



بررسی شرایط استخراج عصاره هسته زیتون با استفاده از دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک و ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی آن‌ها

عباس نمدی‌پور^۱، حبیب‌الله میرزایی^{۲*}، محمدعلی سحری^۳، منصوره هوشیار^۴

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- *دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس.

۴- دانش آموخته دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۱

کلمات کلیدی:

عصاره هسته زیتون،

ترکیبات فنلی،

خصوصیات ضد میکروبی،

GC-MS

DOI:10.22034/FSCT.22.162.1.

* مسئول مکاتبات:

mirzaei Habib1@gmail.com

هدف از مطالعه حاضر بررسی شرایط استخراج عصاره هسته زیتون با استفاده از دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک و بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بود. طبق نتایج، عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی می‌باشد. نوع حلال و مدت زمان استخراج، دارای تاثیر معنی‌داری ($P < 0.05$)، روی مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌های هسته زیتون می‌باشد. همچنین، تیمارهای استخراج شده با حلال (آب) ۰: اتانول (۱۰۰) در هر سه زمان (۱، ۲ و ۳ دقیقه) و سپس تیمارهای استخراج شده با حلال اتانول ۸۰: آب ۲۰ در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بودند؛ و به عنوان تیمارهای منتخب جهت انجام آزمون‌های میکروبی، انتخاب شدند. در ارتباط با خصوصیات ضد میکروبی، طبق نتایج بدست آمده از آزمون انتشار چاهک، هر سه عصاره اتانولی، دارای خصوصیات ضد میکروبی بودند. از سوی دیگر، در آزمون اندازه‌گیری چگالی نوری که جهت انتخاب تیمار بهینه صورت گرفت، نتایج نشان داد که عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای بالاترین خاصیت ضد میکروبی می‌باشد؛ در نتیجه این عصاره به عنوان بهترین تیمار انتخاب و ترکیبات فنلی آن بوسیله دستگاه GC-MS اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که، بیشترین درصد فراوانی ترکیب فنلی در این عصاره مربوط به هیدروکسی تایروزول و تایروزول می‌باشد.

۱-مقدمه

استفاده زیاد از افزودنی‌های ضد میکروبی شیمیایی مانند سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم، سبب ایجاد مشکلات متعدد در سلامت مصرف کنندگان از جمله مسمومیت، اثرات منفی در سلول‌های کبدی، کلیوی و مغزی و در موارد حادتر سرطان، می‌شود؛ به همین دلیل در سالیان اخیر، تقاضا برای استفاده از مواد طبیعی و بیولوژیک، به‌عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است [1]. از دیگر معایب مواد شیمیایی، می‌توان به محدود بودن، گرانقیمت بودن و همچنین ایجاد مقاومت دارویی در مصرف کنندگان اشاره کرد [2]. از سوی دیگر، عصاره‌ها گیاهی نسبت به مواد شیمیایی، به دلیلی دارا بودن منشا طبیعی، سازش بیشتری با بدن انسان دارند. عدم وجود عوارض جانبی، ارزان بودن و در دسترس بودن از دیگر مزایای استفاده از عصاره‌های گیاهی بجای مواد شیمیایی می‌باشد [3]. در میزان اثر نگهدارنده‌های طبیعی، نوع و مقدار ترکیبات فنلی بسیار مهم می‌باشد. در مطالعات مختلف، مقادیر متفاوتی برای میزان ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال‌های مختلف ارائه گردیده است. این مقادیر مختلف استخراج، به نوع گیاه و منطقه‌ای که در آن کشت شده و شرایط استخراج بستگی دارد [4]. زیتون^۲ با نام علمی *Olea europaea* به خانواده *Oleaceae* تعلق دارد. میوه زیتون به علت داشتن روغن بسیار با کیفیت و مرغوب، یکی از پرفایده‌ترین میوه‌های مناطق نیمه گرمسیری می‌باشند [5]. ایران با تولید سالانه ۸۵ هزار تن در رتبه ۲۰ دنیا قرار دارد [6]. به دلیل کاربردهای عمده زیتون از جمله تهیه روغن و کنسرو میوه زیتون، در سالیان اخیر توجه زیادی به کاشت و پرورش آن شده است. ضایعات مواد غذایی که در طول تولید، پخش و مصرف مواد غذایی تولید می‌شوند، دارای ویژگی‌های

تغذیه‌ای زیادی بوده؛ که دفع آن‌ها از یک سو باعث هدر رفت مواد مغذی و از سوی دیگر هزینه بر می‌باشد. دفع ضایعات همچنین دارای اثرات مخربی روی محیط زیست می‌باشند. به‌همین دلیل صنعت غذا به دنبال راهکاری برای کاهش این ضایعات غذایی و همچنین استفاده مطلوب از محصولات فرعی بدست آماده در طی زنجیره تولید می‌باشد [7]. ابوالفتح و همکاران (۲۰۲۴) به بررسی متغیرهای مختلف بر خواص ضد باکتریایی برگ زیتون پرداختند. نتایج نشان داد که عصاره‌ی برگ زیتون دارای اثرات معنی داری روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد [8]. تولید میزان زیاد هسته زیتون به‌عنوان ضایعات در صنایع فرآوری زیتون، و با توجه به رشد این صنایع در سالیان اخیر، سبب شده است که راهکارهایی با هدف استفاده بهینه از این ضایعات در صنایع غذایی و دارویی ایجاد شود. هسته زیتون یک ساختار لیگنوسلولزی است که از سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل شده است. هسته زیتون حاوی پروتئین و پلی فنل‌های زیادی مانند تایروزول، هیدروکسی تایروزول، اولئوروپین می‌باشد [9]. هسته زیتون که ۲۲-۱۸ درصد از وزن زیتون را شامل می‌شود؛ منبع بسیار غنی از ترکیبات مفید و ارزشمند می‌باشد [10]. هسته زیتون حاوی مواد معدنی زیادی مانند منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سیلیس و گوگرد زیادی می‌باشد. علاوه بر این، وفور ترکیبات فنلی در هسته زیتون سبب شده است که این محصول فرعی صنایع غذایی، به‌عنوان یک ماده‌ی دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی شناخته شود [11]. ماستری و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی ترکیبات هسته زیتون پرداختند. این محققین بیان کردند که هسته زیتون حاوی فیبر رژیمی، لیپید و پروتئین به ترتیب ۴۷، ۳۰ و ۱۷ درصد بر مبنای وزن خشک می‌باشند.

این محققین همچنین میزان ترکیبات فنلی درون عصاره هسته زیتون را ۲۸۰ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک بر حسب گالیک اسید گزارش کردند [12]. تاکنون براساس اطلاعات موجود از آنجایی که، تحقیقی در زمینه بهینه سازی استخراج عصاره هسته زیتون با روش سوند هموژنایزر صورت نگرفته است؛ لذا در این تحقیق سعی شد که ابتدا، پودرهای هسته زیتون (واريته شنگه) بوسیله ی ۵ سیستم حلال (شامل ۲ سیستم حلال تک جزیی آب و اتانول و ۳ سیستم حلال دو جزیی آب ۵۰ : اتانول ۵۰، آب ۲۰ : اتانول ۸۰ و آب ۸۰ : اتانول ۲۰) در سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه بوسیله ی دستگاه سوند هموژنایزر با توان ۱۰۰ وات (نیم ثانیه روشن و نیم ثانیه خاموش) مورد عصاره گیری قرار گیرد. در ادامه، عصاره های حاصل توسط کاغذ واتمن شماره ۴ فیلتر و میزان ترکیبات فنلی آن ها ارزیابی گردید. در مرحله بعد، ۵ نمونه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی انتخاب و خصوصیات ضد میکروبی آن ها بررسی شد. در پایان عصاره دارای بالاترین خاصیت ضد میکروبی به عنوان نمونه بهینه انتخاب و ترکیبات فنلی آن بوسیله دستگاه GC-MS اندازه گیری گردید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ مواد و دستگاه ها

هسته زیتون (واريته شنگه)، از کارخانه اسپینو واقع در اطراف تهران، سوش های میکروبی از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی، اتانول، فولین سیوکالته و کربنات سدیم، از شرکت سیگما و محیط کشت های پوتیتیو دکستروز آگار و مولر هینتون آگار از شرکت مرک تهیه شدند.

۲-۲ روش ها

۲-۲-۱ بهینه سازی استخراج عصاره هسته زیتون:

هسته های زیتون پس از شستشو، ابتدا در شرایط طبیعی و با استفاده از محیط مناسب و سپس به منظور رسیدن به حد مطلوب خشک شدن (۱۰ درصد) در آون ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت خشک و در ادامه توسط آسیاب صنعتی، آسیاب شد. پودرها تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر با دمای منفی ۱۸- قرار داده شد. جهت استخراج عصاره ها، برای هر تیمار ۵ گرم پودر هسته با ۱۰۰ میلی لیتر از حلال ها (۲ سیستم حلال تک جزیی آب و اتانول و ۳ سیستم حلال دو جزیی آب ۵۰ : اتانول ۵۰، آب ۲۰ : اتانول ۸۰ و آب ۲۰ : اتانول ۸۰) را درون بشر ریخته و توسط دستگاه سوند با توان ۱۰۰ در سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه (نیم ثانیه روشن، نیم ثانیه خاموش) عصاره گیری صورت پذیرفت. در ادامه، عصاره های حاصل با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف و تا انجام آزمایشات بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند [13].

۲-۲-۲ اندازه گیری ترکیبات فنلی کل عصاره ها:

اندازه گیری ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره ها بر اساس روش فولین سیوکالته (کاپنسی و همکاران، ۲۰۰۰) انجام گردید [14]. بر اساس این روش، ابتدا ۱ میلی لیتر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالته که به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دو بار تقطیر رقیق شده، ترکیب گردید. پس از گذشت ۸ دقیقه، ۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن افزوده و به حجم ۵۰ میلی لیتر با آب مقطر رسانده شد. ترکیب حاصله به مدت ۰/۵ ساعت در تاریکی قرار داده شد و جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. فنل کل، با توجه به معادله ی خط بدست آمده از نمودار استاندارد، بر حسب گالیک اسید گزارش گردید:

$$A=0/0011C+0/0196, R^2=0$$

A جذب نمونه در ۷۶۰ نانومتر و C غلظت معادل اسید گالیک (میکروگرم بر میلی لیتر) می باشد.

۲-۲-۳- ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی نمونه های منتخب:

جهت بررسی خصوصیات ضد میکروبی (آسپیریلوس نایجر PTCC ۵۲۹۸ و اشیریشیا کلی ۱۳۹۹ PTCC) از روش Fasihi و همکاران (۲۰۱۷) با کمی تغییرات استفاده گردید [15]. در هر دو مورد، از سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (هر ۱ سی سی معادل نیم مک فارلند، $10^8 \times 1/5$ سلول باکتری وجود دارد) و از روش انتشار چاهک استفاده گردید. در ارتباط با خصوصیات ضد قارچی، پس از ریختن محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار^۳ در پلیت استریل و کشت سطحی کپک آسپیریلوس نایجر، ۳ عدد چاهک به قطر ۵ میلی متر در هر پلیت ایجاد و عصاره به میزان ۵۰ میکرولیتر درون آن ها ریخته و گرمخانه گذاری (۲۵ درجه سلسیوس) انجام شد. اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک ها، نشان دهنده خصوصیات ضد قارچی عصاره ها بود. در ارتباط با خصوصیات ضد باکتریایی، پس از ریختن محیط کشت مولر هیتون آگار^۴ در پلیت استریل و کشت سطحی باکتری اشیریشیا کلی، ۳ عدد چاهک به قطر ۵ میلی متر در هر پلیت ایجاد و عصاره به میزان ۵۰ میکرولیتر درون آن ها ریخته و گرمخانه گذاری (۳۷ درجه سلسیوس) انجام شد. اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک ها، نشان دهنده خصوصیات ضد باکتریایی عصاره ها بود. در ادامه و جهت اطمینان کامل از صحت انجام کار، از الگوی رشد باکتری در محیط مایع با استفاده از جذب نوری بر اساس روش حبیبی و همکاران

(۱۳۹۷) با کمی تغییرات استفاده گردید [16]. به این صورت که میزان ۱۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیزم ها به محیط کشت لوریا براث (LB^۵) حاوی عصاره (۹ سی سی محیط کشت و ۱ سی سی عصاره)، اضافه و رشد میکروارگانیزم در سه روز متوالی در دماهای (۳۷ درجه سلسیوس برای باکتری و ۲۵ درجه سلسیوس برای کپک) بوسیله بررسی میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ارزیابی گردید.

۲-۲-۴- شناسایی پروفایل عصاره بهینه:

از دستگاه GC-MS برای شناسایی ترکیبات عصاره بهینه استفاده شد. طول، قطر و ضخامت لایه داخلی ستون استفاده شده به ترتیب، ۳۰ متر، ۰/۲۵ میلی متر و ۲۵ میکرومتر بود. نوع ستون HP-5MS با برنامه دمایی ۲۷۰-۴۰ درجه سلسیوس با سرعت افزایش دمای ۱۰ درجه سانتیگراد در دقیقه بود. گاز هلیوم، نقش گاز حامل با نرخ جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه را داشت. شناسایی ترکیبات فنلی عصاره، بوسیله ی مقایسه طیف سنج جرمی و اندیس بازداری آن ها به ترتیب با بانک طیفی و اندیس بازداری استاندارد ترکیبات صورت پذیرفت. میزان ترکیبات از طریق سطح کل پیک ها بوسیله نرم افزار دستگاه انجام گرفت [17].

۲-۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز داده ها از طرح کاملاً تصادفی و جهت تعیین اختلاف بین میانگین داده ها پس از آنالیز واریانس ها با روش ANOVA، از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد

5 -Luria Broth

3 -Potato Dextrose Agar

4 -Mueller Hinton Agar

استفاده شد. آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار آماری *SPSS* انجام گرفت. برای رسم گراف ها و نمودارها از نرم افزار *Excel* استفاده و تمامی آزمون ها در ۳ تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ ارزیابی مقدار کل ترکیبات فنلی هسته زیتون استخراج شده بوسیله حلال های مختلف:

مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره های استخراج شده بوسیله ی حلال های مختلف در جدول ۱ آمده است. همان طور که

مشاهده می شود، نوع حلال و مدت زمان استخراج، دارای تاثیر معنی داری ($P < 0.05$)، در مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره های هسته زیتون دارد. به عبارت دیگر، با افزایش زمان استخراج، در تمام تیمارها، یک روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فنلی مشاهده گردید؛ که در اکثر موارد، این روند معنی دار ($P < 0.05$) بود. در ارتباط با تاثیر نوع حلال، طبق نتایج بدست آمده، تیمارهای استخراج شده با حلال (آب: اتانول ۱۰۰) در هر سه زمان و سپس تیمارهای استخراج شده با حلال اتانول ۸۰: آب ۲۰ در زمان های ۲ و ۳ دقیقه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بودند؛ و به عنوان تیمارهای منتخب، انتخاب شدند.

Table 1: Comparison of the average amount of phenolic compounds of extracts extracted with different solvents (mg of gallic acid per 100 grams of dry matter)

run	Time (m)	Solvent type	The amount of phenolic compounds
1	1	Ethanol 0: water 100	^{Hb} 4.11 ± 261.72
2	2	Ethanol 0: water 100	^{Hb} 3.21 ± 263.14
3	3	Ethanol 0: water 100	^{Ga} 1.42 ± 270.12
4	1	Ethanol 20: water 80	^{Hb} 2.36 ± 263.43
5	2	Ethanol 20: water 80	^{Hb} 2.19 ± 265.16
6	3	Ethanol 20: water 80	^{Fa} 6.87 ± 279.22
7	1	Ethanol 50: water 50	^{Gb} 1.83 ± 269.12
8	2	Ethanol 50: water 50	^{Gb} 3.23 ± 271.61
9	3	Ethanol 50: water 50	^{Fa} 2.12 ± 284.23
10	1	Ethanol 80: water 20	^{Fc} 4.22 ± 281.16
11	2	Ethanol 80: water 20	^{Eb} 3.11 ± 290.35
12	3	Ethanol 80: water 20	^{Da} 2.43 ± 303.77
13	1	Ethanol 100: water 0	^{Cc} 2.13 ± 341.91
14	2	Ethanol 100: water 0	^{Bb} 3.22 ± 352.02
15	3	Ethanol 100: water 0	^{Aa} 4.12 ± 384.34

Capital dissimilar letters indicate significant differences between all samples and small dissimilar letters indicate significant differences in each of the samples at different extraction times ($p < 0.05$).

می‌توان به تفاوت در دامنه قطبیت پلی فنل‌ها نسبت داد؛ به همین دلیل انتخاب حلال مطلوب جهت استخراج ترکیبات فنلی، امری می‌باشد [20].

۳-۲ نتایج ارزیابی‌های میکروبی نمونه‌های منتخب:

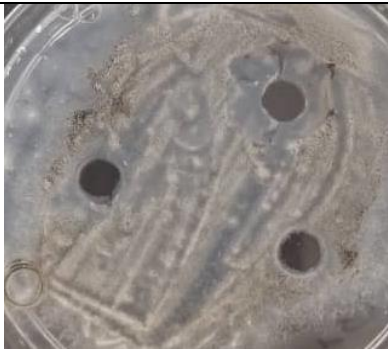
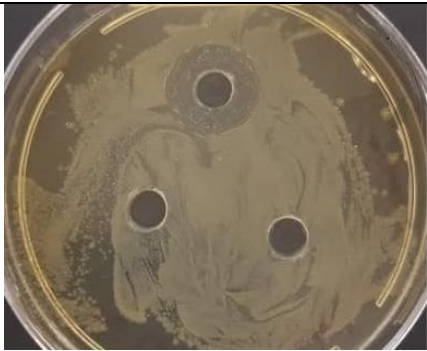
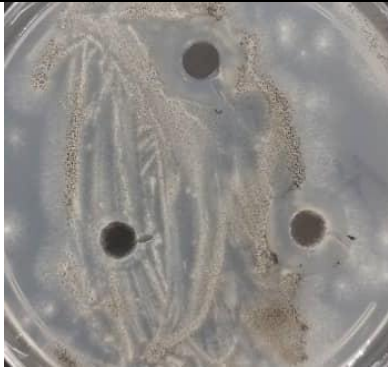
جدول ۲ و شکل‌های ۱ و ۲، نشان دهنده‌ی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های منتخب از مراحل قبل (عصاره‌های استخراج شده با حلال اتانولی در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه و همچنین عصاره‌های استخراج شده با حلالی هیدروالکی اتانول ۸۰:۲۰ آب، در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه) می‌باشند. طبق نتایج بدست آمده از آزمون انتشار چاهک، سه عصاره استخراج شده با حلال اتانولی با زمان استخراج ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیات ضد میکروبی بودند. لازم به ذکر است که نمونه‌های هیدروالکی خصوصیت ضد میکروبی ناچیزی از خود نشان دادند. از سوی دیگر، در آزمون جذب نوری که جهت کسب اطمینان از نتایج حاصل از آزمون انتشار چاهک و انتخاب تیمار بهینه (از بین عصاره‌های دارای خصوصیت ضد میکروبی در آزمون انتشار چاهک یعنی عصاره‌های اتانولی استخراج شده در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه) انجام گرفت، نتایج نشان داد که عصاره‌های اتانولی استخراج شده در هر سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی بودند. نتایج حاکی از آن بود که عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای خصوصیات ضد میکروبی بالاتری نسبت به سایر نمونه‌ها بود؛ لذا به‌عنوان تیمار بهینه جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب گردید. مارکین و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌ی آبی برگ زیتون بیان کردند که، این عصاره دارای قدرت مهارکنندگی در برابر

به دلیل ماهیت شیمیایی متفاوت ترکیبات فنلی با منشا گیاهی، این ترکیبات را می‌توان به روش‌های متفاوت و با حلال‌های مختلف استخراج کرد. از جمله عوامل تاثیر گذار در استخراج ترکیبات فنلی، نوع، حجم و اشباعیت حلال، درجه حرارت و تعداد دفعات فرایند استخراج و همچنین نوع و ماهیت گیاه می‌باشند [4]. امواج ایجاد شده در روش سوند هموژنایزر، با تشکیل پدیده کاویتاسیون، سبب تخریب دیواره سلولی و در نتیجه نشت ترکیبات فنلی توسط حلال به محیط می‌شود [18]. کدیر و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی میزان ترکیبات فنلی میوه، برگ و هسته زیتون با استفاده از روش سوکسله به این نتیجه رسیدند که، میزان ترکیبات فنلی درون عصاره‌ی اتانولی میوه زیتون، برگ زیتون و هسته زیتون به ترتیب ۲۷۰، ۲۸۰ و ۳۱۷ میکروگرم بر حسب گالیک اسید می‌باشد. این محققین بیان کردند که هسته زیتون به دلیل دارا بودن ماده لزج روغنی حاوی ترکیبات زیست فعال، غنی از ترکیبات فنلی می‌باشد [9]. نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده در این پژوهش، همخوانی داشت. در یک تحقیق دیگر دات و همکاران (۲۰۱۱) با بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی هسته زیتون با استفاده از حلال مختلف، گزارش کردند که تیمار بهینه با حلال متانولی، در زمان استخراج ۱۲ ساعت، درجه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد و ۳ مرحله استخراج بدست خواهد آمد. این محققین بیان کردند که افزایش زمان استخراج، سبب افزایش میزان ترکیبات فنلی عصاره‌ها می‌شود. از سوی دیگر، نتایج بدست آمده توسط این محققین نشان داد که حلال الکی نسبت به آب دارای بازدهی استخراج بیشتری می‌باشد؛ که در هر دو مورد با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [19]. اختلاف در میزان ترکیبات فنلی استخراج شده را بوسیله حلال‌های مختلف را

دانستند [24]؛ که با نتایج این پژوهش مطابقت نداشت. از سوی دیگر، نتایج به دست آمده نشان داد که، افزایش میزان ترکیبات فنلی، سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها می‌گردد. ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها، از طریق تاثیر روی لایه فسفولیپیدی دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها، سبب تخریب غشا و خروج محتویات و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شود. از سوی دیگر، ترکیبات فنلی با تاثیر روی آنزیم آمینواسید دکربوکسیلاز میکروارگانیسم‌ها، اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند [25].

اشریشیا کلای می‌باشد [21]. که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. از دلایل خصوصیات ضد میکروبی این عصاره می‌توان به حضور ترکیبات فنلی مانند اولئوروپین و هیدروکسی تایروزول اشاره کرد [22]. همگ و همکاران (۲۰۲۰) نیز با بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون، گزارش کردند که این عصاره دارای خصوصیات ضد میکروبی بالایی در برابر اشریشیا کلای می‌باشد [23]. که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. کدیر و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته زیتون واریته هلهالی بیان کردند که عصاره هسته زیتون توانایی مهارکنندگی بالایی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها دارد [9]؛ که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. از سوی دیگر، یونس و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی محتوای فنلی و خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته زیتون بیان کردند که این عصاره تاثیر مهار کنندگی روی باکتری گرم منفی اشریشیا کلای ندارد. این محققین عدم وجود کانتچین در این عصاره را دلیل این امر

Table 2 Antimicrobial properties of selected samples

Variable Treatment	Antifungal effects	Antibacterial effects
Ethanol 100: water 0 in 1 minute		
Ethanol 100: water 0 in 2 minutes		
Ethanol 100: water 0 in 3 minutes		

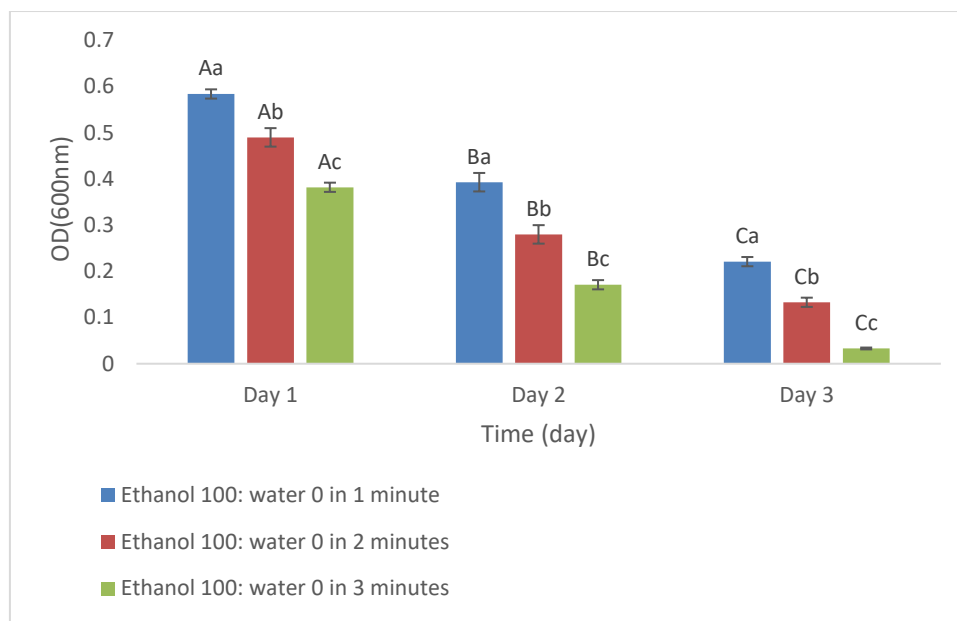


Fig 1: Antibacterial effects of ethanol extracts extracted in 1, 2 and 3 minutes. Capital dissimilar letters indicate significant differences in one sample on different days and small dissimilar letters indicate significant differences between different samples on the same day ($p < 0.05$).

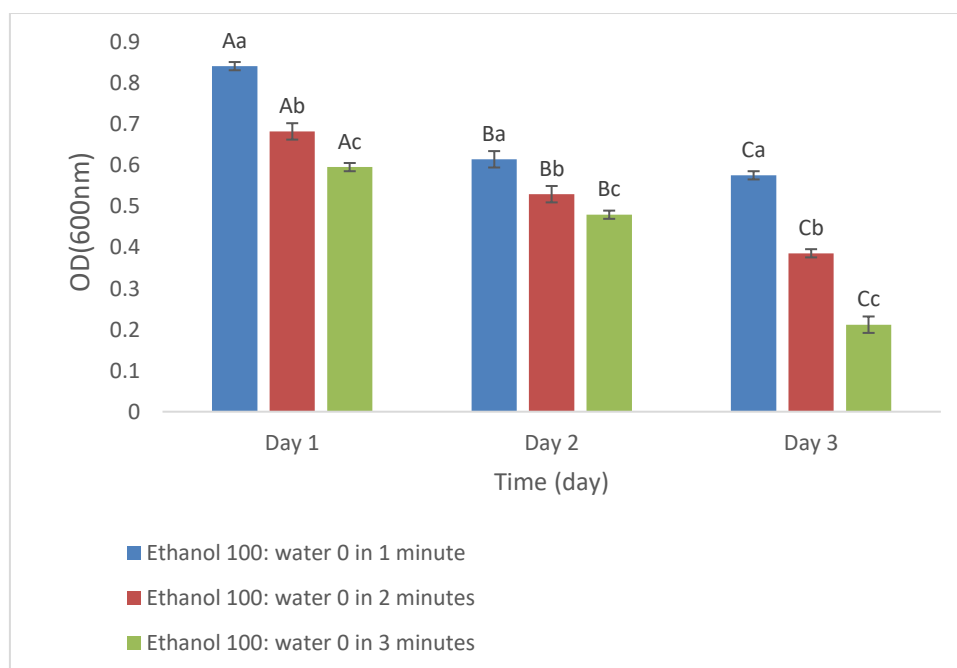


Fig 2: Antifungal effects of ethanol extracts extracted in 1, 2 and 3 minutes. (Capital dissimilar letters indicate significant differences in one sample on different days and small dissimilar letters indicate significant differences between different samples on the same day ($p < 0.05$))

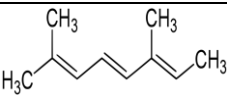
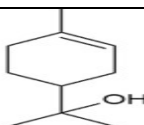
نوع و میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره هسته زیتون در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود،

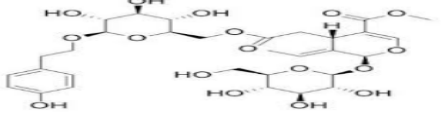
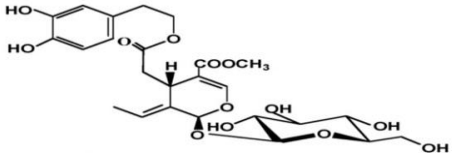
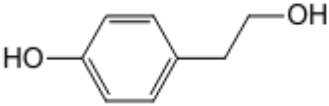
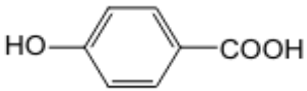
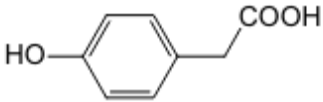
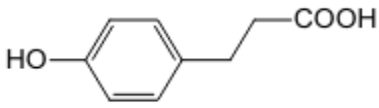
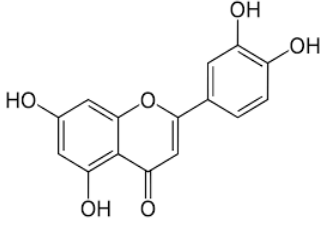
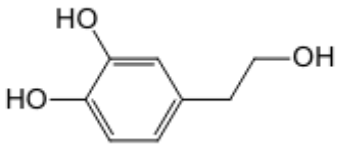
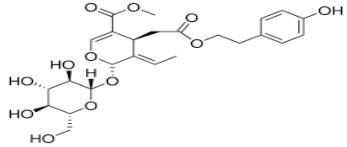
۳-۳ پروفایل ترکیبات فنلی نمونه بهینه:

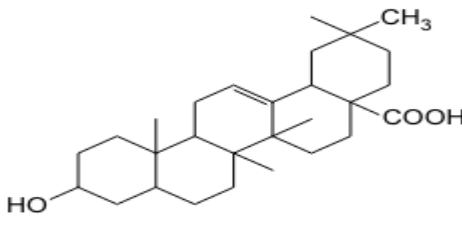
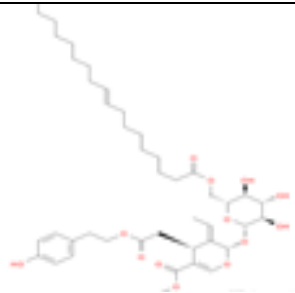
پژوهش حال حاضر همخوانی نداشت. از دلایل این عدم تطابق می‌توان به زیتون انتخاب شده جهت انجام آزمایش اشاره کرد. به عبارت دیگر، برخلاف پژوهش حاضر که از هسته‌ی زیتون پس از فراوری استفاده گردید؛ اما آن محققان از هسته‌ی زیتون روی درخت و قبل از فراوری، جهت انجام آزمایش استفاده کردند. لازم به ذکر است که انجام فرایند سود زنی در کارخانه‌ها سبب تخریب ترکیبات فنلی کمپلکس می‌شود. از دیگر دلایل این امر می‌توان به واریته زیتون و همچنین نوع حلال جهت استخراج اشاره کرد. زیرا این محققین از حلال متانول ۸۰ درصد جهت استخراج ترکیبات فنلی استفاده کردند. از دیگر ترکیبات فنلی موجود در هسته زیتون می‌توان به لیگوستروزیدها اشاره کرد. لیگوستروزیدها یک ترکیب فنلی رایج در تمام بخش‌های زیتون مانند برگ، میوه و هسته زیتون یافت می‌شود؛ اما در هسته زیتون به مراتب کمتر گزارش شده است [31]. در ارتباط با حضور لیگوستروزیدها در هسته زیتون، نتایج این پژوهش با نتایج ماستری و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت [9].

۱۳ ترکیب اصلی شناسایی گردید. بیشترین درصد فراوانی مربوط به هیدروکسی تایروزول و تایروزول بود. که با نتایج بوسکو (۲۰۱۰) که روی ترکیبات فنلی عصاره میوه و هسته زیتون‌های کنسروی یونانی بررسی انجام دادند [26]؛ مطابقت داشت. اما میزان این ترکیبات با نتایج حال حاضر متفاوت بود؛ از دلایل این امر، می‌توان به واریته زیتون اشاره کرد. از سوی دیگر، مالیک و بردفورد (۲۰۰۶) گزارش کردند که عمده ترین ترکیب فنلی کمپلکس در میوه، هسته و برگ زیتون، اولئوروپین می‌باشد؛ که در طی بلوغ به ترکیبات فنلی دیگر از جمله، هیدروکسی تایروزول تجزیه می‌گردد [27]؛ که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. نتایج این پژوهش در ارتباط با بیشتر بودن میزان هیدروکسی تایروزول و تایروزول، با نتایج مالاماسی و همکاران (۲۰۲۱) [28] و همچنین گنکالوز و همکاران (۲۰۱۹) [29]؛ همخوانی داشت. در تحقیقی دیگر بن منصور و همکاران (۲۰۱۱)، روی پروفایل ترکیبات فنلی هسته زیتون جمع آوری شده از درختان تونس بررسی انجام دادند؛ نتایج نشان داد که ترکیب فنلی نوژنید دارای بالاترین میزان می‌باشد [30]؛ که با نتایج

Table 3: The type and amount of phenolic compounds of the extracted extracts of the optimal treatment (mg of polyphenol per 100 grams of olive seed)

Run	RT(min)	Amount (%)	Phenolic compound	Chemical structure
1	6.134	0.51	Alloocimene	
2	8.53	0.23	ALPHA. TERPINEOL	

3	11.06	5.52	nuezhenide	
4	11.44	7.34	Oleuropein	
5	14.03	12.65	Tyrosol	
6	15.63	0.49	p-Hydroxy-benzoic acid	
7	17.285	0.57	p-Hydroxyphenylacetic acid	
8	18.5	11.4	Phloretic acid	
9	18.8	2.96	Luteolin	
10	18.92	28.12	Hydroxytyrosol	
11	19.36	0.46	Ligstroside	

12	22.78	8.35	Oleanolic acid	
13	25.596	0.57	Jaspolyanoside	

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق به بررسی بهینه سازی استخراج عصاره هسته زیتون با استفاده از حلال‌های مختلف در زمان‌های مختلف با روش سوند هموژنایزر پرداخته شد. نتایج نشان داد که، عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی می‌باشد. نوع حلال و مدت زمان استخراج، دارای تاثیر معنی‌داری ($P < 0.05$)، در مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره‌های هسته زیتون می‌باشد. به عبارت دیگر، با افزایش زمان استخراج، در تمام تیمارها، یک روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فنلی مشاهده گردید؛ که در اکثر موارد، این روند معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. در ارتباط با تاثیر نوع حلال، طبق نتایج بدست آمده، تیمارهای استخراج شده با حلال (آب: اتانول ۱۰۰) در هر سه زمان و سپس تیمارهای استخراج شده با حلال اتانول ۸۰: آب ۲۰ در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بودند؛ و به عنوان تیمارهای منتخب، انتخاب شدند. در ارتباط با خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های

۵- منابع

منتخب طبق نتایج بدست آمده از آزمون انتشار چاهک، سه عصاره استخراج شده با حلال اتانولی با زمان استخراج ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیات ضد میکروبی بودند. لازم به ذکر است که نمونه‌های هیدروالکی خصوصیت ضد میکروبی ناچیزی از خود نشان دادند. از سوی دیگر، در آزمون جذب نوری که جهت کسب اطمینان از نتایج حاصل از آزمون انتشار چاهک و انتخاب تیمار بهینه (از بین عصاره‌های دارای خصوصیت ضد میکروبی در آزمون انتشار چاهک یعنی عصاره‌های اتانولی استخراج شده در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه) انجام گرفت، نتایج نشان داد که عصاره‌های اتانولی استخراج شده در هر سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی بودند. لازم به ذکر است که عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، به عنوان بهترین تیمار انتخاب و ترکیبات فنلی آن بوسیله دستگاه GC-MS اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که، بیشترین درصد فراوانی مربوط به هیدروکسی تایروزول و تایروزول می‌باشد.

- [1] Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- [2] Kuo L-M Y, Tseng P-Y, Lin Y-C, Liaw C-C, Zhang L-J, Tsai K-C, et al. New hirsutinolide-type sesquiterpenoids from *vernonia cinerea* inhibit nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Planta Med.* 2018;84(18):1348-1354. doi: 10.1055/a-0647-1901 PMID: 29986352.
- [3] Rad BZ, Mardjanmehr H, Sasani F, Khosravi A, Gharagozlou MJ. Evaluation of skin repairing and antifungal properties of alcoholic extract of laleh abbasi (*mirabilis jalapa*) leaf on induced wounds in laboratory white rat model. *J Vet Res.* 2023;78(1):9-19. doi: 10.22059/jvr.2022.340558.3247 (In Persian).
- [4] Anwar, F., and Przybylski, R. (2012). Effect of Solvents Extraction on Total Phenolics and Antioxidant Activity of Extractions from Flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.). *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria.* 11(3):293-301.
- [5] Daane, K. M., and Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual review of entomology*, 55, 151-169.
- [6] Jiménez-Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., del Mar Jiménez-Gasco, M., Antoniou, P. P., and Tjamos, E. C. (2012). Verticillium wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *Plant Disease*, 96(3), 304-329.
- [7] Hussein, A.M.S., M.M. Kamil and G.F. Mohamed. (2011). Physicochemical and sensorial quality of semolina defatted guava seed flour composite pasta. *Journal of the American Society.* 7(6): 623-629.
- [8] Abolfath, M., Cheloei, N., Asgari, S., Beladian, E., Ghasemzadeh-mohammadi, V. (2024). Investigating Variables of Time, Extraction Solvent Composition and Ratio of Solvent-to-plant on Antioxidant and Antibacterial Characteristics of *Striata* Plants and Olive Leaves Using Microwave and Ultrasonic Extraction Methods. *Iranian J Nutr Sci Food Technol*; 19 (3) :43-53.
- [9] Kadir, B., Fatümetüzzehra, K., Mehmet, A., A., Selami, G., and Yakup, Y. (2023). Antioxidant and antithrombotic properties of fruit, leaf, and seed extracts of the Halhalı olive (*Olea europaea* L.) native to the Hatay region in Turkey. *Foods and Raw Materials.* 11(1).
- [10] Bianci, G., (2003). Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 229–242.
- [11] Mokhtari, M., Ghanadi, A. (2013). The effects Of hydro-alcoholic extract Of olive seed on the levels Of the gonadotropines and ovarian steroids in immature female rat. *Original Research*, 2(6).
- [12] Maestri, D., Barrionuevo, D., Bodoira, R., Zafra, A., Jiménez-López, J., Alché, J., d., D. (2019). Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea europaea* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 56(9), 4359–4370. doi:10.1007/s13197-019-03904-5.
- [13] namadipour A, sadeghi mahoona A. 2018. Antioxidant interactions in date palm and zizyphus extracts combination. *FSCT* ; 15 (77) :38-31. URL: <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-8029-fa.html>.
- [14] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry.* 71: 553–562.
- [15] Fasihi, H., Fazilati, M., Hashemi, M. and Noshiravani, N. (2017). Novel Carboxymethyl Cellulose- Polyvinyl alcohol blend films stabilized by Pickering emulsion in corporation method. *Carbohydrate Polymers*, 167, 79-89.
- [16] Habibi, S. A., Soltani, M., Ahmadi Vand, S., and Taheri-Mirghaied, A. (2019). In vitro antibacterial activity of some medical plants against *Streptococcus iniae*. *New Findings in Veterinary Microbiology*, 1(2), 36-46. doi: 10.35066/J040.2018.707.
- [17] Keskes, H., Belhadj, S., Jlal, L., El Feki, A., Damak, M., Sayadi, S. et al., (2017). LC-MS-MS and GCMS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian *Juniperus phoenicea* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55(1):88-95.
- [18] Karabegovic, I.T., Stojicevic, S.S., Velickovic, D.T., Todorovic, Z. B., Nikolic, N. C., and Lazic, M. L. (2014). The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54, 142–148.

- [19] Alu'datt, M. H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M. N., Alsaad, A., Rababeh, T. (2011). Optimisation and characterisation of various extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity in olive seeds. *Natural Product Research*, 25(9), 876–889. doi:10.1080/14786419.2010.489048.
- [20] Kchaou, W., Abbas, F., Blecker, C., Attia, H., and Besbes, S. (2013). Effects of extraction solvents on fenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial Crops and Products*. 45:262-269.
- [21] Markin, D., Duek, L., and Berdichevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, 46(3–4), 132–136. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00859.x>.
- [22] Liu, Y., McKeever, L. C., and Malik, N. S. A. (2017). Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113>.
- [23] Hemeg, H.A.; Moussa, I.M.; Ibrahim, S.; Dawoud, T.M.; Alhaji, J.H.; Mubarak, A.S.; Kabli, S.A.; Alsubki, R.A.; Tawfik, A.M.; Marouf, S.A.(2020). Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 3221–3227.
- [24] Younis, H., El shalakany, W., Amin, S., Abdel-Reheem, M., and Ibrahima, H. (2023). Biological activities and related phenolic compounds content of olive and plum stones ethanolic extract. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(13), 2307-2330. doi: 10.21608/ejchem.2023.209650.7948.
- [25] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193–198.
- [26] Boskou, G. (2010). Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention || Antioxidant Capacity and Phenolic Profile of Table Olives from the Greek Market., 925–934. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00099-1.
- [27] Malik, N.S.A. and Bradford, J.M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in a Arbequinaolives. *Scientia Hort.* 110: 274-278.
- [28] Mallamaci, R.; Budriesi, R.; Clodoveo, M.L.; Biotti, G.; Micucci, M.; Ragusa, A.; Curci, F.; Muraglia, M.; Corbo, F.; Franchini, C. (2021). Olive Tree in Circular Economy as a Source of Secondary Metabolites Active for Human and Animal Health Beyond Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules* 2021, 26, 1072. <https://doi.org/10.3390/molecules26041072>.
- [29] Gonçalves, A., Silva, E., Brito, C., Martins, S., Pinto, L., Dinis, L., ... Correia, C. M. (2019). Olive tree physiology and chemical composition of fruits are modulated by different deficit irrigation strategies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.10064
- [30] Ben Mansour, A., Porter, E. A., Kite, G. C., Simmonds, M. S. J., Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2015). Phenolic Profile Characterization of Chemlali Olive Stones by Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1990–1995. doi:10.1021/acs.jafc.5b00353.
- [31] Michel, T., Khelif, I., Kanakis, P., Termentzi, P., Allouche, N., Halabalaki, M., Skaltsouni, A. (2015). UHPLC–DAD–FLD and UHPLC–HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. *Phytochem Lett* 11:424–439.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigating the extraction conditions of olive kernel extract using a Ultrasonic Homogenizer and evaluating their antimicrobial properties

Namadpour, A.¹, Mirzaei, H. A.^{2*}, Sahari, M.A.³, Hooshiyar, M.⁴

1. P.H.D. Student, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Professor, Dept. of Food Science & Technology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Former PhD Student, Department of Microbiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2024/7/18 Accepted: 2024/12/11	The aim of the present study was to investigate the extraction conditions of olive kernel extract using an ultrasonic homogenizer and to investigate the antimicrobial properties of the extract with the highest amount of phenolic compounds. According to the results, the ethanolic sample which was extracted in 3 minutes has the highest amount of phenolic compounds. The kinds of solvent and extraction time have significant effects ($P < 0.05$) on the amount of the sample phenolic compounds. The treatments extracted with solvent (water 0: 100 ethanol) in all three times (1, 2 and 3 minutes) and then the treatments extracted with solvent ethanol 80: water 20 in 2 and 3 minutes had the highest amount of phenolic compounds thus as the treatment for performing microbial tests were selected. In relation to antimicrobial properties, according to the results obtained from the well diffusion test, all three ethanolic extracts had antimicrobial properties. Also, the optical density measurement test (OD or OD600) was done to choose the optimal treatment. The results showed that the ethanolic extract in 3 minutes has the highest antimicrobial properties, thus this extract was selected as the best treatment and its phenolic compounds were measured by GC-MS. The results showed that the highest percentage of phenolic compounds in this extract is related to hydroxytyrosol and tyrosol.
Keywords: Olive kernel extract, Phenolic compound, antimicrobial properties, GC-MS	
DOI: 10.22034/FSCT.22.162.1. *Corresponding Author E- mirzaei Habib1@gmail.com	