مقایسه روش های استخراج با حلال و آب زیر بحرانی بر ویژگی های ضد اکسیداتیو و ضدمیکروبی عصاره دارچین

سپیده سهراب پور[1*]، رضا اسماعیل زاده کناری[2]، زینب رفتنی امیری[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده مهندسی و زراعی
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده مهندسی و زراعی

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۹)

چکیده

در دهه اخیر استفاده از افزودنی‌های طبیعی جایگزین برایترکیبات سنتزی و شیمیایی مورد استفاده در صنایع غذایی،اهمیت بسزایی داشته است. از سوی دیگر به دلیل مشارکت ترکیبات فنولی در فعالیت آنتی اکسیدانی هدف پژوهش حاضر اندازه گیری میزان کل این ترکیبات و توکوفرول کل، با استفاده از آزمون های سه گانه اندازه گیری قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH، توان احیاء آهن و رنگبری بتاکاروتن در عصاره دارچین استخراج شده به دو روش غرقابیو آب زیر بحرانی و همچنین ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی این عصاره ها بر روی هر دو گونه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت است. نتایج حاصل نشان دادمقادیر ترکیبات فنولی و توکوفرولی کل حاصل از روش‌های استخراج مختلف، از نظر آماری باهم اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0.05$). بطوری‌که عصاره حاصل از روش غرقابی حاوی ترکیبات فنولی بیشتر (30.35±1.13 GAE/ml) و عصاره آب زیر بحرانی دارای ترکیبات توکوفرولی بیشتری (20.86±0.5 ml/kg) بود. نتایج آزمون های آنتی اکسیدانی سه گانه انجام شده نیز نشان‌دهنده فعالیت ضداکسیداتیو بالاتر عصاره روش غرقابی می باشد. قدرت رقابت آنتی اکسیدانی هر دو عصاره در آزمون های سه گانه در مقایسه با TBHQبسیار متفاوت بود. نتایج آزمون ضدمیکروبی نشان داد که کمترین غلظت عصاره روش غرقابی (۵۰۰ppm) اثر کشندگی بر کلیه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده داشت، درحالی‌که عصاره روش آب زیر بحرانی در غلظت‌های متفاوت بر باکتری‌های مختلف اثر کشندگی خود را اعمال نمود. بطوری‌که، غلظت ۵۰۰ppm تنها قادر به از بین بردن باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*بود. بر اساس نتایج کلی حاصل از این پژوهش، عصاره های حاصل از دارچین می تواند جایگزین بسیار مناسبی برای مواد شیمیایی ضدمیکروبی و آنتی اکسیدان های سنتزی در صنایع غذایی گردد.

کلید واژگان: آب زیر بحرانی، غرقابی، فعالیت ضد اکسیداتیو، فعالیت ضدمیکروبی، عصاره دارچین

*مسئول مکاتبات: sepidesohrabpour@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

۱- مقدمه

واکنش اسیدهای چرب غیراشباع از طریق یک مکانیسم زنجیره ای با اکسیژن، منجر به فرآیند پیچیده ای می‌گردد که تحت عنوان اکسایش شناخته می‌شود و رادیکالهای آزاد تولید شده در این واکنش، منجر به کاهش کیفیت مواد غذایی می‌گردند[۱].

مطالعات انجام گرفته بسیار زیادی در سطح جهان، خطرات ناشی از مصرف آنتی اکسیدان های سنتزی از جمله BHA[1] و BHT[2] را به اثبات رسانده اند و از آنجایی که این ترکیبات دارای اثرات سمی بر روی سلامتی انسان هستند، جایگزین کردن آنها با ترکیبات مشابه طبیعی و ایمن در مواد غذایی، امریست که توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف داشته است[۲]. امروزه، تمرکز عمده محققین در این زمینه، بر استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی می باشد[۳].

از سوی دیگر، افزایش بیماریهای ایجاد شده از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به میکروارگانیسم‌های با منشاء غذایی، از دیگر چالشهای اصلی مطرح در ایمنی غذایی می باشد[٤].

دارچین با نام علمی *CinnamommumZylancum*یا *CinnamommumVerum* از خانواده *Lauraceae* و از جنس *Cinnamomum* درختچه ای همیشه سبز[٥] می‌باشد که دارای تقریبا ۲۵۰ گونه مختلف میباشد[٤]. اسانس آن دارای فعالیت ضد میکروبی قوی می‌باشد[٦].علاوه بر این، دارچین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز میباشد[٥].

برخی محققین، وجود ترکیبات فنولی در این منابع را از جمله عوامل اثرگذار در این ویژگی ها معرفی نموده اند[۷و۸]. پلی فنولها علاوه بر داشتن خصوصیات آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی، دارای خاصیت ضدمیکروبی نیز می‌باشند[۲]. ازآنجایی که تمام این ویژگیها بطور عمده به ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی بستگی دارد، تلاشها باید در راستای استخراج صحیح، جداسازی و شناسایی این ترکیبات متمرکز گردد [۷]. به منظور استخراج این ترکیبات مهم زیست فعال روشهای مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله میتوان به روشهای مرسوم استخراج باحلال و یا روشهای نوینی چون استخراج با آب زیر بحرانی اشاره نمود[۹].

هدف مطالعه پیش رو، بررسی اثر روشهای استخراج با حلال (SO[3]) و آب زیر بحرانی (SWE[4]) بر ویژگیهای آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی دارچین می‌باشد. بدین منظور عصاره های استخراج شده مورد بررسی های مختلف تعیین میزان کل ترکیبات فنولی و توکوفرولی، آزمونهای سه گانه تعیین قدرت ضداکسیداتیو به روش های مهار رادیکال آزاد DPPH، احیاء فریک FRAP[5] و رنگبری بتاکاروتن BCB[6] قرار گرفته اند و به منظور ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی آنها، آزمونهای کمی وکیفی تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برروی هر دو گونه باکتریایی گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس*) وگرم منفی (*اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا*) انجام گرفت که نتایج، بیان کننده قدرت بالای آنتی رادیکالی و ضدمیکروبی عصاره های مورد مطالعه در مقایسه با ترکیبات سنتزی و شیمایی میباشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- واکنشگرها و استانداردها

۱و۱-دیفنیل-۱-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH[7])، ۲و۲- بی پیریدین، تری کلرواستیک اسید (TCA[8])، واکنشگر فولین سیوکالتیو، کربنات سدیم، اسیدگالیک، ترتیاری بوتیل هیدروکسی کوئینون(TBHQ[9])، بافرفسفات، فریسیانیدپتاسیم، فریک کلراید، تولوئن، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، تووین و کلروفرم از شرکت سیگما-آمریکا خریداری گردیدند.پودر دارچین مورد استفاده، از مرکز طب سنتی ساری، مازندران، ایران تهیه گردید. میکروارگانیسمهای پاتوژن مورد مطالعه شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1431)، *باسیلوس سوبتیلیس*(PTCC1015)،

1. Butylatedhydroxianisole
2. Butylatedhydroxitoluene

3. Solvent Extraction
4. Subcritical Water Extraction
5. Ferric reducing antioxidant power
6. β- carotene bleaching assay
7. diphenyl-picrylhydrazyl
8. Trichloroacetic acid
9. Tertiary butylhydroquinone

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

اشرشیاکلی (PTCC1399) و *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC1310) بودند و از پژوهشکده ژنتیک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردیدند.

۲-۲- استخراج با حلال

۲۵ گرم از پودر دارچین آماده به نسبت ۱ به ۵ با حلال اتانول-آب ۵۰ ٪ مخلوط و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت روی همزن (fan azmagostar، ایران)با سرعت ۱٤۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از صاف کردن فاز بالایی، تبخیر حلال در آون (memmert، آلمان) با دمای ٤٥ درجه سانتیگراد انجام گرفت [۱۰].

۲-۳- استخراج با آب زیر بحرانی

استخراج با آب زیربحرانی دریک رآکتور استیل ضد زنگ ۸ میلی‌لیتری انجام گرفت. در هر دوره، پودر دارچین (۱ گرم)و آب مقطر (۵ میلی لیتر) به داخل رآکتور انتقال و دمای رآکتور تا ۲۲۰-۱۸۰ درجه سانتیگراد افزایشیافت و در پایان پس از غوطه ورکردن در حمام آب تا دمای محیط سرد گردید[۱۱]. لازم به ذکر است که هر دو عصاره پس از استخراج تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد و در ظروف پوشش داده شده با فویل آلومنیومی نگهداری گردید.

۲-٤- اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

پس از تهیه عصاره ها، نیم میلی لیتر از عصاره با غلظت ppm ۱۰۰۰ با ۲/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتیو ده بار رقیق شده و ۲ میلی لیتر از کربنات سدیم ۷/۵ ٪ مخلوط گردید و پس از ۱۵ دقیقه جذب آن در ۷٦۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (analytic Jena, spekol 2000، آلمان) قرائت گردید.مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده بر مبنای گالیک اسید و بصورت میلی گرم در میلی لیتر عصاره بیان گردید[۱۲].

۲-۵- اندازه گیری میزان توکوفرول کل

میزان ترکیبات توکوفرولی عصاره بر مبنای آلفا توکوفرول اندازه گیری گردید. در این آزمون ۱ میلی لیتر عصاره با غلظت ۱۰۰۰ppm با ۵ میلی لیترتولوئن، ۳/۵ محلول ۲-'۲-بی پیریدین (۰/۰۷ ٪ وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ ٪) و ۰/۵ میلی لیتر کلریدآهن III شش آبه(۰/۲ ٪ وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ ٪) مخلوط گردید و در پایان جذب نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیبات توکوفرولی بر اساس میلی گرم در میلی لیتر عصاره گزارش گردید[۱۳].

۲-٦- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

در این روش به ۰/۳ میلی لیتر از عصاره ها در غلظتهای مختلف به ۲/۷ میلی لیتر محلول DPPH(۵-٦۱۰)اضافه شد و به مدت ٦۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. پس از پایان زمان مذکور، جذب محلولها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با بلانک آب مقطر قرائت گردید. آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در این آزمایش بعنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت[۱٤].

درصد مهار کنندگی رادیکالی عصاره ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%I = \frac{A_B - A_S}{A_B} \times 100$$

(معادله ۱)

که در آن جذب نمونه کنترل و جذب نمونه یا استاندارد می‌باشد که پس از ٦۰ دقیقه اندازه گیری گردیده اند.

۲-۷- توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن FRAP

مقدار ۲/۵ میلی لیتر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر از محلول ۲۰ میلی مول بر لیتر بافر فسفات (pH =٦/٦) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید پتاسیم ۱ ٪ اضافه و انکوبه گذاری شد.سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ ٪ وزنی-حجمی به آن اضافه و سانتریفیوژ (hermle, Z200a، آلمان) گردید. در نهایت، مقادیر جذب نمونه ها در ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید(جذب بالاتر نشاندهنده قدرت احیای بیشتر است).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

محلول متانولی TBHQ به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۸- اندازه گیری میزان بتاکاروتن

محلول بتاکاروتن از طریق حل کردن ۵ میلی لیتر کلرو فرم تهیه و ۶۰۰ میکرولیتر از این محلول به ۴۰ میلی گرم اسید لینولئیک و ۳۰۰ میلی گرم توویـن ۴۰ اضافه گردید و پس از حذف کلروفرم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تحت خلاء آب مقطر به میزان ۱۰۰ میلی لیتر به بالن اضافه گردید. جذب نمونه ها بلافاصله پس از آماده سازی با استفاده از اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. جذب نمونه های باقیمانده در تاریکی به مدت۲۴ ساعت نیز پس از سپری شدن زمان مذکور در طول موجیکسان اندازه گیری گردیده و در پایان درصد فعالیت آنتی اکسیدانی آن با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%I = \left(1 - \frac{A_{ss}^{24} - A_{ss}^{0}}{A_{sc}^{24} - A_{c}^{0}}\right) \times 100$$

معادله (۲)

که در آن به ترتیب جذب عصاره د رزمان صفر و پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب جذب شاهد در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت می‌باشد[۱۲].

۲-۹- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[1]) و کشندگی (MBC[2])

هر یک از سویه های باکتریایی روز قبل از انجام تست MIC، MBC بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA) جهت قرار کرقتن در فاز لگاریتمی کشت سطحی شدند.

یک لوپ پر از هر سویه به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث (NB) جهت تهیه سوسپانسیون غلیظ میکروبی اضافه گردید و تا هنگام برابر شدن دانسیته نوری (OD) آن با محلول نیم مک فارلند توسط محیط کشت مایع (NB) رقیق شد.

در پلیت های میکروتیتر ۹۶ خانه ای، به ترتیب ابتدا ۲۰ میکرولیتر عصاره، ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت و در نهایت ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی در سه تکرار اضافه گردید. یک چاهک فاقد عصاره (حاوی باکتری و محیط کشت) به عنوان کنترل مثبت (کنترل رشد) و یک چاهک فاقد باکتری (حاوی محیط کشت و عصاره) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و جذب نمونه ها پس از اینکه پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر (awareness technology, stat fax 2100) قرائت گردید.

بر اساس اختلاف جذب نمونه ها در مقایسه با شاهد (باکتری و محیط کشت) میزان اثرگذاری عصاره بر نابودی میکروارگانیسم ها بررسی گردید. اولین خانه ای که در آن کدورتی مشاهده نشد بعنوان MIC تعیین گردید. از این چاهک ها ۵ میلی لیتر به پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار انتقال داده شده و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. غلظت هایی که فاقد رشد باکتری بودند به عنوان مقادیر حداقل غلظت کشندگی گزارش گردیدند [۱۵].

۲-۱۰ - تجزیه تحلیل آماری

در پژوهش حاضر از طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار جهت ارزیابی اثر روش استخراج بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره دارچین استفاده شد. بررسی اثر معنی داری با استفاده از آزمون *ANOVA* و سپس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از نرم افزار *SAS 9.3* انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیبات فنولی و توکوفرولی کل

مقدار ترکیبات فنول و توکوفرول کل عصاره دارچین در جدول ۱ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد، مقدار کل ترکیبات فنول عصاره استخراج شده به روش غرقابی از نظر آماری دارای اختلاف معنادار بوده (P<۰/۰۵) و از نظر مقداری

1. Minimum inhibitory concentration
2. Minimum bactericidal concentration

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

بسیار بیشتر از مقدار این ترکیبات در عصاره آب زیر بحرانی می‌باشد (به ترتیب ۱/۱۳ ، ۳۰/۳۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ۱/۱۳ ، ٦/٦۳ میلی گرم بر میلی لیتر).مطالعات متعددی نشان‌داده اند که استخراج با حلال پرکاربردترین روش مرسوم جهت جداسازی ترکیبات زیست فعال گیاهی می‌باشدکه هر دو محصول استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی به شدت وابسته به طبیعت حلال استخراج کننده، به دلیل تفاوت در قطبیت گیاهان می‌باشد[۱٦]. به گزارش دولت آبادی و همکاران (۱۳۹۳) بیشترین میزان استخراج به حلال اتانول ۵۰ ٪ نسبت داده شده است[۸] و همچنین ولینگیری و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه خود بر روی سبوس برنج، بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را در استفاده از حلال اتانول ٪۷۵ در ترکیب با آب گزارش نموده‌اند[۱۷]. به گزارش کالل و همکاران (۲۰۱٤) استفاده از حلال‌های قطبی به منظور استخراج ترکیبات پلی فنولی رایج می باشد که در این راستا، استفاده از آب در ترکیب حلال باعث افزایش قطبیت حلال و افزایش راندمان و کاهش زمان استخراج می‌گردد[۱٦]. این مقدار فنول در روش حلال در مقایسه با ترکیبات فنولی حاصل از مطالعه انجام شده توسط کالل و همکاران (۲۰۱٤) بر روی پوست سیر (۲۵ میلی‌گرم‌برمیلی لیتر) بیشتر بوده و تقریبا معادل مقدار ترکیبات فنولی حاصل از استخراج با حلال اتانولی *گیاه*نیلوفرپیچ[1](30.35±1.08 mg/ml) می‌باشد[۱٦و۱۸]. میزان ترکیبات حاصل از این مطالعه در مقایسه با مطالعه مشابه انجام شده توسط جمشیدی و همکاران (۱۳۹۱) بر روی دارچین کمتر بود (55.69±1.43 mg/ml)[۱۹]. در حالت کلی، نتایج این مطالعه نشان دادکه دارچین ماده ای با مقدار قابل توجهی از ترکیبات فنولی می‌باشد.

لازم به ذکر است که در انجام کلیه آزمایشات این پژوهش از عصاره در فرم مایعات استفاده شده و جهت تهیه آن از حلال استخراجی استفاده گردیده است.به عنوان مثال جهت تهیه عصاره ای با غلظت نهایی ppm ۱۰۰۰، ۱۰ میلی گرم عصاره خشک در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتر به حجم رسانده شده است.

در مقایسه با این روش، روش آب زیر بحرانی مقدار ترکیبات فنولی کمتری را از گیاه استخراج نمود که دلیل احتمالی این امر را می‌توان به تاثیر حرارت نسبتا بالای استفاده شده در این روش نسبت داد که این امر با نتیجه گزارش شده توسط ولینگیری و همکاران (۲۰۱۵) انجام شده بر روی سبوس برنج به روش سوکسله و استفاده از دمای ۷۰ درجه سانتیگراد مطابقت دارد[۱۷].

مقدار ترکیبات توکوفرولی در این مطالعه در عصاره آب زیر بحرانی بیشتر بوده (جدول۱) و از نظر آماری دارای اختلاف معناداری با عصاره غرقابی می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

۳-۲- قدرت آنتی اکسیدانی

از آنجاییکه یک روش به تنهایی قادر به بیان ظرفیت آنتی اکسیدانی نمی‌باشد[۲۰]، در این مطالعه که بر روی شش غلظت ppm ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ٤۰۰۰ و ۵۰۰۰ انجام شد، از سه روش اسپکتروفوتومتری مهار رادیکال آزاد DPPH، احیاءآهن FRAPورنگبری بتاکاروتن BCB[2] استفاده و نتایج با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQمقایسه گردید (جدول۲).

آزمون DPPH بطور گسترده ای برای شناسایی فعالیت بازدارندگی رادیکالهای آزاد عصاره‌های حاصل از گیاهان مختلف و ترکیبات خالص استفاده میشود[۱٦]. بررسی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره های غرقابی (SO) و آب زیر بحرانی (SWE) دارچین از نظر آماری دارای اختلاف معناداری بوده ($P<۰/۰۵$) و همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده، قدرت مهار رادیکال عصارهSO بیشتر از عصاره SWE می‌باشد.

1. *Merremiaborneensis*

2. Beta Carotene Bleaching

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

Table1 Comparisons of total phenolic and tocopherol compounds of SO and SWE extracts (mg/ml)

Extraction method	tocopherol	Phenol
Solvent	1.95 ± 0.5^{b}	30.35 ± 1.13^{a}
Subcritical water Extraction	2.86 ± 0.5^{a}	6.63 ± 1.13^{b}

Different letters indicate significant differences ($p<0.5$)

Table2 The free radical scavenging capacity of SO and SWE extracts (%)

Concentration (ppm)	Solvent	Subcritical water Extraction
500	36.85 ± 21.47^{Be}	61.76 ± 7.82^{Ae}
1000	44.96 ± 21.47^{Bd}	84.47 ± 7.82^{Aa}
2000	59.52 ± 21.47^{Bc}	81.82 ± 7.82^{Aab}
3000	82.44 ± 21.47^{Ab}	80.03 ± 7.82^{Bbc}
4000	93.78 ± 21.47^{Aa}	77.43 ± 7.82^{Bcd}
5000	81.27 ± 21.47^{Ab}	74.77 ± 7.82^{Bd}

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. ($p<0.5$)

بر اساس مطالعات بسیار زیاد انجام گرفته در این زمینه، آنتی اکسیدانها می‌توانند مقدار DPPH را در طی انتقال هیدروژن به فرم غیررادیکالی (DPPH-H) احیاکنند و منجر به کاهش جذب در ۵۱۵ نانومتر گردند که علت این کاهش جذب را میتوان به واکنش بین ترکیبات فیتوشیمیایی و DPPH نسبت داد که از نظر علمی نشان دهنده قدرت آنتی اکسیدانی می‌باشد[۱۷].

مطابق داده های ارائه شده در جدول۲، بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد به غلظت ppm ٤۰۰۰ عصاره غرقابی (SO) و ppm ۱۰۰۰ عصاره آب زیر بحرانی (SWE) اختصاص دارد. همانگونه که مشاهده می‌شود در اکثر موارد، افزایش غلظت بطور عمده افزایش قدرت مهار رادیکال را در پیداش ته و در حالت کلی هر دو عصاره در تمام غلظتهای مورد بررسی، فعالیت مهار رادیکال آزاد خوبی با درجات مختلف نشان دادندکه در مقایسه با نتایج کار ولینگیری و همکاران (۲۰۱۵) مقادیر بدست آمده بسیار بیشتر (۲٦٪) و نیز در برخی غلظت‌ها بیشتر یا برابر با نتایج کار سلمانیان و همکاران (۱۳۹۲) بر روی میوه ولیک (۹۳/٤۱–۱۷/۳۳ ٪) می‌باشد که این امر را می‌توان در رابطه با مقادیر بالای ترکیبات فنولی عصاره دارچین دانست[۱۷و۲۱].

مقایسه غلظتهای مشترک عصاره های مختلف نشان دادکه قدرت مهار عصاره SWE در غلظتهای پائینتر بیشتر از عصاره SO در همین غلظتها می‌باشد. در حالیکه غلظتهای بالاتر عصاره SO از نظر قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH دارای مقادیر بالاتر و اختلاف آماری معناداری می‌باشد($p<۰/۰۵$).

از جمله دیگر روشهای استفاده شده برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره ها، تعیین توان احیاءآهن است که در این روش توانایی عصاره ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده میشود[۲۲].

مطابق جدول۳، اختلاف معناداری از نظر آماری بین توان احیاء آهن عصاره های غرقابی (SO) و آب زیر بحرانی (SWE) و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ وجود داشت ($p<۰/۰۵$). توان احیاء آهن عصاره ها وابسته به غلظت نبود و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ و غلظتهایppm ۵۰۰ و ۱۰۰۰ عصاره SO، در مقایسه با غلظتهای دیگر همین عصاره و نیز کلیه غلظتهای عصاره SWE قدرت احیاء بالاتری از خود نشان دادند و اختلاف معناداری از نظر آماری بین آنها وجود داشت ($p<۰/۰۵$) ولی بین کلیه غلظتهای عصاره SWE با همه اختلاف آماری معناداری مشاهده نگردید که این امر با توجه به مقادیرکم ترکیبات فنولی() موجود در آن دور از انتظار نمی‌باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

Table 3 Iron (II) chelating activity of US and SFE extracts (%)

Subcritical water Extraction	Solvent	Concentration (ppm)
0.38±0.009^{Bb}	1.72±0.10^{Aa}	500
0.365±0.009^{Bb}	1.68± 0.10^{Aa}	1000
0.365±0.009^{Bb}	1.49± 0.10^{Aa}	2000
0.364±0.009^{Bb}	1.48± 0.10^{Aa}	3000
0.371± 0.009^{Bb}	1.49± 0.10^{Aa}	4000
0.37± 0.009^{Bb}	1.6± 0.10^{Aa}	5000
1.66± 0.009^{a}	1.66± 0.10^{Aa}	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (p<0.5)

همانگونه که مشاهده می‌گردد کلیه غلظتهای عصاره SO در مقایسه با غلظتهای مشابه عصاره SWE از نظر آماری دارای اختلاف معناداری بوده(p<۰/۰۵) و توان احیاء آهن عصاره SO درتمامی غلظتها بالاتر از غلظتهای مشابه عصاره SWE می‌باشد (جدول۳).

روشکار بتاکاروتن بر پایه رنگبری بتاکاروتن به دلیل واکنش آن با رادیکالهای تشکیل شده در طی اکسیداسیون لینولئیک اسید در امولسیون می‌باشد. سرعت رنگبری بتاکاروت نمی‌تواند در حضورآنتی اکسیدانها کاهش یابد[۲۳].

مطابق جدول٤، از این اصل در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره دارچین و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ استفاده گردیده است. ترتیب کاهش قدرت آنتی اکسیدانی بر اساس این جدول به ترتیب زیر می‌باشد:

SO> SWE> TBHQ

Table4βcarotene-linoleic acid bleaching activity of SO and SWE extracts (%)

Subcritical water Extraction	Solvent	Concentration (ppm)
95.82±6.26^{Aa}	88.7±10.18^{Bb}	500
84.83± 6.26^{Ab}	84.22± 10.18^{Ab}	1000
85.59± 6.26^{Bb}	96.06± 10.18^{a}	2000
81.42± 6.26^{Bbc}	82.78± 10.18^{Abc}	3000
78.95± 6.26^{Bc}	84.60± 10.18^{Ac}	4000
78.62± 6.26^{Ac}	62.75± 10.18^{Bbc}	5000
78.01± 6.26^{c}	78.01± 10.18^{c}	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (p<0.5)

نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره غرقابی (SO) در غلظت ppm ۲۰۰۰ و عصاره آب زیر بحرانی (SWE) در غلظت ppm ۵۰۰ از نظر قدرت رنگبری اختلاف معناداری بایکدیگر نداشتند و فعالیت آنتی اکسیدانی چشمگیری را نشان دادند و در حالت کلی قدرت رنگبری بتاکاروتن هر دو عصاره به استثنای غلظت ppm ۵۰۰ عصاره غرقابی در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی بیشتر بود و در غلظت‌هایppm ٤۰۰۰ و ۵۰۰۰ عصاره آب زیر بحرانی اختلاف آماری با TBHQ معنادار نبود (P<۰/۰۵).

با توجه به مطالعه ال-باروتی و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی دارچین انجام گرفته و نتایج قدرت رنگبری بتاکاروتن عصاره دارچین در آن (۸۲/۳ ٪)، در پژوهش پیشرو غلظت های ppm ۵۰۰۰ عصاره SO و غلظت‌های ۳۰۰۰، ٤۰۰۰ و ۵۰۰۰ عصاره SWE کمتر و در سایر غلظتهای هر دو روش بیشتر از این مقدار بود[۲۳].

همچنین در این‌مطالعه گزارش شده که BHT بعنوانیک آنتی اکسیدان سنتزی در مقایسه با عصاره گیاهی پونه کوهی، قدرت رنگبری بیشتری داشت که این نتیجه با آنچه در این مطالعه مشاهده گردیده همخوانی و مطابقت نداشت و آنتی اکسیدان سنتزی استفاده شده در این پژوهش قدرت ضعیف تری در مقایسه با عصاره گیاهی دارچین داشت.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

نتایج مقایسه غلظتهای مشابه دو عصاره نشاندهنده وجود اختلاف معنادار آماری بین دو روش بوده (P <۰/۰۵) و در حالت کلی عصاره SO در مقایسه با SWE قدرت رنگبری بالاتری از خود نشان داد.به استثنای غلظت ppm ۵۰۰ و ۵۰۰۰ که قدرت رنگبری عصاره SWE که قدرت رنگبری بالاتری در مقایسه با از عصاره SO از خود نشان داد و غلظت ppm ۱۰۰۰ که قدرت رنگبری هر دو عصاره در این غلظت فاقد اختلاف معنادار آماری می‌باشد(P <۰/۰۵). مطالعات متعددی نشان داده اند که هر چه میزان ترکیبات فنولی و توکوفرولی عصاره بیشتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی آن نیز بیشتر خواهد بود[۸و۲٤]. لذا، بر اساس این استدلال، ناچیز بودن فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آب زیربحرانی در مقایسه با عصاره غرقابی قابل توجیه می باشد.

۳-۳- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره دارچین از نظر کمی و کیفی با استفاده از آزمونهای تعیین حداقل غلظت بادارندگی و حداقل غلظت کشندگی نشان داد که تمامی عصاره ها فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری علیه باکتریها دارند (جدول۵).

Table 5 Antimicrobial (MIC, MBC) activity of the SO and SWE extracts.

Extraction (ppm)		Gram Reaction	Type
Subcritical water extraction	Solvent extraction		
500	500	+	*Staphylococcus aureus*PTCC1431
500	500	+	*Bacillus subtilis*PTCC1015
500	500	−	*Escherichia coli* PTCC1399
500	500	−	*Pseudomonas aeruginosa*PTCC1310

کلیه میکروارگانیسم های مورد بررسی در این آزمون در کمترین غلظت مورد استفاده از عصاره دارچین بازداری شده و لذا حداقل غلظت بازدارنده هر دو عصاره غرقابی (SO) و آب زیر بحرانی (SWE) برای تمامی میکروارگانیسم های مورد بررسی هر دو گونه باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی غلظت ppm ۵۰۰ تعیین گردید.

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد هر دو عصاره در غلظت ۵۰۰ppm اثر مهار کنندگی روی تمامی باکتری‌های مورد آزمون داشتند.

بر اساس گزارش کالل و همکاران(۲۰۱٤)، مکانیسم های مختلفی از جمله بازداری آنزیمهای برون سلولی میکروبی، بازداری رشد ازطریق حذف سوبستر اویا بازدارندگی اکسیداسیون فسفریلاسیون، دلایل اصلی توجیه فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات فنولی شناسایی گردیده اند.

به گزارشیوبین و همکاران اسانسهای گیاهی دارچین فعالیت ضدباکتریایی قوی علیه باکتریهای عامل فساد مواد غذایی و پاتوژن *اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده است[٤]. بررسی ویژگیهای ضد میکروبی عصاره حاصل از پوست سیر درمطالعه کالل و همکاران (۲۰۱٤) خاصیت ضد باکتریایی مناسبی علیه باکتریهای گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس تنجنسیس و باسیلوس سوبتیلیس* درمقایسه با گرم منفی ها نشانداده است[۱٦].

علاوه بر این خاصیت ضد میکروبی عصاره های دارچین توسط محققین متعددی گزارش گردیده است[٤و٦و۲۵و۲٦].

٤- نتیجه گیری کلی

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر عصاره دارچین استخراج شده با حلال و آب زیر بحرانی بر ویژگیهای ضد میکروبی و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

ضداکسایشی می‌باشدکه نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره دارچین قدرت آنتی اکسیدانی بالایی در مقایسه با آنتی‌اکسیدانهای سنتزی داشته و قاد ربه بازداری و مهار رشد باکتریهای پاتوژن مختلف در غلظت های استفاده شده می‌باشد که هر دو ویژگی مذکور مرتبط با میزان ترکیبات فنولی مناسب موجود دراین گیاه می‌باشد. میزان ترکیبات فنولی استحصالی در عصاره SWE کمتر از عصاره SO بود که دلیل احتمالی آن استفاده از حرارت در این روش و آسیب حرارتی ناشی از آن براین ترکیبات می‌باشد. لذا، بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، و با تاکید بر این اصل که تمایل مصرف کنندگان به پرهیز از مصرف محصولات با نگهدارنده های شیمیایی که با افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها همراه است رو به افزایش است، میتوان عصاره دارچین را بعنوان جایگزینی مناسب و ایمن برای آنتی اکسیدانهای سنتتیک و نگهدارنده‌های میکروبی شیمیایی در صنعت غذا معرفی نمود. لازم به ذکر می‌باشد که به منظور استفاده از عصاره مورد مطالعه در صنعت غذا در کارخانجات تولید محصولات غذایی، مطالعات بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

۵- منابع

[1] Ladikos, D., and Lougovois, V., 1990, Lipid oxidation in muscle foods. Food Chemistry. 35: 295-314.

[2] Moure, A., Cruzy, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., and Parajo, J. C., 2001, Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry. 72: 145-171.

[3] Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. Arouma, O. I., 1995, the characterization of antioxidants. Food Chemistry and Toxicology. 33: 601-617.

[4] Yunbin, Zh.,Xiaoyu, L., Yifei, W., Pingping, J., SiewYoung, Q., 2015, Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus, Food Control; 05.032.

[5] Vaibhavi, J., Rakesh, P., Pankaj, Kh.,Neeraj, P., Sunil, G., Anupriya, P., Sonu, Sh., 2010, Cinnamon: a pharmacological review. ScienSage Publication ISSN: 0976-9595.

[6] Fei LU., Yi-Cheng, D., Xing-qianYE., Yu-ting, D., 2011,Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil, Agricultural Sciences in China. 10 (9): 1482-1487.

[7] Herrero M, Plaza M, Cifuents A, and Ibanez E., 2012, Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food.

[8] Dolatabadi, M., RaftaniAmiri, Z., EsmaeilzadehKenari, R., 2014, Comparison of total phenols and antioxidant properties of walnut (Juglansregia L.) green husk of three regions of northern Iran (Shahrood, Bandar Gaz and Hzargarib), JFSt. No 45, Vol 11.

[9] HammiaKhaoula, M., Jdey, A., Abdelly, Ch., Majdoub, H., Ksouri, R., 2015, Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian Zizyphus lotus fruits using response surface Methodology. Food Chemistry 184 (2015) 80–89.

[10] AtayeSalehi, E., EsmaeilzadehKenari, R., NasiriTakami, T., 2013, Investigation the effect of pimppinellaaffinisledeb on canola oil during storage, Iranian Food Science and Technology Research Journal, No. 10, Vol 2: 176-181. (Persian)

[11] Garcia-Mendoza, M., Paula, J., Paviani, L., Cabral, F., Martinez-Correa, H., 2015, Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO_2 and pressurized solvent processes. LWT - Food Science and Technology. 1e7.

[12] Delfanian, M., EsmaeilzadehKenari, R., Sahari, M. A., 2015, Antioxidative effect of loquat (Eriobotrya japonica Lindl.) fruit skin extract in soybean oil, Food Science & Nutrition; (1): 74–80.

[13] Wong, M. L., Timms, R. E., Goh, E. M., 1988, Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin, JAOCS, 65 (2): 258-261.

[14] EsmaeilzadehKenari, Reza., Mohsenzadeh, F., RaftaniAmiri, Z., 2014, Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods, Food Science & Nutrition 2(4): 426–435.

[15] Wendlin, I., Gasser, R., Emil, R., 1997, A Macrodillution well method for Minimum Inhibitory Concentration and Minimum

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

Bactocidal Concentration Determination of Antimicrobials Borreliaburgdorferi in vitro, Journal of spirochetal and Tick-born Disease, Vol. 4, NO. 1/2.

[16] Kallel, F., Drissa, D., Chaaria, F., Belghitha, L., Bouaziza,Raoudha, F., Ghorbela, R., EllouzChaabouni, S., 2014, Garlic (Allium sativum L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties.Industrial Crops and Products 62: 34–41.

[17] Vellingiri, V., Pemiah, B., 2015, Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls, Food Bioscience.11: 85–91.

[18] Hossain, A., Shah, M., Dawood, M., 2011, A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant Merremiaborneensis, Arabian Journal of Chemistry.

[19] Jamshidi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., 2013, Effect of gamma irradiation on the antioxidant and antimicrobial activities of cinnamon powder, Iranian Jurnal of Nutrition Science & Food Technology, Vol: 17, No (4), pages: 73-82 (Persian).

[20] Gonzez-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rossell, C., Simal, S., 2014, Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (Vitisvinifera L.): Experimental kinetics and modeling, UltrasonicsSonochemistry.

[21] Salmanian, S., SadeghiMahoonak, A., Alami, M., Ghorbani, M., 2013, Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit (Crataeguselbursensis). Iranian Journal of Nutrition Science & Food Technology. 8(1): 177-185. (Persian)

[22] Lars, M., Kati, F., Bohm, V., 2011, Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay, Food Chemistry. 129:139–148.

[23] El-Baroty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S., Saleh, M. A., 2010, Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils, African Journal of Biochemistry Research Vol. 4(6), pp. 167-174.

[24] Saviz, A., EsmaeilzadehKenari, R., KhalilzadehKelagar, M.A., 2015, Investigation of Cultivate Zone and Ultrasound on Antioxidant, Activity of Fenugreek Leaf Extract, J. Appl. Environ. Biol. Sci., 4(11S) 174-181.

[25] Deans, S.G., Ritchie, G., 1987, Antibacterial properties of plant essential oils, International Journal of food Microbiology, 5: 165-180.

[26] Hilli, P., Evans, C.S., and Veness, R.G.,1997, Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil, Lettes in applied Microbiology. 24: 269-275.

[27] Tavakoli, J., HadadKhodaparast, H., EsmaeilzadehKenari, R., Amin Lari, M., Sharif, A., 2013, Investigation antioxidant power of P.khinjuk oil as a new food source in Iran, Iranian Food Science and Technology Research Journal Vol. 9, No. 1, p. 61-67. (Persian)

[28] Leal, P.F., Maia, N.B., Carmello, Q.A.C., Catharino, R.R., Eberlin, M.N., Angela,M., Meireles A., 2008, Sweet Basil (ocimumbasilicum) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): Global yields, Chemical composition, Antioxidant activity, and Estimation of the cost of Manufacturing. Food Bioprocess Technology, 1, 326-338.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]

Investigation the effect of antioxidant and antibacterial properties of cinnamon extract of solvent and subcritical water extraction

Sohrabpour, S. [1*], EsmaeilzadehKenari, R. [1], RaftaniAmiri, Z. [1]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Researchers University

(Received: 2018/08/19 Accepted:2019/01/29)

Essential of replacing natural compounds with synthetic ones has become more important. Participation of phenolic compounds in natural plant sources in antioxidant and antimicrobial activities caused to determine not only total phenolic and tocopherol compounds, but also antiradical capacity via three various methods such as free radical scavenging DPPH, ferric reducing power FRAP and beta carotene bleaching power of maceration (SO) and subcritical water extraction (SWE) methods of cinnamon extract further than antimicrobial properties of it on both gram negative and positive bacterium. Results proved various amounts with significant difference of total phenolic and tocopherol compounds of two various extraction methods. While SO-extract contained higher phenolic compounds, higher total tocopherol compounds were measured in SWE-extract. Results of all three antioxidant assays indicated that both extracts proved different antioxidant power comparing with TBHQ. The lowest concentration of SO-extract (500ppm) had a bactericide effect on all investigated bacterium in this work. Whereas, 500 ppm of SWE-extract was able to effect only *Staphylococcusaureus* as a gram positive bacteria, but not others.

Keywords: Maceration, Subcritical water extraction, Antimicrobial activity, Antioxidant activity

* Corresponding Author E-Mail Address:sepidesohrabpour@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-15]