

شناسایی ترکیبات شیمیایی و ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی شیره خرمالو وحشی (خرمندی)

مائه کلبادی نژاد¹، لیلا نجفیان^{1*}

1- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: 97/10/30 تاریخ پذیرش: 99/01/16)

چکیده

خرمالو وحشی (خرمندی) با نام علمی *Diospyros lotus* دارای ویژگی‌های سلامت بخش فراوانی است که این ویژگی‌ها عمدتاً به ترکیبات زیست فعال موجود در آن نسبت داده می‌شود. در مطالعه حاضر، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی شیره خرمالو وحشی مورد بررسی قرار گرفت و شناسایی ترکیبات عصاره به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) صورت پذیرفت. محتوای فنل تام و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. فعالیت ضد میکروبی بر روی چهار باکتری به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. نتایج حاصل از تحقیق نشان دهنده محتوای فنل بالای فنل تام و ترکیبات فلاونوئیدی در شیره خرمالوی وحشی بوده است. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی شیره خرمالوی وحشی نیز نشان دهنده ویژگی بالای آنتی‌اکسیدانی آن بوده است. میزان مهار تشکیل رادیکال DPPH توسط شیره خرمالوی وحشی در غلظتهای 100، 200، 400، 800 و 50 میلی‌گرم/لیتر از DPPH به ترتیب برابر با 82/0%، 61/53%، 53/51%، 32/52% و 18/31% بوده است. خواص ضد میکروبی شیره خرمالوی وحشی به ویژه در رقت‌های بالا نظیر 50 و 100 اثرات مهارکننده گی‌بالایی بر روی رشد سویه‌های مختلف از جمله اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس ارتوس و باسیلوس سرئوس داشت. نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی نشان داد که شیره خرمالو وحشی حاوی مقادیر بالایی از قند و اجزای عملکردی مانند گروه اپوکسی متانو تری متیل (17/77%)، فوران کربوکسی آلدئید (17/01%) و متیل ایندول (11/02%) می‌باشد که در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن موثر می‌باشند.

کلید واژگان: شیره خرمالوی وحشی، آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS)

* مسئول مکاتبات: najafian_5828@yahoo.com

1- مقدمه

این گیاه بومی آسیای جنوب غربی و اروپای شرقی می باشد و متعلق به خانواده *Ebanaceae* می باشد که در گویش مازندرانی به آن خرمندی یا اره می گویند [9]. دیوسپیروس لوتوس در ایران بومی جنگل های شمال کشور است و از قسمت های ساحلی دریای خزر تا ارتفاع 1100 متر از سطح دریا و از آستارا تا رامیان گرگان دیده می شود. خرمالو وحشی دارای ویژگی های سلامت بخش فراوانی است که این ویژگی ها عمدتاً به ترکیبات زیست فعال موجود در آن نسبت داده می شود. شیره خرمالو وحشی، حاوی ترکیبات فنولی و دارای خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی بوده و همچنین به عنوان یک شیرین کننده طبیعی با ارزش تغذیه ای بالا مطرح می باشد [10 و 11] به همین دلیل می تواند در صنایع غذایی کاربرد زیادی داشته باشد. با توجه به اهمیت میوه ها با اثرات دارویی به خصوص میوه های بومی کشورمان در این تحقیق بر آن شدیم که اجزاء تشکیل دهنده و خصوصیات مهم کاربردی شیره خرمالوی وحشی (ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی) را مورد بررسی قرار دهیم، تا بدین طریق هم امکان استفاده از یک منبع سهل الوصول و مقرون به صرفه فراهم شده، از هدر رفتن محصول و خسارتهای ناشی از آن جلوگیری و در نهایت گامی جهت اعتالی بهداشت و ایمنی غذایی جامعه برداشته شود.

2- مواد و روش ها

میوه خرمندی در اردیبهشت ماه 1396 از مناطق هزار جریب شهرستان بهشهر تهیه و بعد از شستشوی میوه ها، آنها را در دیگ پخت از جنس مس در فشار اتمسفر و دمای 100 درجه سانتی گراد قرار داده و تا نرم شدن کامل و استخراج کامل مواد قندی و اسیدی تحت حرارت و همزدن مداوم قرار داده، سپس توسط پارچه صافی در چندین مرحله مواد نامحلول و معلق را حذف کرده و محلول صاف شده درون دیگ پخت تا رسیدن به غلظت و قوام مورد نظر حرارت دادیم و از شیره بدست آمده جهت انجام آزمایشات استفاده کردیم. مواد شیمیایی مورد استفاده همگی با بالاترین خلوص از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

1-2- آنالیز عصاره با GC-MS

به منظور ارزیابی و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره

امروزه تحقیقات بسیاری در مورد جایگزین کردن مواد شیمیایی و سنتزی با مواد طبیعی به منظور حذف یا کاهش این ترکیبات در مواد غذایی انجام شده است. عصاره های گیاهی و ترکیبات آنها به عنوان متابولیک های ثانویه گیاهان می باشند و خاصیت ضد باکتریایی آنها مدت هاست که شناخته شده و کاربردهای زیادی به عنوان طعم دهنده و نگهدارنده در صنایع غذایی و دارویی دارند [1]. این مسئله به همراه عوارض جانبی بعضی از آنتی بیوتیکها موجب گردیده است که محققین و دانشمندان همواره به دنبال آنتی بیوتیکهای جدید با اثرات جانبی کمتر باشند. به همین دلیل منابع طبیعی به خصوص گیاهان دارویی دارای اسرار بیشماری است و کشف هریک از اسرار، گامی در جهت درمان و ریشه کن کردن بیماریهاست و از جایگاه خاصی برخوردار است [2 و 3]. علاوه بر این به منظور حفظ کیفیت مواد غذایی و افزایش طول عمر نگهداری آنها از آنتی اکسیدانها استفاده می شود. ضد اکسایش ها ترکیباتی مؤثرند که میتوانند از اکسایش ماکرو مولکولهایی مانند پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها جلوگیری کنند [4]. این عمل با مهار مرحله ی گسترش یا شروع واکنشهای زنجیرهای اکسایش یا تولید رادیکالهای آزاد انجام می پذیرد. امروزه از آنتی اکسیدانهای سنتتیک در صنعت غذا به طور گستردهای استفاده شده ولی بی خطر بودن آنها مورد سؤال میباشد [5]. اسانسها و عصاره های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و عوامل حذف کننده رادیکال های آزاد از توان بسیار بالایی جهت به کارگیری شان به عنوان ترکیبات نگهدارنده طبیعی جدید در محافظت غذاهای خام و فرآوری شده بر خوردار می باشند [6]. کاربرد آنتی اکسیدانهای طبیعی مشتق از منابع گیاهی و میوه ها توجه زیادی را به خود جلب نموده و در پیشگیری از ابتلاء به تعداد زیادی از بیماریها حائز اهمیت باشند، تعدادی از ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی به عنوان فرآورده های ثانویه توسط گیاهان ساخته میشود که از جمله آنها میتوان به ترکیبات فنلی اشاره نمود [7 و 8].

خرمالوی وحشی با نام علمی *Diospyros lotus* درختی است خزان شونده که تا ارتفاع 19 متر و گستردگی 6 متر رشد می کند.

حل شد. سپس 0/1 میلی لیتر آلومینیوم کلراید 10% به آن اضافه شد، سپس 0/1 میلی لیتر از محلول پتاسیم استات 1 مولار و در نهایت 2/8 میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج 415 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی-ماوراءبنفش اندازه گیری شد. کوئرسیستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی گرم کوئرسیستین در گرم شیره» گزارش گردید. آزمایشات 3 بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش شد.

$$Y = 0.358 X - 0.464 \quad (R^2 = 0.868)$$

2-4- ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از DPPH با روش میلیاسکاس و همکاران (2004) با اندکی تغییر انجام گرفت. محلول هایی با غلظت های مختلف (100 - 200 - 400 - 800 پی پی ام در متانول) از عصاره آماده گردید [14]. به 1 میلی لیتر از نمونه 1 میلی لیتر محلول 0/1 میلی مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت 15 دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در 517 نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. از BHA (بوتیل هیدروکسی آنیزول) به عنوان استاندارد استفاده گردید و در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$(3) \quad 100 \times \text{جذب DPPH} - \text{جذب نمونه} = \text{درصد مهار رادیکال آزاد}$$

جذب DPPH

2-5- بررسی فعالیت آنتی باکتریال شیره خرمالو جنگلی (خرمندی)

میکروارگانسیم های مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: اشیشیاکلی (PTCC:1330)، سالمونلا تیفی موریوم (PTCC:1709)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC:25923) و باسیلوس سرئوس (PTCC:1015) که از مرکز تحقیقات و

خرمالوی وحشی و میزان غلظت این ترکیبات، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی استفاده شد. در این مطالعه دستگاه گاز کروماتوگراف از نوع 5973--69870 Hewlett-Pakard، با ستون مویینه از نوع MS-5HP به طول 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی متر و ضخامت لایه داخلی 0/25 میکرومتر، با برنامه دمایی ستون در ابتدا 60 درجه سانتی گراد با توقف 4 دقیقه ای در این دما، سپس افزایش دما تا 100 درجه سانتی گراد با سرعت 3 درجه در هر دقیقه با توقف 2 دقیقه ای، سپس افزایش دمای ستون تا 225 درجه سانتی گراد با سرعت 4 درجه در دقیقه، استفاده شد. دمای اتاق تزریق 270 درجه سانتی گراد بود و گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان 1 میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف سنج جرمی مورد استفاده مدل 5975 C، با انرژی یونیزاسیون 70 الکترون بود.

2-2- تعیین محتوای فنل کل

محتوای فنول کل با معرف فولین سیوکالیتو¹ بر اساس روش مک دونالد و همکاران (2001) انجام شد [12]. 0/5 میلی لیتر از شیره 0/1 % با 2/5 میلی لیتر واکنشگر 0/2 نرمال فولین سیو کالیتو مخلوط شد و به مدت 5 دقیقه هم زده شد. سپس 2 میلی لیتر محلول کربنات سدیم 7/5 درصد اضافه شد. جذب نمونه ها پس از 2 ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در 760 نانومتر اندازه گیری شد. نتایج بصورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد. به این صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی شیره بر اساس میزان معادل «میلی گرم گالیک اسید در گرم شیره» گزارش شد.

$$Y = 0.485 X - 0.558 \quad (R^2 = 0.870)$$

2-3- تعیین فلاونوئید کل

میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش های رنگ سنجی ارزیابی شد [13]. غلظت 1 میلی گرم / میلی لیتر از هر شیره تهیه شد. 0/5 میلی لیتر از نمونه در 1/5 میلی لیتر متانول

1. Folin-Ciocalteu's

پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شدند.

2-6- تهیه سوسپانسیون میکروبی 0/5 مک‌فارلند:

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی 0/5 مک‌فارلند، برای هر سری آزمایش، نیاز به کشت تازه 24 ساعته از میکروب مورد نظر است. 24 ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت آگار شیب دار مغذی تلقیح انجام می‌دهیم و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری می‌شود. پس از رشد کشت مربوطه کلونی‌های سطح آن با محلول نرمال سالین 0/9 درصد شسته می‌شود و سوسپانسیون غلیظی از میکروب حاصل می‌گردد. مقدار کمی از این سوسپانسیون داخل لوله‌های در پیچ دار استریل ریخته شد و سپس با افزودن محلول نرمال سالین سوسپانسیون غلیظ تا حدی رقیق می‌گردد که در مقایسه با محلول استاندارد 0/5 مک‌فارلند، میزان جذب (کدورت) سوسپانسیون در طول موج 530 نانومتر اسپکتروفوتومتر با میزان جذب محلول 0/5 مک‌فارلند برابر می‌گردد و به این ترتیب سوسپانسیون با غلظت تقریبی $1/5 \times 10^8$ cfu/ml بدست می‌آید که از آن در تلقیح استفاده می‌شود سپس با انجام محاسبات لازم مشخص می‌گردد که برای رسیدن به غلظت نهایی میکروب مورد نظر به چند میلی‌لیتر سوسپانسیون نیاز است.

2-7- تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت 24 ساعته از هر باکتری می‌باشد. لذا 24 ساعت قبل از انجام آزمایش از هر باکتری مقداری از کشت ذخیره هر کدام از باکتری‌ها به طور جداگانه به محیط کشت BHI آگار تلقیح و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. جهت بدست آوردن سوسپانسیون‌های یکنواخت و همگن از معیار کدورت سنجی استاندارد نیم مک‌فارلند استفاده شد. مقداری از باکتری تازه کشت داده شده را درون لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی ریخته، پس از شیکر نمودن کدورت حاصله با کدورت نیم مک‌فارلند مقایسه شد. سوسپانسیون تهیه شده با کدورت معادل نیم مک‌فارلند برای باکتری شاخص اش‌ریشیاکلی، سالمونلا تیفی-موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس حدود 10^8 سلول بود (CLSI, 2012).

2-8- آزمون هاله عدم رشد به روش دیسک

دیفوزیون

در روش دیسک دیفیوژن به دیسک‌های بلانک استریل مقدار 300 میکرولیتر از رقت‌های 12/5، 25، 50 و 100 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره مورد نظر اضافه شد تا عصاره‌ها کاملاً جذب دیسک‌ها شدند، سپس این دیسک‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و خشک شدند. از کشت 24 ساعته هریک از باکتری‌های آماده شده سوسپانسیون میکروبی معادل 0/5 مک‌فارلند تهیه و به وسیله سوپ بر سطح کشت مولر هیتون آگار کشت یکنواختی تهیه شد. دیسک‌های حاوی عصاره بر سطح آگار قرار داده و پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شدند.

2-9- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از جدول تجزیه واریانس در قالب طرح فاکتوریل و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح معناداری 5 درصد، با استفاده از نرم‌افزار (version SPSS 22) انجام شد و کلیه نتایج ارائه شده بر اساس میانگین 3 تکرار ارائه شده است. کلیه جداول و نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

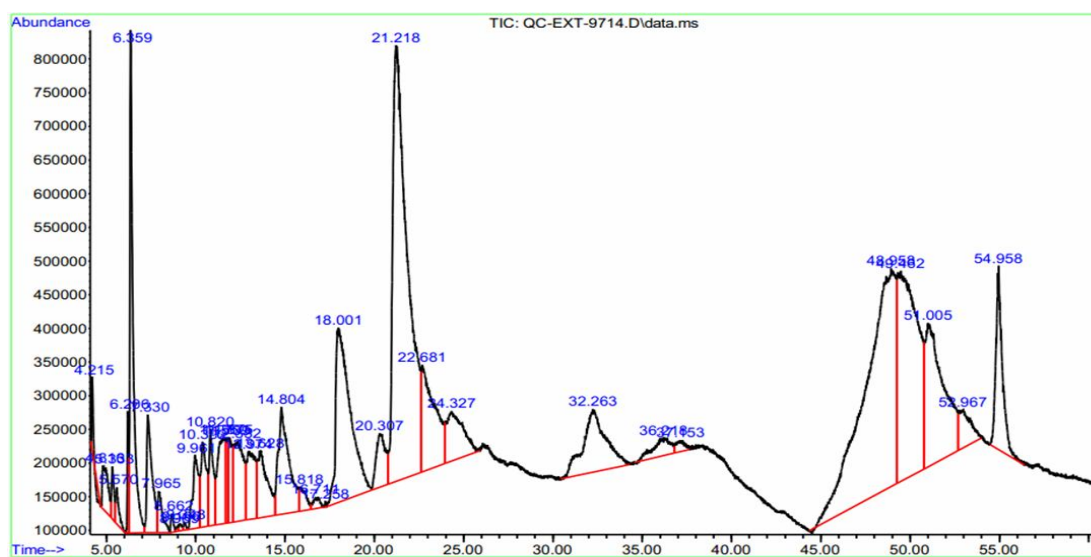
3- نتایج و بحث

3-1- ترکیبات شیمیایی شیره خرمالو وحشی

نتیجه حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی شیره خرمالو در جدول 1 نشان داده شده است. بررسی طیف‌های GC و GC/MS و محاسبه زمان نگهداری، شاخص بازدارندگی و مقایسه طیف‌های جرمی ترکیب‌ها یا ترکیبات استاندارد در مجموع 38 ترکیب شیمیایی را در شیره خرمالو وحشی نشان داد که بیشترین آن به ترتیب مربوط به ترکیبات گروه اپوکسی متانو تری متیل (17/77 درصد)، فوران کربوکسی آلذئید (17/01 درصد) و متیل ایندول (11/02 درصد) بود.

Table 1 Major chemical compositions of date plum extract (%)

No	Compound date plum	%	Retention time (RT)
1	5,5-Epoxy-methano-2,2,6-trimethyl-7	17.77	48.95
2	2-Furancarboxaldehyde	17.01	21.2
3	1-allyl-3-methylindole-2-carbaldeh	11.02	49.46
4	(E)-3,13-Tetradecadien-2-one	6.95	51
5	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- -4H-pyran-4-one	6.7	18
6	2-Furancarboxaldehyde	4.2	6.35
7	Furancarboxaldehyde	3.77	22.68
8	Tetrahydropyrazolo	3.75	32.26
9	Cedran-diol	3.11	54.95
10	Methylparabanicacid	2.99	14.80
11	Butanoicacid,	2.14	24.32
12	2-Propanol	2.09	12.33
13	Dihydroxyacetone	1.77	11.55
14	1-Propanol	1.74	13.63
15	2-Furanmethanol	1.65	7.32
16	Butyl alcohol	1.58	12.97
17	Nonane	1.3	20.30
18	Ethanethioic acid	1.27	10.39
19	2-Ethylacridine	1.18	52.96
20	Ethanethioic	1.14	9.96
21	Diacetamide	1.05	10.82

**Fig 1** GC-MS chromatogram of Date Plum (*Diospyros Lotus*) extract

هگزانال (22/1%)، نونان (12/8%)، لیمونن (6/9%)، فیتول (8/4%)، 1-هگزانول (3/8%)، 2- فوران کربوکسی آلدئید (3/5%) بدست آمد [19]. آزمایشات نشان داد که روغن اسانس این گیاه دارای فعالیت آنتی میکروبی خوبی در برابر تمام میکروارگانیسم های آزمایش شده بود.

2-3 - میزان محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی

شیره خرمالو وحشی

میانگین میزان محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی عصاره شیره خرمالو وحشی در جدول 2 نشان داده شده است. بررسی مقدار فنول در شیره خرمالوی وحشی از اهمیت بالایی برخوردار است چراکه بر ویژگی های آنتی اکسیدانی این شیره تاثیر می گذارد. ترکیبات فنلی، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنده و ان متابولیت های ثانویه را تشکیل می دهند که در پاسخ به استرس های محیطی ایجاد می شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه های هیدروکسیل، توانایی خنثی سازی رادیکال های آزاد را داشته و می توانند به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل نمایند [20]. در این پژوهش مقدار محتوای تام فنلی برابر با $199/73 \pm 0/12$ میلی گرم اسید گالیک در گرم بدست آمد. قربانلی و همکاران (1390)، محتوی فنلی عصاره متانولی و اتانولی میوه از گیل را به ترتیب 167/37 و 157/37 میلی گرم گالیک اسید در 100 گرم عصاره گزارش نمودند [21] که به مراتب از شیره خرمالوی وحشی کمتر بود.

محتوای تام فلاونوئیدی عصاره شیره خرمالو وحشی برابر با $14/1 \pm 0/17$ میلی گرم کوئرستین در گرم بود. سلمانیان و همکاران 2014 مقدار تام ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از میوه ولیک در طی مدت زمان 18 ساعت و در دمای استخراج 50 درجه سانتیگراد را اندازه گیری کردند و میزان آن به ترتیب $0/09 \pm 14/2$ میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره بود [22]. میزان محتوای تام فنل کل و فلاونوئیدها در این مطالعه می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در عصاره ی تهیه شده از شیره خرمالوی وحشی را توجیه نماید.

بررسی طیف های GC/MS و GC و محاسبه زمان نگهداری، شاخص بازدارندگی و مقایسه طیف های جرمی ترکیب ها یا ترکیبات در شیره خرمالوی وحشی نشان داد که بیشترین آنها به ترتیب مربوط به ترکیبات گروه اپوکسی متانو تری متیل (17/77%)، فوران کربوکسی آلدئید (17/01%) و متیل ایندول (11/02%) می باشد. فوران ها شامل گروه های کربوکسیل هستند که می تواند باعث فعالیت های آنتی اکسیدانی شود و مشتقات فوران می توانند فعالیت های آنتی اکسیدانی بالارا بوسیله حذف رادیکال های آزاد DPPH سبب شوند [15]. فوران کربوکسی آلدئید (17/01) علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی می باشد، فورفورال به عنوان ایجاد کننده عطر و طعم در غذاها و همچنین در محصولات دیگر مانند محصولات آرایشی، میکروپ کش ها و آفت کش ها مورد استفاده قرار می گیرد [16]. بر اساس تحقیقات کریمی و همکاران، 2017 فوران کربوکسی آلدئید دارای پتانسیل خاصی از فعالیت های آنتی اکسیدانی و به عنوان یک منبع ضد باکتریایی می تواند به عنوان محافظت کننده های بیولوژیک در صنایع غذایی و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد [17]. متیل ایندول (11/02) دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد. ایندول ها قوی ترین ترکیبات موجود در گیاهان و سبزیجات هستند که به طور گسترده ای بر روی سرطان و سایر اختلالات موثر هستند. این ترکیب در گیاهان چلیپایی به عنوان خاصیت ضد اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد آتروژن شناخته شده است که به طور مستقیم بر روی سلول های سرطانی یا فعالیت سلول های ایمن که حمله گر به سلول های غیر طبیعی هستند اثر می گذارد. سدران دیول (3/11) از دیگر ترکیبات موجود در این شیره که دارای خاصیت ضد قارچی، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی می باشد و همچنین جز ترکیبات آروماتیک است [18]. از دیگر ترکیبات موجود در شیره خرمالو وحشی، دی هیدروکسی استون (1/77) است. ژین و همکاران (2015) به مطالعه و تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی اسانس *pyrosia tonkinensis* توسط دستگاه GC-MASS پرداختند. ترکیبات اصلی بدست آمده از آن

Table 2 Total phenols and flavonoids contents of date plum syrup

Total phenol (mg GA/g)	Total Flavonoid (mg QE/g)
199.73 ± 0.12	14.1 ± 0.17

Values are means ± standard deviations

3-3- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره شیره خرمالوی وحشی و نمونه استاندارد BHA در شکل 2 قابل مشاهده می‌باشد. با توجه به نتایج موجود در شکل 2 می‌توان بیان کرد با افزایش غلظت شیره خرمالو وحشی همانند آنتی اکسیدان

سنتزی BHA میزان مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت شیره خرمالو وحشی روند افزایشی داشت و از نظر آماری شاخص درصد مهار رادیکال آزاد دارای تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$).

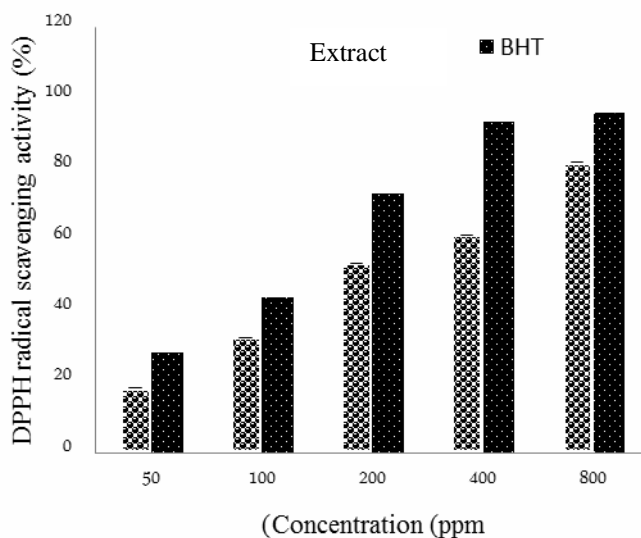


Fig 2 DPPH radical scavenging activity of date plum extract and BHT at different concentrations

مورد استفاده قرار می‌گیرد [26]. نتایج حاصل از بررسی خواص آنتی اکسیدانی شیره خرمالوی وحشی نیز دال بر خاصیت بالای آنتی اکسیدانی آن بوده است. میزان مهار تشکیل رادیکال DPPH توسط شیره خرمالو وحشی در غلظتهای 100، 200، 400، 800 و 50 میلی گرم/لیتر از DPPH به ترتیب برابر با 82/0، 61/53، 53/51، 32/52 و 18/31% بوده است. به طوریکه با افزایش غلظت شیره، خواص آنتی اکسیدانی آن افزایش یافت. اگرچه درصد مهار DPPH توسط نمونه استاندارد BHA به طور معنی داری بیشتر از عصاره شیره خرمالوجنگلی بوده است، با این حال شیره خرمالو جنگلی خواص آنتی اکسیدانی خوبی نشان داد. شارما و همکاران (2014) به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره گیاه تاتوره از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH پرداختند. آنها اعلام نمودند تمامی غلظت های عصاره تاتوره دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با افزایش غلظت عصاره، افزایش یافت [27].

آنتی اکسیدانی‌هایی که مهارکننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند یکی از مهم‌ترین انواع آنتی اکسیدان هستند که بررسی ظرفیت آن‌ها موضوع بسیاری از تحقیقات و بحث‌های علمی می‌باشد. آنتی اکسیدان‌های مهاری از طریق مهار رادیکال آزاد قبل از حمله به مولکول‌های ضروری بدن عمل می‌نمایند به این طریق که یا اتم هیدروژن اهدا می‌کند و یا الکترون را انتقال می‌دهد. محصولات این واکنش ترکیبات پایدار و رادیکال استخراج شده از آنتی اکسیدان می‌باشد [23،24]. مهار رادیکال آزاد یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌هایی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی اکسیدان می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار کنند. اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتی اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه‌گیری است [25]. رادیکال DPPH شباه کمی به رادیکال پراکسی دارد اما به دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولاً این روش برای بررسی مقدار آنتی اکسیدان در پوسته ترکیبات گیاهی و یا دانه‌های روغنی

بود. در تمامی غلظت های شیره خرمالو وحشی کمترین اثر ضد بازدارندگی بر باکتری باسیلوس سرئوس و بیشترین اثر بر باکتری سالمونلا تایفی موریوم بود. همچنین استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف از نظر آماری سبب ایجاد تفاوت معنی داری در بین باکتری های مورد بررسی شد. همچنین می توان بیان کرد که به جز آنتی بیوتیک آمپی سیلین که بر باکتری های اشریشیاکلی و سالمونلا تایفی موریوم دارای اثر ضد میکروبی نداشت، سایر آنتی بیوتیک ها دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری های مورد آزمون داشتند. با توجه به نتایج موجود در جدول 3، آنتی بیوتیک آمپی سیلین بیشترین اثر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله 39 میلی متر داشت. همچنین باکتری های اشریشیاکلی و سالمونلا تایفی موریوم دارای بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک جنتامایسین را بترتیب با میزان 19 و 23 میلی متر داشتند. براساس روش دیسک دیفوزن باکتری های گرم منفی به شیره خرمالوی وحشی نسبت به باکتری های گرم مثبت حساس تر بودند در حالیکه نتایج برای تاثیر آنتی بیوتیک ها عکس بوده است به طوری که باکتری های گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس حساسیت بیشتری نسبت به باکتری های گرم منفی نشان دادند.

3-4- اثر ضد میکروبی شیره خرمالو وحشی بر

باکتری ها

در شکل 3 و شکل 4 و جدول 3 اثر ضد میکروبی درصدهای مختلف شیره خرمالو وحشی بر 4 گونه باکتری، همچنین اثر انواع آنتی بیوتیک ها بر 4 گونه باکتری و اثر مقایسه ای انواع آنتی بیوتیک ها و درصدهای مختلف شیره خرمالو وحشی بر 4 گونه باکتری به ترتیب مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اشکال 3 و 4 می توان بیان کرد که از نظر آماری شیره خرمالو وحشی در غلظت های مختلف سبب ایجاد اثرات معنی داری بر میزان قطر هاله ضد میکروبی شده است ($p < 0/05$). همانگونه که قابل ملاحظه است با افزایش غلظت شیره خرمالو وحشی اثر ضد میکروبی آن نیز به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. با توجه به نتایج می توان بیان کرد نمونه شیره خرمالو وحشی 12/5 میلی گرم در میلی لیتر در بین نمونه های حاوی شیره خرمالو وحشی دارای کمترین اثر ضد میکروبی بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس با میزان 6 میلی متر و نمونه حاوی 100 میلی گرم در میلی لیتر شیره خرمالو وحشی با میزان 28 میلی متر در بین نمونه های حاوی شیره خرمالو وحشی دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بر باکتری سالمونلا تایفی موریوم

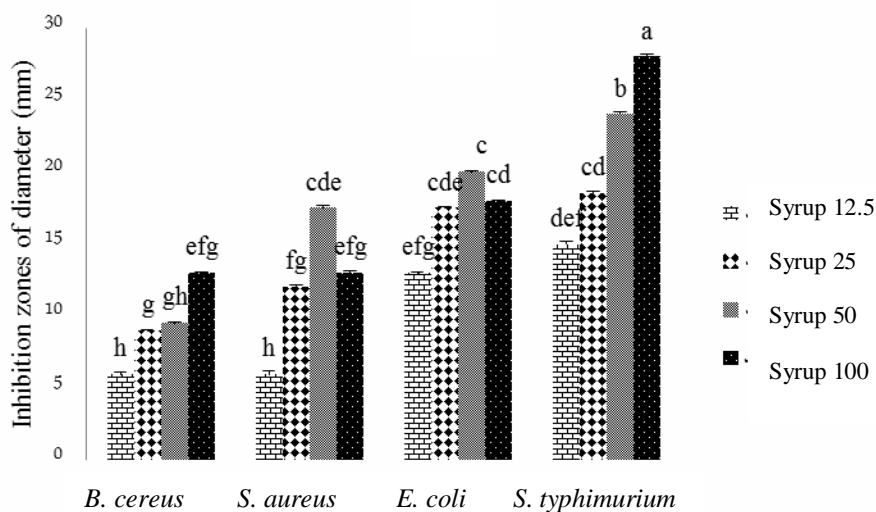


Fig 3 Antimicrobial activity of date plum syrup at different concentrations on *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium*
Different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

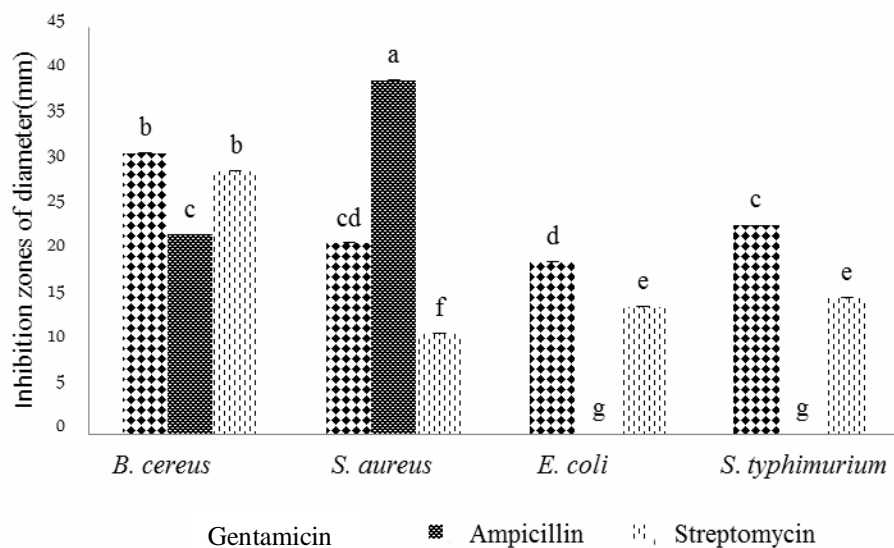


Fig 4 Antimicrobial activity of some of antibiotics on *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium*. Different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

Table 3 Inhibition zones diameter (mm) for tested bacteria with date plum syrup at different concentrations and some of antibiotics

Antibiotic	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
Gentamicin	31±0.2 ^b	19±0.1 ^{defg}	21±0.2 ^{def}	23±0.2 ^{cd}
Ampicillin	22±0.1 ^{cde}	0±0.01	39±0.2 ^a	0±0.0 ^l
Streptomycin	29±0.2 ^b	14±0.2 ⁱ	11±0.1 ^{ij}	15±0.1 ^{ghi}
Syrup 12.5	6±0.1 ^k	13±0.2 ^{ij}	6±0.1 ^k	15±0.2 ^{ghi}
Syrup 25	11±0.2 ^{ij}	17.5±0.2 ^{fgh}	12±0.2 ^{ij}	18.5±0.2 ^{fgh}
Syrup 50	9.5±0.1 ^j	20±0.2 ^{def}	17.5±0.2 ^{fgh}	25±0.2 ^c
Syrup 100	13±0.2 ^{ij}	18±0.2 ^{efgh}	13±0.1 ^{ij}	28±0.2 ^b

Values are reported as the mean ± SD, experiments were performed in triplicate. Different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

مؤثر در ایجاد اختلاف نتایج در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها می‌باشند [29]. فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به اثبات رسیده است. تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل فاکتور کلیدی در فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی به شمار می‌آید. با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل، فعالیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد. فعالیت‌های ضد میکروبی فلاونوئیدها در نتیجه توانایی تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد و بنابراین از این طریق از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کنند. ترکیبات فنولی از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا برهم‌کنش‌های غیراختصاصی با پروتئین‌ها، از فعالیت آنزیمی جلوگیری به عمل آورده و بدین ترتیب فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند [30]. در این

عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی می‌توانند عملکردهای مختلفی را در مقابل سویه‌های باکتریایی از خود نشان دهند که از آن جمله می‌توان به تداخل با غشای فسفولیپیدی دولایه‌ای سلول اشاره کرد که به دنبال آن نفوذپذیری غشاء افزایش و مواد درون‌سلولی کاهش می‌یابد. از سایر مکانیسم‌ها می‌توان به آسیب به آنزیم‌های دخیل در تولید انرژی و ترکیبات ساختاری سلول و نیز غیرفعال کردن ترکیبات ژنتیکی اشاره کرد [28]. مقایسه نتایج حاصل از مطالعات مختلف پیچیده به نظر می‌رسد؛ چراکه نتایج با فاکتورهایی نظیر دما، زمان گرمخانه‌گذاری، pH محیط و نوع محیط کشت، فاز رشد میکروارگانیسم و حجم محیط کشت مورد استفاده تحت تأثیر قرار می‌گیرد. همچنین، ترکیب شیمیایی، نوع و مکانیسم عمل ترکیبات فنولی هر یک از عصاره‌ها از عوامل

5- منابع

- [1] Palmer, A. S., Stewart, J. and Fyfe, F. 2002. The Potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese, *Journal of Food Microbiology*, 1:463-470.
- [2] Golab ghale, N. 1997. Effect of garlic Essential Oils in *Salmonella Typhimurium*. [Research project]. Razi vaccine & serum institute [in Persia].
- [3] Taleb, H., Maddocks, S. E., Keith Morris, R. and Kanekanian, A. D. 2016. The Antibacterial Activity of Date Syrup Polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7:1-8.
- [4] Parker, T. D., Adams, D. A., Zhou, K., Harris, M. and Yu, L. 2003. Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils, *Journal of Food Science*, 68(4):1240-1243.
- [5] Mahmoudi, R., Ehsani, A. and Zare, P. 2012. Phytochemical, antibacterial and antioxidant properties of *Cuminum Cuminum L.* essential oil, *Journal of Food Science Research*, 22(3): 312-321 [In Persia].
- [6] Bahiense J, et al. 2017. Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*, *Pharmaceutical Biology*, 55:991-7.
- [7] Muret, K., Sevgi, K., Sengul, K., Esra, U., Cemalettin, B. and Fedra, V. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia, *Food Chemistry*, 100: 534-526.
- [8] Cheraghali, F., Mirmoghtadaie, L., Shojae-Aliabadi, S. and Hosseini, S. M. 2016. A Comparative Study of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Walnut Green Husk Aqueous Extract before and after Microencapsulation, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 11(2): 113-124 [In Persia].
- [9] Raftani Amiri, S., Mirarab Razi, S., Amirabadi, S., Rezaei Erami, S., Mohammadi, T. and Fathollahi, E. 2017. Production and Optimizing Formulation of Medlar Sauce by the Application of Persimmon Juice as a Sweetener Using Response Surface Methodology, *Journal of Food Science and Nutrition*, 14(55): 5-14.

تحقیق حضور ترکیباتی نظیر فوران کربوکسی آلدئید و سدران دیول در شیر خرمالوی وحشی می تواند دلیلی برای ویژگی های ضد میکروبی این ماده گردد. رانوسی و همکاران (1389) شناسایی و اندازه گیری ترکیبات موجود در اسانس برگ لیموترش توسط طیف سنج کروماتوگرافی گازی و بررسی فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی آن را مورد بررسی قرار دادند. آنان بیان کردند در این پژوهش که اسانس برگ لیموترش به دلیل داشتن ترکیباتی نظیر لیمونن دارای فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی می باشد [31]. سرمیری و همکاران (1395) تأثیر عصاره گیاهان دارویی (سیر، موسیر، لیمو، شیرین بیان و تلخ بیان) بر روی باکتریهای بیماریزای (*اشرشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس*) تکمیل شده با مدلینگ مولکولی عوامل قوی ضد باکتریایی را مورد مطالعه قرار دادند [32]. آنان در پژوهش خود بیان کردند که لیمو به دلیل داشتن ترکیبات فنولی دارای اثر ضد میکروبی قابل توجه است. پیر محله و همکاران (1396) به بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره ترکیبات گیاهی (آویشن، دارچین، لیمو و پرتقال) روی عامل بیماری *سالمونلا پاراتیفوئیدی* پرداختند [33]. آنان در پژوهش خود بیان کردند که ترکیبات گیاهی نظیر لیمو به دلیل داشتن ترکیبات آنتی اکسیدان و ضد باکتریایی و ترکیبات فنولیک دارای خاصیت ضد میکروبی می باشند.

4- نتیجه گیری نهایی

در یک نتیجه گیری کلی می توان بیان نمود که شیر خرمالوی وحشی دارای قابلیت ضد باکتریایی مناسبی در شرایط *In vitro* بر روی سویه های گرم مثبت و منفی مورد مطالعه بود و غلظت های مختلف شیر خرمالوی وحشی، ویژگی های آنتی اکسیدانی خوبی را نشان داد. واضح است که تنها یک روش نمی تواند پیش بینی جامعی از تأثیر تمام پارامترهای درگیر در خصوصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی ارائه دهد. بنابراین می طلبد که با روش دیگر نیز این بخش از مطالعه حاضر انجام گردد تا تفاوت های احتمالی بین روش های متفاوت آشکار گردد و همچنین در مدل های غذایی و *In vivo* اقدام به بررسی اثر شیر خرمالوی وحشی از نقطه نظر قدرت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی و ویژگی های عملکردی شود.

- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 8(6): 977-996.
- [19] Xin, X. Liu, Q. Zhang, Y. and Gao, D. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Pyrrhosia tonkinensis* (Giesenhagen) Ching, Natural Product Research, 30(7):853-6.
- [20] Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. Journal of Food Chemistry, 105(1): 57-64.
- [21] Ghorbanli, M., Livani, F., Sateei, A. 1388. Antioxidant activity and phenolic compounds from medlar (*Mespilus germanica L.*) fruit. Journal of investigation and application of medical plants, 2(2): 31- 43.
- [22] Salmanian, S. H, Sadeghi Mahoonak, A. R., Alami, M, Ghorbani, M. Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid, Anthocyanin Compounds, Antibacterial and Antioxidant Activity of Hawthorn (*Crataegus Elbursensis*) Fruit Acetonic Extract. 2014. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 13(1): 53-66. [Farsi]
- [23] Niki, E. 2010. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology and Medicine 49: 503-515.
- [24] Huang, W. Y., Majumder, K. and Wu, J. 2010. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. Food Chemistry, 123: 635-641.
- [25] Prevec, T., Šegatin, N., PoklarUlrih, N. and Cigić, B. 2013. DPPH assay of vegetable oils & model antioxidants in protic and aprotic solvents. Talanta, 109: 13-19.
- [26] Chen, Z., Bertin, R. and Froidi, G. 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH_ assay using several statistical programs. Food Chemistry, 138: 414-420.
- [27] Sharma, S., Alfatah, M., Bari, V. K., Rawal, Y., Paul, S., Ganesan, K. 2014. Sphingolipid biosynthetic pathway genes FEN1 and SUR4 modulate amphotericin B resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(4):2409-14.
- [28] Kotzekidou, P., Giannakidis, P. and Boulamatsis, A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against
- [10] Azarhoosh, K. H., Sharifi, A. and Estiri, S. H. 2017. Effect of Sugar Replacement with Date Plum (*Diospyros Lotus*) Syrup on Antioxidant Activity, Phenolic Compounds and Sensory Properties of Functional Cookies, Journal of Food Science and Technology, 1(31): 115-123.
- [11] Gao. H., Cheng, N., Zhou, J., Wang, B., Deng, J. and Gao, W. 2014. Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (*Diospyros Lotus L*) Fruits, Journal of Food science and Technology, 51(5):950-6.
- [12] Mc Donald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M. and Robards, K. 2001. Phenolic Content and Antioxidant activity of olive Extracts. Food Chemistry, 73: 73-84.
- [13] Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food Drug Analysis, 10: 178-182.
- [14] Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Vanbeek, T.A. 2004 Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry 85: 231-237.
- [15] Mohammed, S. A., Khan, J. A. 2013. Antioxidant capacity of chewing stick miswak salvadora persica. Bio Med Central Biochemistry Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Kingdom of Saudi Arabia.
- [16] Oskoueian, E., Abdullah, N., Ahmad, S., Saad, W. S., Omar, A. R. and Wan Ho, Y. 2011. Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas L.* Kernel Meal Extract. International Journal of Molecular Sciences. 12 (9): 5955-5970.
- [17] Karimi, E., Mehrabanjoubani, P. Homayouni-Tabrizi, M. Abdolzadeh, A. Soltani, M. 2017. Phytochemical evaluation, antioxidant properties and antibacterial activity of Iranian medicinal herb *Galanthus transcaucasicus* Fomin. Food Measurement and characterization, 12 (1): 433-440.
- [18] Mohammed, G. H. J., Omran, A. M. and Hussein, H. M. 2016. Antibacterial and Phytochemical Analysis of Piper nigrum using Gas Chromatography – Mass Spectrum and

- [32] Sarmiri, S., Chehri, Kh., Karimi, N., Karimi, E. 2016. Effect of Medicinal Herbs Extract (Garlic, Muscat, Lemon, liquorice root and sophora) on pathogenic bacteria (*Escherichia coli* and *Bacillus cereus*): Complexed by molecular modeling of strong antibacterial agents. Thesis, Razi university, Faculty of Science.
- [33] Pirmahalleh Rahimi, S. F. 2017. Evaluation of Antimicrobial effects of plant compounds (thyme, cinnamon, lemon and orange) on the cause of *paratyphoidal salmonella* isolated from beef. Thesis, Tabriz university, Faculty of Veterinary Medicine.
- foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT-Food Science and Technology*. 41: 119–127.
- [29] Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., and Toivonen, P. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 56: 305–311.
- [30] Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review*. 12: 564-582.
- [31] Pasha Zanousi, M. B., M. Raeesi, M. and Mirkazemi Moghadam, S. S. 2011. Identification and determination of components of Citrus limon essential oil by GC-MS spectrophotometry and study of its antibacterial and antioxidant activity. 5th National Conference on New Ideas in Agriculture, February 16-17.

Identification of Chemical Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Date Plum (*Diospyros Lotus*) Syrup

Kolbadi Nejad, M. ¹, Najafian, L. ^{1*}

1. Department of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

(Received: 2019/01/20 Accepted: 2020/04/04)

Date Plum (*Diospyros Lotus*) has high health-promoting properties which they are mainly attributed to its available bioactive compounds. In present study, antioxidant and antibacterial properties of the date plum syrup was investigated and the extract compounds identified by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of the extracts were measured. Antimicrobial activity was performed on four bacteria by disc diffusion method. The research results indicated high total phenolic and flavonoid contents of the date plum extracts. Surveying antioxidant properties of date plum extract also implicate its high antioxidant properties. DPPH radical scavenging activity of date plum extract at concentrations of 800, 400, 200, 100 and 50 micrograms/milliliter has been 82% , 61.53%, 53.51%, 32.52%, 18.31%, respectively. In investigation of antibacterial properties, the date plum syrup had high inhibiting effects on growth of different types such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in high dilutions (50 and 100 mg/ml).. The date plum extract includes high amounts of sugar and functional components such as 5,5-Epoxy-methano-2,2,6-trimethyl-7-oxabicyclo (17/77%), 2-Furancarboxaldehyde (17/01%) and 1-allyl-3-methylindole-2-carbaldehyde (11/2%).

Keywords: Date plum (*Diospyros Lotus*), Antioxidant, Antimicrobial, Identification.

* Corresponding Author E-Mail Address: najafian_5828@yahoo.com