش استخراج، حلال‌های مورد استفاده و تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابجا شونده هیدروکسیل، تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیسم مختلف واکنش آنها و کینتیک متفاوت واکنش‌های مهاری نیز می‌توانند ظرفیت آنتی‌رادیکالی لیگنین را تغییر دهند [١٣].

غلظتی از لیگنین که باعث مهار ٥٠٪ از رادیکال‌های آزاد می‌شود را با IC50 نشان می‌دهند. در بررسی اثرات متقابل غلظت با روش، بهترین غلظت برای مهار ٥٠ درصد از رادیکال‌های آزاد (IC50) درلیگنین باگاس با استفاده از روش DL مشاهده شد که مقدار عددی آن برابر با ١/٤±٢٧٨/٧ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید، درحالی که در لیگنین چوب آسیاب‌شده از باگاس، مقدار IC50 برابر با ٠/٨±٣٥٥/٨ بود که نشان دهنده‌ی قدرت پایین مهارکنندگی لیگنین چوب‌آسیاب شده می‌باشد.

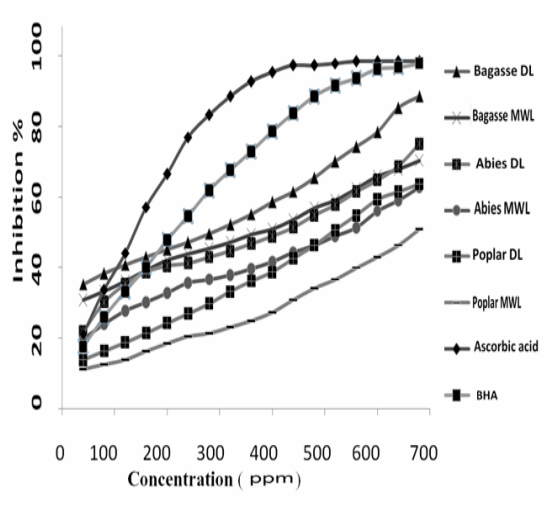

Fig 2 Effect of the bagasse, poplar, and abies Lignin concentration on inhibitory activity

همچنین IC50 برای صنوبر با استفاده از روش‌های DL و MWL به‌ترتیب برابر با٢/٢±٥٢٣/٥ و ٠/٧±٦٨٢/٢ و برای آسکوربیک اسید و BHA به‌ترتیب ٠/٩±١٣٢/١ و١/٦ ±٢١٥/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. از آسکوربیک اسید و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول که آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشند، برای مقایسه با لیگنین استفاده شد. نتایج نشان داد که آسکوربیک اسید قدرت بالایی برای حذف رادیکال‌های آزاد در مقایسه با سایر نمونه‌ها دارد (نمودار ١).

Table 1 The total lignin content, yield percent, and total phenols content obtained from bagasse, poplar, and abies by two different extraction methods (Acidic-dioxane (DL) and Milled wood (MWL).

Plant sources	Total lignin content (%)	Extraction method	Yield (%)	Total phenol contents (mg gr-1)
Bagasse	21.6±0.8	DL	54.2±0.4	331.4±7.6
		MWL	33.8±0.8	287.7±10.7
Poplar	23.8±0.4	DL	62.5±0.8	198.6±6.6
		MWL	34.6±0.3	169.2±2.5
Abies	27.4±0.3	DL	67.8±0.7	254.4±3.8
		MWL	31.3±0.3	208.2±4.1

میزان فنل کل در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌رادیکالی موجود در لیگنین‌های تهیه‌شده از گیاه را توجیه نماید. ویناردل و همکاران (٢٠٠٨) بر روی خصوصیات و کاربرد لیگنین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان تحقیق کردند. نتایج گزارش شده

بیانگر قدرت بالای حذف رادیکال آزاد AAPH در لیگنین باگاس در مقایسه با دیگر گونه‌ها بود[۲۱]. همچنین در مطالعه‌ی آنها ، مقدارIC50 برای لیگنین باگاس برابر با ٦/٧±٤٤/٩ گزارش شد، درحالی که در تحقیق حاضر، به دلیل متفاوت بودن روش استخراج، نوع رادیکال آزاد، نوع حلال و غلظت رادیکال آزاد در برابر لیگنین، مقدار این عدد بالاتر می-باشد. ولی با این‌حال در آزمایشات آنها نیز ثابت شد که لیگنین باگاس در مقایسه با بقیه‌ی گیاهان، قدرت بیشتری را برای حذف رادیکال‌های آزاد دارد [۲۱]. در این تحقیق نشان داده شد که لیگنین استخراج‌شده از صنوبر با روش DL قدرت آنتی‌رادیکالی بالاتری را در مقایسه با لیگنین MWL حاصل از نراد دارد، که این امر نشان‌دهنده‌ی کارایی بهتر روش DL می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ نیز مشاهده می شود، مقدار لیگنین در سوزنی برگان بیشتر از پهن برگان و گیاهان علفی می باشد، که در این تحقیق نیز بالاترین مقدار لیگنین متعلق به گونه ی نراد(سوزنی برگ) بود. همچنین بازده استخراج با استفاده از روش DL بالاتر اختلاف کاملا معنی داری (P<۰/۰۱) درمقایسه با MWL در بین تمام گونه های گیاهی از خود نشان داد.

٤- نتیجه‌گیری

از آنجایی که ارتباط نزدیکی بین قدرت آنتی‌رادیکالی و قدرت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد، بنابراین استفاده از لیگنین در صنعت می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باشد. نتیجه‌ی این تحقیق نشان داد که لیگنین استخراج شده با روش DL به‌دلیل بازده بالا و همچنین قدرت آنتی‌رادیکالی بهتر آن، می‌تواند به‌عنوان آنتی اکسیدان طبیعی عمل نموده و پس از آزمایش‌های تکمیلی در صنایع غذایی و دارویی به‌کار رود.

٥- تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر محمدعلی ابراهیم‌زاده به‌دلیل فراهم نمودن امکانات در آزمایشگاه شیمی دارویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و بهمن مرادی ملک به دلیل شناسایی گونه ها در هرباریوم تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Bhuiyan, M. A. R., M. Z. Hoque and S.J. Hossain., (2009). Free Radical Scavenging Activities of Zizyphus mauritiana.World Journal of Agricultural Sciences.5 (3):318-322.

[2] Bjorkman A., (1954). Isolation Lignin from Finly Divided Wood with Natural Solvent, Nature 174:1057-1058.

[3] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Reset, C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 28 (1), 25–30.

[4] Dizhbite,T., Telysheva,G.,Jurkajane,V.,and Viestrus,U., (2004). Characterization of the radical scavenging activity of lignins—natural antioxidants, Bioresource Technology.95(3),309-317.

[5] Fukushima, R. S., and Hatfield, R. D., (2001). Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. J. Agric. Food Chem. 49:3133-3139.

[6] García,A., Amendola.D., González.M., Spigno.G. and Labidi.J., (2011). Lignin as Natural Radical Scavenger. Study of the Antioxidant Capacity of Apple Tree Pruning Lignin Obtained by Different Methods Chemical Engineering Transactions vol 24:924-930.

[7] Garcia, A.,Toledano,A., Angeles,M.A.,and Labidi, j., (2010). Study of the antioxidant capacity of Miscanthus sinensis lignins, Process Biochemistry 45, 935-940.

[8] Gülçin, I., (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. Innovative Food Science and Emerging Technologies,11:210-218.

[9] Jiang, J.-E., Chang, H. M., Bhattacharjee, S.S. and Kwoh, D.L.W., (1987). Characterization of Residual Lignins Isolated from Unbleached and Semibleached Softwood Kraft Pulps. Journal of Wood Chemistry and Technology 7 : 81-96.

[10] Karpinska,M., Borowski,.and Danowska-Oziewicz,M., (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve food.Food chemistry, 72:5-9.

[11] Ketsa, S. and S. Atantee. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen

fruit after impact., (1998). Postharv. Biol. Technol. 14:117-124.

[12] Ladikos, D. and Lougovois., (1990). Lipid oxidation in muscle foods. Food chemistry,35:295-314

[13] Lagouri V, Boskou D., (1996). Nutrient antioxidants in origano. Int J Food Sci Nutr.;47:493-497.

[14] Lawther J., R. Sun, and W. Banks., (1996). Extraction and comparative characterization of ball-milled lignin (LM), enzyme lignin (LE) and alkali lignin (LA) from wheat straw. Cellul. Chem. Technol. 30:395–410

[15] Martysiak-Żurowska D., Wenta W., (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 11(1), 83-89.

[16] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., et al., (2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72: 145–171.

[17] Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., and Asgarirad, H., (2011). The antioxidant activity of wild medlar (Mespilus germanica L.) fruit, stem bark and leaf. African Journal of Biotechnology, 10 (2) : 283-289.

[18] Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Fernandes, F. A. N., & Brito, E. S.,(2010). Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extract. Food Research International, 44:2072-2075.

[19] Sarikurkcu C, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Harmandar M., (2008). Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of Marrubium globosum subsp. globosum (Lamiaceae) by three different chemical assays. Bioresource Technol. 99, 4239-4246.

[20] Tappi Method T222 om-88., (1988). Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp. Tappi Press, Atlanta, GA.

[21] Vinardell, M.P., Ugartondo, V.,and Mitjans,m., (2008). Potential applications of antioxidant lignins from different sources. Jurnal of industrial crops and products 2 7 : 220–223.

Investigation of anti-radical properties of lignin extracted from plant species by two methods of MWL and DL

Ebrahimzadeh, A. [1], Esmaeilzadeh- kenari, R. [2*], Abdolkhani, A. [3]

1. MSc in food science and engineering, Department of food science and engineering, Sari Agricultural sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2. Associated professor in, Department of food science and engineering ,University of Sari Agricultural sciences and Natural Resources university, Sari, Iran.
3. Assistant professor in, Department of Wood and Paper Sciences, University of Tehran, iran.

(Received: 2016/03/12 Accepted: 2016/04/26)

Today due to known anti-radical activity in plants extracted compounds and its derives was regarded to adding those to food and biological systems. In present paper investigated radical scavenging activity of lignin (as a non-carbohydrate poly-phenol) was extracted from different plant resources. TAPPI standard, T222om-88h was used In order to determination of total lignin. The amount of lignin in abies species was much more than others. Lignin was prepared from three species of bagas (*Herbaceous*), abies (*bornmuelleriana*) (Needle-leaf) and poplar (*populous euroamerica*) (Broad-leaved) by two process of Milled Wood Lignin (MWL) and Acidic Dioxan Lignin (DL).the extraction efficiency of the DL was higher than MWL method in all species. The radical scavenging activity and phenolic compound were determinate by stable DPPH free radical and Folin- ciocalteu reagent, Respectively. The results showed that lignin extracted from cane sugar bagasse in both MWL and DL methods has more radical scavenging activity in compare with other specimens. In all of samples DL has better anti-radical activity than MWL extraction method. The lowest and highest amount of IC50Were attributed to bagasse (278.7 ±١,٤٦) and poplar (682.2 ±0.71) , respectively.

Key words: Lignin, Radical scavenging activity, Total phenol, DPPH.

* Corresponding Author E-Mail Address: r. kenari@sanru.ac.ir