

بررسی تاثیر شرایط استخراج بر میزان ترکیبات فنولی و خاصیت ضد میکروبی عصاره پوست انار

پریا رهنمون^۱، محبوبه سرابی جماب^{۲*}، مجید جوانمرد داخلی^۳، آرام بستان^۴

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد

۲- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد

۳- دانشیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی پژوهشکده فناوری های شیمیایی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

۴- استادیار گروه نانوفناوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۱۹)

چکیده

امروزه تمایل به استفاده از ضد میکروب های طبیعی در مواد غذایی افزایش یافته است. پوست انار با داشتن ترکیبات فنولی و ضد میکروبی فراوان یک منبع مهم برای استخراج این ترکیبات به شمار می رود. در این پژوهش استخراج عصاره از پوست انار با نسبت های مختلفی از حلال اتانول/ آب (۴۰ به ۶۰، ۶۰ به ۴۰ و ۸۰ به ۲۰) در دماهای ۲۵، ۴۰ و ۵۵ درجه سانتی گراد و زمان های ۲۰، ۲۴ و ۲۸ ساعت انجام شد. بازده استخراج، میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها اندازه گیری گردید. قدرت ضد میکروبی عصاره های استخراج شده علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی شامل *سالمونلا* / *اینتریتیدیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* با روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) تعیین شد. نتایج نشان داد در نسبت اتانول به آب ۶۰ به ۴۰، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و زمان ۲۴ ساعت بیشترین بازدهی استخراج (۵۰/۱٪)، میزان ترکیبات فنولی کل (۳۴۹/۵۱۸ میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک)، فلاونوئیدها (۲۵۰/۱۲۴ میلی گرم روتین بر گرم عصاره خشک)، آنتوسیانین ها (۲۵۲/۰۴۷ میلی گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در ۱۰۰ گرم عصاره) و نیز قویترین خاصیت ضد میکروبی به دست آمد. تمامی عصاره ها خاصیت ضد میکروبی در مورد میکروارگانیسم های مورد مطالعه داشتند. در میان میکروارگانیسم های مورد آزمون، *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره پوست انار داشت.

کلید واژگان: عصاره پوست انار، قدرت ضد میکروبی، ترکیبات فنولی، فلاونوئید، آنتوسیانین.

* مسئول مکاتبات: m.sarabi@rifst.ac.ir

۱- مقدمه

از دیر باز سلامت مواد غذایی از لحاظ میکروبی یکی از دغدغه‌های مهم مصرف‌کنندگان، تولیدکنندگان و سازمان‌های کنترل‌کننده بوده است. امروزه تقاضا برای استفاده از مواد غذایی با حداقل فرایندهای نگهداری و کمترین میزان مواد نگهدارنده سنتزی افزایش یافته است. با اینکه بسیاری از این نگهدارنده‌های سنتزی از سوی سازمان‌های مسئول مجوز استفاده در مواد خوراکی را دارند ولی بحث در مورد عوارض جانبی آن‌ها هنوز مطرح می‌باشد. با توجه به استفاده روزافزون از مواد غذایی نیمه آماده و کنسرو شده که معمولا حاوی نگهدارنده‌های سنتزی می‌باشند، مشکل استفاده از این ترکیبات بیش از پیش بروز می‌نماید و انتخاب جایگزین مناسب و طبیعی برای این نگهدارنده‌ها احساس می‌شود. ضایعات برخی گیاهان و میوه‌ها منابع ارزشمندی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از جمله ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند [۱-۴].

انار با نام علمی *پونیکا گراناتوم*، میوه بومی کشورهای ایران، آفریقا، چین و هند است. ایران با تولید تقریباً ۹۹۰ هزار تن انار در سال یکی از بزرگترین تولید کنندگان این محصول در جهان محسوب می‌شود [۵]. قسمت عمده میوه انار تولیدی برای آب‌گیری استفاده می‌شود. پوست انار می‌تواند تا ۴۰٪ از وزن کل میوه انار را تشکیل دهد [۶] و از محصولات جانبی کارخانه‌های آب‌گیری به‌شمار می‌رود. تحقیقات نشان داده است ترکیبات فنولی انار بالا بوده (۷) و دارای خواص ضد میکروبی علیه باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های پاتوژن مانند *اشریشیا کلی*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *ویبریو کلرا*، *هلیکوباکتر*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *یرسینیا اینترکولیتیکا* و غیره است [۷ و ۸].

روش استخراج ترکیبات زیست‌فعال از منابع گیاهی یکی از فاکتورهای موثر در میزان دستیابی به این ترکیبات می‌باشد [۹]. یکی از روش‌های معمول استخراج ترکیبات ضد میکروبی استفاده از حلال است. حلال‌های آلی به صورت خالص و یا مخلوط با آب عمده‌ترین حلال‌های مورد استفاده برای استخراج این

ترکیبات می‌باشند [۱۰]. در بین حلال‌های آلی اتانول به دلیل غیرسمی بودن برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده در مواد غذایی کاربردی‌تر است [۱۱]. از روش‌های دستگاهی برای استخراج عصاره پوست انار می‌توان به تحقیق چم و هسل (۲۰۱۰) اشاره نمود که از آب فوق داغ برای استخراج پلی‌فنول‌های پوست انار استفاده کردند [۱۲]. استفاده از پیش‌تیمار اولتراسوند جهت استخراج ترکیبات فنولی پوست انار نیز مورد استفاده قرار گرفته است [۱۳].

در این پژوهش، سه فاکتور موثر در استخراج با حلال شامل دما، زمان و نسبت حلال با هدف دستیابی به بازده استخراج بالای ترکیبات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه قدرت ضد میکروبی عصاره پوست انار مربوط به حضور ترکیبات فنولی (فلاونوئیدی و غیرفلاونوئیدی) می‌باشد [۱۴]، میزان ترکیبات فنولی کل، فلاونوئیدها و مقدار آنتوسیانین‌ها اندازه‌گیری شد. خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های استخراجی علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی شامل *سالمونلا اینترتیدیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرویلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه* به دو روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) مورد آزمون قرار گرفت [۸].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه گیاهی

انار با واریته پیش‌رس شیراز از فروشگاه محلی در اواخر شهریورماه ۱۳۹۳ خریداری شد. بعد از پوست‌گیری با دست، پوست‌های جدا شده در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم آفتاب به مدت ۸ روز خشک شدند. نمونه‌های خشک شده با آسیاب (Moulinex, France) خرد شده و برای به دست آوردن پودر یکنواخت از الک ۳۵ مش استفاده شد [۸]. رطوبت اولیه نمونه به روش آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت طبق روش استاندارد ملی ۲۷۰۵ اندازه‌گیری شد [۱۵]. رطوبت اولیه نمونه‌ها $9.7 \pm 0.3\%$ بر پایه خشک به دست آمد.

1. *Punica granatum*

۲-۲- مواد شیمیایی

معرف فولین سیوکالتیو، سدیم کربنات، نیتريت سدیم، کلرید آلومینیوم، هیدروکسید سدیم، پتاسیم کلراید، اسید هیدروکلریک، سدیم استات، استیک اسید، مونوپتاسیم فسفات، دی‌پتاسیم فسفات، اسید سولفوریک، کلرید باریم، اسید گالیک، روتین، محیط کشت مولر هیتون مایع و آگار، محیط کشت دکستروز پیتیتو مایع و آگار از شرکت تجاری مرک آلمان خریداری شدند. اتانول با درجه خلوص ۹۶٪ از شرکت الکل اتحاد ایران تهیه شد.

۲-۳- سویه‌های میکروبی

چهار سویه باکتری شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۷۶۴ PTCC)، *اشریشیا کلی* (۱۳۲۹ PTCC)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۹۹۷ PTCC) و *سالمونلا اینترتیدیس* (۱۷۰۹ PTCC)، کپک *آسپرژیلوس نایچر* (۵۰۱۲ PTCC) و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (۵۱۷۷ PTCC) از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

۲-۴- استخراج

استخراج عصاره از پوست انار در چندین دما و زمان مختلف و با نسبت‌های متفاوتی از حلال اتانول/ آب انجام شد. نسبت ماده جامد به حلال مورد استفاده ۱ به ۱۰ وزنی- حجمی بود [۸]. عصاره‌های به دست آمده بعد از عبور از صافی پارچه‌ای، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Poya Electronic, Iran Gallenkamp vacuum oven, United Kingdom) شدند. مایع رویی جمع آوری و در آن تحت خلا (Kingdom) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، خلا ۰/۸ بار در مدت زمان ۵ الی ۸ ساعت (با توجه به نوع حلال) خشک شدند. عصاره‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۶].

۲-۵- اندازه‌گیری بازده استخراج

درصد بازده استخراج با تقسیم کردن عدد وزن عصاره خشک به دست آمده بر میزان اولیه نمونه (۵ گرم پوست انار) ضربدر ۱۰۰ به دست آمد.

۲-۶- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی از روش فولین- سیوکالتیو استفاده شد (۱۶). به طور خلاصه، ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول عصاره در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتر ریخته شد. ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و سپس ۲ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ بار رقیق شده به آن اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵٪ وزنی- حجمی اضافه گردید. پس از به حجم رساندن، میزان جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل شاهد بعد از یک ساعت قرائت شد. نتایج بر اساس منحنی استاندارد اسیدگالیک $(y=2.105x + 0.074)$ و بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره بیان شد.

۲-۷- اندازه‌گیری فلاونوئیدها

اندازه‌گیری فلاونوئیدها بر اساس روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم انجام گرفت [۱۷]. به طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر محلول عصاره به بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتر منتقل شد. ۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۳ میلی‌لیتر نیتريت سدیم ۵٪ اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، ۰/۳ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ اضافه شد. بعد از ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار اضافه شد و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب نمونه ها در ۵۱۰ نانومتر در مقابل شاهد قرائت شد. نتایج بر اساس منحنی استاندارد روتین $(y=0.417x + 0.015)$ و بر حسب میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره بیان شد.

۲-۸- اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها

برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌ها از روش اختلاف pH استفاده شد [۱۸]. بطور خلاصه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۳/۶ میلی‌لیتر از هر یک از بافرهای پتاسیم کلراید (pH=۱) و سدیم استات (pH=۴/۵) به طور جداگانه مخلوط شد. میزان جذب هر یک از محلول‌ها در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان جذب (A) از رابطه (۱) به دست آمد. میزان آنتوسیانین‌ها در عصاره بر حسب میلی‌گرم در لیتر از رابطه (۲) به دست آمد که در این رابطه، MW وزن مولکولی سیانیدین ۳ گلوکوزید و برابر با ۴۴۹/۲ گرم بر مول، DF فاکتور رقیق سازی، L طول سل بر حسب سانتیمتر، ϵ جذب مولی سیانیدین ۳ گلوکوزید و برابر با ۲۶۹۰۰ l/mol.cm و ۱۰۰۰، فاکتور تبدیل

اریترومایسن ($15 \mu\text{g}$) نیز به عنوان کنترل مثبت در سطح محیط آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت (باکتری)، ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت (مخمر) و ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۹۶ ساعت (کپک) گرمخانه‌گذاری شدند و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد [۲۰].

۲-۱۰-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC)

۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره بعد از عبور از فیلتر استریل $0.45 \mu\text{m}$ میکرون، به هر یک از سل‌های پلیت الایزا که حاوی ۹۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون مایع (باکتری) و محیط دکستروز مایع (کپک و مخمر) و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (10^6cfu/ml) بود، ریخته شد. سل حاوی محیط کشت بدون سوسپانسیون میکروبی و عصاره به عنوان کنترل منفی و سل حاوی محیط کشت مایع و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (10^6cfu/ml) به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. پلیت الایزا در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت (باکتری)، ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت (مخمر) و ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۹۶ (کپک) گرمخانه‌گذاری شد. رشد میکروبی با اندازه‌گیری دانسیته چشمی (OD) توسط دستگاه الایزا (ELISA reader, ELX800, Biotek Instruments) تعیین شد (۲۱). حداقل غلظت بازدارندگی رشد، کمترین غلظتی از عصاره است که بتواند مانع رشد میکروبی بعد از گرمخانه‌گذاری گردد.

۲-۱۱- طرح آماری

به منظور دستیابی به بیشترین بازدهی و خواص ضدمیکروبی عصاره استخراجی از پوست انار، چندین پیش‌تست برای انتخاب مهم‌ترین فاکتورهای موثر در استخراج انجام شد (داده‌ها نشان داده نشده است). نتایج نشان داد دما، زمان استخراج و نسبت حلال اتانول/ آب بیشترین تاثیر را در بازده استخراج و قدرت ضدمیکروبی عصاره استخراج شده دارد. آزمایشات در دماهای مختلف (۲۵، ۴۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های مختلف (۲۰، ۲۴ و ۲۸ ساعت) و نسبت‌های متفاوتی از اتانول/ آب (۶۰:۴۰، ۴۰:۶۰ و ۲۰:۸۰) به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً

گرم به میلی‌گرم می‌باشد. نتایج بر اساس میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در ۱۰۰ گرم عصاره بیان شد.

رابطه (۱)

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=4.5}$$

رابطه (۲)

$$\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{E \times L}$$

= میزان آنتوسیانین‌ها (میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در لیتر)

۲-۹- فعال سازی میکروارگانسیم‌ها

برای فعال سازی سویه‌های باکتری و مخمر، هر یک از سویه‌ها به محیط کشت مولر هینتون مایع منتقل و در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از سانتریفیوژ در 12000rpm به مدت ۱۰ دقیقه (Heraeus Biofuge (Pico, England)، مایع رویی دور ریخته شده و از کدورت باقیمانده به وسیله محلول بافر فسفات سوسپانسیون باکتری یک مک فارلند (10^8cfu/ml) تهیه شد (۸). برای تهیه سوسپانسیون قارچی، اسپور کشت داده شده در محیط پوتیتو دکستروز آگار به صورت استریل خراشیده و به داخل آب مقطر استریل انتقال یافت و تا به دست آمدن میزان جذب 0.600 در طول موج 450nm نانومتر، جهت به دست آوردن جمعیت میکروبی معادل cfu/ml 10^8 ، رقیق شد [۱۹].

۲-۱۰-۲- بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره

۲-۱۰-۱- روش انتشار دیسک

ابتدا از تمام سویه‌ها، سوسپانسیون میکروبی معادل 10^6cfu/ml تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری، کپک و مخمر بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (باکتری) و پوتیتو دکستروز آگار (کپک و مخمر) به طور یکنواخت پخش شد. دیسک‌های بلانک استریل به قطر ۶ میلی‌متر (پادتن طب) آغشته به ۴۰ میکرولیتر عصاره با رقت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (یعنی ۸ میلی‌گرم از عصاره پوست انار)، بعد از انجام یکسری پیش‌تست، در سطح محیط آگار قرار داده شد. محلول عصاره قبل از استفاده از فیلتر استریل $0.45 \mu\text{m}$ میکرون عبور داده شد. دیسک‌های آغشته به اتانول به عنوان کنترل منفی و دیسک‌های آنتی بیوتیک پنی سیلین ($10 \mu\text{g}$)، جنتامایسن ($10 \mu\text{g}$) و

در این پژوهش بازدهی استخراج ترکیبات فنولی با اتانول حدود ۲۵٪ گزارش شد [۹].

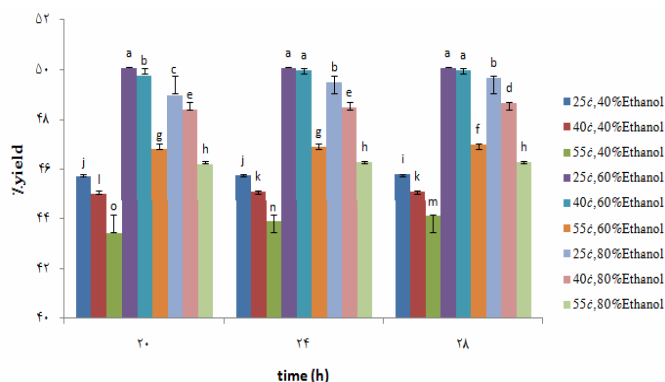


Fig 1 Extraction yields of different treatment.
*Different letters indicate significant difference between treatments.

۲-۳- ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدها

میزان ترکیبات فنولی کل در عصاره استخراجی بر مبنای مقادیر جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین سیوکالتو و بر اساس مقایسه آن با منحنی استاندارد گالیک اسید به دست آمد. میزان فلاونوئیدهای عصاره استخراجی از پوست انار نیز با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری و با قرار دادن در معادله خطی منحنی استاندارد روتین محاسبه شد. با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل ۲ و ۳، بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰ و در مدت زمان ۲۴ ساعت به دست آمد (۳۴۹/۵۱۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و ۲۵۰/۱۲۴ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره). در دماهای بالا میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها کاهش یافت بطوریکه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، نسبت اتانول/آب ۴۰ به ۶۰ و زمان ۲۸ ساعت کمترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئید، به ترتیب ۲۰۱/۰۵۴ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و ۱۳۲/۱۳۴ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره، به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که دماهای بالا باعث از بین رفتن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌شود. در دماها و زمان‌های مختلف بیشترین مقادیر ترکیبات فنولی در نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰ به دست آمد که نشان می‌دهد نسبت ۶۰ به ۴۰ دو حلال اتانول و آب بیشترین کارایی را برای استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در بین سه نسبت حلال انتخاب شده دارد. در مطالعه

تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ α = مقایسه شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بازده استخراج

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین بازده استخراج در نسبت حلال اتانول/آب ۶۰ به ۴۰ و دماهای پایین (۲۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد) به دست آمده است. در تحقیق انجام گرفته توسط مالویا و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیشترین بازدهی استخراج عصاره پوست انار استخراج شده با نسبت‌های مختلفی از حلال‌های آب، اتانول و متانول، زمانی به دست آمد که از حلال اتانول/آب با نسبت ۵۰ به ۵۰ استفاده شد [۲۲]. در بین متغیرهای انتخاب شده، نسبت حلال بیشترین تاثیر را در بازده استخراج نشان داد. با افزایش زمان درصد بازده استخراج در اکثر تیمارها افزایش یافت. افزایش دما (۵۵ درجه سانتیگراد)، در بیشتر موارد نه تنها باعث افزایش بازده استخراج نشد بلکه در برخی تیمارها روند بازده استخراج را کاهش داد. شاید به این دلیل که در دماهای بالاتر برخی ترکیبات فرار با سرعت بیشتری از عصاره استخراجی خارج می‌شوند و باعث کم شدن بازده استخراج می‌شوند. علاوه بر آن، در دماهای بالاتر برخی از ترکیبات حساس به حرارت از بین می‌روند که این امر باعث کاهش بازده استخراج می‌شود [۲۳]. وجود الکل به میزان ۶۰٪ در حلال، باعث افزایش میزان بازده استخراج شد. تحقیقات نشان داده است که الکل سرعت و بازده استخراج را به دلیل تخریب دیواره سلولی و افزایش میزان دسترسی مواد قابل حل شدن، افزایش می‌دهد [۱۰]. علاوه بر آن، استفاده از دو حلال در استخراج باعث می‌شود، از قدرت هر دو حلال در استخراج ترکیبات زیست فعال با قطبیت‌های متفاوت بهره برد [۱۰] و بازده استخراج را افزایش داد. در یک مطالعه، برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست انار از حلال‌های آب، اتانول، متانول، استون و اتیل استات در دمای اتاق و زمان ۶ ساعت استفاده شد. استون و متانول بترتیب با ۳۵٪ و ۳۰٪ بازدهی، بیشترین میزان بازدهی استخراج را نشان دادند.

۳-۳- آنتوسیانین‌ها

میزان آنتوسیانین‌های عصاره استخراج شده از پوست انار به روش اختلاف pH اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در ۱۰۰ گرم عصاره خشک پوست انار گزارش شد (شکل ۴). بیشترین مقدار آنتوسیانین‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نسبت اتانول/آب ۴۰ به ۶۰ و در مدت زمان ۲۰ ساعت به دست آمد (۳۰۴/۳۴۲ میلی‌گرم سیانیدین ۳ گلوکوزید در ۱۰۰ گرم عصاره). نتایج نشان داد که با افزایش دما میزان آنتوسیانین‌های عصاره کاهش می‌یابد که نشان دهنده حساسیت ترکیبات آنتوسیانینی به دماهای بالا می‌باشد. در تحقیق سوگانیا دنی و همکاران (۲۰۱۲) نیز نتایج نشان داده است، آنتوسیانین‌ها در دماهای پایین پایداری بیشتری نسبت به دماهای بالا دارند [۲۵]. آنتوسیانین‌ها ترکیبات زیست فعال حساس به حرارت می‌باشند که در دماهای بالا تجزیه می‌شوند [۲۳]. در سایر دماها و زمان‌های انتخاب شده برای استخراج نیز، در نسبت اتانول/آب ۴۰ به ۶۰، بیشترین مقدار آنتوسیانین‌ها به دست آمد که این یافته با نتایج اوآنسا و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد [۲۶]. در این مطالعه همچنین بهترین دمای استخراج، در بین سه دمای ۴، ۳۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد، جهت استخراج آنتوسیانین‌ها از نوعی توت آبی^۲، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد معرفی شد که این تفاوت شاید به دلیل زمان کوتاه استخراج (۲ ساعت) در این پژوهش بود.

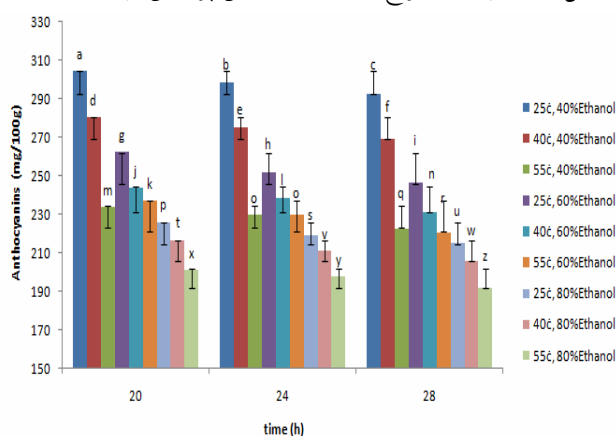


Fig 4 Anthocyanins content (mg/100g) of different treatments.

*Different letters indicate significant difference between treatments.

وانگ و همکاران (۲۰۱۳) نیز استخراج ترکیبات فنولی از برگ درخت انار در بین غلظت‌های متفاوتی از چند حلال مختلف شامل آب، اتانول، متانول و استون، حلال ۶۱٪ اتانول بیشترین بازدهی استخراج ترکیبات فنولی را داشت [۲۴]. همانطور که قبلاً نیز اشاره شد اتانول به دلیل تخریب دیواره سلولی، سرعت استخراج ترکیبات زیست فعال از جمله ترکیبات فنولی را افزایش می‌دهد [۱۰].

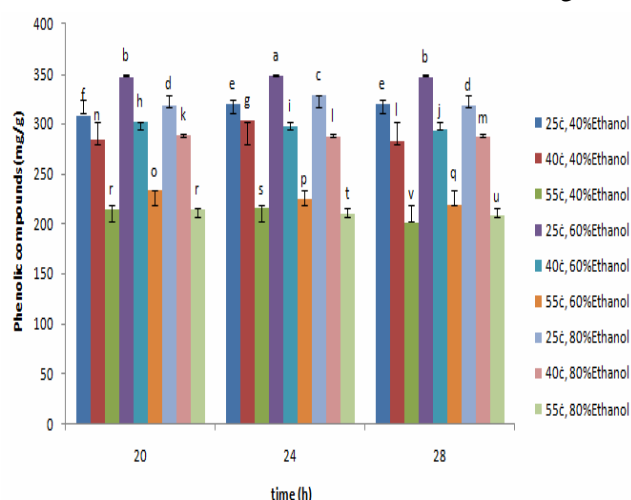


Fig 2 Total phenolic compounds content (mg/g) of different treatments.

*Different letters indicate significant difference between treatments.

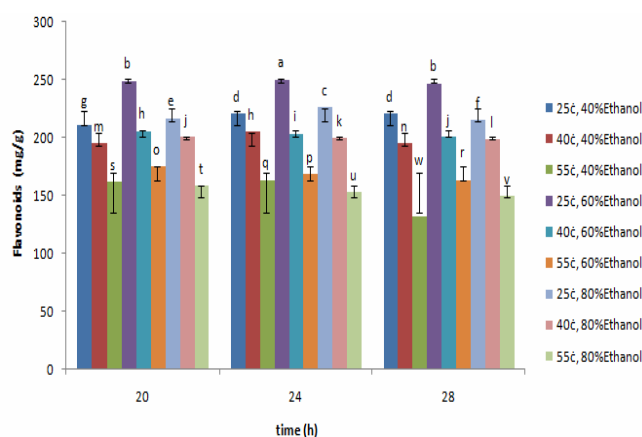


Fig 3 Total flavonoids content (mg/g) of different treatments.

*Different letters indicate significant difference between treatments.

۳-۴ ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها به دو روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) علیه چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمام عصاره‌های استخراجی علیه تمامی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون در این مطالعه خاصیت ضد میکروبی دارد (جدول ۱). بیشترین میزان خاصیت ضد میکروبی مربوط به عصاره پوست انار استخراج شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۴ ساعت و نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰ می‌باشد که نشان می‌دهد خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ها با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها ارتباط مستقیمی دارد [۸]. در بین باکتری‌های مورد آزمون، *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله عدم رشد بین ۹ تا ۱۸/۶۶ میلی‌متر) بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره پوست انار نشان داد. هایپاتیان و همکاران (۲۰۱۲) نیز هاله عدم رشد برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 14458 در حضور عصاره ۸۰٪ متانولی پوست انار را ۱۷ میلیمتر به دست آوردند. در بین باکتری‌های مورد آزمون *اشریشیا*

کلی بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره‌های استخراج شده از پوست انار نشان داد. باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره‌های گیاهی مقاومت بیشتری در مقایسه با گرم مثبت‌ها نشان می‌دهند [۲۷]. باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان، دارای یک غشا خارجی در دیواره سلولی خود می‌باشند. مولکول‌های لیپیدی ساکاریدی موجود در سطح این غشا و خاصیت هیدروفیلی آن، مقاومت این سلول‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد. درحالی‌که در باکتری‌های گرم مثبت، ترکیبات ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشا سیتوپلاسمی را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۲۷].

عصاره پوست انار در مورد *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سروزیه* نیز خاصیت ضد میکروبی نشان داد که با یافته آل‌زورکی (۲۰۰۹) مطابقت دارد. ایراهیم (۲۰۱۰)، هاله عدم رشد برای *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سروزیه* را در حضور عصاره پوست انار به ترتیب ۱۰/۳ و ۹/۶ میلی‌متر به دست آورد [۲۸] که با نتایج به دست آمده در این پژوهش (جدول ۱) مطابقت دارد.

Table 1 Inhibition zone (mm) of different extracts against tested microorganisms.

treatments		microorganisms						
Temp	Time	Ethanol:water	<i>S.enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.niger</i>	<i>S.cerevisiea</i>
25	20	40:60	11.33±0.577	11.33±0.577	12.33±0.577	15.33±0.577	12.33±0.577	8.66±0.577
25	20	60:40	13.33±0.577	11.33±0.577	12.33±0.577	18.33±0.577	15.33±0.577	12±1
25	20	80:20	11.33±0.577	10.33±0.577	11.33±0.577	14±1	10.66±1.527	8.66±0.577
25	24	40:60	12.33±0.577	11.66±0.577	12.66 ±0.577	16.66±0.577	13.66±0.577	9.67±0.577
25	24	60:40	13.33±0.577	12.33±0.577	13.67±0.577	16.33±0.577	13.67±1.528	10.33±1.528
25	24	80:20	11.33±0.577	10.33±0.577	10.33±0.577	13.33±0.577	10.33±1.528	8.33±1.527
25	28	40:60	12±1	12±1	12.33±1.528	15.66±0.577	13.66±0.577	10.66±0.577
25	28	60:40	12.66±0.577	11.33±0.577	12.33±0.577	16.67±0.577	13.33±1.528	10.33±0.577
25	28	80:20	10.33±0.577	10±1	9.67±0.577	12.33±0.577	9.33±0.577	7.33±0.577
40	20	40:60	8.66±1.528	9.33±0.577	11.66±0.577	13.67±1.528	11.33±0.577	8.33±0.577
40	20	60:40	10.33±0.577	11.66±0.577	11.33±0.577	13.33±0.577	9.67±2.08	8.33±1.528
40	20	80:20	9.33±0.577	10.33±0.577	9.33±0.577	11.33±0.577	8.33±1.527	6.33±0.577
40	24	40:60	11±1	9.66±0.577	11.66±0.577	14.33±0.577	13±1	8.66±1.528
40	24	60:40	10.66±0.577	10.33±0.577	9.33±0.577	11.66±1.528	9.33±1.528	7.66±0.577
40	24	80:20	9.33±0.577	9.66±0.577	8.33±0.577	10.33±0.577	8.66±2.08	5.33±0.577
40	28	40:60	9.66±0.577	10.33±0.577	9.66±1.528	14.66±0.577	10.66±1.527	8.33±1.528
40	28	60:40	9.33±0.577	10.66±0.577	9.33±0.577	12.33±0.577	8.33±1.527	8.33±1.528
40	28	80:20	7.66±1.527	9.33±0.577	8.33±0.577	10.33±0.577	8.33±0.577	5.33±0.577
55	20	40:60	8.33±0.577	9.66±0.577	9±1	11.66±1.528	9.33±0.577	6.66±0.577
55	20	60:40	8.33±0.577	9.66±0.577	9.33±0.577	11±1	6.66±0.577	6.33±0.577
55	20	80:20	7.33±0.577	6.33±0.577	8.33±0.577	10±1	7.33±1.527	6.33±1.528
55	24	40:60	7±1	9.33±0.577	10±1	10.66±1.527	8.66±2.08	6.33±0.577
55	24	60:40	8.33±0.577	10.33±0.577	8.33±0.577	11.33±0.577	7.33±1.528	6.33±0.577
55	24	80:20	7.33±0.577	8.33±0.577	8.66±0.577	9±1	7.33±1.528	6.66±0.577
55	28	40:60	7.33±0.577	9.33±0.577	9.33±0.577	12.33±0.577	10.33±1.528	7.33±0.577
55	28	60:40	7±1	9.33±0.577	9±1	10.33±0.577	7.33±1.528	7.33±0.577
55	28	80:20	7.33±0.577	6.66±1.528	8.33±0.577	9.33±0.577	7.33±1.527	6.33±0.577

ترکیبات فنولی از طریق چند مکانیسم مختلف خاصیت ضد میکروبی ایجاد می‌کنند. ترکیبات فنولی قادرند با پروتئین‌های دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها واکنش داده و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد نمایند و یا باعث دناتوراسیون برخی آنزیم‌های میکروبی شوند. علاوه بر آن این ترکیبات با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و آن‌ها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کنند [۳۲].

۳-۵- حساسیت میکروارگانیسم‌های مورد آزمون نسبت به آنتی بیوتیک‌های تجاری

نتایج مربوط به هاله عدم رشد باکتری‌های مورد آزمون نسبت به سه آنتی بیوتیک تجاری در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، در بین این آنتی بیوتیک‌ها، جنتامایسین هاله عدم رشد قویتری علیه باکتری‌های مورد آزمون ایجاد نمود. هاله عدم رشد تمامی عصاره‌های استخراجی نیز از هاله عدم رشد آنتی بیوتیک جنتامایسین کمتر بود. جنتامایسین با متوقف کردن سنتز پروتئین در میکروارگانیسم‌ها باعث مرگ آن‌ها می‌شود [۳۳]. بهترین عصاره پوست انار استخراج شده از لحاظ قدرت ضد میکروبی (۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت، نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰)، هاله عدم رشد بزرگتری برای باکتری‌های *سالمونلا* / *اینتریتیدیس* و *لیستریا مونوسیژنوز* در مقایسه با اریترومایسین ایجاد کرد ولی در مورد سایر میکروارگانیسم‌ها اریترومایسین بهتر از عصاره پوست انار عمل نمود. اریترومایسین علیه برخی باکتری‌های گرم منفی و کپک‌ها نیز موثر است. این آنتی بیوتیک باعث کاهش سنتز پروتئین در میکروارگانیسم‌های حساس می‌شود [۳۳].

هاله عدم رشد ایجاد شده توسط پنی‌سیلین در مورد تمامی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، کوچکتر از هاله عدم رشد تشکیل شده توسط قویترین عصاره ضد میکروبی استخراج شده از پوست انار بود. پنی‌سیلین از اولین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه باکتری‌ها به‌ویژه *استافیلوکوک*‌ها و *استرپتوکوک*‌ها بود ولی امروزه به دلیل استفاده بیش از حد، بسیاری از میکروارگانیسم‌ها نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت پیدا کرده‌اند [۳۳].

نتایج حاصل از MIC (جدول ۲) نیز نشان می‌دهد که *استافیلوکوکوس اورئوس* کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد را در بین سایر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون دارا می‌باشد. بر اساس مطالعه وانگ (۲۰۰۸) و اولیورا (۲۰۱۳)، قدرت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی را می‌توان بر اساس مقادیر MIC آن‌ها تقسیم بندی نمود (۲۳ و ۲۹). عصاره‌هایی که دارای مقادیر MIC کمتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشند، ضد میکروب قوی، عصاره‌های دارای MIC بین ۶۰۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ضد میکروب متوسط و عصاره‌هایی با مقادیر MIC بالای ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، عصاره‌های ضعیف به حساب می‌آیند. با توجه به این تقسیم بندی می‌توان گفت که عصاره استخراجی در سه تیمار ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ساعت، نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰، ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت، نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۸ ساعت، نسبت اتانول/آب ۶۰ به ۴۰، عصاره ضد میکروبی قوی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. آل زورکی (۲۰۰۹) مقدار MIC عصاره پوست انار استخراج شده با ۸۰٪ متانول را برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیژنوز* به ترتیب ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کرد (۷). گولون و همکاران (۲۰۱۶) نیز مقادیر MIC عصاره پوست انار استخراج شده با ۸۰٪ متانول را برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیژنوز*، *اشریشیا کلی* و گونه‌های مختلف *سالمونلا* ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند [۳۰].

خاصیت ضد میکروبی عصاره پوست انار مربوط به ترکیبات فنولی آن می‌باشد. گالیک اسید، الازیک اسید و پونیکالاجین از ترکیبات فنولی عمده در پوست انار می‌باشند که خاصیت ضد میکروبی آن‌ها به اثبات رسیده است [۳۱]. فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نیز خاصیت ضد میکروبی دارند. سیلوان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که فنولیک اسیدها، کاتچین، پروآنتوسیانین‌ها و فلاونول‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند [۳]. هاپرتیان و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره استخراجی از پوست انارهای قرمز رنگ که دارای آنتوسیانین بالاتری بود، نسبت به عصاره استخراجی از پوست انارهای صورتی رنگ که مقدار آنتوسیانین کمتری داشت، خاصیت ضد میکروبی قویتری نشان داد [۸].

Table 2 Minimum inhibition zone (mg/ml) of different extracts.

Treatments			Microorganisms					
Temp (°C)	Time (h)	Ethanol:Water	<i>S.enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.niger</i>	<i>S.cerevisiea</i>
25	20	40:60	200	200	200	2	200	2000
25	20	60:40	2000	2000	2000	0.2	2000	2000
25	20	80:20	200	200	200	2	200	2000
25	24	40:60	200	200	200	2	200	2000
25	24	60:40	2000	2000	2000	0.2	2000	2000
25	24	80:20	200	200	200	2	200	2000
25	28	40:60	200	200	200	2	200	2000
25	28	60:40	20	20	20	0.2	20	200
25	28	80:20	200	200	200	2	200	2000
40	20	40:60	200	200	200	2	200	2000
40	20	60:40	200	200	200	2	200	2000
40	20	80:20	200	200	200	2	200	2000
40	24	40:60	200	200	200	2	200	2000
40	24	60:40	200	200	200	2	200	2000
40	24	80:20	200	200	200	2	200	2000
40	28	40:60	200	200	200	2	200	2000
40	28	60:40	200	200	200	2	200	2000
40	28	80:20	200	200	200	2	200	2000
55	20	40:60	200	200	200	2	200	2000
55	20	60:40	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	20	80:20	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	24	40:60	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	24	60:40	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	24	80:20	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	28	40:60	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	28	60:40	2000	2000	2000	20	2000	2000
55	28	80:20	2000	2000	2000	20	2000	2000

Table 3 inhibition zone (mm) of antibiotics against tested microorganisms.

Antibiotics	Microorganisms					
	<i>S.enteritidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.niger</i>	<i>S.cerevisiea</i>
Erythromycin	12	13	11	15	15	14
Gentamicin	25	21	23	27	28	25
Penicillin	7	10	11	12	10	11

۴- نتیجه گیری

آزمون شامل سالمونلا اینترتیدیس، اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، آسپرژیلوس نایجر و ساکارومایسس سرویزیه نشان داد. استافیلوکوکوس اورئوس در بین میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره پوست انار نشان داد.

عصاره استخراج شده از پوست انار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، زمان ۲۴ ساعت و نسبت اتانول/ آب ۶۰ به ۴۰، بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها را در مقایسه با سایر عصاره‌های استخراج شده داشت. علاوه بر آن این عصاره بیشترین خاصیت ضد میکروبی را علیه میکروارگانیسم‌های مورد

۵- منابع

- origin. Food Research International, 46: 505-513.
- [11] Shang, Y.F., Kim, S.M., Um, B.H. 2014. Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. Food Chemistry, 154, 164-170.
- [12] Çam, M. and Hisil, Y. 2010. Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. Food Chemistry, 123: 878-885.
- [13] Tabaraki. R., Heidarizadi. E., Benvidi. A. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. Separation and Purification Technology, 98: 16-23.
- [14] Bragaa. L.C, Shuppb. C.W, Cummingsb. C, Jettb. M, Takahashic. J.A, Carmo. L.S, Chartone-Souzaa. E, Nascimento. A. 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. Journal of Ethnopharmacology, 96: 335-339.
- [15] Iranian National Standards Organization 1389. www.isiri.org.
- [16] Singleton. V, Orthofer. R, Raventos. R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by mean of Folin- Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152- 178.
- [17] Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, P. M., Albertini, M. C., & Piatti, E. 2005. Raw Millefori honey is packed full of antioxidants. Journal of Food Chemistry, 9: 217-222.
- [18] Cheng, G.W., Breen, P.J. 1991. Activity of phenylalanine ammonialyase (PLA) and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. J.Am.Soc.Hort.Sci, 116:865- 869.
- [19] Chandrasekaran, M. and Venkatesalu, V. 2004. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. Journal of Ethnopharmacology, 91: 105-108.
- [20] CLSI (1) - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standarddNinth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2eA9 [ISBN 1-56238- 586-0]. 940
- [1] Perumalla. A and Hettiarachchy, N.S. 2011. Green tea and grape seed extracts Potential applications in food safety and quality. Food Research International 44: 827- 839.
- [2] Aliakbarian. B, Fathi. A, Perego. P, Dehghani. F. 2012. Extraction of antioxidant from winery wastes using subcritical water. The Jurnal of Subcritical Fluids, 65: 18- 24.
- [3] Silvan. M, Mingo. E, Hidalgo. M, Pascual-Teresa. S, Carrascosa. A.V, Martinez-Rodriguez. A.J. 2013. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp. Food Control, 29: 25- 31.
- [4] Sagdic. O and Ozturk. I, Kisi. O. 2012. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. Expert Systems with Applications, 39: 6792- 6798.
- [5] Akhavan. H, Barzegar. M, Weidlich. H, Zimmermann. B. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars. Journal of Chemistry, 2015:1-7.
- [6] Cam. M, Icyer. N.C, Erdogan. F. 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. LWT - Food Science and Technology, 55: 117- 123.
- [7] Al-Zoreky. N.S. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. International Journal of Food Microbiology, 134: 244- 248.
- [8] Hayrapetyan. H, Hazeleger. W.C, Beumer. R.R. 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. Food Control, 23: 66-72.
- [9] Yasoubi. P, Barzegar. M, Sahari. M, Azizi. M.H. 2007. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extracts. Journal of Agric. Sci. Technol, 9: 35-42.
- [10] Wijngaard, H., Hossain M.B., Rai D.K, Brunton. 2012. Technique to extract bioactive compounds from by food by-products of plant

- [2۷] Duffy, CF., Power, RF. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *Journal of international antimic* 17: 527- 529.
- [28] Ibrahim, I.M. 2010. Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. *Journal of Agricultural Sciences*, 6 (4): 338-344.
- [29] Oliveira, D., Salvador, A., Smânia, A., Smânia, Jr.E., Maraschin, M., Ferreira, S. 2013. Antimicrobial activity and composition profile grape pomace extracts obtained by supercritical fluid. *Jurnal of Biotechnology*, ۱۶۴: ۴۲۳- ۴۳۲.
- [30] Gullon. B., Pintado. M. E., PerezAlvarez. J., Viuda-Martos. M. 2016. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) our obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, 59: 94-98.
- [31] Qu, W., Breksa, A., Pan, Zh., Ma, H. 2012. Quantitative determinate of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Journal of Food Chemistry*, 132: 1585- 1591.
- [32] Hugo, W. B., Bloom eld, S. F. 1971. Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 3. The effect of fentichlor on the metabolic activities of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 34: 579- 591.
- [33] Clinical Research Information on Drug Induced liver injury. United States national library of medicine. <http://livertox.nih.gov>. West Valley Road, Suite ۱۴۰۰, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- [21] CLSI (2) - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standardddSeventh Edition. Clinical and LaboratoryStandards Institute docu-ment M7eA7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical andLaboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- [22] Maviya. Sh., Jha. A., Hettiarachchy. N. 2014. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Scientist & Technologist*, 51(12): 4132-4137.
- [23] Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A., Speers, R.A., 1987. Anthocyanins as food colorants-a review. *Journal of Food Biochem*, 11: 201-247.
- [24] Wang, Y., He, H., Yang, J., De, Y., Hao, X. 2008. New monoterpenoid coumarins from *Clausena anisumolens*. *Journal of Molecules*, 13: 931- 937.
- [25] Suganya Devi, P., Saravanakumar., Mohandas, S. 2012. The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum(*Sorghum bicolor*) bran. *African Journal of Food Science*, 6(24): 567-573.
- [26] Oancea, O., Stoia, M., Comon, D. 2012. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food sApplication. *Procedia Engineering*, ۴۲: ۴۸۹- ۴۹۰.

Evaluation of Extraction Conditions on Phenolic Compounds and Antimicrobial Properties of Pomegranate (*Punica Granatum*) Peels

Rahnemoon, P. ¹, Sarabi Jamab, M. ^{2*}, Javanmard Dakheli, M. ³, Bostan, A. ⁴

1. PhD student of food microbiology, Research Institute of Food Science and Technology.
 2. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology.
 3. Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST).
 4. Assistant Professor, Department of Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology.
- (Received: 2015/12/07 Accepted: 2016/05/08)

In recent years, tendency to use of natural antimicrobial agents in food industry has increased. Pomegranate peels containing phenolic compounds and anti microbial agents, count as valuable source for extraction of these compounds. In this study, the extraction of pomegranate peel extract was done at different ethanol/water ratio (40:60, 60:40 and 80:20), temperature (25, 40 and 55°C) and time duration (20, 24 and 28h). Extraction yield, Phenolic compounds, Flavonoids and Anthocyanins were measured. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts were determined against some food born microorganisms such as *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisia* by agar defusion and MIC methods. Results showed that at ethanol/water ratio 60:40, 25°C and 24h and maximum amount of Phenolic compounds (349.518 mg acid galic/g dried extract), Flavonoids (250.124 mg rutin/g dried extract), Anthocyanins (252.047 mg cyanidin3glucoside/100g dried extract) and the most strongest antimicrobial activity were obtained. All extracts were demonstrated antimicrobial activity against every testedmicroorganisms. *Staphylococcuse Aureus* showed the highest sensitivity among the tested microorganisms.

Keywords: Pomegranate Peel Extract, Antimicrobial Activity, Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins.

* Corresponding Author E-Mail Address: m.sarabi@rifst.ac.ir