

## بررسی خصوصیات آنتی‌رادیکالی لیگنین استخراج شده از گونه‌های گیاهی توسط دو روش $MWL^1$ و $DL^2$

علی ابراهیم‌زاده<sup>۱</sup>، رضا اسماعیل‌زاده کناری<sup>۲\*</sup>، علی عبدالخانی<sup>۳</sup>

- 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: ۹۴/۱۲/۲۲ 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، از روش استاندارد شماره‌ی T222 om- 88H آیین‌نامه‌ی TAPPI استفاده شد که مقدار آن در نراد  $(27/4 \pm 0/3)$  بیشتر از بقیه گونه‌ها 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 لیگنین‌های به دست آمده، به ترتیب با استفاده از روش فولین سیوکالتیو (Folin-ciocalteu) و رادیکال پایدار ۲،۲ 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  $IC_{50}$  ( $278/7 \pm 1/4$ ) میکروگرم در میلی‌لیتر) به باگاس و بیشترین  $IC_{50}$  ( $682/2 \pm 0/7$ ) 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

این ماده سبب شده است که لیگنین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و آنتی‌رادیکال با منبع طبیعی و تجدید شذنی در نظر گرفته شود [۶]. 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، درختی 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. ۴-۱-ادیوکسان برای استخراج و حل کردن کامل لیگنین از شرکت مرک آلمان تهیه شد. ارزیابی خصوصیات آنتی‌رادیکالی 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، از روش 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 به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و در این مدت هر ۱۰ دقیقه، محلول با همزن شیشه‌ای به هم زده شد، سپس مخلوط اسید و آرد چوب به همراه ۵۶۰ ml 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، به مدت ۴ ساعت غلیان ملایم

پدیده‌ی اکسیداسیون در طی نگاه‌داری و فرایندهای مختلف اعمال‌شده بر روی محصولات غذایی خام و فراوری شده باعث ایجاد تند 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 از گزارشات نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده مانند بوتیل‌هیدروکسی‌آیزول (BHA)، بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT) دارای اثرات سمی بر روی سلامتی می‌باشند، بنابراین جایگزین کردن آنتی‌اکسیدان‌های ایمن و طبیعی به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مواد غذایی توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. پلی‌فنول‌ها علاوه بر داشتن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی دارای خواص ضد میکروبی و ضد قارچی نیز می‌باشند، به همین علت در صنایع غذایی مورد مطالعه بیشتر قرار گرفته‌اند [۸ و ۱۶].

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)، کانفیریل (سوزنی‌برگان) و سیناپیل الکل (پهن‌برگان) تشکیل شده است [۴ و ۱۱]. 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<sup>۱</sup> را به خوبی از خود نشاد می‌دهد [۲۱]. گارسیا<sup>۲</sup> 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

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

پس از صاف کردن، 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 ۱۰۳ 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:

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 ۱۰۳ 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:

$$۱۰۰ \times \text{وزن خشک آرد چوب} / \text{وزن خشک لیگنین} = \text{درصد}$$

لیگنین

## ۲-۲- استخراج لیگنین به روش دیوکسان اسیدی (DL)

به منظور استخراج لیگنین دیوکسان اسیدی، از روش فوکوشیما و همکاران (۲۰۰۱) با تغییرات و اصلاحات جزئی استفاده شد. ابتدا چوب‌های هر سه نمونه توسط آسیاب دورانی (مدل IKH.S1 ساخت شرکت رج آلمان)، آسیاب و توسط الک با مش ۶۰، آرد چوب مناسب تهیه گردید. برای جداسازی مواد استخراجی و کربوهیدرات‌ها، ابتدا آرد حاصله توسط استون و سپس توسط آب، هر بار به مدت ۶ ساعت در داخل سوکسله شستشو داده شد. ۲۵ گرم از آرد چوب عاری از مواد استخراجی به همراه ۹۰ سی سی دیوکسان و ۱۰ سی سی اسید هیدروکلریدریک ۳۷٪ به مدت ۱۰ ساعت در حمام آب گرم شیکر دار (مدل WNB-14 ساخت شرکت ممرت آلمان)، با دمای ۶۷ 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 (۵).

## ۲-۳- لیگنین چوب آسیاب شده (MWL)

برای تهیه‌ی لیگنین چوب آسیاب شده، روش پیشنهادی لاودر و همکاران (۱۹۹۶) مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا چوب نمونه‌های مورد استفاده، با آسیاب معمولی خرد و از الک با مش ۲۰ عبور داده شد. ذرات در داخل کارتوش قرار گرفته و با استون به مدت ۶ ساعت رفلاکس شد، سپس در دمای محیط خشک و مجدداً با آب مقطر با همان شرایط رفلاکس گردید. نمونه‌ها به مدت یک هفته در داخل دستگاه آسیاب تویی به شدت آسیاب شد. مخلوط دیوکسان: آب (۹۶:۴ حجمی) به آرد به دست آمده از مرحله‌ی قبلی با نسبت ۱ به ۱۰ حجمی وزنی اضافه و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت.

## ۲-۴- خالص سازی لیگنین

به منظور خالص سازی لیگنین از روش بیورکمن استفاده شد. بر اساس این روش، لیگنین خام بدست آمده از مراحل قبل در اسید استیک ۹۰ درصد و در ۴۰۰ میلی لیتر آب (به نسبت ۹:۱) ته نشین گردید. پس از خشک کردن بوسیله خشک کن انجمادی، در مقدار ۲۰ میلی لیتر حلال دی کلرواتان: اتانول (۲:۱، نسبت حجمی) حل و در دی اتیل اتر ته نشین شد. به این ترتیب لیگنین نسبتاً خالص به دست آمد [۲].

## ۲-۵- اندازه گیری میزان فنل کل لیگنین

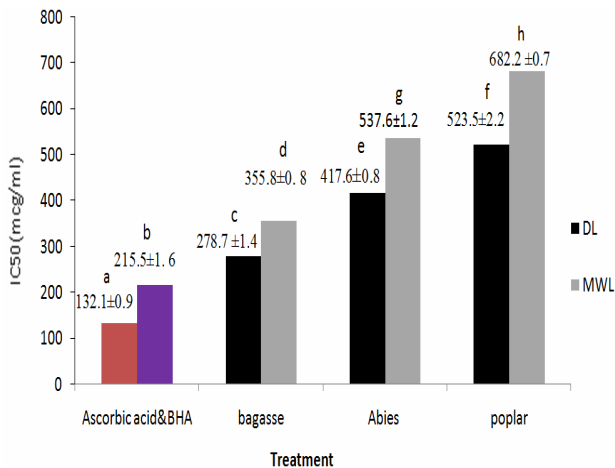
برای تعیین مقدار فنول کل لیگنین‌های استخراج شده، روش گارسیا و همکاران (۲۰۱۱) مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب ۰/۱ گرم از لیگنین در داخل ۱۰۰ میلی لیتر از دیوکسان: آب (۱:۹) حل و به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر تکان داده شد. ۲/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتیو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) به همراه ۲ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم (۷۵ g.L<sup>-1</sup>) برداشته و به ۰/۵ میلی لیتر از دیوکسان حاوی لیگنین اضافه شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. پس از سرد شدن، جذب آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل EZ201 PerkinElmer ساخت آمریکا)، خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک نمونه گزارش شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید در محدوده‌ی ۴۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده گردید [۶].

## ۲-۶- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان به وسیله‌ی

### دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

DPPH رادیکال آزاد پایداری است که به راحتی الکترون و یا رادیکال‌های هیدروژن را 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

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 استخراج شده 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** IC<sub>50</sub> 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 می‌باشد، که با افزایش غلظت و درجه‌ی 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 (نمودار ۲). در بین روش‌ها نیز DL بهترین روش انتخاب شد ( $P < 0.01$ ). لیگنین استخراج شده با روش DL در مقایسه با روش MWL خالص‌تر بوده و مقدار کربوهیدرات کمتری دارد، وجود ترکیبات غیر لیگنینی مانند همی‌سلولزها و سایر کربوهیدرات‌ها باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. از آنجاییکه این ترکیبات می‌توانند با

واکنش با تغییر رنگ DPPH از بنفش به زرد همراه می‌باشد. [۱۵] برای تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی لیگنین، از روش براند-ویلیامز<sup>۱</sup> و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد. ابتدا غلظت‌های مختلف از لیگنین در حلال دی‌اکسان-آب (با نسبت ۹ به ۱ حجمی) تهیه و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های تهیه شده با ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ) مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه گرماخانه‌گذاری در دمای معمولی اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm مقابل شاهد خوانده شد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از رابطه‌ی زیر به دست آمد [۳ و ۱۸]:

$$\%I = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه}} \times 100$$

## ۲-۷- آنالیز آماری

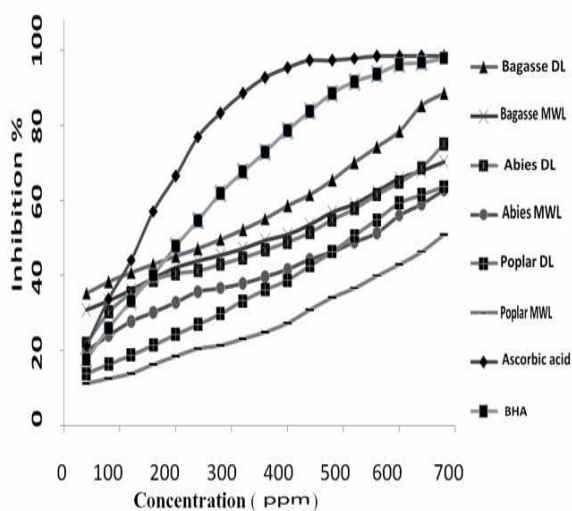
آنالیز آماری داده‌ها با روش فاکتوریل طرح کاملاً تصادفی و مقایسه‌ی میانگین چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. برای آنالیز داده‌های به‌دست آمده، از برنامه نرم‌افزاری SAS نسخه‌ی شماره‌ی ۹ و برای گروه‌بندی اثرات متقابل از MSTATC استفاده شد. نتایج با احتمال  $P < 0.01$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر عددی IC<sub>50</sub> از روی رگرسیون برازش شده بین نقاط مختلف غلظت با درصد مهار کنندگی متناظر حاصل شد. تمامی نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار  $\pm$  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 گونه‌های مختلف، در محدوده‌ی بین  $169.2 \pm 2.5$  -  $331.4 \pm 7.6$  میلی‌گرم درگرم لیگنین پودری بود و اختلاف کاملاً معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) در مقدار فنل کل لیگنین‌های به‌دست آمده از سه نوع گیاه مشاهده شد و مقدار فنل کل برای باگاس  $<$  نراد  $<$

1. Brand-Williams

چوب آسیاب شده از باگاس، مقدار  $IC_{50}$  برابر با  $355/8 \pm 0/8$  بود که نشان دهنده قدرت پایین مهارکنندگی لیگنین چوب آسیاب شده می باشد.



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

همچنین  $IC_{50}$  برای صنوبر با استفاده از روش های DL و MWL به ترتیب برابر با  $523/5 \pm 2/2$  و  $682/2 \pm 0/7$  و برای آسکوربیک اسید و BHA به ترتیب  $132/1 \pm 0/9$  و  $1/6$  و  $215/5 \pm$  میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. از آسکوربیک اسید و بوتیل هیدروکسی آنیزول که آنتی اکسیدان های سنتزی می باشند، برای مقایسه با لیگنین استفاده شد. نتایج نشان داد که آسکوربیک اسید قدرت بالایی برای حذف رادیکال های آزاد در مقایسه با سایر نمونه ها دارد (نمودار ۱).

**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

بیانگر قدرت بالای حذف رادیکال آزاد AAPH در لیگنین باگاس در مقایسه با دیگر گونه ها بود [۲۱]. همچنین در مطالعه ای آنها، مقدار  $IC_{50}$  برای لیگنین باگاس برابر با  $44/9 \pm 6/7$  گزارش شد، در حالی که در تحقیق حاضر، به دلیل

گروه های فنولی لیگنین پیوندهای هیدروژنی بر قرار کنند، بنابراین می توانند خصوصیات آنتی اکسیدانی لیگنین را تحت تاثیر قرار دهند [۷]. به دلیل حضور مقدار قابل توجهی از کربوهیدرات ها و ناخالصی های پروتئینی با منشأ آنزیمی های هیدرولیزکننده در روش استخراج آنزیمی، این روش مورد استفاده قرار نگرفت [۹]. پیوند بین کربوهیدرات ها و لیگنین در درختان چوبی بسیار محکم تر از گیاهان علفی می باشد، بنابراین در حین استخراج لیگنین، مقدار زیادی از آنها به صورت ناخالصی همراه با لیگنین وجود دارند که طی مراحل خالص سازی نیز ممکن است اندکی از این ترکیبات در داخل نمونه به صورت کمپلکس با لیگنین همراه باشند. همین امر احتمالاً یکی از دلایلی است که باعث کاهش قدرت آنتی رادیکالی در نمونه های چوبی نسبت به گونه های علفی شده است. علاوه بر روش استخراج، حلال های مورد استفاده و تعداد حلقه های آروماتیک و ماهیت گروه های جایجا شونده، هیدروکسیل، تنوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیسم مختلف واکنش آنها و کینتیک متفاوت واکنش های مهارتی نیز می تواند ظرفیت آنتی رادیکالی لیگنین را تغییر دهند [۱۳].

غلظتی از لیگنین که باعث مهار ۵۰٪ از رادیکال های آزاد می شود را با  $IC_{50}$  نشان می دهند. در بررسی اثرات متقابل غلظت با روش، بهترین غلظت برای مهار ۵۰ درصد از رادیکال های آزاد ( $IC_{50}$ ) در لیگنین باگاس با استفاده از روش DL مشاهده شد که مقدار عددی آن برابر با  $278/7 \pm 1/4$  میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه گردید، در حالی که در لیگنین

میزان فنل کل در این تحقیق می تواند فعالیت آنتی رادیکالی موجود در لیگنین های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. ویناردل و همکاران (۲۰۰۸) بر روی خصوصیات و کاربرد لیگنین به عنوان یک آنتی اکسیدان تحقیق کردند. نتایج گزارش شده

- 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 Viesturs, 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

متفاوت بودن روش استخراج، نوع رادیکال آزاد، نوع حلال و غلظت رادیکال آزاد در برابر لیگنین، مقدار این عدد بالاتر می‌باشد. ولی با این حال در آزمایشات آنها نیز ثابت شد که لیگنین باگاس در مقایسه با بقیه گیاهان، قدرت بیشتری را برای حذف رادیکال‌های آزاد دارد [۲۱]. در این تحقیق نشان داده شد که لیگنین استخراج شده از صنوبر با روش DL قدرت آنتی‌رادیکالی بالاتری را در مقایسه با لیگنین MWL حاصل از نراد دارد، که این امر نشان‌دهنده کارایی بهتر روش DL می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ نیز مشاهده می‌شود، مقدار لیگنین در سوزنی برگان بیشتر از پهن برگان و گیاهان علفی می‌باشد، 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 کاملاً معنی داری ( $P < 0/01$ ) در مقایسه با MWL در بین تمام گونه‌های گیاهی از خود نشان داد.

#### ۴- نتیجه گیری

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 به دلیل بازده بالا و همچنین قدرت آنتی‌رادیکالی بهتر آن، می‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی عمل نموده و پس از آزمایش‌های تکمیلی در صنایع غذایی و دارویی به‌کار رود.

#### ۵- تشکر و قدردانی

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

#### ۶- منابع

- [1] Bhuiyan, M. A. R., M. Z. Hoque and S.J. Hossain., (2009). Free Radical Scavenging Activities of Zizyphus mauritiana. World

- 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 27 : 220-223.
- [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

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

Ebrahimzadeh, A. <sup>1</sup>, Esmailzadeh-kenari, R. <sup>2\*</sup>, Abdolkhani, A. <sup>3</sup>

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 ( $278.7 \pm 1.87$ ) and poplar ( $682.2 \pm 0.71$ ), respectively.

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

---

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