مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کلروفیل استخراج‌شده از گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) با بهره‌گیری از روش‌های استخراج آنزیمی و فراصوت

امیر احمدی[۱]، سید احمد شهیدی[۲*]، رضا صفری[۳]، علی معتمدزادگان[٤]، آزاده قربانی حسن سرایی[٥]

۱دانشجوی دکترا، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲* دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۳ استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

٤ استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

٥ دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۲/۲۲

کلمات کلیدی:

روش آنزیمی،

روش فراصوت،

کلروفیل،

ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی،

یونجه.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.99

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2

* مسئول مکاتبات:

sashahidy@yahoo.com

چکیده

امروزه از رنگ‌دانه‌های طبیعی به‌صورت گسترده‌ای در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌گردد و طی سال‌های اخیر تحقیقات متعددی پیرامون روش‌های استخراج و بررسی خواص رنگ‌دانه‌های طبیعی انجام یافت. هدف از این تحقیق نیز مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کلروفیل استخراج‌شده از گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) با بهره‌گیری از روش‌های استخراج آنزیمی و فراصوت می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سه روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) انجام گرفت. نتایج نشان داد که غلظت کلروفیل a در گیاه یونجه بیشتر از غلظت کلروفیل b بوده است و همچنین روش آنزیمی نیز عملکرد بالاتری در استخراج کلروفیل نشان داده است. علاوه براین غلظت‌های بالاتر عصاره یونجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مهار رادیکال آزاد DPPH و نیز قدرت احیاکنندگی آهن نشان داد (p.<۰/۰۵). همچنین، با افزایش غلظت عصاره، مقدار ترکیبات فنلی کل و ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافت (p.<۰/۰۵). به دلیل عملکرد مطلوب‌تر، از کلروفیل استخراج‌شده به روش آنزیمی در ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی یعنی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ATBS و نیز قدرت احیاکنندگی آهن استفاده گردید و با افزایش غلظت کلروفیل نیز خواص آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی مطلوب کلروفیل استخراج‌شده به روش آنزیمی از گیاه یونجه می‌توان کاربرد آن را در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی مورد ارزیابی قرار داد و با استفاده از این تکنیک سامانه‌های استخراجی در مقیاس صنعتی طراحی نمود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

۱- مقدمه

همواره توجه به سلامت انسان در صنایع غذایی و دارویی موردتوجه بوده است و بهره‌گیری از مواد غذایی سالم در این خصوص بسیار مؤثر است. یکی از عوامل مخاطره‌آمیز سلامتی انسان، واکنش‌های اکسیداسیون در بدن به دلیل تولید رادیکال-های آزاد می‌باشد که به آسیب یا مرگ سلول‌ها منجر می‌شود [۱]. پایین آمدن سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن منجر به پیری زودرس، سلول‌های آسیب‌دیده یا جهش‌یافته، نسج و بافتِ آسیب‌دیده، فعال شدن ژن‌های معیوب در DNA و افزایش فشار بر سیستم ایمنیِ بدن می‌شود [۲]. یافته‌های علمی حاکی از آن است که میوه‌ها و سبزی‌ها حاوی انواع مختلفی مواد مغذی و غیرمغذی نظیر رنگ‌دانه‌ها هستند که به آنها ترکیبات فیتوشیمیایی می‌گویند. این ترکیبات از نظر بیوزیستی اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند و از ابتلا به برخی بیماری‌های مزمن نظیر انواع سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و دیابت جلوگیری می‌کنند. از مهم‌ترین عملکردهای این ترکیبات مهار رادیکال‌های آزاد و اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند [۳ و ٤]. رنگ‌دانه‌ها در حقیقت ترکیبات شیمیایی‌ای هستند که در گستره طول‌موج ناحیه مرئی قادر به جذب نور می‌باشند و از مهم‌ترین مزایای رنگ‌دانه‌های طبیعی در کنار خواص سلامت بخش آنها می‌توان به تنوع و گستردگی رنگی آنها اشاره نمود [۵]. از بخش‌های مختلفی از اندام یک گیاه به‌عنوان رنگ‌دانه استفاده می‌گردد که به دلایل مختلف دارای خواص متفاوتی نیز می‌باشند [٦]. در گیاهان چهار گروه اصلی رنگ‌دانه شامل کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها وجود دارند که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. کلروفیل‌ها در واحدهای سلولی ویژه‌ای به نام کلروپلاست که به‌عنوان عامل فتوسنتز عمل می‌کند، واقع شده‌اند. کلروفیل‌ها که مهم‌ترین رنگ‌دانه جذب‌کننده نور در فرآیند فتوسنتز می‌باشند و نقش اصلی آنها جذب انرژی نور و تبدیل آن به انرژی شیمیایی می‌باشد و عمدتاً به رنگ سبز مایل به آبی و یا سبز مایل به زرد می‌باشد. به‌عنوان رنگ‌دانه غذا، کلروفیل عامل انتقال رنگ سبز پایدار به برگ اسفناج، کاهو و غیره می‌باشد. در میان انواع کلروفیل، دو نوع کلروفیل a و کلروفیل b که با نسبت‌های متفاوتی برحسب شدت نور در بافت‌های گیاهان سبز وجود دارند و عمدتاً به نسبت ۳ به ۱ می‌باشند، در مواد غذایی مورداستفاده قرار می‌گیرند [۵]. این دو نوع کلروفیل دارای ساختار مشابهی بوده و تفاوتشان در گروه R آن‌هاست. اگر R یک گروه متیل (CH_3) باشد، کلروفیل از نوع a و اگر عامل فرمیل (CHO) باشد، کلروفیل از نوع b است. هسته چهار پیرولی با سر مولکول کلروفیل قطب آب‌دوست و زنجیر فیتولی یا دم کلروفیل قطب آب‌گریز (یا چربی‌دوست) آن را تشکیل می‌دهد و به همین جهت کلروفیل و مولکول‌های نظیر آن را ترکیبات دوپسند[1] می‌نامند [۷].

امروزه تمایل فزایند ای برای جایگزینی رنگ‌های مصنوعی در صنایع غذایی و بهداشتی با رنگ‌های با منشأ طبیعی به وجود آمده است. اثرات جانبی متعددی از قبیل اثرات آلرژیک، عوارض عصبی و رفتاری (مانند بیش فعالی) و همچنین سمیت ناشی از مصرف رنگ‌دانه‌های مصنوعی در طولانی‌مدت مشاهده شده است [۸]. این در حالی است که رنگ‌های مشتق شده از منابع طبیعی، علاوه بر این‌که دارای کیفیت، کارایی و ویژگی‌های حسی مناسبی هستند، دارای اثرات دارویی متعددی از قبیل اثرات ضد سرطانی، ضدالتهابی، ضد کلسترول و دیابت نیز می‌باشند و بنابراین نقش مهمی در ارتقاء سلامتی انسان بر عهده دارند [۹]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که فرایندهای اکسیداتیو را به تأخیر انداخته و به دو صورت مصنوعی و طبیعی وجود دارند. از عوارض جانبی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی می‌توان به سرطان‌زایی و جهش‌زایی اشاره نمود [۱۰]؛ بنابراین لزوم استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها، کلروفیل‌ها و رنگ‌دانه‌های گیاهان ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند استرس اکسیداتیو را در سلول‌ها کاهش دهند. ازاین‌رو، تجویز آن‌ها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مفید و مؤثر است [۱۱].

از جمله گیاهان به‌منظور استخراج کلروفیل، یونجه می‌باشد. یونجه (*Medicago sativa* L.) گیاهی علفی و چندساله از تیره بقولات (*Fabaceae*)، با نام‌های انگلیسی *alfalfa* و *Lucerne* است. محتوی مواد شیمیایی گیاهی متنوعی همچون آلکالوئیدها، آمینواسیدها و آنزیم‌های ضروری، فیتواسترول‌ها، فیتواستروژن‌ها، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، مواد معدنی، ساپونین، ویتامین‌ها است [۱۲]. این گیاه به علت غنی بودن از ویتامین‌ها و فیتواستروژن‌ها به‌عنوان افزودنی غذایی در چند کشور توسعه‌یافته استفاده می‌شود [۱۳]. در ایران یونجه رایج‌ترین محصول زراعی رشد یافته است. اجزای مختلف این

1. Amphiphilic compounds

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

گیاه مثل اندام هوایی و بذر از جنبه‌های مختلف ازجمله توانایی در مقاومت به تنش‌های محیطی به‌ویژه شوری و خشکی جهت کاربردهای کشاورزی و دامی و نیز اثر در درمان برخی از بیماری‌های ناشی از تنش اکسایشی بررسی شده است. بااین‌وجود با توجه به گزارش‌هایی مبنی بر وجود طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی مؤثر در گیاه یونجه و ازآنجاکه گیاه یونجه در محدوده جغرافیایی وسیعی رشد می‌یابد و کشت آن آسان و کم‌هزینه است، ضروری است حداکثر پتانسیل بالقوه این گیاه شناسایی و برای توسعه عوامل جدید که فعالیت بیولوژیکی خوبی دارند، استفاده گردد [۱٤].

با توجه به اینکه بهره‌گیری از خواص مختلف گیاهان در صنایع مختلف نیازمند عصاره‌گیری می‌باشد، ارزیابی روش‌های مختلف عصاره‌گیری جهت یافتن بهینه‌ترین و کارآمدترین روش، ضروری می‌باشد. چرا که کیفیت و کمیت عصاره علاوه بر وابستگی به اندام گیاهی به انتخاب روش مناسب عصاره-گیری نیز وابسته است [۱۵]. در سال‌های اخیر، کاربرد آنزیم‌ها در صنایع استخراج ترکیبات زیست فعال گیاهی به دلیل مزایای بیولوژیکی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است؛ زیرا ازنظر محیط‌زیستی فرآیند استخراج آنزیمی روشی سبز و دوستدار محیط‌زیست نیز می‌باشد. استخراج آنزیمی به‌عنوان یک راه مؤثر و نوین برای رهاسازی ترکیبات باند شده و افزایش عملکرد کل، با اضافه نمودن آنزیم‌های خاصی مانند سلولاز، همی‌سلولاز و پکتیناز در طی فرآیند استخراج از طریق شکستن دیواره سلولی و هیدرولیز پلی ساکارید می‌تواند باعث افزایش بازیابی گردد [۱۰]. در این مطالعه نیز به استخراج کلروفیل با استفاده از روش‌های آنزیمی و فراصوت از گیاه یونجه پرداخته می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲- ۱- تهیه گیاه

گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*) با واریته (یونجه همدانی) از شهرستان ساری واقع در استان مازندران (کشور ایران) در فروردین‌ماه ۱۳۹۸ جمع‌آوری شده و پس از تائید نام علمی، برگ‌های گیاه یونجه خشک و سپس با استفاده از آسیاب پودر گردید.

۲- ۲- روش استخراج

۲- ۲- ۱- روش آنزیمی

در استخراج آنزیمی، ابتدا یک گرم از نمونه یونجه با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آبی بافر یا تامپون اسیدی (pH= ۳/۵) مخلوط و مدت یک دقیقه هموژنیزه شد. سپس از محلول آنزیمی *PectineX Ultra SP L* (نووزایم، دانمارک) حاوی مخلوط آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز و همی سلولاز، با غلظت ۵ درصد برای خارج‌سازی از محلول تامپونی تهیه‌شده دارای پودر یونجه در آب، برای مدت ۱۲۰ دقیقه و در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید [۱٦].

۲- ۲- ۲- روش فراصوت

برای استخراج به روش فراصوت ۱۰۰ گرم از یونجه به یک لیتر اتانول ۹٦ درصد (مرک، آلمان) اضافه شد و از فرکانس ۲۵ کیلو هرتز و توان ۱۲۰ وات، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱ ساعت به برای استخراج به روش فراصوت (مدل S60 H ساخت Elma آلمان) استفاده گردید. نمونه‌ها در دمای ٤ درجه و دور ۸۰۰۰ آر پی ام برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (Hettick، آلمان) شده و مایع رویی جمع‌آوری گردید [۱۷].

۲- ۳- اندازه‌گیری کلروفیل

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل، مایع رویی به‌دست آمده بعد از عمل سانتریفوژ در مراحل قبل و در هر یک از روش‌های آنزیمی و یا فراصوت، با استفاده از استون ۸۰ درصد (مرک، آلمان) رقیق گردید. سپس، نمونه‌های رقیق شده جهت بررسی با اسپکتروفتومتر مرئی (Hitachi، ژاپن) داخل سل‌های پلاستیکی یک سانتیمتری که مخصوص مواد رنگی می‌باشند، قرار داده شد. پس از آن در دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی با حلال اتانول به‌عنوان شاهد و طول‌موج‌های موردبررسی ٦٦۳ و ٦٤۵ نانومتر قرار گرفت. در انتها عددهای جذب در معادلات ۱ و ۲ جایگزین شده و مقدار کلروفیل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید [۱۷].

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645)\ V/100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663)\ V/100W$$

A: جذب نور در طول‌موج‌های 663، 645

V: حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)

W: وزن تر نمونه برحسب گرم

در این مرحله توسط دستگاه، با استفاده از غلظت‌های متفاوت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

از نمونه موردنظر منحنی کالیبراسیون رسم گردید. نمونه بهینه از نظر مقدار کلروفیل استخراج‌شده با حلال موردنظر، در غلظت‌های متفاوت تهیه‌شده و در طول‌موج حداکثر که نمونه‌ها پیک نشان دادند، بررسی شد. به‌این‌ترتیب نمونه و حلال بهینه-سازی شده، انتخاب و وارد فاز بعدی آزمایش گردیدند. کمپلکس پایدار نمونه‌های کلروفیلین تهیه‌شده، توسط شاهد بافر فسفات در طول‌موج ٤٠٥ نانومتر که شدت جذب نور مرئی کلروفیلین‌ها می‌باشد بررسی شدند.

۲- ٤- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

در عصاره یونجه مقدار کل ترکیبات فنلی موجود از طریق روش طیف‌سنجی با معرف فولین- سیوکالتیو (مرک، آلمان) سنجیده شد و نتایج بر اساس میلی اکی والان اسید گالیک بر گرم بیان گردید [۱۹].

۲- ۵- اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی

مقادیر ترکیبات فلانوئیدی عصاره یونجه با استفاده از روش دوانتو و همکاران[1] انجام‌شده و نتایج بر اساس میلی‌گرم بر صد گرم وزن خشک بیان گردید [۲۰].

۲- ٦- آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

۲- ٦- ۱- بررسی مهار رادیکال آزاد DPPH[2]

بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به‌طور جداگانه (ppm ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰) با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH (مرک، آلمان) اضافه‌شده و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج nm ۵۱۷ در مقابل شاهد قرائت گردید. قابل ذکر است که تمامی این مراحل در مورد BHA[3] به‌عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد انجام یافت [۲۱].

= درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

۱۰۰× (جذب شاهد/(جذب نمونه- جذب شاهد))

۲- ٦- ۲- بررسی مهار رادیکال ABTS[4]

ارزیابی مهار رادیکال ABTS طبق مطالعه هی و همکاران[5] با اندکی تغییر انجام یافت. در ابتدا ۷ میلی مولار از محلول ABTS با ۲/٤٥ میلی مولار پرسولفات پتاسیم مخلوط شده و در دمای اطاق و مکان تاریک به مدت ١٦ ساعت قرار داده شد. محلول کاری، با رقیق کردن محلول اولیه در اتانول ۸۰ درصد، تهیه شده به‌طوری‌که جذب در طول‌موج ٧٣٤ نانومتر، ۰/۷ قرائت شود. محلول تهیه‌شده از کلروفیل با محلول نهایی ABTS، مخلوط شده و جذب در طول‌موج ٧٣٤ نانومتر قرائت گردید [۲۲].

۲- ٦- ۳- بررسی قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP[6])

جهت بررسی قدرت احیاکنندگی آهن، مقدار ۰/۱ گرم از عصاره یونجه با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سرد در حمام یخ هموژن شد. هموژنات حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف‌شده و سپس به ۵۰ میکرو لیتر از عصاره‌ی به‌دست‌آمده ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار با pH= ۳/٦، فریک-تری-پرییدیل- اس- تریازین و فریک کلرید) اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ٤ دقیقه در دمای °C ۳۰ انکوبه شد. جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP)، خوانده شد. لازم به ذکر است که آمونیوم فروس سولفات به‌عنوان شاهد برای مقایسه بکار رفت [۲۳].

۲-۷- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام یافت. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌منظور ارزیابی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین مقادیر موردسنجش استفاده گردید. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه‌وتحلیل خطای مجاز برای رد Ho، ۵ درصد در نظر لحاظ شد.

۳- نتایج و بحث

۳- ۱- مقادیر کلروفیل

غلظت کلروفیل‌های a و b استخراج‌شده از گیاه یونجه با استفاده از روش‌های فراصوت و آنزیمی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن مرطوب در شکل ۱ قابل رؤیت است و چنانچه مشاهده می‌گردد غلظت کلروفیل a بیشتر از غلظت کلروفیل b بوده و در روش آنزیمی نیز مقادیر کلروفیل بیشتری استخراج

1. Dewanto et al., 2002
2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
3. Butylated hydroxyanisole
4. 2, 2'-Azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid
5. He et al., 2012
6. Ferric Reducing Antioxidant Power

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

گردید. همچنین، مطابق نتایج آنالیز واریانس میان مقادیر کلروفیل‌های a و b در روش‌های استخراج آنزیمی و فراصوت اختلاف معناداری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$).

صابریان و همکاران [۲٤] در مطالعات خود بر روی گیاه یونجه نشان دادند که مقادیر کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b می‌باشد. همچنین، نتایج تحقیقات دیاس و همکاران[1] [۲۵] و نیز کُنگ و همکاران[2] [۲٦] که بر روی برگ کاهو و ریزجلبک *Chlorella vulgaris* انجام یافتند، نشان داد که مقادیر کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b بوده است.

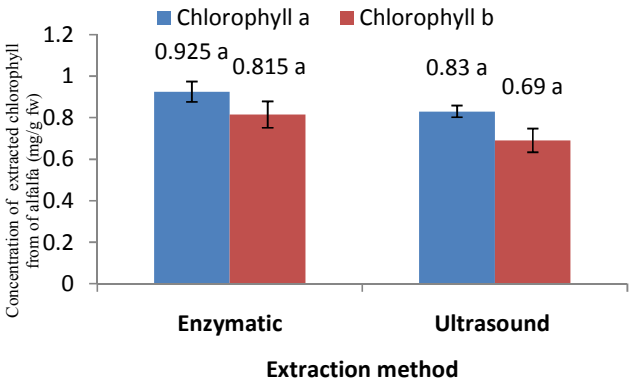

Fig 1 Concentration of extracted chlorophylls from alfalfa in two extraction methods.

۳- ۲- مقادیر فنل کل

در شکل (۲) نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، مقدار فنل کل در عصاره گیاه یونجه افزایش می‌یابد. اگرچه در غلظت پایین عصاره یعنی ۳۰۰ میکرومولار، روش فراصوت عملکرد مطلوب‌تری به همراه داشت، اما مقادیر فنل کل با افزایش غلظت عصاره حاکی از بهبود عملکرد روش آنزیمی بوده است. نتایج ارزیابی آنالیز واریانس نیز بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره جهت ارزیابی مقادیر فنل کل در هر یک از روش‌های استخراجی مذکور بوده است ($p < ۰/۰۵$).

1. Dias et al., 2014
2. Kong et al., 2012

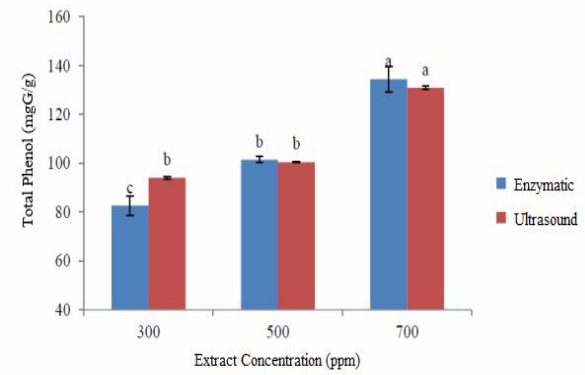

Fig 2 Total phenol of total extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

۳- ٤- مقادیر ترکیبات فلاونوییدی

در شکل (۳) نیز مقدار ترکیبات فلاونوییدی در عصاره گیاه یونجه با افزایش غلظت‌های مختلف عصاره‌های آنزیمی و فراصوت این گیاه افزایش می‌یابد و مقدار آن در روش آنزیمی در مقایسه با روش فراصوت بالاتر است. در هر یک از روش‌های استخراجی، نتایج ارزیابی آنالیز واریانس نیز نشانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره جهت ارزیابی مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی بوده است ($p < ۰/۰۵$).

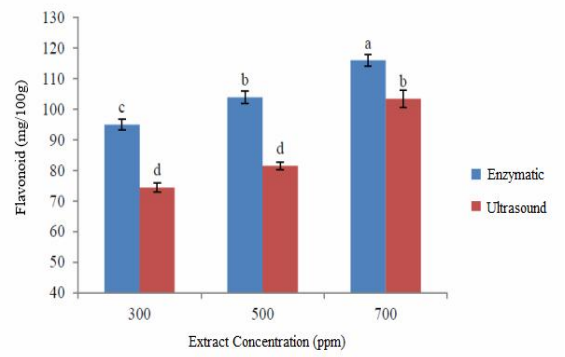

Fig 3 Total flavonoid of total extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

۳- ۵- نتایج آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج تأثیرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه یونجه با آزمون‌های میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن در شکل‌های (٤) و (۵) توصیف شده‌اند و بیانگر رابطه مستقیم غلظت عصاره‌های استخراجی از یونجه به روش آنزیمی و فراصوت با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشند و البته روش آنزیمی با عملکرد مطلوب‌تری همراه بوده است. نتایج ارزیابی آنالیز واریانس در مورد هر دو روش مذکور حاکی از رد Ho و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود ($p < ۰/۰۵$). در تحقیقات بورا و شارما [۲۷] و الدّساری[1] [۲۸] نیز با افزایش غلظت عصاره یونجه، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد. رانا و همکاران[2] [۲۹] نیز به بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه یونجه پرداختند و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره یونجه میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و نیز قدرت احیاکنندگی آهن افزایش می‌یابد. کمالی و همکاران [۳۰] نیز در تحقیقات خود بر روی گیاه دارویی زرین (*Dracocephalum kotschyi*) نشان دادند که افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد دارد و با افزایش غلظت افزایش میزان مهار رادیکال‌های آزاد مشاهده شد و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان دادند. این نتایج با دستاورد شریعتی‌فر [۳۱] نیز بر روی گیاه علف هیضه مشابه بود.

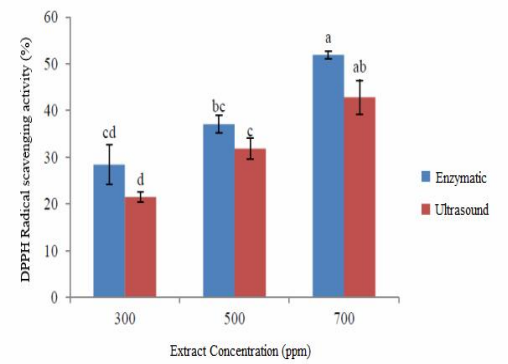

Fig 4 DPPH Radical scavenging activity of different concentration of extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

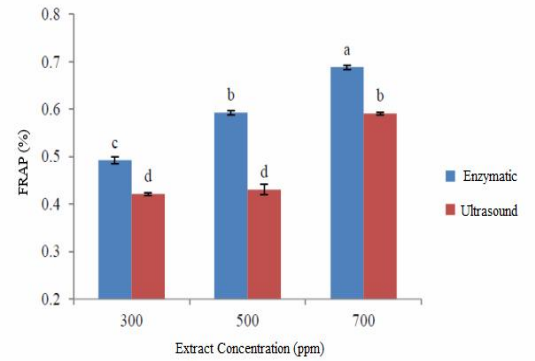

Fig 5 FRAP of different concentration of extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

با توجه به نمودارهای پیشین و مقایسه عملکرد روش‌های استخراج آنزیمی و فراصوت، چنین نتیجه‌گیری شده که روش آنزیمی از عملکرد مطلوب‌تری برخوردار بوده است؛ بنابراین، در ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی از کلروفیل‌های استخراج-شده به روش آنزیمی استفاده شده است. نتایج ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه یونجه در قالب اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد DPPH، میزان مهار رادیکال ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن به ترتیب در شکل‌های (٦) تا (٨) قابل رؤیت می‌باشند. مطابق این نمودارها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های بالاتر کلروفیل استخراج شده بیشتر بوده است. نتایج ارزیابی آنالیز واریانس نیز حاکی از رد Ho و بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف کلروفیل کل جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود ($p < ۰/۰۵$) و نشان داد که تمامی گروه‌ها با سطح معناداری ۵ درصد با یکدیگر اختلاف دارند.

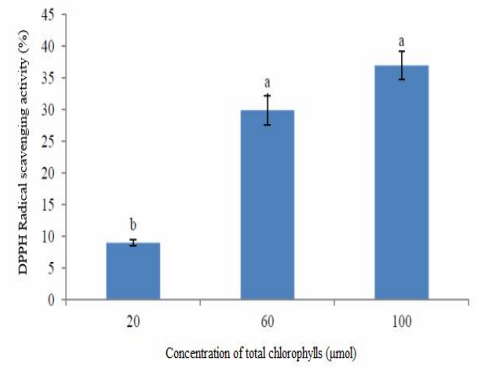

Fig 6 DPPH Radical scavenging activity of different concentration of total chlorophyll concentration.

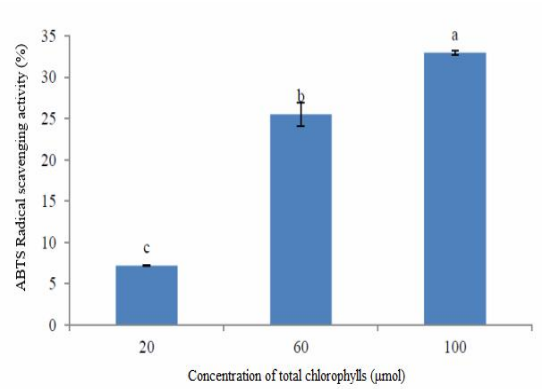

Fig 7 ABTS Radical scavenging activity of different concentration of total chlorophyll concentration.

1 Al-Dosari, 2012
2 Rana et al., 2010

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

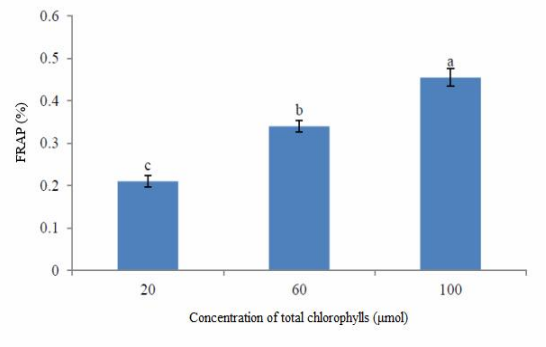

Fig 8 FRAP of different concentration of total chlorophyll concentration.

٤- بحث

نتایج حاصل از این تحقیق بر مبنای استخراج آنزیمی و استخراج فراصوت از گیاه یونجه نشان داد که غلظت کلروفیل a بیشتر از غلظت کلروفیل b بوده است. روش آنزیمی مزیت بیشتری به همراه داشته و در غلظت‌های بالاتر عصاره‌ی این گیاه و نیز کلروفیل مستخرج از آن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی یعنی مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن و مهار رادیکال آزاد ABTS نیز بیشتر بوده است. نتایج این آزمایش نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها رابطه مستقیم با مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل دارد. برخی مطالعات نیز نشان دادند که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌ها از جمله عصاره‌های قطبی می‌باشد [۳۱]. ترکیبات فنلی به‌صورت مؤثری به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده لـذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر لحاظ می‌گردند [۳۲].

عصاره گیاه یونجه حاوی ترکیبات فنلی، انتوسیانین و فلاونوییدی نیز می‌باشد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و مطابق نتایج این تحقیق نیز کلروفیل استخراج‌شده به شیوه‌ی آنزیمی از این گیاه، اثر آنتی‌اکسیدانی قابل توجه‌تری نشان داد و از روش استخراج آنزیمی می‌توان به‌عنوان محرکی جهت افزایش میزان کلروفیل استفاده نمود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد، توانایی زیادی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار کردن رادیکال آزاد متفاوت ممکن است تا حدی مربوط به تنوع وسیع مواد آنتی-اکسیدانی از قبیل فنل‌ها، آسکوربات و کاروتنوئیدها باشد.

فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به دلیل ایجاد مکانیسم دفاعی، گیاهان را در برابر اشعه ماوراءبنفش، عوامل بیماریزا و موجودات گیاه‌خوار محافظت می‌کنند. فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در تنظیم فعالیت‌های آنزیمی و تولید متابولیت‌های اولیه نقش دارند [۳۳]. با توجه به اهمیت و کاربرد فراوان متابولیت‌های ثانویه در زندگی امروزی بشر بررسی منابع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به-عنوان منابعی ارگانیک می‌تواند بسیار مفید باشد [۳٤]. افزایش ترکیبات فنلی نیز با افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم دارند و بنابراین، گیاه یونجه نیز به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و با توجه به دارا بودن آنتوسانین، فلاونوئیدها و نیز ترکیبات فنلی، می‌تواند به‌عنوان منبعی از متابولیت‌های ثانویه در صنایع دارویی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین از آن می‌توان به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

٥- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق از رنگ‌دانه کلروفیل و عصاره حاصل از گیاه یونجه جهت انجام آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی استفاده گردید. جهت استخراج نیز از دو روش آنزیمی و اولتراسوند به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که در روش آنزیمی مقادیر اندازه‌گیری شده برای فنل کل و ترکیبات فلاونوئیدی عصاره بیشتر بوده و همچنین عملکرد آنتی-اکسیدانی عصاره نیز قابل توجه‌تر بوده است. به همین‌منظور روش آنزیمی به‌عنوان مبنای کار قرار گرفته و از این روش به‌منظور ارزیابی پایداری و سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی کلروفیل یونجه استفاده شد. در اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات فنل کل و فلاونوئیدها در عصاره نیز نتایج روش آنزیمی مطلوب‌تر بوده و افزایش تمامی این متغیرها با افزایش غلظت عصاره همسو بوده‌اند. روش آنزیمی در ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره یعنی میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن نیز مطلوب‌تر از روش فراصوت بوده و با افزایش غلظت عصاره، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافته است.

٦- منابع

[1] Shahidi, S. A. (2022). Effect of solvent type on ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Ficaria kochii: Optimization by response surface

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

Characterization, *15*, 327-340.

[11] Roy, A., Sitalakshmi, T., Geetha, R. V., Lakshmi, T., & Priya, V. V. (2011). In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of the Ethanolic Extract of Dioscorea villosa (Wild Yam) Tubers. *Drug Invention Today*, *3*(9).

[12] Nazari, Z., Honarvar, M., & Dianat, M. (2021). Evaluation of the effects of extraction method, duration and harvesting time on qualitative and quantitative features of *Medicago sativa*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*, 4868-4875.

[13] Al-Snafi, A. E., Khadem, H. S., Al-Saedy, H. A., Alqahtani, A. M., & El-Saber, G. (2021). A review on Medicago sativa: A potential medicinal plant. *Int. J. Biol. Pharm. Sci. Arch*, *1*, 22-33.

[14] Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Deng, X. P., & Kwak, S. S. (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant physiology and Biochemistry*, *47*(7), 570-577.

[15] Mehdizadeh, A., Shahidi, S. A., Shariatifar, N., Shiran, M., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2022). Physicochemical characteristics and antioxidant activity of the chitosan/zein films incorporated with Pulicaria gnaphalodes L. extract-loaded nanoliposomes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-11.

[16] Lotfi, L., Kalbasi-Ashtari, A., Hamedi, M., & Ghorbani, F. (2015). Effects of sulfur water extraction on anthocyanins properties of tepals in flower of saffron (Crocus sativus L). *Journal of food science and technology*, *52*, 813-821.

[17] Choi, W. Y., & Lee, H. Y. (2017). Enhancement of chlorophyll a production from marine Spirulina maxima by an optimized ultrasonic extraction process. *Applied Sciences*, *8*(1), 26.

[18] Iranian National Standardization Organization. (2019). Vegetable fats and oilsDetermination of the degradation products of chlorophylls a and a' (pheophytins a, a' and pyropheophytins) Amd No.1. 14838-A1.

[19] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., & Amiri, Z. R. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound□assisted extraction methodology. *Food and Chemical Toxicology*, *163*, 112981.

[2] Kulshreshtha, M., Goswami, M., Rao, C., Ashwlayan, V., & Yadav, S. (2011). Estimation of antioxidant potential of aqueous extract of Ficus bengalensis leaf on gastric ulcer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *9*(1), 122-126.

[3] Sahreen, S., Khan, M. R., & Khan, R. A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. *Food chemistry*, *122*(4), 1205-1211.

[4] Karimi, F., Hamidian, Y., Behrouzifar, F., Mostafazadeh, R., Ghorbani-HasanSaraei, A., Alizadeh, M., ... & Asrami, P. N. (2022). An applicable method for extraction of whole seeds protein and its determination through Bradford's method. *Food and Chemical Toxicology*, *164*, 113053.

[5] Ahmadi, A., Shahidi, S. A., Safari, R., Motamedzadegan, A., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2022). Evaluation of stability and antibacterial properties of extracted chlorophyll from alfalfa (Medicago sativa L.). *Food and Chemical Toxicology*, *163*, 112980.

[6] Arjmandi, J., Shahidi, S. A., Ghorbani-HasanSaraei, A., Limooei, M. B., & Raeisi, S. N. (2022). Sudan I monitoring as a hazardous azo dye using an electroanalytical tool amplified with NiO/SWCNTs-ionic liquid catalysts. *Chemosphere*, *309*, 136673.

[7] Moss, B. W. (2002). The chemistry of food colour. *Colour in food: Improving quality*, 145-178.

[8] Nezhad, H. M., Shahidi, S. A., & Bijad, M. (2018). Fabrication of a nanostructure voltammetric sensor for carmoisine analysis as a food dye additive. *Anal Bioanal Electrochem*, *10*, 220-229.

[9] Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in food science & technology*, *52*, 1-15.

[10] Mehdipoor Damiri, G. R., Motamedzadegan, A., Safari, R., Shahidi, S. A., & Ghorbani, A. (2021). Evaluation of stability, physicochemical and antioxidant properties of extracted chlorophyll from Persian clover (Trifolium resupinatum L.). *Journal of Food Measurement and*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]

Linn. against ischemia and reperfusion insult. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2011*. DOI: 10.1093/ecam/neq019.

[28] Al-Dosari, M. S. (2012). In vitro and in vivo antioxidant activity of alfalfa (Medicago sativa L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats. *The American journal of Chinese medicine*, *40*(04), 779-793.

[29] Rana, M. G., Katbamna, R. V., Padhya, A. A., Dudhrejiya, A. D., Jivani, N. P., & Sheth, N. R. (2010). In vitro antioxidant and free radical scavenging studies of alcoholic extract of Medicago sativa L. *Romanian Journal of Biology-Plant Biology*, *55*(1), 15-22.

[30] Kamali M, Khosroyar S, Jalilvand M. (2014). Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin contents and antioxidant capacities of different extracts of aerial parts of Dracocephalum kotschyi. *North Khorasan University of Medical Sciences*; *6* (3) :627-634.

[31] Shariatifar N. (2012). Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant pulicaria gnaphalodes. *Internal Medicine Today*, 17 (4) :35-41.

[32] Bahramikia, S., & Yazdanparast, R. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of different fractions of Anethum graveolens leaves using in vitro models. *Pharmacol online*, *2*, 219-33.

[33] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M. Ü. N. E. V. V. E. R., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A. T. A. L. A. Y., ... & Ozkan, H. İ. C. A. B. İ. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. *Food chemistry*, *103*(4), 1449-1456.

[34] Karimi-Maleh, H., Darabi, R., Karimi, F., Karaman, C., Shahidi, S. A., Zare, N., ... & Rajendran, S. (2023). State-of-art advances on removal, degradation and electrochemical monitoring of 4-aminophenol pollutants in real samples: A review. *Environmental Research*, 115338.

methods. *Food science & nutrition*, *2*(4), 426-435.

[20] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(10), 3010-3014.

[21] Hosseini, F., Motamedzadegan, A., Raeisi, S. N., & Rahaiee, S. (2022). Antioxidant activity of nanoencapsulated chia (Salvia hispanica L.) seed extract and its application to manufacture a functional cheese. *Food Science & Nutrition*. DOI: 10.1002/fsn3.3169.

[22] He, J., Huang, B., Ban, X., Tian, J., Zhu, L., & Wang, Y. (2012). In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from Meconopsis quintuplinervia. *Journal of ethnopharmacology*, *141*(1), 104-110.

[23] Then, M. (2003). Examination on antioxidant activity in the greater celandine (Chelidonium majus L.) extracts by FRAP method. *Acta Biologica Szegediensis*, *47*(1-4), 115-117.

[24] Saberian, H., Hosseini, F., & Bolourian, Sh. (2017). Optimizing the extraction condition of chlorophyll from Alfalfa and investigating its qualitative and quantitative properties in comparison to different plant resources. *Journal of food science and technology (Iran)*, *71*(14), 47-57. (In Persian).

[25] Dias, M. C., Figueiredo, P., Duarte, I. F., Gil, A. M., & Santos, C. (2014). Different responses of young and expanded lettuce leaves to fungicide Mancozeb: chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation, pigments and proline content. *Photosynthetica*, *52*(1), 148-151.

[26] Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S., Song, H., & Xia, C. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from Chlorella vulgaris residue after lipid separation using response surface methodology. *Journal of food science and technology*, *51*, 2006-2013.

[27] Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Evaluation of antioxidant and cerebroprotective effect of Medicago sativa

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Comparison of antioxidant properties of chlorophyll extracted from alfalfa (*Medicago sativa L.*) using enzymatic and ultrasonic extraction methods

Ahmadi, A. [1], Shahidi, S. A. [2*], Safari, R. [3], Motamedzadegan, A.[4], Ghorbani-HasanSaraei, A. [5]

1. Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
3. Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran.
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
5. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 02/ 10
Accepted 2023/ 03/ 13

Keywords:

Alfalfa,
Antioxidant properties,
Chlorophyll,
Enzymatic method,
Ultrasonic.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.99
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2

*Corresponding Author E-Mail:
sashahidy@yahoo.com

ABSTRACT

Nowadays, natural pigments are widely used in the food, cosmetics and sanitation industries. In recent years, numerous researches have been done on the methods of extraction and evaluation of the properties of natural pigments. The purpose of this study is comparison of enzymatic and ultrasonic extraction methods for the antioxidant properties of chlorophyll extracted from alfalfa (*Medicago sativa* L.). Antioxidant activity was performed by three methods including DPPH and ABTS free radicals scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The results show that the concentration of chlorophyll a in alfalfa is higher than that of chlorophyll b and also the enzymatic method demonstrates higher yield in chlorophyll extraction. In addition, higher concentrations of alfalfa extract showed higher antioxidant activity in inhibiting DPPH free radicals and ferric reducing antioxidant power ($p < 0.05$). Also, with increasing the extract concentration, total phenolic compounds and flavonoid compounds increase ($p < 0.05$). Due to the better performance, the enzymatic extracted chlorophyll was used to evaluate the antioxidant properties, inhibition of free radicals DPPH and ATBS and ferric reducing antioxidant power and the result shows the higher chlorophyll concentration, the higher antioxidant properties. Due to the appropriate antioxidant effect of alfalfa chlorophyll extracted by enzymatic method, its application in food, pharmaceutical and health industries can be evaluated and industrial scale extraction systems can be designed using this technique.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.99]