



مقایسه ویژگی های آنتی اکسیدانی کلروفیل استخراج شده از گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) با

بهره گیری از روش های استخراج آنزیمی و فراصوت

امیر احمدی^۱، سید احمد شهیدی^{۲*}، رضا صفری^۳، علی معتمدزادگان^۴، آزاده قربانی حسن سرایی^۵

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

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

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

^۴استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

^۵دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

کلمات کلیدی:

روش آنزیمی،

روش فراصوت،

کلروفیل،

ویژگی های آنتی اکسیدانی،

یونجه.

امروزه از رنگ دانه های طبیعی به صورت گسترده ای در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده می گردد و طی سال های اخیر تحقیقات متعددی پیرامون روش های استخراج و بررسی خواص رنگ دانه های طبیعی انجام یافت. هدف از این تحقیق نیز مقایسه ویژگی های آنتی اکسیدانی کلروفیل استخراج شده از گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) با بهره گیری از روش های استخراج آنزیمی و فراصوت می باشد. فعالیت آنتی اکسیدانی با سه روش مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیا کنندگی 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 بر این غلظت های بالاتر عصاره یونجه فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری در مهار رادیکال آزاد DPPH و نیز قدرت احیا کنندگی آهن نشان داد ($p < 0.05$). همچنین، با افزایش غلظت عصاره، مقدار ترکیبات فنلی کل و ترکیبات فلاونوئیدی افزایش یافت ($p < 0.05$). به دلیل عملکرد مطلوب تر، از کلروفیل استخراج شده به روش آنزیمی در ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی یعنی مهار رادیکال های آزاد DPPH و ATBS و نیز قدرت احیا کنندگی آهن استفاده گردید و با افزایش غلظت کلروفیل نیز خواص آنتی اکسیدانی افزایش یافت. با توجه به اثر آنتی اکسیدانی مطلوب کلروفیل استخراج شده به روش آنزیمی از گیاه یونجه می توان کاربرد آن را در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی مورد ارزیابی قرار داد و با استفاده از این تکنیک سامانه های استخراجی در مقیاس صنعتی طراحی نمود.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.99
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.8.2

* مسئول مکاتبات:

sashahidy@yahoo.com

۱- مقدمه

همواره توجه به سلامت انسان در صنایع غذایی و دارویی مورد توجه بوده است و بهره گیری از مواد غذایی سالم در این خصوص بسیار مؤثر است. یکی از عوامل مخاطره آمیز سلامتی انسان، واکنش های اکسیداسیون در بدن به دلیل تولید رادیکال های آزاد می باشد که به آسیب یا مرگ سلول ها منجر می شود [۱]. پایین آمدن سطح آنتی اکسیدان ها در بدن منجر به پیری زودرس، سلول های آسیب دیده یا جهش یافته، نسج و بافت آسیب دیده، فعال شدن ژن های معیوب در DNA و افزایش فشار بر سیستم ایمنی بدن می شود [۲]. یافته های علمی حاکی از آن است که میوه ها و سبزی ها حاوی انواع مختلفی مواد مغذی و غیر مغذی نظیر رنگدانه ها هستند که به آنها ترکیبات فیتوشیمیایی می گویند. این ترکیبات از نظر بیوزیستی اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند و از ابتلا به برخی بیماری های مزمن نظیر انواع سرطان، بیماری های قلبی-عروقی و دیابت جلوگیری می کنند. از مهم ترین عملکردهای این ترکیبات مهار رادیکال های آزاد و اثرات آنتی اکسیدانی می باشند [۳ و ۴]. رنگدانه ها در حقیقت ترکیبات شیمیایی ای هستند که در گستره طول موج ناحیه مرئی قادر به جذب نور می باشند و از مهم ترین مزایای رنگدانه های طبیعی در کنار خواص سلامت بخش آنها می توان به تنوع و گستردگی رنگی آنها اشاره نمود [۵]. از بخش های مختلفی از اندام یک گیاه به عنوان رنگدانه استفاده می گردد که به دلایل مختلف دارای خواص متفاوتی نیز می باشند [۶]. در گیاهان چهار گروه اصلی رنگدانه شامل کلروفیل ها، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها وجود دارند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی می باشند. کلروفیل ها در واحدهای سلولی ویژه ای به نام کلروپلاست که به عنوان عامل فتوسنتز عمل می کند، واقع شده اند. کلروفیل ها که مهم ترین رنگدانه جذب کننده نور در فرآیند فتوسنتز می باشند و نقش اصلی آنها جذب انرژی نور و تبدیل آن به انرژی شیمیایی می باشد و عمدتاً به رنگ سبز مایل به آبی و یا سبز مایل به زرد می باشد. به عنوان رنگدانه غذا، کلروفیل عامل انتقال رنگ سبز پایدار به برگ اسفناج، کاهو و غیره می باشد. در میان انواع کلروفیل، دو نوع کلروفیل a و کلروفیل b که با نسبت های متفاوتی بر حسب شدت نور در بافت های گیاهان سبز وجود دارند و عمدتاً به نسبت ۳ به ۱ می باشند، در مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرند [۵]. این دو نوع کلروفیل دارای

ساختار مشابهی بوده و تفاوتشان در گروه R آن هاست. 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 آب دوست و زنجیر فیتولی یا دم کلروفیل قطب آب گریز (یا چربی دوست) آن را تشکیل می دهد و به همین جهت کلروفیل و مولکول های نظیر آن را ترکیبات دوپسند^۱ می نامند [۷].

امروزه تمایل فزاینده ای برای جایگزینی رنگ های مصنوعی در صنایع غذایی و بهداشتی با رنگ های 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 رنگدانه های مصنوعی در طولانی مدت مشاهده شده است [۸]. این در حالی است که رنگ های مشتق شده از منابع طبیعی، علاوه بر این که دارای کیفیت، کارایی و ویژگی های حسی مناسبی هستند، دارای اثرات دارویی متعددی از قبیل اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد کلسترول و دیابت نیز می باشند و بنابراین نقش مهمی در ارتقاء سلامتی انسان بر عهده دارند [۹]. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که فرایندهای اکسیداتیو را به تأخیر انداخته و به دو صورت مصنوعی و طبیعی وجود دارند. از عوارض جانبی آنتی اکسیدان های مصنوعی می توان به سرطان زایی و جهش زایی اشاره نمود [۱۰]؛ بنابراین لزوم استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی نظیر توکوفرول ها، فلاونوئیدها، کلروفیل ها و رنگدانه های گیاهان ضروری به نظر می رسد. آنتی اکسیدان ها می توانند استرس اکسیداتیو را در سلول ها کاهش دهند. از این رو، تجویز آنها برای درمان بسیاری از بیماری ها مفید و مؤثر است [۱۱].

از جمله گیاهان به منظور استخراج کلروفیل، یونجه می باشد. یونجه (*Medicago sativa* L.) گیاهی علفی و چندساله از تیره بقولات (*Fabaceae*)، با نام های انگلیسی *alfalfa* و *Lucerne* است. محتوی مواد شیمیایی گیاهی متنوعی همچون آلکالوئیدها، آمینواسیدها و آنزیم های ضروری، فیتواسترول ها، فیتواستروژن ها، فلاون ها، فلاونوئیدها، مواد معدنی، ساپونین، ویتامین ها است [۱۲]. این گیاه به علت غنی بودن از ویتامین ها و فیتواستروژن ها به عنوان افزودنی غذایی در چند کشور توسعه یافته استفاده می شود [۱۳]. در ایران یونجه رایج ترین محصول زراعی رشد یافته است. اجزای مختلف این

1. Amphiphilic compounds

۲-۲-۱- روش آنزیمی

در استخراج آنزیمی، ابتدا یک گرم از نمونه یونجه با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آبی بافر یا تامپون اسیدی ($\text{pH} = 3/5$) 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 ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید [۱۶].

۲-۲-۲- روش فراصوت

برای استخراج به روش فراصوت ۱۰۰ گرم از یونجه به یک لیتر اتانول ۹۶ 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 ۴ 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 سانتریفیوژ 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 ۶۶۳ و ۶۴۵ 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].

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V/100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V/100W$$

A: جذب نور در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳

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

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 [۱۴].

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 عصاره‌گیری 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 از نظر 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 تأیید نام علمی، برگ‌های گیاه یونجه خشک و سپس با استفاده از آسیاب پودر گردید.

۲-۲- روش استخراج

در دمای اتاق و مکان تاریک به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. محلول کاری، با رقیق کردن محلول اولیه در اتانول ۸۰ درصد، تهیه شده به طوری که جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر، ۰/۷ قرائت شود. محلول تهیه شده از کلرو فیل با محلول نهایی ABTS، مخلوط شده و جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت گردید [۲۲].

۲-۶-۳- بررسی قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP^۶)

جهت بررسی قدرت احیا کنندگی آهن، مقدار ۰/۱ گرم از عصاره یونجه با ۵ میلی لیتر آب مقطر در هاون چینی سرد در حمام یخ هموژن شد. هموژنات حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شده و سپس به ۵۰ میکرو لیتر از عصاره ی به دست آمده ۱/۵ میلی لیتر معرف FRAP (بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی مولار با pH=۳/۶، فریک-تری-پرییدیل-اس-تریازین و فریک کلرید) اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۳۰ °C انکوبه شد. جذب محلول ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به همراه ۱/۵ میلی لیتر معرف FRAP)، خوانده شد. لازم به ذکر است که آمونیوم فروس سولفات به عنوان شاهد برای مقایسه بکار رفت [۲۳].

۲-۷- تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام یافت. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به منظور ارزیابی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین مقادیر مورد سنجش استفاده گردید. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل خطای مجاز برای رد Ho، ۵ درصد در نظر لحاظ شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقادیر کلرو فیل

غلظت کلرو فیل های a و b استخراج شده از گیاه یونجه با استفاده از روش های فراصوت و آنزیمی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن مرطوب در شکل ۱ قابل رؤیت است و چنانچه مشاهده می گردد غلظت کلرو فیل a بیشتر از غلظت کلرو فیل b بوده و در روش آنزیمی نیز مقادیر کلرو فیل بیشتری استخراج

از نمونه مورد نظر منحنی کالیبراسیون رسم گردید. نمونه بهینه از نظر مقدار کلرو فیل استخراج شده با حلال مورد نظر، در غلظت های متفاوت تهیه شده و در طول موج حداکثر که نمونه ها بیک نشان دادند، بررسی شد. به این ترتیب نمونه و حلال بهینه- سازی شده، انتخاب و وارد فاز بعدی آزمایش گردیدند. کمپلکس پایدار نمونه های کلرو فیلین تهیه شده، توسط شاهد بافر فسفات در طول موج ۴۰۵ نانومتر که شدت جذب نور مرئی کلرو فیلین ها می باشد بررسی شدند.

۲-۴- اندازه گیری ترکیبات فنلی کل

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

۲-۵- اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی

مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی عصاره یونجه با استفاده از روش دوانتو و همکاران^۱ انجام شده و نتایج بر اساس میلی گرم بر صد گرم وزن خشک بیان گردید [۲۰].

۲-۶- آزمون های آنتی اکسیدانی

۲-۶-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد DPPH^۲

بدین منظور ۱ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره به طور جداگانه (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰) با ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH (مرک، آلمان) اضافه شده و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد قرائت گردید. قابل ذکر است که تمامی این مراحل در مورد BHA^۳ به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد انجام یافت [۲۱].

= درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

۱۰۰ × ((جذب شاهد) - (جذب نمونه - جذب شاهد))

۲-۶-۲- بررسی مهار رادیکال ABTS^۴

ارزیابی مهار رادیکال ABTS طبق مطالعه هی و همکاران^۵ با اندکی تغییر انجام یافت. در ابتدا ۷ میلی مولار از محلول ABTS با ۲/۴۵ میلی مولار پرسولفات پتاسیم مخلوط شده و

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

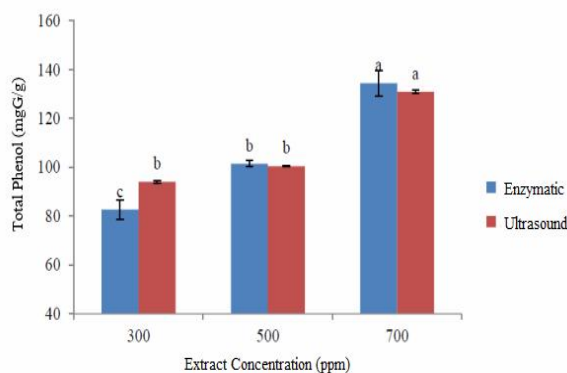


Fig 2 Total phenol of total extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

۳-۴- مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی

در شکل (۳) نیز مقدار ترکیبات فلاونوئیدی 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 ($p < 0.05$).

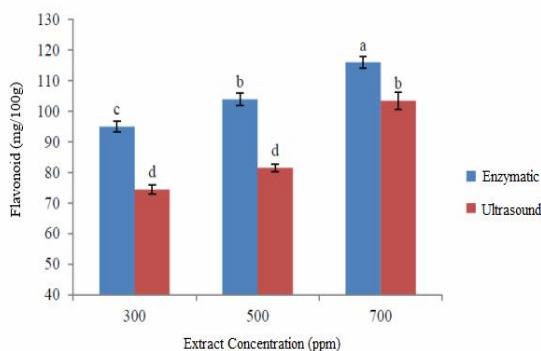


Fig 3 Total flavonoid of total extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

۳-۵- نتایج آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج تأثیرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه یونجه با آزمون‌های میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن در شکل‌های (۴) 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 H_0 و

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 ($p > 0.05$).

صابریان و همکاران [۲۴] در مطالعات خود بر روی گیاه یونجه نشان دادند که مقادیر کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b می‌باشد. همچنین، نتایج تحقیقات دیاس و همکاران [۲۵] و نیز کنگ و همکاران [۲۶] که بر روی برگ کاهو و ریزجلبک *Chlorella vulgaris* انجام یافتند، نشان داد که مقادیر کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b بوده است.

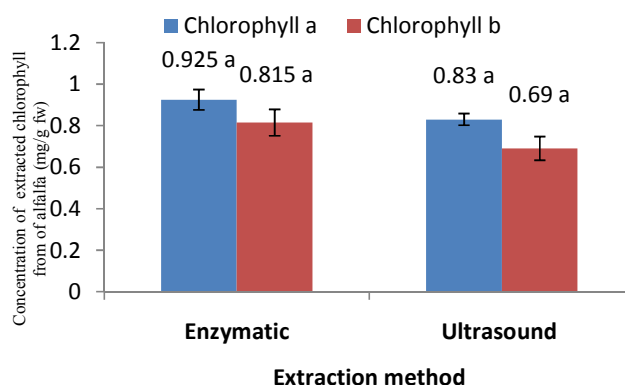


Fig 1 Concentration of extracted chlorophylls from alfalfa in two extraction methods.

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 ($p < 0.05$).

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 استخراج‌شده 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 (۶) تا (۸) قابل رؤیت می‌باشند. مطابق این نمودارها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های بالاتر کلروفیل استخراج‌شده بیشتر بوده است. نتایج ارزیابی آنالیز واریانس نیز حاکی از رد H_0 و بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف کلروفیل کل جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود ($p < 0.05$) و نشان داد که تمامی گروه‌ها با سطح معناداری ۵ درصد با یکدیگر اختلاف دارند.

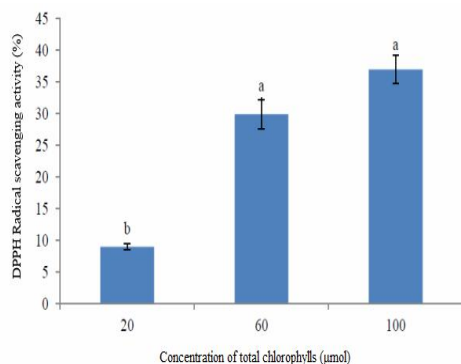


Fig 6 DPPH Radical scavenging activity of different concentration of total chlorophyll concentration.

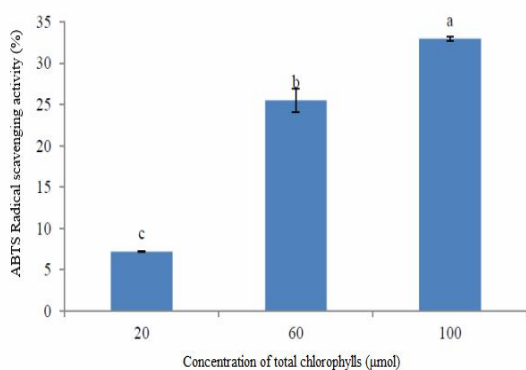


Fig 7 ABTS Radical scavenging activity of different concentration of total chlorophyll concentration.

بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود ($p < 0.05$). در تحقیقات بورا و شارما [۲۷] و الدساری [۲۸] نیز با افزایش غلظت عصاره یونجه، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد. رانا و همکاران [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 kotschy*) 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.

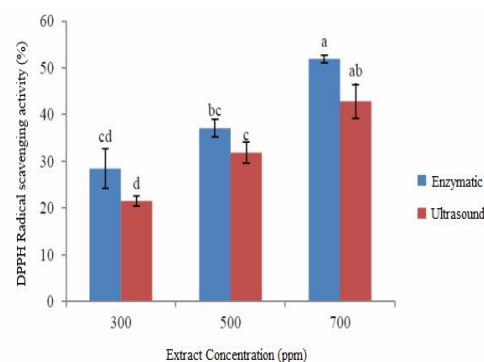


Fig 4 DPPH Radical scavenging activity of different concentration of extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

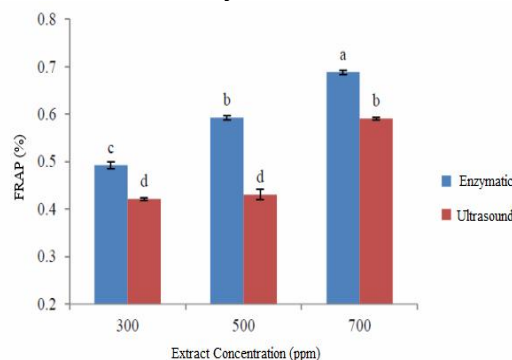


Fig 5 FRAP of different concentration of extracted chlorophyll from alfalfa by different methods.

1 Al-Dosari, 2012

2 Rana et al., 2010

بیماریا 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 به‌عنوان منابعی ارگانیک می‌تواند بسیار مفید باشد [۳۴]. 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.

۵- 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 آنتی‌اکسیدانی عصاره نیز قابل توجه‌تر بوده است. به همین منظور 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.

۶- منابع

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

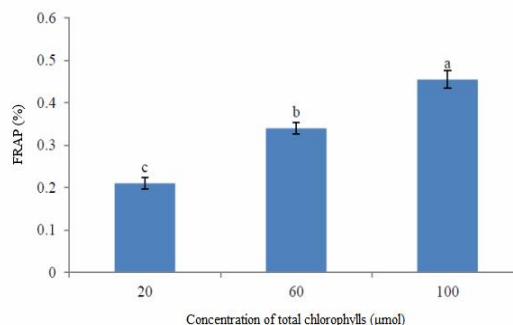


Fig 8 FRAP of different concentration of total chlorophyll concentration.

۴- 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 لذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر لحاظ می‌گردند [۳۲].

عصاره گیاه یونجه حاوی ترکیبات فنلی، انتوسیانین و فلاونوئیدی 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 آنتی‌اکسیدانی از قبیل فنل‌ها، آسکوربات و کاروتنوئیدها باشد.

فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به دلیل ایجاد مکانیسم دفاعی، گیاهان را در برابر اشعه ماوراءبنفش، عوامل

- 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., Hamed, 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 oils Determination of the degradation products of chlorophylls a and a' (pheophytins a, a' and pyropheophytins) Amd No.1. 14838-A1.
- [19] Esmailzadeh 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*

- Linn. against ischemia and reperfusion insult. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. DOI: 10.1093/ecam/nea019.
- [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*



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-HasanSarai, 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	ABSTRACT
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	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 (<i>Medicago sativa</i> 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.