نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، ص. ۳۰۷-۲۹۷

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 6, No. 4, winter, 2011, p. 297-307

تأثیر واریته و روش استخراج بر ویژگی های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره برگ های زیتون

زهرا رفیعی [۱]- سید مهدی جعفری [۲*]- مرتضی خمیری [۳]- مهران اعلمی [۴]

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۹
تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۱۴

چکیده

در این پژوهش، ترکیبات فنولی سه واریته کرونایکی، روغنی و میشن با دو روش غرقابی و مایکروویو استخراج شد. در ادامه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل به سه روش مهار رادیکال دی پی پی اچ، قدرت احیا کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تعیین شد. نتایج نشان داد عصاره مایکروویوی واریته کرونایکی، بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۰/۱۲± ۲۴۴/۶۶۷ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) و کمترین IC_{50} در سه آزمون مهار رادیکال دی پی پی اچ (۰/۱۵± ۷۴/۱۹ میکروگرم در میلی لیتر)، قدرت احیا کنندگی (۰/۰۵± ۱۴۸/۰۱۵ میکروگرم در میلی لیتر) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۰/۰۲± ۱۶۰/۳۹۱ میکروگرم در میلی لیتر) را به خود اختصاص داد. همچنین ارتباط خطی بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی اکسیدانی مشاهده شد. در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره های مختلف، عصاره کرونایکی استخراج شده به کمک امواج مایکروویو بیشترین فعالیت باکتری کشی را داشت وکمترین غلظت باکتری کشی در مورد باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشیرشیاکلی* به ترتیب برابر با ۶۲۵ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود که نشان دهنده مقاوم‌تر بودن باکتری اشیرشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس آرئوس بود. بنابراین عصاره های برگ زیتون، به ویژه عصاره های استخراج شده به روش مایکروویو قدرت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی داشته و از آن جاییکه که برگ زیتون یک برگ همیشه سبز است، می تواند به عنوان یک نگهدارنده و آنتی اکسیدان طبیعی و ارزان قیمت در مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: امواج مایکروویو، برگ زیتون، ترکیبات فنولی، روش غرقابی، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی

مقدمه

رادیکال های آزاد و دیگر انواع اکسیژن فعال در بدن توسط سامانه آنتی اکسیدانی طبیعی پایش می شوند اما اگر موازنه بین رادیکال های آزاد تولیدی و سامانه مهار کننده این ترکیبات از بین رود، منجر به صدمه به مولکول های زیستی شده و در نتیجه خطر ابتلا به بسیاری از بیماری ها را افزایش می دهند (Blomhoff, 2005). علاوه بر این با توجه به اینکه اکسایش یکی از دلایل اصلی فساد چربی ها و غذاهای چرب در طول دوره فراوری و ذخیره سازی می باشد (Goli et al, 2005)، استفاده از آنتی اکسیدان ها در رژیم غذایی برای کاهش اثرات رادیکال های آزاد ضروری به نظر می رسد. آنتی اکسیدان های سنتزی از جمله بوتیلات هیدروکسی آنیزول[۲] (BHA)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن[۳] (BHT)، ترش بوتیل هیدروکینون[۴] (TBHQ) دارای اثرات جانبی مضر می باشند. بنابراین استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی مورد توجه فراوان قرار گرفته است (Karthikumar et al, 2007). در یک پژوهش، Atawodi (2005) فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی آفریقا از جمله برگ

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲ و۴- استادیاران دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*- نویسنده مسئول: (Email:smjafari@gau.ac.ir)
۳- دانشیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

1- Butylated hydroxyanisole
2- Butylated hydroxytoluene
3-Tert-butyl hyroquinone

زیتون آفریقایی را مورد مطالعه قرار داد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را خوب عنوان کرد. در پژوهش Silva، et al (2006) میوه و تفاله زیتون در بین بخش‌های مختلف زیتون، بیشترین و دانه کمترین میزان ترکیبات فنولی را به خود اختصاص داده و به استثنای هسته در بقیه موارد، ارتباط خطی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت‌آنتی اکسیدانی وجود داشت.

علاوه بر مشکلات ناشی از اکسایش، مواد غذایی خام و فراوری شده در طول دوره تولید، فروش و توزیع در معرض آلودگی قرار دارند. لذا نیاز به استفاده از نگهدارنده ها برای افزایش طول دوره نگهداری مواد غذایی ضروری به نظر می رسد. از طرفی ایمن بودن مواد نگهدارنده شیمیایی مورد تردید قرار گرفته و بسیاری از سویه های میکروبی نیز نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند. بنابراین استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان مواد نگهدارنده طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ویژگی های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره ها به حضور متابولیت های ثانویه از جمله ترکیبات فنولی نسبت داده شده است (Korukluoglu et al,2008). یکی از محصولات غنی از ترکیبات فنولی، عصاره برگ زیتون می باشد. Koutsoumanis et al (1998) و Yigit et al (2001) گزارش کردند که ترکیبات فنولی برگ زیتون، در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها، مخمرها، کپک‌ها، قارچ‌ها، رتروویروس‌ها و دیگر انگل‌ها فعالیت ضد میکروبی دارند. Pereira et al (2007) گزارش کرد *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سابتلیس* مقاومترین و حساسترین باکتری ها نسبت به عصاره های برگ زیتون بودند. Markin et al(2003) با مطالعه فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی برگ های زیتون در محیط آزمایشگاهی بر میکروارگانیسم‌های مختلف دریافتند که همه باکتری-ها به جز *باسیلوس سابتلیس* در غلظت ۰/۶درصد وزنی- حجمی در طی ۳ ساعت نابود شدند.

استخراج اولین مرحله اساسی را در تحقیقات و کاربردهای مختلف گیاهان دارویی را تشکیل می‌دهد. تکنیک‌های قدیمی استخراج مواد گیاهی با حلال از جمله روش غرقابی نیاز به زمان، مصرف حلال و نیروی کار بیشتری دارند. بنابراین نیاز به توسعه و استفاده از تکنیک-های جدید استخراج، برای کاهش زمان استخراج، مصرف حلال، آلودگی و افزایش میزان استخراج ترکیبات هدف می باشد (Wang and Weller,2006). یکی از این روش ها، روش استخراج به کمک امواج مایکروویو[1] (MAE) می باشد. امواج مایکروویو، تشعشعاتی الکترومغناطیسی با فرکانس حدود ۳۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز می-باشند. کاهش زمان استخراج، عملکرد و خلوص بالا، پایش دقیق واکنش توسط سنسورهای دما و فشار، امکان اتوماسیون، حرارت‌دهی یکنواخت و مصرف کم حلال، از مزایای استخراج با امواج مایکروویو نسبت به روش‌های سنتی می‌باشند.(Jain et al, 2009) نتایج پژوهش Lujan et al (2006)، در استخراج ترکیبات فنولی برگ زیتون به کمک مایکروویو محفظه باز نشان داد که برای رسیدن به بازده استخراجی معادل روش MAE، نیاز به زمان ۲۴ ساعت و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد می‌باشد. داده‌ها ی پژوهش Quan et al (2006) حاکی از راندمان بالای استخراج ترکیبات فنولی ریشه چای (۸۲/۴۶ درصد در۶ دقیقه) به کمک امواج مایکرویودر مقایسه با روش غرقابی (۴۳/۳۹ درصد در ۲۴ ساعت در دمای اتاق) بود. در یک پژوهش مشابه اتانول ۹۵ درصد و ۲ دقیقه اشعه‌دهی بهترین حالت برای استخراج تانشینون‌ها (یک ترکیب دی ترپنی)[2] از مریم گلی بود که این میزان نشان‌دهنده استخراج برابر یا کمی بالاتر این ترکیبات، در یک زمان کوتاه نسبت به روش غرقابی در دمای محیط (۲۴ ساعت) بود.(Pan et al, 2001)

هدف از این پژوهش بررسی اثر واریته و دو روش استخراج غرقابی و استخراج به کمک سامانه مایکروویو محفظه باز بر میزان ترکیبات فنولی برگ های زیتون و نیز تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره ها می باشد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

حلال‌های مصرفی از شرکت مجللی تهران و دیگر مواد شیمیایی مصرفی از نمایندگی‌های مرک و اپلیکم آلمان تهیه شدند.

آماده‌سازی برگ‌های زیتون

برگ‌های زیتون واریته های کرونایکی، روغنی و میشن از باغ زیتون جهاد کشاورزی کردکودی برداشت شد. برگ‌ها در سایه خشک و با استفاده از آسیاب (ساخت شرکت ایران خود ساز) پودر و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. در نهایت نمونه‌ها در بسته‌های نیم کیلویی با دو لایه نایلونی و مقوایی به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت بسته بندی و تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۱۸- درجه سانتیگراد نگه داری شد.

استخراج ترکیبات فنولی با روش غرقابی

پودر برگ های زیتون هر سه واریته با نسبت ۵۰:۱ با اتانول ۵۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط به خوبی مخلوط شد.

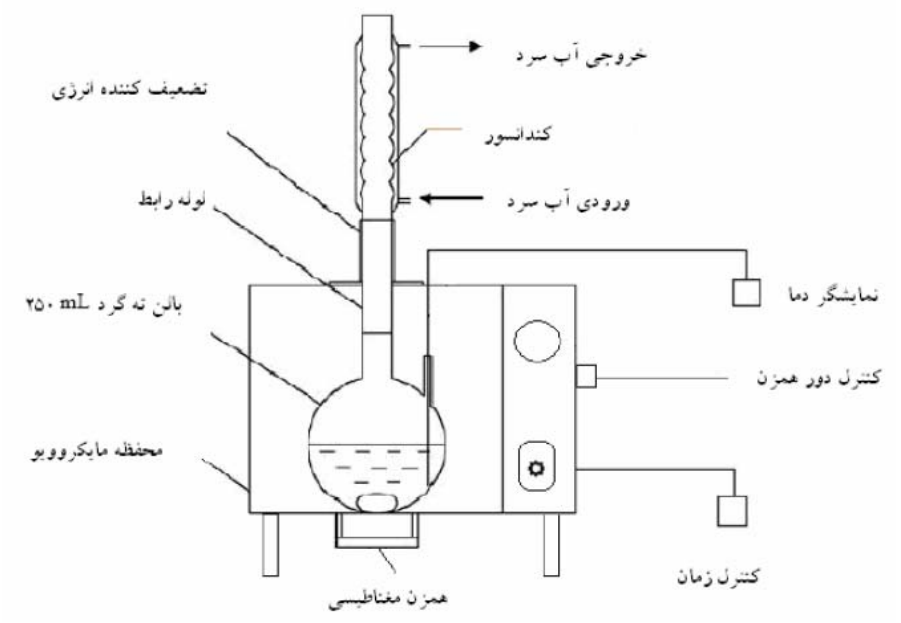
استخراج ترکیبات فنولی به روش مایکروویو (MAE)

یک مایکروفر خانگی (سامسونگ مدل سی اف ۳۱۱۰ ان- ۵) در آزمایشگاه با انجام اصلاحاتی برای استخراج ترکیبات فنولی طراحی

1- Microwave-asissted extraction

2- Tanshinone

گردید (مطابق شکل ۱).



شکل۱- دستگاه ساخته شده برای استخراج به کمک امواج مایکروویو

اصلاحات انجام شده به شرح زیر بود (قره خانی و همکاران، ۱۳۸۸):

۱- حلال‌ها از جمله استون، متانول و اتانول دمای جوش پایینی دارند و زود تبخیر می شوند. اگر بخارات حلال در داخل دستگاه مایکروفر باقی بمانند، خطر انفجار وجود داشته و میزان حلال مورد استفاده برای استخراج نیز کاهش می‌یابد. برای حل این مسئله، یک کندانسور در قسمت بالای مایکروفر برای خروج و سرد کردن بخارات و برگشت حلال به بالن استخراج تعبیه شد.

۲- همزدن سطح تماس بیشتری بین حلال و پودرایجاد می کند در نتیجه راندمان استخراج را افزایش می‌دهد. به این منظور یک همزن مغناطیسی در این دستگاه قرار داده شد تا استخراج بهتر و کامل‌تر انجام شود.

۳- برای کنترل دما بسته به نوع حلال، بازه زمانی خاصی برای اشعه دهی مشخص شد.

روش عصاره گیری به کمک امواج مایکروویو

در این روش همانند روش غرقابی، پودر برگ‌های زیتون و اتانول ۵۰ درصد با نسبت ۵۰:۱ در داخل بالن استخراج ریخته شد. همزمان با هم خوردن محتویات داخل بالن به کمک همزن مغناطیسی،اشعه دهی به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. عصاره‌های حاصل از هر دو روش پس از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (آی کا آ مدل آر وی بیسیک ۰۵) با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ و با دستگاه خشک کن انجمادی (ساخت شرکت اپرون مدل اف دی بی ۵۵۰۳) خشک گردید. در نهایت میزان ترکیبات فنولی عصاره ها به روش فولین- سیوکالتو اندازه گیری شد (Arabshahi and Urooj, 2007). منحنی استاندارد بر اساس اسید تانیک رسم و میزان ترکیبات فنولی به صورت میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره بیان شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آزمون‌های مختلف

از پودر خشک شده عصاره ها، غلظت‌های مختلفی (۱۰۰۰ -۵۰ پی پی ام) آماده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، با سه روش DPPH، نیروی احیا کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به روش عربشاهی و اروج (۲۰۰۷)، تعیین و با آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و BHT مقایسه شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ها

در این قسمت عصاره‌های برگ های زیتون سه واریته کرونایکی، روغنی و میشن استخراج شده به دو روش غرقابی و به کمک امواج مایکروویو آماده و اثر ضد میکروبی عصاره‌های مذکور در ۹ غلظت

۱۵۶/۲۵، ۶۲۵/۵، ۳۱۲، ۱۲۵۰،۲۵۰۰،۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰و ۴۰۰۰۰ پی پی ام بر دو باکتری اشیرشیاکلی[1] و استافیلوکوکوس آرئوس[2] بررسی شد. سوش‌های خالص این باکتری‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران خریداری شد. برای بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهک استفاده نموده و بعد از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (ساخت شرکت بیندر) ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد از طی این دوره میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترومنت) در طول موج ۵۴۰ نانومترقرائت گردید. در نهایت کمترین غلظت بازدارندگی (MIC[3]) و کمترین غلظت کشندگی (MBC[4]) تعیین شد (عروج علیان و همکاران، ۲۰۱۰).

آنالیز آماری

در این پژوهش، تأثیر حلال و روش استخراج بر مقدار ترکیبات فنولی با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به طور جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تیمارها در سه تکرار انجام شده و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح احتمال۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS و رسم شکل‌ها با نرم افزار EXCEL صورت گرفت.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی تیمارهای مختلف نشان داد اثر واریته و روش استخراج و اثر متقابل این فاکتورها در استخراج ترکیبات فنولی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است (مطابق شکل‌های ۲و۳).

براساس نتایج بدست آمده، در بین دو روش استخراج، روش استخراج به کمک امواج مایکروویو بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۲۳۳/۴۳میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) را نسبت به روش غرقابی (۲۰۴/۹۷ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) به خود اختصاص داد.

میزان ترکیبات فنولی تیمارهای مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۲۴۴/۶۶۷ میلی گرم معادل اسید تانیک در گرم عصاره) در عصاره مایکروویوی واریته کرونایکی مشاهده شد و واریته روغنی و میشن در همین روش استخراج در رتبه های بعدی قرار گرفتند. عصاره های MAE از نظر میزان ترکیبات فنولی غنی تر از عصاره های استخراج شده به روش غرقابی بوده ودر روش غرقابی، همانند روش مایکروویو واریته کرونایکی بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی را نشان داد.

جدول ۱- بررسی اثر واریته و روش استخراج بر میزان ترکیبات فنولی

واریته / روش	کرونایکی	روغنی	میشن
غرقابی	±۰/۳۵[d]	±۰/۰۱[e]	±۰/۲۱[f]
	۲۱۵/۶۲۱	۲۰۵/۹۶۳	۱۹۳/۳۳۵
مایکروویو	±۰/۱۲[a]	±۰/۳۱[b]	±۰/۲۸[c]
	۲۴۴/۶۶۷	۲۳۶/۱۲۶	۲۱۹/۵۱۵

حرف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می-باشد.

افزایش استخراج ترکیبات فنولی با روش MAE به اثر حرارت-دهی آن نسبت داده می‌شود. این حرارت در نتیجه چرخش دو قطبی حلال در مقابل اشعه‌های مایکروویو اتفاق می‌افتد که خود باعث افزایش دمای حلال و در نتیجه افزایش حلالیت ترکیبات هدف می گردد.(Hemwimon et al, 2007) علاوه بر این اشعه‌دهی به کمک مایکروویو، با افزایش ناگهانی دما و فشار داخلی تخریب دیواره سلولی را تسریع کرده و خروج ترکیبات از داخل بافت به درون حلال را افزایش می‌دهد.(Zhang et al, 2008) به همین دلیل میزان استخراج ترکیبات فنولی به کمک مایکروویو بیشتر از روش غرقابی بود.

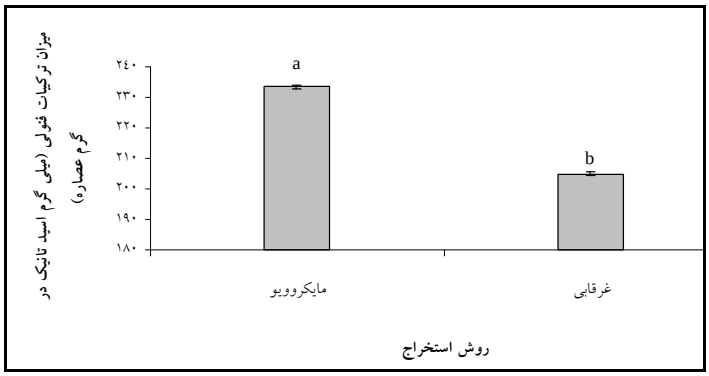
آزمون DPPH

IC_{50}. عصاره‌های استخراج شده به روش غرقابی و MAE در آزمون DPPH بر حسب میکروگرم در میلی لیتر در جدول ۲ ارائه شده است. IC_{50}. بیانگر غلظتی از عصاره است که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH، مورد نیاز می‌باشد. IC_{50}. کمتر، نشان‌دهنده قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره مربوطه می‌باشد. با توجه به داده‌های جدول ۲، در بین عصاره‌ها، عصاره اتانولی واریته کرونایکی استخراجی به روش MAE با IC_{50}. برابر با ۰/۱۵± ۷۴/۱۹ بهترین عصاره برای مهار رادیکال DPPH می‌باشد و عصاره های واریته روغنی و میشن در رتبه های بعدی قرار گرفتند.

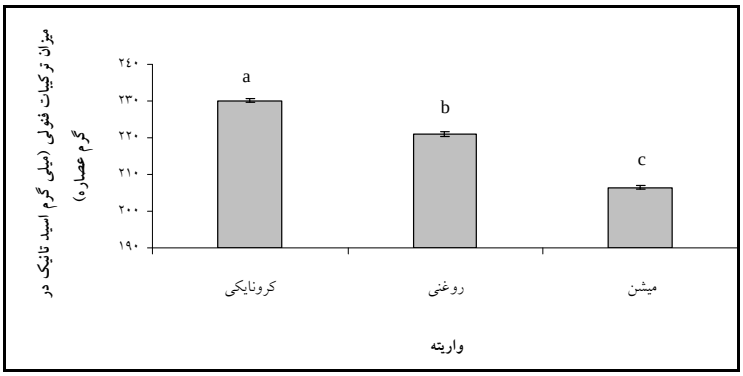
اما در مورد مقایسه عصاره‌های استخراج شده با روش غرقابی، همانند روش MAE عصاره واریته کرونایکی با IC_{50}. برابر با ۰/۲± ۹۷/۵۲۴ میکروگرم در میلی لیتر در مهار این رادیکال بهتر عمل کرد. همچنین غلظت های بالاتر تمامی عصاره ها توانایی بیشتری در مهار

1-Escherichia coli PTCC 1533
2-PTCC 1112 2.Staphylococcus aureus
3-Minimum inhibitory concentration
4- Minimum bactericidal concentration

رادیکال DPPH نشان دادند (شکل۴). در شکل ها از یکسری علامت های اختصاری برای معرفی عصاره ها استفاده شده است. حرف اول نشانه واریته (میشن=M، روغنی= R، کرونایکی= C) و حرف دوم نشانه روش استخراج می باشد (روش غرقابی= S، استخراج به کمک امواج مایکروویو= M).



شکل۲- مقایسه روش غرقابی و روش استخراج با امواج مایکروویو



شکل ۳- مقدار کل ترکیبات فنولی واریته‌های مختلف استخراج شده با روش غرقابی

جدول ۲- IC_{50} عصاره‌ها در آزمون DPPH

واریته / روش	کرونایکی	روغنی	میشن
غرقابی	±۰/۲۰^{c}	±۰/۴۱^{b}	±۰/۸۶^{a}
	۹۷/۵۲۴	۱۰۰/۴۸۳	۱۱۳/۶۰۲
مایکروویو	±۰/۱۵^{f}	±۰/۱۹^{e}	±۰/۱۱^{d}
	۷۴/۱۹	۸۱/۴۸۷	۹۳/۹۱۲

حرف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همه عصاره‌های مورد آزمون، اثر مهارکنندگی کمتری نسبت به BHT (میکروگرم در میلی لیتر IC_{50}=۴۱/۶۰۲) داشتند اما عصاره‌های MAE کرونایکی و روغنی در مهار رادیکال قوی‌تر از BHA (میکروگرم در میلی لیتر ۸۹/۰۵۸ =IC_{50}) عمل کردند.

آزمون قدرت احیاکنندگی

در جدول ۳، IC_{50} عصاره‌های مختلف در آزمون قدرت احیاکنندگی بر حسب میکروگرم در میلی لیتر نشان داده شده است. در این آزمون، منظور از IC_{50} غلظتی است که جذب عصاره به نیم برسد. با توجه به داده‌های ارائه شده در جدول زیر، عصاره واریته کرونایکی در روش MAE، کمترین IC_{50} (۰/۰۵± ۱۴۸/۰۱۵ میکروگرم در میلی لیتر) و بالاترین قدرت احیاکنندگی را به خود اختصاص داده و واریته روغنی در همین روش، در رتبه دوم قرار گرفت.

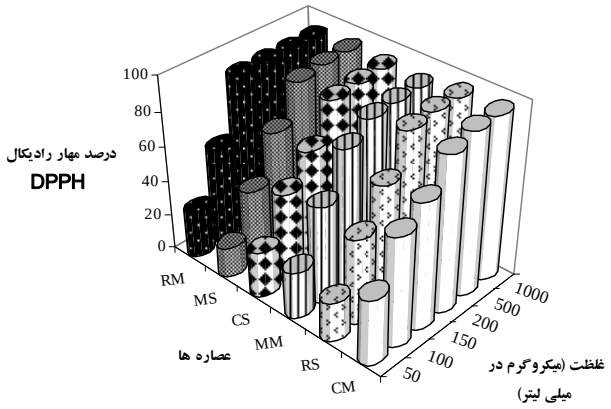
در این روش نیز، همانند روش مهار رادیکال DPPH، تمامی عصاره‌های MAE نسبت به روش غرقابی قدرت احیاکنندگی بیشتری داشتند..

در روش غرقابی همانند روش MAE، بالاترین قدرت احیا-کنندگی مربوط به عصاره واریته کرونایکی بود. همچنین یک ارتباط خطی مثبت بین قدرت احیا کنندگی و غلظت عصاره ها مشاهده شد به طوریکه با افزایش غلظت عصاره، IC_{50} کاهش و قدرت احیاکنندگی افزایش یافت (شکل۵).

در مقایسه عصاره‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، مشخص شد که BHT با IC_{50} برابر با ۵۹/۱۵۴ میکروگرم در میلی لیتر قدرت احیا-کنندگی بیشتری نسبت به همه عصاره‌های مورد آزمون دارد اما عصاره های واریته کرونایکی و روغنی در روش MAE، نسبت به BHA (۰/۶۵± ۲۰۵/۵۴۹ میکروگرم در میلی لیتر) قدرت احیاکنندگی بیشتری از خود نشان دادند.

جدول ۳- IC_{50} عصاره‌ها در آزمون قدرت احیاکنندگی

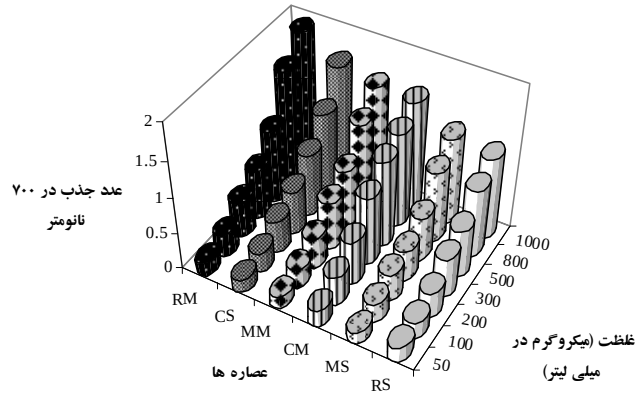
واریته / روش	کرونایکی	روغنی	میشن
غرقابی	±۰/۰۷[c]	±۰/۰۸[b]	±۰/۶۷[a]
	۲۴۶/۰۷۶	۲۷۳/۰۵۲	۳۱۴/۰۶
مایکروویو	±۰/۰۵[f]	±۰/۰۴[e]	±۰/۱۲[d]
	۱۴۸/۰۱۵	۱۹۷/۴۳۳	۲۳۵/۳۲



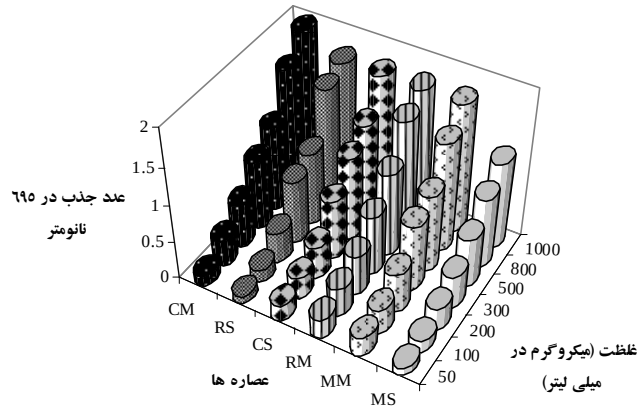
شکل ٤- میزان مهار رادیکال DPPH توسط عصاره‌های مختلف.

آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

جدول ۴، IC_{50} عصاره‌های مختلف در آزمون ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل را نشان می‌دهد. در این آزمون هم، IC_{50} بیانگر غلظتی از عصاره است که میزان جذب به عدد نیم برسد. با توجه به اطلاعات جدول زیر کمترین IC_{50}، مربوط به عصاره واریته کرونایکی (۰/۰۲± ۱۶۰/۳۹۱میکروگرم در میلی لیتر) در روش MAE بود.



شکل ۵- قدرت احیاکنندگی عصاره‌های مختلف



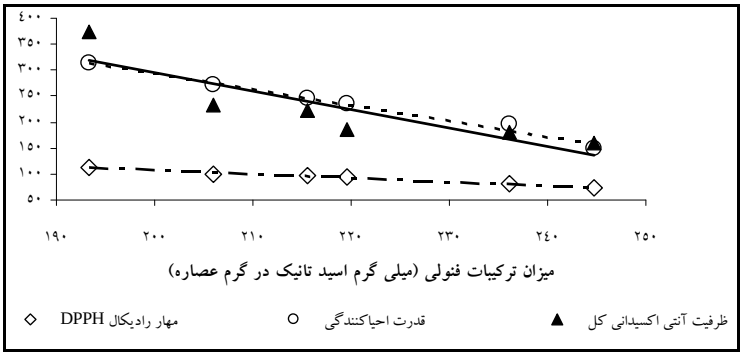
شکل ٦- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف

جدول ٤- IC٥٠ عصاره‌ها در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

واریته / روش	کرونایکی	روغنی	میشن
غرقابی	۲۲۲/۴۸ ±۰/۱[c]	±۰/۰۸[b]	±۰/۶۵[a]
		۲۳۳/۱۵	۳۷۴/۱۳۸
مایکروویو	±۰/۰۲[f]	±۰/۲۷[e]	±۰/۲[d]
	۱۶۰/۳۹۱	۱۸۱/۰۲۲	۱۸۴/۶۸۳

در این آزمون هم همانند دو آزمون مهار رادیکال DPPH و قدرت احیاکنندگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده با روش MAE نسبت به روش غرقابی بیشتر بود. همچنین در روش غرقابی شاهد بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره واریته کرونایکی (۰/۱± ۲۲۲/۴۸ میکروگرم در میلی لیتر) بودیم. همانند دو آزمون قبل، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره ها وابسته به غلظت عصاره ها بود (شکل ۶). در قیاس با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، عصاره MAE واریته کرونایکی (۰/۰۲± ۱۶۰/۳۹۱ میکروگرم در میلی لیتر) نسبت به BHT (۰/۱± ۱۷۹/۴۳۲ میکروگرم در میلی لیتر) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان داد. درمورد BHA (۰/۵± ۴۲۲/۳۰۷ میکروگرم در میلی لیتر) تمامی عصاره ها، ۵۰ ICکمتر و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به این آنتی‌اکسیدان سنتزی داشتند.

شکل ۷ ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی و جدول ۶ معادلات و ضریب همبستگی تعیین شده به سه روش مهار رادیکال DPPH، نیروی احیاکنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نشان می دهند.



شکل ۷- رابطه بین میزان ترکیبات فنولی و IC٥٠ عصاره ها

جدول ۵– معادلات خط مربوط به ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها

نوع آزمون	ضریب همبستگی (R^2)	معادله خط
مهار رادیکال DPPH	۰/۹۸۸۲	y = -۰/۷۳۷۵x+۲۵۵/۲
نیروی احیاکنندگی	۰/۹۸۲۸	y = -۳/۰۳۵۵x+۹۰۰/۹۴
آزمون ظرفیت آنتی اکسیدانی کل	۰/۷۵۱	y = -۳/۵۴۸۱x+۱۰۰۳/۷

جدول ٦- کمترین غلظت بازدارندگی(میکروگرم در میلی لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری ها

باکتری / عصاره	*استافیلوکوکوس آرئوس*	*اشیرشیاکلی*
CM	۳۱۵	۳۱۵
RM	۳۱۵	۶۲۵
MM	۱۲۵۰	۶۲۵
CS	۶۲۵	۶۲۵
RS	۶۲۵	۱۲۵۰
MS	۱۲۵۰	۱۲۵۰

جدول ۷- کمترین غلظت کشندگی (میکروگرم در میلی لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری ها

باکتری / عصاره	*استافیلوکوکوس آرئوس*	*اشیرشیاکلی*
CM	۶۲۵	۲۵۰۰
RM	۱۲۵۰	۵۰۰۰
MM	۱۲۵۰	۵۰۰۰
CS	۱۲۵۰	۵۰۰۰
RS	۲۵۰۰	۱۰۰۰۰
MS	۲۵۰۰	۱۰۰۰۰

با توجه به شکل ۷ و جدول ۵ مشخص شد رابطه خطی منفی بین میزان ترکیبات فنولی و IC۵۰ در هر سه روش ذکر شده وجود دارد به طوری که با افزایش میزان ترکیبات فنولی IC۵۰ کاهش و فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت. همچنین مشخص شد ۹۸ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در دو آزمون مهار رادیکال DPPH و نیروی احیاکنندگی و ۷۵ درصد آزمون ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، مربوط به وجود ترکیبات فنولی می باشد. در بسیاری از پژوهش‌ها عنوان شده است که بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی عصاره‌های گیاهی ارتباط مستقیمی وجود دارد (Alothman et al, 2009., Cai et al, 2004) اما در عصاره‌های گیاهی، علاوه بر فنول‌ها آنتی‌اکسیدان‌های دیگری هم وجود دارد که برهم کنش بین این ترکیبات نقش به سزایی در بروز قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ها دارد (Hayouni et al, 2007). بالاتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های MAE نسبت به عصاره‌های استخراج شده به روش غرقابی در هر سه آزمون ذکر شده، به میزان بالای ترکیبات فنولی در این عصاره‌ها نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، زمان طولانی استخراج در روش‌های غرقابی موجب اکسایش ترکیبات فنولی و به تبع کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Hayat et al, 2009). بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های استخراج شده به روش MAE نسبت به روش های سنتی استخراج، در پژوهش های زیادی به اثبات رسیده است. (2007) Hemwimon et al عنوان کرد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های

استخراج شده با روش MAE در برابر مهار رادیکال DPPH بیشتر از روش غرقابی به مدت ۳ روز است. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مایکروویوی پوست میوه لانگان در روش های مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از روش سوکسله گزارش شد (Pan et al, 2008).

IC_{50} بدست آمده در سه آزمون تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی در این سه روش با هم متفاوت بودند. این اختلاف در نتایج مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به دلیل مکانیسم‌های مختلف عمل آنتی-اکسیدان (جلوگیری از شروع اکسایش و آغاز واکنش های زنجیره ای ، مهار رادیکال های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی کاتالیست کننده اکسایش، تجزیه پراکسیدها و...) می‌باشد (Gulçin et al, 2003). علاوه بر این، روش‌های مختلف تعیین فعالیت آنتی-اکسیدانی وابسته به شرایط واکنش، سوبسترا، نوع آزمون، طبیعت آنتی‌اکسیدان‌های مورد آنالیز و بسیاری از فاکتورها می‌باشد. بنابراین ارتباط بین آزمون‌ها فقط به روش وابسته نیست و مقایسه نتایج روش‌های مختلف با هم دشوار می‌باشد (Contini et al, 2008).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف میزان MBC و MIC عصاره‌ها در برابر باکتری استافیلوکوکوس آرئوس و اشیرشیاکلی

جدول ۶ و۷، MIC و MBC عصاره‌ها را در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس و اشیرشیاکلی نشان می‌دهند.

با توجه به داده‌های جدول ۶، عصاره مایکروویوی دو واریته کرونایکی و روغنی کمترین MIC (۳۱۵ میکروگرم در میلی لیتر) را در برابر *استافیلوکوکوس آرئوس* داشتند. در مورد روش غرقابی همانند روش مایکروویو واریته میشن بیشترین میزان MIC (۱۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) را به خود اختصاص داد. در مقایسه دو روش می‌توان گفت به استثنا واریته میشن، عصاره‌های مایکروویوی در مهار باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* بهتر عمل کردند. با توجه به داده‌های جدول بالا، کمترین میزان MIC، در برابر *اشیرشیاکلی* ۳۱۵ میکروگرم در میلی لیتر بود که این رقم در عصاره مایکروویوی واریته کرونایکی مشاهده شد. در مورد روش غرقابی واریته کرونایکی با MIC برابر با ۶۲۵ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به دو واریته دیگر، قدرت بیشتری در مهار باکتری اشیرشیاکلی از خود نشان داده و در مقایسه دو روش استخراج، عصاره‌های مایکروویوی MIC کمتری برای مهار این باکتری ها نیاز داشتند.

همان طوری که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، کمترین MBC، *در برابر استافیلوکوکوس آرئوس* (۶۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) مربوط به عصاره مایکروویوی واریته کرونایکی بود. همچنین، در مورد روش غرقابی همانند روش مایکروویو، واریته کرونایکی با MBC برابر با۱۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، بیشترین قدرت باکتری کشی را از خود نشان داد.

کمترین MBC برای نابودی باکتری *اشیرشیاکلی* ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود که در عصاره واریته کرونایکی به کمک روش مایکروویو به دست آمد و کمترین قدرت کشندگی در برابر این باکتری، مربوط به عصاره های واریته های روغنی و میشن در روش استخراج به روش غرقابی بود. در روش غرقابی همانند روش مایکروویو، واریته کرونایکی قدرت کشندگی بیشتری داشت. همچنین در مقایسه دو روش مشخص شد، تمام عصاره‌های مایکروویوی MBC پایین تر و در نتیجه قدرت باکتری کشی بیشتری نسبت به روش غرقابی در مورد هر دو باکتری دارند.

با توجه به موارد گفته شده، MBC در مورد باکتری استافیلوکوکوس آرئوس و اشیرشیاکلی به ترتیب برابر با ۶۲۵ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود که نشان دهنده مقاوم‌تر بودن باکتری اشیرشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس آرئوس بود. استافیلوکوکوس آرئوس یک باکتری گرم مثبت و اشیرشیاکلی یک باکتری گرم منفی می باشد. لیپوپلی ساکاریدهای غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی آن‌ها را نسبت به دترجنت‌ها، آنتی بیوتیک‌ها و رنگ‌های آب دوست مقاوم می‌کند. با توجه به ساختار چند لایه باکتری‌های گرم منفی علت MBC بالاتر در مورد اشیرشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس آرئوس توجیه می‌شود. در بسیاری از پژوهش‌های دیگر هم به نتیجه مشابه با این مسئله دست یافته‌اند (منصف اصفهانی و همکاران، ۱۳۸۸؛ کرمانشاهی و همکاران، ۱۳۸۷). علاوه بر این مشخص شد در بسیاری از موارد عصاره‌های مایکروویوی فعالیت ضد باکتریایی بهتری دارند که دلیل این امر با توجه به ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت ضد میکروبی و میزان بالای استخراج ترکیبات فنولی در روش مایکروویو قابل توجیه می‌باشد (Negi et al, 2005). در مورد اختلاف نتایج در مورد واریته‌ها، ترکیب شیمیایی و نوع ترکیبات فنولی هر یک از عصاره‌ها از عوامل مؤثر در ایجاد این اختلاف می‌باشند. همچنین عصاره ها، علاوه بر اثر بر غشا ممکن است در سنتز آنزیم‌های مختلف باکتری-ها نیز نقش داشته باشد که این مسئله در مورد فلفل سیاه و قرمز و آویشن شیرازی بر آنزیمDNase استافیلوکوکوس آرئوس نیز مشخص شده است (زرین قلم مقدم و همکاران، ۱۳۸۶).

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش مشخص شد که روش MAE راندمان استخراج بالاتری نسبت به روش سنتی در استخراج ترکیبات فنولی داشته و زمان استخراج را به میزان زیادی کاهش می دهد. همچنین واریته اثر زیادی بر میزان استخراج ترکیبات فنولی و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی داشت. در بررسی

فعالیت آنتی اکسیدانی، عصاره هایی با میزان ترکیبات فنـولی بـالاتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان دادند. در مـورد فعالیـت ضـد میکروبی عصاره های مایکروویوی واریته کرونایکی نقش مؤثری در مهار هر دو باکتری مورد آزمون بـه ویـژه اسـتافیلوکوکوس آرئـوس داشتند. بنابراین با توجه به این که برگ زیتـون یـک بـرگ همیشـه سبز بوده و در تمامی فصول سال به آسـانی در دسـترس اسـت و در کشور ما استفاده دارویی و خوراکی به صورت صنعتی ندارد، می توان از واریته های مختلف آن به ویژه واریته کرونایکی و روش اسـتخراج به کمک امواج مایکروویو، برای تهیه عصاره غنی از ترکیبات فنـولی برای مصارف خوراکی و دارویی و تهیه محصـولات جدیـد از جملـه چای و عصاره برگ زیتون بهره جست.

منابع

۱- زرین قلم، م.، ستاری، م.، زرین قلم مقدم، ج. و رضا زاده، ش.، ۱۳۸۶، اثر عصاره الکلی فلفل سیاه و قرمز و آویشن شیرازی بر مهار آنزیم DNase استافیلوکوکوس آرئوس، فصلنامه گیاهان دارویی، ۴ :۲۴.

۲- کرمانشاهی، ر. ک.، معطر، ف. و سلیمانی منش، ع.، ۱۳۸۵، ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی و الکلی گلرنـگ بـر روی تعدادی از باکتری ها. مجله علوم دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۵، ۲۶- ۱۸.

۳- قره خانی، م.، رفیعی، ز.، قربانی، م. و جعفری، س. م.، ۱۳۸۸. سیستم مایکروویو محفظـه بـاز بـرای اسـتخراج ترکیبـات مـؤثره از گیاهان دارویی، ۵۹۳۲۱.

۴- منصف اصفهانی، ح. ر.، شریفی اقدم، ا.، امینی، م.، فرامرزی، م. ع.، شاهوردی، ا. و حاجی آقایی، ر.، ۱۳۸۸، بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره تام و فراکسیو ن های گیاه.Geum kokanicum، فصلنامه گیاهان دارویی، ۲:۳۰.

5- Arabshahi, S. & Urooj, A., 2007, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. Food Chemistry, 102, 1233-1240.

6- Atawodi, S. E., 2005, Antioxidant potential of African medicinal plants. African Journal Biotechnology. 4 (2), 128 -133.

7- Blomhoff, R., 2005, Dietary antioxidants and cardiovascular disease. Current Opinion in Lipidology, 16, 47–54.

8- Cai, Y. Z., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H., 2004, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, 174, 2157–2184.

9- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. & Anelli, G., 2008, Extraction of natural antioxidants from hazelnut (Corylus avellana L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. Food Chemistry, 110, 659–669.

10- Goli, A. H., Barzegar, M. & Sahari, M. A., 2005, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. Food Chemistry, 92, 521–525.

11- Gulçin, I., Buyukokuroglu, M. E., Oktay, M. & Kufrevioglu, O. I., 2003, Antioxidant and analgesic activities of turpentine of Pinus nigra Arn. subsp. Pallsiana (Lamb.) Holmboe. Journal of Ethnopharmacology, 86, 51–58.

12- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X. & Xia, W., 2009, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. Separation and Purification Technology, 70, 63-70.

13- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M. & Hamdi, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. Food Chemistry, 105, 1126–1134.

14- Hemwimon, S., Pavasant, P. & Shotipruk, A., 2007, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda citrifolia. Separation and Purification Technology, 54, 44 –50.

15- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A. & Shukla, S. S., 2009, Microwave assisted extraction for phytoconstituents- An overview. Asian J. Research Chem, 2 (1), 19- 25.

16- Karthikumar, S., Vigneswari, K. & Jegatheesan, K., 2007, Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of Eclipta prostrata (L). Scientific Research and Essay, 2 (4), 101-104.

17- Korukluoglu, M., Sahan, Y. & Yigit, A., 2008, Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. Journal of Food Safety, 28, 76-87.

18- Koutsoumanis, K., Tassou, C. C., Toukis, P.S. & Nychas, G. J., 1998. Modelling the effectivenes of a natural antimicrobial on Salmonella enteritidis as a function of concentration, temperature and pH using conductance measurements. Journal of Applied Microbiology 84, 981-987.

19- Lujan , R. J., R. J., Rodriguez. & Castro, M. D. L., 2006, Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385(4), 753-759.

20- Markin, D., Duek, L. & Berdicevsky, I., 2003, In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses, 46, 132–136.
21- Negi, P.S., Chauhan, A. S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S. & Ramteke, R.S., 2005, Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed extracts. Food. Food Chemistry, 92, 119-124.
22- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi., Azizi, M. & Bassami, M. R., 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120, 765–770.
23- Pan, X., Niu, G. & Liu, H., 2001, Microwave assisted extraction of tanshinones from Salvia miltiorrhiza bunge with analysis by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 922, 371-375.
24- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X He, C., Ji, X., Zhang, J. & Huang, F., 2008, Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (Dimocarpus Longan Lour) peel. Food Chemistry, 106, 1264–1270.
25- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F.,Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. & Pereira, J. A., 2007, Phenolic Compound and Antimicrobial Activity of Olive (Olea europaea L.Cv.Cobrancosa) leaves. Journal of Molecules, 12, 1153-1162.
26- Quan, P. T., Hang, T. V., Ha, N. H., De, N. X. & Tuyen, T. N., 2006, Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. Tap Chi Phat Trien Kh&Cn, 9 (8), 69- 75.
27- Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V. & Boas, L. V., 2006, Phenolic compounds and antioxidant activity of olea europaea l. fruits and leaves. Food Sci Tech Int, 12(5), 385–396.
28- Wang, L. & Weller, C.L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci. Technol, 17, 300-12.
29- Yigit, A., Sahan, Y. & Korukluoglu, M., 2001, Antimicrobial substances found in olive leaves and olive. Pp.139-147. 2nd International Altınoluk “Antandros” Olive Busines Symposium. Altınoluk, Turkey.
30- Zhang, B., Yang, R. & Liu, C. Z., 2008, Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of Lonicera japonica Thunb. Sep. Purif. Technol, 62, 480–483.

Effect of Variety and Method of Extraction on Antioxidant and Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extracts

Z. Rafiee [1]- S. M. Jafari [2]*- M. Khomeiri [3]- M. Alami [4]

Received: 11-10-2010
Accepted: 3-4-2011

Abstract

The aim of this study was to extract phenolic compounds from olive leaves of Cronaiky, Roghani and Mishen varieties by maceration and Microwave-assisted extraction (MAE) methods. Our result revealed that effect of extraction method and variety was statistically significant ($p<0.05$) and MAE-produced extracts have more total phenolics and antioxidant activity than traditional ones. The highest phenolic content (244.667±0.12 mg TAE/g extract) and the lowest IC_{50} in DPPH (74.19±0.15 µg/ml), reducing power (148.015±0.05 µg/ml) and total antioxidant capacity (160.391±0.02 µg/ml) indices were related to the MAE extract of Cronaiky. Also, it was observed a highly linear correlation between the polyphenol contents and antioxidant activity. Regarding the antimicrobial activity of olive leaf extract, we found the highest bactericidal activity was associated with MAE extract of Cronaiky and the lowest MBC was 625 and 2500 µg/ml against *Staphilococcus Aureus* and *Escherishia Coli*, respectively., showing *E.Coli* as more resistant than *S.aureus*.

Keywords: olive leaf, phenolic compound, maceration, microwave, antioxidant activiy, antimicrobial activity

1- MSc Graduate, School of Food Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2 ,4- Assistant Professors, School of Food Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan
*- Corresponding author Email: (Smjafari@gau.ac.ir)
3- Associate Professors, School of Food Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan