مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۳ شماره ۱/ سال ۱۴۰۲/ صفحات ۱ تا ۱۵
DOI:10.22034/FR.2023.47254.1799

تاثیر روش خیساندن بر مقدار ترکیبات زیست فعال و خواص ضدمیکروبی گلنار فارسی

علی رضا ملکی کهکی[۱]، لیلا ناطقی [۲*] و پیمان رجایی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۶

[۱] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[۲] به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[*] مسئول مکاتبه: Email :leylanateghi@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: میوه انار(گلنار فارسی) یکی از مهمترین محصولات کشاورزی و گیاهان دارویی به علت وجود تانن و ترکیبات پلی فنولیک، خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در درمان بیماری ها و به عنوان نگهدارنده طبیعی بکار می رود. هدف کلی از این تحقیق بررسی تاثیر سه متغیر نوع حلال، زمان و دما بر میزان استخراج فلاوونوئیدها، IC50 و آنتوسیانین‌ها و اثر ضد میکروبی عصاره بهینه استخراج شده به روش خیساندن از گلنار فارسی بود. روش کار: بدین منظور اثر نوع حلال (آب و متانول ۸۰ ٪)، زمان (۱۲، ۳۰ و۴۸ ساعت) و دما (۲۰، ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی گراد) بر مقدار ترکیبات زیست فعال و خواص ضدمیکروبی گلنار فارسی مورد بررسی قرار گرفت. ۱۸ تیمار مطابق با روش سطح پاسخ باکس بنکن طراحی شد. نتایج: بهینه‌سازی همزمان شرایط استخراج عصاره از گلنار فارسی با هدف دستیابی به بالاترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و خواص آنتی‌اکسیدانی، با ۹۵/۶۱۴ ٪ مطلوبیت در شرایط زمان استخراج ۴۸ ساعت، دما ۵۰°C و استفاده از حلال متانول پیش‌بینی شد. در شرایط مذکور میزان فلاونوئید ۸/۶۲۱۶ mg/g، میزان آنتوسیانین ۵/۷۳۶۵ µmol/g و میزان IC50(mg/ml)، ۷/۲۷۹۳ بود. بالاترین مقدار میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره گلنار فارسی استخراج شده در شرایط بهینه بر علیه باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* به ترتیب ۴۶۸/۵ و ۱۸۷۵ µg/ml ، ۹۳۷/۵ و ۳۷۵۰ µg/ml، ۹۳۷/۵ و ۵۰۰۰ µg/ml بود. تیمار بهینه به روش خیساندن اثر ضد میکروبی بیشتری علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با بیشترین قطر هاله ی عدم رشد (۱۳mm) در مقایسه با *اشرشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* داشت. نتیجه‌گیری نهایی: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با بهینه سازی شرایط استخراج می‌توان میزان قابل توجهی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی از گیاه گلنار فارسی استخراج نمود و از آن در صنایع غذایی و داروسازی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، خیساندن، فلاونوئید ، گلنار فارسی

مقدمه

امروزه در سراسر جهان همراه با افزایش آگاهی عمومی نسبت به سلامت و امنیت تغذیه، بسیاری از مصرف‌کنندگان، مواد غذایی را به عنوان وسیله‌ای به منظور مدیریت سلامت خود استفاده می‌کنند (حسینی، ۱۳۹۷). نگهدارنده‌ها ترکیباتی هستند که برای جلوگیری

از رشد و یا از بین بردن میکروارگانیسم‌های مضر به منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نگهدارنده‌های سنتتیک در مواد غذایی دارای اثرات نامطلوب نظیر سرطان‌زایی، سمیت، ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها، جهش‌زایی، آلرژی و برخی مشکلات دیگر هستند (یانگ و همکاران ۲۰۱۶؛ هینریچ و همکاران ۲۰۱۰). امروزه استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی حاصل از گیاهان دارویی به‌دلیل سازگاری بیشتر با بدن از یکسو و دارا بودن ترکیبات فرار مولد طعم از سوی دیگر در حال افزایش است (سلیکتاس و همکاران ۲۰۰۷). همچنین خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این افزودنی‌های طبیعی به اثبات رسیده است (تاج‌کریمی و همکاران ۲۰۱۰). از جمله بررسی‌های انجام شده جهت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی می‌توان به بررسی استفاده از عصاره پوست سبز پسته و پوست انار به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در سوسیس اشاره کرد (علی یاری و همکاران ۲۰۲۰).

گلنار فارسی؛ با نام علمی *Punica pleniflora* *granatum var* ، از خانواده *Puniaceae* است. گل‌های انار غیرمثمر، به‌عنوان گیاه دارویی مهم در طب سنتی می باشد. از خواص آن می‌توان به بندآوردن خون در خون ریزی شدید به علت داشتن تانن اشاره کرد. به دلیل داشتن ترکیبات فنلی در درمان برونشیت، اسهال، مشکلات گوارشی و در استعمال خارجی، به صورت غرغره، برای رفع ورم لوزه استفاده می‌شود (کو شیه و همکاران ۲۰۱۰؛ گونجی و همکاران ۲۰۱٤). ترکیبات فنلی گیاهی گروه‌های مختلفی از جمله فلاونوییدها مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها و فلاون‌ها و غیر فلاونوییدی مثل فنولیک اسیدها و لیگنین‌ها را شامل می‌شوند. بر اساس مطالعات از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در پوست انار می‌توان به الاژیک اسید اشاره نمود که ساختار و طبیعت فنلی این ترکیب موجب فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن می‌شود (سلحورزی و همکاران ۲۰۱۱). در گل‌های درخت انار موادی نظیر اسیدگالیک[1] ، اسید اورسولیک[2] و تری‌ترپنوئیدهایی[3] نظیر اسید ماسلینیک[4] و اسید آسیاتیک[5] و ترکیب‌های فنولیک نظیر پونیکالاژین یافت می‌شوند که همگی این مواد فنولی می‌تواند باعث فعالیت ضدمیکروبی اجزای این گیاه باشد (جورنکا و همکاران ۲۰۰۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی به دلیل ویژگی‌های اکسایشی-کاهشی (Redox) و ساختار شیمیایی این مولکول‌ها است که می‌توانند نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزهای سنگین و فرونشاندن اکسیژن یگانه و سه‌گانه داشته باشد (احمدی و همکاران ۱۳۹۵). سایر محققین نیز تحقیقاتی در مورد ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه انار انجام داده‌اند که از جمله آن می‌توان به ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریال و تعیین میزان فنل تام عصاره هیدروالکلی گل انار فارسی (*Punica granatum*) (احمدی و همکاران ۱۳۹۵)، استخراج ترکیبات فنولیک از پوست انار با استفاده از روش مایکروویو (کادریدس و همکاران ۲۰۱۹) اشاره نمود. عصاره‌های گیاهی در صنایعی هم‌چون داروسازی، آرایشی و بهداشتی کاربرد دارند. روش‌های مختلفی برای استخراج این ترکیبات وجود دارد. یکی از روش‌های استخراج مواد موثره در عصاره‌های گیاهی روش خیساندن است که توسط حلال‌های متفاوت، در زمان و دماهای گوناگون صورت می‌گیرد. روش‌های سنتی استخراج مواد گیاهی با حلال عمدتا بر اساس انتخاب صحیح حلال و استفاده از دما و زمان مناسب می‌باشد که انتقال جرم را بهبود می‌بخشد. برای استخراج ترکیبات زیست فعال، به روش سنتی می‌توان از روش‌های خیساندن و غرقابی استفاده نمود (Jerković et al. 2007). با توجه به اینکه در روش خیساندن فرصت کافی برای انتشار حجم مناسبی از حلال به داخل سلول‌ها و

[1] Gallic acid
[2] Ursolic acid
[3] Triterpenoids
[4] Muslin acid
[5] Ascetic acid

خروج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جایگاه استقرارشان فراهم می‌شود، ترکیبات موثره بیشتری در این روش از گیاه استخراج می‌شود (Joshi et al., 2009). پژوهش حاضر تلاشی در جهت استخراج مواد موثره گلنار فارسی به روش استخراج به عنوان جایگزین نگهدارنده‌های سنتتیک می‌باشد. هدف اصلی از این پژوهش بررسی تاثیر روش خیساندن بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی، آنتوسیانینی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره گلنار فارسی بود.

مواد و روش

ابتدا گلنار فارسی از بازار محلی ساوه تهیه و توسط هرباریوم گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران با نام علمی *Punica granatum*، واریته *pleniflora* تایید شد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل؛ متانول، آلومینیوم کلراید ، پتاسیم استات، کوئرستین[1]، ۲و۲–دی فنیل–۱–پیکریل هیدرازیل[2]، اتانول، پتاسیم کلرید ، کلریک اسید، سدیم استات و کلریدریک اسید ، سیانیدین –۳– گلوکوزید، محلول رینگر، محیط کشت مولر هینتون و براث محیط کشت مولر هینتون آگار از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. همچنین باکتری‌های *اشریشیاکلای* (PTCC: 1338)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC:143) و *کلستریدیوم پرفرنژنس* (PTCC:1766)، به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند.

آماده سازی گلنار فارسی و عصاره گیری

نمونه گلنار فارسی جهت کاهش محتوای رطوبت تا ۸ درصد در آون ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس قطعات خشک شده به وسیله آسیاب پارس خزر مدل 320P (ایران) و الک با مش ۵۰۰ میکرون عبور داده شد. استخراج ترکیبات موثره از گلنار فارسی مطابق با روش سطح پاسخ با سه متغیر مستقل نوع حلال (آب و متانول ۸۰٪)، زمان (در سه سطح ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و دما (در سه سطح ۲۰، ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. نسبت پودر گلنار فارسی به حلال ۱ به ۵ بود. بنابراین حلال و گلنار فارسی به ارلن مخروطی آزمایشگاه ۲۵۰ میلی‌لیتر منتقل شدند و سپس شرایط استخراج گلنار فارسی مطابق با مقادیر ذکر شده در جدول (۱) برای آن فراهم شد. لازم به ذکر است برای جلوگیری از تبخیر حلال طی زمان استخراج درب ارلن توسط پوشش پلی‌اتیلنی محکم بسته می‌شود و سپس در تکان دهنده مداری مدل ممرت ۲۲ (آلمان) با درجه حرارت و زمان مناسب برای استخراج کامل رنگدانه نگه داشته شد. شایان ذکر است نسبت های مختلف پودر گلنار فارسی به حلال و سطوح متغیرها بر اساس پیش تیمار تعیین گردید. سپس عصاره استخراج شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جدا شده و عصاره صاف شده توسط روتاری اواپراتور ایکا مدل RV10 DS99 (آلمان) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تا بریکس ۶۰ غلیظ شدند و سپس در آون ۴۰ درجه سانتی گراد تا خشک شدن کامل عصاره‌ها خشک شد (ابراهیم‌زاده و همکاران ۲۰۰۸).

آزمون‌های انجام شده بر روی عصاره‌ها

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در عصاره گلنار فارسی از طریق رنگ سنجی اندازه‌گیری گردید. ml ۰/۵ از عصاره درون لوله آزمایش در ml ۱/۵ متانول حل شد و سپس ml ۰/۱ آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ml ۰/۱ از محلول پتاسیم استات M ۱ به آن اضافه گردید. در نهایت ml ۲/۸ آب مقطر به آن‌ها اضافه و به مدت min ۳۰ در دمای اتاق نگهداری شد و بعد جذب مخلوط حاصل در طول موج nm ۴۱۵ توسط دستگاه اسپکتروفتومتری قرائت گردید. کوئرستین به‌عنوان استاندارد با غلظت‌های مختلف (ppm ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۸۰) برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم نمونه خشک بیان شد (چنگ و

[1] Quercetin

[2] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

همکاران ۲۰۰۲).

به روش طراحی تیمارها با روش خیساندن-جدول ۱ سطح پاسخ

Table 1- Samples extraction design by soaking method

Treatment	Solvent type	Time (h)	Temperature (°C)
1	1	30	20
2	1	12	20
3	1	48	35
4	2	12	35
5	2	48	20
6	2	48	35
7	2	30	20
8	1	12	50
9	2	30	50
10	1	30	35
11	1	30	50
12	2	48	50
13	1	48	20
14	1	48	50
15	1	12	35
16	2	30	35
17	2	12	50
18	2	12	20

1: Methanol 80%, 2: water

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

۲و۲دی‌فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش بوده که با احیا شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. براساس روش آزمون، به میزان µl ۵ از عصاره آماده شده با µl ۳۰۰ محلول اتانولی DPPH ۰/۱۳۵ mlM مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها به مدت یک دقیقه تکان داده شدند و به مدت min ۳۰ در تاریکی قرار داده شدند و جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل L 800آکوالیتیک، آلمان در طول موج nm ۵۱۷ قرائت شد. نمونه‌های شاهد تمام مراحل استخراج فوق را بدون افزودن نمونه طی نمودند (یاو و همکاران ۲۰۱۳). فعالیت آنتی اکسیدانی توسط رابطه ۱ محاسبه شد:

رابطه [۱]:

$$DPPH=\frac{\text{درصد جذب نمونه}-\text{درصد جذب شاهد}}{\text{درصد جذب شاهد}}\times ۱۰۰$$

جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی از فاکتور IC50 که بیانگر درصدی از عصاره که قادر به خنثی کردن ۵۰ ٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH است، استفاده شد. برای محاسبه IC50 ابتدا منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری بر حسب (mg/ml) رسم شد و معادله خط نمودار (y=0.013x+8.22) بدست آمد و با جایگزین کردن عدد ۵۰ در محور y مقدار IC50 از محور x محاسبه شد.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های آنتوسیانین‌ها

مقدار ترکیبات آنتوسیانین‌ها با استفاده از روش تغییر pH تعیین گردید. ابتدا ml ۲ از عصاره استخراج‌شده گیاهی با ml ۲۵ محلول بافر دارای pH= ۱ که شامل مخلوط پتاسیم کلرید M ۰/۲ و کلریک اسید M ۰/۲ به حجم رسانده شد و سپس ml ۲ دیگر از این عصاره استخراج‌شده گیاهی با محلول بافر دارای pH=٤/٥ که شامل مخلوط سدیم استات M ۱ و کلریدریک اسید M ۱ به حجم ml ۲۵ رسانده شد و جذب نمونه‌ها در طول‌موج nm ۵۱۰ قرائت گردید. غلظت آنتوسیانین‌ها توسط رابطه ۲ محاسبه شد:

رابطه [۲]:

$$C_{mg/100ml}=\frac{(Abs\ pH\ 1-Abs\ pH\ 4.5)\times 484.82\times 1000}{24825}\times DF$$

اعداد ٤٨٤/٨٢ و ٢٤٨٢٥ به ترتیب وزن مولکولی و ضریب جذب مولی مولکول سیانیدین -۳- گلوکوزید در طول‌موج nm۵۱۰ در محلول بافری می‌باشد. DF نیز عامل رقت محسوب می‌شود (راپیسدرا ۲۰۰۰).

آزمون‌های میکروبی

اثر ضدمیکروبی تیمار بهینه که بالاترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئیدی را داشت به روش ارزیابی MBC،MIC، هاله عدم رشد به روش چاهک و دیسک روی میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*،

اشریشیاکلای و *کلستریدیوم پرفرنژنس* بررسی گردید. به منظور بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره‌های مذکور از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده گردید، به این صورت که در هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا، ابتدا ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث[1] ۲ µl و ۵ از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند اضافه و سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ µl از رقت‌های متوالی عصاره اضافه گردید. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها توسط شیکرایکا مدل ورتکس ژنیوس (آلمان)، ۲۰ ثانیه با دور ۳۰۰ rpm آن‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از طی این دوره میزان کدورت توسط دستگاه الایزا (مدل ای ال ایکس ۸۰۰، بیوتک آمریکا) در طول موج ۵۴۰ nm قرائت و ثبت شد و در صورت عدم ایجاد کدورت میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری (MIC) تعیین گردید. سپس از نمونه‌های چاهک‌های بدون کدورت روی محیط کشت مولر هینتون آگار پاساژ داده و با روش رقت‌های متوالی عمل شمارش کلنی صورت گرفت. اولین لوله‌ای که مقدار کاهش رشد تعداد باکتری‌ها نسبت به زمان صفر لوله شاهد، بیشتر از یک هزارم بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین گردید (هاریکریشنان و همکاران ۲۰۰۳).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور و طراحی، تجزیه و تحلیل داده‌ها و دستیابی به شرایط بهینه برای استخراج حداکثر ترکیبات آنتی اکسیدانی از گلنار فارسی در شرایط مختلف استخراج (حلال، دما و زمان) از روش سطح پاسخ درجه دوم (Quadratic) باکس بنکن در سطح احتمال ۵ ٪ از استفاده از نرم‌افزار مینی تب ۱۶ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ استخراج عصاره از گلنار فارسی به روش خیساندن

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ فلاونوئید، IC50 و آنتوسیانین استخراج عصاره از گلنار فارسی به روش خیساندن در شرایط مختلف در جدول ۲، نشان داده شد. نتایج نشان داد اثرات خطی هر سه متغیر دما، زمان و نوع حلال بر مقدار فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و IC50 و همچنین اثرمربعی زمان بر میزان فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و اثرمربعی دما بر مقدار IC50 عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن معنی‌دار ($p\leq 0.05$) بود (جدول ۲). نتایج مقایسه بین میزان فلاونوئید، آنتوسیانین و IC50 موجود در عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن درشرایط مختلف به روش آزمون شده و پیش‌بینی شده در جدول ۳ نشان داده شده است.

[1] Mueller Hinton Broth

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ استخراج عصاره از گلنار فارسی به روش خیساندن

Table 2- Analysis of variance of response surface methodology of *Punica granatum* extraction by soaking method

Source of Changes	Flavonoids (mg/g)		Anthocyanins (µmol/g)		IC50 (mg/ml)	
	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value
Constant	114.59	0.000*	118.52	0.000*	56.76	0.000*
Linear effects	301.64	0.000*	312.53	0.000*	141.66	0.000*
Solvent Type (A)	27.57	0.001*	8.25	0.018*	8.94	0.015*
Temperature (B)	777.24	0.000*	781.59	0.000*	375.39	0.000*
Time (C)	100.11	0.000*	147.75	0.000*	40.66	0.000*
Quadratic effects	4.40	0.046*	4.67	0.041*	13.00	0.002*
Temperature× Temperature(B^2)	3.11	0.112	0.17	0.694	23.50	0.001*
Time × Time (C^2)	5.70	0.041*	9.17	0.014*	2.50	0.148
Interaction	0.99	0.438	0.41	0.749	1.04	0.420
Solvent × Temperature (A×B)	1.75	0.218	0.04	0.852	0.03	0.859
Solvent × Time (A × C)	0.33	0.578	0.80	0.394	0.06	0.818
Temperature × Time (B × C)	0.90	0.368	0.39	0.546	3.03	0.116
Lack of fit	1.54	0.251	1.63	0.315	1.74	0.275

جدول ۳- مقایسه مقادیر فلاونوئید، آنتوسیانین و IC50 موجود در عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن درشرایط مختلف به روش آزمون شده و پیش‌بینی شده

Table3- Comparison between flavonoid, IC50 and anthocyanin value in in *Punica granatum* extraction by soaking method in different conditions

Treatment	Flavonoids (mg/g)		Anthocyanin (µmol/g)		IC50 (mg/ml)	
	Tested	Predicted	Tested	Predicted	Tested	Predicted
1	5.357	5.458	3.848	3.734	14.963	15.630
2	4.100	4.010	2.485	2.625	17.255	17.353
3	8.417	8.181	4.939	5.055	7.937	8.379
4	4.264	4.452	3.121	3.033	16.959	17.054
5	6.914	6.677	4.939	4.886	12.103	11.562
6	7.296	7.530	5.091	5.225	8.893	9.277
7	4.838	5.028	3.909	3.848	15.712	16.695
8	5.084	5.102	3.424	3.454	15.290	15.760

9	6.231	6.121	4.758	4.879	14.669	14.065
10	6.477	6.311	4.091	3.971	14.264	13.865
11	6.613	6.685	4.515	4.623	13.740	13.189
12	7.897	7.904	6.121	5.977	8.068	8.083
13	7.105	7.260	4.758	4.787	11.143	10.569
14	8.545	8.622	5.818	5.737	7.007	7.279
15	4.728	4.796	2.939	2.832	16.437	16.011
16	5.903	5.814	4.091	4.157	14.932	14.835
17	4.756	4.692	3.758	3.725	16.312	16.709
18	7.015	6.723	5.671	5.818	12.058	11/777

میزان فلاونوئید موجود در عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن

با توجه به جدول ۳ با افزایش دما از ۲۰ به ۵۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش زمان استخراج از ۱۲ به ٤٨ ساعت و استفاده از حلال متانول اثر معنی‌داری ($P\leq 0.05$) بر افزایش میزان فلاونوئید داشت. به‌طوری بالاترین میزان فلاونوئید ۸/٥٤٥ میلی‌گرم/ گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ٤٨ ساعت توسط حلال متانول به دست آمد و کمترین میزان فلاونوئید ٤/١ میلی‌گرم/ گرم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۱۲ساعت توسط حلال آب به دست آمد. نوع حلال بیشترین تاثیر را بر استخراج ترکیبات فلاونوئیدی داشته است. متانول در بین حلال‌های رایج جهت عصاره گیری، برای ترکیبات قطبی و غیر قطبی دارای کارایی بیشتری نسبت به آب می‌باشند. این امر به علت تشکیل کمپلکس‌های ترکیبات فنولی قابل حل در حلال متانول می‌باشد (دو و همکاران ۲۰۱٤). متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنل و فلاونوئید تام، دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت‌های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند بنابراین با توجه به شیوع بالای بیماری‌های مزمن و فرسایشی منطقی است که برای تامین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن از گیاهان استفاده شود و به خصوص گیاهانی که فنل و فلاونوئید تام بالایی داشته باشند در نتیجه برای تامین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان با ترکیبات فنلی بالا توصیه می‌شود (سوترو و همکاران ۲۰۱۸). در پژوهش انجام شده توسط کبیری و همکاران (۲۰۱۵) استخراج ترکیبات فنلی برگ گیاه بادرنجبویه[1] با دو روش استخراج (غرقابی و ماکروویو) و حلال‌های (آب، متانول ۸۰ ٪ و اتانول ۵۰ ٪) در زمان‌های مختلف بررسی و به این نتیجه رسیدند که در هر دو روش، عصاره اتانولی بیشترین راندمان و عصاره آبی کمترین راندمان را در استخراج ترکیبات فنلی دارا بوده است. همچنین براساس گزارشات سلمانیان و همکاران(۲۰۱۳) و داوری‌نژاد و همکاران (۲۰۱۷) به ترتیب عصاره متانولی زولنگ و میوه عناب حاوی بالاترین مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی بود.

میزان آنتوسیانین موجود در عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن

نتایج جدول ۳ نشان داد که شرایط متفـاوت استخراج (دما، زمان و نوع حلال) تأثیر قابل‌توجهی بر میزان IC50 عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن داشت. همچنین نتایج نشان داد با افزایش دما از ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد ، زمان استخراج از۱۲ تا ٤٨ ساعت و

[1] Melissa officinalis

استفاده از حلال آب اثر معنی‌داری ($P\leq 0.05$) در افزایش میزان آنتوسیانین داشت. به‌طوری که بالاترین میزان آنتوسیانین ٦/١٢١ µmol/g در دما ٥٠°C ، زمان استخراج ٤٨ ساعت توسط حلال آب به دست آمد و کمترین میزان آنتوسیانین ٢/٤٨٥ µmol/g در دما٢٠°C ، زمان استخراج ١٢ساعت توسط حلال متانول به دست آمد. آنتوسیانین‌ها ترکیبات حساس و غیر پایداری در شرایط فرآوری و نگهداری هستند. درواقع مواردی مانند pH، غلظت انتوسیانین و ساختار شیمیایی، آنزیم‌های موجود در فرآورده، قند و فلزات یونی بر پایداری آن موثر است (جعفری و همکاران ۲۰۱۷). از آنجاییکه آنتوسیانین‌ها در pH بالا از پایداری کمتری برخوردارند (گیوستی و همکاران ۲۰۰۱). بنابراین حلال متانول در مجاورت با ترکیبات عصاره گلنار فارسی، pH بالاتری ایجاد کرده است و بالا رفتن pH عصاره می‌تواند به عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در تخریب آنتوسیانین و کاهش کل آنتوسیانین استخراج مطرح باشد. کاوه و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی تاثیر شرایط استخراج بر ترکیبات شیمیایی بادمجان، مقادیر آنتوسیانین استخراج شده توسط حلال اتانولی و آب به ترتیب mg cyanidine/g ٤/٣٣-٠/٨ بود و افزایش زمان منجر به افزایش بازده استخراج شد. لی و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی شرایط بهینه ارزیابی آنتوسیانین از *Vietnamese Carissa carandas L. fruits* توسط اتانول ۵۰٪ ، نسبت جامد به مایع ۱به ۳، دمای ۵۰ °C و زمان ٤٥ دقیقه حداکثر مقدار آنتوسیانین استخراج شده را ۲۷۷/۲ mg/L گزارش کردند. همچنین براساس تحقیق متینی و همکاران (۲۰۲۰) مقادیر آنتوسیانین استخراج شده به روش غرقابی موجود در شرایط بهینه طی ٢٤ ساعت و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برابر با ٣٤٥/١١٨ mg/L بود.

میزان آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن

نتایج جدول ۳ نشان داد که شرایط متفـاوت استخراج (دما، زمان و نوع حلال) تأثیر قابل توجهی بر میزان IC50 عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن داشت. نتایج جدول ۳ نشان داد با افزایش دما از ۲۰ به ۵۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش زمان استخراج از ۱۲ به ٤٨ ساعت و استفاده از حلال متانول اثر معنی‌داری ($P\leq 0.05$) بر کاهش میزان IC50 داشت. به‌طوری که بالاترین درصد IC50 یا پایین‌ترین میزان مهار رادیکالهای آزاد در عصاره گلنار فارسی ۱۷/۲۵۵ mg/ml در دما ۲۰ ° C ، زمان استخراج ۱۲ ساعت توسط حلال آب به دست آمد و پایین‌ترین میزان IC 50 یا بالاترین میزان مهار رادیکال-های آزاد در عصاره گلنار فارسی ۷/۰۰۷ mg/ml در دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ٤٨ ساعت توسط حلال متانول به دست آمد. دمای بالاتر باعث افزایش نیروی جنبشی و انحلال بیشتر ومدت زمان ٤٨ ساعت فرصت لازم جهت واکنش بین ترکیبات قطبی و غیر قطبی عصاره و حلال با قطبیت کمتررا فراهم کرد. از آنجاییکه در شرایط ذکر شده بیشترین میزان ترکیبات فنولی موجود بود از این‌رو پایین‌ترین میزان IC50 دور از انتظار نبوده است. عصاره‌هایی با میزان ترکیبات فنولی بیشتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند. قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان داروئی به کار می‌رود. در حالت کلی، حضور عوامل احیا کننده نقش اساسی در خاصیت احیا کنندگی ایفا می‌کند. این ترکیبات فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند. چنانچه ترکیبی دارای این ویژگی‌ها باشد، می‌تواند باعث کاهش میزان ترکیبات حد واسط اکسیده ساخته شده طی مراحل لیپید پراکسیداسیون شود. به این ترتیب باعث شکستن زنجیره واکنش می شود و می تواند به عنوان آنتی اکسیدان اولیه و ثانویه عمل کند (خلیلی و همکاران ۲۰۱۵). در تایید نتایج تحقیق حاضر نتایج تکین و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی محتوای فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی گل انار نشان داد همه ی عصاره‌های استخراج شده خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی را بر مبنای DPPH بودند و محتوای فنل کل در گستره‌ی ١٤/٨٢ mg (GAE)/g تا

۹۰/۸٦ متغیر بود. همچنین گونجی و همکاران ۲۰۱۵ خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گلنار فارسی توسط متانول ۱۰۰٪ را ۸۷/٤ ٪ و عبدالهی و همکاران ۲۰۱۸ میزان IC50 گل انار را برابر با mg/ml ۲۷/۹۲ با استفاده از حلال اتانول ۷۰٪ گزارش کردند.

مدل چند جمله‌ای عصاره استخراج شده گلنار فارسی در شرایط مختلف به روش خیساندن

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل چندجمله‌ای درجه دوم بر روی فلاونوئید، IC50 و آنتوسیانین در جدول ٤ نشان داده شده است. بر این اساس مقدار ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده در مدل رگرسیونی میزان فلاونوئید عصاره استخراج شده از گلنار فارسی به ترتیب ۹۹/۰۳ و ۹۸/۱٦، میزان آنتوسیانین ۹۹/۰٦ و ۹۸/۲۲ و میزان IC50 ۹۸/۰٦ و ۹۸/۳۳ بدست آمد. میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده بالای ۹۰ درصد مشاهده شد که نشان‌دهنده برازش خوب مدل نسبت به داده‌های آزمایشی بود.

جدول ۴- مدل چند جمله‌ای جهت پیش‌بینی میزان فلاونوئید، آنتوسیانین و IC50 موجود در عصاره گلنار فارسی به روش خیساندن

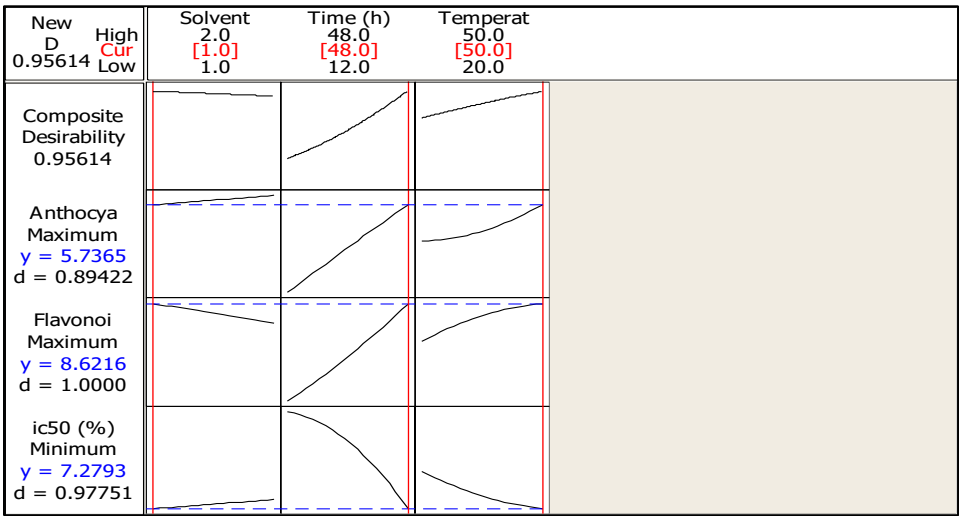
Table 4- Predicted polynomial model of flavonoid, IC50 and anthocyanin amounts in *Punica granatum* extraction by soaking method

Source	Model	R^2	R^2-adj
Flavonoids (mg.g)	$Y= 6.06294-0.24846A +1.61575B+ 0.57986C+0.17689B^2- 0.23974C^2-0.07672AB -0.03346AC+ 0.06727BC$	99.03%	98.16%
Anthocyanin's (µmol.g)	$Y=4.06397+0.09259A+1.10354B+0.47980C- 0.02778B^2+0.20707C^2-0.00758AB+0.03535AC+0.03030 BC$	99.06%	98.22%
IC50 (mg.ml)	$Y=14.3501+ 0.4853A-3.8523B-1.2679C -1.6695B^2+ 0.5449C^2 - 0.0363AB -0.0471AC -0.4242BC$	98.06%	96.33%

A: Solvent, B: Time, C: Temperature

بهینه‌سازی

شکل ۱ نمودار بهینه استخراج را نشان می‌دهد. بهینه سازی شرایط استخراج عصاره گلنار فارسی به روش خیساندن با هدف دستیابی به بالاترین میزان فلاونوئید و آنتوسیانین ، پایین‌ترین میزان IC 50 (mg/ml) به صورت همزمان با ۹۵/٦۱٤ ٪ مطلوبیت در شرایط زمان استخراج ٤۸ ساعت، دما ۵۰°C و استفاده از حلال متانول پیش‌بینی شد. مطابق با نتایج شکل ۲ در شرایط مذکور میزان فلاونوئید ۸/٦۲۱٦ mg/g ، میزان آنتوسیانین ۵/۷۳٦۵ µmol/g و میزان IC50(mg/ml)، ۷/۲۷۹۳ پیش‌بینی شد. شرایط بهینه پیش بینی شده به صورت عملی در آزمایشگاه اعمال شد و میزان IC (mg/ml) 50 آن ۷/۳۰۷ ، میزان آنتوسیانین ۵/۷۱۸ µmol/g و میزان فلاونوئید ۸/۵٦۵ µmol/g بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با میزان IC 50 (mg/ml) ، آنتوسیانین و فلاونوئید کل پیش‌بینی شده توسط روش سطح پاسخ نداشت ($p>0.05$).



شکل ۱- شرایط بهینه استخراج

Figure1-Optimal extraction conditions

اثرات ضد میکروبی عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن

تیمار بهینه پیش‌بینی شده به روش خیساندن که بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را داشت به صورت عملی تولید شد و پس از تایید خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن، اثر ضدمیکروبی تیمار بهینه با دو روش براث میکرودایلوشن و انتشار در چاهک روی میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* مطابق شکل ۲ بررسی شد.

جدول (۵) مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تیمار بهینه پیش‌بینی شده به روش خیساندن علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد بین مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن علیه *کلستریدیوم پرفرنژنس* و *اشرشیاکلای* تفاوت معنی‌دار ($p > 0.05$) وجود نداشت. ولی بین مقدار حداقل غلظت کشندگی عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن علیه *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *اشرشیاکلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0.05$) وجود داشت. پایین‌ترین مقدار میانگین MIC وMBC عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن به ترتیب ٤٦٨/٥ µg/ml و ۱۸۷۵ علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و بالاترین مقدار میانگین MIC وMBC عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن به ترتیب ۹۳۷/۵ µg/ml و ۵۰۰۰ علیه باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* بود. تیمار بهینه به روش خیساندن اثر ضد میکروبی بیشتری علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با بیشترین قطر هاله ی عدم رشد (۱۳mm) به نسبت *اشرشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* داشت.

ترکیبات ضدمیکروبی موجود در گیاهان دارویی و ادویه‌ها به طور معمول مرتبط به ترکیبات فنولی است که دارای گروه (-0H) بوده و مسئول خاصیت ضد میکروبی مانند تیمول و کارواکرول است که در گیاهان دارویی وجود دارد. گروه هیدروکسیل موجود در ترکیبات فنولی با قسمت فعال آنزیم‌ها پیوند برقرار کرده و از متابولیسم آن‌ها جلوگیری می‌کند بین کارواکرول و پیش‌ساز آن پارا- سیمین [1]یک سینرژیست وجود دارد که حائز اهمیت است، به گونه‌ای که ابتدا پارا- سیمین غشای سلولی

[1] para-cymene

میکروارگانیزم را متورم می‌کند و در ادامه ورود مقدار بیشتری از کارواکرول به سلول تسهیل و در نهایت تاثیر کاواکرول موجب از بین رفتن میکروارگانیزم می‌شود. مکانیسم دیگری که ممکن است اتفاق بیفتد این است که این ترکیبات با فسفولیپیدهای موجود در غشای سلولی پیوند برقرار می‌کند و خاصیت تراوایی انتخابی کاهش یافته و موجب افزایش نفوذپذیری غشا می‌شود در این حالت مواد سازنده‌ی سلولی از سلول خارج شده و به متابولیسم انرژی آسیب وارد می‌شود و همچنین در جذب مواد مغذی توسط سلول میکروبی و انتقال الکترون در آن و سنتز مواد ژنتیکی تغییر ایجاد می‌شود (چیترا و همکاران ۲۰۱۸). نتایج ما همچنین، مطابق با نتایج به دست آمده توسط دهام و همکاران (۲۰۱۰) است، که اثر ضد میکروبی عصاره‌های پوست انار را در برابر *باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژنز* مورد بررسی قرار دادند. اسماعیل و همکاران (۲۰۱۶) همچنین اثرات مهاری عصاره پوست انار را در برابر *باسیلوس سوبستیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس ، سودوموناس آئروژنز ، اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و آسپرژیلوس نایجر* به دست آورد.

جدول ۵- نتایج میانگین MBC و MIC عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس*

Table 5- Results of average MIC and MBC for *Punica granatum* extraction by soaking method against *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*

Microorganism	چاهک (mm)	دیسک (mm)	MIC µg/ml	MBC µg/ml
Staphylococcus aureus	23	13	468.5^{b}	1875^{c}
E.coli	18	7	937.5^{a}	3750^{b}
Clostridium perfringens	17	6	937.5^{a}	5000^{a}

Similar small letters represent no significant difference

شکل۳- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره گلنار فارسی استخراج شده به روش خیساندن علیه a) باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* b) باکتری *اشرشیاکلای* c) *کلستریدیوم پرفرنژنس*

Figure 3- The diameter of inhibition zone of *Punica granatum* extraction by soaking method against a) *Staphylococcus aureus* b) *E.coli* c) *Clostridium perfringens*

نتیجه گیری

پژوهش حاضربا هدف بررسی شرایط بهینه به منظور استخراج فلاوونوئیدها، IC50 و آنتوسیانین‌ها و بررسی اثر ضد میکروبی عصاره بهینه استخراج شده از گلنار فارسی به روش خیساندن انجام گردید. نتایج نشان داد شرایط استخراج شامل فاکتورهای دما و زمان در سه سطح و نوع حلال (متانول، آب) اثر معنی داری بر استخراج ترکیبات موثره از عصاره گلنار فارسی داشت. براساس نتایج بهینه‌سازی همزمان پارامترهای استخراج، افزایش دما و زمان، استفاده از حلال متانول منجر به دستیابی حداکثر ترکیبات موثره از عصاره گلنار فارسی گردید. مطابق نتایج ارزیابی میکروبی نمونه بهینه عصاره

استخراج شده از گلنارفارسی دارای اثرات ضدمیکروبی مطلوب بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، *اشریشیاکلای* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* بود. بنابراین می‌توان گفت عصاره گیاه گلنار فارسی به عنوان منبع غنی از ترکیبات فلاوونوئیدی، آنتوسیانینی و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به‌شمار می‌رود که می‌توان آن را جهت نگهداری محصولات غذایی بکار برد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع مورد استفاده

احمدی الف، عبداللهی ع، فصیحی رامندی م، نامدار ن، موسوی م و سمیع زاده ب، ۱۳۹۵، ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریال و تعیین میزان فنل تام عصاره هیدروالکلی گل انار فارسی unica granatum P. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، ٦(۳)، ۳۱۹-۳۲۵.

سلاح‌ورزی ی، تهرانی‌فر ع وجهانبخش و، ۱۳۹۰، ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی عصاره قسمت‌های مختلف انار (Punica granatum L.) با محتوای فنولیکی آن. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران, ۲۷(۱)، ٤٧-٥٦.

متینی س، مرتضوی ع،صادقیان ع و شریفی الف، ۱۳۹۹، بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیبات زیست فعال از تفاله انگور سیاه سردشت به روش‌های فراصوت و غرقابی با استفاده از متدولوژی سطح پاسخ. علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۷(۹۸)، ۱٤۷-۱۵۸.

حسینی ح،۱۳۹۷، اهمیت زنجیره غذایی پایدار در تأمین امنیت غذایی و توسعه پایدار، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ۱۳(۱)، ۱۲۷.

Abdolahi N, Soltani A, Mirzaali A, Soltani S, Balakheyli H, & Aghaei M, 2018. Antibacterial and antioxidant activities and phytochemical properties of Punica granatum flowers in Iran. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science 42(3), 1105-1110.

Aliyari P, Bakhshi Kazaj F, Barzegar M, & Ahmadi Gavlighi H, 2020. Production of functional sausage using pomegranate peel and pistachio green hull extracts as natural preservatives. Journal of Agricultural Science and Technology 22(1), 159-172.

Chang C.C, Yang M.H, Wen H M, & Chern JC, 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. Journal of food and drug analysis 10(3), 3.

Cushnie T.T, & Lamb A. J, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobial agents 26(5), 343-356.

Celiktas O.Y, Kocabas E.H, Bedir E, Sukan F.V, Ozek T, & Baser K.H. C, 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, Depending on location and seasonal variations. Food Chemistry 100(2), 553-559.

Chitra K, Venkatesh R, Dhanalakshmi K, Sharavanan P.T, Bali Sasikumar C, & Karthikeyani Vijayakumari K, 2018. Production and economic analysis of oyster mushroom (Pleurotus florida). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7(9), 379-383.

Dahham S.S, Ali M.N, Tabassum H, & Khan M, 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (Punica granatum L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 9(3), 273-281.

Davarynejad G, Taghizadeh S.F, & Asili J, 2017. Effect of different solvents on total phenolic contents and antioxidant activity of Zizyphus jujube Miller fruits. Journal of Horticultural Science 31(1), 158-166.

Do Q.D, Angkawijaya A.E, Tran-Nguyen P.L, Huynh L.H, Soetaredjo F.E, Ismadji S, & Ju Y.H, 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of food and drug analysis 22(3), 296-302.

Ebrahimzadeh M.A, Pourmorad F, & Hafezi S, 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of biology 32(1), 43-49.

Giusti M.M, & Wrolstad R.E, 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry 1, 1-2.

Gavanji S, Larki B, Bakhtari A, 2014. The effect of extract of Punica granatum var. pleniflora for treatment of

minor recurrent aphthous stomatitis. Integrative medicine research 3(2):83-90.

Gavanji S, Larki B, & Bakhtari A, 2015. Comparative analysis of extract of Punica granatum var. pleniflora (Golnar-e-farsi) to some antibiotics on pathogens. Journal of Essential Oil Bearing Plants 18(1), 168-178.

Harikrishnan R, Rani M.N, & Balasundaram C, 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, Cyprinus carpio, following herbal treatment for Aeromonas hydrophila infection. Aquaculture 221(1-4), 41-50.

Heinrich M, Williamson E.M, Gibbons S, Barnes J, & Prieto-Garcia J, 2017. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy E-*BOOK*. Elsevier Health Sciences.

Ismail E, Diallo A, Khenfouch M, Dhlamini S M, & Maaza M, 2016. RuO2 nanoparticles by a novel green process via Aspalathus linearis natural extract & their water splitting response. Journal of Alloys and Compounds 662, 283-289.

Jafari S.M, Ghalenoei M.G, & Dehnad D, 2017. Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. Powder Technology 311, 59-65.

Jurenka J, 2008. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. Alternative medicine review 13, 2.

Kabiri S, & Sayyed-Alangi S.Z, 2015. Comparison of Antioxidant effect of different extracts from Melissa officinalis leaves with immersion and microwave-assisted extractions and its oxidative stability on soybean oil. Innovative Food Technologies 2(4), 23-38.

Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, & Goula A.M, 2019. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. Chemical Engineering and Processing-Process Intensification 137, 1-11.

Kaveh S, Sadeghi Mahoonak A, & Sarabandi K, 2020. The Effect of Solvent Type, Time and Extraction Method on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Eggplant Peel Extract. karafan scientific semi-annual 17(2), 129-141.

Khalili M, & Ebrahimzadeh M. A, 2015. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 24(120), 188-208.

Le X.T, Huynh M.T, Pham T.N, Than V.T, Toan T.Q, Bach L.G, & Trung N.Q, 2019. Optimization of total anthocyanin content, stability and antioxidant evaluation of the anthocyanin extract from Vietnamese Carissa carandas L. fruits. Processes 7(7), 468.

Rapisarda P, Fanella F, & Maccarone E, 2000. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(6), 2249-2252.

Salmanian S, Sadeghimahoonak A, Jamson M, & Tabatabaee Amid B, 2013. Identification and quantification of phenolic acids, radical scavenging activity and ferric reducing power of Eryngium caucasicum Trautv. ethanolic and methanolic extracts. Research and Innovation in Food Science and Technology 2(2), 193-204.

Sottero B, Leonarduzzi G, Testa G, Gargiulo S, Poli G, & Biasi F, 2019. Lipid oxidation derived aldehydes and oxysterols between health and disease. European journal of lipid science and technology 121(1), 1700047.

Tajkarimi M.M, Ibrahim S.A, & Cliver D.O, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control 21(9), 1199-1218.

Tekin Z, Küçükbay F. Z, & Dikme A, 2020. In Vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts of Three Achillea Species from Turkey. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry *8*(2), 483-490.

Yao X.H, Zhang D.Y, Zu Y.G, Fu Y.J, Luo M, Gu C.B, & Efferth T, 2013. Free radical scavenging capability, antioxidant activity and chemical constituents of Pyrola incarnata Fisch leaves. Industrial crops and products 49, 247-255.

Yang Y, Song X, Sui X, Qi B, Wang Z, Li Y, & Jiang L, 2016. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. Industrial Crops and Products 80, 141-147.

Journal of Food Research, 2023,33(1):1-15
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI:10.22034/FR.2023.47254.1799

The effect of soaking method on the amount of bioactive compounds and antimicrobial properties of *Punica granatum*

AR Maleki Kahki[1], L Nateghi[*2] and P Rajaei[2]

Received: August 1, 2021 Accepted: November 7, 2021
[1]Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[2]Associate Professor and Assistant Professor respectively, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[*]Corresponding author: Email: leylanateghi@yahoo.com

Introduction: Medicinal plants are widely used in traditional culture to treat certain illness all over the world and they are becoming popular in many modern societies among costumers as natural preservatives instead of synthetic chemicals in food products. In fact, they are a great source of antioxidants, which can reduce or stop the oxidation reactions, and their benefits against human diseases and food spoilage has attracted food designers and researchers' attention. (Yang *et al*., 2016). *Punica granatum*; non-productive ancient, mystical, unique pomegranate flower borne on a small, long-living tree, is an important medicinal plant in north of Iran. Various studies have announced that has been used to treat wounds, bronchitis, diarrhea, digestive problems, cardiovascular disease, diabetes, dental conditions, bacterial infections, arthritis and obesity due to its astringent, hemostatic and antimicrobial properties. It is also effectively used to help oral inflammation (Gavanji *et al*., 2014). Secondary metabolites derived from this flower including total poly phenolic and flavonoid compounds such as gallic acid, ursolic acid, triterpenoids, maslinic acid, acetic acid, punicalagin, and anthocyanin are able to inactivating oxygen-free radicals (Jurenka *et al*., 2008). These secondary compounds can be found in different parts of the plant consists of leaves, trunk skin, roots, fruit peel, pomegranate juice, seeds and flowers (Salahvarzi *et al*., 2011). Therefore, the extraction of is *Punica granatum* utilized in pharmacy, cosmetics and food industries. Soaking is one of the methods mostly used to extract plants effective component which is applied by different solvents in different time and temperature.
Material and methods: Formerly, *Punica granatum* was prepared from Saveh and approved by the herbarium of medicinal plants of the Faculty of Pharmacy, University of Tehran with the scientific name of *Punica granatum*, pleniflora variety. Thus three soaking variables of solvent type (water and methanol 80%), time (12, 24 and 48 hours) and temperature (20, 35 and 50 °C) were executed for *Punica granatum* extraction. So 18 treatments were prepared under different conditions of time, temperature and solvent. Total flavonoid by aluminum chloride method, anthocyanin content and IC50 by free radical scavenging activity of *Punica granatum* extraction were measured. Evaluation of free radical scavenging was conducted with Diphenyl Picrylhydrazyl radical. The IC50 factor,

which demonstrates the amount of required sample to inhibit 50 percent of free radicals, was used. The lower the IC50, the lower concentration with higher antioxidants of extract would prevent oxidation process (Khalili *et al*., 2015). Confirming its antioxidant properties afterwards, the antimicrobial effect (MIC, MBC) of optimal treatment with two methods of micro dilution broth and diffusion in the well on *Staphylococcus aureus*, *E.coli* and *Clostridium perfringens* were studied. Data were analyzed by one-way variance Duncan test at 95% confidence level by using Minitab 16.

Results and discussion: The results of single optimization of independent variables showed the highest flavonoid and anthocyanin content was 8.545 mg/100g during 24h in 35° C using methanol and 6.121 µmol/g during 12h in 50 ° C using water, respectively. The amount of flavonoid and anthocyanin and antioxidant activity enhanced significantly ($p \leq 0.05$) over time at higher temperature. Indeed, the solvent has enough time to permeate into plant texture and molecules and the compound can separate from plant matrix and be solved in the solvent. As the increment in temperature decreases the viscosity of solvent and influences the spread rate of it, the mass transfer rate increases. Methanol 80% was more effective to extract antioxidants compared to water. This may be due to solvent polarity since extractability of anthocyanin, flavonoid and phenolic compounds are depended on degree of polarity and ratio of solute and solvent. The polarity of the flavonoid is an important factor to consider; the polarity of the solvent has to be desire for recovery. In addition, the solvent used in the extraction process may have an effect on the bioactivity of the recovered flavonoids. A polar solvent is commonly used for the extraction of isoflavones, flavones, and methylated flavones. In contrast, methanol is sufficient to extract polar flavonoids such as flavonoid glycosides. That's the reason for ineffectiveness of water to extract total phenols and flavonoids though it can raise the extraction of anthocyanin. Anthocyanin is less stable in higher pH. Methanol raises the pH leading to anthocyanin destruction. The simultaneous optimized condition of *Punica granatum* extraction to access the most extracted flavonoid and anthocyanin amount and the highest antioxidant properties were predicted during 48h in 50 ° C using methanol solvent with 95/614% acceptability percentage. Under optimum condition 8/6216 mg/g flavonoid, 5/7365 µmol/g anthocyanin and 7.2793 mg/ml IC50 were measured. Based on the results of antimicrobial evaluation of optimized extraction with highest antioxidant activity the highest mean minimum inhibitory concentration(MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of *Punica granatum* against *Staphylococcus aureus*, *E.coli* and *Clostridium perfringens* were observed 468.5 and 1875 µg/ml, 937.5 and 3750 µg/ml , 937/5 and 5000 µg/ml, respectively. The results of the diameter of inhibition zone of *Punica granatum* extraction showed better antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* with the diameter of inhibition zone of (13mm) compared to *E.coli* and *Clostridium perfringens*. The antimicrobial activity of the *Punica granatum* extract was more effective against gram positive (*S. aureus*) compared to Gram-negative (*E. coli*) bacteria, which are eminent pathogenic microorganisms responsible for food poisoning. A possible explanation for these effects is that Gram-negative bacteria is more resistant. The higher inhibition of Gram-positive bacterium to Gram-negative one is related to structural differences in the cell wall. The Gram-positive bacteria including several layers of peptidoglycans, negatively charged, exhibiting a relatively high level of porosity and permeability. On the other hand, Gram-negative bacteria exposure the cell wall, an additional thoroughly organized outer membrane consisting phospholipids, proteins, lipoproteins and negatively charged lipopolysaccharides, functioning as a hurdle. Consequently, by hydroxyl group of flavonoid and poly phenolic compounds permeating to bacteria cell and bonding their enzymes prevent their metabolism and cause the cell destruction and death.

Conclusion: Thus, by optimizing extraction condition a significant amount of antimicrobial and antioxidant compounds of *Punica granatum* can be extracted and be used in food and pharmaceutical industry.

Keywords: Antioxidant, Anthocyanin, Flavonoid, *Punica granatum*, Soaking