علمی پژوهشی

بررسی خاصیت ضد اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره ی متانولی پوست سبز گردو

زهرا لطیفی[۱*]، محمود چهارلنگ[۲]، میلاد دانش نیا[۳]، سمانه خاکی آرانی [۴]، معصومه برزنونی [۵]، پروین بُقُری[۶]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری و عضو مرکز تحقیقات مهندسی کیفیت و انجمن علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نور

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز آذین شوشتر، دانشگاه جامع علمی کاربردی، خوزستان، ایران

۳ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

٤- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- دانش آموخته کارشناسی، گروه علوم وصنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، خراسان رضوی، ایران

٦- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان رضوی، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰٦/۰۲)

چکیده

در سال‌های اخیر به استفاده از مواد طبیعی نظیر اسانس‌ها و عصاره‌ها به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت غذا تاکید شده است. پوست سبز گردو از ضایعات کشاورزی است که به دلیل داشتن ترکیبات فنولی، می تواند به عنوان یک ترکیب طبیعی با خواص بیولوژیک مطرح باشد و باعث کاهش بسیاری از بیماری‌های لاعلاج و جلوگیری از فعالیت اکسایش لیپیدها گردیده و به عنوان عوامل ضدمیکروبی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، محتوای ترکیبات فنولی، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی عصاره متانولی پوست سبز گردو مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره‌گیری به دو روش خیساندن و سوکسله در حلال متانول ٦۰ و ۸۰ درصد انجام شد. میزان ترکیبات فنولی عصاره به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. فعالیت ضد رادیکالی عصاره با آزمون مهار رادیکال‌های DPPH بررسی شد. فعالیت ضدباکتریایی عصاره به روش انتشار دیسکی علیه باکتری های *سالمونلا تایفی موریوم*، *شیگلا دیسانتری و لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

میزان فنل کل برای روش خیساندن و سوکسله به ترتیب ۱۷/۸۱ و ۸۹/۰۷ بر حسب معادل اسید گالیک بر اساس میلی گرم بر گرم نمونه به دست آمد. میزان EC_{50} پوست سبز گردو ۰.۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. عصاره فعالیت ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای در مقابل تمامی باکتری های مورد بررسی نشان داد. میزان MIC بین ۰/٦۲۵و ۱/۲۵ و MBC بین ۱/۲ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که عصاره متانولی پوست سبزگردو به عنوان منبع غنی و بالقوه از ترکیبات زیست فعال با خاصیت آنتی-اکسیدانی و ضد میکروبی قابل استفاده در صنعت غذا و دارو در جهت حفظ سلامت انسان می‌باشد.

کلید واژگان: پوست سبز گردو، خاصیت ضداکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، ترکیبات فنولی

*مسئول مکاتبات: yasamin.latifi131@yahoo.com

۱- مقدمه

گردو(Juglans regia) از درختان بسیار مهم و ارزشمند می باشد که در بسیاری از نقاط جهان یافت می شود، در ایران این گیاه از ارتفاع ۲۶ متر پایین تر از سطح دریا در مازندران تا ارتفاع بیش از ۲۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا در چهارمحال بختیاری رویش داشته و بجز استان های ساحلی خلیج فارس و دریای عمان، در سایر استان های کشور کشت می گردد. گردو متعلق به رده ی نهان دانگان، زیر رده ی دولپه ای ها، راسته یAmentales، خانواده Juglandaceae و جنس Juglans [۱] و دارای ۲۱ گونه است که همگی خزان دار می باشند و دارای میوه خوراکی هستند [۲].

پوست سبز گردو یکی از مهمترین ضایعات حاصل از گردو پس از جدا کردن مغز بوده و می تواند به عنوان منبعی از ترکیبات فنولی با خواص بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد. اثرات مفید ترکیبات فنلی از جمله: خاصیت ضد سرطانی، ضد جهش و محافظت از قلب و همچنین مشکوک به سمی بودن آنتی اکسیدان های مصنوعی، منجر به مطالعات متعددی برای به دست آوردن این ترکیبات از منابع طبیعی شده است. به همین منظور ضایعات صنایع غذایی و کشاورزی مورد توجه قرار گرفت. با به کار گیری این ضایعات جهت تولید آنتی اکسیدان های طبیعی علاوه بر مقرون به صرفه شدن تولید، به حفظ محیط زیست نیز کمک می شود[۳].

ترکیبات فنلی موادی هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. این ترکیبات در تمامی بخش ها ی درخت گردو (میوه، پوست و برگ) موجود است و اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن شناخته شده است . بنابراین، اجز ای مختلف درخت گردو می تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدان طبیعی و عوامل ضد میکروبی، ارزشمند باشد[٤].

واژه آنتی اکسیدان، به گیرنده های رادیکال آزاد، ممانعت کننده های پراکسیداسیون لیپیدها و عوامل چلات کننده (Chelating agent)، نسبت داده می شود [۵]. آنتی اکسیدان های سنتزی مانند BHT ، BHA و پروپیل گالات در حال حاضر به فرآورده های غذایی، برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی ها اضافه می شوند. مطالعات نشان داده است که میوه ها، سبزی ها و ضایعات آنها دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشند[٦].

آنتی اکسیدان های طبیعی ترکیبات فنولی هستند که در همه بخش های یک گیاه وجود دارند و از انواع متابولیت های ثانویه هستند که گیاهان در مواجه با گونه های فعال اکسیژن، آنها را تولید می کنند. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی اساساً به دلیل خصوصیات اکسایشی و کاهشی آنهاست که این امکان را به آنها می دهد که به عنوان یک عامل احیاء کننده، دهنده هیدروژن و خنثی کننده اکسیژن یگانه عمل کنند. آنتی اکسیدان ها به طور طبیعی در اکثر منابع طبیعی موجود هستند. فرآوری ممکن است باعث تخریب یا حذف این ترکیبات گردد. بنابراین افزودن ترکیبات آنتی اکسیدانی برای حفظ کیفیت برخی محصولات مورد نیاز است[۷].

ترکیبات فنولی عصاره پوست سبز گردو توسط استامپر و همکاران مورد تجزیه قرار گرفت و ترکیبات سازنده آن مشخص گردید. تعداد ۱۳ ترکیب فنولی شامل :هیدروکسی سین دامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها (اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید پروتوکاتئیک، اسید سیرینژیک و اسید وانیلیک فلاونوئیدها کاتکین، اپی کاتکین، میرستن) و ژوگلون یا جوگلون (۵ هیدروکسی ۱و ٤ نفتوکینون) در گردو شناسایی شده است. ترکیبات فنولی عصاره استخراجی پوست سبز گردو در چهار رقم میوه گردوی رسیده مورد بررسی قرار گرفت. در بین این ترکیب ها ژوگلون بیشترین میزان را دارد و ترکیب اصلی موجود در پوست سبز گردو است[۸].

اُلویرا و همکاران میزان فنول کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی ۵ واریته مختلف عصاره آبی پوست گردو را ارزیابی نموده و نشان دادند که پوست سبز گردو می تواند به عنوان منبع مهمی از ترکیبات محافظت کننده سلامتی و ضد میکروبی مورد توجه قرار گیرد[۹].

همچنین با توجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، در اثر مصرف داروهای ضدمیکروبی جهت پیشگیری،

درمان عفونت ها، عوارض جانبی و اثرات سوء متفاوت آنها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به منظور کشف منابع جدید دارویی علیه عفونت های باکتریایی مورد نیاز می باشد[۱۰]، همچنین به منظور کاهش و یا حذف آنتی باکتریالها و نگهدارنده های سنتتیک و جایگزینی با ترکیبات نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی، مطالعه این اثرات در مدل های آزمایشگاهی و سپس در مدل های صنعتی ضروری است[۱۱]. لذا هدف از این پژوهش، بررسی خاصیت ضد اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره ی متانولی پوست سبز گردو است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی نمونه ها

۲۰ کیلوگرم میوه گردو واریته اسرائیلی در تاریخ ۱۳۹۵/۷/۱ از یک باغ محلی(عمارلو) واقع در اطراف شهر رودبار برداشت شد. همه نمونه ها پیش از طلوع آفتاب برداشت شدند. در همه مراحل گردوهای کاملاً سالم، به صورت دست چین، بدون هیچ گونه آسیبی به پوست سبز و به صورت کاملاً تصادفی برداشت شدند. نمونه ها پس از برداشت در همان روز پوست گیری شد. پوست های سبز جدا شده در یک محیط دور از نور خورشید و در دمای محیط خشک شدند. پوست های سبز پس از خشک شدن کامل، به کمک یک آسیاب برقی به دقت آسیاب شدند و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش ۲۰ الک شد. پودر پوست سبز خشک شده گردو به دست آمده تا پایان آزمایش ها در ظرف شیشه ای قهوه ای رنگ و در دمای یخچال (حدود ٤ ^{o}C) نگهداری شد.

۲-۲- تهیه عصاره پوست سبز گردو به روش پرکولاسیون(خیساندن)

در این روش ۲۰ گرم پودر سبز گردو با ۲۰۰ میلی لیتر حلال در داخل یک بالن ژوژه مخلوط شده و در ظرف را بعد از بستن توسط پارافین مسدود نموده و به مدت یک ساعت توسط همزن، همزده شد. سپس نمونه را به مدت ۷۲ ساعت در یخچال با دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار داده و در طی این مدت هر روز به مدت ۱-۲ ساعت توسط همزن، همزده شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در نهایت نمونه با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ی ۳ صاف شد. نمونه به دست آمده به داخل پتریدیش منتقل شده و در آون با دمای ۳۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد . پس از گذشت ٤۸ ساعت عصاره خشک از داخل پتریدیش ها جمع آوری نموده و تا پایان دوره آزمایش در ظرف شیشه ای قهوه ای رنگ و در دمای یخچال (حدود ٤ درجه سانتیگراد) نگهداری شد.

۲-۳- اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی

اندازه گیری فنول ها توسط روش فولین سیوکالتو (۲۲) و برای همه نمونه با ۳ تکرار صورت گرفت. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. نتایج براساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره بیان گردید[۱۲].

۲-٤- اندازه گیری میزان ترکیبات فلاوونوئیدی

اندازه گیری ترکیبات فلاوونوئیدی توسط روش رنگ سنجی و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۱۵ نانومتر و برای همه نمونه با ۳ تکرار صورت گرفت. نتایج براساس میلی گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم نمونه خشک شده بیان گردید[۱۲].

۲-۵- میزان به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH

غلظت های مختلفی (۰.۵، ۱، ۱.۵، ۲، ۲.۵، ۳ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره پوست سبز گردو و نیز آنتی اکسیدان سنتزی BHT در محلول متانول تهیه شد. ۰.۳ میلی لیتر از محلول های تهیه شده با ۲.۷ میلی لیتر محلول متانول حاوی معرف DPPH(غلظت ۰.۱ میلی مولار) مخلوط شد. مخلوط همزده شده و به مدت ٦۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از طیف سنج نوری خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH طبق رابطه زیر محاسبه شد[۱۳]:

$$\% RSA = [(AC-AS)/AC] \times 100$$

که در این رابطه RSA، فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد بر حسب درصد و AC و AS به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند. از محلول متانولی ۰.۱ میلی مولار DPPH به عنوان شاهد استفاده شد.

به جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی رادیکالی، از فاکتور $EC_{۵۰}$ استفاده شد که بیان گر غلظتی از عصاره است که قادر به

کاهش غلظت رادیکال آزاد DPPH اولیه به ۵۰ درصد مقدار اولیه است.

۲-٦-آزمون میکروبی

۲-٦-۱- فعال سازی باکتریهای مورد بررسی

باکتری های *سالمونلا تایفی موریوم*(PTCC 1609)، *باسیلوس سرئوس*(PTCC 1015)، *کاندیدا آلیکس*(PTCC 5027)، *استافیلوکوکوس اورئوس*(PTCC 1431)، *نوروسپورا اینترمدیا*(PTCC 5291) و *سودوموناس ائوروژنس*(PTCC 1430) از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. ویال لیوفیلیزه حاوی باکتری های فوق الذکر طبق دستورالعمل، تحت شرایط استریل از محل مورد نظر باز شد و از آن کشت مادر و سپس کشت ذخیره تهیه شد. کشت ذخیره در فریزر ۲۰ – درجه سانتی گراد قرار داده شد و در مراحل بعدی از آن استفاده شد.

۲-٦-۲- روش چاهک گذاری در آگار

فعالیت ضد میکروبی غلظت های ۰.۵، ۱، ۱ میلی گرم بر گرم عصاره آبی پوست سبز گردو با استفاده از روش چاهک گذاری در آگار(Agar well Diffusion Method) تعیین شد(۱۹). باکتری های سالمونلا تایفی موریوم، باسیلوس سرئوس، کاندیدا آلیکس، استافیلوکوکوس اورئوس، نوروسپورا اینترمدیا و سودوموناس ائوروژنس در محیط آبگوشت BHI، ۲٤ ساعت قبل از آزمون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. در ادامه کشت سطحی با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع محتوی تقریباً 10^7 CFU/ml – 10^8 از باکتری های مذکور در محیط کشت جامد BHI انجام گرفت[۱٤].

در مرحله بعد در هر پلیت سه چاهک با قطر ٦ میلی متر توسط سر پیپت پاستور استریل ایجاد شد. و در درون هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ریخته شد. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله ها با کمک کولیس با دقت ۰.۰۲ میلی متر اندازه گیری گردید. قطر هاله تشکیل شده (بر حسب میلی متر) به عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی در نظر گرفته شد. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری بر روی سطح پلیت، یک پلیت کشت داده شده فاقد عصاره، در نظر گرفته شد. همچنین از یک پلیت فاقد باکتری نیز برای اطمینان از عدم آلودگی محیط های کشت استفاده گردید[۱۵].

۲-۷- تجزیه آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصله با نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. همچنین به منظور بررسی اثر غلظت بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره پوست سبز گردو از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. همچنین برای مقایسه میانگین ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی دار شناخته شد از آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range Tests) استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، در سطح معنی داری (α=0.05) انجام شد و تمام آزمون ها در سه تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

در پژوهش حاضر جهت استخراج ترکیبات پلی فنولی از روش ماسراسیون(خیساندن) استفاده شده است. در این پژوهش مقدار ترکیبات فنولیک۷٤.۲۹ میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره بدست آمد. در مطالعه نوشیروانی و همکاران در سال ۱۳۹۸، ترکیبات فنولیک پوست سبز گردو در روش ماسراسیون ۳۸.۷ میلی گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک به دست آمد[۱٦]. ثابت ماندن دما یکی از عوامل قابل توجه در حین استخراج ترکیبات فنولیک می باشد زیرا دما به عنوان یکی از عوامل مهم در استخراج ترکیبات فنولی است و با ضریب انتشار ترکیبات فنولی به داخل حلال رابطه دارد. دمای بالا باعث افزایش سرعت تخریب بافت ماتریکس شده و در نتیجه ترکیبات بیشتری وارد حلال خواهند شد[۱۷].

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی نیز در پژوهش حاضر ۵۳.٦۲ میلی گرم کاتچین بر گرم نمونه بدست آمد. این مقدار در پژوهش نوشیروانی و همکاران در سال ۱۳۹۸، ۱.۵۹ میلی گرم بر گرم بر حسب کاتچین ثبت شده است[۱٦]. همانگونه که در مطالعات پیشین نیز مشخص شده بود بین محتوای فنولیک و محتوای فلاونوئیدی رابطه موثر و مثبت برقرار است[۱۸]. کافئیک اسید، گالیک اسید، مریستین، کوئرستین و ژوگلون، فلاونوئیدهای پوست سبز گردو را تشکیل می دهند[۱۹] و فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالا بوده و با بدام انداختن رادیکال های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو و

همینطور مهار ماکرو مولکول های اکسیداسیون، خطر بیماری های دژنراتیو (degenerative) را کاهش می دهد[۲۱، ۲۰]. فلاونوئیدها می توانند با حذف رادیکال های آزاد اکسیژن عملکرد آنتی اکسیدانی داخل سلول را افزایش دهند[۲۲]. لازم به ذکر است که مهم ترین خصوصیت فلاونوئیدها نقش آنها در پیشگیری از بیماری های قلبی می باشد.

Table 1 Comparison mean amount of total phenolic and flavonoids compounds of walnut green skin with percolation extraction method

Type of compound	Maceration extraction method
The amount of phenolic compounds (Mg of gallic acid per gram of dry extract weight)	74.29 ± 0.09^{a}
The amount of flavonoid compounds (Mg of quercetin per gram of dry extract weight)	53.62 ± 0.17^{b}

dissimilar letters within a row represent a significant difference ($P<0.05$)

عصاره پوست سبز گردو دارای فعالیت آنتی رادیکالی می باشد. در این پژوهش جهت بررسی این فعالیت فاکتور EC_{50} در مقابل مهار رادیکال DPPH مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی و آنالیز نتایج حاصل از پژوهش دولت آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۳، بیانگر این است که غلظت ترکیبات فنولیک نقش موثری بر مهار رادیکال های آزاد DPPH داشته است[۲۳]. این پژوهش همچنین اثر آب و هوا بر مقدار فنول موجود در پوست سبز گردو را تایید می کند. بطوریکه پوست سبز گردو در درختان مناطق مرتفع و کوهستانی نسبت به پوست سبز گردو در درختان مناطق معتدل و نیمه خشک دارای مقدار فنول و همچنین خواص آنتی اکسیدانی بیشتری است. از آنجایی که نمونه های مورد استفاده در پژوهش حاضر از منطقه ای کوهستانی(اطراف شهر رودبار) تهیه شده اند دارای مقدار فنول و خواص آنتی اکسیدانی بیشتری می باشند. با افزایش غلظت ترکیبات فنولیک که در نتیجه افزایش تعداد گروههای هیدروکسیل موجود در محیط واکنش را موجب می شود، قدرت مهار کنندگی نیز به علت احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال های آزاد DPPH افزایش می یابد[۲٤]. لازم به ذکر است که در غلظت های بالای ترکیبات فنولیک، مهار رادیکال های آزاد تغییر محسوسی ندارد. زیرا یک مقدار معین از ترکیبات فنولیک برای انجام فعالیت آنتی اکسیدانی مورد نظر کافی بوده و غلظت ترکیبات فنولیک بالاتر از حد اشباع در فعالیت آنتی اکسیدانی بی‌تاثیر است[۲۵].

Table 2 Amount of EC_{50} according to DPPH

Type of Antioxidant	EC_{50}
walnut green skin Extract	0.019 ± 0.0002^{a}
BHT	0.13 ± 0.0003^{b}

dissimilar letters within a row represent a significant difference ($0.05>P$)

در جدول شماره۲ میزان EC_{50} در عصاره پوست سبز گردو و نیز آنتی اکسیدان سنتزی BHT بررسی شده است که مقدار EC_{50} موجود در عصاره پوست سبز گردو در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی بیشتر است. در پژوهش رضایی ارمی و همکاران در سال ۱۳۹۳، میزان EC_{50} عصاره پوست گردو استخراج شده توسط روش معمول، بالاتر از آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و BHT بود که این مورد بیانگر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر آنتی اکسیدان های سنتزی نسبت به عصاره استخراج شده می باشد[۲٦] که با نتایج آزمایش حاضر همخوانی دارد.

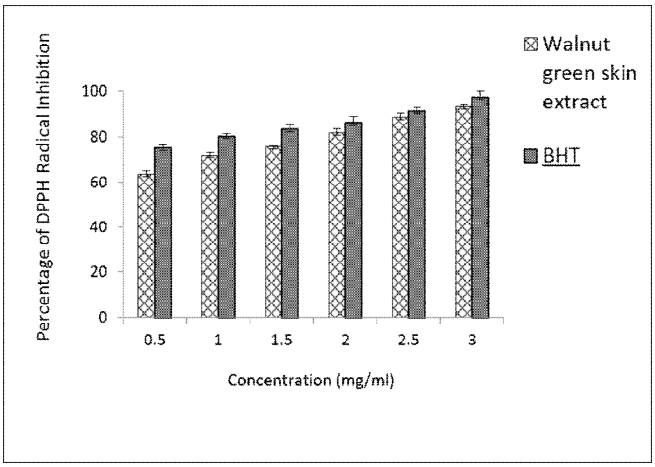

Fig 1 Comparison DPPH free radicals inhibitory effect by walnut green skin extract and BHT synthetic antioxidant according to different concentrations

در شکل شماره ۱، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH با استفاده از غلظت های مختلف عصاره پوست سبز گردو (بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر) و مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی BHT بررسی شده است، عصاره پوست سبز گردو در تمامی غلظت های مورد آزمایش، درصد مهار کنندگی کمتری نسبت به BHT داشت و این موضوع در پژوهش رضایی ارمی و همکاران در سال ۱۳۹۳، نیز به اثبات رسید که در تمام غلظت های مورد آزمایش، آنتی اکسیدان سنتزی BHT فعالیت آنتی رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره پوست سبز گردو داشت[۲۶]. حتی در پژوهش صورت گرفته توسط قادری و همکاران در سال ۱۳۹۰، نیز که فعالیت ضد رادیکالی آنتی اکسیدان BHT و عصاره بلوط مورد بررسی قرار گرفت، فعالیت آنتی رادیکالی بالاتر BHT نسبت به عصاره بلوط به ثبت رسید[۲۷]. همانطور که در مطالعه عربشاهی و عروج در سال ۱۳۷۷، مشاهده گردید، مهار رادیکالDPPH رابطه مستقیم با مقدار ترکیبات فنولی دارد[۲۸]. در پژوهش حاضر، بیشترین اختلاف درصد مهار کنندگی عصاره سبز گردو و آنتی اکسیدان BHT در غلظت ۰.۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. ولی اختلاف معنی داری در درصد مهار کنندگی در غلظت ۲.۵ میلی گرم بر میلی لیتر دیده نشد. با افزایش غلظت، درصد مهارکنندگی رایکال آزاد DPPH توسط عصاره پوست سبز گردو و آنتی اکسیدان BHT افزایش یافت که این مورد در پژوهش مردانی و همکاران در سال ۱۳۹۱[۲۹] و دولت آبادی و همکاران[۲۳] در سال ۱۳۹۳، نیز گزارش شده بود. در بالاترین غلظت آزمایش شده (۳ میلی گرم/میلی لیتر) عصاره پوست سبز گردو و BHT درصد مهار کنندگی بالاتر از ۸۰ درصد را نشان داده اند.

Table 3 Antimicrobial activity of different concentrations of methanolic extract of walnut green skin on tested microbes based on disk diffusion method

	Extract concentration (mg / ml)					
	0.5	**1**	**1.5**	**2**	**2.5**	**3**
Salmonella typhimurium	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus	6.9±1.72[a]	7.3±0.22[a]	10.9±1.04[b]	12.39±0.32[c]	13.76±1.83[d]	15.5±0.72[d]
Candida albicans	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	1.00±8.15[a]	1.43±10.631[b]	11.57±1.98[b]	13.69±1.04[c]	15.66±0.35[d]	17.01±1.92[e]
Neurospora intermedia	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-
Escherichi coli	-	-	-	-	-	-

The values of non-similar letters in each row have a significant difference in the level($p<0.05$)

ترکیبات فنولیک موجود در پوست سبز گردو در بسیاری از گیاهان دیگر نیز وجود دارد که اثر ضد میکروبی و تاثیر آن روی میکروارگانیسم ها تابع محل و تعداد گروههای هیدروکسیل روی حلقه فنولی است. در صورت اکسید شدن فنول ها اثرات شدیدتری روی میکروارگانیسم ها قابل مشاهده خواهد بود[۳۰].

ترکیبات فنولیک با مکانیسم هایی خاص قادر به اعمال اثر ضد میکروبی خود هستند. ترکیب پروتئین های خارج سلولی با تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و با ایجاد اختلال در غشای سلول میکروارگانیسم ها از محتمل‌ترین مکانیسم های عمل ضد میکروبی ترکیبات فنولی هستند[۳۱]. طبق تحقیق پریرا و همکاران در سال ۱۳۸۶، کوئرستین ۳-گالاکتوزید به عنوان ترکیب اصلی فنولی موجود در پوست سبز گردو با مهار آنزیم DNA گیراز در میکروارگانیسم ها موجب جلوگیری از تکثیر آنها شد[۳۲].

در جدول ۳، فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی پوست سبز گردو بر میکروارگانیسم های سالمونلا تایفی موریوم، باسیلوس سرئوس، کاندیدا آلبیکنس، استافیلوکوکوس اورئوس، نوروسپورا اینترمدیا، سودوموناس

ائوروژنس و اشریشیاکلی بر اساس روش انتشار دیسکی مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس پژوهش دولت آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۳، پوست سبز گردو از فعالیت میکروارگانیسم های گرم مثبت مانند لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروارگانیسم های گرم منفی مانند اشرشیاکلی، پروتئوس ولگاریس و سالمونلا تیفی جلوگیری می کند[۲۳]. غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره پوست سبز گردو بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و غلظت ۱۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر سایر میکروارگانیسم‌ها اثر مهارکنندگی رشد دارد. لازم به ذکر است که این عصاره در غلظت ۱۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری های سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز اثر کشندگی داشت. حشمتی و همکاران در سال ۱۳۹۵، در تحقیقی، مهار ۳ میکروارگانیسم ساکارومایسس سرویزیه، آسپرژیلوس نایجر و باسیلوس لچنی فرمیس را توسط عصاره های اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو را اثبات کردند[۳۳]. در این مطالعه مشخص گردید که بیشترین اثر مهارکنندگی عصاره استخراج شده از برگ و پوست سبز میوه گردو بر روی ساکارومایسس سرویزیه بود. همینطور نتایج این مطالعه بیانگر این بود که مقدار MIC و MBC عصاره متانولی برگ گردو روی آسپرژیلوس نایجر صفر بوده و عصاره اتانولی برگ گردو در رقت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر آسپرژیلوس نایجر اثرگذار بود. بر همین اساس کمترین اثر مهارکنندگی روی آسپرژیلوس نایجر ثبت شد . این مورد که عصاره پوست گردو با ۰.۱ MIC بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موثر است در تحقیقی توسط الیویرا و همکاران در سال ۱۳۸۷ گزارش[۹] و توسط چراغعلی و همکاران در سال ۱۳۹۵، نیز تایید گردید[۳٤]. در پژوهش حاضر نیز اثر ضد میکروبی عصاره متانولی پوست سبز گردو بر روی میکروارگانیسم های باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به اثبات رسید. در مطالعات دیگری نیز اثرات ضد باکتریایی عصاره برگ درخت گردو روی باکتری های گرم مثبت نظیر باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری های گرم منفی از جمله اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه به اثبات رسیده است[۳۲].

٤- نتیجه‌گیری

در پایان لازم به ذکر است که پوست سبز گردو که به عنوان ضایعات محصولات کشاورزی دور ریخته می شود می‌تواند جهت استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی با منشاء طبیعی جهت استفاده در محصولات مختلف بهره برداری شود و موجب تغییر در جنبه های مختلف مانند ایمنی و سلامتی محصول گردد.

٥- منابع

[1] Tabatabaei, M., Dehlavi, A. And Afrasiab Ahmadi, AS. 1992 . Walnut, Hicori and Pekan. Publishing house Jihad university, Tehran, page 432, [in persian].

[2] Sattar A, Jar M, Ahmed A, Durrari SK. 1990. Peroxidation and heavy metals of dry nut oils. Acta-Alimentaria .19(3): 225-28.

[3] Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (Corylus avellana L.) shell and skin wastes by lon maceration at room temperature. Food Chemistry, 110, .966–956.

[4] Stampar, F., Solar, A., Hudina, M.,Veberic, R., Colaric, M. 2006. Traditinalwalnut ligueur-cocktail of phenolics. Food chemistry, 95(4), 627-631.

[5] Lee, J.C., Kim, J., Park, J.K., Chung, G.H, Jang, Y.S. 2003. The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidasemediated apoptosis. Exp. Cell Research, 291: 386-397.

[6] Sakanaka, S. and Ishihara, Y. 2008. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. Food Chemistry, 107: 739-744.

[7] Wijngaard H, Rle H, Brunton C. 2009. Survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry .116: 202-7.

[8] Cosmulescu S, Trandafir I, Achim Gh, Botu M, Baciu A, Gruia M. 2010. Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici .38:53-6.

[9] Oliveira I, Sousa A, Ferreira CFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. 2008. Total phenols, antioxidant potential andantimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) greenhusks. Food Chem Toxicol. 46: 2326–2331.
[10] Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira I, Bento A, Estevinho L. 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (Juglans regia L.) cultivars. Food and Chemical Toxicology .46: 2103–11.
[11] Rahnama M, Razavi Rouhani SM, Tajik H, Khalighi Sigaroudi F, Rezazadeh Bari M. 2009. Efffects of zataria multiflora bioss. Essentioal oil and nisin, alone and in combination against listeria monocytogen in bhi broth. J Med Plants. 8(32): 120-31.
[12] Kamaliroosta L, Ghavami M, Gharachorloo M, Azizinezhad, R. 2010. Isolation of cinnamon extract and assessing its effect on the stability of sunflower oil. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 6 (1): 13-22 [in Persian].
[13] Diaz-Bandera D, Villanueva-Carvajal A, Dublan-Garcia O, Quintero-Salazar B, Domingues-Lopez A. 2015. Assessing release kinetics and dissolution of spray-dried Roselle(Hibiscus sabdariffa L.) extract encapsulated with different carrier agents. Food Science and Technology.15: 1 – 27.
[14] Hejri A, Gharanjig K, Hejazi M. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (Phaseolus vulgaris L.). Food Research International. 43:516-9[in Persian].
[15] Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valenta P, Andrade P , Ferreira I, et al . 2007. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology. 45: 2287-95.
[16] Nourishani, N., Fassihi, H., Ali Moradi, P. 2015. Antioxidant effects of extracts and powdered green peanut skin on sunflower oil oxidation. Iranian Journal of Nutrition and Food Technology. Volume 10 No. 3 Pages 79-90, [in persian].
[17] Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, et al. 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglans regia L.) green husk extracts. Ind Crops Prod.
[18] Kamali M, Khosroyar S, Jalilvand M. 2014. Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin contents and antioxidant capacities of different extracts of aerial parts of Dracocephalum kotschyi. J North Khorasan Univ Med Sci. 6(3):627-634. doi:10.29252/jnkums.6.3.627.
[19] COSMULESCU SN, TRANDAFIR I, ACHIM G, BOTU M, BACIU A, GRUIA M. 2010. Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits. Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca. . 38(1):53-56.
[20] Branca M. Silva, Paula B. Andrade, Patrícia Valentão, Federico Ferreres, Rosa M. Seabra, Ferreira§ MA. 2004. Quince (Cydonia oblonga Miller) Fruit (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity.
[21] Raquel Pulido, Laura Bravo , Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay.
[22] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA.2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. 74(4):418-425.
[23] Dolatabadi, M., Ghodni Amiri, Z., Ismaelzadeh Kanari, R. 2013. Comparison of Total Phenol and Antioxidant Properties of Green Walnut Skin in Northern Areas of Iran (Shahrood, Bandar Gaz and Thousand Jereyb). Tarbiat Modares University. Volume 11 No. 45, [in persian].
[24] Sun T, Powers JR, Tang J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. Food Chem. 105(1):101-106.
[25] Rumbaoa RGO, Cornago DF, Geronimo IM. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (Ipomoea batatas) varieties. Food Chem.113(4):1133-1138.
[26] Rezaei Erami, S., Jafari, S.M., Khumiri, M., Bayat, H.2015. Extraction of Walnut shell extracts, Shahmirzadi variety and effect of solvent and extraction method on antioxidant activity of extract. Journal of Food Science and Nutrition. Volume 12. Number 3 . Pages 85 to 98, [in persian].
[27] M. GG, A.R. SM, M. A, M.H. A, M. G. 2012. Study on antioxidant activities of Phenolic extracts from fruit of a variety of Iranian acorn(Q. Castaneifolla var Castteifolia) .9(35):45-56.
[28] Arabshahi-Delouee S, Urooj A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.)

leaves. Food Chem. 102(4):1233-1240.
[29] Mardani Ghahfarakhmi, A., Alaami, M., Arafshahi Dolayi, S., Khodabakhshi, R., Ghaderi Ghahfarakhmi, M. 2013. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of phenolic extracts of flower of Maghreb flower (Oenothera biennis L.) Iranian Food Science and Technology Researches. Year ninth Second Issue, [in persian].
[30] Rama Raje Urs N V. 1975. Enhancement of the Bactericidal Activity of a Peroxidase System by Phenolic Compounds. Phytopathology. 65(6):686.
[31] Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, et al. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Ethnopharmacol. 50(1):27-34.
[32] Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valenta P, Andrade P , Ferreira I, et al . 2007. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology. 45: 2287-95.
[33] Heshmatami A., Azizi Shafa M., Old, P. 2016. Antimicrobial effect of ethanolic and methanolic extract of leaves and green skin of walnut fruit against Saccharomyces cerevisiae, Bacillus lichenium fermes and Aspergillus niger in palm dates. Iranian Journal of Nutrition and Food Technology. . Volume 11 No. 4 Pages 81-88, [in persian].
[34] Cheraghali, F., Mirmaghdamie L., Shojaee Ali Abadi, S., Hosseini, S. 2016. Comparison of antimicrobial and antioxidant properties of aqueous extract of green peanut walnut before and after micro-coating. Iranian Journal of Nutrition and Food Technology. Volume 11 No. 2 Pages 113-124, [in persian].

Antioxidant and antimicrobial properties of methanolic extract of green walnut skin

Latifi, Z.[1*], Chaharlang, M. [2], Daneshniya, M. [3], Khaki Arani, S. [4], Barzanooni, M. [5], Boghori, P.[6]

1. Young Researchers and Elites Researchers Club, Islamic Azad University, Sari Branch, and a member of the Quality Engineering Research Center and the Scientific Association of the Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Noor Branch
2. Master of Scince (MSc),Department of Food Science and Technology,Azin Shoushtar Branch,Applied Scientific University, Khuzestan,Iran
3. Young and Elite Researchers Club, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran
4. Master of Science (MSc).Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University,Varamin Branch,Tehran, Iran.
5. Bachelor student department of food science and , Neyshabour Branch , Islamic Azad University , khorasan Razavi, Iran
6. Master of Science, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, khorasan Razavi, Iran

(Received: 2019/04/30 Accepted: 2019/08/22)

In recent years, the use of natural substances such as essential oils and extracts has been emphasized in place of chemical preservatives in the food industry. green walnut skin is an agricultural waste that, due to its phenolic compounds, can be considered as a natural combination containing biological properties, and it reduces many of the incurable diseases and prevents the oxidation of lipids and is used as antimicrobial factors. In this study, the content of phenolic compounds, antioxidant and anti - bacterial properties of methanolic extracts of green walnut skin was investigated. Extraction was carried out using both soaking and soxhelt methods in 60% and 80% methanol solvent. The amount of phenolic compounds of the extract was determined by spectrophotometric method.The anti-radical activity of the extract was evaluated by DPPH radical inhibitory test. Antibacterial activity of the extract was investigated by disc diffusion method against *Salmonella typhimurium, Shigella dysentery and Listeria monocytogenes*. Collected data were analyzed using SPSS software and Duncan test. Results: The total phenol content for soaking and soxhlet methods was respectively 17.81 and 89.07, according to Gallic acid equivalent, based on mg / g of sample. EC_{50} amount of green walnut skin was 0.15 mg / ml. The Remarkable antimicrobial activity was observed against all studied bacteria. MIC was between 1.625 and 1.25 and MBC between 1.2 and 2.5 mg / ml. The results of this study showed that methanolic extracts of green walnut skin are a potential source of bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial properties that can be used in the food and medicine industry to protect human health.

Key words: Green Walnut Skin, Antioxidant Property, Antimicrobial Activity, Phenolic Compounds

*Corresponding Author E-Mail Address: yasamin.latifi131@yahoo.com