بررسی تاثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات فنولی و خاصیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار

پریا رهنمون [١]، محبوبه سرابی جماب [٢*]، مجید جوانمرد داخلی [٣]، آرام بستان [٤]

١- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد
٢- استادیار گروه زیست‌فناوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد
٣- دانشیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی پژوهشکده فناوری های شیمیایی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
٤- استادیار گروه نانوفناوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد

(تاریخ دریافت: ٩٤/٠٩/١٦ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٢/١٩)

چکیده

امروزه تمایل به استفاده از ضدمیکروب‌های طبیعی در مواد غذایی افزایش یافته است. پوست انار با داشتن ترکیبات فنولی و ضدمیکروبی فراوان یک منبع مهم برای استخراج این ترکیبات به شمار می‌رود. در این پژوهش استخراج عصاره از پوست انار با نسبت‌های مختلفی از حلال اتانول/ آب (٤٠ به ٦٠، ٦٠ به ٤٠ و ٨٠ به ٢٠) در دماهای ٢٥، ٤٠ و ٥٥ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ٢٠، ٢٤ و ٢٨ ساعت انجام شد. بازده استخراج، میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها اندازه‌گیری گردید. قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی شامل *سالمونلا اینتریتیدیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* با روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) تعیین شد. نتایج نشان داد در نسبت اتانول به آب ٦٠ به ٤٠، دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد و زمان ٢٤ ساعت بیشترین بازدهی استخراج (٥٠/١٪)، میزان ترکیبات فنولی کل (٣٤٩/٥١٨ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره خشک)، فلاونوئیدها (٢٥٠/١٢٤ میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره خشک)، آنتوسیانین‌ها (٢٥٢/٠٤٧ میلی‌گرم سیانیدین ٣ گلوکوزید در ١٠٠ گرم عصاره) ونیز قویترین خاصیت ضدمیکروبی به دست آمد. تمامی عصاره‌ها خاصیت ضدمیکروبی در مورد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه داشتند. در میان میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره پوست انار داشت.

کلید واژگان: عصاره پوست انار، قدرت ضدمیکروبی، ترکیبات فنولی، فلاونوئید، آنتوسیانین.

* مسئول مکاتبات: m.sarabi@rifst.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۱- مقدمه

از دیر باز سلامت مواد غذایی از لحاظ میکروبی یکی از دغدغه‌های مهم مصرف‌کنندگان، تولیدکنندگان و سازمان‌های کنترل‌کننده بوده است. امروزه تقاضا برای استفاده از مواد غذایی با حداقل فرایندهای نگهداری و کمترین میزان مواد نگهدارنده سنتزی افزایش یافته است. با اینکه بسیاری از این نگهدارنده‌های سنتزی از سوی سازمان‌های مسئول مجوز استفاده در مواد خوراکی را دارند ولی بحث در مورد عوارض جانبی آن‌ها هنوز مطرح می‌باشد. با توجه به استفاده روزافزون از مواد غذایی نیمه آماده و کنسرو شده که معمولا حاوی نگهدارنده‌های سنتزی می‌باشند، مشکل استفاده از این ترکیبات بیش از پیش بروز می‌نماید و انتخاب جایگزین مناسب و طبیعی برای این نگهدارنده‌ها احساس می‌شود. ضایعات برخی گیاهان و میوه‌ها منابع ارزشمندی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از جمله ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشند [۱-٤].

انار با نام علمی *پونیکا گراناتوم*[1]، میوه بومی کشورهای ایران، آفریقا، چین و هند است. ایران با تولید تقریبا ۹۹۰ هزار تن انار در سال یکی از بزرگترین تولید کنندگان این محصول در جهان محسوب می‌شود [۵]. قسمت عمده میوه انار تولیدی برای آب‌گیری استفاده می‌شود. پوست انار می‌تواند تا ٤۰٪ از وزن کل میوه انار را تشکیل دهد [٦] و از محصولات جانبی کارخانه‌های آبگیری به‌شمار می‌رود. تحقیقات نشان داده است ترکیبات فنولی انار بالا بوده (۷) و دارای خواص ضدمیکروبی علیه باکتری‌هابه-ویژه باکتری‌های پاتوژن مانند *اشریشیا کلی*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *ویبریو کلرا*، *هلیکوباکتر*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *یرسینا اینترکولیتیکا* و غیره است [۷و ۸].

روش استخراج ترکیبات زیست‌فعال از منابع گیاهی یکی از فاکتورهای موثر در میزان دستیابی به این ترکیبات می‌باشد [۹]. یکی از روش‌های معمول استخراج ترکیبات ضدمیکروبی استفاده از حلال است. حلال‌های آلی به صورت خالص و یا مخلوط با آب عمده‌ترین حلال‌های مورد استفاده برای استخراج این ترکیبات می‌باشند [۱۰]. در بین حلال‌های آلی اتانول به دلیل غیرسمی بودن برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی مورد استفاده در مواد غذایی کاربردی‌تر است [۱۱]. از روش‌های دستگاهی برای استخراج عصاره پوست انار می‌توان به تحقیق چم و هیسل (۲۰۱۰) اشاره نمود که از آب فوق داغ برای استخراج پلی‌فنول‌های پوست انار استفاده کردند [۱۲]. استفاده از پیش‌تیمار اولتراسوند جهت استخراج ترکیبات فنولی پوست انار نیز مورد استفاده قرار گرفته است [۱۳].

در این پژوهش، سه فاکتور موثر در استخراج با حلال شامل دما، زمان و نسبت حلال با هدف دستیابی به بازده استخراج بالای ترکیبات ضدمیکروبی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه قدرت ضدمیکروبی عصاره پوست انار مربوط به حضور ترکیبات فنولی (فلاونوئیدی و غیرفلاونوئیدی) می‌باشد [١٤]، میزان ترکیبات فنولی کل، فلاونوئیدها و مقدار آنتوسیانین‌ها اندازه‌گیری شد. خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های استخراجی علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی شامل *سالمونلا اینتریتیدیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* به دو روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) مورد آزمون قرار گرفت [۸].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه گیاهی

انار با واریته پیش‌رس شیراز از فروشگاه محلی در اواخر شهریورماه ۱۳۹۳ خریداری شد .بعد از پوست‌گیری با دست، پوست‌های جدا شده در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم آفتاب به مدت ۸ روز خشک شدند .نمونه‌های خشک شده با آسیاب (Moulinex, France) خرد شده و برای به دست آوردن پودر یکنواخت از الک ۳۵ مش استفاده شد [۸]. رطوبت اولیه نمونه به روش آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت طبق روش استاندارد ملی ۲۷۰۵ اندازه‌گیری شد [۱۵]. رطوبت اولیه نمونه‌ها ۰/۳٪±۹/٦ بر پایه خشک به دست آمد.

1. *Punica granatum*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

٢-٢- مواد شیمیایی

معرف فولین سیوکالتیو، سدیم کربنات، نیتریت سدیم، کلرید آلومینیوم، هیدروکسید سدیم، پتاسیم کلراید، اسید هیدروکلریک، سدیم استات، استیک اسید، مونوپتاسیم فسفات، دی‌پتاسیم فسفات، اسید سولفوریک، کلرید باریم، اسید گالیک، روتین، محیط کشت مولرهینتون مایع و آگار، محیط کشت دکستروز پپتیتو مایع و آگار از شرکت تجاری مرک آلمان خریداری شدند. اتانول با درجه خلوص ٩٦٪ از شرکت الکل اتحاد ایران تهیه شد.

٢-٣- سویه‌های میکروبی

چهار سویه باکتری شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (١٧٦٤ PTCC)، *اشریشیا کلی* (١٣٢٩ PTCC)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (١٩٩٧ PTCC) و *سالمونلا اینترتیدیس* (١٧٠٩ PTCC)، کپک *آسپرژیلوس نایجر* (٥٠١٢ PTCC) و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (٥١٧٧ PTCC) از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

٢-٤- استخراج

استخراج عصاره از پوست انار در چندین دما و زمان مختلف و با نسبت‌های متفاوتی از حلال اتانول/ آب انجام شد. نسبت ماده جامد به حلال مورد استفاده ١ به ١٠ وزنی- حجمی بود [٨]. عصاره‌های به دست آمده بعد از عبور از صافی پارچه‌ای، با سرعت ٣٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ (Poya Electronic, Iran) شدند. مایع رویی جمع آوری و در آون تحت خلا (Gallenkamp vacuum oven, United Kingdom) در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد، خلا ٠/٨ بار در مدت زمان ٥ الی ٨ ساعت (با توجه به نوع حلال) خشک شدند. عصاره‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [٦].

٢-٥- اندازه‌گیری بازده استخراج

درصد بازده استخراج با تقسیم کردن عدد وزن عصاره خشک به دست آمده بر میزان اولیه نمونه (٥ گرم پوست انار) ضربدر ١٠٠ به دست آمد.

٢-٦- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی از روش فولین- سیوکالتیو استفاده شد (١٦). به طور خلاصه، ٠/٣ میلی‌لیتر از محلول عصاره در بالن حجمی ١٠ میلی‌لیتر ریخته شد. ٥ میلی‌لیتر آب مقطر و سپس ٢ میلی لیتر معرف فولین ١٠ بار رقیق شده به آن اضافه شد. پس از ٣ دقیقه، ٢ میلی‌لیتر سدیم کربنات ٧/٥٪ وزنی- حجمی اضافه گردید. پس از به حجم رساندن، میزان جذب نمونه ها در طول موج ٧٦٠ نانومتر در مقابل شاهد بعد از یک ساعت قرائت شد. نتایج بر اساس منحنی استاندارد اسیدگالیک ($y=2.105x +0.074$) و بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره بیان شد.

٢-٧- اندازه‌گیری فلاونوئیدها

اندازه‌گیری فلاونوئیدها بر اساس روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم انجام گرفت [١٧]. به طور خلاصه، ١ میلی‌لیتر محلول عصاره به بالن حجمی ١٠ میلی لیتر منتقل شد.٤ میلی‌لیتر آب مقطر و ٠/٣ میلی‌لیتر نیتریت سدیم ٥٪ اضافه شد. بعد از ٥ دقیقه، ٠/٣ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ١٠٪ اضافه شد. بعد از ٦ دقیقه ٢ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ١ مولار اضافه شد و با آب مقطر به حجم ١٠ میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب نمونه ها در ٥١٠ نانومتر در مقابل شاهد قرائت شد. نتایج بر اساس منحنی استاندارد روتین ($y=0.417x + 0.015$) و بر حسب میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره بیان شد.

٢-٨- اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها

برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌ها از روش اختلاف pH استفاده شد [١٨]. بطور خلاصه٤٠٠ میکرولیتر از محلول عصاره با ٣/٦ میلی‌لیتر از هر یک از بافرهای پتاسیم کلراید (pH=١) و سدیم استات (pH=٤/٥) به طور جداگانه مخلوط شد. میزان جذب هر یک از محلول‌ها در دو طول موج ٥٢٠ و ٧٠٠ نانومتر خوانده شد. میزان جذب (A) از رابطه (١) به دست آمد. میزان آنتوسیانین‌ها در عصاره بر حسب میلی‌گرم در لیتر از رابطه (٢) به دست آمد که در این رابطه، MW وزن مولکولی سیانیدین ٣ گلوکوزید و برابر با ٤٤٩/٢ گرم بر مول، DF فاکتور رقیق سازی، L طول سل بر حسب سانتیمتر، ε جذب مولی سیانیدین ٣ گلوکوزید و برابر با$l/mol.cm$ ٢٦٩٠٠ و ١٠٠٠، فاکتور تبدیل

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

گرم به میلی‌گرم می‌باشد. نتایج بر اساس میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در ۱۰۰ گرم عصاره بیان شد.

رابطه (۱)

$$A= (A_{520}- A_{700})_{pH=1.0} _ (A_{520}- A_{700})_{pH=4.5}$$

رابطه (۲)

$$\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times L}$$

= میزان آنتوسیانین‌ها (میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در لیتر)

۲-۹- فعال سازی میکروارگانسیم‌ها

برای فعال سازی سویه‌های باکتری و مخمر، هر یک از سویه‌ها به محیط کشت مولر هینتون مایع منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه (Heraeus Biofuge Pico, England)، مایع رویی دور ریخته شده و از کدورت باقیمانده به وسیله محلول بافر فسفات سوسپانسیون باکتری یک مک فارلند (10^8 cfu/ml) تهیه شد (۸). برای تهیه سوسپانسیون قارچی، اسپور کشت داده شده در محیط پوتیتو دکستروز آگار به صورت استریل خراشیده و به داخل آب مقطر استریل انتقال یافت و تا به دست آمدن میزان جذب ۰/٦۰۰ در طول موج ٤۵۰ نانومتر، جهت به دست آوردن جمعیت میکروبی معادل 10^8 cfu/ml، رقیق شد [۱۹].

۲-۱۰- بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره

۲-۱۰-۱- روش انتشار دیسک

ابتدا از تمام سویه‌ها، سوسپانسون میکروبی معادل 10^6 cfu/ml تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسون تهیه شده باکتری، کپک و مخمر بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (باکتری) و پوتیتو دکستروز آگار (کپک و مخمر) به طور یکنواخت پخش شد. دیسک‌های بلانک استریل به قطر ٦ میلی‌متر (پادتن طب) آغشته به ٤۰ میکرولیتر عصاره با رقت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (یعنی ۸ میلی‌گرم از عصاره پوست انار)، بعد از انجام یکسری پیش تست، در سطح محیط آگار قرار داده شد. محلول عصاره قبل از استفاده از فیلتراستریل ۰/٤۵ میکرون عبور داده شد. دیسک‌های آغشته به اتانول به عنوان کنترل منفی و دیسک‌های آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰µg)، جنتامایسن (µg ۱۰) و اریترومایسن (µg ۱۵) نیز به عنوان کنترل مثبت در سطح محیط آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت (باکتری)، ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت (مخمر) و ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۷۲- ۹٦ ساعت (کپک) گرمخانه‌گذاری شدند و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد [۲۰].

۲-۱۰-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC)

۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره بعد از عبور از فیلتر استریل ۰/٤۵ میکرون، به هر یک از سل‌های پلیت الایزا که حاوی ۹۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون مایع (باکتری) و محیط دکستروز مایع (کپک و مخمر) و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (10^6cfu/ml) بود، ریخته شد. سل حاوی محیط کشت بدون سوسپانسیون میکروبی و عصاره به عنوان کنترل منفی و سل حاوی محیط کشت مایع و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسون میکروبی (10^6cfu/ml) به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. پلیت الایزا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت (باکتری)، ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت (مخمر) و ۲۸ درجه‌سانتی گراد به مدت ۷۲- ۹٦ (کپک) گرمخانه‌گذاری شد. رشد میکروبی با اندازه‌گیری دانسیته چشمی (OD) توسط دستگاه الایزا (ELISA reader, ELX800, Biotek Instruments) تعیین شد (۲۱). حداقل غلظت بازدارندگی رشد، کمترین غلظتی از عصاره است که بتواند مانع رشد میکروبی بعد از گرمخانه گذاری گردد.

۲-۱۱- طرح آماری

به منظور دستیابی به بیشترین بازدهی و خواص ضدمیکروبی عصاره استخراجی از پوست انار، چندین پیش تست برای انتخاب مهم‌ترین فاکتورهای موثر در استخراج انجام شد (داده ها نشان داده نشده است). نتایج نشان داد دما، زمان استخراج و نسبت حلال اتانول/ آب بیشترین تاثیر را در بازده استخراج و قدرت ضدمیکروبی عصاره استخراج شده دارد. آزمایشات در دماهای مختلف (۲۵، ٤۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های مختلف (۲۰، ۲٤ و ۲۸ ساعت) و نسبت‌های متفاوتی از اتانول/ آب (٦۰:٤۰، ٦۰:٤۰ و ۸۰:۲۰) به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملا

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

تصادفی در سه تکرارانجام شد. داده ها با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ = α مقایسه شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بازده استخراج

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین بازده استخراج در نسبت حلال اتانول/آب ٦٠ به ٤٠ و دماهای پایین (۲۵ و ٤٠ درجه سانتی‌گراد) به دست آمده است. در تحقیق انجام گرفته توسط مالوییا و همکاران (۲۰۱٤) نیز بیشترین بازدهی استخراج عصاره پوست انار استخراج شده با نسبت‌های مختلفی از حلال‌های آب، اتانول و متانول، زمانی به دست آمد که از حلال اتانول/آب با نسبت ۵۰ به ۵۰ استفاده شد [۲۲]. در بین متغیرهای انتخاب شده، نسبت حلال بیشترین تاثیر را در بازده استخراج نشان داد. با افزایش زمان درصد بازده استخراج در اکثر تیمارها افزایش یافت. افزایش دما (۵۵ درجه سانتی‌گراد)، در بیشتر موارد نه تنها باعث افزایش بازده استخراج نشد بلکه در برخی تیمارها روند بازده استخراج را کاهش داد. شاید به این دلیل که در دماهای بالاتر برخی ترکیبات فرار با سرعت بیشتری از عصاره استخراجی خارج می‌شوند و باعث کم شدن بازده استخراج می‌شوند. علاوه برآن، در دماهای بالاتر برخی از ترکیبات حساس به حرارت از بین می‌روند که این امر باعث کاهش بازده استخراج می‌شود [۲۳]. وجود الکل به میزان ٦٠٪ در حلال، باعث افزایش میزان بازده استخراج شد. تحقیقات نشان داده است که الکل سرعت و بازده استخراج را به دلیل تخریب دیواره سلولی و افزایش میزان دسترسی مواد قابل حل شدن، افزایش می‌دهد [۱۰]. علاوه برآن، استفاده از دو حلال در استخراج باعث می‌شود، از قدرت هر دو حلال در استخراج ترکیبات زیست فعال با قطبیت‌های متفاوت بهره برد [۱۰] و بازده استخراج را افزایش داد. در یک مطالعه، برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست انار از حلال‌های آب، اتانول، متانول، استون و اتیل استات در دمای اتاق و زمان ٦ ساعت استفاده شد. استون و متانول بترتیب با ۳۵٪ و ۳۰٪ بازدهی، بیشترین میزان بازدهی استخراج را نشان دادند. در این پژوهش بازدهی استخراج ترکیبات فنولی با اتانول حدود ۲۵٪ گزارش شد [۹].

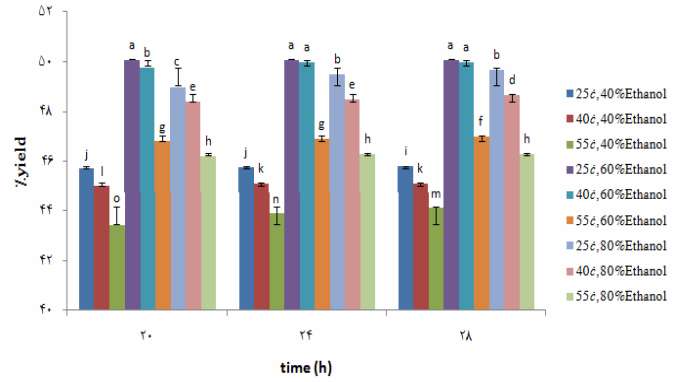

Fig 1 Extraction yields of different treatment. *Different letters indicate significant difference between treatments.

۳-۲- ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدها

میزان ترکیبات فنولی کل در عصاره استخراجی بر مبنای مقادیر جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین سیوکالتو و بر اساس مقایسه آن با منحنی استاندارد گالیک اسید به دست آمد. میزان فلاونوئیدهای عصاره استخراجی از پوست انار نیز با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری و با قرار دادن در معادله خطی منحنی استاندارد روتین محاسبه شد. با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل ۲ و ۳، بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، نسبت اتانول/آب٦٠ به ٤٠ و در مدت زمان ٢٤ ساعت به دست آمد (٣٤٩/٥١٨ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و ۲۵۰/۱۲٤ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره). در دماهای بالا میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها کاهش یافت بطوریکه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، نسبت اتانول/آب٤٠ به ٦٠ و زمان ۲۸ ساعت کمترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئید، به ترتیب ۲۰۱/۰۵٤ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و ۱۳۲/۱۳٤ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره، به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که دماهای بالا باعث از بین رفتن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌شود. در دماها و زمان‌های مختلف بیشترین مقادیر ترکیبات فنولی در نسبت اتانول/آب ٦٠ به ٤٠ به دست آمد که نشان می‌دهد نسبت ٦٠ به ٤٠ دو حلال اتانول و آب بیشترین کارایی را برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در بین سه نسبت حلال انتخاب شده دارد. در مطالعه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

وانگ و همکاران (۲۰۱۳) نیز استخراج ترکیبات فنولی از برگ درخت انار در بین غلظت‌های متفاوتی از چند حلال مختلف شامل آب، اتانول، متانول و استون، حلال ٦١٪ اتانول بیشترین بازدهی استخراج ترکیبات فنولی را داشت [٢٤]. همانطور که قبلا نیز اشاره شد اتانول به دلیل تخریب دیواره سلولی، سرعت استخراج ترکیبات زیست فعال از جمله ترکیبات فنولی را افزایش می‌دهد [١٠].

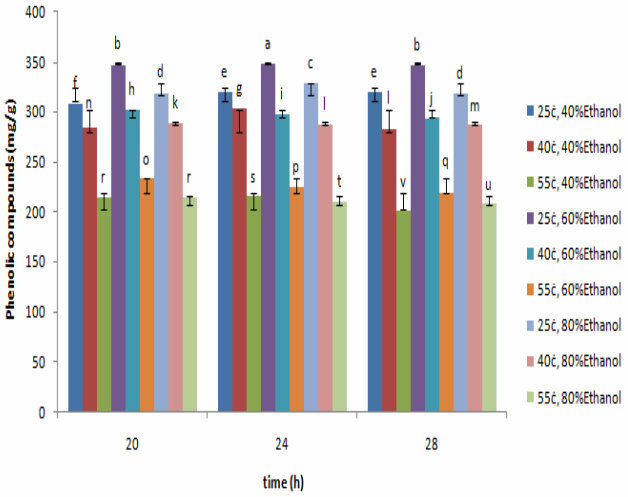

Fig 2 Total phenolic compounds content (mg/g) of different treatments.
*Different letters indicate significant difference between treatments.

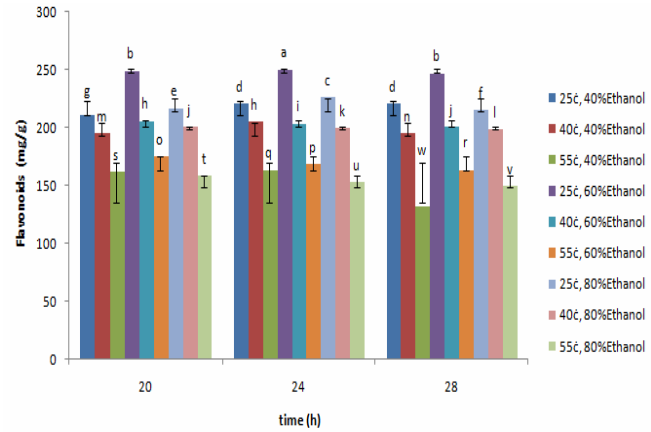

Fig 3 Total flavonoids content (mg/g) of different treatments.
*Different letters indicate significant difference between treatments.

٣-٣- آنتوسیانین‌ها

میزان آنتوسیانین‌های عصاره استخراج شده از پوست انار به روش اختلاف pH اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم سیانیدین ٣ گلوکوزید در ١٠٠ گرم عصاره خشک پوست انار گزارش شد (شکل ٤). بیشترین مقدار آنتوسیانین‌ها در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد، نسبت اتانول/آب ٤٠ به ٦٠ و در مدت زمان ٢٠ ساعت به دست آمد (٣٠٤/٣٤٢ میلی‌گرم سیانیدین ٣ گلوکوزید در ١٠٠ گرم عصاره). نتایج نشان داد که با افزایش دما میزان آنتوسیانین‌های عصاره کاهش می‌یابد که نشان دهنده حساسیت ترکیبات آنتوسیانینی به دماهای بالا میباشد. در تحقیق سوگانیا دنی و همکاران (٢٠١٢) نیز نتایج نشان داده است، آنتوسیانین‌ها در دماهای پایین پایداری بیشتری نسبت به دماهای بالا دارند [٢٥]. آنتوسیانین‌ها ترکیبات زیست فعال حساس به حرارت می‌باشند که در دماهای بالا تجزیه می‌شوند [٢٣]. در سایر دماها و زمان‌های انتخاب شده برای استخراج نیز، در نسبت اتانول/آب ٤٠ به ٦٠، بیشترین مقدار آنتوسیانین‌ها به دست آمد که این یافته با نتایج اوآنسا و همکاران (٢٠١٢) مطابقت دارد [٢٦]. در این مطالعه همچنین بهترین دمای استخراج، در بین سه دمای ٤، ٣٠ و ٥٠ درجه سانتی‌گراد، جهت استخراج آنتوسیانین‌ها از نوعی توت آبی[2]، دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد معرفی شد که این تفاوت شاید به دلیل زمان کوتاه استخراج (٢ ساعت) در این پژوهش بود.

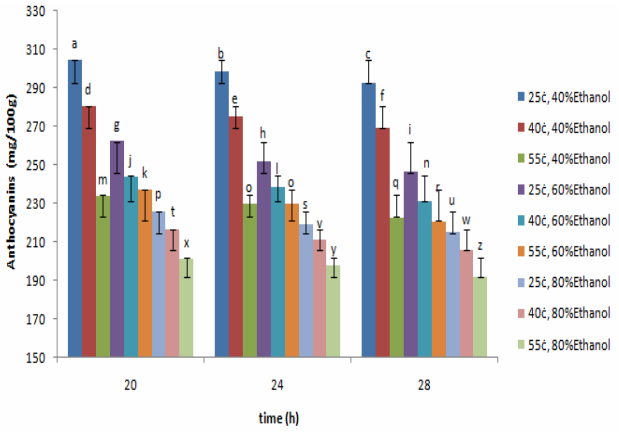

Fig 4 Anthocyanins content (mg/100g) of different treatments.
*Different letters indicate significant difference between treatments.

2. *Vaccinium Corymbosum*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

٣-٤ ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به دو روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمام عصاره‌های استخراجی علیه تمامی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون در این مطالعه خاصیت ضد میکروبی دارد (جدول ١). بیشترین میزان خاصیت ضدمیکروبی مربوط به عصاره پوست انار استخراج شده در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد، زمان ٢٤ ساعت و نسبت اتانول/آب ٦٠ به ٤٠ می‌باشد که نشان می‌دهد خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها ارتباط مستقیمی دارد [٨]. در بین باکتری‌های مورد آزمون، *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله عدم رشد بین ٩ تا ١٨/٦٦ میلی‌متر) بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره پوست انار نشان داد. هایراپتیان و همکاران (٢٠١٢) نیز هاله عدم رشد برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 14458 در حضور عصاره ٨٠٪ متانولی پوست انار را ١٧ میلیمتر به دست آوردند. در بین باکتری‌های مورد آزمون *اشریشیا کلی* بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره‌های استخراج شده از پوست انار نشان داد. باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره‌های گیاهی مقاومت بیشتری در مقایسه با گرم مثبت‌ها نشان میدهند [٢٧]. باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان، دارای یک غشا خارجی در دیواره سلولی خود می‌باشند. مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدی موجود در سطح این غشا و خاصیت هیدروفیلی آن، مقاومت این سلول‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد. درحالیکه در باکتری‌های گرم مثبت، ترکیبات ضدمیکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشا سیتوپلاسمی را تحت تاثیر قرار می‌دهند [٢٧].

عصاره پوست انار در مورد *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* نیز خاصیت ضدمیکروبی نشان داد که با یافته آل‌زورکی (٢٠٠٩) مطابقت دارد. ایبراهیوم (٢٠١٠)، هاله عدم رشد برای *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* را در حضور عصاره پوست انار به ترتیب ١٠/٣ و ٩/٦ میلی متر به دست آورد [٢٨] که با نتایج به دست آمده در این پژوهش (جدول ١) مطابقت دارد.

Table 1 Inhibition zone (mm) of different extracts against tested microorganisms.

treatments			microorganisms					
Temp	Time	Ethanol:water	*S.enteritidis*	E.coli	*L.monocytogenes*	*S.aureus*	A.*niger*	S.*cerevisiea*
25	20	40:60	11.33±0.577	11.33±0.577	12.33±0.577	15.33±0.577	12.33±0.577	8.66±0.577
25	20	60:40	13.33±0.577	11.33±0.577	12.33±0.577	18.33±0.577	15.33±0.577	12±1
25	20	80:20	11.33±0.577	10.33±0.577	11.33±0.577	14±1	10.666±1.527	8.66±0.577
25	24	40:60	12.33±0.577	11.66±0.577	12.66 ±0.577	16.66±0.577	13.66±0.577	9.67±0.577
25	24	60:40	13.33±0.577	12.33±0.577	13.67±0.577	16.33±0.577	13.67±1.528	10.33±1.528
25	24	80:20	11.33±0.577	10.33±0.577	10.33±0.577	13.33±0.577	10.33±1.528	8.33±1.527
25	28	40:60	12±1	12±1	12.33±1.528	15.66±0.577	13.66±0.577	10.66±0.577
25	28	60:40	12.66±0.577	11.33±0.577	12.33±0.577	16.67±0.577	13.33±1.528	10.33±0.577
25	28	80:20	10.33±0.577	10±1	9.67±0.577	12.33±0.577	9.33±0.577	7.33±0577
40	20	40:60	8.66±1.528	9.33±0.577	11.66±0.577	13.67±1.528	11.33±0.577	8.33±0.577
40	20	60:40	10.33±0.577	11.66±0.577	11.33±0.577	13.33±0.577	9.67±2.08	8.33±1.528
40	20	80:20	9.33±0.577	10.33±0.577	9.33±0.577	11.33±0.577	8.33±1.527	6.33±0.577
40	24	40:60	11±1	9.66±0.577	11.66±0.577	14.33±0.577	13±1	8.66±1.528
40	24	60:40	10.66±0.577	10.33±0.577	9.33±0.577	11.66±1.528	9.33±1.528	7.66±0.577
40	24	80:20	9.33±0.577	9.66±0.577	8.33±0.577	10.33±0.577	8.66±2.08	5.33±0.577
40	28	40:60	9.66±0.577	10.33±0.577	9.66±1.528	14.66±0.577	10.66±1.527	8.33±1.528
40	28	60:40	9.33±0.577	10.66±0.577	9.33±0.577	12.33±0.577	8.33±1.527	8.33±1.528
40	28	80:20	7.66±1.527	9.33±0.577	8.33±0.577	10.33±0.577	8.33±0.577	5.33±0.577
55	20	40:60	8.33±0.577	9.66±0.577	9±1	11.66±1.528	9.33±0.577	6.66±0.577
55	20	60:40	8.33±0.577	9.66±0.577	9.33±0.577	11±1	6.66±0.577	6.33±0.577
55	20	80:20	7.33±0.577	6.33±0.577	8.33±0.577	10±1	7.33±1.527	6.33±1.528
55	24	40:60	7±1	9.33±0.577	10±1	10.66±1.527	8.66±2.08	6.33±0.577
55	24	60:40	8.33±0.577	10.33±0.577	8.33±0.577	11.33±0.577	7.33±1.528	6.33±0.577
55	24	80:20	7.33±0.577	8.33±0.577	8.66±0.577	9±1	7.33±1.528	6.66±0.577
55	28	40:60	7.33±0.577	9.33±0.577	9.33±0.577	12.33±0.577	10.33±1.528	7.33±0.577
55	28	60:40	7±1	9.33±0.577	9±1	10.33±0.577	7.33±1.528	7.33±0.577
55	28	80:20	7.33±0.577	6.66±1.528	8.33±0.577	9.33±0.577	7.33±1.527	6.33±0.577

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

نتایج حاصل از MIC (جدول ۲) نیز نشان می‌دهد که *استافیلوکوکوس اورئوس* کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد را در بین سایر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون دارا می‌باشد. بر اساس مطالعه وانگ (۲۰۰۸) و اولیورا (۲۰۱۳)، قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی را می‌توان بر اساس مقادیر MIC آن‌ها تقسیم بندی نمود (۲۳ و ۲۹). عصاره‌هایی که دارای مقادیر MIC کمتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشند، ضدمیکروب قوی، عصاره های دارای MIC بین ٦۰۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ضدمیکروب متوسط و عصاره‌هایی با مقادیر MIC بالای ۱٦۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، عصاره‌های ضعیف به حساب می‌آیند. با توجه به این تقسیم بندی می‌توان گفت که عصاره استخراجی در سه تیمار ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ساعت، نسبت اتانول/آب ٦۰ به ٤۰، ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲٤ ساعت، نسبت اتانول/آب ٦۰ به ٤۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۸ ساعت، نسبت اتانول/آب ٦۰ به ٤۰، عصاره ضدمیکروبی قوی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. آل زورکی (۲۰۰۹) مقدار MIC عصاره پوست انار استخراج شده با ۸۰٪ متانول را برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کرد (۷). گولون و همکاران (۲۰۱٦) نیز مقادیر MIC عصاره پوست انار استخراج شده با ۸۰٪ متانول را برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی* و گونه‌های مختلف سالمونلا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند [۳۰].

خاصیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار مربوط به ترکیبات فنولی آن می‌باشد. گالیک اسید، الاژیک اسید و پونیگالاچین از ترکیبات فنولی عمده در پوست انار می‌باشند که خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها به اثبات رسیده است [۳۱]. فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نیز خاصیت ضدمیکروبی دارند. سیلوان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که فنولیک اسیدها، کاتچین، پروآنتوسیانین‌ها و فلاونول‌ها دارای خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند [۳]. هایراپتیان و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره استخراجی از پوست انارهای قرمز رنگ که دارای آنتوسیانین بالاتری بود، نسبت به عصاره استخراجی از پوست انارهای صورتی رنگ که مقدار آنتوسیانین کمتری داشت، خاصیت ضدمیکروبی قویتری نشان داد [۸].

ترکیبات فنولی از طریق چند مکانیسم مختلف خاصیت ضد میکروبی ایجاد می‌کنند. ترکیبات فنولی قادرند با پروتئین‌های دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها واکنش داده و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد نمایند و یا باعث دناتوراسیون برخی آنزیم‌های میکروبی شوند. علاوه بر آن این ترکیبات با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و آن ها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کنند [۳۲].

۳-۵- حساسیت میکروارگانیسم‌های مورد آزمون نسبت به آنتی بیوتیک‌های تجاری

نتایج مربوط به هاله عدم رشد باکتری‌های مورد آزمون نسبت به سه آنتی بیوتیک تجاری در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، در بین این آنتی بیوتیک‌ها، جنتامایسین هاله عدم رشد قویتری علیه باکتری‌های مورد آزمون ایجاد نمود. هاله عدم رشد تمامی عصاره‌های استخراجی نیز از هاله عدم رشد آنتی بیوتیک جنتامایسین کمتر بود. جنتامایسین با متوقف کردن سنتز پروتئین در میکروارگانیسم‌ها باعث مرگ آن‌ها می‌شود [۳۳]. بهترین عصاره پوست انار استخراج شده از لحاظ قدرت ضد میکروبی (۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲٤ ساعت، نسبت اتانول/آب ٦۰ به ٤۰)، هاله عدم رشد بزرگتری برای باکتری‌های *سالمونلا اینتریتیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در مقایسه با اریترومایسین ایجاد کرد ولی در مورد سایر میکروارگانیسم‌ها اریترومایسین بهتر از عصاره پوست انار عمل نمود. اریترومایسین علیه برخی باکتری‌های گرم منفی و کپک‌ها نیز موثر است. این آنتی بیوتیک باعث کاهش سنتز پروتئین در میکروارگانیسم‌های حساس می‌شود [۳۳].

هاله عدم رشد ایجاد شده توسط پنی‌سیلین در مورد تمامی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، کوچکتر از هاله عدم رشد تشکیل شده توسط قویترین عصاره ضدمیکروبی استخراج شده از پوست انار بود. پنی‌سیلین از اولین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه باکتری‌ها به‌ویژه استافیلوکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها بود ولی امروزه به دلیل استفاده بیش از حد، بسیاری از میکروارگانیسم‌ها نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت پیدا کرده‌اند [۳۳].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

Table 2 Minimom inhibition zone (mg/ml) of different extracts.

Treatments			Microorganisms					
Temp (ċ)	Time (h)	Ethanol:Water	*S.enteritidis*	E.coli	*L.monocytogenes*	*S.aureus*	A.*niger*	S.*cerevisiea*
25	20	40:60	200	200	200	2	200	2000
25	20	60:40	2000	2000	2000	0.2	2000	2000
25	20	80:20	200	200	200	2	200	2000
25	24	40:60	200	200	200	2	200	2000
25	24	60:40	2000	2000	2000	0.2	2000	2000
25	24	80:20	200	200	200	2	200	2000
25	28	40:60	200	200	200	2	200	2000
25	28	60:40	20	20	20	0.2	20	200
25	28	80:20	200	200	200	2	200	2000
40	20	40:60	200	200	200	2	200	2000
40	20	60:40	200	200	200	2	200	2000
40	20	80:20	200	200	200	2	200	2000
40	24	40:60	200	200	200	2	200	2000
40	24	60:40	200	200	200	2	200	2000
40	24	80:20	200	200	200	2	200	2000
40	28	40:60	200	200	200	2	200	2000
40	28	60:40	200	200	200	2	200	2000
40	28	80:20	200	200	200	2	200	2000
55	20	40:60	200	200	200	2	200	2000
55	20	60:40	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	20	80:20	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	24	40:60	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	24	60:40	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	24	80:20	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	28	40:60	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	28	60:40	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	28	80:20	2000	2000	2000	20	2000	2000

Table 3 inhibition zone (mm) of antibiotics against tested microorganisms.

Antibiotics	Microorganisms					
	S.enteritidis	E.coli	*L.monocytogenes*	*S.aureus*	A.*niger*	S.*cerevisiea*
Erythromycin	12	13	11	15	15	14
Gentamicin	25	21	23	27	28	25
Penicillin	7	10	11	12	10	11

٤- نتیجه گیری

عصاره استخراج شده از پوست انار در دمای ٢٥ درجه سانتی گراد، زمان ٢٤ ساعت و نسبت اتانول/ آب ٦٠ به ٤٠، بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها را در مقایسه با سایر عصاره‌های استخراج شده داشت. علاوه بر آن این عصاره بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمون شامل *سالمونلا اینترتیدیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* نشان داد. *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره پوست انار نشان داد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۵- منابع

[1] Perumalla. A and Hettiarachchy, N.S. 2011. Green tea and grape seed extracts Potential applications in food safety and quality. Food Research International 44: 827- 839.

[2] Aliakbarian. B, Fathi. A, Perego. P, Dehghani. F. 2012. Extraction of antioxidant from winery wastes using subcritical water. The Jurnal of Subcritical Fluids, 65: 18- 24.

[3] Silvan. M, Mingo. E, Hidalgo. M, Pascual-Teresa. S, Carrascosa. A.V, Martinez-Rodriguez. A.J. 2013. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against Campylobacter spp. Food Control, 29: 25- 31.

[4] Sagdic. O and Ozturk. I, Kisi. O. 2012. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. Expert Systems with Applications, 39: 6792- 6798.

[5] Akhavan. H, Barzegar. M, Weidlich. H, Zimmermann. B. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars. Journal of Chemistry, 2015:1-7.

[6] Cam. M, Icyer. N.C, Erdogan. F. 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. LWT - Food Science and Technology, 55: 117- 123.

[7] Al-Zoreky. N.S. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. International Journal of Food Microbiology, 134: 244- 248.

[8] Hayrapetyan. H, Hazeleger. W.C, Beumer. R.R. 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. Food Control, 23: 66-72.

[9] Yasoubi. P, Barzegar. M, Sahari. M, Azizi. M.H. 2007. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extracts. Journal of Agric. Sci. Technol, 9: 35-42.

[10] Wijngaard, H., Hossain M.B., Rai D.K, Brunton. 2012. Technique to extract bioactive compounds from by food by-products of plant origin. Food Research International, 46: 505-513.

[11] Shang, Y.F., Kim, S.M., Um, B.H. 2014. Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. Food Chemistry, 154, 164-170.

[12] Çam, M. and HisIl, Y. 2010. Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. Food Chemistry, 123: 878-885.

[13] Tabaraki. R., Heidarizadi. E., Benvidi. A. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. Separation and Purification Technology, 98: 16–23.

[14] Bragaa. L.C, Shuppb. C.W, Cummingsb. C, Jettb. M, Takahashic. J.A, Carmo. L.S, Chartone-Souzaa. E, Nascimento. A. 2005. Pomegranate extract inhibits Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production. Journal of Ethnopharmacology, 96: 335–339.

[15] Iranian National Standards Organization 1389. www.isiri.org.

[16] Singleton. V, Orthofer. R, Raventos. R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by mean of Folin- Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152- 178.

[17] Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, P. M., Albertini, M. C., & Piatti, E. 2005. Raw Millefori honey is packed full of antioxidants. Journal of Food Chemistry, 9: 217−222.

[18] Cheng, G.W., Breen, P.J. 1991. Activity of phenylalanine ammonialyase (PLA) and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. J.Am.Soc.Hort.Sci, 116:865- 869.

[19] Chandrasekaran, M. and Venkatesalu, V. 2004. Antibacterial and antifungal activity of Syzygium jambolanum seeds. Journal of Ethnopharmacology, 91: 105-108.

[20] CLSI (1) - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standarddNinth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2eA9 [ISBN 1-56238- 586-0]. 940

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[2٧] Duffy, CF., Power, RF. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. Journal of international antimic 17: 527- 529.

[28] Ibrahium, I.M. 2010. Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. Journal of Agricultural Sciences, 6 (4): 338-344.

[29]Oliveira, D., Salvador, A., Smânia, A., Smânia, Jr.E., Maraschin, M., Ferreira, S. 2013. Antimicrobial activity and composition profile grape pomace extracts obtained by supercritical fluid. Jurnal of Biotechnology, ١٦٤: ٤٢٣- ٤٣٢.

[30] Gullon. B., Pintado. M. E., PerezAlvarez. J., Viuda-Martos. M. 2016. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) our obtained from co-product of juice extraction. Food Control, 59: 94-98.

[31] Qu, W., Breksa, A., Pan, Zh., Ma, H. 2012. Quantitative determinate of major polyphenol constituents in pomegranate products. Journal of Food Chemistry, 132: 1585- 1591.

[32] Hugo, W. B., Bloom eld, S. F. 1971. Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. 3. The effect of fentichlor on the metabolic activities of Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of Applied Bacteriology, 34: 579- 591.

[33] Clinical Research Information on Drug Induced liver injury. United States national library of medicine. http://livertox.nih.gov.

West Valley Road, Suite ١۴٠٠, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

[21] CLSI (2) - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standarddSeventh Edition. Clinical and LaboratoryStandards Institute docu-ment M7eA7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical andLaboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

[22] Maviya. Sh., Jha. A., Hettiarachchy. N. 2014. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. Journal of Food Scientist & Technologist, 51(12): 4132-4137.

[23] Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A., Speers, R.A., 1987. Anthocyanins as food colorants-a review. Journal of Food Biochem, 11: 201-247.

[24] Wang, Y., He, H., Yang, J., De, Y., Hao, X. 2008. New monoterpenoid coumarins from Clausena anisumolens. Journal of Molecules, 13: 931- 937.

[25] Suganya Devi, P., Saravanakumar., Mohandas, S. 2012. The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum(*Sorghum bicolor*) bran. African Journal of Food Science, 6(24): 567-573.

[26] Oancea, O., Stoia, M., Comon, D. 2012. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of Vaccinium Corymbosum in the Perspective of Food sApplication. Procedia Engineering, ٤٢: ٤٨٩–٤٩٥.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

Evaluation of Extraction Conditions on Phenolic Compounds and Antimicrobial Properties of Pomegranate (*Punica Granatum*) Peels

Rahnemoon, P. [1], Sarabi Jamab, M. [2*], Javanmard Dakheli, M. [3], Bostan, A. [4]

1. PhD student of food microbiology, Research Institute of Food Science and Technology.
2. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology.
3. Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST).
4. Assistant Professor, Department of Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology.

(Received: 2015/12/07 Accepted: 2016/05/08)

In recent years, tendency to use of natural antimicrobial agents in food industry has increased. Pomegranate peels containing phenolic compounds and anti microbial agents, count as valuable source for extraction of these compounds. In this study, the extraction of pomegranate peel extract was done at different ethanol/water ratio (40:60, 60:40 and 80:20), temperature (25, 40 and 55˚C) and time duration (20, 24 and 28h). Extraction yield, Phenolic compounds, Flavonoids and Anthocyanins were measured. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts were determined against some food born microorganisms such as *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiea by agar defusion and MIC methods*. Results showed that at ethanol/water ratio 60:40, 25˚C and 24h and maximum amount of Phenolic compounds (349.518 mg acid galic/g dried extract), Flavonoids (250.124 mg rutin/g dried extract), Anthocyanins (252.047 mg cyanidin3glucoside/100g dried extract) and the most strongest antimicrobial activity were obtained. All extracts were demonstrated antimicrobial activity against every testedmicroorganisms. *Staphylococcuse Aureus* showed the highest sensitivity among the tested microorganisms.

Keywords: Pomegranate Peel Extract, Antimicrobial Activity, Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins.

* Corresponding Author E-Mail Address: m.sarabi@rifst.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]