مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی شرایط استخراج عصاره هسته زیتون با استفاده از دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک و ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی آن‌ها

عباس نمدی‌پور[۱]، حبیب الله میرزایی[۲*]، محمدعلی سحری[۳]، منصوره هوشیار [۴]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- *دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس.

۴- دانش آموخته دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۱

کلمات کلیدی:

عصاره هسته زیتون،

ترکیبات فنلی،

خصوصیات ضد میکروبی،

GC-MS

DOI:10.22034/FSCT.22.162.1.

* مسئول مکاتبات:

mirzaeihabib1@gmail.com

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی شرایط استخراج عصاره هسته زیتون با استفاده از دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک و بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بود. طبق نتایج، عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی می‌باشد. نوع حلال و مدت زمان استخراج، دارای تاثیر معنی‌داری ($P<0/05$)، روی مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌های هسته زیتون می‌باشد. همچنین، تیمارهای استخراج شده با حلال (آب ۰ : اتانول ۱۰۰) در هر سه زمان (۱، ۲ و ۳ دقیقه) و سپس تیمارهای استخراج شده با حلال اتانول ۸۰: آب ۲۰ در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بودند؛ و به عنوان تیمارهای منتخب جهت انجام آزمون‌های میکروبی، انتخاب شدند. در ارتباط با خصوصیات ضد میکروبی، طبق نتایج بدست آمده از آزمون انتشار چاهک، هر سه عصاره اتانولی، دارای خصوصیات ضد میکروبی بودند. از سوی دیگر، در آزمون اندازه گیری چگالی نوری که جهت انتخاب تیمار بهینه صورت گرفت، نتایج نشان داد که عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای بالاترین خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد؛ در نتیجه این عصاره به عنوان بهترین تیمار انتخاب و ترکیبات فنلی آن بوسیله دستگاه GC-MS اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که، بیشترین درصد فراوانی ترکیب فنلی در این عصاره مربوط به هیدروکسی تایروزول و تایروزول می‌باشد.

۱-مقدمه

استفاده زیاد از افزودنی‌های ضد میکروبی شیمیایی مانند سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم، سبب ایجاد مشکلات متعدد در سلامت مصرف کنندگان از جمله مسمومیت، اثرات منفی در سلول‌های کبدی، کلیوی و مغزی و در موارد حادتر سرطان، می‌شود؛ به همین دلیل در سالیان اخیر، تقاضا برای استفاده از مواد طبیعی و بیولوژیک، به‌عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است [1]. از دیگر معایب مواد شیمیایی، می‌توان به محدود بودن، گرانقیمت بودن و همچنین ایجاد مقاومت دارویی در مصرف کنندگان اشاره کرد[2]. از سوی دیگر، عصاره‌ها گیاهی نسبت به مواد شیمیایی، به دلیلی دارا بودن منشا طبیعی، سازش بیشتری با بدن انسان دارند. عدم وجود عوارض جانبی، ارزان بودن و در دسترس بودن از دیگر مزایای استفاده از عصاره های گیاهی بجای مواد شیمیایی می‌باشد[3]. در میزان اثر نگهدارنده‌های طبیعی، نوع و مقدار ترکیبات فنلی بسیار مهم می‌باشد. در مطالعات مختلف، مقادیر متفاوتی برای میزان ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال‌های مختلف ارائه گردیده است. این مقادیر مختلف استخراج، به نوع گیاه و منطقه‌ای که در آن کشت شده و شرایط استخراج بستگی دارد [4]. زیتون[۲] با نام علمی ***Olea europaea*** به خانواده ***Oleaceae*** تعلق دارد. میوه زیتون به علت داشتن روغن بسیار با کیفیت و مرغوب، یکی از پرفایده ترین میوه‌های مناطق نیمه گرمسیری می‌باشند [5]. ایران با تولید سالیانه ۸۵ هزار تن در رتبه ۲۰ دنیا قرار دارد [6]. به دلیل کاربردهای عمده زیتون از جمله تهیه روغن و کنسرو میوه زیتون، در سالیان اخیر توجه زیادی به کاشت و پرورش آن شده است. ضایعات مواد غذایی که در طول تولید، پخش و مصرف مواد غذایی تولید می‌شوند، دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای زیادی بوده؛ که دفع آن‌ها از یک سو باعث هدر رفت مواد مغذی و از سوی دیگر هزینه بر می‌باشد. دفع ضایعات همچنین دارای اثرات مخربی روی محیط زیست می‌باشند. به‌همین دلیل صنعت غذا به دنبال راهکاری برای کاهش این ضایعات غذایی و همچنین استفاده مطلوب از محصولات فرعی بدست آماده در طی زنجیره تولید می‌باشد [7]. ابوالفتح و همکاران (۲۰۲٤) به بررسی متغیرهای مختلف بر خواص ضد باکتریایی برگ زیتون پرداختند. نتایج نشان داد که عصاره‌ی برگ زیتون دارای اثرات معنی داری روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد[8]. تولید میزان زیاد هسته زیتون به‌عنوان ضایعات در صنایع فرآوری زیتون، و با توجه به رشد این صنایع در سالیان اخیر، سبب شده است که راهکارهایی با هدف استفاده بهینه از این ضایعات در صنایع غذایی و دارویی ایجاد شود. هسته زیتون یک ساختار لیگنوسلولزی است که از سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل شده است. هسته زیتون حاوی پروتئین و پلی فنل‌های زیادی مانند تایروزول، هیدروکسی تایروزول، اولئوروپین می‌باشد [9]. هسته زیتون که ۲۲-۱۸ درصد از وزن زیتون را شامل می‌شود؛ منبع بسیار غنی از ترکیبات مفید و ارزشمند می‌باشد [10]. هسته زیتون حاوی مواد معدنی زیادی مانند منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سیلیس و گوگرد زیادی می‌باشد. علاوه بر این، وفور ترکیبات فنلی در هسته زیتون سبب شده است که این محصول فرعی صنایع غذایی، به‌عنوان یک ماده‌ی دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی شناخته شود [11]. ماستری و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی ترکیبات هسته زیتون پرداختند. این محققین بیان کردند که هسته زیتون حاوی فیبر رژیمی، لیپید و پروتئین به ترتیب ٤۷ ، ۳۰ و ۱۷ درصد بر مبنای وزن خشک می‌باشند.

2 -Olive

این محققین همچنین میزان ترکیبات فنلی درون عصاره هسته زیتون را ۲۸۰ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک بر حسب گالیک اسید گزارش کردند [12]. تاکنون براساس اطلاعات موجود از آن‌جایی‌که، تحقیقی در زمینه بهینه سازی استخراج عصاره هسته زیتون با روش سوند هموژنایزر صورت نگرفته است؛ لذا در این تحقیق سعی شد که ابتدا، پودرهای هسته زیتون (واریته شنگه) بوسیله‌ی ۵ سیستم حلال (شامل ۲ سیستم حلال تک جزیی آب و اتانول و ۳ سیستم حلال دو جزیی آب ۵۰ : اتانول ۵۰، آب۲۰ : اتانول ۸۰ و آب ۸۰ : اتانول ۲۰) در سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه بوسیله‌ی دستگاه سوند هموژنایزر با توان ۱۰۰ وات (نیم ثانیه روشن و نیم ثانیه خاموش) مورد عصاره گیری قرار گیرد. در ادامه، عصاره‌های حاصل توسط کاغذ واتمن شماره ٤ فیلتر و میزان ترکیبات فنلی آن‌ها ارزیابی گردید. در مرحله بعد، ۵ نمونه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی انتخاب و خصوصیات ضدمیکروبی آن‌ها بررسی شد. در پایان عصاره دارای بالاترین خاصیت ضد میکروبی به عنوان نمونه بهینه انتخاب و ترکیبات فنلی آن بوسیله دستگاه GC-MS اندازه گیری گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد و دستگاه‌ها

هسته زیتون (واریته شنگه)، از کارخانه اسپینو واقع در اطراف تهران، سوش‌های میکروبی از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی، اتانول، فولین سیوکالته و کربنات سدیم، از شرکت سیگما و محیط کشت‌های پوتیتیو دکستروز آگار و مولر هینتون آگار از شرکت مرک تهیه شدند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- بهینه سازی استخراج عصاره هسته زیتون:

هسته‌های زیتون پس از شستشو، ابتدا در شرایط طبیعی و با استفاده از محیط مناسب و سپس به منظور رسیدن به حد مطلوب خشک شدن (۱۰ درصد) در آون ٤۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ٤ ساعت خشک و در ادامه توسط آسیاب صنعتی، آسیاب شد. پودرها تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر با دمای منفی ۱۸- قرار داده شد. جهت استخراج عصاره‌ها، برای هر تیمار ۵ گرم پودر هسته با ۱۰۰ میلی لیتر از حلال‌ها (۲ سیستم حلال تک جزیی آب و اتانول و ۳ سیستم حلال دو جزیی آب ۵۰: اتانول ۵۰، آب۸۰:اتانول۲۰ و آب۲۰: اتانول۸۰) را درون بشر ریخته و توسط دستگاه سوند با توان ۱۰۰ در سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه (نیم ثانیه روشن، نیم ثانیه خاموش) عصاره گیری صورت پذیرفت. در ادامه، عصاره‌های حاصل با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره ٤ صاف و تا انجام آزمایشات بعدی در یخچال با دمای ٤ درجه سلسیوس قرار داده شدند [13].

۲-۲-۲ اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل عصاره‌ها:

اندازه گیری ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره‌ها بر اساس روش فولین سیوکالته (کاپنسی و همکاران، ۲۰۰۰) انجام گردید [14]. بر اساس این روش، ابتدا ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالته که به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دو بار تقطیر رقیق شده، ترکیب گردید. پس از گذشت ۸ دقیقه، ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن افزوده و به حجم ۵۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رسانده شد. ترکیب حاصله به مدت ۰/۵ ساعت در تاریکی قرار داده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۰ نانومتر قرائت گردید. فنل کل، با توجه به معادله‌ی خط بدست آمده از نمودار استاندارد، بر حسب گالیک اسید گزارش گردید:

$A=0/0011C+0/0196,\ R^2=0$

A جذب نمونه در ۷۶۰ نانومتر و C غلظت معادل اسید گالیک (میکروگرم بر میلی لیتر) می‌باشد.

۳-۲-۲- ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی نمونه‌های منتخب:

جهت بررسی خصوصیات ضد میکروبی (*آسپرژیلوس نایجر* PTCC ۵۲۹۸ و *اشریشیا کلی* PTCC ۱۳۹۹) از روش Fasihi و همکاران (۲۰۱۷) با کمی تغییرات استفاده گردید [15].. در هر دو مورد، از سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (هر ۱ سی سی معادل نیم مک فارلند، $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری وجود دارد) و از روش انتشار چاهک استفاده گردید. در ارتباط با خصوصیات ضد قارچی، پس از ریختن محیط کشت پوتیتیو دکستروز آگار[3] در پلیت استریل و کشت سطحی کپک *آسپرژیلوس نایجر*، ۳ عدد چاهک به قطر ۵ میلی متر در هر پلیت ایجاد و عصاره به میزان ۵۰ میکرولیتر درون آن‌ها ریخته و گرمخانه گذاری (۲۵ درجه سلسیوس) انجام شد. اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها، نشان دهنده خصوصیات ضد قارچی عصاره‌ها بود. در ارتباط با خصوصیات ضدباکتریایی، پس از ریختن محیط کشت مولر هینتون آگار[4] در پلیت استریل و کشت سطحی باکتری *اشریشیا کلی*، ۳ عدد چاهک به قطر ۵ میلی متر در هر پلیت ایجاد و عصاره به میزان ۵۰ میکرولیتر درون آن‌ها ریخته و گرمخانه گذاری (۳۷ درجه سلسیوس) انجام شد. اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها، نشان دهنده خصوصیات ضد باکتریایی عصاره‌ها بود. در ادامه و جهت اطمینان کامل از صحت انجام کار، از الگوی رشد باکتری در محیط مایع با استفاده از جذب نوری بر اساس روش حبیبی و همکاران (۱۳۹۷) با کمی تغییرات استفاده گردید [16]. . به این صورت که میزان ۱۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم‌ها به محیط کشت لوریا براث (LB[5]) حاوی عصاره (۹ سی سی محیط کشت و ۱ سی سی عصاره)، اضافه و رشد میکروارگانیسم در سه روز متوالی در دماهای (۳۷ درجه سلسیوس برای باکتری و ۲۵ درجه سلسیوس برای کپک) بوسیله بررسی میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ارزیابی گردید.

٤-۲-۲- شناسایی پروفایل عصاره بهینه:

از دستگاه GC-MS برای شناسایی ترکیبات عصاره بهینه استفاده شد. طول، قطر و ضخامت لایه داخلی ستون استفاده شده به‌ترتیب، ۳۰ متر، ۰/۲۵ میلی متر و ۲۵ میکرومتر بود. نوع ستون HP-5MS با برنامه دمایی ۲۷۰-۴۰ درجه سلسیوس با سرعت افزایش دمای ۱۰ درجه سانتیگراد در دقیقه بود. گاز هلیوم، نقش گاز حامل با نرخ جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه را داشت. شناسایی ترکیبات فنلی عصاره، بوسیله‌ی مقایسه طیف سنج جرمی و اندیس بازداری آن‌ها به ترتیب با بانک طیفی و اندیس بازداری استاندارد ترکیبات صورت پذیرفت. میزان ترکیبات از طریق سطح کل پیک‌ها بوسیله نرم افزار دستگاه انجام گرفت [17].

۵-۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی و جهت تعیین اختلاف بین میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس‌ها با روش *ANOVA*، از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد

3 -Potato Dextrose Agar

4 -Mueller Hinton Agar

5 -Luria Broth

استفاده شد. آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار آماری *SPSS* انجام گرفت. برای رسم گراف‌ها و نمودارها از نرم افزار *Excel* استفاده و تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ ارزیابی مقدار کل ترکیبات فنلی هسته زیتون استخراج شده بوسیله حلال‌های مختلف:

مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره‌های استخراج شده بوسیله‌ی حلال‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نوع حلال و مدت زمان استخراج، دارای تاثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵)، در مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره‌های هسته زیتون دارد. به عبارت دیگر، با افزایش زمان استخراج، در تمام تیمارها، یک روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فنلی مشاهده گردید؛ که در اکثر موارد، این روند معنی دار (P<۰/۰۵) بود. در ارتباط با تاثیر نوع حلال، طبق نتایج بدست آمده، تیمارهای استخراج شده با حلال (آب۰:اتانول۱۰۰) در هر سه زمان و سپس تیمارهای استخراج شده با حلال اتانول۸۰: آب ۲۰ در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بودند؛ و به عنوان تیمارهای منخب، انتخاب شدند.

Table 1: Comparison of the average amount of phenolic compounds of extracts extracted with different solvents (mg of gallic acid per 100 grams of dry matter)

run	Time (m)	Solvent type	The amount of phenolic compounds
1	1	Ethanol 0: water 100	^{Hb} 4.11 ± 261.72
2	2	Ethanol 0: water 100	^{Hb} 3.21 ± 263.14
3	3	Ethanol 0: water 100	^{Ga} 1.42 ± 270.12
4	1	Ethanol 20: water 80	^{Hb} 2.36 ± 263.43
5	2	Ethanol 20: water 80	^{Hb} 2.19 ± 265.16
6	3	Ethanol 20: water 80	^{Fa} 6.87 ± 279.22
7	1	Ethanol 50: water 50	^{Gb} 1.83 ± 269.12
8	2	Ethanol 50: water 50	^{Gb} 3.23 ± 271.61
9	3	Ethanol 50: water 50	^{Fa} 2.12 ± 284.23
10	1	Ethanol 80: water 20	^{Fc} 4.22 ± 281.16
11	2	Ethanol 80: water 20	^{Eb} 3.11 ± 290.35
12	3	Ethanol 80: water 20	^{Da} 2.43 ± 303.77
13	1	Ethanol 100: water 0	^{Cc} 2.13 ± 341.91
14	2	Ethanol 100: water 0	^{Bb} 3.22 ± 352.02
15	3	Ethanol 100: water 0	^{Aa} 4.12 ± 384.34

Capital dissimilar letters indicate significant differences between all samples and small dissimilar letters indicate significant differences in each of the samples at different extraction times ($p < 0.05$).

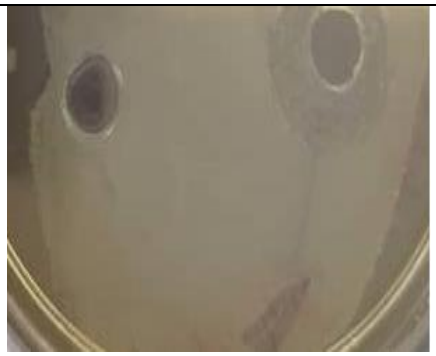
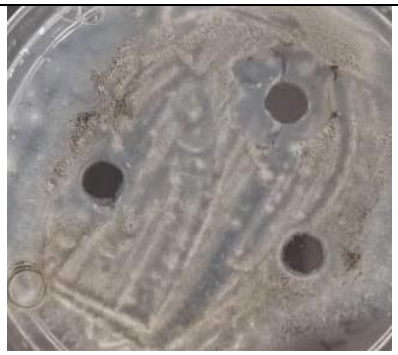
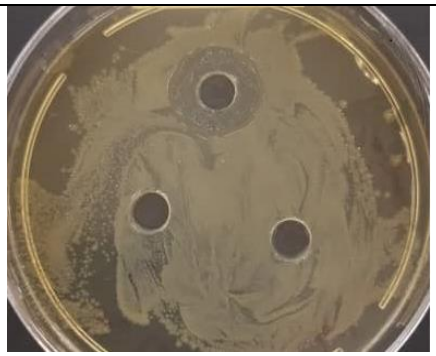
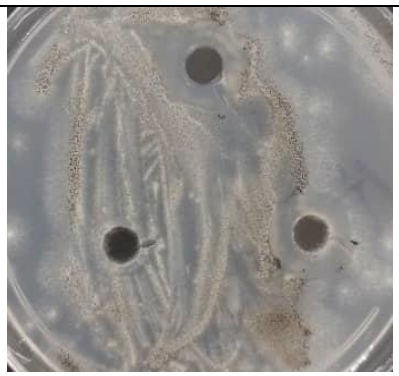
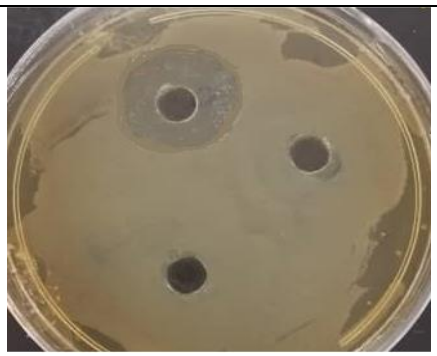
به دلیل ماهیت شیمیایی متفاوت ترکیبات فنلی با منشا گیاهی، این ترکیبات را می‌توان به روش‌های متفاوت و با حلال‌های مختلف استخراج کرد. از جمله عوامل تاثیر گذار در استخراج ترکیبات فنلی، نوع، حجم و اشباعیت حلال، درجه حرارت و تعداد دفعات فرایند استخراج و همچنین نوع و ماهیت گیاه می‌باشند [4]. امواج ایجاد شده در روش سوند هموژنایزر، با تشکیل پدیده کاویتاسیون، سبب تخریب دیواره سلولی و در نتیجه نشت ترکیبات فنلی توسط حلال به محیط می‌شود [18]. کدیر و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی میزان ترکیبات فنلی میوه، برگ و هسته زیتون با استفاده از روش سوکسله به این نتیجه رسیدند که، میزان ترکیبات فنلی درون عصاره‌ی اتانولی میوه زیتون، برگ زیتون و هسته زیتون به ترتیب ۲۷۰، ۲۸۰ و ۳۱۷ میکروگرم بر حسب گالیک اسید می‌باشد. این محققین بیان کردند که هسته زیتون به دلیل دارا بودن ماده لزج روغنی حاوی ترکیبات زیست فعال، غنی از ترکیبات فنلی می‌باشد [9]. نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده در این پژوهش، همخوانی داشت. در یک تحقیق دیگر دات و همکاران (۲۰۱۱) با بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی هسته زیتون با استفاده از حلال مختلف، گزارش کردند که تیمار بهینه با حلال متانولی، در زمان استخراج ۱۲ ساعت، درجه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد و ۳ مرحله استخراج بدست خواهد آمد. این محققین بیان کردند که افزایش زمان استخراج، سبب افزایش میزان ترکیبات فنلی عصاره‌ها می‌شود. از سوی دیگر، نتایج بدست آمده توسط این محققین نشان داد که حلال الکی نسبت به آب دارای بازدهی استخراج بیشتری می‌باشد؛ که در هر دو مورد با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [19]. اختلاف در میزان ترکیبات فنلی استخراج شده را بوسیله حلال‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در دامنه قطبیت پلی فنل‌ها نسبت داد؛ به همین دلیل انتخاب حلال مطلوب جهت استخراج ترکیبات فنلی، امری می‌باشد [20].

۲-۳ نتایج ارزیابی‌های میکروبی نمونه‌های منتخب:

جدول ۲ و شکل‌های ۱ و ۲، نشان دهنده‌ی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های منتخب از مراحل قبل (عصاره‌های استخراج شده با حلال اتانولی در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه و همچنین عصاره‌های استخراج شده با حلالی هیدروالکی اتانول ۸۰ : آب ۲۰، در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه) می‌باشند. طبق نتایج بدست آمده از آزمون انتشار چاهک، سه عصاره استخراج شده با حلال اتانولی با زمان استخراج ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیات ضد میکروبی بودند. لازم به ذکر است که نمونه‌های هیدروالکی خصوصیت ضد میکروبی ناچیزی از خود نشان دادند. از سوی دیگر، در آزمون جذب نوری که جهت کسب اطمینان از نتایج حاصل از آزمون انتشار چاهک و انتخاب تیمار بهینه (از بین عصاره‌های دارای خصوصیت ضد میکروبی در آزمون انتشار چاهک یعنی عصاره‌های اتانولی استخراج شده در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه) انجام گرفت، نتایج نشان داد که عصاره‌های اتانولی استخراج شده در هر سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی بودند. نتایج حاکی از آن بود که عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای خصوصیات ضد میکروبی بالاتری نسبت به سایر نمونه‌ها بود؛ لذا به‌عنوان تیمار بهینه جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب گردید. مارکین و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌ی آبی برگ زیتون بیان کردند که، این عصاره دارای قدرت مهارکنندگی در برابر

اشریشیا کلای می‌باشد[21] . که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. از دلایل خصوصیات ضد میکروبی این عصاره می‌توان به حضور ترکیبات فنلی مانند اولئوروپین و هیدروکسی تایروزول اشاره کرد [22] . همگ و همکاران (۲۰۲۰) نیز با بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ زیتون، گزارش کردند که این عصاره دارای خصوصیات ضد میکروبی بالایی در برابر *اشریشیا کلای* می‌باشد [23] . که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. کدیر و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته زیتون واریته هلهالی بیان کردند که عصاره هسته زیتون توانایی مهارکنندگی بالایی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها دارد [9]؛ که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. از سوی دیگر، یونس و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی محتوای فنلی و خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته زیتون بیان کردند که این عصاره تاثیر مهار کنندگی روی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای* ندارد. این محققین عدم وجود کاتچین در این عصاره را دلیل این امر دانستند [24]؛ که با نتایج این پژوهش مطابقت نداشت. از سوی دیگر، نتایج به دست آمده نشان داد که، افزایش میزان ترکیبات فنلی، سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها می‌گردد. ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها، از طریق تاثیر روی لایه فسفولیپیدی دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها، سبب تخریب غشا و خروج محتویات و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شود. از سوی دیگر، ترکیبات فنلی با تاثیر روی آنزیم آمینواسید دکربوکسیلاز میکروارگانیسم‌ها، اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند [25] .

Table 2 Antimicrobial properties of selected samples

Variable / Treatment	Antifungal effects	Antibacterial effects
Ethanol 100: water 0 in 1 minute		
Ethanol 100: water 0 in 2 minutes		
Ethanol 100: water 0 in 3 minutes		

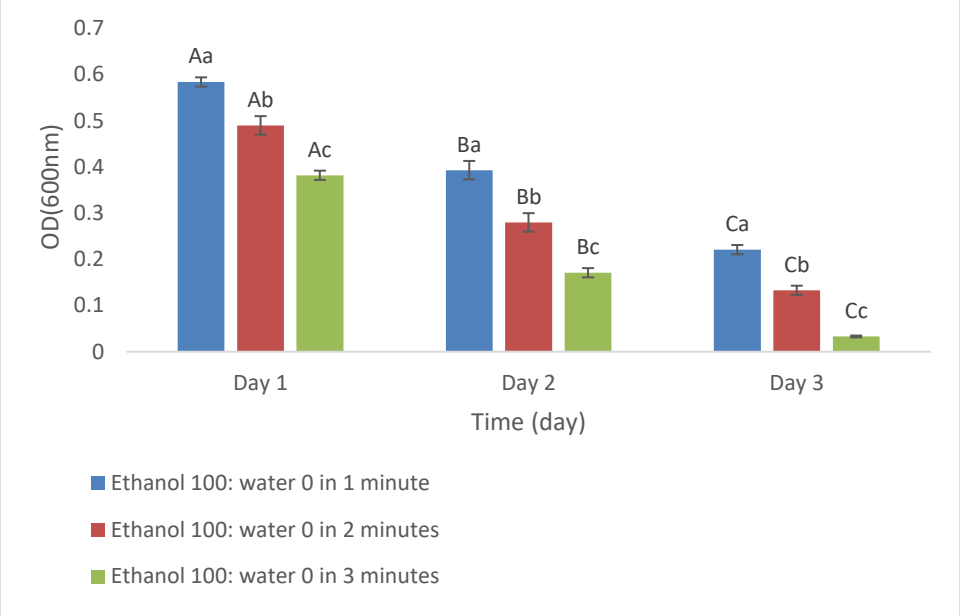


Fig 1: Antibacterial effects of ethanol extracts extracted in 1, 2 and 3 minutes. Capital dissimilar letters indicate significant differences in one sample on different days and small dissimilar letters indicate significant differences between different samples on the same day ($p < 0.05$).

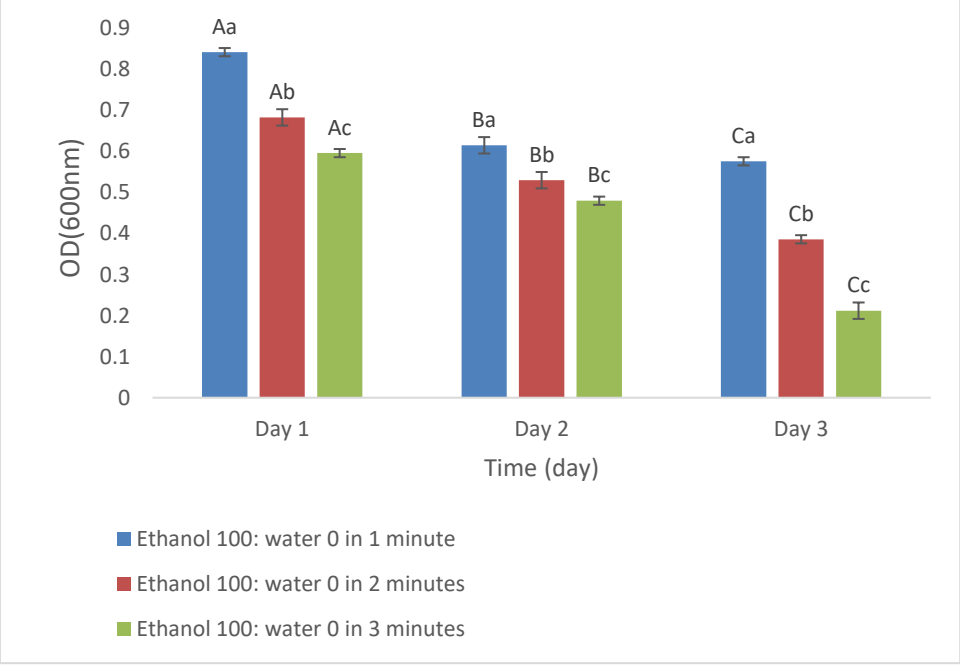


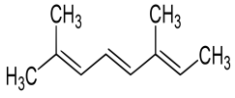
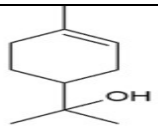
Fig 2: Antifungal effects of ethanol extracts extracted in 1, 2 and 3 minutes. (Capital dissimilar letters indicate significant differences in one sample on different days and small dissimilar letters indicate significant differences between different samples on the same day ($p < 0.05$))

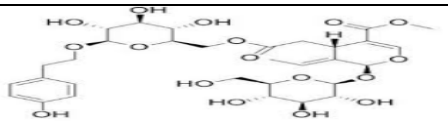
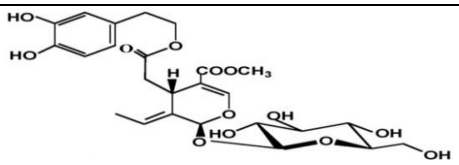
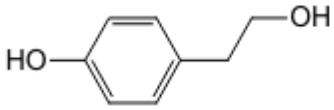
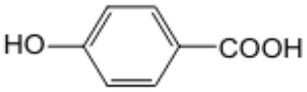
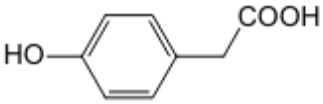
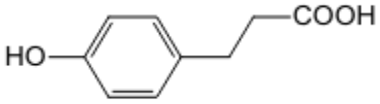
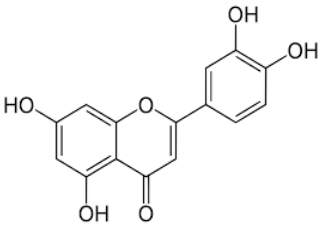
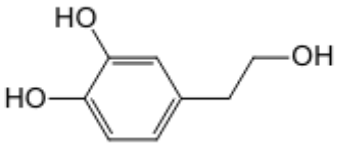
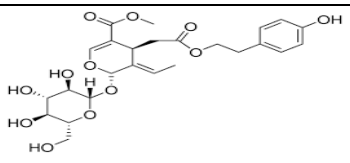
۳-۳ پروفایل ترکیبات فنلی نمونه بهینه:

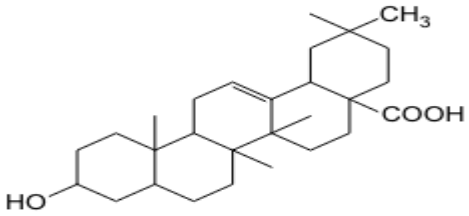
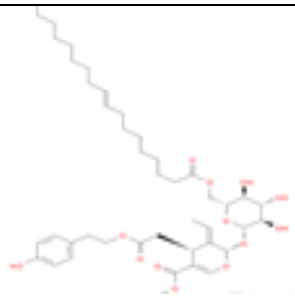
نوع و میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره هسته زیتون در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود،

۱۳ ترکیب اصلی شناسایی گردید. بیشترین درصد فراوانی مربوط به هیدروکسی تایروزول و تایروزول بود. که با نتایج بوسکو (۲۰۱۰) که روی ترکیبات فنلی عصاره میوه و هسته زیتون‌های کنسروی یونانی بررسی انجام دادند [26]؛ مطابقت داشت. اما میزان این ترکیبات با نتایج حال حاضر متفاوت بود؛ از دلایل این امر، می‌توان به واریته زیتون اشاره کرد. از سوی دیگر، مالیک و بردفورد (۲۰۰۶) گزارش کردند که عمده ترین ترکیب فنلی کمپلکس در میوه، هسته و برگ زیتون، اولئوروپین می‌باشد؛ که در طی بلوغ به ترکیبات فنلی دیگر از جمله، هیدروکسی تایروزل تجزیه می‌گردد [27]؛ که با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. نتایج این پژوهش در ارتباط با بیشتر بودن میزان هیدروکسی تایروزول و تایروزل، با نتایج مالاماسی و همکاران (۲۰۲۱) [28] و همچنین گنکالوز و همکاران (۲۰۱۹) [29]؛ همخوانی داشت. در تحقیقی دیگر بن منصور و همکاران (۲۰۱۱)، روی پروفایل ترکیبات فنلی هسته زیتون جمع آوری شده از درختان تونس بررسی انجام دادند؛ نتایج نشان داد که ترکیب فنلی نوژنید دارای بالاترین میزان می‌باشد [30]؛ که با نتایج پژوهش حال حاضر همخوانی نداشت. از دلایل این عدم تطابق می‌توان به زیتون انتخاب شده جهت انجام آزمایش اشاره کرد. به عبارت دیگر، برخلاف پژوهش حاضر که از هسته‌ی زیتون پس از فراوری استفاده گردید؛ اما آن محققان از هسته‌ی زیتون روی درخت و قبل از فراوری، جهت انجام آزمایش استفاده کردند. لازم به ذکر است که انجام فرایند سود زنی در کارخانه‌ها سبب تخریب ترکیبات فنلی کمپلکس می‌شود. از دیگر دلایل این امر می‌توان به واریته زیتون و همچنین نوع حلال جهت استخراج اشاره کرد. زیرا این محققین از حلال متانول ۸۰ درصد جهت استخراج ترکیبات فنلی استفاده کردند. از دیگر ترکیبات فنلی موجود در هسته زیتون می‌توان به لیگوستروزیدها اشاره کرد. لیگوستروزیدها یک ترکیب فنلی رایج در تمام بخش‌های زیتون مانند برگ، میوه و هسته زیتون یافت می‌شود؛ اما در هسته زیتون به مراتب کمتر گزارش شده است [31]. در ارتباط با حضور لیگوستروزیدها در هسته زیتون، نتایج این پژوهش با نتایج ماستری و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت [9] .

Table 3: The type and amount of phenolic compounds of the extracted extracts of the optimal treatment (mg of polyphenol per 100 grams of olive seed)

Run	RT(min)	Amount (%)	Phenolic compound	Chemical structure
1	6.134	0.51	Alloocimene	
2	8.53	0.23	ALPHA. TERPINEOL	

3	11.06	5.52	nuezhenide	
4	11.44	7.34	Oleuropein	
5	14.03	12.65	Tyrosol	
6	15.63	0.49	p-Hydroxy-benzoic acid	
7	17.285	0.57	p-Hydroxyphenylacetic acid	
8	18.5	11.4	Phloretic acid	
9	18.8	2.96	Luteolin	
10	18.92	28.12	Hydroxytyrosol	
11	19.36	0.46	Ligstroside	

12	22.78	8.35	Oleanolic acid	
13	25.596	0.57	Jaspolyanoside	

٤- نتیجه گیری

در این تحقیق به بررسی بهینه سازی استخراج عصاره هسته زیتون با استفاده از حلال‌های مختلف در زمان‌های مختلف با روش سوند هموژنایزر پرداخته شد. نتایج نشان داد که، عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی می‌باشد. نوع حلال و مدت زمان استخراج، دارای تاثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵)، در مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره‌های هسته زیتون می‌باشد.. به عبارت دیگر، با افزایش زمان استخراج، در تمام تیمارها، یک روند افزایشی در میزان استخراج ترکیبات فنلی مشاهده گردید؛ که در اکثر موارد، این روند معنی دار (P<۰/۰۵) بود. در ارتباط با تاثیر نوع حلال، طبق نتایج بدست آمده، تیمارهای استخراج شده با حلال (آب۰:اتانول۱۰۰) در هر سه زمان و سپس تیمارهای استخراج شده با حلال اتانول۸۰: آب ۲۰ در زمان‌های ۲ و ۳ دقیقه دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی بودند؛ و به عنوان تیمارهای منتخب، انتخاب شدند. در ارتباط با خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌های منتخب طبق نتایج بدست آمده از آزمون انتشار چاهک، سه عصاره استخراج شده با حلال اتانولی با زمان استخراج ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیات ضد میکروبی بودند. لازم به ذکر است که نمونه‌های هیدروالکی خصوصیت ضد میکروبی ناچیزی از خود نشان دادند. از سوی دیگر، در آزمون جذب نوری که جهت کسب اطمینان از نتایج حاصل از آزمون انتشار چاهک و انتخاب تیمار بهینه (از بین عصاره‌های دارای خصوصیت ضد میکروبی در آزمون انتشار چاهک یعنی عصاره‌های اتانولی استخراج شده در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه) انجام گرفت، نتایج نشان داد که عصاره‌های اتانولی استخراج شده در هر سه زمان ۱، ۲ و ۳ دقیقه دارای خصوصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی بودند. لازم به ذکر است که عصاره اتانولی استخراج شده در زمان ۳ دقیقه، به عنوان بهترین تیمار انتخاب و ترکیبات فنلی آن بوسیله دستگاه GC-MS اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که، بیشترین درصد فراوانی مربوط به هیدروکسی تایروزول و تایروزول می‌باشد.

٥-منابع

[1] Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9), 1199-1218.

[2] Kuo L-M Y, Tseng P-Y, Lin Y-C, Liaw C-C, Zhang L-J, Tsai K-C, et al. New hirsutinolide-type sesquiterpenoids from vernonia cinerea inhibit nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Planta Med. 2018;84(18):1348-1354. doi: 10.1055/a-0647-1901 PMID: 29986352.

[3] Rad BZ, Mardjanmehr H, Sasani F, Khosravi A, Gharagozlou MJ. Evaluation of skin repairing and antifungal properties of alcoholic extract of laleh abbasi (mirabilis jalapa) leaf on induced wounds in laboratory white rat model. J Vet Res. 2023;78(1):9-19. doi: 10.22059/jvr.2022.340558.3247 (In Persian).

[4] Anwar, F., and Przybylski, R. (2012). Effect of Solvents Extraction on Total Phenolics and Antioxidant Activity of Extractions from Flaxseed (Linum Usitatissimum L.). ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 11(3):293-301.

[5] Daane, K. M., and Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. Annual review of entomology, 55, 151-169.

[6] Jiménez-Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., del Mar Jiménez-Gasco, M., Antoniou, P. P., and Tjamos, E. C. (2012). Verticillium wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. Plant Disease, 96(3), 304-329.

[7] Hussein, A.M.S., M.M. Kamil and G.F. Mohamed. (2011). Physicochemical and sensorial quality of semolina defatted guava seed flour composite pasta. Journal of the American Society. 7(6): 623-629.

[8] Abolfath, M., Cheloei, N., Asgari, S., Beladian, E., Ghasemzadeh-mohammadi, V. (2024). Investigating Variables of Time, Extraction Solvent Composition and Ratio of Solvent-to-plant on Antioxidant and Antibacterial Characteristics of Striata Plants and Olive Leaves Using Microwave and Ultrasonic Extraction Methods. Iranian J Nutr Sci Food Technol; 19 (3) :43-53.

[9] Kadir, B., Fatümetüzzehra, K., Mehmet, A., A., , Selami, G., and Yakup, Y. (2023). Antioxidant and antithrombotic properties of fruit, leaf, and seed extracts of the Halhalı olive (Olea europaea L.) native to the Hatay region in Turkey. Foods and Raw Materials.11(1).

[10] Bianci, G., (2003). Lipids and phenols in table olives. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105, 229–242.

[11] Mokhtari, M., Ghanadi, A. (2013). The effects Of hydro-alcoholic extract Of olive seed on the levels Of the gonadotropines and ovarian steroids in immature female rat. Original Research, 2(6).

[12] Maestri, D., Barrionuevo, D., Bodoira, R., Zafra, A., Jiménez-López, J., Alché, J., d., D. (2019). Nutritional profile and nutraceutical components of olive (Olea europaea L.) seeds. Journal of Food Science and Technology, 56(9), 4359–4370. doi:10.1007/s13197-019-03904-5.

[13] namadipour A, sadeghi mahoonak A. 2018. Antioxidant interactions in date palm and zizyphus extracts combination. FSCT ; 15 (77) :38-31. URL: http://fsct.modares.ac.ir/article-7-8029-fa.html.

[14] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A. (2000). Electrochemicalsensor andbiosensor for polyphenols detection in oliveoils. Food Chemistry. 71: 553–562.

[15] Fasihi, H., Fazilati, M., Hashemi, M. and Noshiravani, N. (2017). Novel Carboxymethyl Cellulose- Polyvinyl alcohol blend films stabilized by Pickering emulsion in corporation method. Carbohydrate Polymers, 167, 79-89.

[16] Habibi, S. A., Soltani, M., Ahmadivand, S., and Taheri-Mirghaed, A. (2019). In vitro antibacterial activity of some medical plants against Streptococcus iniae. *New Findings in Veterinary Microbiology*, *1*(2), 36-46. doi: 10.35066/J040.2018.707.

[17] Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., El Feki, A., Damak, M., Sayadi, S. et al., (2017). LC-MS–MS and GCMS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian Juniperus phoenice leaves. Pharmaceutical Biology, 55(1):88-95.

[18] Karabegovic, I.T., Stojicevic, S.S., Velickovic, D.T., Todorovic, Z. B., Nikolic, N. C., and Lazic, M. L. (2014). The effect of different extraction techniques on the compositionand antioxidant activity of cherry laurel (Prunus laurocerasus) leaf and fruit extracts. Industrial Crops and Products, 54, 142–148.

[19] Alu'datt, M. H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M. N., Alsaad, A., Rababeh, T. (2011). Optimisation and characterisation of various extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity in olive seeds. Natural Product Research, 25(9), 876–889. doi:10.1080/14786419.2010.489048.

[20] Kchaou, W., Abbes, F., BLecker, C., Attia, H., and Besbes, S. (2013). Effects of extraction solvents on fenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (Phoenix dactylifera L.). Industrial Crops and Products. 45:262-269.

[21] Markín, D., Duek, L., and Berdícevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses, 46(3–4), 132–136. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00859.x.

[22] Liu, Y., McKeever, L. C., and Malik, N. S. A. (2017). Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology, 8(FEB), 113. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00113.

[23] Hemeg, H.A.; Moussa, I.M.; Ibrahim, S.; Dawoud, T.M.; Alhaji, J.H.; Mubarak, A.S.; Kabli, S.A.; Alsubki, R.A.; Tawfik, A.M.; Marouf, S.A.(2020). Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi J. Biol. Sci. 27*, 3221–3227.

[24] Younis, H., El shalakany, W., Amin, S., Abdel-Reheem, M., and Ibrahima, H. (2023). Biological activities and related phenolic compounds content of olive and plum stones ethanolic extract. Egyptian Journal of Chemistry, 66(13), 2307-2330. doi: 10.21608/ejchem.2023.209650.7948.

[25] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120(1), 193–198.

[26] Boskou, G. (2010). Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention || Antioxidant Capacity and Phenolic Profile of Table Olives from the Greek Market., 925–934. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00099-1.

[27] Malik, N.S.A. and Bradford, J.M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in a Arbeqtunaolives. Scientia Hort. 110: 274-278.

[28] Mallamaci, R.; Budriesi, R.; Clodoveo, M.L.; Biotti, G.; Micucci, M.; Ragusa, A.; Curci, F.; Muraglia, M.; Corbo, F.; Franchini, C. (2021). Olive Tree in Circular Economy as a Source of Secondary Metabolites Active for Human and Animal Health Beyond Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules* 2021, *26*, 1072. https://doi.org/10.3390/molecules26041072.

[29] Gonçalves, A., Silva, E., Brito, C., Martins, S., Pinto, L., Dinis, L., … Correia, C. M. (2019). Olive tree physiology and chemical composition of fruits are modulated by different deficit irrigation strategies. Journal of the Science of Food and Agriculture. doi:10.1002/jsfa.10064

[30] Ben Mansour, A., Porter, E. A., Kite, G. C., Simmonds, M. S. J., Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2015). Phenolic Profile Characterization of Chemlali Olive Stones by Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(7), 1990–1995. doi:10.1021/acs.jafc.5b00353.

[31] Michel, T., Khlif, I., Kanakis, P., Termentzi, P., Allouche, N., Halabalaki, M., Skaltsouni, A. (2015). UHPLC–DAD–FLD and UHPLC–HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different Olea europaea organs of Koroneiki and Chetoui varieties. Phytochem Lett 11:424–439.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigating the extraction conditions of olive kernel extract using a Ultrasonic Homogenizer and evaluating their antimicrobial properties

Namadpour , A.[1] , Mirzaei, H. A. [2*] , Sahari, M.A. [3], Hooshiyar, M.[4]

1. P.H.D. Student, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Professor, Dept. of Food Science & Technology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Former PhD Student, Department of Microbiology , Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2024/7/18

Accepted:2024/12/11

Keywords:

Olive kernel extract,

Phenolic compound,

antimicrobial properties,

GC-MS

DOI: 10.22034/FSCT.22.162.1.

*Corresponding Author E-mirzaeihabib1@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the extraction conditions of olive kernel extract using an ultrasonic homogenizer and to investigate the antimicrobial properties of the extract with the highest amount of phenolic compounds. According to the results, the ethanolic sample which was extracted in 3 minutes has the highest amount of phenolic compounds. The kinds of solvent and extraction time have significant effects ($P<0.05$) on the amount of the sample phenolic compounds. The treatments extracted with solvent (water 0: 100 ethanol) in all three times (1, 2 and 3 minutes) and then the treatments extracted with solvent ethanol 80: water 20 in 2 and 3 minutes had the highest amount of phenolic compounds thus as the treatment for performing microbial tests were selected. In relation to antimicrobial properties, according to the results obtained from the well diffusion test, all three ethanolic extracts had antimicrobial properties. Also, the optical density measurement test (OD or OD600) was done to choose the optimal treatment. The results showed that the ethanolic extract in 3 minutes has the highest antimicrobial properties, thus this extract was selected as the best treatment and its phenolic compounds were measured by GC-MS. The results showed that the highest percentage of phenolic compounds in this extract is related to hydroxytyrosol and tyrosol.