

اثر روش‌های استخراج با کمک اولتراسوند و سیال فوق بحرانی بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی عصاره دارچین

سپیده سهراب پور^{۱*}، رضا اسماعیل زاده کناری^۲، زینب رفتنی امیری^۲

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

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده مهندسی و زراعی

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۰)

چکیده

با توجه به مشکلات متعدد گزارش شده، علاقه مصرف کنندگان به استفاده از افزودنی‌های طبیعی به جای افزودنی‌های سنتتیک امری اجتناب ناپذیر گردیده است. تحقیق پیش رو با استفاده از تیمارهای استخراج با کمک اولتراسوند و سیال فوق بحرانی، پس از اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی، به اندازه گیری فعالیت ضد اکسایشی عصاره ها با آزمون‌های حذف کنندگی رادیکالهای آزاد DPPH، رنگبری بتاکاروتن و قدرت کاهندگی فریک (FRAP) و در نهایت اندازه گیری مقدار توکوفرول کل نمونه ها پرداخته است. نتایج حاصل نشان داد که فراصوت (دمای ۴۵ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه) قادر به استخراج ترکیبات فنولی بیشتری می باشد و قدرت آنتی اکسیدانی این عصاره در هر سه آزمون در مقایسه با عصاره سیال فوق بحرانی (فشار ۱۰۰ بار، دما ۵۵ درجه سانتیگراد، سرعت جریان دی اکسید کربن ۱۶ گرم بر دقیقه، سرعت جریان اتانول (بعنوان اصلاحگر) ۴ میلی لیتر بر دقیقه و زمان استخراج ۳ ساعت، بیشتر می باشد) به ترتیب 29.95 ± 10.13 و 21 ± 10.13 میلی گرم بر میلی لیتر). قدرت آنتی اکسیدانی این عصاره در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در غلظت های مختلف متفاوت بود بطوریکه در غلظتهای کمتر از ۲۰۰۰ ppm آنتی اکسیدان TBHQ قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری از عصاره فراصوت از خود نشان داد (به ترتیب 70.57 ± 16.96 و 60.26 ± 16.96 درصد). فعالیت ضد باکتریایی (حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی) این عصاره ها در برابر چهار باکتری بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی شامل دو گونه گرم منفی اشرشیاکلی و سودوموناس آنروژینوزا، و دو گونه گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی گردید و نتایج نشان داد که غلظت ۵۰۰ ppm هر دو عصاره قادر به بازدارندگی و نیز کشندگی کلیه باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه می باشد.

کلید واژگان: فراصوت، سیال فوق بحرانی، عصاره دارچین، فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت آنتی اکسیدانی

*مسئول مکاتبات: sepidesohrabpour@gmail.com

۱- مقدمه

امروزه مصرف کنندگان نگرانی‌های عمده‌ای در ارتباط با استفاده از محصولات با کیفیت بالا، سالم و طبیعی با هدف بهره‌مند شدن از زندگی سالم دارند [۱]. تنش اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل دینامیکی بین تعدادی از رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن و سطوح آنتی اکسیدانی برای از بین بردن و/یا مهار آنها و محافظت از بدن در برابر اثرات زیان بار آنها مطرح می‌باشد [۲]. ترکیبات تولید شده در طی اکسیداسیون از جمله هیدروپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن یگانه می‌تواند باعث آسیب‌های بیولوژیکی مولکول‌ها گردد [۳]. این امر منجر به آسیب‌های سلولی و گسترش اختلالات فیزیولوژیکی غیرطبیعی در انسان مانند پیری زود رس، سرطان، آتروزکروز، آب مروارید و بیماری‌های قلبی و عصبی شود. ایمنی غذایی به طور موثری مربوط به سلامت عمومی بوده و این امر توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود معطوف داشته است [۴]. بطوریکه آلودگی مواد غذایی توسط هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز یک دغدغه برای مصرف کنندگان و تولید کنندگان مواد غذایی می‌باشد که منجر به ایجاد نگرانی‌های اساسی در جامعه و صنعت غذا می‌گردد [۱]. آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند ¹BHT، ²BHA، ³TBHQ به منظور کنترل یا کاهش سرعت اکسیداسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات مختلف در این زمینه نشان داده‌اند که آنتی اکسیدان‌های سنتزی برای سلامت انسان مضر و سرطان‌زا هستند [۳]. علاوه بر این، در سال‌های اخیر، نگهدارنده‌های شیمیایی سنتزی مورد استفاده قرار گرفته در کارخانجات مواد غذایی با هدف کنترل رشد باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی و بیماری‌زا، یک بحث چالش برانگیز بوده است. به دلیل مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در برابر آنتی بیوتیک‌ها، امروزه تلاش در جهت استفاده از ترکیبات ضدباکتریایی طبیعی به منظور محافظت از مواد غذایی می‌باشد [۱]. لذا، ضرورت جایگزینی آنتی اکسیدان‌های سنتزی با انواع طبیعی و یافتن منابع طبیعی دارای فعالیت ضدباکتریایی مناسب به منظور افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی امری اجتناب ناپذیر و مسئله‌ای حائز اهمیت است [۳ و ۴].

در سال‌های اخیر، علاقه به شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی و عوامل آنتی میکروبی مورد توجه محققین بسیاری قرار گرفته است [۱]. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات زیست فعال هستند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی مناسب می‌باشند [۳]. علاوه، مطالعات بسیاری مشارکت ترکیبات فنولی در این فعالیت‌ها را به اثبات رسانده‌اند [۵ و ۶]. گیاهان و ادویه‌جات، به دلیل ویژگی‌های حسی، مطلوب و ویژگی‌های مناسب نگه‌داری، دارندگی‌شان، جهت بهبود طعم مواد غذایی بطور قابل توجهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. عصاره‌های گیاهی می‌توانند از گیاهان معطر مختلفی از جمله بوته‌ها و ادویه‌ها استخراج شوند. ادویه‌ها و عصاره‌های آنها به عنوان نگهدارنده‌های مواد غذایی سالم و بی‌خطر برای افزایش عمر ماندگاری و کاهش باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این زمینه، دارچین و عصاره‌های حاصل از آن توأماً، هر دو خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی را دارا می‌باشد [۴]. این خصوصیات در عصاره دارچین، به سینامالدهید به عنوان جزء غالب آن نسبت داده می‌شود [۲]. دارچین با بیش از ۲۵۰ گونه مختلف متعلق به خانواده *Lauraceae* و جنس *Cinnamomum* می‌باشد که علاوه بر مصرف گسترده آن در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی، در هندوستان، چین و استرالیا به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴].

سیستم‌های استخراج مختلفی به منظور استخراج ترکیبات پلی فنولی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱]. در طی چند دهه اخیر، تحقیقات زیادی در راستای شناسایی روش‌های مناسب استخراج با راندمان بالا و دوستدار محیط زیست انجام گردیده است [۷]. در نتیجه این تحقیقات، روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات زیست فعال گیاهان استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به استخراج با کمک فراصوت و سیال فوق بحرانی اشاره نمود [۳ و ۹].

هدف از این مطالعه، بررسی ویژگی‌های عصاره‌های طبیعی است که بتواند بطور همزمان بعنوان منبع آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی جهت مصرف در صنایع غذایی کاربرد داشته باشد. بدین منظور، پس از استخراج عصاره هیدروالکلی (اتانول ۵۰٪) دارچین به دو

1. Butylatedhydroxitoluene
2. Butylatedhydroxianisole
3. Tertiary butylhydroquinone

روش استخراج اولتراسوند (US) و سیال فوق بحرانی (SFE)، علاوه بر اندازه گیری مقدار ترکیبات فنولی و توکوفرولی، فعالیت ضد اکسیداتیو عصاره به روش های مختلف و نیز اثرات آنتی میکروبی آن بر روی باکتری های مختلف گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (اشرشیاکلی و سودوموناس آنروژینوزا) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روشها

۱-۲- واکنشگرها و استانداردها

Table1 Features of investigated pathogen bacteria

Type	GramReaction
<i>Staphylococcus aureus</i> PTCC1431	+
<i>Bacillus subtilis</i> PTCC1015	+
<i>Escherichia coli</i> PTCC1399	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC1310	-

۱-۱- دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲-۲- پیریدین، تری کلرو استیک اسید (TCA)، واکنشگر فولین سیوکالتیو، کرینات سدیم، اسید گالیک، ترتیاری بوتیل هیدروکسی کوئینون (TBHQ)، بافر فسفات، فری سیانید پتاسیم، فریک کلراید، تولوئن، بتاکارتون، لینولئیک اسید، تووین و کلروفرم از شرکت سیگما-آمریکا خریداری گردیدند. پودر دارچین مورد استفاده، از مرکز طب سنتی ساری، مازندران، ایران تهیه گردید. باکتری های بیماری زای مورد مطالعه در این پژوهش از پژوهشکده ژنتیک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران تهیه گردید (جدول ۱).

ایران)، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، سرعت جریان دی اکسید کربن ۱۶ گرم بر دقیقه و سرعت جریان اتانول (بعنوان اصلاحگر) ۴ میلی گرم بر دقیقه در زمان استخراج سه ساعت قرار گرفت [۱۱].

۲-۴- اندازه گیری ترکیبات فنولی کل

مقدار ترکیبات کل فنولی عصاره دارچین به روش اسپکتروفتومتری (analytic Jena, spekol 2000، آلمان) و با استفاده از واکنشگر فولین سیوکالتیو به روش شرح داده شده توسط دلفانیان و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت و جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید [۳].

۲-۴-۱- ترسیم منحنی کالیبراسیون

بمنظور رسم منحنی کالیبراسیون، ابتدا محلولهای استاندارد اسیدگالیک در متانول با غلظتهای مختلف در دامنه ۰/۴ تا ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر آماده شد (کاپانسی و همکاران، ۲۰۰۰). سپس به بالن ژوژه های ۵۰ میلی لیتری، ۱ میلی لیتر محلول استاندارد گالیک اسید، ۶ میلی لیتر متانول، ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتیو و ۵ میلی لیتر کرینات سدیم ۷/۵ درصد افزوده و سپس به کمک آب مقطر به حجم رسانده شد. محلولها در شب نگهداری و سپس جذب آنها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت

لازم به ذکر است که کلیه آزمایشات بر روی عصاره مایع انجام شده و بمنظور رقیق سازی عصاره از حلال استخراجی (اتانل-آب ۵۰٪ حجمی-حجمی) استفاده گردیده است.

۲-۲- استخراج با کمک اولتراسوند

استخراج عصاره هیدرالکلی (اتانل ۵۰٪) به روش ساويز و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییرات انجام گرفت. بدین طریق که ۲۵ گرم از پودر دارچین با نسبت ۱ به ۵ با حلال اتانول-آب ۵۰ درصد (حجمی-حجمی) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد تحت تاثیر امواج فراصوت (ELMASONIC S10H، آلمان) با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز قرار گرفت و پس از صاف کردن در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد آن (Memert UF30، آلمان) خشک و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر با دمای ۱۸- در ظروف شیشه ای پوشش داده شده با فویل آلومینیومی نگهداری شد [۱۰].

۲-۳- استخراج با سیال فوق بحرانی

استخراج عصاره با سیال فوق بحرانی به روش چیناراسو و همکاران (۲۰۱۵) با تغییرات اندک صورت پذیرفت. در این روش ۱۵۰ میلی گرم پودر دارچین تحت فشار ۱۰۰ بار (مدل ۱۳۸۷،

$$\%I = \left(1 - \frac{A_{25}^0 - A_{25}^t}{A_{25}^0 - A_{25}^c}\right) \times 100 \quad (2)$$

که در آن به ترتیب، جذب عصاره در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت و به ترتیب، جذب شاهد در زمان صفر و پس از ۲۴ ساعت می‌باشد [۳].

۹-۲- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی، به روش میکرودیلوژن وندلین و همکاران (۱۹۹۷) با اعمال اندکی تغییرات، عمل گردید. جذب نمونه‌ها پس از آماده سازی پلیت‌های ۹۶ خانه ای، توسط الیزا ریدر (Stat Fax 2100- آمریکا) و در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت گردید [۱۵].

۱۰-۲- تجزیه تحلیل آماری

در پژوهش حاضر از طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار جهت ارزیابی اثر روش استخراج بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره دارچین استفاده شد. بررسی اثر معنی داری با استفاده از آزمون ANOVA و سپس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9.3 انجام گرفت. جهت ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel 2016 استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- اندازه گیری ترکیبات فنولی و توکوفرول کل

عصاره ها، مواد معطر و ترکیبات فرار حاصل از متابولیت‌های ثانویه گیاهان، بطور گسترده در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعات گذشته، فنول و برخی ترکیبات دیگر را از جمله اجزاء اصلی عصاره دارچین شناسایی و معرفی نموده‌اند [۱۶].

مقدار ترکیبات فنول و توکوفرول عصاره دارچین به عنوان شاخصه های کیفی مورد ارزیابی و نتایج در جدول ۲ نشان داده شد. بر اساس نتایج ارائه شده مشاهده می‌گردد که مقدار کل ترکیبات فنول استخراج شده به کمک امواج فراصوت (US) از

گردید. منحنی جذب در برابر غلظت اسید گالیک (میلی گرم در میلی لیتر) رسم و معادله (۱-۴) با ضریب تبیین ۰/۹۹ حاصل گردید:

$$Y = 0.0008X + 0.029 \quad (1-4)$$

که در آن X مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر و Y میزان جذب قرائت شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر می باشد [۱۲].

۵-۲- اندازه گیری میزان توکوفرول کل

اندازه گیری این ترکیب با استفاده از روش ارائه شده توسط ساویز و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید [۱۰].

۶-۲- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

اندازه گیری فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH بر مبنای روش اسپکتروفوتومتری و بر اساس گزارشات ارائه شده توسط لوسولا و همکاران (۲۰۱۲) در طول موج ۵۱۷ نانومتر و با اعمال اندکی تغییرات جزئی انجام گرفت و در نهایت درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول (۱) محاسبه گردید:

$$\%I = \frac{(A_E - A_F)}{A_E} \times 100 \quad (1)$$

که در آن وبه ترتیب جذب نمونه در غلظت های مختلف و جذب شاهد می باشد [۱۲].

۷-۲- توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن FRAP

متد استفاده شده جهت اندازه گیری قدرت کاهندگی فریک در این مطالعه مطابق روش رنگ سنجی استفاده شده توسط اسماعیل زاده کناری و همکاران (۲۰۱۴) می باشد که در آن پس از ترکیب مواد لازم، گرمخانه گذاری (Memert UF30، آلمان) و سانتریفیوژ کردن (200A* HERMEL Z، آلمان)، جذب نمونه ها در ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. به منظور مقایسه قدرت احیاء عصاره از TBHQ بعنوان استاندارد استفاده گردید [۱۴].

۸-۲- اندازه گیری میزان بتاکاروتن

به منظور اندازه گیری این فاکتور به روش دلفانیان و همکاران (۲۰۱۵) عمل گردید و پس از قرائت جذب نمونه ها در ۴۷۰ نانومتر، درصد قدرت آنتی اکسیدانی با فرمول (۲) محاسبه گردید:

نظر آماری دارای اختلاف معنادار می باشد ($p < 0.05$) و از نظر مقداری بیشتر از مقدار این ترکیب در عصاره سیال فوق بحرانی (SFE) می باشد (بترتیب 29.95 ± 10.13 و 21 ± 10.13 میلی گرم بر میلی لیتر). از آنجایی که عصاره استخراج شده با هر دو روش دارای ترکیبات زیست فعال بودند، عامل اصلی در تعیین ترکیبات فنولی به تفاوت در شرایط استخراج نسبت داده می شود. مطالعات موری و همکاران (۲۰۱۲) انجام شده بر روی انگور قرمز نشان داد که در استخراج با کمک اولتراسوند بیشترین میزان ترکیبات فنولی در ترکیب حلال ۵۰ درصد اتانول حاصل می گردد [۱۳]. بعلاوه، مطالعه گونز و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان داد که امواج فراصوت عاملی مهم در افزایش راندمان استخراج ترکیبات فنولی از عصاره از گوشت انگور می باشد [۷]. مقدار ترکیبات فنولی

حاصل از این پژوهش در مقایسه با مطالعه مشابه انجام گرفته بر روی دارچین توسط ال-باروتی و همکاران (۲۰۱۴) بیشتر بود (29.95 ± 10.13 mg/ml) که دلیل آن را می توان به تفاوت در روشهای استخراج، تفاوت در محیط رشد و نیز بخشی که عصاره گیاهی از آن استحصال می گردد نسبت داد [۴ و ۱۷]. مطالعه فنج و همکاران (۲۰۱۴) که بر روی عصاره نیشکر استخراج شده با کمک امواج فراصوت انجام گرفته و نیز نتایج گزارش شده توسط جی کون و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که در مقایسه با آنها مقادیر ترکیبات فنولی استخراجی در این پژوهش کمتر می باشد (بترتیب 117.5 ± 13 و 141.9 ± 7.17 میلی گرم بر میلی لیتر). [۱۸ و ۱۹]

Table 2 Comparisons of total phenolic and tocopherol compounds of US and SFE extracts (mg/ml)

Extraction Method	Tocopherol (mg/ml)	of total phenolic compounds (mg/ml)
Ultrasound assisted extraction	2.17 ± 0.5^{ab}	29.95 ± 10.13^{ab}
Supercritical fluid extraction	2.38 ± 0.5^{ab}	21 ± 10.13^b

Different letters in the column indicate significant differences. ($P < 0.05$)

۲-۳- قدرت آنتی اکسیدانی

مطالعه گونز و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که استفاده از تنها یک روش قادر به بیان ظرفیت آنتی اکسیدانی نمی باشد [۷]. لذا، از اینرو در تحقیق پیش رو که بر روی شش غلظت ۵۰۰ ppm، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ انجام شد، سه روش اسپکتروفوتومتری به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، اندازه گیری توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن و قدرت آنتی اکسیدانی رنگبری بتاکاروتن مورد بررسی قرار گرفت و در پایانتایج با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ مورد مقایسه قرار گرفت. جدول قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره های استخراج شده به دو روش استخراج با کمک امواج فراصوت (4US) و سیال فوق بحرانی (5SFE) را نشان می دهد.

در حالت کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که دارچین حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی می باشد و با وجود اختلاف آماری معنادار بین دو روش استخراجی با کمک امواج فراصوت و سیال فوق بحرانی، در مقدار ترکیبات فنولی تفاوت چشمگیری از نظر عددی با یکدیگر مشاهده نگردید. در مقایسه، روش سیال فوق بحرانی مقدار ترکیبات فنولی کمتری (10.13 mg/ml) را از گیاه استخراج نمود. مطالعات طباتا و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که سیال فوق بحرانی قادر به استخراج مقادیر بالاتری از ترکیبات فنولی می باشد [۲۰].

نتایج همچنین نشان داد که مقدار ترکیبات توکوفرول حاصل از این پژوهش از نظر آماری دارای اختلاف معنادار نبوده ولی از نظر مقداری، سیال فوق بحرانی قادر به استخراج ترکیبات توکوفرولی نسبتاً بالاتری از دارچین در مقایسه با امواج فراصوت می باشد (بترتیب 2.38 ± 0.5 و 2.17 ± 0.5 میلی گرم بر کیلوگرم ماده خشک).

4. Ultrasound assisted extraction

5. Supercritical fluid extraction

Table 3 The free radical scavenging capacity of US and SFE extracts (%)

Supercritical fluid extraction	Ultrasound assisted extraction	Concentration (ppm)
86.01±16.96 ^{Aa}	38.31±16.96 ^{Bf}	500
83.97±16.96 ^{Aa}	43.82±16.96 ^{Be}	1000
77.43±16.96 ^{Ab}	60.26±16.96 ^{Bd}	2000
73.09±16.96 ^{Ac}	77.21±16.96 ^{Ab}	3000
68.39±16.96 ^{Bd}	93.49±16.96 ^{Aa}	4000
60.64±16.96 ^{Be}	92.46±16.96 ^{Aa}	5000
70.57±16.96 ^{Ac}	70.57±16.96 ^{Ac}	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (P<0.05)

(۲۰۱۴) بالا بودن ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با یکدیگر رابطه مستقیم دارند [۲۲ و ۷].

بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی در این روش به دلیل مقدار بالای ترکیبات فنولی استخراج شده به غلظت‌های ۴۰۰۰ ppm و ۵۰۰۰ ppm عصاره US اختصاص داده شده (بترتیب 93.49±16.96 و 92.46±16.96). این نتیجه‌ها یافته‌های حاصل از مطالعات ال-باروتی و همکاران (۲۰۱۴) انجام شده بر روی دارچین مطابقت دارد [۲].

میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی بدست آمده از آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره پوست سیر در مطالعه ولینگری و پمپا (۲۰۱۵) در محدوده ۲۶٪ الی ۷۹٪ می‌باشد [۲۱] که در مقایسه با میانگین مطالعه پیش رو مقادیر کمتری می‌باشند (۳۸/۳۱٪ الی ۹۲/۴۶٪) و این نشان دهنده قدرت مهارکنندگی بالاتر عصاره دارچین به دلیل وجود ترکیبات فنولی بالاتر می‌باشد.

بر اساس نتایج مشاهده گردید که قدرت احیاکنندگی آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ در مقایسه با غلظت‌های ۳۰۰۰ ppm، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ ppm عصاره US کمتر و در مقایسه با غلظت‌های ۵۰۰۰ ppm، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm عصاره بیشتر بود و در هر دو حالت اختلاف از نظر آماری معنادار بود. مقایسه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره SFE در غلظت‌های پائین تر (۵۰۰۰ ppm، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰) در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ بالاتر و دارای اختلاف معنادار آماری بود. در حالی که غلظت ۳۰۰۰ ppm همین عصاره فاقد اختلاف آماری معنادار با این آنتی اکسیدان بود. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۴۰۰۰ ppm و

ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی از طریق فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد بطور گسترده ای بری عصاره‌های حاصل از گیاهان مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱]. این پارامتر در اصل به عنوان روشی برای تعیین توانایی نمونه‌ها برای کاهش رادیکالهای آزاد تعیین گردیده است [۱۳]. رادیکال آزاد DPPH بسیار پایدار بوده و رنگ بنفش تیره ای دارد که زمانی که احیا می‌شود رنگ آن روشن تر شده و باعث کاهش جذب در ۵۱۵ نانومتر می‌گردد [۱۳] که علت این کاهش جذب به واکنش بین ترکیبات فیتوشیمیایی و DPPH نسبت داده شده است [۲۱ و ۱۰] در این واکنشها، ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره‌ها بعنوان اهداکننده‌های هیدروژن به DPPH⁰ و تبدیل آن به فرم احیا شده DPPH-H عمل می‌کنند [۲].

مقایسه قدرت مهارکنندگی غلظت‌های مشابه دو عصاره مختلف نشان داد که قدرت مهارکنندگی در غلظت‌های ۵۰۰ ppm، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm عصاره SFE بیشتر و از نظر آماری دارای اختلاف معنادار می‌باشد (P<۰/۰۵). در غلظت ۳۰۰۰ ppm دو عصاره هیچ اختلاف آماری معناداری مشاهده نگردید ولی در غلظت‌های بالاتر عصاره‌ها، ۴۰۰۰ ppm و ۵۰۰۰ ppm اختلاف آماری معنادار بود. همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده، قدرت مهار رادیکال عصاره SFE در غلظت‌های پائین تر (۵۰۰ ppm، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰) در مقایسه با عصاره US بیشتر می‌باشد. درحالی‌که مطابق همین جدول، افزایش غلظت در عصاره US منجر به افزایش قدرت مهار رادیکال در غلظتهای بالاتر (۳۰۰۰ ppm، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰) گردیده است که علت آن را می‌توان به بالاتر بودن میزان ترکیبات فنولی استخراج شده در این روش استخراج داد. مطابق گزارش دولت آبادی و همکاران (۱۳۹۳) و گونز و همکاران

رادیکال آزاد انجام می دهد. [۲۵]. در این پژوهش در عصاره های گیاهی با بالاترین سطح فنول، بالاترین قدرت احیاکنندگی وجود داشت که این امر با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. مطابق نتایج ارائه شده در جدول ۴، نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره های مختلف از نظر قدرت احیاکنندگی اختلاف معناداری با یکدیگر و با آنتی اکسیدان سنتزی دارند. توان احیاء آهن در عصاره US در مقایسه با عصاره SFE بالاتر و مشابه آنتی اکسیدان سنتزی بود که دلیل آن ارتباط مستقیم ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد [۲۷ و ۲۲]. این افزایش توان احیاکنندگی تابع افزایش غلظت بود بطوری که در حالت کلی با افزایش غلظت عصاره US از ۵۰۰ به ۵۰۰۰ (بر حسب ppm) میزان جذب محلولهای حاوی عصاره بطور قابل ملاحظه ای افزایش یافت. باستانی غلظت ۱۰۰۰ ppm که توان احیاکنندگی آهندر مقایسه با غلظت های ۲۰۰۰ ppm، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ و نیز آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ نشان داد. همچنین غلظت ۲۰۰۰ ppm که در مقایسه با غلظت های پائین تر (۵۰۰ ppm و ۱۰۰۰) توان احیاء آهن کمتری نشان داد که این استثنائات از نظر آماری فاقد اختلاف آماری معنادار بود. قدرت احیاکنندگی عصاره US در غلظت ۳۰۰۰ ppm و ۴۰۰۰ با آنتی اکسیدان سنتزی از نظر مقدار برابر بود. افزایش غلظت عصاره SFE هیچ تاثیر چشمگیری در افزایش توان احیاء آهن نداشت، بطوریکه مقدار آن در تمام غلظت ها از ۵۰۰ ppm تا ۵۰۰۰ ثابت بود. تغییر قدرت آنتی اکسیدانی و غیرخطی بودن وابستگی آن به غلظت در عصاره های SFE در این مطالعه با نتایج ارائه شده توسط ضیاء و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. در مطالعه این محقق نیز با وجود افزایش قدرت احیا با افزایش غلظت، از رابطه خطی منظمی تبعیت نمی نمود [۲۶]. بین غلظتهای مختلف عصاره US و غلظتهای مختلف عصاره SFE با یکدیگر هیچ اختلاف آماری معناداری وجود داشت. توان احیاء آهن آنتی اکسیدان سنتزی در مقایسه با عصاره SFE بالاتر و دارای اختلاف آماری معنادار چشمگیری بود. افزایش توان احیاء آهن عصاره US با افزایش غلظت در این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط لارس و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد.

۵۰۰۰ این عصاره با اختلاف آماری معنادار قدرت مهار رادیکال آزاد کمتری داشت.

گزارشات ارائه شده توسط آکچ و همکاران (۲۰۱۱) بر روی رزماری به عنوان ترکیب ضد اکسیداتیو طبیعی و مقایسه آن با آنتی اکسیدان سنتزی BHT قدرت آنتی اکسیدانی و مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بیشتر عصاره را نشان می دهد [۲۳].

تعیین توان احیاء آهن (FRAP)، از دیگر روشهای استفاده شده برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره در این پژوهش می باشد که در آن توانایی عصاره ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی مورد بررسی قرار می گیرد. حضور عوامل احیا کننده (آنتی اکسیدان ها) منجر به احیاء کمپلکس فری سیانید و تبدیل آنها به فروس می گردد که بسته به ظرفیت احیا کنندگی عصاره های مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ های سبز و آبی همراه است [۲۴].

قدرت احیاکنندگی عصاره ها، توانایی آنها را برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی نشان می دهد. حضور آنتی اکسیدان ها (احیا کننده ها) در عصاره که دهنده الکترون هستند منجر به احیاء کمپلکس های فری سیانید و تبدیل آنها به فرم فروس می شود [۲۵]. با توجه به جدول ۲، مقدار فنل کل در عصاره فراصوت در مقایسه با آب فوق بحرانی بیشتر (10.13 $\pm$ 29.95 mg/ml) و دارای اختلاف آماری معنادار می باشد ($P < 0.05$) و از آنجایی که رابطه مستقیم بالا بودن ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره توسط محققین زیادی گزارش گردیده [۲۷ و ۲۲]، بالا بودن توان احیاء آهن در عصاره فراصوت در مقایسه با عصاره SFE امری اثبات شده می باشد. در گزارش ارائه شده توسط گیلانی و همکاران (۱۳۹۴) نیز بیشترین قدرت احیاکنندگی متعلق به عصاره حاصل از روش اولتراسوند-آب-اتانل (۵۰:۵۰) است که بالاترین غلظت ترکیبات فنولی را دارا بوده است. مطابق یافته های این تحقیق نمونه های حاوی ترکیبات فنولی بالاتر، قدرت احیاکنندگی بالاتری هم داشته اند. ترکیبات فنولی عصاره ها می توانند با اهدای اتم های هیدروژن و واکنشهای زنجیری رادیکالهای آزاد را شکسته و اکسایش را به تاخیر اندازند، وجود عوامل اصلی قدرت احیاکنندگی است که فعالیت آنتی اکسیدانی را از طریق شکستن واکنش زنجیری

Table 4 Iron (II) chelating activity of US and SFE extracts (%)

Ultrasound assisted extraction	Supercritical fluid extraction	Concentration (ppm)
1.76±0.67 ^{Aa}	0.3±0.67 ^{Bb}	500
1.79±0.67 ^{Aa}	0.3±0.67 ^{Bb}	1000
1.73±0.67 ^{Aa}	0.3±0.67 ^{Bb}	2000
1.77±0.67 ^{Aab}	0.3±0.67 ^{Bb}	3000
1.77±0.67 ^{Aab}	0.3±0.67 ^{Bb}	4000
1.81±0.67 ^{Aab}	0.3±0.67 ^{Bb}	5000
1.77±0.67 ^b	1.77±0.67 ^{Bb}	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (P<0.05)

اختلاف آماری بین غلظت‌های مختلف عصاره US معنادار نبود، باستانی غلظت ۴۰۰۰ppm که با تمام غلظت‌های این عصاره دارای اختلاف آماری معنادار بود. مقایسه کلیه غلظت‌های عصاره US با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ نشان داد که قدرت رنگبری بتاکاروتن بالاتری از خود نشان دادند. باستانی غلظت‌های ۲۰۰۰ppm و ۴۰۰۰ که قدرت رنگبری کمتری از TBHQ داشتند (بترتیب 76.38±7.75 و 74.17±7.75). مقایسه کلیه غلظت‌های عصاره سیال فوق بحرانی (SFE) با آنتی‌اکسیدان سنتزی نشان داد که قدرت رنگبری TBHQ در مقایسه با کلیه غلظت‌های این عصاره بالاتر و دارای قدرت عملکرد بیشتری می‌باشد (92.98±7.75). باستانی غلظت ۲۰۰۰ppm هر دو عصاره که دارای اختلاف آماری معنادار بود، سایر غلظت‌های دو عصاره با هم اختلاف آماری معناداری نداشت (P<۰/۰۵). گزارش ارائه شده در مطالعه ال باروتی و همکاران (۲۰۱۰) بر روی پونه کوهی نشان داد این عصاره گیاهی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی عملکرد قویتری دارد [۲].

جدول ۵، نشان دهنده تاثیر عصاره ها در غلظت‌های مختلف و استاندارد (TBHQ) بر اکسیداسیون امولسیون بتاکاروتن-لینولئیک اسید می‌باشد.

Table5 β-carotene-linoleic acid bleaching activity of US and SFE extracts (%)

Ultrasound assisted extraction	Supercritical fluid extraction	Concentration (ppm)
92.98±7.75 ^{Ab}	84.63±7.75 ^{Bab}	500
92.98±7.75 ^{Aa}	85.59±7.75 ^{Aa}	1000
76.83±7.75 ^{Adc}	84.83±7.75 ^{Bab}	2000
97.62±7.75 ^{Aa}	85.21±7.75 ^{Aa}	3000
74.17±7.75 ^{Be}	85.78±7.75 ^{Ba}	4000
92.38±7.75 ^{Ac}	81.79±7.75 ^{Aab}	5000
78.14±7.75 ^d	92.98±7.75 ^b	TBHQ (100)

Means ±SD followed by capital letters within each row and small letters within each column are significantly different. (P<0.05)

در روش سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش لینولات-بتاکاروتن، رادیکال‌های آزاد لینولئیک اسید به ساختار غیراشباع کاروتنوئید حمله می‌کند. استفاده از عصاره‌های مختلف حاوی ترکیبات با اثر آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از طریق خنثی کردن رادیکال‌های آزاد لینولات و سایر رادیکال‌های تولید شده، از رنگبری بتاکاروتن در طی عملیات ممانعت نماید [۲۷]. در حالت کلی، استفاده از آنتی‌اکسیدان می‌تواند منجر به کاهش سرعت رنگبری بتاکاروتن گردد [۲۸]. بررسی نتایج حاصل از آزمون تعیین توان آنتی‌اکسیدان بتاکاروتن عصاره‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف عصاره‌های مختلف اختلاف آماری معناداری وجود دارد که در این بین استثنائاتی نیز وجود دارد. اختلاف بین عصاره‌های مختلف و آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ نیز از نظر آماری معنادار بود. نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۵ ارائه گردیده است. مطابق داده‌های این جدول، افزایش توان آنتی‌اکسیدانی و رنگبری تابع افزایش غلظت نبود. بیشترین قدرت ضد اکسیداتیو در این روش متعلق به غلظت ۳۰۰۰ppm عصاره فراصوت (US) بود (97.62±7.75) که در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی نیز بطور چشمگیری بالاتر بود.

۳-۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC^6) و

حداقل غلظت کشندگی (MBC^7)

عصاره دارچین جهت اثبات دارا بودن فعالیت ضدباکتریایی از نظر کمی و کیفی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون‌های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نشان داد که تمامی غلظت‌ها فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه هر دو گروه باکتری مورد مطالعه در این پژوهش دارند. بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره دارچین بر روی هر دو گروه باکتریهای گرم مثبت (*باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*) انتخاب شده در این پژوهش نشان داد که کمترین غلظت استفاده شده در این پژوهش (500 ppm) قادر به بازدارندگی و نیز مهار کلیه ریزاندامگان مورد مطالعه گردید که این امر بیان کننده قدرت ضدباکتریایی بسیار بالای عصاره دارچین می باشد که نشان می‌دهد عصاره این گیاه می تواند جایگزینی مناسب، مقرون به صرفه، طبیعی، بی خطر و قدرتمند برای نگهدارنده‌های شیمیایی مورد استفاده کنونی در صنعت غذا باشد.

مهمترین ترکیبات موثر فرار اسانس دارچین ترانس سینامالدهید^۸، لینالول^۹، اوژنول^{۱۰}، بنزنپروپانال^{۱۱} و سینامیل استات^{۱۲} بوده و تاثیر ضد میکروبی اسانس بر روی طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها به اثبات رسیده و خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی برای این ترکیب گزارش شده است. همچنین ویژگی های ضد میکروبی این اسانسها بحضور ترکیبات فنلی نسبت داده شده است. این ترکیبات غشای دو لایه فسفولپیدی سلول را حساس نموده و موجب افزایش نفوذ پذیری و نشت اجزای سلول مانند آهن، اسید نوکلئیک و اسیدهای آمینه شده و یا ممکن است به سیستم آنزیمی باکتری ها آسیب جدی برسانند. Duan و همکاران

(۲۰۰۹) فعالیت ضد میکروبی اسانس دارچین را به اوژنول نسبت دادند و Bouhid و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند سینامالدهید فراوانترین ترکیب در اسانس دارچین با مکانیزم ضدباکتریایی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث نشت یون پتاسیم داخل سلول از سلولهای باکتری شده و کاهش قابل توجهی در فعالیت متابولیک آن گذاشت. Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند در اسانسهایی که اثرات بازدارندگی کمی داشتند، اوژنول و سینامالدهید می تواند به طور مستقیم با خواص ضدباکتریایی مرتبط باشد. با بررسی های مختلف مشخص شد که اسانس دارچین می تواند از رشد باکتری های گرم مثبت و منفی جلوگیری کند [۲۹-۳۱].

نتایج حاصل از مطالعه ال باروتی و همکاران (۲۰۱۰) نیز با یافته های حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. بر اساس این مطالعه، عصاره دارچین با مقادیر MIC بین ۲۰ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به کاهش و مهار رشد باکتریهای *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنونومونیا* می باشد [۲]. بعلاوه، این نتیجه با گزارش ارائه شده توسط جمشیدی و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی دارچین انجام گرفته همخوانی داشته و موید اثر ضدباکتریایی قوی دارچین بر روی ریزاندامگان مشابه می باشد [۳۲]. علاوه بر این، کالال و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه ای که بر روی عصاره های گیاهی حاصل از ادویه ها و بوته های مختلف از جمله دارچین، نعناع و آویشن انجام دادند، اظهار داشتند که این عصاره ها می توانند با اثرگذاری بر دیواره سلولی باکتریها به داخل دیواره سلولی نفوذ کرده و غشاء سیتوپلاسمی آنها را تخریب نمایند و از این طریق منجر به از بین رفتن باکتریها گردند [۱]. یافته های حاصل از این پژوهش نیز مصداق بارز این گزارش بوده و قدرت ضدباکتریایی بالای عصاره دارچین بر انواع باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی مطالعه شده را تائید می نماید.

6. Minimum inhibitory concentration

7. Minimum bactericidal concentration

8. Cinnamaldehyde

9. Linalool

10. Eugenol

11. Benzenepropanal

12. Cinnamyl acetate

Table 6 Antimicrobial (MIC, MBC) activity of the US and SFE extracts

Extraction (ppm)	Gram Reaction	Type
Supercritical fluid extraction	Ultrasound assisted extraction	
500	500	+
500	500	+
500	500	-
500	500	-

Staphylococcus aureus PTCC1431*Bacillus subtilis* PTCC1015*Escherichia coli* PTCC1399*Pseudomonas aeruginosa* PTCC1310

۴- نتیجه گیری

مطالعه پیش رو با هدف معرفی دارچین بعنوان منبعی طبیعی به منظور جایگزینی آن با آنتی اکسیدانهای سنتزی و نگهدارنده‌های شیمیایی خطرناک انجام گرفت و نتایج نشان داد که قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ها با میزان ترکیبات فنولی- بعنوان دهندگان هیدروژن- رابطه مستقیم دارد، که در این زمینه گزارشات متعدد ارائه شده توسط توکلی و همکاران (۲۰۱۳)، ال-باروتی و همکاران (۲۰۱۰) و دلفانیان و همکاران (۲۰۱۵) با این نظریه همخوانی دارند [۳، ۲، ۳۳]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که، عصاره فراصوت (US) با مقدار ترکیبات فنولی بیشتر در مقایسه با عصاره سیال فوق بحرانی (SFE) دارای قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری بوده و توان ضد اکسایشی بیشتری حتی در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی دارد و از آنجایی که استخراج با کمک اولتراسوند به عنوان روش دوستدار محیط زیست و تکنولوژی سبز شناخته شده [۹۰] می‌توان از این روش جهت استخراج عصاره‌های گیاهی در صنعت استفاده نمود. کلیه غلظت‌های استفاده شده در این پژوهش قدرت میکروب کشی بسیار بالایی بر روی هر دو گونه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه دارد که دلیل آن به وجود سینامالدئید و اوجینول بعنوان عمده‌ترین ترکیبات فنولی با خاصیت ضد میکروبی و ضد اکسیداتیو نسبت داده می‌شود [۲]. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که دارچین می‌تواند به عنوان منبعی در دسترس، ارزان قیمت و غنی از ترکیبات زیست فعال طبیعی با عملکرد آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی قابل توجه، جایگزین بسیار مناسبی برای آنتی اکسیدان های سنتزی و نگهدارنده های

شیمیایی معرفی و در صنایع مختلف غذایی مورد استفاده قرار بگیرد که بر اساس نتایج حاصله غلظت ۵۰۰ ppm عصاره فراصوت قدرت بسیار بالایی در هر دو فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی هر دو گروه باکتری گرم مثبت و منفی از خود نشان داد و لذا استفاده از آن برای این منظور پیشنهاد می گردد.

۵- منابع

- [1] Kallela, F., Drissa, D., Chaaria, Lilia Belghitha, F., Bouaziza, F., Ghorbela, R., Ellouz Chaabouni, S. (2014). Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, Vol. (62), 8.
- [2] El-Baroty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S., and Saleh, M. A. (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, Vol. 4(6), 167-174.
- [3] Delfanian, M., Esmailzadeh Kenari, R., and Sahari Mohammad, A. (2015). Antioxidative effect of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit skin extract in soybean oil. *Food Science and Nutrition*, Vol. 3 (1), 74-80.
- [4] Yunbin, Zh., Xiaoyu, L., Yifei, W., Pingping, J., Siew Young, Q. (2015). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, Vol. 5(32), 1-21.
- [5] Mammadov, R; Ili, P; Ertem V, Havser, A. (2011). Antioxidant Activity and Total

- [14] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Raftani Amir, Z. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Food Science & Nutrition*, Vol. 2(4), 426–435.
- [15] Wendlin, I., Gasser, R., Emil, R. (1997). A Macrodilution well method for Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration Determination of Antimicrobials *Borrelia burgdorferi* in vitro. *Journal of Spirochetes and Tick-borne Disease*, Vol. 4(1/2), 7–10.
- [16] Gharekhani Mehre, Qorbani Mohammad, Rasulnejad Nasrin, Jabreily Shahrokh. (2010). New methods of extraction of bioactive compounds of medicinal plants: solvent and ultrasound assisted extraction, *Iranian Chemistry Engineering*, NO. 59. (Persian)
- [17] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., and Parajo, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145–171.
- [18] Simin Feng, Zisheng Luo, Beipei Tao, Chun Chen. (2014). Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. *LWT - Food Science and Technology*, 1e7.
- [19] Ji-Kun Xu, Ming-Fei Li, Run-Cang Sun. (2015). Identifying the impact of ultrasound-assisted extraction on polysaccharides and natural antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Process Biochemistry*.
- [20] Tábara T. Garmus, Losiane C. Paviani, Carmen L. Queiroga, Fernando A. Cabral. (2015). Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *J. of Supercritical Fluids*.
- [21] Vellingiri Vadivel, Pemiah Brindha. (2015). Antioxidant property of solvent extract and acid/alkali hydrolysates from rice hulls. *Food Bioscience*, Vol. 11, 85–91.
- [22] Dolat Abadi M, Raftani Amiri Z, Esmail Zadeh Kenari R. (2014). Comparison of total phenols and antioxidant properties of walnut Phenolic Content of *Gagea fibrosa* and *Romulea amiflora*. *Iranian Journal of Chemistry Engineering*, Vol. 30 (3), 57–62.
- [6] Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., and Ibanez, E. (2015). Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food.
- [7] Gonzalez-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rossell, C., Simal, S. (2014). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1–9.
- [8] Granato, D., and de Araujo Calado Veronica, M. (2014). The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. *Mathematical and Statistical Methods in Food and Technology*, First Edition. Section 1, 4–18.
- [9] Selin, S., Ruya, S. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 20, 595–602.
- [10] Saviz, A., Esmaeilzadeh Kenari, R., Khalilzadeh Kelagar, M.A. (2015). Investigation of Cultivate Zone and Ultrasound on Antioxidant Activity of Fenugreek Leaf Extract. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, Vol. 4(11S), 174–181.
- [11] Chinnarasu, C., Montesa, A., Fernandez-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Pereyra, C., Martinez de la Ossa, E.J., Patabhi, S. (2015). Natural antioxidant fine particles recovery from *Eucalyptus globulus* leaves using supercritical carbon dioxide assisted processes. *J. Of Supercritical Fluids*, Vol. 101, 161–169.
- [12] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A., (2000). Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemical*. 71: 553–562.
- [13] Lucila Lemos Lima Morelli, Marcelo Alexandre Prado. (2012). Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 1144–1149

- testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry., 85;633–640.
- [29] Duan, Zhao.(2009). Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in strawberry juice. J. Food Sci. 74 (3), M131–M137.
- [30] Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M., Manresa, A.(2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* induced by Cinnamon verum essential oil. J. Appl. Microbiol. 109 (4), 1139–1149.
- [31] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & 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.
- [32] Jamshidi M, Barzegar M, Sahari MA.(2013). Effect of gamma irradiation on the antioxidant and antimicrobial activities of cinnamon powder, Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology Vol. 7, No. 4. (Persian)
- [33] Tavakoli Javad, Hadad Khodaparast Hoeyn, Esmaeilzadeh Kenari Reza, Amin Lari Mahmud, Sharif Ali. (2013). Investigation antioxidant power of P.khinjuk oil as a new food source in Iran, Iranian Food Science and Technology Research Journal Vol. 9, No. 1,61-67. (Persian)
- (*Juglans regia* L.) green husk of three regions of northern Iran (Shahrood, Bandar Gaz and Hzargarib). FSCT. 11 (45) :183-192 (Persian)
- [23] Okoh O. O., Sadimenko A. P., and Afolayan A. J. (2011). Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydro-distillation and solvent free microwave extraction. African Journal of Biotechnology., Vol. 10(20), 4207-4211.
- [24] Lars, M., Kati, F., Bohm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay, Food Chemistry., 129:139–148.
- [25] Gillani, F; Raftani Amiri, Z; Esmailzadeh Kenari, R. (2016). Iranian food science and technology Research Journal. Vol. 13, No. 4. 517-527.
- [26] Xie, Z., Huang J., Xu X., and Jin Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food Chemistry., Vol. 111, 370-376.
- [27] Lillian Barros, Maria-Joao Ferreira, Bruno Queiros, Isabel C.F.R. Ferreira, Paula Baptista. (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chemistry., Vol. 103, 413–419.
- [28] T. Kulisica, A. Radonicb, V. Katalinicc, M. Milos. (2004). Use of different methods for

The effect of ultrasound assisted and super critical fluid extraction on antioxidant and antibacterial properties of cinnamon extract

Sohrabpour, S.^{1*}, Esmailzadeh Kenari, R.¹, Raftani Amiri, Z.¹

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

(Received: 2018/09/09 Accepted: 2019/03/11)

According to various reported problems, consumers' interest for using natural food additive and preservative agents instead of synthetic ones has become inevitable. In this paper, after determining the total phenolic compound, antioxidant activity of samples was investigated using three various methods of DPPH, FRAP and B-carotene bleaching power, and then, total tocopherol of the samples was measured for treated samples of two ultrasound assisted and supercritical fluid extraction procedures. Results proved that ultrasound (45°C, 30 minutes) was able to extract more phenolic compounds than subcritical fluid extraction (100bar, 55°C, $V_{Co2}=16$ gr/min, $V_{Ethanol}=14$ ml/min, time: 3 hours). As the result of that, Ultrasound assisted extraction expressed more antioxidant power than Supercritical fluid extractino in all three antioxidant assays. Comparing antioxidant power of both extracts with synthetic antioxidant (TBHQ) proved various results in different concentrationssuch that all treated samples less than 2000ppm indicated higher antioxidant activity than ultrasound assisted extraction (Respectively 70.57 ± 16.96 , $60.26 \pm 16.96\%$). A part from antioxidant activity, antimicrobial activity (MIC-MBC) of extracts examined on four various bacteria of both gram positive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) and negative (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) pathogenic ones. Results detected that 500ppm (the lowest concentration of this work) was the same concentration for both MIC and MBC assays.

Keywords: Ultrasound, Supercritical fluid extraction, Cinnamon extract, Antimicrobial activity, Antioxidant activity

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