



بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس و عصاره زیره سیاه استخراجی به روش های کلونجر و فراصوت

نازنین سپهری^۱، علی مرتضوی^۲، علیرضا صادقیان^{۳*}، احمد پدرام نیا^۴، مرتضی محمدی^۵

۱- دانشجوی دکتری، علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

گروه فرآوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۵- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

گروه فرآوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۹

کلمات کلیدی:

زیره سیاه،

اشرشیاکلی استفیلوکوکوس اورئوس،

MIC

رادیكال گیرندگی.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.5

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.16.0

* مسئول مکاتبات:

alisadeghian@yahoo.com

اسانس و عصاره زیره سیاه به دلیل ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی از اهمیت ویژه ای در حفاظت از غذاهای خام و فرآوری شده، برخوردار است. در مطالعه حاضر ترکیب شیمیایی، خواص ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی اسانس زیره سیاه استخراج شده به روش کلونجر و پیش فرآوری توسط امواج التراسوند (فرکانس های ۳۷ و ۸۰ کیلوهرتز و توان های ۷۰ و ۱۰۰ درصد) و بهینه یابی شرایط استخراج با توجه به ویژگی های شیمیایی اسانس بررسی شد. خصوصیات ضدباکتریایی اسانس زیره سیاه علیه باکتری های پاتوژن اشرشیاکلی و استفیلوکوکوس اورئوس با اندازه گیری حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری های پاتوژن با استفاده از روش میکرو-پلیت انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس با بررسی درصد مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH سنجیده شد. نتایج آنالیز اسانس زیره سیاه با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی نشان داد که عمده ترین ترکیب اسانس زیره سیاه استخراج شده گاما-ترپنین با ۳۰/۰۳ درصد به روش کلونجر، و ۳۱/۰۴ درصد به روش اولتراسوند بود. بیشترین راندمان اسانس و عصاره استخراج شده به روش کلونجر به ترتیب ۲/۰۴ و ۰/۷۵ درصد و در روش اولتراسوند با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد (۸۰/۱۰۰) ۲ و ۱ درصد بود. میزان ترکیبات فنولی در اسانس و عصاره استخراج شده به روش کلونجر به ترتیب ۱۳/۲ و ۱۱۱/۰۹ و در روش اولتراسوند (۸۰/۱۰۰) به ترتیب برای اسانس و عصاره ۱۸/۶۵ و ۱۴۱/۱۹ میلی گرم اسیدگالیک به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک بدست آمد. نتایج نشان داد که استفیلوکوکوس اورئوس حساس ترین و اشرشیاکلی مقاومترین باکتری نسبت به اسانس زیره سیاه بودند. بر این اساس، می توان بیان کرد که استخراج اسانس زیره سیاه با روش اولتراسوند اولتراسوند بیشترین تاثیر را در استخراج مواد موثره اسانس و عصاره داشته است و می تواند برای حفاظت از مواد غذایی در مقابل انواع سیستم های اکسیداتیو و میکروارگانیسم های عامل عفونت مورد استفاده قرار گیرد.

۱- مقدمه

زیره سیاه با نام علمی *Bunium Persicum Boiss* گیاهی چند ساله و خودگشن از خانواده چتریان است که در زبان انگلیسی *Black Caraway* نامیده می شود. زیستگاه طبیعی این گیاه در سطح جهان آسیای مرکزی، غربی، اروپای جنوب شرقی و درگستره ایران، استانهای تهران، قزوین، کرمان، خراسان، بندر عباس، اصفهان، فارس، سمنان و یزد است [۳-۱]. ایران در سال ۲۰۱۴ رتبه سوم تولید و صادرات زیره را داشته است و در سال ۲۰۱۵ پس از کشورهای هند، سوریه، ترکیه، چین در مقام پنجم قرار گرفت. زیره سیاه جز گیاهان دارویی مهم و اقتصادی کشور ایران به شمار می رود [۳]. اسانس زیره سیاه شامل کومین آلدهید، آلفا پینن، گاما-ترپینن و مواد موثر بسیار زیادی می باشد که در صنایع دارویی و غذایی کاربرد فراوان دارد. از زیره سیاه در طب سنتی در گرفتگی عضلات، به عنوان بادشکن، اشتها آور، خلط آور، افزایش دهنده ترشح شیر، طعم دهنده در صنایع غذایی و تقویت کننده معده استفاده می شود. همچنین، این گیاه دارای اثرات ضدسرطانی، کاهنده قند خون و قابض می باشد [۴].

اسانس تولیدی زیره سیاه بیش از سه برابر زیره سیاه می باشد [۳]. در مورد ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سیاه گزارش شده است که کیفیت اسانس آن تحت تأثیر شرایط محیطی و ساختار ژنتیکی است [۵]. در مقایسه ای که بین ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سیاه خودرو و زراعی در کشور هند صورت گرفته، مشخص شده است که اسانس نوع زراعی دارای کیفیت برتری است و دارای آلدئید بیشتر و ترپن هیدروکربن هایی مانند پاراسایمن و گاما-ترپینن است [۶]. زیره سیاه علاوه بر دانه، کاه و کلش نسبتاً زیادی تولید می کند که دارای ۱/۲ درصد اسانس دانه می باشد که از نظر ترکیب شیمیایی مشابه دانه های رسیده است [۶].

اسانس ها دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشند. اکسیداسیون در مواد غذایی روندی تخریبی است که باعث از بین رفتن ارزش غذایی و تغییر در ترکیبات شیمیایی آنها می گردد و چربی ها و روغن ها بیشتر از سایر مواد غذایی مستعد اکسیداسیون هستند، که باعث تندی چربی ها و روغن ها می شود [۷]. به علاوه محصولاتی که از اکسیداسیون لیپیدها حاصل

می شوند، می توانند روی اجزای دیگر موجود در ماده غذایی نیز اثرات منفی داشته باشند به طوری که علاوه بر اثرات نامطلوب ارگانولپتیک در محصولات غذایی با از بین بردن ویتامین ها و اسیدهای چرب ضروری و ایجاد ترکیبات سمی می توانند منجر به اثرات نامطلوب و عوارض سوء در بدن شوند [۸ و ۹]. اثرات سمی آنتی اکسیدان های مصنوعی از یک سو و استقبال مصرف کنندگان از مواد افزودنی طبیعی از سوی دیگر، موجب شده است تمایل به استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی در مصرف کنندگان افزایش یابد. این آنتی اکسیدان ها ترکیبات پلی فنلی هستند که در تمام گیاهان و تمام قسمت های آنها از قبیل برگ، ساقه، میوه، ریشه، بذر و غیره یافت می شوند [۱۰]. امروزه آنتی اکسیدان های طبیعی که از گیاهان و ادویه جات بدست می آیند به دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدانی، به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرند [۱۱]. در مطالعه ای که در مورد بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره های الکلی ۲۴ گیاه دارویی از جمله زیره سیاه و زیره سیاه جمع آوری شده از ایران انجام گردید، مشخص شد که محتوای ترکیبات فنلی زیره سیاه بیشتر از زیره سبز می باشد [۱۲].

روش های استخراج اسانس از گیاهان به دو دسته روش های سنتی و روش های نوین تقسیم می شوند. از روش های سنتی می توان به روش تقطیر با آب و بخار و استخراج با حلال های آلیو از روش های نوین می توان به روش های مایکروویو، امواج فراصوت و میدان های الکتریکی پالسی اشاره کرد. روش های نوین استخراج روش هایی بدون حلال آلی، سریع، با صرف میزان انرژی پایین و دارای ماندن بالا همراه با کیفیت خوب اسانس بدست آمده می باشند که این امر باعث شده است بسیار بیشتر مورد توجه قرار گیرند اما دسترسی به ابزار و وسایل اسانس گیری در این روش ها به سهولت امکان پذیر نیست [۱۳-۱۴]. از میان روش های مختلف، استخراج به کمک امواج التراسونیک، روشی ساده و کارآمد می باشد. افزایش بازده استخراج به کمک امواج التراسونیک عمدتاً به حفره سازی در مولکول بر اثر ارتعاش صوتی ایجاد شده نسبت داده می شود. مراحل فرایند استخراج ترکیبات گیاهی، از طریق امواج فراصوت، شامل تورم بافت برای جذب حلال و خروج ترکیبات از بافت به حلال با ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلولی است که این عمل انتقال جرم را ساده و سریع

1. Cuminaldehyde
2. α -Pinene
3. γ -terpinen

دانه خشک زیره سیاه از بازارهای محلی مشهد تهیه شد. اسانس‌گیریه روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت برای هر ۱۰۰ گرم نمونه آسیاب شده به همراه ۱۷۰۰ میلی‌لیتر آب صورت گرفت. سپس اسانس و عصاره به صورت جداگانه جداسازی شدند. اسانس‌ها در ویال‌های شیشه‌ای تیره رنگ در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند [۱۹]. همچنین به منظور انجام آزمایشات لازم روی عصاره حاصل از این روش، مقدار ۱۰۰ سی‌سی از اسانس باقیمانده در بالن کلونجر برداشته، خشک و در ظروف تیره رنگ و در بسته تا زمان انجام آزمایشات مربوطه، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد.

۲-۲- استخراج اسانس و عصاره به کمک فراصوت

برای این منظور ابتدا ۱۰۰ گرم نمونه زیره توسط دستگاه آسیاب شد و به همراه ۱۷۰۰ میلی‌لیتر آب به دستگاه اولتراسوند (IKA-T25, Germany) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با توان ۷۰۰ و ۷۰ درصد و فرکانس ۸۰ و ۳۷ کیلو هرتز به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس به سیستم کلونجر به مدت ۴ ساعت منتقل شد. اسانس و عصاره به صورت جداگانه جداسازی شدند. اسانس‌ها در ویال‌های شیشه‌ای تیره رنگ در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند [۱۹]. در اینجا نیز به منظور انجام آزمایشات لازم روی عصاره حاصل از این روش، مقدار ۱۰۰ سی‌سی از اسانس باقیمانده در بالن کلونجر برداشته، خشک و در ظروف تیره رنگ و در بسته تا زمان انجام آزمایشات مربوطه، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد.

۲-۳- راندمان استخراج اسانس و عصاره

ابتدا وزن اسانس حاصل، اندازه‌گیری و برای محاسبه بازده وزنی/وزنی، با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ (Shimadzu, Japan) و فرمول (۱) درصد اسانس تعیین شد:

$$\text{Essence Efficiency} = \frac{(m_{s,p} - m_p)}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

که در رابطه فوق $m_{s,p}$ و m_p به ترتیب وزن پلیت و نمونه و وزن پلیت خالی هستند و m_s وزن خشک گیاه می‌باشد. همچنین، به منظور بدست آوردن راندمان عصاره از فرمول (۲) استفاده شد:

می‌نماید. در محیط مایع، امواج صوتی باعث ایجاد کاویتاسیون می‌شود که سرعت کاویتاسیون، انقباض و انبساط‌های متوالی، بستگی به فرکانس التراسوند دارد و سبب تغییر شکل مواد جامد و افزایش تخلخل و انتقال جرم در میوه‌ها و دانه‌ها می‌شود [۱۵-۱۶]. تحقیقات صورت گرفته در مورد استفاده از امواج التراسونیک در استخراج اسانس و ترکیبات آن از گیاهان دارویی نظیر مریم‌گلی و زیره سیاه، حاکی از افزایش راندمان و کیفیت بهتر آن نسبت به روش‌های معمولی است [۶].

یکی از خواص اسانس‌های گیاهی، فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌باشد که در مطالعات بسیاری به آن اشاره شده است [۱۷-۱۸]. جستجو برای کشف عوامل ضد میکروبی سالم و موثر ادامه دارد که می‌تواند هم از لحاظ درمانی و هم از لحاظ پیشگیری، در مورد طیف وسیعی از عفونت‌های باکتریایی استفاده شود. این نیاز در سال‌های اخیر با ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو نمایان‌تر شده است [۱۰]. از آنجا تاکنون مطالعه‌ای روی مقایسه ویژگی‌های میکروبی اسانس و عصاره زیره سیاه و مقایسه اثر روش‌های استخراج بر خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن انجام نشده است، لذا هدف این تحقیق بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس و عصاره زیره سیاه می‌باشد. از سویی گیاهان دارویی موادی با فعالیت ضد میکروبی تولید می‌کنند، شرکت‌های داروسازی در حال حاضر به دنبال داروهای جایگزین از سایر منابع مانند گیاهان هستند. با توجه به اهمیت گیاهان دارویی خصوصاً گیاهان بومی کشور ایران که همچنان در بسیاری حوزه‌ها ناشناخته مانده‌اند و نیز تاثیر روش استخراج بر درصد و نوع ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌های گیاهی، در این مطالعه خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس گیاه زیره سیاه به عنوان گونه گیاهی معطر و ارزشمند، استخراج شده توسط امواج التراسوند مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج اسانس و عصاره به روش

کلونجر

۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید گالیک تهیه و ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت با ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف مخلوط شدند. در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از اسانس ها با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر، با معرف مخلوط شدند و محلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. نهایتاً جذب محلول ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شدند [۱۷].

۲-۷- تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC)

جهت ارزیابی شاخص (MIC) ابتدا کشت باکتریایی از باکتری های اشرشیاکلی ۶۳۸۹ ATCC و استافیلوکوکوس اورئوس ۹۵۳۸ ATCC در محیط کشت مولر هیتون به مدت ۲۴ ساعت برای تمامی باکتری های مذکور انجام شد، سپس برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند، ابتدا باکتری های لیوفلیزه به طور جداگانه روی محیط کشت مولر هیتون براث (مرک، آلمان) تلقیح و کشت میکروبی به منظور رسیدن به فاز لگاریتمی به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۲-۸- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

به منظور بررسی حداقل غلظت کشندگی، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های تعیین شده در روش MIC، به طور جداگانه روی محیط کشت مولر هیتون آگار منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۲-۹- تعیین قطر هاله عدم رشد

جهت ارزیابی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کشت میکروبی مورد نیاز با رقت ۰/۱ Cfu/ml برای باکتری های پاتوژن از سوسپانسیون نیم مک فارلند (1.5*10⁸ Cfu/ml) تهیه گردید و در محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. در مرحله بعد از اسانس مذکور در غلظت های (۲۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰، ۱۵۶۲، ۳۱۲۵، ۶۲۵۰، ۱۲۵۰۰ میلی گرم بر میکرولیتر) در چاهک هایی که به فاصله ۱۵ سانتی متر از یکدیگر در محیط کشت ایجاد شده بود به مقدار ۸۰ میکرولیتر تزریق گردید. از آنتی بیوتیک جنتامایسن به عنوان شاهد مثبت و از حلال اتانول به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پتری

$$(2) \quad Efficiency = \frac{(m_{de})}{m_m} \times 100$$

که در رابطه فوق m_{de} و m_m به ترتیب وزن عصاره خشک شده و وزن ماده اولیه می باشند.

۲-۴- جداسازی و شناسایی ترکیبات

تفکیک ترکیبات اسانس توسط روش کروماتوگرافی گازی با مشخصات گاز کروماتوگراف (Shimadzu) مدل 9A، نوع ستون DB-5، طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون انجام پذیرفت. دمای اولیه ستون ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه نگهداری شد. سپس، افزایش دما تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد در دقیقه برنامه ریزی شد. تزریق و آشکارسازی هردو در دمای ۲۹۰ درجه سانتیگراد انجام گرفت. گاز حامل ستون، گاز هلیوم با سرعت خطی ۳۲ سانتی متر بر ثانیه بود [۱۹].

۲-۵- ارزیابی قدرت جذب رادیکال های آزاد

اثر آنتی اکسیدانی اسانس ها با استفاده از روش اندازه گیری ظرفیت رادیکال گیرندگی^۴ به کمک رادیکال آزاد-فنیل، ۲-۲-هیدرازیل ۱-دی پیکریل^۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH ترکیبی بنفش رنگ است که به دلیل حضور گروه های فنیل در ساختار آن به راحتی به صورت رادیکال در آمده و یک رادیکال آزاد می باشد. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می دهد. در این روش برای مقایسه اثر آنتی اکسیدانی اسانس زیره از بوتیل هیدروکسی تولوئن استفاده شد. نمونه ها با غلظت های متفاوت با یک میلی لیتر از محلول ۰/۵ میلی مولار DPPH مخلوط و به وسیله متانول ۹۵٪ به حجم ۴ میلی لیتر رسانده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب محلول ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CT-5700) خوانده شد. درصد RSC توسط فرمول (۳) محاسبه گردید:

$$RSC(\%) = 100 \times (A_b - A_s / A_b) \quad (3)$$

در این فرمول A_b و A_s به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه می باشند.

۲-۶- ارزیابی ترکیبات فنولیک

برای اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی از معرف Follin-Ciocalteu استفاده شد. بدین منظور غلظت های

4. RSC: Radical Scavenging Capacity
5. DPPH

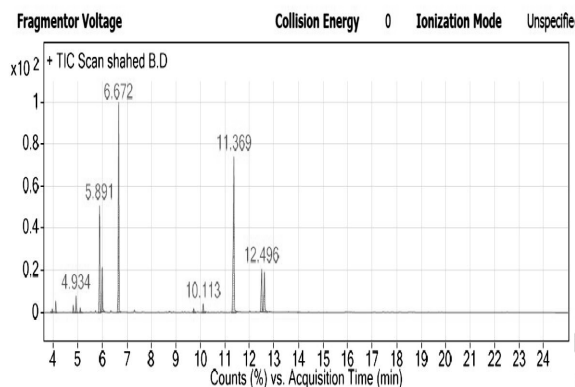


Fig 1 GC/MS chromatogram of black caraway extracted by Clevenger.

Table 1 The composition of black caraway extracted by Clevenger method, Retention time and area (from less to high amount).

	Compound	Retention time (min.)	Area Sum (%)
1	2-thujene	3.956	0.37
2	α -pinene	4.099	1.21
4	sabinen	4.812	0.8
5	β -pinene	4.934	1.94
6	β -myrcene	5.097	0.57
7	P-cymene	5.891	13.46
8	D-limonene	6	6.06
9	γ -terpinen	6.672	30.03
10	-4-Terpeneol	9.727	0.56
11	3-p-Menthen-7-al	10.113	1.38
12	Cuminal	11.369	29.31
13	α -terpinen-7-al	12.496	7.23
14	γ -terpinen-7-al	12.612	7.08
Total			100

همانطور که در جدول ۲ و شکل ۲ مشخص است بیشترین ترکیب تشکیل دهنده و استخراج شده از اسانس زیره سیاه استخراج شده به روش اولتراسوند (۸۰/۱۰۰)، ترکیب گاما ترپین با ۳۱/۰۴ درصد که نسبت به روش استخراج کلونجر، مقدار این ترکیب بیشتر بوده است و کمترین ترکیب، دو-تیوژن با ۰/۳۷ درصد می باشد. همچنین در ترکیباتی که در اسانس استخراج شده به روش اولتراسونیک به دست آمده است ترکیبات به ترتیب صعودی شامل گاما ترپین، کومینال، او سیمن، الفا-ترپین-۷-ال، گاما-ترپین-۷-ال و دی لیمون بودند. که ترکیب او سیمن به مقدار ۱۴/۳۸ درصد و ترکیب

دیش ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری و میانگین مربوطه گزارش شد [۱۰].

۲-۱۰- آنالیز آماری

آنالیز آماری شامل تجزیه واریانس داده ها برای تیمارهای با دوزهای مختلف، به کارگیری اسانس زیره سیاه در تست آنتی اکسیدان DPPH و همچنین مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه ای دانکن بود که توسط نرم افزار SAS نسخه ۱۶ انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس و

عصاره

خلاصه نتایج حاصل از تفکیک اسانس زیره سیاه و شناسایی مواد و نیز نمونه ای از کروماتوگرام اسانس زیره سیاه استخراج شده به روش کلونجر به ترتیب در جدول ۱ و شکل ۱ آورده شده است. در این نمودار ستون افقی زمان بازداری و ستون عمودی شاخص بازداری^۶ می باشد. در جدول ۱ ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زیره سیاه همراه با زمان بازداری و درصد هر ترکیب مشاهده می شود. در ترکیباتی که در اسانس استخراج شده به روش کلونجر به دست آمده به ترتیب صعودی شامل گاما-ترپین، کومینال، پی سیمن، الفا-ترپین-۷-ال، گاما-ترپین-۷-ال و دی لیمون بودند. همان گونه که داده ها نشان می دهد بیشترین ترکیب تشکیل دهنده و استخراج شده از اسانس زیره سیاه به روش کلونجر، ترکیب گاما ترپین با ۳۰/۰۳ درصد و کمترین ترکیب دو-تیوژن با ۰/۳۷ درصد می باشد. رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) ترکیبات عمده اسانس زیره سیاه را گاما-ترپین، کومین آلدهید و الفا ترپین گزارش نمودند که تا حدودی مشابه ترکیبات اسانس زیره سیاه در مطالعه حاضر می باشد. آنها مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده زیره سیاه را گاما-ترپین (۲۴/۲۱ درصد) و کومین آلدهید (۲۱/۰۷ درصد) پاراسیمن (۱۶/۵۶ درصد) بیان نمودند [۲۰].

6. Retention time

7. Retention index

یکسان بود. کوثری و همکاران (۲۰۰۴) همچنین بیان داشتند که قسمتهای مختلف گیاه که در اسانس گیری به کار می رود شامل (شاخه های اولیه، شاخه های ثانویه و ارتفاع گیاه) نیز بر روی محتوای اسانس تاثیر گذار است.

۳-۲- ارزیابی راندمان استخراج اسانس و عصاره

شکل ۳ میزان راندمان استخراج اسانس توسط تیمارهای مختلف زیره سیاه را نشان می دهد. با توجه به نتایج، روش استخراج به طور معنی داری بر راندمان استخراج اسانس تاثیر داشته است، به طوری که راندمان استخراج اسانس در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد و پس از آن تیمار ۳۷ کیلوهرتز و توان ۷۰ درصد بیشترین مقدار بوده است. بیشترین راندمان استخراج اسانس در روش کلونجر ۲/۰۴ درصد و در روش اولتراسوند (۸۰/۱۰۰) حدود ۲/۵ درصد بوده است.

همان طور که در شکل ۳ دیده می شود، راندمان استخراج عصاره در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد و پس از آن تیمار ۳۷ کیلوهرتز و توان ۷۰ درصد بیشترین مقدار بوده است. که با نتایج راندمان استخراج اسانس همخوانی داشته است و نشان می دهد که روش استخراج به طور معنی داری بر راندمان استخراج عصاره تاثیر داشته است. بیشترین راندمان استخراج عصاره در روش کلونجر ۰/۷۵ درصد و در روش اولتراسوند (۸۰/۱۰۰) حدود ۱ درصد بوده است. به نظر می رسد در تیمار با فرکانس ۸۰ هرتز به دلیل افزایش طول موج، منجر به کاهش اثر بر فرایند استخراج شده و ضریب نفوذ فرکانس کاهش یافته است که در نتیجه راندمان کاهش یافته است. شلماشی و همکاران (۱۳۸۹) با مطالعه بر عصاره گیری با استفاده از تکنیک اولتراسوند و مقایسه آن با روش سنتی سوکسله دریافتند که بازدهی استخراج عصاره با تکنیک التراسوند بسیار بالاتر از روش سنتی سوکسله بوده است [۲۳]. احمدیان و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی استخراج ترکیبات موثره عصاره گلبرگ زعفران با کمک امواج فراصوت با شدت ۱۰۰٪ و ۲۰٪ دریافتند که هرچه شدت امواج فراصوت بیشتر باشد، استخراج ترکیبات موثره نیز بیشتر می شود [۲۴]. که نتایج این مطالعه، مطابق با این پژوهش بوده است. همچنین زو و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که افزایش توان دستگاه التراسونیک از ۲۰ به ۱۰۰ درصد سبب افزایش

پیمنت-۲-ان-۷-ال ترانس به میزان ۰/۳۷ درصد نیز استخراج شده است.

فضل آرا و همکاران (۲۰۱۲) ترکیبات عمده اسانس زیره سیاه را به سه گروه ترپن هیدروکربن ها شامل ترکیبات (آلفا پینن، بتا پینن، سابینن، پاراسیمن، ترپینن) آلدیها شامل ترکیبات (کومین آلدیها، پارامنتا-۱ و ۲ دی ان-۷-ال، پارامنتا-۱ و ۴ دی ان-۷-ال) و الکها شامل ترکیبات اکومین الکل، پرپال الکل، ترانس وربنول، فنکول) تقسیم بندی نمودند [۲۱].

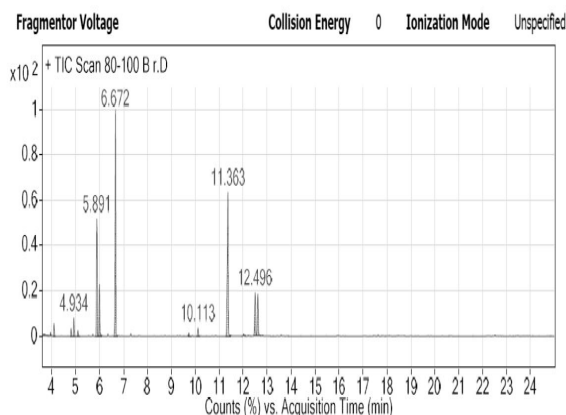


Fig 2 GC/MS chromatogram of black caraway extracted by ultrasound assisted (80/100).

Table 2 Composition of black caraway extracted by ultrasound assisted (80/100), retention time and area (from less to high amount).

Compound	Retention time (min.)	Area Sum (%)
1 2-thujene	3.956	0.37
2 IR- α -pinene	4.106	1.33
3 sabinen	4.812	0.83
4 β -pinene	4.934	2.02
5 β -myrcene	5.097	0.63
6 O-Cymene	5.891	14.38
7 D-limonene	6	6.49
8 γ -terpinen	6.672	31.04
9 (-)-4-Terpineol	9.733	0.44
10 3-p-Menthen-7-al	10.113	1.2
11 Cuminal	11.363	25.85
12 p-Menth-2-en-7-ol,trans-	12.021	0.32
13 α -terpinen-7-al	12.496	7.16
14 γ -terpinen-7-al	12.612	7.2
Total		99.26

در تحقیقی که امیری و همکاران (۱۳۹۲) انجام دادند بیشترین میزان ترکیب استخراج شده از زیره سیاه را به گاما ترپینن (۲۴ درصد) نسبت دادند [۲۲]. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر

اسید به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک، و در روش اولتراسوند با تیمار (۸۰/۱۰۰) ۱۸/۶۵ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک بوده است. همچنین بنظر می رسد علت کاهش ترکیبات فنلی در تیمار با فرکانس ۸۰ و توان ۷۰ به دلیل افزایش قدرت نفوذ امواج فراصوت و در نتیجه تخریب ترکیبات فنولی شده است که در نتیجه منجر به کاهش مقادیر فنولی شده است.

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود، روش استخراج بر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده تاثیر معنی داری داشته است. براین اساس بیشترین میزان ترکیبات فنلی استخراج شده از عصاره زیره سیاه در تیمار اولتراسوند با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است که با تیمار با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد تفاوت معنی داری نداشته است. همچنین بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک برحسب اسید گالیک برای عصاره ۱۹ در روش کلونجر به میزان ۱۱۱/۰۹ و در روش اولتراسوند با تیمار (۸۰/۱۰۰) ۱۴۱/۱۹ میلی گرم گالیک اسید به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک بوده است.

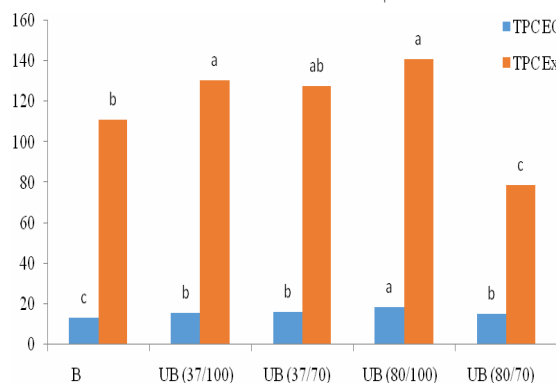


Fig 4 Effect of Ultrasound assisted method on the total phenolic compound of caraway essential oil (TPC EO) and extract (TPC Ex).

البوو همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که استفاده از روش اولتراسوند باعث افزایش کارتوسیک اسید استخراج شده از رزماری می شود، آنها نشان دادند اندازه گیری مقدار کلی ترکیبات فنولیک عصاره های استخراجی به روش های غرقایی و اولتراسوند حاکی از آن بود که روش استخراج تأثیر به سزایی بر میزان کل ترکیبات فنولیک دارد. تنش برشی حاصل از امواج مافوق صوت باعث شکسته شدن مولکول های پلیمری بزرگ و در نتیجه باعث استخراج بهتر ترکیبات فنولیک نسبت به روش غرقایی شده است [۱۵]. یاکینو و همکاران (۲۰۰۹) ضمن بررسی روند استخراج ترکیبات فنولیک از نوعی از مرکبات بیان داشتند که استفاده از اولتراسوند باعث افزایش معنی داری در استخراج ترکیبات فنولیک نسبت به روش غرقایی شده است [۲۶]. در

بازده استخراج ترکیبات شده است، زیرا در اثر انتشار امواج فراصوت در فاز جامد-مایع، چرخه های انقباض و انبساطی در محیط ایجاد شده که سبب تشکیل حباب های بزرگ تر و در نهایت متلاشی شدن دیواره سلول ها می شود [۲۴]. باتوجه به این موضوع که در گیاهان ترکیبات قطبی و غیر قطبی وجود دارند و با توجه به اینکه در این پژوهش حلال استخراج اسانس و عصاره آب بوده است، بنابراین می توان علت تفاوت در میزان اسانس و عصاره استخراج شده را غیر قطبی بودن اسانس و قطبی بودن حلال (آب) و از طرفی ماهیت قطبی بودن عصاره و حلال دانست. در قسمت ترکیبات فنلی نتایج نشان داده شد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد و فرکانس ۳۷ کیلوهرتز با توان ۱۰۰ درصد بوده است.

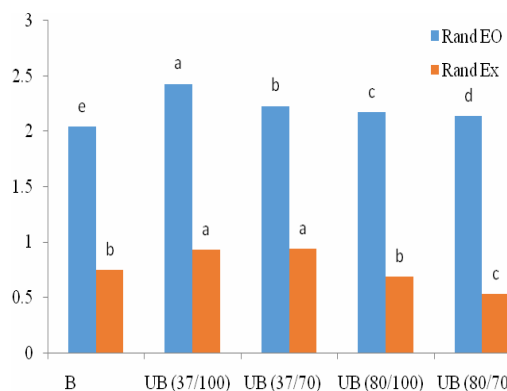


Fig 3 Effect of Ultrasound assisted method on the extraction efficiency of caraway essential oil (Rand EO) and extract (Rand EX).

۳-۳- اثر روش استخراج بر ترکیبات فنلی

اسانس و عصاره

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که روش استخراج بر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده تاثیر معنی داری داشته است. با توجه به شکل ۴، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در روش اولتراسوند نسبت به روش کلونجر استخراج شده و بیشترین مقدار در بین تیمارهای اولتراسوند در اسانس زیره سیاه، در تیمار با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است که با تیمار با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد تفاوت معنی داری نداشته است، که با نتایج راندمان استخراج نیز مطابقت دارد. بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک برحسب اسید گالیک برای اسانس در روش کلونجر ۱۳/۲ میلی گرم گالیک

با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل ۵ مشاهده می شود که بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پس از آنتی اکسیدان های مصنوعی بوتیل هیدروکسی اسید و اسید آسکوربیک، در عصاره زیره سیاه در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است که با تیمار با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۷۰ درصد تفاوت معنی داری نداشته است. که این تیمار در نتایج راندمان و میزان ترکیبات بیشترین مقدار را داشته اند. همچنین بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در عصاره استخراج شده در روش کلونجر ۲۵/۶۳۴ درصد و در روش اولتراسوند با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد (۳۷/۱۰۰) به میزان ۲۷/۷۹۱ درصد بوده است.

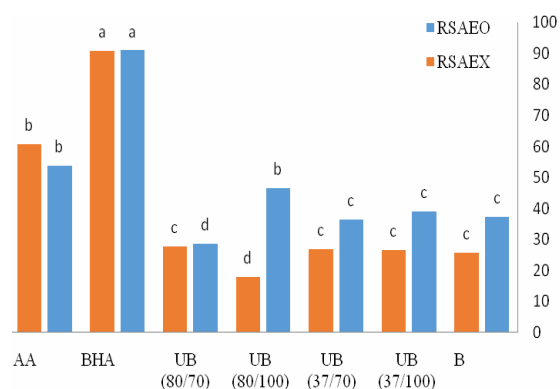


Fig 5 Effect of Ultrasound assisted method on the antioxidant activities of caraway essential oil (EO) and extract (Ex).

در پژوهش حاضر در بخش ارزیابی ترکیبات آنتی اکسیدانی در اسانس و عصاره نشان داده شد که بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در اسانس و عصاره به ترتیب در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد و فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است. احمدیان و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی استخراج ترکیبات موثره گلبرگ زعفران با کمک امواج فراصوت دریافتند که شدت صوت ۱۰۰ درصد، بیشترین تاثیر را بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی دارد [۲۴]. در پژوهشی که توسط سایر محققین بر روی استخراج عصاره از میوه داغداغان به کمک امواج فراصوت صورت گرفت، بیشترین درصد بازدارندگی رادیکال های آزاد DPPH را به بیشترین شدت صوت نسبت داده اند [۱۱]. پودی و همکاران (۱۳۹۶) با مقایسه ترکیبات فنولی استخراج شده از برگ گیاه فیجوا با کمک امواج فراصوت دریافتند که قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH به

پژوهشی دیگر که روی استخراج ترکیبات فنولی از میوه گارسینا/بندیکا صورت گرفت، محققین بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را به صوت های بالاتر نسبت دادند [۲۷].

دی و همکاران در مطالعه ای به بررسی تاثیر شدت امواج فراصوت بر جداسازی کارتنوئیدها از گیاه *Spirulina platensis* دریافتند که با افزایش میزان شدت امواج فراصوت، انرژی بیشتری به محیط منتقل می شود که سبب ایجاد پدیده حفره زایی با شدت بیشتری می شود [۱۶]. پودی و همکاران (۱۳۹۶) با مقایسه ترکیبات فنولی استخراج شده از برگ گیاه فیجوا با کمک امواج فراصوت دریافتند که هرچه شدت امواج فراصوت تا مقدار مشخص، بیشتر شود، حباب های بیشتری تولید می شود [۸]. در مطالعه دیگری قربانی و همکاران با بررسی تاثیر شرایط عصاره گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص اکسایشی عصاره گیاه رازیانه دریافتند که به منظور استخراج بیشتر عصاره گیاه رازیانه، استفاده از امواج فراصوت سبب دستیابی به بیشترین مقدار ترکیبات فنولی می شود [۲۲]. این یافته ها با نتایج این پژوهش همخوانی نشان داده است. به طور کلی می توان علت افزایش استخراج ترکیبات فنولی در مطالعه حاضر را این موضوع دانست که افزایش توان امواج، سبب افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی می شود، که این امر به دلیل تشدید انتقال جرم ناشی از فروپاشی حباب های کاویتاسیون در نزدیکی دیواره های سلولی می باشد. همچنین در زمان فروپاشی حباب های کاویتاسیون، یک جریان سریع امواج فراصوت ایجاد می گردد که به عنوان میکروپمپ عمل کرده و می تواند موجب استخراج بیشتر ترکیبات فنولی شود [۲۸].

۳-۴- ارزیابی اثر روش استخراج بر میزان

ترکیبات آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره

با توجه به نتایج تجزیه واریانس و شکل ۵ معلوم شد که پس از آنتی اکسیدان های مصنوعی بوتیل هیدروکسی اسید و اسید آسکوربیک، بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی در اسانس زیره سیاه در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است. همین طور بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در اسانس استخراج شده در روش کلونجر ۳۷/۱۸۵ درصد و در روش اولتراسوند با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد (۸۰/۱۰۰) به میزان ۴۶/۶۲۲ درصد بوده است.

قبولی روی سویه‌های اشیشیا کلی و / استافیلوکوکوس اورئوس دارد [۲۹]. در پژوهشی دیگر، اثر ضد میکروبی زیره سیاه روی اشیشیا کلی و سالمونلا تیفی اثبات شده است [۳۰]. رنجبریان و همکاران (۱۳۸۳) طی مطالعه‌ای اثر ضد باکتریایی چهار عصاره گیاهی از جمله زیره سیاه را بر هلیکوباکتریلوری، اشیشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. آنها نشان دادند که عصاره‌ی زیره سیاه رشد این باکتری‌ها را مهار می‌کند [۳۱].

Table 3 MIC and MBC results for E.coli and S.aureous in terms of mg/ml.

	S.aureous		E.coli	
	MIC	MBC	MIC	MBC
ST/EC				
Clevenger	25000	50000	50000	50000
Ultrasound assisted (80/100)	25000	50000	25000	50000

۳-۶- ارزیابی قطر هاله عدم رشد (چاهک)

طبق نتایج بدست آمده بیشترین قطر هاله عدم رشد (چاهک) مربوط به تیمار فراصوت با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد (۸۰/۱۰۰) بر روی باکتری اشیشیا کلی به میزان ۱۴ میلی‌متر بوده است (جدول ۴).

Table 4 Evaluation of inhibition of essential oil on the growth of E.coli and S.aureous.

Replication	Essential oil	
	Ultrasound 80/100	Clevenger
E.coli	14	18
S.aureous	10	12

۴- نتیجه‌گیری

بیشترین ترکیبات اسانس زیره سیاه استخراج شده به روش کلونجر شامل گاما-ترپینن، کومینال، پی‌سیمن، الفا-ترپینن ۷-ال، گاما-ترپینن ۷-ال و دی‌لیمون بودند، در مقابل بیشترین ترکیبات اسانس زیره سیاه استخراج شده به روش فراصوت شامل گاما ترپینن، کومینال، او سیمن، الفا-ترپینن ۷-ال، گاما-ترپینن ۷-ال و دی‌لیمون بودند. بر این اساس، روش استخراج به طور معنی‌داری بر راندمان استخراج اسانس تأثیر داشته است، به طوری که راندمان استخراج اسانس در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد و پس از آن تیمار ۳۷ کیلوهرتز و توان ۷۰ درصد بیشترین مقدار بوده است. بیشترین راندمان استخراج اسانس در روش کلونجر

دلیل بیشتر بودن میزان کل ترکیبات فنولی استخراج شده از برگ گیاه فیجوا با استفاده از شدت صوت بالا بوده است و هرچه شدت صوت بالاتر، استخراج ترکیبات فنولی بیشتر و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی نیز بیشتر است [۸]. که این گزارش با نتایج پژوهش ما مطابقت نشان داد. در واقع علت خروج بیشتر ترکیبات آنتی اکسیدانی در این تیمارها (۸۰/۱۰۰ و ۳۷/۱۰۰) در پژوهش حاضر را می‌توان به استخراج بیشتر ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی در شدت صوت ۱۰۰ درصد و در نتیجه افزایش تخریب دیواره‌های سلولی و خروج بیشتر این مواد نسبت داد.

۳-۵- ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی MIC و

MBC

همان طور که نتایج آزمایش MIC و MBC در جدول ۳ نشان می‌دهد، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس روی باکتری اشیشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس در تیمار فراصوت با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد (۸۰/۱۰۰) به ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰۰۰ و ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که امواج فراصوت به دلیل قدرت نفوذ بالا، وارد ساختار میکروارگانیسم شده و در نتیجه به دلیل تخریب دیواره سلولی آنها، میزان اسانس و عصاره بیشتری از سلول‌های زیره آزاد و در نتیجه مهارکنندگی و کشندگی افزایش داشته است. به عبارتی، نقش محافظت کنندگی دیواره سلولی در مقابل ترکیبات ضد میکروبی اسانس و عصاره زیره سیاه کاهش یافته است.

نتایج مطالعه حاضر در اسانس زیره سیاه، سیزده جزء را شناسایی کرد. کومینال، گاما ترپینن، پارا - متا او ۴ دی ان ۷ آل، بتا پینن و پارا - متا او ۳ دی ان ۷ ال اجزای عمده بودند. در اجزای استخراج شده در اسانس زیره سیاه در تحقیق حاضر به ترتیب به میزان ۷/۱۶ و ۰/۸۳ درصد مشاهده شده است. طی این مطالعه حضور میزان بالای کومینال (حدود ۲۶ درصد) در اسانس زیره سیاه می‌تواند فعالیت ضد باکتریایی آن را توضیح دهد. همچنین اجزای فرعی اسانس یعنی آلفا پینن^۸، سابینن^۹ هم دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند [۱۲]. طی مطالعه‌ای نشان داده شد که اسانس زیره‌هاثر ضدباکتریایی قابل

8. α -pinene
9. Sabinene

اولتراسوند تاثیر چشمگیری در بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضدباکتریایی اسانس و عصاره زیره سیاه داشته است و بیشترین تاثیر نیز در تیمار با فرکانس های ۸۰ و ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس و عصاره زیره سیاه می تواند برای حفاظت از مواد غذایی در مقابل انواع سیستم های اکسیداتیو و میکروارگانیسم های عامل عفونت مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

- [1] Azimzadeh M. Genetic assessment of Iranian Bunium persicum Boiss using ITS.MSc[thesis]. Tehran: University of Tehran 2009.[Persian].
- [2] Dehkhoda AA. Dictionary of Persian words. Vol 3.Tehran: University of Tehran; 1957. p. 879.[Persian].
- [3] Pour-seydi S. Assessment of germination and cytology of three Iranian caraway genus: Bunium, Carum and Cuminum. Tehran: University of Tehran; 1994. [Persian].
- [4] Trease GE, Evans WC. Pharmacognosy. London: Bailer Trindall; 1972.p. 515.
- [5] Steinegger E, Hansel R. Lehrbuch der pharmacognosie auf phytochemischer grundlage. Berlin: Springer Verlag; 1972. p. 348-82.
- [6] Haghiroalsadat F, Bernard F, Kalantar SM, Sheikha MH, Hokmollahi F, Azimzadeh M, et al. Bunium persicum(Black Caraway) of Yazd province: chemical assessment and Evaluation of its antioxidant effects. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2010; 18(4): 284-91. [Persian]
- [7] Catoni, C., Schaefer, H.M., Peters, A. (2008). Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. *Funct. Ecol.*, 22(4), 649-654.
- [8] Poodi, Y., Bimakr, M., Ganjloo, A., Zarringhalami, S. (2017). Optimization and comparative evaluation of ultrasound-assisted extraction of bioactive phenolic compounds from feijoa (*Feijoa sellowiana*) leaves. *Innovative Food Technologies*, 5(1), 49-64. doi: 10.22104/jift.2017.506.
- [9] Kamali, F., & Sadeghi Mahoonak, A., & Nasirifar, Z. (2015). The effect of ultrasound-assisted conditions on the extraction of phenolic compounds and flavonoids from autumn olive fruits (*elaeagnus umbellate*). *journal of food technology and nutrition*, 12(2 (46)), 23-32.

۲/۰۴ درصد و در روش اولتراسوند (۸۰/۱۰۰) حدود ۲/۵ درصد بوده است. باتوجه به این موضوع که در گیاهان ترکیبات قطبی و غیر قطبی وجود دارند و با توجه به اینکه در این پژوهش حلال استخراج اسانس و عصاره آب بوده است، بنابراین می توان علت تفاوت در میزان اسانس و عصاره استخراج شده را غیر قطبی بودن اسانس و قطبی بودن حلال (آب) و از طرفی ماهیت قطبی بودن عصاره و حلال دانست. بیشترین میزان ترکیبات فنلی در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد و فرکانس ۳۷ کیلوهرتز با توان ۱۰۰ درصد بوده است. روش استخراج بر میزان ترکیبات فنلی استخراج شده تاثیر معنی داری داشته است. همچنین، بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک برحسب اسید گالیک برای عصاره ۱۹ در روش کلونجر به میزان ۱۱۱/۰۹ و در روش اولتراسوند با تیمار (۸۰/۱۰۰) ۱۴۱/۱۹ میلی گرم گالیک اسید به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک بوده است. به طور کلی می توان علت افزایش استخراج ترکیبات فنلی در مطالعه حاضر را این موضوع دانست که افزایش توان امواج، سبب افزایش میزان استخراج ترکیبات فنولی می شود، که این امر به دلیل تشدید انتقال جرم ناشی از فروپاشی حباب های کاویتاسیون در نزدیکی دیواره های سلولی می باشد. همچنین در زمان فروپاشی حباب های کاویتاسیون، یک جریان سریع امواج فراصوت ایجاد می گردد که به عنوان میکروپمپ عمل کرده و می تواند موجب استخراج بیشتر ترکیبات فنولی شود. بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پس از آنتی اکسیدان های مصنوعی بوتیل هیدروکسی اسید و اسید آسکوربیک، در عصاره زیره سیاه در تیمار اولتراسونیک با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد بوده است که با تیمار با فرکانس ۸۰ کیلوهرتز و توان ۷۰ درصد تفاوت معنی داری نداشته است. که این تیمار در نتایج راندمان و میزان ترکیبات فنولی نیز بیشترین مقدار را داشته اند. همچنین بیشترین میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی در عصاره استخراج شده در روش کلونجر ۲۵/۶۳۴ درصد و در روش اولتراسوند با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ درصد (۳۷/۱۰۰) به میزان ۲۷/۷۹۱ درصد بوده است. نتایج نشان داد که حضور میزان بالای کومینال (حدود ۲۶ درصد) در اسانس زیره سیاه می تواند فعالیت ضد باکتریایی آن را توضیح دهد. همچنین اجزای فرعی اسانس یعنی آلفا پینن، سایننهم دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر میتوان بیان کرد که تیمار

- iranian white cheese. Iranian journal of food science and technology, 9(35), 35-44.
- [22] Amiri, H., & Biraminia, L. (2014). phytochemical evalution of ferulago angulata, bunium persicumand dorema aucheri from kerman province (iran). eco-phytochemical journal of medical plants, 1(4 (4)), 1-10.
- [23] Shalmashi, A., Amani, F (2010). Extraction of black cumin by ultrasound technique. Pharmaceutical plant conference, Sari, Iran.
- [24] Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R. (2016). Extraction of Active Components from Saffron Petal with the Help of Ultrasound and Optimization of Extraction Conditions. *Innovative Food Technologies*, 4(1), 121-135. doi: 10.22104/jift.2016.382.
- [25] Xu, Y .Pan, S. (2013). Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-translycopene from red grapefruit (Citrus paradise Macf.). *Ultrason.Sonochem.*, 20(4), 1026-1032.
- [26] Ya-Qin, Ma, Jian-Chu, Chen. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compound of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*., 16: 57-62.
- [27] Herrera, M.C., De Castro, M.L. (2004). Ultrasoundassisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Anal Biochem.*, 379, 1106-1112.
- [28] Ghorbani, M., & Aboonajmi, M., & Ghorbani javid, M., & Arabhosseini, A. (2017). Effect of ultrasound extraction conditions on yield and antioxidant properties of the fennel seed (foeniculum vulgare) extract. Iranian journal of food science and technology, 14(67), 63-73.
- [29] Mandana, B., Russly, A.R., Farah, S.T., Noranizan, M.A., Zaidul, I.S.M., Ali, G. (2013) Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from wintermelon (Benincasa hispida) and its antioxidant activityand fatty acid composition. *Molecules*, 18, 997-1014.
- [30] Nikavar B, Abolhasani F. Screening of antioxidant properties of seven umbelliferae fruits from Iran. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(1): 30-35.
- [31] Ranjbaran P, Sadeghian S, Shirazi MH, Sarraf-Nejad A, Fazeli MR, Amin GH, et al. Antibacterial effects of Cinnamon verum, Bunium persicum, Foeniculum vulgare and Anethum graveolens extracts on Helicobacter pylori via disk diffusion and flow cytometry. *J Hamedan Univ Medl Science* 2005; 33(3):4247.
- [10] Mahmoudi, R., Ehsani, A., Zare, P. (2012). Phytochemical, antibacterial and antioxidant properties of Cuminum Cyminum L. essential oil. *Food industry researches journal*. 22, 3.
- [11]n, Z., sa., A., k, F. (2013). Effect of extraction condition with two ultrasonic methods on phenolic, flavonoids and DPPH free radical scavenging of Celtis australis extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5(2), 115-129.
- [12] Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. essential oils. *J Agric Food Chem* 2005; 53(1): 57–61.
- [13] Ajith TA, Janardhanan KK. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40(3): 157-62.
- [14] Preuss HG, Echard B, Brook I, Elliott TB. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem* 2005; 272(1-2):29-34.
- [15] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorime, J. P. and Manson, T. J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidant from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*., 11(3-4):261-265.
- [16] Dey, S., Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted extraction of β -carotene from Spirulina platensis. *Ultrasonics Sonochem.*, 20, 271-276.
- [17] Mc Donald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.*, 73(1), 73-84.
- [18] Sour E, Amin G, Farsam H, Barazandeh Tehrani M. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *Daru* 2008; 16(2): 83-7.
- [19] Mekawey AAI, Mokhtar MM, Farrag RM. antitumor and antibacterial activities of [1-(2Ethyl, 6-Heptyl) Phenol] from Cuminum Cyminum seeds. *J App Scienc Res* 2009; 5(11):1881-1888.
- [20]Rafei, S., & Azizkhani, M., & Areaei, P. (2017). Impact of antioxidative properties of cumin and tarragon essential oils on the quality of full-fat white cheese. *journal of food technology and nutrition*, 14(4 (56)), 79-90.
- [21] Fazlara, A., & Sadeghi, E., & Rostami Soleimani, P. (2012). Study on the antibacterial effects of cuminum cyminum essential oil on listeria monocytogenes in



Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of essential oil and black cumin extract extracted by Clevenger and Ultrasound methods

Sepehri, N.¹, Mortazavi, A.², Sadeghian, A.^{3*}, Pedramnia, A.⁴, Mohammadi, M.⁵

1. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
4. Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
5. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 06/ 21
Accepted 2021/ 10/ 31

Keywords:

Cumin,
E.Coli,
S.Aureus,
MIC,
Radical scavenger.

DOI: 10.52547/fst.18.121.5

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.16.0

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

ABSTRACT

Essential oils and extracts of black cumin have been attracted researchers in the field of protection of raw and processed food due to their antimicrobial and antioxidant compounds. In the current study, the chemical composition, antibacterial and antioxidant properties of black cumin essential oil extracted by Clevenger and ultrasound assisted (frequencies 37 and 80 kHz and 70 and 100% power) methods were performed and the optimization of extraction conditions according to the chemical properties of the essential oil. Antibacterial properties of black cumin essential oil against E.coli and S.aureus were measured by measuring the minimum inhibitory concentration and the minimum lethal concentration of pathogenic bacteria using micro-plate method. The antioxidant activity of essential oil was measured by examining the percentage of DPPH free radical scavenging. The results of analysis of black cumin essential oil by GCMS showed that the main composition of black cumin essential oil extracted by Clevenger method was γ -terpene with 30.03% and in ultrasound method was 31.04%. The highest efficiencies of essential oils and extracts obtained by Clevenger method were 2.04 and 0.75%, respectively, and in ultrasound method (80/100) for essential oils and extracts were 2% and 1%, respectively. The results showed that S.aureus was the most sensitive and E.coli the most resistant bacteria to cumin essential oil. Therefore, it can be stated that the extraction of black cumin essential oil by ultrasound method (80/100) could have the greatest effect on the extraction of essential oils and extracts and can be used to protect food against various systems. Benefit from oxidative and microorganisms that cause infections and food poisoning.