



ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش فراصوت با استفاده از مدل سطح پاسخ

عبدالواحد صفرزائی^۱، رضا اسماعیل زاده کناری^{۲*}، رضا فرهمندفر^۳، علیرضا خلیقی مهر^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- *دکتری، استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

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

۴- دانشجوی دکتری، گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۲۷

کلمات کلیدی:

گیاه کمرگل،

آنتی‌اکسیدانی،

ضدمیکروبی،

حمام فراصوت

DOI: 10.22034/FSCT.20.145. 1

* مسئول مکاتبات:

r.esmaeilzade@sanru.ac.ir

عصاره‌ها و اسانس‌های استخراجی از گیاهان دارویی دارای عوامل زیست‌فعال متعدد از جمله ترکیبات فنلی با ویژگی‌های بالقوه آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی چشمگیر می‌باشند. انتخاب روش استخراج مناسب بر کمیت و کیفیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اثرگذار است. هدف از این مطالعه، بررسی کارایی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل بود. بهینه‌سازی با استفاده از روش آماری سطح پاسخ و طرح باکس بنکن با انتخاب فاکتور زمان فراصوت دهی در سه سطح (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و شدت امواج فراصوت در سه سطح (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) و کاربرد حلال اتانول ۷۰ درصد انجام گردید. از نتایج آزمون‌های انجام شده با روش آماری سطح پاسخ، شدت فراصوت به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل شناخته شد و با افزایش زمان و شدت امواج فراصوت میزان استخراج این ترکیبات افزایش یافت. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل، زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد تعیین گردید و در این شرایط بهینه، میزان ترکیبات فنلی کل و شاخص IC_{50} عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه به ترتیب ۲۳/۶۳ میلی‌گرم بر گرم و ۴۵/۳۰ میکروگرم بر میلی‌گرم، میزان بهینه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب ۰/۱۹ و ۶/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت ۱۱/۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل گردید. همچنین عصاره‌های استخراجی در شدت فراصوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه دارای قابلیت مهار فعالیت باکتری‌های *اشریشیاکلی* H7 : O157 و *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های به ترتیب ۲۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و قابلیت کشندگی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی* H7 : O157 و *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت‌های به ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند.

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، ترکیبات فیتوشیمیایی زیست‌فعال نوین مشتق شده از گیاهان دارویی خاص جهت بهبود شاخص‌های سلامتی آحاد جامعه به طور ویژه‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱]. بخش عظیمی از سهم درمان در طب سنتی اختصاص به اسانس‌ها و عصاره‌های استخراجی از گیاهان دارویی دارد که حاوی طیف وسیعی از ترکیبات زیست‌فعال می‌باشند [۲]. ترکیبات عملگرایی زیست‌فعال در دو دسته مولکول‌ها (نظیر کارتنوئیدها، پلی‌فنول‌ها، اسیدهای چرب، پپتیدها، پروتئین‌ها و استرول‌های گیاهی) و سلول‌های زنده (پروبیوتیک‌ها) طبقه‌بندی می‌شوند [۳]. از جمله ترکیبات زیست‌فعال عمده می‌توان به ترکیبات فنلی اشاره نمود که دارای اثرات سودمندی نظیر ضدآلرژی، ضدالتهاب، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند [۴]. به طور کلی، ترکیبات با ویژگی آنتی‌اکسیدان به دو دسته طبیعی و سنتزی تقسیم‌بندی می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، ترکیبات فنلی حاوی درجات مختلفی از جانشین‌های آلکیلی می‌باشند در حالی که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند ترکیبات فنلی نظیر کینون و لاکتون باشند [۵]. ترکیبات فنلی از طریق گروه هیدروکسیل آزاد روی حلقه آروماتیک خود نقش آنتی‌اکسیدانی را ایفا می‌کنند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها به تعداد و موقعیت قرارگیری گروه‌های هیدروکسیل وابسته است [۶].

فرآیند استخراج حیاتی‌ترین مرحله در حصول ترکیبات فیتوشیمیایی ارزشمند از منابع گیاهی است [۷]. جهت استخراج ترکیبات فنلی از گیاهان دارویی می‌توان از روش‌های سنتی نظیر سوکسله و غرقابی و یا از فناوری‌های نوین نظیر سیال فوق بحرانی، امواج مایکروویو و فراصوت استفاده کرد [۸، ۹]. فناوری‌های نوین در مقایسه با روش‌های سنتی استخراج باعث کاهش مدت زمان عصاره‌گیری، کاهش حلال مصرفی، افزایش بازده استخراج و بهبود کیفیت عصاره استخراجی می‌شوند. استخراج به روش فراصوت سبب نفوذ مناسب حلال به درون

بافت‌های گیاهی گردیده و نسبت به سایر روش‌های عصاره‌گیری از سرعت و کارایی مطلوب‌تری برخوردار است [۱۰]. دما و فشار حاصل از فروپاشی حباب‌های کاویتاسیون در فناوری نوین فراصوت با تخریب ساختار سلول‌های گیاهی منجر به افزایش حلالیت پلی‌فنول‌ها و تسریع فرآیند انتقال جرم آنها به محیط استخراج می‌گردد [۱۱]. انرژی حرارتی ایجاد شده در اثر امواج فراصوت با افزایش دمای حلال منجر به کاهش کشش سطحی آن و در نتیجه افزایش مرطوب شدن مواد گیاهی و استخراج کارآمدتر می‌شود [۱۲]. سیستم‌های پروب و حمام دو روش متداول بهره‌گیری از امواج فراصوت هستند. حمام فراصوت دارای قابلیت کاربرد در مقیاس بزرگ و صنعتی و تکرارپذیری بالا بوده و علاوه بر آن خطر آسیب به ترکیبات زیست‌فعال، ایجاد آلودگی و کف در نمونه در این روش در مقایسه با پروب فراصوت به مراتب کمتر است [۱۳، ۱۴].

گیاه کمرگل با نام علمی *Capparis spinosa L.* متعلق به راسته میخک‌سانان، تیره و خانواده کبر یا علف مار و جنس کاپاریس می‌باشد. این گیاه، علفی چندساله و معمولاً به شکل درختچه و بوته دارای ریشه‌ای چوبی و منشعب، ساقه‌های متعدد و غالباً گسترده بر روی زمین، برگ‌های دایره‌ای و تخم مرغی شکل، گلبرگ‌های سفید و گاهی قرمز رنگ و میوه بیضوی و گوشت‌دار با دانه‌های متعدد لوبیایی شکل سیاه رنگ می‌باشد که نخست به رنگ سبز روشن بوده ولی به مرور زمان متمایل به قرمز می‌گردد. شکل و مزه میوه گیاه کمرگل شبیه هندوانه است ولی به اندازه فندق و در برخی مواقع بزرگتر از آن است [۱۵]. گیاه کمرگل شامل ۲۵۰ گونه است که اغلب آنها وحشی بوده و قادر به رشد در زمین‌های خشک و نیمه‌خشک نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و سازگاری قابل توجه به شرایط سخت نظیر خشکسالی، تحمل دماهای بالاتر از ۴۰ درجه سلسیوس در تابستان و دماهای تا ۸- درجه سلسیوس در زمستان و رشد مناسب در زمین‌های آهکی می‌باشند [۱۶، ۱۷].

ترپتیک سوی آگار، مولر هیتون آگار و مولر هیتون برات از شرکت مرک آلمان و پودر ۲۰۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما آلمان تهیه شده بودند.

۲-۲ شناسایی گیاه و آماده‌سازی پودر میوه گیاه جهت عصاره‌گیری

با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت، گیاه کمرگل جمع‌آوری شده از زمین‌های زراعی شهرستان عنبرآباد واقع در استان کرمان در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۸ مورد شناسایی قرار گرفت. میوه گیاه کمرگل در مرداد ماه برداشت و در دمای اتاق و محیطی تاریک به طور کامل خشک گردید و سپس به منظور آماده‌سازی میوه گیاه جهت استخراج عصاره توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر و به منظور دستیابی به ابعاد یکنواخت از الک با مش ۴۰ عبور داده شد.

۲-۳ استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی میوه گیاه کمرگل

۱-۲-۳ استخراج عصاره اتانولی با استفاده از روش فراصوت

۵۰ گرم از نمونه پودر شده میوه گیاه با ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۷۰ درجه مخلوط گردید و ظرف حاوی حلال و نمونه در حمام فراصوت مدل JK-DUC-8200LHC ساخت کشور چین با فرکانس ثابت ۳۵ کیلوهرتز و در دمای محیط قرار داده شد. متغیرهای مستقل عصاره‌گیری به روش فراصوت شامل زمان فراصوت‌دهی در سه سطح (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و شدت امواج فراصوت در سه سطح (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) انتخاب شده بودند. پس از اتمام تیمار فراصوت، عصاره استخراجی با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و قسمت شفاف فوقانی لوله‌ها با سمپلر جدا گردید و از صافی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. جداسازی حلال و تغلیظ عصاره با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی تخت خلاء در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه با هدف حفظ ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از هر گونه آسیب حرارتی انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده به پلیت منتقل و

از جمله عوامل زیست‌فعال موجود در گیاه کمرگل می‌توان به ساکاریدها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ایندول‌ها و فنلیک‌اسیدها، ترپنوئیدها، روغن‌های فرار، اسیدهای چرب، ویتامین C، ویتامین E و استروئیدها اشاره کرد [۱۸، ۱۹]. مهمترین ترکیبات فیتوشیمیایی میوه گیاه کمرگل شامل کاپاری-زید، روتین، هموگالاکتورونان، پروتوکتچوئیک آلدئید، اتیل ۳ و ۴-دی‌هیدروکسی بنزوات، سیرینجیک اسید، وانیلیک اسید و آلفا توکوفرول می‌باشند [۲۰].

میوه گیاه کمرگل دارای اثرات محافظت کبدی، کاهنده سطح گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول سرم خون می‌باشد [۲۱، ۲۲]. عصاره‌های الکلی استخراج شده از میوه‌های گیاه کمرگل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بازدارنده‌ای را در مهار فعالیت باکتری‌های گرم مثبت (نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و گونه‌های باسیلوس) و گرم منفی (نظیر *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) در آزمون‌های بیولوژیکی و شیمیایی از خود نشان داده‌اند [۲۴، ۲۵]. [۲۶]. تاکنون مطالعاتی پیرامون بهینه‌سازی شرایط استخراج آبی و الکلی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی جوانه گل، برگ و ریشه گیاه کمرگل با حمام فراصوت انجام شده است [۹، ۲۷، ۲۸].

با توجه به تمایل فراوان مردم به استفاده از ترکیبات طبیعی استخراج شده از گیاهان دارویی و کاربرد طب سنتی در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوناگون، در این تحقیق سعی بر آن است تا شرایط بهینه در استخراج الکلی ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی میوه گیاه کمرگل مورد بررسی قرار گیرد.

۲-۲ مواد و روش‌ها

۲-۱-۲ مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده جهت انجام آزمون‌ها دارای گرید آنالیتیکال بودند. معرف فولین سیوکالچو، پودر اسید گالیک، پودر کربنات سدیم بدون آب، الکلی اتیلیک (اتانول) ۹۶ درجه و محیط‌های کشت نوترینت آگار،

۲-۲-۴ تعیین میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد

به منظور تعیین میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه از آزمون DPPH و معرف ۲و۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل استفاده شد [۹]. در این آزمون، میزان ۵ میلی-لیتر از محلول اتانولی دی پی پی اچ ۰/۰۰۴ درصد به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره تهیه شده با حلال اتانول اضافه گردید و پس از اختلاط، در دمای اتاق و محیطی تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و سپس جذب نمونه و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد خوانش قرار گرفت. میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بر حسب درصد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} = \text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد}$$

۲-۲-۵ آزمون‌های میکروبی

۲-۲-۱-۵ تهیه غلظت مادر از عصاره الکلی میوه گیاه

غلظت مادر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر عصاره خشک شده الکلی میوه گیاه با استفاده از محلول دی متیل سولفوکساید ۵ درصد آماده شد و از طریق عبور دادن آن از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استریل گردید.

۲-۲-۵-۵ تهیه سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند

آمپول‌های لیوفیلیزه استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت PTCC 1431، باسیلوس سرئوس PTCC 1015، اشیشیاکلی H7 : O157، PTCC 1860 و سودوموناس آئروژینوزا، PTCC 1430 از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردیده و سویه‌ها بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده احیاء شدند. در ادامه از باکتری‌های رشد یافته به میزانی

در دستگاه آون خلاء با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا عصاره به طور کامل خشک گردد. در ادامه، عصاره‌ها تا زمان انجام آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۲-۴ آزمون‌های شیمیایی

۲-۲-۱-۴ اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل^۱

میزان ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره میوه گیاه به روش رنگ سنجی فولین سیوکالچو مورد ارزیابی قرار گرفت [۹]. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره با غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام با سمپلر به لوله آزمایش انتقال داده شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین سیوکالچو و یک میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و به خوبی همگن گردید. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد در دمای اتاق به لوله اضافه و توسط شیکر لوله به طور مناسب یکنواخت گردید. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت در محیطی تاریک و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Aquarius سری ۷۵۰۰ ساخت شرکت CECIL انگلستان در طول موج ۷۶۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت. میزان ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره میوه گیاه از روی معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک و بر حسب میلی‌گرم در گرم عصاره گزارش شد (معادله ۱).

$$Y = 4/0458 X + 0/0523$$

$$R^2 = 0/9923$$

که در این معادله X: میزان جذب و Y: میزان ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی‌گرم در گرم اسیدگالیک می‌باشد.

بازدارندگی در نظر گرفته شد. تیمارها در سه تکرار انجام گردیدند.

۴-۲-۵ تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی^۳

حداقل غلظت باکتری‌کشی با توجه به مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی برای هر عصاره تعیین گردید. در این روش، میزان ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده بود به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح و پس از پخش یکنواخت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پایین‌ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نکرده یا به عبارتی دیگر فاقد رشد باکتری بودند به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی در نظر گرفته شد. به منظور تایید نتایج، آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گردیدند [۲۴].

۴-۲-۶ روش آماری

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (زمان و شدت صوت) بر میزان ترکیبات فنلی کل، قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد و خصوصیات ضدمیکروبی عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه کمرگل از روش آماری سطح پاسخ و نرم افزار Design Expert نسخه ۱۲ استفاده گردید. بر اساس روش سطح پاسخ، طرح باکس بنکن^۴ به منظور بررسی دو متغیر در سه سطح انتخاب شد و ۱۳ حالت مختلف (تیمار) جهت بررسی روند میزان استخراج و تعیین شرایط بهینه پیشنهاد گردید (جداول ۱ و ۲ و ۳).

به لوله‌های حاوی محلول رینگر استریل اضافه گردید تا کدورتی معادل محلول استاندارد نیم مک فارلند ($10^6 \times 1/5$) واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) و با جذبی معادل ۰/۰۸-۰/۱۳ در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر حاصل گردد [۲۹].

۴-۲-۳ تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد^۱

جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد عصاره‌های الکلی استخراجی از میوه گیاه از روش میکرودايلوشن^۲ استفاده گردید [۳۰]. در این روش، در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه، نخست درون چاهک‌های ۱۲ عددی هر ردیف، میزان ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث استریل با غلظت مضاعف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مادر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های الکلی به چاهک اول منتقل و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم منتقل و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شد. این ترتیب برای همه چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۲ که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود، ادامه یافت. چاهک شماره ۱۱ به عنوان شاهد و کنترل منفی در نظر گرفته شد. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۱ برداشته و دور ریخته شد. در ادامه ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند به هر یک از چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۱ اضافه گردید سپس میکروپلیت به مدت ۷ ثانیه در شیکر الایزا تکان داده شد و میزان کدورت اولیه چاهک‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت گردید. در ادامه میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و پس از گذشت این زمان، میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها مجدداً توسط دستگاه الایزا قرائت و مقایسه گردید. کمترین غلظت عصاره که سبب ممانعت از رشد باکتری گردیده بود به عنوان حداقل غلظت

^۳ - Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

^۴ - Box-Behnken

^۱ - Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

^۲ - Microdilution

Table 1. Treatments designed in response surface test and response values for antioxidant tests of alcholic extracts of Caper fruit

IC ₅₀ of Fruit Alcholic Extracts (µg/mg)	TPC of Fruit Alcholic Extracts (mg/g)	Sound Intensity (X ₂) (%)	Exreaction Time (X ₁) (min)	Treatment
87.92	12.82	49	14	1
90.74	12.02	40	25	2
85.22	15.10	49	36	3
81.52	16.48	70	10	4
70.10	18.90	70	25	5
62.50	19.50	70	25	6
65.41	19.32	70	25	7
68.61	19.29	70	25	8
60.21	20.10	70	25	9
54.35	21.14	70	40	10
51.62	22.16	91	14	11
46.87	24.10	100	25	12
47.67	23.22	91	36	13

Table 2. Treatments designed in response surface test and response values for antimicrobial tests of alcholic extracts of Caper fruit

MIC of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	MIC of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	MIC of <i>Bacillus cereus</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	MIC of <i>Staphylococcus aureus</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	Sound Intensity (X ₂) (%)	Exreaction Time (X ₁) (min)	Treatment
>100	>100	50	1.56	49	14	1
>100	>100	50	1.56	40	25	2
>100	>100	25	0.78	49	36	3

>100	>100	25	0.78	70	10	4
100	100	12.50	0.39	70	25	5
100	100	12.50	0.39	70	25	6
100	100	12.50	0.39	70	25	7
100	100	12.50	0.39	70	25	8
100	100	12.50	0.39	70	25	9
100	50	12.50	0.39	70	40	10
50	50	6.25	0.19	91	14	11
25	25	6.25	0.19	100	25	12
25	25	6.25	0.19	91	36	13

Table 3. Treatments designed in response surface test and response values for antimicrobial tests of alcholic extracts of Caper fruit

MBC of <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	MBC of <i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	MBC of <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	MBC of <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> of Fruit Alcholic Extracts (mg/ml)	Sound Intensity (X ₂) (%)	Exreaction Time (X ₁) (min)	Treatment
>100	>100	>100	100	49	14	1
>100	>100	>100	100	40	25	2
>100	>100	100	50	49	36	3
>100	>100	100	50	70	10	4
>100	>100	50	25	70	25	5
>100	>100	50	25	70	25	6
>100	>100	50	25	70	25	7
>100	>100	50	25	70	25	8
>100	>100	50	25	70	25	9
>100	100	50	25	70	40	10
100	100	50	25	91	14	11
50	50	25	12.50	100	25	12
50	50	25	12.50	91	36	13

۳- نتایج و بحث

۳-۱ انتخاب بهترین مدل

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری به روش سطح پاسخ بیانگر آن بود که در بین مدل‌های درجه اول (Linear، 2FI و Mean)، درجه دوم (Quadratic) و درجه سوم (Cubic)، مدل Quadratic برای کلیه آزمون‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها بوده و فاکتور عدم برازش (Lack of Fit) آن نیز معنی‌دار نمی‌باشد. از اینرو، این مدل جهت آنالیز آماری آزمون‌ها انتخاب گردید. پس از انتخاب بهترین مدل، جهت تعیین معادله کلی بر اساس جدول تجزیه تحلیل واریانس (ANOVA)، پارامترهایی که آزمون F آنها معنی‌دار نبود (P > ۵ درصد) از مدل حذف گردیدند و پارامترهای دیگر که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد بودند در مدل نگهداشته شدند. در ادامه، معادله کلی با استفاده از ضرایب اختصاص یافته برای هر پارامتر تعیین گردید.

۳-۲ اثر زمان و شدت امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات

فنلی میوه گیاه

بر اساس شکل ۱ که نشان‌دهنده اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت امواج فراصوت بر میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از میوه گیاه کمرگل می‌باشد، مشاهده گردید با افزایش زمان و شدت امواج فراصوت روند استخراج ترکیبات فنلی از میوه گیاه افزایش یافت.

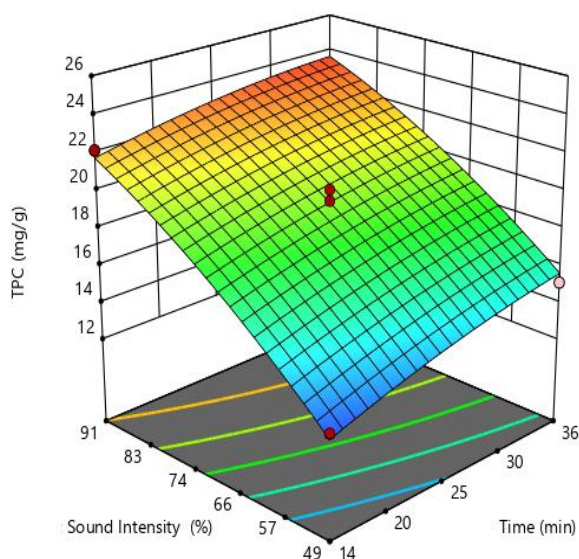


Figure 1. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of two extraction time and sound intensity variables on the amount of total phenolic contents of alcoholic extracts of Caper fruit

میزان میانگین ترکیبات فنلی کل استخراجی از میوه گیاه کمرگل با حلال اتانول به روش فراصوت 18.78 ± 3.72 میلی‌گرم بر گرم تعیین گردید. وجود ضریب تبیین بالا بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده (به ترتیب 0.9873 و 0.9352) بیانگر همبستگی بسیار مطلوب بین نتایج بدست آمده از طریق آزمون یا روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده‌ی میزان استخراج ترکیبات فنلی کل میوه گیاه با روش‌های آماری بودند (جدول ۴). صفرزائی و همکاران (۲۰۲۰) در استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی از ریشه گیاه کبر با حلال‌های اتانولی و آبی به روش فراصوت گزارش کردند که یک روند افزایشی در میزان استخراج با گذشت زمان وجود دارد. فاکتور زمان در افزایش مدت انتقال جرم تاثیرگذار است [۹]. شدت فراصوت نیز به دلیل میزان انرژی بالای امواج باعث شکستن فیزیکی دیواره و غشاء سلول‌های گیاهی و افزایش جریان انتقال جرم بین بافت‌های گیاه و انتقال ذرات از درون سلول به محیط استخراج می‌گردد. علاوه بر این، شدت امواج فراصوت باعث کاهش اندازه ذرات و افزایش میزان

بازده استخراج می‌شود [۳۱]. انرژی حرارتی ایجاد شده در اثر امواج فراصوت با تخریب ساختار سلولی گیاه باعث افزایش راندمان استخراج می‌گردد. تخریب ساختار سلولی منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی و تجزیه متابولیت‌های ثانویه حاصل از برهم‌کنش‌های ماتریس (پلی‌فنول‌ها با لیپوپروتئین‌ها) و از این رو، افزایش حلالیت و انتقال جرم پلی‌فنول‌ها می‌گردد. علاوه بر این، دمای بالا منجر به کاهش ویسکوزیته محیط استخراج و نفوذ حلال به ذرات گیاه گردیده و از این رو، باعث بهبود و تسریع فرآیند استخراج می‌شود [۱۲].

آلبو^۱ و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای به بررسی تاثیر شدت امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گیاه رزماری با حلال‌های بوتانول، استات اتیلن و اتانول پرداختند و گزارش کردند که امواج فراصوت اثر حلال اتانول که در شرایط معمول حلال ضعیفی است را به سطح استخراج مشابه با دو حلال دیگر رسانده است [۳۲].

با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات فنلی از میوه گیاه بر اساس جدول تجزیه و تحلیل واریانس (جدول ۴) معادله کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۲: معادله کلی تعیین میزان ترکیبات فنلی استخراجی از میوه گیاه با حلال اتانول

$$Y = 19.42 + 1/24 X_1 + 4/32 X_2 - 0.71 X_2^2$$

که در این معادله، Y: میزان ترکیبات فنلی استخراجی از میوه گیاه بر حسب میلی‌گرم بر گرم، X_1 : زمان بر حسب دقیقه و X_2 : شدت فراصوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله ۲، شدت فراصوت (X_2) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات فنلی از میوه گیاه کمرگل با حلال اتانول شناخته شد. شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی کل از میوه گیاه کمرگل با حلال اتانول به روش فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد تعیین گردید و در این شرایط بهینه، میزان ترکیبات

فنلی کل استخراجی از میوه گیاه ۲۳/۶۳ میلی‌گرم بر گرم بدست آمد (جدول ۵). همتیان و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را ۲۰/۰۱ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند [۳۳]. راشدی و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای دیگر، میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل رویشی در استان خوزستان به روش غرقابی را ۸/۱۴ میلی‌گرم بر گرم تعیین نمودند [۳۴]. بویار^۲ و همکاران (۲۰۱۸) نیز در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل رویشی در منطقه ترانس هیمالیا به روش غرقابی را ۴/۰۷ میلی‌گرم اکسی‌والان اسیدگالیک بر گرم گزارش کردند [۲۵] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر دارای محتوای ترکیبات فنلی کل کمتری می‌باشد. این تفاوت در میزان ترکیبات فنلی کل عصاره استخراجی از میوه گیاه در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات فوق‌الذکر می‌تواند ناشی از تاثیر کارآمد امواج فراصوت در افزایش روند استخراج ترکیبات فنلی از میوه گیاه نسبت به روش‌های سنتی استخراج نظیر غرقابی باشد. ارار^۳ و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از میوه گیاه کمرگل با حلال متانول به روش غرقابی را ۵۸/۸ میلی‌گرم اکسی‌والان اسیدگالیک بر گرم گزارش کردند [۳۵] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، ترکیبات فنلی کل استخراجی از میوه گیاه بیشتر بوده است. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) نیز در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنلی کل استخراجی از میوه گیاه کمرگل با حلال اتانول ۷۰ درصد به روش غرقابی را ۳۱/۷ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند [۲۴]. در مطالعه‌ای حاضر میزان بهینه ترکیبات فنلی کل استخراجی از میوه گیاه کمرگل کمتر از این میزان بوده و این اختلاف می‌تواند از تفاوت در شرایط محیطی و اقلیمی محل رویش گیاه نشأت گیرد [۳۶]. دهقان‌تنها و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی میوه فلفل قرمز با استفاده از حلال متانول به روش سطح پاسخ پرداختند و بیشترین میزان ترکیبات فنلی

فلفل قرمز را ۴۹/۶ میلی گرم در صد گرم فلفل در دمای ۴۹ درجه سلسیوس، زمان ۳۹ دقیقه و شدت صوت ۸۹/۸ درصد حمام فراصوت گزارش و نشان دادند که با افزایش زمان و شدت فراصوت میزان استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز افزایش می یابد و فاکتور شدت صوت را تاثیرگذارترین پارامتر در استخراج بیان کردند [۳۷] که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

Table 4. ANOVA of the quadratic model of total phenolic contents of alcholic extracts of Caper fruit

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	165.76	5	33.15	109.03	<0.0001
X ₁	12.33	1	12.33	40.54	0.0004
X ₂	149.16	1	149.16	490.54	<0.0001
X ₁ X ₂	0.3721	1	0.3721	1.22	0.3052
X ₁ ²	0.7737	1	0.7737	2.54	0.1547
X ₂ ²	3.49	1	3.49	11.48	0.0116
Residual	2.13	7	0.3041		
Lack of fit	1.36	3	0.4541	2.37	0.2114
Pure error	0.7661	4	0.1915		
R ²	0.9873				
Adj. R ²	0.9783				
Pred. R ²	0.9352				

Table 5. Results of the optimization process for antioxidant and antimicrobial tests of alcholic extracts of Caper fruit

Desirability	MBC of <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/ml)	MIC of <i>Bacillus cereus</i> (mg/ml)	MIC of <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/ml)	IC ₅₀ (µg/mg)	TPC (mg/g)	Sound Intensity (%)	Time (min)	Optimal Points
0.979	11.81	6.07	0.19	45.30	23.63	91	36	1
0.977	12.78	6.84	0.21	45.71	23.60	91	34	2
0.974	13.50	7.36	0.22	46.07	23.57	91	33	3
0.965	14.48	8.02	0.24	46.74	23.49	91	32	4

۳-۳ اثر زمان و شدت امواج فراصوت بر میزان IC₅₀ عصاره-های الکلی میوه گیاه

شکل ۲ نمایانگر اثر زمان و شدت امواج فراصوت بر میزان IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه کمرگل می‌باشد. به طور همزمان با افزایش زمان فراصوت‌دهی و شدت امواج فراصوت میزان IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه کاهش محسوسی را نشان می‌دهد. شاخص IC₅₀ به غلظتی از عصاره اطلاق می‌شود که قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH باشد یا به عبارت دیگر میزان رادیکال‌های آزاد DPPH را به نصف کاهش دهد. ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH که در واقع، همان اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده نظیر فنل‌ها در انتقال اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد است، متداولترین روش اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بوده و با پی-رنگ شدن محلول DPPH در اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره قابل شناسایی است [۹]. DPPH نوعی رادیکال آزاد است که در دمای اتاق و در حلال متانول پایدار و محلولی با رنگ بنفش تولید می‌کند. هنگامی که رادیکال‌های آزاد با آنتی‌اکسیدان‌ها وارد واکنش می‌شوند، ویژگی رادیکالی آزاد آنها در اثر شکستن زنجیره از بین رفته و رنگ آنها از بنفش به زرد روشن تغییر پیدا می‌کند. تغییر رنگ محلول ناشی از جزء آنتی‌اکسیدان دهنده اتم هیدروژن به رادیکال آزاد می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد DPPH را به شکل پایدارتری کاهش می‌دهند [۳۸]. از این‌رو، عصاره‌هایی که در غلظت پایین‌تر قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH باشند از قدرت آنتی-اکسیدانی بالاتری برخوردار خواهند بود. در این مطالعه، میزان میانگین IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه کمرگل با حلال اتانول به روش فراصوت $67/13 \pm 15/16$ میکروگرم بر میلی‌گرم بدست آمد. نتایج IC₅₀ پیش‌بینی‌شده توسط مدل از طریق آماری و بدست آمده از طریق آزمون به روش تجربی (به ترتیب با ضریب تبیین $0/8671$ و $0/9245$) همبستگی بسیار مطلوبی را نشان دادند (جدول ۶).

با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان از میوه گیاه کمرگل بر اساس جدول تجزیه و تحلیل واریانس (جدول ۶) معادله کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۳: معادله کلی تعیین میزان IC₅₀ عصاره استخراجی از میوه گیاه با حلال اتانول

$$Y = 65/37 - 5/63 X_1 - 16/99 X_2$$

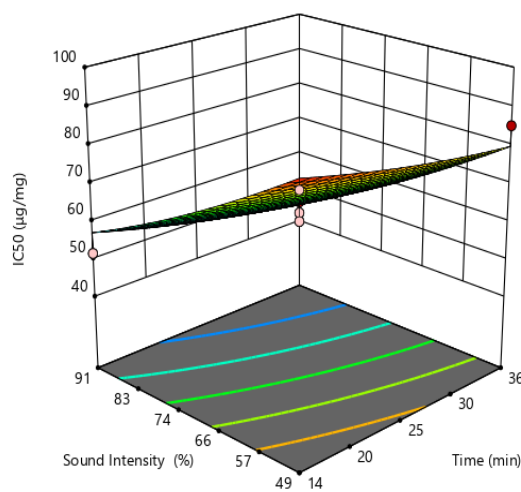
در این معادله، Y: میزان IC₅₀ عصاره استخراجی از میوه گیاه بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم، X₁: زمان بر حسب دقیقه و X₂: شدت فراصوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله ۳، شدت فراصوت (X₂) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان از میوه گیاه کمرگل شناخته شد. شرایط بهینه IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه با حلال اتانول به روش حمام فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد تعیین گردید و در این شرایط بهینه، میزان IC₅₀ عصاره-های استخراجی از میوه گیاه $45/30$ میکروگرم بر میلی‌گرم حاصل گردید. ضیاءالحق و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را از طریق تعیین شاخص IC₅₀، $69/1$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۳۹] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری می‌باشند. بویار و همکاران (۲۰۱۸) نیز در مطالعه‌ای، میزان IC₅₀ عصاره‌های متانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل رویشی در منطقه ترانس هیمالیا به روش غرقابی را $0/097$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۲۵] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری برخوردار بودند. راشدی و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، میزان IC₅₀ عصاره‌های متانولی میوه گیاه کمرگل رویشی در استان خوزستان را $6/11$ میکروگرم بر میلی‌گرم گزارش کردند [۳۴] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر

Figure 2. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of two extraction time and sound intensity variables on the amount of IC₅₀ of alcoholic extracts of Caper fruit

Table 6. ANOVA of the quadratic model of IC₅₀ of alcoholic extracts of Caper fruit

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	2588.81	5	517.76	17.14	0.0008
X ₁	253.96	1	253.96	8.41	0.0230
X ₂	2308.31	1	2308.31	76.40	<0.0001
X ₁ X ₂	0.3906	1	0.3906	0.0129	0.9127
X ₁ ²	10.34	1	10.34	0.3421	0.5770
X ₂ ²	19.03	1	19.03	0.6298	0.4535
Residual	211.50	7	30.21		
Lack of fit	143.77	3	47.92	2.83	0.1704
Pure error	67.73	4	16.93		
R ²	0.9245				
Adj. R ²	0.8705				
Pred. R ²	0.8671				

دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری می باشند. علیا زی کیو گلو^۱ و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه ای میانگین غلظت بازدارنده ترکیبات گیاه کمرگل استخراجی به روش حمام فراصوت را معادل ۰/۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۳۶] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری را نشان دادند. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) نیز در مطالعه ای، میزان IC₅₀ عصاره های استخراجی از میوه گیاه کمرگل با حلال اتانول ۷۰ درصد به روش غرقابی را ۵۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۲۴] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر از فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری برخوردار بودند. همتیان و همکاران (۲۰۲۰) نیز در مطالعه ای، میزان IC₅₀ عصاره های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را ۱/۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۳۳] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر دارای فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری بودند. به طور کلی، دلیل این تفاوت در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های استخراجی از میوه گیاه در مطالعات متعدد ناشی از تاثیر شرایط محیطی بر رشد گیاه، تفاوت گونه و رویشگاه های گیاه کمرگل، تفاوت در زمان برداشت میوه گیاه و همچنین تاثیر حلال و نوع روش استخراج می باشد [۹].



۳-۴ میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد عصاره های الکلی میوه گیاه
 ۳-۴-۱ میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت و باسیلوس سرئوس عصاره های اتانولی میوه گیاه

با توجه به شکل ۳ با افزایش زمان و شدت امواج فراصوت، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت و باسیلوس سرئوس

عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل کاهش یافته است. عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه در شدت‌های صوت بالا (۹۱ و ۱۰۰ درصد) قابلیت مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت را در کمترین غلظت سریالی (۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر) و قابلیت مهار رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* را در غلظت ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از خود نشان داده‌اند. این موضوع، بیانگر حساسیت زیاد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت به عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه نسبت به باکتری *باسیلوس سرئوس* می‌باشد.

با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات ضد میکروبی از میوه گیاه بر اساس جداول تجزیه و تحلیل واریانس (جداول ۸ و ۷) معادلات کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۴: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت عصاره‌های اتانولی میوه گیاه

$$Y = 0.39 - 0.17 X_1 - 0.49 X_2 + 0.19 X_1 X_2 + 0.08 X_1^2 + 0.23 X_2^2$$

معادله ۵: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* عصاره‌های اتانولی میوه گیاه

$$Y = 12.50 - 5.33 X_1 - 15.55 X_2 + 6.25 X_1 X_2 + 2.73 X_1^2 + 7.42 X_2^2$$

که در این معادلات، Y: میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد عصاره میوه گیاه بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، X_1 : زمان بر حسب دقیقه و X_2 : شدت فراصوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله‌های ۴ و ۵، شدت صوت (X_2) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل شناخته شد. شرایط بهینه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد

باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت و *باسیلوس سرئوس* عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه به روش حمام فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد تعیین گردید و در این شرایط بهینه، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب ۰/۱۹ و ۶/۰۷ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. این موضوع بیانگر قدرت ضد میکروبی بالای عصاره‌های اتانولی میوه گیاه در مهار باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت به دلیل دارا بودن دیواره سلولی تک لایه در ساختار خود مقاومت کمتر و نفوذپذیری بیشتری را به ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره‌ها از جمله پلی فنل‌ها که دارای چندین گروه هیدروکسیل می‌باشند، نشان می‌دهند [۴۰]. روحانی (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش نمود [۴۱] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد بیشتر و قابلیت مهار فعالیت میکروبی پایین‌تری را نشان می‌دهد. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را به ترتیب ۱۲/۸ و ۶/۴ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۲۴] که در مقایسه با مقادیر بهینه مطالعه حاضر از فعالیت ضد میکروبی پایین‌تری برخوردار هستند. هم‌تیا و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را ۰/۱۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۳۳] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد تقریباً یکسان و نزدیکی را نشان می‌دهد. رحیمی فرد و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره تام متانولی حاصل از

حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌ها در مطالعات متعدد می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه‌های گیاه کمرگل، شرایط محیطی رویش گیاه، میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی و نوع روش استخراج باشد.

بخش هوایی گونه‌های *Cartilaginea* و *Mucronifolia* گیاه کمرگل را به ترتیب ۳۱/۲۵ و ۱۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر فعالیت ضد میکروبی بالاتری را نشان می‌دهند [۴۲]. این تفاوت در میزان

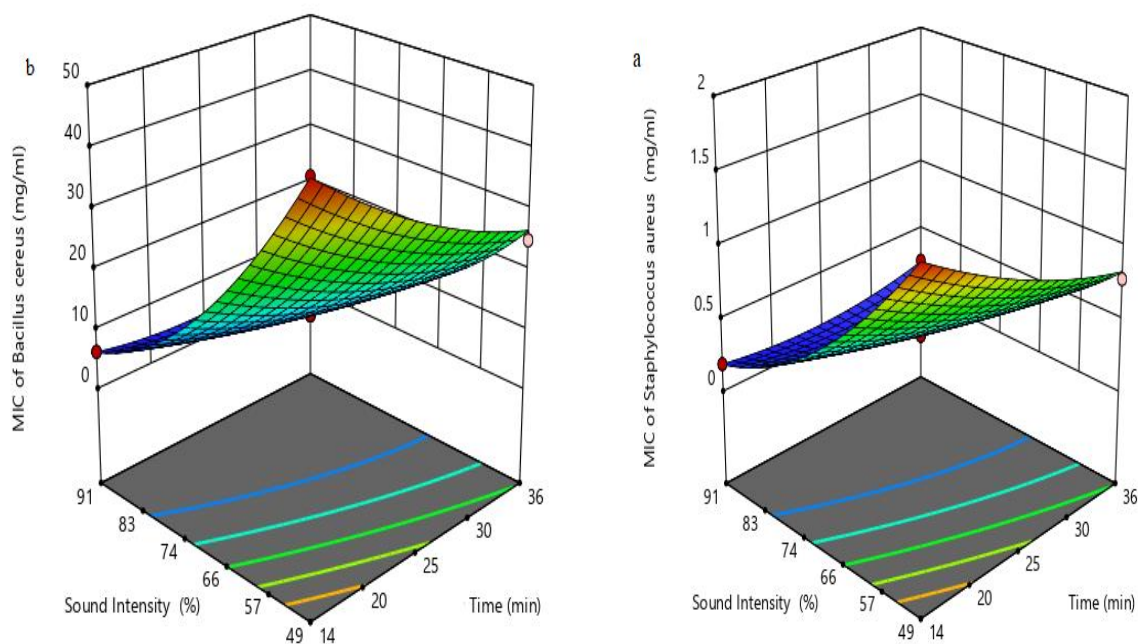


Figure 3. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of two extraction time and sound intensity variables on the amount of MIC of *Staphylococcus aureus* of alcoholic extracts of Caper fruit (a) and amount of MIC of *Bacillus cereus* of alcoholic extracts of Caper fruit (b)

Table 7. ANOVA of the quadratic model of MIC of *Staphylococcus aureus* of alcholic extracts of Caper fruit

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	2.66	5	0.5324	321.61	<0.0001
X ₁	0.2216	1	0.2216	133.88	<0.0001
X ₂	1.90	1	1.90	1147.06	<0.0001
X ₁ X ₂	0.1521	1	0.1521	91.88	<0.0001
X ₁ ²	0.0503	1	0.0503	30.36	0.0009
X ₂ ²	0.3680	1	0.3680	222.31	<0.0001

Residual	0.0116	7	0.0017
Lack of fit	0.0116	3	0.0039
Pure error	0.0000	4	0.0000
R ²	0.9957		
Adj. R ²	0.9926		
Pred. R ²	0.9692		

Table 8. ANOVA of the quadratic model of MIC of *Bacillus cereus* of alcoholic extracts of Caper fruit

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F-Value	P-Value
Model	2722.74	5	544.55	327.64	<0.0001
X ₁	227.67	1	227.67	136.98	<0.0001
X ₂	1933.54	1	1933.54	1163.36	<0.0001
X ₁ X ₂	156.25	1	156.25	94.01	<0.0001
X ₁ ²	52.01	1	52.01	31.29	0.0008
X ₂ ²	383.19	1	383.19	230.56	<0.0001
Residual	11.63	7	1.66		
Lack of fit	11.63	3	3.88		
Pure error	0.0000	4	0.0000		
R ²	0.9957				
Adj. R ²	0.9927				
Pred. R ²	0.9697				

میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های /شریشیاکلی :

O157 H7 و سودوموناس آنروژینوزا عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل بسته به زمان فراصوت‌دهی و شدت امواج فراصوت از ۲۵ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بودند. عصاره-های اتانولی استخراجی در زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد و نیز زمان ۲۵ دقیقه و شدت فراصوت ۱۰۰ درصد

۲-۳- میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های /شریشیاکلی *H7 : O157* و سودوموناس آنروژینوزا عصاره‌های اتانولی میوه گیاه

۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که در مقایسه با کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد مطالعه حاضر فعالیت ضد میکروبی بالاتری را نشان می‌دهند [۴۲].

۳-۵ میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های الکلی میوه گیاه

۳-۵-۱ میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت و باسیلوس سرئوس عصاره‌های اتانولی میوه گیاه

بر اساس شکل ۴ همزمان با افزایش زمان و شدت امواج فراصوت، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل کاهش محسوسی را نشان می‌دهد.

با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل بر اساس جدول تجزیه و تحلیل واریانس (جدول ۹) معادله کلی را می‌توان به صورت زیر گزارش کرد:

معادله ۶: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت عصاره اتانولی میوه گیاه

$$Y = 25 - 12/23 X_1 - 29/53 X_2 + 9/37 X_1 X_2 + 6/25 X_1^2 + 15/62 X_2^2$$

که در این معادله Y: میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره اتانولی میوه گیاه بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، X_1 : زمان بر حسب دقیقه و X_2 : شدت فراصوت بر حسب درصد می‌باشد. با توجه به معادله ۶، شدت فراصوت (X_2) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل شناخته شد. شرایط بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت عصاره‌های اتانولی میوه گیاه به روش فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد تعیین شد و در این شرایط بهینه میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی

کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های /شریشیاکلی $H7 : O157$ و سودوموناس آئروژینوزا (۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را به خود اختصاص داده بودند. این موضوع بیانگر مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت به عوامل ضد میکروبی موجود در عصاره‌های استخراجی از گیاه کمرگل می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی به دلیل دارا بودن دیواره سلولی اضافی و چند لایه، مقاومت بیشتر و نفوذپذیری کمتری را به ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهند [۴۰]. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های /شریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را به ترتیب ۶/۴ و ۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۲۴] که در مقایسه با کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد مطالعه حاضر، میزان فعالیت ضد میکروبی و قابلیت مهار رشد باکتریایی بیشتری را نشان داده‌اند. گول^۱ و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری /شریشیاکلی عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل را ۲۶۶/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۲۶] که در مقایسه با کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد مطالعه حاضر دارای قابلیت مهار رشد باکتریایی بیشتری می‌باشند. روحانی (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری /شریشیاکلی عصاره اتانولی میوه گیاه کمرگل را ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمود [۴۱] که در مقایسه با کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد مطالعه حاضر فعالیت ضد میکروبی و قابلیت مهار رشد باکتریایی کمتری را نشان داده‌اند. رحیمی‌فرد و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های /شریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا عصاره تام متانولی حاصل از بخش هوایی گونه Cartilaginea گیاه کمرگل را به ترتیب ۴۱/۶۷ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بخش هوایی گونه Mucronifolia گیاه کمرگل را به ترتیب ۴۶/۸۷ و بیشتر از

¹ - Gull

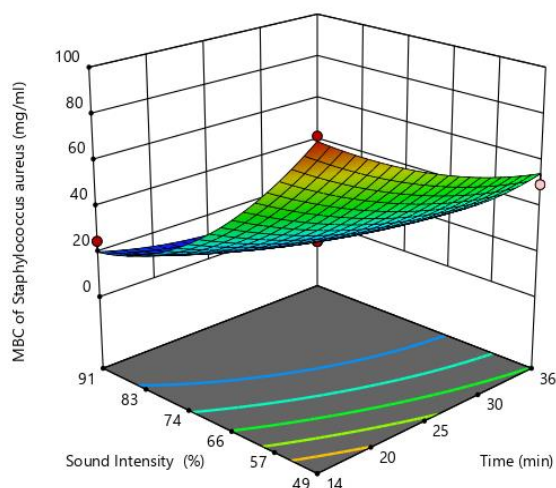


Figure 4. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of two extraction time and sound intensity variables on the amount of MBC of *Staphylococcus aureus* of alcoholic extracts of Caper fruit

Table 9. ANOVA of the quadratic model of MBC of *Staphylococcus aureus* of alcoholic extracts of Caper fruit

Source	Sum of Square	d f	Mean Square	F-Value	P-Value
Model	10348.82	5	2069.76	134.27	0.0001 <
X ₁	1196.96	1	1196.96	77.656	0.0001 <
X ₂	6976.38	1	6976.38	452.56	0.0001 <
X ₁ X ₂	351.56	1	351.56	22.81	0.0020
X ₁ ²	271.74	1	271.74	17.63	0.0040
X ₂ ²	1698.37	1	1698.37	110.17	0.0001 <
Residual	107.91	7	15.42		
Lack of fit	107.91	3	35.97		

استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت ۱۱/۸۱ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل گردید. میزان حداقل غلظت باکتری کشی باسیلوس سرئوس عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل بسته به زمان و شدت امواج فراصوت از ۲۵ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر متغیر بودند. عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل در زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد و نیز زمان ۲۵ دقیقه و شدت فراصوت ۱۰۰ درصد کمترین میزان حداقل غلظت باکتری کشی باسیلوس سرئوس (۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) را به خود اختصاص داده بودند. روحانی (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری کشی استافیلوکوکوس اورئوس عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش نمود [۴۱] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، حداقل غلظت باکتری-کشی بیشتر و فعالیت ضد میکروبی پایین‌تری را نشان می‌دهد. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری کشی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را به ترتیب ۱۲/۸ و ۵۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۲۴] که در مقایسه با مقادیر بهینه و کمترین میزان حداقل غلظت باکتری کشی مطالعه حاضر از فعالیت ضد میکروبی پایین‌تری برخوردار هستند. همتیان و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری کشی استافیلوکوکوس اورئوس عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را ۰/۲۸۳ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند [۳۳] که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر، حداقل غلظت باکتری-کشی کمتر و قابلیت ضد میکروبی بالاتری را نشان می‌دهند. این تفاوت در مقادیر حداقل غلظت باکتری کشی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس نسبت به مطالعه حاضر ناشی از تاثیر کارآمد امواج فراصوت در استخراج قوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان و به تبع ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل نسبت به روش‌های سنتی استخراج می‌باشد.

قابلیت مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد و خصوصیات ضد میکروبی قوی با قابلیت مهار رشد و باکتری‌کشی انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشند. روش استخراج نوین فراصوت دارای قابلیت استخراج کارآمد عوامل زیست فعال از بخش‌های مختلف گیاهان در بازه زمانی کوتاه نسبت به روش‌های سنتی استخراج نظیر سوکسله و غرقابی می‌باشد. نتایج این تحقیق بیانگر آن بود که با افزایش فاکتورهای زمان فراصوت دهی و شدت امواج فراصوت، روند استخراج ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل افزایش یافته است و شدت فراصوت به عنوان موثرترین فاکتور شناخته شد. با استفاده از روش آماری سطح پاسخ، شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی از میوه گیاه کمرگل، زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد تعیین گردید و در این شرایط بهینه، میزان ترکیبات فنلی کل و شاخص IC₅₀ عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه به ترتیب ۲۳/۶۳ میلی‌گرم بر گرم و ۴۵/۳۰ میکروگرم بر میلی‌گرم، میزان بهینه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب ۰/۱۹ و ۶/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی *استافیلوکوکوس اورئوس* کوآگولاز مثبت ۱۱/۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل گردید. همچنین عصاره‌های استخراجی در شدت فراصوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه دارای قابلیت مهار فعالیت باکتری‌های *اشریشیاکلی H7 : O157* و *سودوموناس آنروژینوزا* در غلظت‌های به ترتیب ۲۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و قابلیت کشندگی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی H7 : O157* و *سودوموناس آنروژینوزا* در غلظت‌های به ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند.

۵-منابع

Pure error	0.0000	4	0.0000
R ²	0.9897		
Adj. R ²	0.9823		
Pred. R ²	0.9266		

۲-۳ میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *اشریشیاکلی H7 : O157* و *سودوموناس آنروژینوزا* عصاره‌های اتانولی میوه گیاه

میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *اشریشیاکلی H7 : O157* و *سودوموناس آنروژینوزا* عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل بسته به زمان فراصوت دهی و شدت امواج فراصوت از ۵۰ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بودند. عصاره‌های اتانولی استخراجی از میوه گیاه در زمان ۳۶ دقیقه و شدت فراصوت ۹۱ درصد و نیز زمان ۲۵ دقیقه و شدت فراصوت ۱۰۰ درصد دارای کمترین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *اشریشیاکلی H7 : O157* و *سودوموناس آنروژینوزا* (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بودند. محبوی و محبوی (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آنروژینوزا* عصاره‌های اتانولی میوه گیاه کمرگل به روش غرقابی را به ترتیب ۲۵/۶ و ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۲۴] که در مقایسه با کمترین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی مطالعه حاضر، میزان فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نشان داده‌اند. روحانی (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *اشریشیاکلی* عصاره اتانولی میوه گیاه کمرگل را ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمود [۴۱] که در مقایسه با کمترین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی مطالعه حاضر دارای فعالیت ضد میکروبی یکسانی بود.

۴-نتیجه‌گیری

عوامل زیست فعال موجود در عصاره‌های استخراجی از گیاهان از جمله ترکیبات فنلی دارای ویژگی‌های بالقوه آنتی‌اکسیدانی و

- [1] Abdel-Shaheed, M. M., Abdalla, E. S., Khalil, A. F., & El-Hadidy, E. M. (2021). Effect of Egyptian date palm pollen (*Phoenix dactylifera* L.) and its hydroethanolic extracts on serum glucose and lipid profiles in induced diabetic rats. *Food and Nutrition Sciences*, 12(2), 147.
- [2] Mishra, B. B., & Tiwari, V. K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European journal of medicinal chemistry*, 46(10), 4769-4807.
- [3] Pateiro, M., Gómez, B., Munekata, P. E., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., & Lorenzo, J. M. (2021). Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules*, 26(6), 1547.
- [4] Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., ... & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- [5] Da Cruz, R. G., Beney, L., Gervais, P., De Lira, S. P., de Souza Vieira, T. M. F., & Dupont, S. (2019). Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. *Food chemistry*, 277, 698-705.
- [6] Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food and Function*, 12(1), 14-29.
- [7] Kenari, R. E., & Razavi, R. (2022). Encapsulation of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) flower extract in *Urtica dioica* L. seed gum: Characterization, antioxidant/antimicrobial properties, and in vitro digestion. *Food Science and Nutrition*, 10(10), 3436-3443.
- [8] Razavi, R., & Kenari, R. E. (2021). Antioxidant evaluation of *Fumaria parviflora* L. extract loaded nanocapsules obtained by green extraction methods in oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2448-2457.
- [9] Safarzaei, A., Sarhadi, H., Haddad Khodaparast, M. H., Shahdadi, F., & Dashipour, A. R. (2020). Optimization of aqueous and alcoholic extraction of phenolic and antioxidant compounds from Caper (*Capparis spinosa* L.) roots assisted by ultrasound waves. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 22(4), 1-8.
- [10] Majd, M. H., Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavi, S. A., & Bolourian, S. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 57, 195-202.
- [11] Zheng, B., Yuan, Y., Xiang, J., Jin, W., Johnson, J. B., Li, Z., ... & Luo, D. (2022). Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivities. *Lwt*, 154, 112740.
- [12] Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021.
- [13] Luque-Garcia, J. L., & De Castro, M. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 41-47.
- [14] Ranjha, M. M. A., Irfan, S., Lorenzo, J. M., Shafique, B., Kanwal, R., Pateiro, M., ... & Aadil, R. M. (2021). Sonication, a potential technique for extraction of phytoconstituents: a systematic review. *Processes*, 9(8), 1406.
- [15] Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2021). Plant of the Millennium, Caper (*Capparis spinosa* L.), chemical composition and medicinal uses. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 1-9.
- [16] Gan, L., Zhang, C., Yin, Y., Lin, Z., Huang, Y., Xiang, J., ... & Li, M. (2013). Anatomical adaptations of the xerophilous medicinal plant, *Capparis spinosa*, to drought conditions. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(2), 156-161.
- [17] Chedraoui, S., Abi-Rizk, A., El-Beyrouthy, M., Chalak, L., Ouaini, N., & Rajjou, L. (2017). *Capparis spinosa* L. in a systematic review: A xerophilous species of multi values and promising potentialities for agrosystems under the threat of global warming. *Frontiers in Plant science*, 8, 1845.

- [18] Moufid, A., & Farid, O. M. Eddouks. (2015). Pharmacological Properties of *Capparis spinosa* Linn. Int J Diabetol Vasc Dis Res, 3(5), 99-104.
- [19] Zhou, H., Jian, R., Kang, J., Huang, X., Li, Y., Zhuang, C., ... & Wu, X. (2010). Anti-inflammatory effects of caper (*Capparis spinosa* L.) fruit aqueous extract and the isolation of main phytochemicals. Journal of agricultural and food chemistry, 58(24), 12717-12721.
- [20] Yang, T., Wang, C., Liu, H., Chou, G., Cheng, X., & Wang, Z. (2010). A new antioxidant compound from *Capparis spinosa*. Pharmaceutical biology, 48(5), 589-594.
- [21] Huseini, H. F., Hasani-Rnjbar, S., Nayebi, N., Heshmat, R., Sigaroodi, F. K., Ahvazi, M., ... & Kianbakht, S. (2013). *Capparis spinosa* L. (Caper) fruit extract in treatment of type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. Complementary therapies in medicine, 21(5), 447-452.
- [22] Mollica, A., Zengin, G., Locatelli, M., Stefanucci, A., Mocan, A., Macedonio, G., ... & Novellino, E. (2017). Anti-diabetic and anti hyperlipidemic properties of *Capparis spinosa* L.: in vivo and in vitro evaluation of its nutraceutical potential. Journal of functional foods, 35, 32-42.
- [23] Yang, T., Liu, Y., Wang, C., & Wang, Z. (2008). Advances on investigation of chemical constituents, pharmacological activities and clinical applications of *Capparis spinosa*. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica, 33(21), 2453-2458.
- [24] Mahboubi, M., & Mahboubi, A. (2014). Antimicrobial activity of *Capparis spinosa* as its usages in traditional medicine. Herba Polonica, 60(1), 39-48.
- [25] Bhoyar, M. S., Mishra, G. P., Naik, P. K., & Singh, S. B. (2018). Evaluation of Antioxidant Capacities and total Polyphenols in Various Edible Parts of *Capparis spinosa* L. Collected from trans-Himalayas. Def. Life Sci. J., 3(2), 140-145.
- [26] Gull, T., Sultana, B., Bhatti, I. A., & Jamil, A. (2015). Antibacterial potential of *Capparis spinosa* and *Capparis decidua* extracts. International journal of Agriculture and Biology, 17(4), 727-733.
- [27] Mazarei, F., Jooyandeh, H., Noshad, M., & Hojjati, M. (2017). Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. International journal of biological macromolecules, 95, 224-231.
- [28] Boudries, H., Nabet, N., Chougui, N., Souagui, S., Loupassaki, S., Madani, K., & Dimitrov, K. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolics from *Capparis spinosa* flower buds and LC-MS analysis. Journal of Food Measurement and Characterization, 13(3), 2241-2252.
- [29] Jokar, M., Rahman, R. A., Ibrahim, N. A., Abdullah, L. C., & Tan, C. P. (2012). Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. Food and bioprocess technology, 5(2), 719-728.
- [30] Ozturk, S., & Ercisli, S. (2007). Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food control, 18(5), 535-540.
- [31] Li, J. W., Ding, S. D., & Ding, X. L. (2007). Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. jinsixiaozao. Journal of food engineering, 80(1), 176-183.
- [32] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics sonochemistry, 11(3-4), 261-265.
- [33] Hematian, A., Nouri, M., & Dolatabad, S. S. (2020). Kashk with caper (*Capparis spinosa* L.) extract: quality during storage. Foods and Raw Materials, 8(2), 402-410.
- [34] Rashedi, H., Amiri, H., & Gharezi, A. (2015). Assessment of phytochemical and antioxidant properties of the *Capparis spinosa* L. in Khuzestan province. *Journal of Inflammatory Disease*, 18(6), 11-17. (In persian).
- [35] Arrar, L., Benzidane, N., Krache, I., Charef, N., Khennouf, S., & Baghiani, A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. Pharmacognosy Communications, 3(2), 70-74.
- [36] Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O. E., Sahin, H., Yildiz, O., & Baltas, N. (2013). Phenolic components,

antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa* L. African Journal of Biotechnology, 12(47), 6643-6649.

[37] Dehghan Tanha, R., Mahdian, E., Amini Fard, M. H., Bayat, H., & Karajian, R. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total phenolic content from *Capsicum annum* fruits with response surface methodology. Journal of Innovation in Food Science and Technology, 11(1), 87-97. (In persian).

[38] Irawan, C., Sukiman, M., Putri, I. D., Utami, A., Dewanta, A., & Noviyanti, A. (2022). Optimization of the Ultrasound Assisted Extraction of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Fruit Peel and its Antioxidant and Anti-Gout Potential. Pharmacognosy Journal, 14(2), 397-405.

[39] Zia-Ul-Haq, M., Cavar, S., Qayum, M., Imran, I., & Feo, V. D. (2011). Compositional studies: antioxidant and antidiabetic activities of *Capparis deciddua* (Forsk.) Edgew. International journal of molecular sciences, 12(12), 8846-8861.

[40] Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. Phytomedicine, 90, 153626.

[41] Rouhani, H. (2016). Determination some the ecological, antioxidant and antimicrobial properties of caper (*Capparis spinosa*) in habitat Gonabad. M.Sc Thesis of Rangeland Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Torbat-e-Heydarieh. (In persian).

[42] Rahimifard, N., Shojaii, A., Mahbobi, M., Hafezan, G., Bagheri, F., & Asgarpanah, J. (2015). Evaluation of antibacterial activity and flavonoid content of two *Capparis* species from Iran. Journal of Medicinal Plants, 14(55), 89-94. (In persian).



Scientific Research

Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extracts extracted from Caper (*Capparis spinosa*) fruit by ultrasound method using the RSM

Abdolvahed Safarzaei¹, Reza Esmaeilzadeh Kenari^{*2}, Reza Farahmandfar³, Ali Reza Khalighi Mehr⁴

1- Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*2- Ph.D, Full Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3- Ph.D, associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

4- Ph.D Student, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Tehran University, Tehran, Iran

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Extracts and essential oils of medicinal plants have many bioactive agents, including phenolic compounds with significant antioxidant and antimicrobial properties. Choosing the suitable extraction method affects the quantity and quality of antioxidant and antimicrobial compounds. The aim of this study was to evaluate the efficiency of ultrasound waves in extracting phenolic, antioxidant and antimicrobial compounds of Caper fruit. Response surface methodology (RSM) and Box–Behnken design were used to optimize the extraction factors, including extraction time (10, 25, 40 min) and ultrasound intensity (40, 70, 100 %) with ethanolic solvent (70 %). From the results of the tests performed with the response surface methodology, ultrasound intensity was recognized as the most effective factor in extracting phenolic, antioxidant and antimicrobial compounds of Caper fruit and by increasing time and ultrasound intensity, the extraction of these compounds increased. The optimum conditions for extraction of antioxidant and antimicrobial compounds of Caper fruit were determined extraction time 36 minutes and ultrasound intensity 91 percent. In these optimum conditions, the amount of total phenolic contents and IC₅₀ index of ethanolic extracts extracted from Caper fruit were obtained 23.63 mg/g and 45.30 µg/mg, respectively, the optimum amount of minimum inhibitory concentration of *coagulase positive Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were obtained 0.19 and 6.07 mg/ml, respectively, and the optimum amount of minimum bactericidal concentration of *coagulase positive Staphylococcus aureus* was obtained 11.81 mg/ml. Also, the extracts extracted at time 36 minutes and ultrasound intensity 91 percent had the ability to inhibit the activity of *Escherichia coli* O157: H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 25 and 25 mg/ml, respectively, and had the bactericidal ability of *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 25, 50 and 50 mg/ml, respectively.

Article History:

Received: 2022/8/15

Accepted: 2023/11/18

Keywords:

Caper,

Antioxidant,

Antimicrobial,

Ultrasonic bath

DOI: 10.22034/FSC.T.20.145.1

*Corresponding Author E-Mail:
r.esmaeilzade@sanru.ac.ir