استخراج عصاره بره‌موم و ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن به عنوان نگهدارنده طبیعی در موادغذایی

رقیه حاتمی[1]، هدا جعفری‌زاده مالمیری[2]، افشین جوادی[3]*، نویده انرجان[4]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران.

۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده شیمی، واحد تبریز، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران.

۳. گروه بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۴. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی ، تبریز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Javadi@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت۱۴۰۰/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

چکیده

هدف از این پژوهش عصاره‌گیری بره‌موم با استفاده از روش‌های خیساندن در اتانول ۲۰ و ۷۰ درصد و اثر اولتراسوند در اتانول ۲۰ درصد، و ارزیابی خواص فیزیکوشمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن‌ها به عنوان نگهدارنده طبیعی جهت استفاده در صنایع غذایی می‌باشد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۹۴/۱۹ میلی‌گرم‌برگرم)، فلاونوئید (۸۹/۴۶ میلی-گرم‌برگرم) و خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH (۹۲/۶۳ درصد) در عصاره‌های اولتراسونیک و کم‌ترین میزان ترکیبات فنلی (۸۷/۸۵ میلی‌گرم‌برگرم)، فلاونوئید (۸۲/۲۰ میلی‌گرم‌برگرم) و خاصیت آنتی‌اکسیدانی (۸۵/۸۷ درصد) در روش خیساندن در اتانول ۲۰ درصد می‌باشد. همچنین نتایج بررسی خاصیت ضدمیکروبی با روش مهاری انتشار از چاهک نشان داد حساس-ترین باکتری *Staphylococcus aureus* (قطر هاله ۲۰ میلی‌متر) در مقابل عصاره اولتراسونیک بود. در ارتباط با مهار باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تفاوت معنی‌داری بین عصاره‌ها نبود ($p>0/05$) و هیچ‌یک از عصاره‌ها قدرت ضدباکتریایی علیه باکتری *Pseudomonas aeruginosa* نداشتند. بیشترین قدرت مهار *Candida albicans* (قطر هاله ۳۶ میلی‌متر) با عصاره‌اولتراسونیک بود و در بررسی رشد *Aspergillus niger* پس از سپری شدن ۸ روز، کمترین میزان رشد با عصاره اولتراسونیک (۹ میلی‌متر) و پس از آن عصاره اتانول ۷۰ درصد (۱۰ میلی‌متر) به دست آمد. بر این اساس میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی استخراج شده در عصاره اتانولی ۷۰ درصد بیشتر از عصاره اتانول ۲۰ درصد بود و در روش اولتراسوند بر اساس تکنولوژی هردل در مدت زمان کم، میزان زیادی از ترکیبات فعال در حلال اتانول ۲۰ درصد استخراج گردید.

کلید واژه‌ها: خواص فیزیکوشیمیایی، عصاره اتانولی بره‌موم، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، نگهدارنده طبیعی.

مقدمه

بره‌موم یا چسب زنبور توسط زنبورهای عسل کارگر از گیاهان، جوانه و گل درختان غان، سپیدار، بلوط، کاج-ها و بید جمع‌آوری شده و پس از بلعیدن و انجام عمل گوارشی بر روی آن، به صورت ماده‌ای رزینی و چسبناک تولید می‌شود. از این ماده برای بستن منافذ داخل کندو و حفاظت از آن در مقابل حیوانات و میکروارگانیسم‌های مزاحم، نور و رطوبت، ضدعفونی نمودن محیط داخلی و تنظیم دمای داخلی کندو استفاده می‌گردد. بره‌موم خام

معمولاً از ۵۰ درصد صمغ گیاهی، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد اسیدهای چرب ضروری و آروماتیک، ۵ درصد گرده و ۵ درصد مواد آلی دیگر تشکیل شده است. ترکیب شیمیایی برەموم بسیار پیچیده بوده و بیش از ۴۰۰ ترکیب شیمیایی مختلف در این ماده شناسایی شده است. بیشترین ترکیب شیمیایی آن بر پایه ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشد. فلاونوئیدها جزو ترکیبات پلی‌فنولیک موجود در برخی از گیاهان بوده و به میزان متفاوتی در برەموم دیده می‌شوند. مهم‌ترین اجزای فعال شیمیایی آن شامل دی‌هیدروچالکون، چالکون، فلاون، ترپن، اسیدهای-معطر و آلدئیدها بوده و حاوی مواد معدنی مختلفی مانند منیزیم، کلسیم، سدیم، روی، آهن، کلسیم، آلومینیوم، سلنیوم و برخی ویتامین‌ها مانند B1، B2، B6، C و E و تعدادی اسیدچرب است (Di Capua, et al., 2018). بر اساس مطالعات مختلف، برەموم و عصاره‌های آن به دلیل دارا بودن خواص بیولوژیکی متعددی همچون خاصیت ضدعفونی کنندگی، آنتی‌باکتریال، ضدقارچی، ضدویروسی (Ali and Kunugi, H., 2021) ، ضدفشارخون، ضدسرطان و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، دارا بودن فعالیت سیتوتوکسیک و علاوه بر آن خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار اهمیت یافته است. ظرفیت جذب رادیکال آزاد، وجود ترکیبات زیست فعال و اثرات ضدمیکروبی، استفاده از آن را به عنوان نگهدارنده مورد توجه قرار داده و موجب کاربرد آن در علوم‌پزشکی، صنایع‌دارویی، لوازم-آرایشی و صنایع‌غذایی می‌گردد (Irigoiti, et al.,2021; Mahdavi-Roshan, et al., 2022).

برەموم خام به صورت مستقیم به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع‌غذایی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. به منظور حذف مواد زاید و استخراج ترکیبات فنلی و محتویات فلاونوئیدی، آن را خالص‌سازی می‌نمایند. روش استخراج، گامی کلیدی برای جداسازی و بازیابی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی برەموم است و حلال‌های هیدروالکلی به عنوان مناسب‌ترین محیط برای استخراج اجزای فنلی فعال بیولوژیکی برەموم خام توصیف شده‌اند. تکنیک‌های استخراج برای برەموم خام معمولا روش‌های خیساندن در دمای اتاق و سوکسله هستند. این روش‌ها ساده و ارزان بوده و استخراج ترکیبات فنلی با این روش‌ها به مقدار قابل توجهی صورت می‌گیرد. اما روش‌های فوق اغلب زمان‌بر بوده و نیازمند حجم بالای حلال می‌باشند، همچنین باعث افزایش هزینه‌های فرایند و خطرات زیست‌محیطی می-شوند، به همین علت، استفاده از روش‌های اولتراسونیک، میدان الکتریکی پالسی، گرمایش مایکروویو، سیال‌های فوق‌بحرانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Cavalaro, et al., 2019; Oroian, et al., 2020).

مختار(۲۰۱۹) در روش خیساندن، تاثیر درصدهای حلال اتانولی را برمیزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها بررسی کرده و درصد اتانول را ۵۰ تا ۸۰ درصد پیشنهاد داده است(Mokhtar, 2019). پوجیریاهو و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقات خود بر روی برەموم، اتانول ۱۸ درصد را بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنلی و ضدمیکروبی به‌دست آورده‌اند و حداقل مدت زمان استخراج به روش خیساندن را بیشتر از سه روز گزارش کرده‌اند (Pujirahayu, et al., 2014). بانکووا و همکاران (۲۰۲۱) استخراج عصاره برەموم با روش‌های خیساندن، سوکسله، مایکروویو، فشارهای بالا، سیالات فوق بحرانی و اولتراسونیک و مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی حاصل از هر روش را بررسی کردند و به دلیل زمان کوتاه استخراج، روش اولتراسونیک را به عنوان بهترین روش معرفی کرده و تحقیقات بیشتر در زمینه استخراج با اولتراسونیک را پیشنهاد داده‌اند (Bankova, et al., 2021). امروزه به‌دلیل نگرانی‌ها درباره ترکیبات آنتی-اکسیدانی و ضدمیکربی سنتزی در سلامتی انسان، جایگزین کردن آن‌ها با موادطبیعی در صنایع‌غذایی جایگاه ویژه‌ای دارد. لذا، در این پژوهش به تعیین ویژگی-های فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره برەموم منطقه آذربایجان با دو روش استخراج خیساندن و اولتراسونیک جهت ارزیابی قابلیت کاربرد آن به عنوان نگهدارنده طبیعی در موادغذایی پرداخته شده است.

مواد و روش کار

خریداری مواد اولیه

اتانول ۹۶ درصد، آب دوبار تقطیر، سولفات سدیم، اسید سولفوریک، هیدروکسید سدیم، اسید بوریک، اسید هیدروکلریک، هگزان، متانول، سولفات مس، کلرید آلومینیوم، ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱ پیکریل هیدرازیل، کلرید - باریم (Merck,Germany)، معرف فولین سی‌کالچیو، اسیدگالیک، کوئرستین (Sigma-Aldrich)، سوش‌های باکتری شامل *Staphylococcus aureus* (PTCC:۱۷۶۴)، *Bacillus cereus* (PTCC:۱۰۱۵)، *Escherichia coli* (PTCC:۱۷۶۹)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC:۱۳۱۰)، *Candida albicans* (PTCC:۵۰۲۷) و *Aspergillus niger* (PTCC:۱۵۱۱) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی) و محیط‌های کشت نوترینت‌آگار و پتیتودکستروزآگار(Himedia,India) خریداری شد.

آماده‌سازی برەموم

برەموم خام از بازار محلی تبریز خریداری شد و ناخالصی-های آن به صورت دستی حذف و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. به مدت ۲ ساعت در فریزر ۱۶- درجه سلسیوس (سامسونگ مدل HM34) قرار گرفت. پس از منجمدشدن، در آسیاب خانگی (مولینکس مدل۱۰۴۴) به صورت پودر درآمده و پودرهای به دست آمده برای ادامه آزمون در ظروف تیره در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج به روش خیساندن

با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر و اتانول، محلول هیدروالکلی ۲۰ و ۷۰ درصد تهیه شد. سپس ۴۰ گرم از برەموم پودرشده در داخل ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول‌های هیدروالکلی تهیه شده حل گردید و به مدت ۳ روز در دمای آزمایشگاه و به دور از نور آفتاب، نگهداری شده و هرچهار ساعت یک‌بار هم‌زده شد و با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ صاف گردید. محلول‌های صاف شده، برای عمل تبخیر در روتاری اواپراتور تحت خلا (Buchi Rotavapor R-100) در دمای ۵۰-۴۵ درجه سلسیوس سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در نهایت محلول‌های غلیظ شده دوباره از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ عبور داده شد و به عنوان عصاره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید (Zainal, et al., 2021).

استخراج به روش اولتراسونیک

در این روش برای استخراج از دستگاه اولتراسونیک پروب-دار (Hiesche, UP400S, Berlin, Germany) استفاده شد. ۴۰ گرم از برەموم پودر شده با ۲۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۲۰ درصد مخلوط و پروب دستگاه به مدت ۱۰ دقیقه در داخل محلول قرار داده شد. توان دستگاه ۳۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز انتخاب گردید. در نهایت همانند روش خیساندن، عملیات تبخیر با استفاده از روتاری‌اواپراتور تحت خلا با روش فوق انجام یافت. عصاره به‌دست آمده در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور از نور برای آزمون‌های بعدی نگهداری شد (Hatami, et al., 2020).

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی عصاره‌های استخراج شده

میزان رطوبت برەموم خام با روش خشک‌کردن و توزین ۱۰ گرم برەموم پودر شده در آون (Shimaz,SHFD55) اندازه‌گیری گردید (Dias, L.G. et al., 2012). اندازگیری pH با استفاده از pHمتر (JENWAY, 3510, England) انجام گردید. اندازه‌گیری خاکستر در کوره ۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت، چربی به روش سوکسله و پروتئین به روش کجلدال انجام شد (Kunrath, et al., 2017).

ارزیابی ترکیبات فنلی عصاره‌های استخراج شده

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی‌کل با روش فولین‌سی‌کالچیو انجام یافت، غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسیدگالیک تهیه و ۰/۵ میلی-

لیتر از آن‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین‌سی‌کالچیو و ۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد وزنی- حجمی به ان افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شده و سپس جذب نوری آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Hatch, DR5000, US) در طول موج ۷۶۰ نانومترخوانده شد و نمودار استاندارد رسم گردید. برای تعیین مقدار ترکیبات فنلی نمونه‌ها، مقدار ۰/۱ میلی‌گرم از عصاره‌های برەموم در۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰درصد حل و سپس ۱میلی‌لیتر از محلول تهیه شده تا حجم ۵ میلی‌لیتر رقیق شد. ۲ میلی‌لیتر کربنات-سدیم با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سی کالچیو مخلوط شده و به مدت ۸ دقیقه در تاریکی نگه‌داری و جذب آن در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم برگرم اسیدگالیک محاسبه گردید (Abdullah, et al., 2020).

ارزیابی محتوای کل فلاونوئیدی عصاره‌های استخراج شده

آزمون تعیین محتوای فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کلریدآلومینیوم انجام گرفت. یک میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۲ درصد به یک میلی‌لیتر از عصاره‌ها با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در داخل کابینت قرار داده شد. جذب نمونه‌ها در ۴۳۰ نانومتر در مقابل بلانک (کلرید آلومینیوم ۲ درصد به همراه آب مقطر) قرائت گردید. از کوئرستین (غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی-گرم بر گرم) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئیدی به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم عصاره گزارش شد (Abdullah, et al., 2020).

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی

برای ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال آزاد از روش DPPH استفاده شد، ۰/۲۵ گرم از عصاره‌ها با اتانول ۷۰ درصد به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به ۲ میلی‌لیتر از محلول آماده‌شده ۲میلی‌لیتر معرف ۲ و ۲-دی‌فنیل ۱ پیکریل هیدرازیل اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در داخل کابینت قرار گرفت. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای نمونه شاهد نیز دقیقاً به همین صورت عمل گردید با این تفاوت که به جای نمونه از اتانول ۲۴ درصد استفاده شد. محتوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH از رابطه (۱) زیر محاسبه گردید (Ghavidel, et al., 2021).

رابطه (۱)

$$DPPH = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} * 100$$

ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج‌شده

درآزمون‌های میکروبی برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و مخمر *Candida albicans* روش مهاری انتشار از چاهک و برای *Aspergillus niger* روش مهار رشد استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون (حاوی CFU 10^8 x ۱/۵) باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و مخمر *Candida albicans* بر روی محیط کشت نوترینت آگار پخش گردید، به‌وسیله ژل پانچر، چاهک-هایی (۸-۶ میلی‌متر) در محیط کشت ایجاد و درون هر یک از چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌ها ریخته شد. منطقه شفاف ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری گردیده و فعالیت‌های ضدمیکروبی نمونه‌ها نشان داده می-شوند.

در روش مهار رشد، کپک *Aspergillus niger* تهیه و در مرکز پلیت حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار قرار داده شده و به مدت ۷ روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس انکوبه می‌شود، سپس دیسک‌هایی به شعاع ۵ میلی‌متر از کپک انکوبه شده جدا گردیده و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آکار و ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌ها انتقال داده می‌شود و در یکی از نمونه‌ها هم، پلیت حاوی محیط کشت پتیتو دکستروز آگار و قارچ به

عنوان نمونه شاهد به کار برده می‌شود (Fardsadegh and Jafarizadeh-Malmiri, 2019).

آنالیز آماری

همه آزمون‌ها با سه تکرار انجام و نتایج به‌صورت میانگین داده‌ها ارائه شد. داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس با برنامه آماری Minitab v.16 (Minitab Inc., PA, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده، از آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی عصاره‌های برەموم

آنالیز آماری داده‌های به دست آمده از آزمون‌های فیزیکوشیمیایی عصاره‌های خیساندن (۲۰ درصد، ۷۰ درصد هیدروالکلی) و عصاره اولتراسونیک با میانگین سه بار تکرار در جدول‌های (۱) و (۲) آمده است. نتایج آنالیز آماری در جدول (۱) نشان داد که میزان پروتئین و pH نمونه‌های ۷۰ درصد و اولتراسونیک و درصد چربی عصاره-های ۲۰ درصد و ۷۰ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p>0/05$) اما میزان واکس، خاکستر و رطوبت در عصاره-ها اختلاف معنی‌داری با هم‌دیگر داشتند ($p<0/05$).

جدول ۱- نتایج آزمون فیزیکوشیمیایی عصاره‌های برەموم

تیمار	pH	چربی(درصد)	پروتئین(درصد)	واکس(درصد)	رطوبت(درصد)	خاکستر(درصد)
خیساندن ۲۰(درصد)	۰/۱۳^{b} ± ۵/۲۳	± ۰/۱۹^{a} ۵۶/۶۱	۱/۵۱ ± ۰/۰۸^{b}	± ۰/۱۲^{a} ۲۳/۲۹	± ۰/۱۰^{a} ۵/۱۰	۴/۸۹ ± ۰/۱۳^{a}
خیساندن ۷۰ (درصد)	۰/۰۶^{a} ± ۵/۶۰	± ۰/۳۱^{a} ۵۶/۵۰	۲/۳۵ ± ۰/۳۰^{a}	± ۰/۱۷^{b} ۲۱/۲۳	± ۰/۰۹^{b} ۴/۶۷	۴/۶۲ ± ۰/۰۸^{b}
اولتراسونیک	۰/۱۶^{a} ± ۵/۶۶	۰±/۲۶^{b} ۵۶/۳۶	۲/۲۸ ± ۰/۲۲^{a}	± ۰/۳۸^{c} ۱۸/۲۴	± ۰/۰۱^{c} ۴/۱۰	۳/۹۵ ± ۰/۱۹^{c}

•(میانگین ± انحراف استاندارد) حروف مختلف در ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p<0/05$)

در جدول (۲) مقادیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها آمده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد تمامی عصاره‌های استخراج شده دارای ترکیبات فعال بالایی هستند به‌طوری که بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی با ۰/۰۹ ± ۹۲/۶۳ درصد مربوط به روش اولتراسونیک و کمترین میزان با ۰/۱۳ ± ۸۵/۸۷ درصد مربوط به عصاره هیدروالکلی ۲۰ درصد می‌باشد، نتایج آنالیز آماری نشان داد که اختلاف آماری بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ۲۰درصد و اولتراسونیک معنی‌دار ($p<0/05$) بود، در حالی‌که در عصاره ۷۰درصد و اولتراسونیک تفاوت آماری معنی‌دار نبود ($p>0/05$) اما اختلاف آماری بین عصاره ۲۰درصد و ۷۰درصد معنی‌دار است ($p<0/05$). بر اساس نتایج آزمون محتویات فلاونوئیدی، کمترین میزان فلاونوئید از روش خیساندن و عصاره اتانولی ۲۰درصد با ۰/۱۲ ±۸۲/۲۰ میلی‌گرم برگرم و بیشترین مقدار از روش اولتراسونیک استخراج شده است و از نظر آماری بین این دو عصاره تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). در استخراج ترکیبات فنلی بیشترین مقدار استخراج شده در روش اولتراسونیک با ۰/۲۲ ± ۹۴/۱۹ میلی‌گرم برگرم و کم‌ترین مقدار در عصاره ۲۰درصد ۰/۱۹ ± ۸۷/۸۵ میلی‌گرم برگرم بود و همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد اختلاف آماری بین این دو عصاره معنی‌دار است ($p<0/05$)، اما اختلاف بین عصاره ۲۰ درصد و ۷۰ درصد معنی‌دار نبود ($p>0/05$).

جدول ۲- نتایج آزمون آنتی اکسیدانی، فنلی و فلاونوئیدی

تیمار	آنتی‌اکسیدان (درصد)	محتویات فلاونوئیدی (میلی‌گرم-برگرم)	ترکیبات فنلی(میلی‌گرم بر-گرم)
خیساندن(۲۰ درصد)	۰/۸۵ ± ۱۳/۸۷^{b}	۰/۸۲ ± ۱۲/۲۰^{b}	۰/۸۷± ۱۹/۸۵ ^{b}
خیساندن(۷۰درصد)	۰/۹۰ ± ۱۵/۸۸^{a}	۰/۸۵ ± ۱۷/۸۶^{b}	۰/۹۰ ± ۱۱/۸۹^{b}
اولتراسونیک	۰/۹۲ ± ۰۹/۶۳^{a}	۰ /۸۹ ±۲۲/۴۶^{a}	۰/۹۴ ± ۲۲/۱۹^{a}

•(میانگین± انحراف استاندارد)، حروف مختلف در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند (p<۰/۰۵).

اثر روش‌های عصاره‌گیری بر ویژگی‌های میکروبی عصاره برەموم

در جدول (۳) نتایج مهار باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر به وسیله عصاره‌ها در روش انتشار از چاهک گزارش شده است. براساس نتایج، عصاره اولتراسونیک با ایجاد هاله شفاف با قطر ۰/۲۴ ± ۲۰ میلی‌متری بیشترین مهار و عصاره ۲۰ درصد با قطر هاله ۰/۱ ± ۶ میلی‌متری کم‌ترین مهار باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus*را داشت که این اعداد در آنالیز آماری اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). در باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus*، عصاره ۲۰درصد کم‌ترین مهار (قطر هاله ۰/۱۹ ± ۴ میلی‌متر) و عصاره اولتراسونیک (قطر هاله ۰/۲۳ ± ۱۸میلی‌متر) بیشترین مهار را داشت و این نشان-دهنده اختلاف آماری معنی‌دار میان دو روش است (p<۰/۰۵) اما اختلاف آماری مهار باکتری *Bacillus cereus* در عصاره ۲۰ درصد و ۷۰ درصد معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵).

در ارزیابی مهار رشد باکتری *Escherichia coli*، عصاره ۷۰ درصد هیدروالکلی و اولتراسونیک به ترتیب هاله مهاری ۰/۲۶± ۵ و ۰/۱۹ ± ۱۵ میلی‌متری ایجادکردند (p<۰/۰۵) اما عصاره ۲۰ درصد تاثیری بر مهار باکتری گرم منفی *Escherichia coli* نداشت. هیچ کدام از عصاره‌ها توانایی مهار باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* را نداشتند و در مهار رشد مخمر *Candida albicans* همه عصاره‌ها قدرت مهار این مخمر را داشتند ولی روش اولتراسونیک به صورت معنی‌داری با اندازه ۰/۲۱ ± ۳۶ میلی‌متر بیشتر از دو عصاره دیگر مخمر را مهار کرد (p<۰/۰۵)، با توجه به نتایج جدول حساسیت باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* در مقابل عصاره ۲۰ درصد معنی‌دار نبود اما *Candida albicans* حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت داشت و اختلاف معنی‌دار بود. در نمونه‌های ۷۰ درصد و اولتراسونیک حساسیت باکتری-های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus*، باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و *Candida albicans* در مقابل عصاره‌ها اختلاف آماری معنی‌داری داشتند و حساسیت باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بوده و حساسیت مخمر *Candida albicans* هم بیشتر از همه می باشد.

رشد کپک *Aspergillus niger* در *طی* روزهای ۸،۶،۴،۲ بررسی و میزان رشد کپک مطابق جدول (۴) گزارش شد، در همه موارد بیشترین قدرت رشد مربوط به نمونه شاهد و کمترین میزان رشد برای عصاره اولتراسونیک بود که میزان رشد برای روزهای فوق به ترتیب اعداد ۹،۸،۷،۵ میلی‌متر به‌دست آمد. در روز هشتم بین مهار رشد نمونه شاهد و عصاره ۲۰ درصد و همچنین عصاره ۷۰ درصد و اولتراسونیک اختلاف معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵) اما از لحاظ آماری عصاره ۲۰ درصد و اولتراسونیک در مهار رشد *Aspergillus niger* دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (p<۰/۰۵)، همچنین نتایج روزهای مورد مطالعه در فعالیت ضدقارچی عصاره‌های برەموم بر رشد شعاعی قارچ *Aspergillus niger* نشان داد که در همه نمونه‌ها اثر بازدارندگی در طی زمان نسبت به نمونه شاهد وجود داشته و اختلاف معنی‌دار می‌باشد اما عصاره اولتراسونیک

اثر بازدارنـدگی بیشـتری نسـبت بـه بقیـه نمونـه‌هـا دارد (p<۰/۰۵).

جدول۳- بررسی مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر (قطرهاله مهار رشد) در عصاره‌ها

میکروارگانیسم	عصاره ۲۰درصد بره موم (mm)	عصاره ۷۰ درصد بره‌موم (mm)	عصاره اولتراسونیک (mm)
Staphylococcus aureus	۶ ۰±/۱۰ ^{bB}	۱۲ ± ۰/۳۳ ^{abB}	۲۰ ± ۰/۲۴ ^{aB}
Bacillus cereus	۴ ± ۰/۱۹ ^{bB}	۸ ± ۰/۱۶ ^{bBC}	۱۸ ± ۰/۲۳ ^{aBC}
Escherichia coli	۰	۵ ± ۰/۲۶ ^{bC}	۱۵ ± ۰/۱۹ ^{aC}
Pseudomonas aeruginosa	۰	۰	۰
Candida albicans	۱۲ ± ۰/۱۷ ^{bA}	۲۰ ± ۰/۱۷ ^{bA}	۳۶ ± ۰/۲۱ ^{aA}

•(میانگین±انحراف استاندارد)، حروف مختلف (حروف کوچک) در سطرها (حروف بزرگ) در ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند (p<۰/۰۵).

جدول۴- بررسی رشد کپک *Aspergillus niger* در عصاره ها(mm)

مواد اضافه شده	روز دوم	روز چهارم	روز ششم	روز هشتم
شاهد	۱۰ ± ۰/۳۲ ^{aC}	۲۲ ± ۰/۱۸ ^{aB}	۳۵ ± ۰/۱۰ ^{aA}	۳۸ ± ۰/۳۳ ^{aA}
عصاره ۲۰ درصد(mm)	۹ ± ۰/۲۹ ^{aD}	۲۵ ± ۰/۲۱ ^{aC}	۳۱ ± ۰/۱۹ ^{aB}	۳۵ ± ۰/۲۱ ^{aA}
عصاره ۷۰ درصد(mm)	۵ ± ۰/۲۱ ^{bB}	۶ ± ۰/۲۱ ^{bB}	۹ ± ۰/۰۸ ^{bA}	۱۰ ± ۰/۱۷ ^{bA}
عصاره اولتراسونیک(mm)	۵ ± ۰/۱۷ ^{bC}	۷ ± ۰/۱۱ ^{bB}	۸ ± ۰/۱۷ ^{bAB}	۹ ± ۰/۱۲ ^{bA}

•(میانگین ± انحراف استاندارد)، حروف مختلف در ستون‌ها(حروف کوچک) و در سطرها(حروف بزرگ) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند (p<۰/۰۵).

بحث

خواص بره‌موم با توجه به مبدأ تولید، مقدار مواد موجود در طبیعت، زمان تولید، نوع زنبور و... تغییر می‌کند. از آنجایی کـه عصـاره‌هـای بـره‌مـوم بـا مقـادیر و منـابع متفـاوتی از ترکیبات شیمیایی همراه هستند، لذا ویژگی‌های متفـاوتی از قبیل رنـگ، عطـر، اثـر آنتـی‌اکسـیدانی و ضـدمیکروبی برجای می‌گذارد. با بررسی ویژگی‌هـای فیزیکوشـیمیایی و ترکیبات فعال عصاره بره‌موم می‌تـوان اطلاعـاتی در مـورد میـزان نگهدارنـدگی آن بـه‌دسـت آورد. بـا مطالعـه ایـن پارامترها می‌توان به کیفیت آن جهت اسـتفاده در صـنعت غذا به عنوان یک نگهدارنده طبیعی پی برد.

فلاونوئیدها کلید اصلی در تعیین کیفیت بره‌موم هسـتند و از ترکیبات پلی‌فنولیـک موجـود در برخـی از گیاهـان بـه وجود آمده و در مقادیر متفـاوتی در آن‌هـا وجـود دارد. در این تحقیق پس از قـرار دادن میـزان جـذب عصـاره‌هـا در معادله خط منحنی کوئرستین استاندارد میـزان ترکیبـات فلاونوئیدی عصاره‌های بره‌موم به‌دست آمد. ایـن نتـایج بـا بررسی‌های تروشیوا و همکاران (۲۰۰۷) مشـابهت داشـت، آن‌ها با سه روش خیساندن، مـایکروویو و اولتراسـونیک در اتانول ۷۰ درصد عصاره‌گیری را انجام داده و در نهایـت بـه این نتیجه رسیدند که می‌تـوان بـا روش اولتراسـونیک در کم‌ترین زمان، بیشترین ترکیبات فلاونوئیـدی را اسـتخراج نمود. میهـای و همکـاران (۲۰۱۰) نیـز پـی بردنـد کـه بـا افزایش غلظت حلال میزان استخراج فلاونوئیـدها افـزایش می‌یابد. بالا بـودن دمـا و فشـار در روش اولتراسـونیک بـر دیـواره سـلول‌هـا تـاثیر گذاشـته و میـزان زیـادی از ایـن ترکیبات می‌توانند وارد عصـاره شـوند، نتـایج محققـان بـه وضـوح نشـان داده اسـت کـه تفـاوت در فعالیـت‌هـای

بیولوژیکی عصاره‌های برەموم دقیقا به دلیل تغییر در محتوای فلاونوئیدی می‌باشد (Ahangari, et al., 2018). آنالیز داده‌های میزان ترکیبات فنلی روش‌های استخراج نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی استخراج شده در عصاره‌های برەموم بستگی به روش استخراج و شرایط اعمال شده در آن روش دارد، بیشترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به روش اولتراسونیک به مقدار ۰/۲۲ ± ۹۴/۱۹ میلی‌گرم برگرم برحسب اسید گالیک بود. در روش اولتراسونیک حفره‌هایی به نام حفره‌های صوتی در عصاره به‌وجود می‌آید که با فرو ریختن این حباب‌ها ترکیبات فعال و موثر زیادی وارد عصاره می‌شوند به عبارتی هنگامی که امواج اولتراسونیک با دامنه فرکانسی بیشتر از محیط مایع عبور می‌کند، فروپاشی حباب‌های ایجاد شده بیشتر می‌شود. فروپاشی حباب در نزدیکی غشاهای سلولی می‌تواند باعث ایجاد نیروهای برشی شدیدی شود و بنابراین، شکاف‌های بسیار ریزی در بافت‌های گیاهی ایجاد می‌کند و بدین ترتیب اختلال در بافت سلولی ایجاد کرده و بهره‌وری استخراج را افزایش می‌دهد، به عبارت بهتر، روش استخراج با اولتراسونیک انتخابی‌تر عمل کرده و استخراج در مدتی کوتاه‌تر و با مقدار کمتری از حلال صورت می‌گیرد.. مولنار و همکاران(۲۰۱۷) میزان فنل کل درعصاره برەموم‌های چینی را ۹۵- ۷۵ میلی‌گرم برگرم گزارش کرده‌اند که نتایج این پژوهش مشابه یافته‌های آن‌ها می‌باشد. دینگ و همکاران (۲۰۲۱) میزان فنل کل در عصاره‌های روش اولتراسونیک در منطقه شاندونگ را ۱/۷ ± ۴۳۳/۸ میلی‌گرم برگرم بر حسب اسیدگالیک گزارش کرده‌اند و این اختلاف می‌تواند به دلیل تغییر آب‌وهوا، تغییر فصلی و زمان جمع‌آوری باشد. همچنین نمونه‌های عصاره برەموم مربوط به سرزمین‌های گرم، محتوای فنلی و فلاونوئیدی بیشتر از ۲۳ درصد داشتند و ترکیبات فنلی کل از عصاره اتانولی برەموم آرژانتین با روش خیساندن در مدت یک هفته را در محدوده ۸/۴۱ تا ۳۲/۳۱ میلی‌گرم بر گرم گزارش کرده‌اند (Moreira, et al., 2008; Tosic, et al., 2017).

DPPH یک رادیکال‌آزاد پایدار بوده و در حضور آنتی اکسیدان‌ها در نمونه‌های بیولوژیک خنثی می‌شود. رادیکال آزاد DPPH، در محیط اتانول باعث حداکثر جذب در ۵۱۷ نانومتر و ایجاد رنگ ارغوانی می‌گردد. در صورت خنثی شدن این رادیکال، از شدت رنگ بنفش کم شده و به زرد کم‌رنگ تغییر می‌یابد؛ بنابراین، کاهش جذب نوری متناسب با توانایی خنثی سازی رادیکال DPPH و یا قدرت آنتی اکسیدانی نمونه موردنظر خواهد بود. در این پژوهش قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها برای روش خیساندن در اتانول ۲۰ درصد ۰/۱۳ ± ۸۵/۸۷ درصد، اتانول ۷۰ درصد ۰/۱۵ ± ۹۰/۸۸ درصد و روش اولتراسونیک ۰/۰۹ ± ۹۲/۶۳ درصد به‌دست آمد، اما قدرت بالای مهار فعالیت رادیکال‌آزاد در هر سه نمونه، بیانگر میزان بالای فنل و فلاونوئید در برەموم خام می‌باشد. محققان تفاوت خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف را به شرایط جغرافیایی منطقه، زمان برداشت برەموم و نوع زنبور عسل و ... نسبت داده‌اند. این نتایج با دستاوردهای لیما و همکاران (۲۰۰۹) که خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در عصاره‌های بره موم در محدوده ۸۹/۶۰ -۴۶/۶۰ درصد گزارش کرده‌اند مطابقت داشت. کای و همکاران (۲۰۱۸) و موری و همکاران (۲۰۰۶) در نتایج تحقیقات خود اعلام کردند که عصاره‌های حاصل از امواج اولتراسونیک، در مقایسه با روش‌های خیساندن و مایکروویو دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند که امواج اولتراسونیک با فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز بر خلاف امواج الکترومغناطیس، در عصاره پخش شده و باعث چرخه‌های انبساط، انقباض و نوسان‌های مکانیکی در طی پخش در محیط می‌شود. در حالت انبساط، حباب‌هایی در عصاره ایجاد شده و فشار منفی تولید می‌نماید. حباب‌های تشکیل شده، رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. تأثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث نفوذ بیش‌تری از حلال اتانول به داخل مواد سلولی شده و انتقال جرم را بیشتر می‌کند. اولتراسوند در طی استخراج می‌تواند دیواره‌های سلولی را نیز تخریب کند و باعث تسهیل

آزادسازی محتوای آن می‌شود. بنابراین، تخریب سلولی کارآمد و انتقال جرم مؤثر و آزاد شدن انرژی، سه فاکتوراصلی هستند که باعث افزایش راندمان با اولتراسوند می‌شود (Cai, et al., 2018). در این مطالعه نتایج ارزیابی خواص ضدمیکروبی عصاره‌های خیساندن در اتانول ۲۰ و ۷۰ درصد و اولتراسونیک بر باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره‌ها حساس‌تر هستند. یعقوبی و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف برمموم ایرانی را در برابر *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* نشان داده و ثابت می‌کند که فعالیت ضدباکتریایی، عمدتاً به‌دلیل ترکیبات فنلی قطبی موجود در برمموم است. هم‌چنین اوزیل و همکاران (۲۰۰۵) به این نتیجه رسیدند که فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها با ترکیبات فنلی ، فلاونوئیدی و فعالیت باکتریوستاتیک برمموم رابطه مستقیم دارد و باکتری‌های گرم‌مثبت حساس‌تر از باکتری‌های‌گرم منفی هستند و این نتایج با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد. بررسی‌های دیگر نشان داد که خواص ضدباکتریایی عصاره‌ها به‌طورعمده مربوط به فلاونوئیدها، پینوسمبرین و پینوبانکسین آن می‌باشد. به نظر می‌رسد ترکیبات مؤثر موجود در عصاره بر روی غشای سیتوپلاسمی باکتری اثر گذاشته و باعث مهار فعالیت آنزیمی و تحرک باکتریایی می‌شود، همچنین قدرت مهار باکتری‌های گرم مثبت توسط عصاره‌های برمموم به علت نازک بودن لایه پپتیدوگلیکانی و وجود پورین‌ها در غشای این باکتری‌ها می‌باشد. در پژوهشی دیگر نشان داده‌اند که وجود ترکیبات لیپیدی در غشاء خارجی باکتری گرم منفی مانند *Pseudomonas aeruginosa*، منجر به نفوذپذیری کم‌تر آن‌ها نسبت به عصاره‌ها می‌شود که نتایج بررسی‌ها، نتایج این تحقیق را تائید می‌کند (Esmaeelian, et al., 2021). جرکویس و همکاران (۲۰۱۱) به این نتیجه رسیدند که باکتری *Escherichia coli* حساس‌تر از باکتری *Staphylococcus aureus* است و این نتیجه با نتایج این پژوهش مطابقت ندارد و شاید علت این اختلاف ناشی از واریته گیاه، منطقه جغرافیایی، روش استخراج و نوع حلال به کار رفته جهت استخراج باشد. حاتمی و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که در برمموم منطقه آذربایجان‌شرقی، میزان غلظت ترکیبات فعال اصلی مانند چالکون و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها بالا بوده و نقش اساسی در خاصیت ضدمیکروبی دارند و در روش اولتراسونیک میزان خروج این ترکیبات از سلول‌ها به دلیل به وجود آمدن حفره‌های صوتی، دمای ۵۰۰۰ درجه کلوین، فشار ۲۰۰۰ اتمسفر و پدیده کاویتاسیون افزایش می‌یابد (Hatami, et al., 2020).

Candida albicans یکی از شایع‌ترین مخمرهای فرصت طلبی است که می‌تواند آنزیم‌های پروتئازی ترشح نماید. در برخی از موارد ترشح این پروتئازها، باعث می‌شوند مخمر به فرم هایفی و مولکول‌هایی که میانجی چسبندگی و تهاجم به سلول‌های میزبان هستند، تبدیل شده و باعث تشکیل بیوفیلم و چسبندگی میکروارگانیسم به ماشین‌آلات صنایع غذایی شوند. این عوامل علاوه بر ایجاد عفونت، در فساد موادغذایی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. در این مطالعه هاله عدم رشد به وجود آمده توسط عصاره ۲۰ درصد ۰/۱۷ ± ۱۲ میلی‌متر، عصاره ۷۰ درصد ۰/۱۷ ± ۲۰ میلی‌متر و عصاره اولتراسونیک ۰/۲۱ ± ۳۶ میلی‌متر محاسبه شد و اختلاف معنی‌داری در روش خیساندن و اولتراسونیک وجود داشت و بیشترین مهار توسط عصاره اولتراسونیک به‌دست آمد. نتایج مطالعات سیلوا و همکاران (۲۰۱۷) این نتایج را تائید می‌کند. مهار رشد *Candida albicans* به‌وسیله عصاره برمموم به دلیل وجود ترکیبات فنلی و گروه‌های هیدروکسیل موجود درآن است که در این میان ترکیباتی به نام کافئیک اسید فنیل استر از طریق مهار فعالیت فسفولیپازی مسئول مهار مخمر

*Candida albicans*است. مطالعات بر روی ترکیبات سازنده برەموم وجود این ماده در ساختار آن را تائید می‌کند و به نظر می‌رسد با قرار گرفتن عصاره، تحت امواج اولتراسونیک مقدار ترکیبات فعال موجود در محیط به دلیل پدیده کاویتاسیون و دمای بالا افزایش می یابد (Hatami, et al., 2020). خاصیت ضدقارچی عصاره برەموم به دلیل تاثیر متقابل مولکول‌های پلی کاتیونی عصاره با اجزای آنیونی دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و باعث به وجود آمدن تغییراتی در نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود که در نتیجه بخشی از مواد داخل سلول به بیرون تراوش کرده و از ورود مواد غذایی به داخل آن جلوگیری می‌شود. ترکیبات فعال موجود در عصاره استخراجی با روش اولتراسونیک بعد از ورود به داخل سلول میکروارگانیسم و پیوند با DNA از سنتز RNA و ساخت پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند. همچنین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره می‌تواند باعث جلوگیری از رشد قارچ‌ها شود . این مواد از طریق اتصال‌شان به پروتئین‌های خارج سلولی و محلول و اتصال به دیواره سلولی باکتری‌ها و قارچ‌ها موثر واقع می‌شوند. فلاونوئیدها حالت چربی‌دوست داشته و می‌توانند موجب متلاشی‌شدن غشای قارچ‌ها شوند. عصاره الکلی برەموم قادر نیست رشد گونه‌های مختلف قارچ *آسپرژیلوس* را مهار سازد و نتایج آن‌ها با نتایج این مطالعه مغایرت دارد. نتایج کویروگا و همکاران (۲۰۰۶) نیز ثابت کرد عصاره خالص برەموم قادر است رشد *Aspergillus niger* را مهار نماید. دلیل اختلاف نتایج آگورو و همکاران با یافته‌های این مطالعه و کویروگا و همکاران می‌تواند ناشی از نوع بره-موم و روش عصاره‌گیری مورد استفاده باشد. آگورو و همکاران از برەموم برزیل و روش خیساندن برای تهیه عصاره استفاده کرده بودند، در حالی‌که در مطالعه کویروگا و همکاران از برەموم ایتالیایی و روش اولتراسونیک جهت تهیه عصاره الکلی برەموم استفاده شده بود. بر همین اساس توسی و همکاران ثابت کردند که حلال و روش مورد استفاده جهت استخراج عصاره برەموم میتواند فعالیت ضدمیکروبی آن را به طور معنی‌داری افزایش دهد (Quiroga, et al., 2006).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمون فیزیکوشیمیایی عصاره‌های حاصل از روش خیساندن در اتانول ۲۰ و ۷۰ درصد و اولتراسونیک حاکی از آن است که در بیشترین مقادیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به روش‌های اولتراسونیک و اتانول ۷۰ درصد بود. در بررسی نتایج حاصل از خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های برەموم در روش مهاری انتشار از چاهک حساس‌ترین باکتری، *Staphylococcus aureus* در مقابل عصاره اولتراسونیک بوده و باکتری *Bacillus cereus* کمترین مهار را با عصاره اتانولی ۲۰ درصد و بیشترین مهار را با عصاره اولتراسونیک داشت. عصاره اتانول ۲۰ درصد نتوانست باکتری گرم منفی *Escherichia coli* را مهار نماید، ولی عصاره اتانولی ۷۰ درصد قدرت مهار این باکتری را داشت با این وجود قدرت مهار آن کم‌تر از عصاره اولتراسونیک بود. هیچ یک از عصاره‌ها بر *Pseudomonas aeruginosa* تاثیری نداشتند. همه عصاره‌ها، مخمر *Candida albicans*را مهار نمودند و بیشترین مهار توسط عصاره اولتراسونیک انجام گرفت. در مهار رشد کپک *Aspergillus niger* نیز عصاره اولتراسونیک به صورت معنی‌داری بیشتر از دیگر عصاره‌ها رشد کپک را مهار کرد. از بررسی‌های فوق می توان نتیجه گرفت که عصاره‌های اتانولی ۷۰ درصد، اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی پایدارتر و بیشتری از اتانول ۲۰ درصد دارند، زیرا بیشتر ترکیبات فعال ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدان شناخته شده، در آب نامحلول هستند و در روش اولتراسونیک با اتانول ۲۰ درصد نیز با ترکیب روش‌ها و به دلیل پدیده کاویتاسیون و بر اساس تکنولوژی هردل، می‌توان میزان زیادی از ترکیبات فعال موجود در برەموم را با صرفه‌جویی در زمان، حلال و کم‌ترین آسیب به محیط‌زیست استخراج

نمود و این عصاره را به عنوان آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروب و نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی استفاده کرد.

منابع

1. Abdullah N.A., Zullkiflee N., Zaini S.N.Z., Taha H., Hashim F. and Usman A. 2020. Phytochemicals, mineral contents, antioxidants, and antimicrobial activities of propolis produced by Brunei stingless bees Geniotrigona thoracica, Heterotrigona itama, and Tetrigona binghami. Saudi J. Biol. Sci. 27(11):2902-2911.
2. Ahangari Z., Naseri M. and Vatandoost F. 2018. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. Iran.Endod. J, 13:285.
3. Ali A.M. and Kunugi H. 2021. Propolis, bee honey, and their components protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A review of in silico, in vitro, and clinical studies. Molecules. 26(5):1232.
4. Bankova V., Trusheva B. and Popova M. 2021. Propolis extraction methods: A review. J. Apic. Res: 1-10.
5. Cai W., Hu T., Bakry A.M., Zheng Z., Xiao Y. and Huang Q. 2018. Effect of ultrasound on size, morphology, stability and antioxidant activity of selenium nanoparticles dispersed by a hyperbranched polysaccharide from Lignosus rhinocerotis. Ultrason Sonochem. 42:823-831.
6. Cavalaro R.I., da Cruz R.G., Dupont S., de Moura J.M.L.N. and de Souza Vieira T.M.F. 2019. In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. Food Chem. X, 4:100054.
7. Di Capua A., Bejarano A., Adami R. and Reverchon E. 2018. Preparation and characterization of Chilean propolis coprecipitates using Supercritical Assisted Atomization. Chem Eng Res Des. 136:776-785.
8. Esmaeelian M., Jahani M., Feizy J. and Einafshar S. 2021. Effects of Ultrasound-Assisted and Direct Solvent Extraction Methods on the Antioxidant and Antibacterial Properties of Saffron (Crocus sativus L.) Corm Extract. Food Anal. Methods. 14:74-87.
9. Fardsadegh B. and Jafarizadeh-Malmiri H. 2019. Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their in vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains. Green Process. Synth. 8:399-407.
10. Ghavidel F., Javadi A., Anarjan N. and Jafarizadeh-Malmiri H. 2021. New approach in process intensification based on subcritical water, as green solvent, in propolis oil in water nanoemulsion preparation. Green Process. Synth. 10:208-218.
11. Hatami R., Javadi A. and Jafarizadeh-Malmiri H. 2020. Effectiveness of six different methods in green synthesis of selenium nanoparticles using propolis extract: Screening and characterization. Green Process. Synth. 9(1):685-692.
12. Irigoiti Y., Navarro A., Yamul D., Libonatti C., Tabera A. and Basualdo M. 2021. The use of propolis as a functional food ingredient: A review. Trends Food Sci Technol. 115:297-306.
13. Kunrath C.A., Savoldi D.C., Mileski J.P.F., Novello C.R., Alfaro A.D.T., Marchi J.F. and Tonial I.B. 2017. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. Braz. J. Food Technol. 20.
14. Mahdavi-Roshan M., Gheibi S. and Pourfarzad A. 2022. Effect of propolis extract as a natural preservative on quality and shelf life of marinated chicken breast (chicken Kebab). LWT. 155: 112942.

Mokhtar S.U. 2019. Comparison of total phenolic and flavonoids contents in Malaysian propolis extract with two different extraction solvents. Int. J. Eng. Sci. Technol. 6(2):1-11.

15. Moreira L., Dias L.G., Pereira J.A. and Estevinho L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food Chem. Toxicol. 46:3482-3485.

16. Oroian M., Dranca F. and Ursachi F. 2020. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. J. Food Sci. Technol. 57:70-78.
17. Pujirahayu N., Ritonga H. and Uslinawaty Z. 2014. Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. Int J Pharm Pharm Sci. 6(6):338-340.
18. Quiroga E.N., Sampietro D.A., Soberon J.R., Sgariglia M.A. and Vattuone M.A. 2006. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. J. Appl. Microbiol. 101(1) 103-110.
19. Tosic S., Stojanovic G., Mitic S., Pavlovic A. and Alagic S. 2017. Mineral composition of selected Serbian propolis samples. J Apic Sci 61(1):5.
20. Zainal W., Azian N.A., Albar S.S. and Rusli A.S. 2021. Effects of extraction method, solvent and time on the bioactive compounds and antioxidant activity of Tetrigona apicalis Malaysian propolis. J. Apic. Res.

Extraction of propolis extract and evaluation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties as a natural preservative in food

Hatami R[1], Jafarizadeh-Malmiri H[2], Javadi A[3]*, Anarjan, N[4]

1. Department of Food Science and Technology Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Mamqan, Iran
2. Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran.
3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
4. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

***Corresponding author:** *Javadi@iaut.ac.ir*

Received: 23 November 2021 Accepted: 13 March 2022

Abstract

The purpose of this research is extracting propolis using the methods of soaking in 20% and 70% ethanol and the effect of ultrasound in 20% ethanol, and evaluating its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties as a natural preservative used in the food industry. The physicochemical properties, the amount of phenolic and flavonoid compounds, the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts were measured. The results showed that most of the number of phenolic compounds (94.19 mg/g), flavonoid (89.46 mg/g) and antioxidant property by DPPH method (92.63%) in ultrasonic extracts. And the lowest number of phenolic compounds (87.85 mg/g), flavonoid (82.20 mg/g) and antioxidant property (85.87%) are in the method of soaking in 20% ethanol. Also, the results of the investigation of the antimicrobial property by the diffusion ability method from the well showed that the most sensitive bacterium was *Staphylococcus aureus* (20 mm) in front of the ultrasonic extract. Regarding the ability of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, there was no significant difference between the extracts ($p<0.05$) and none of the extracts had antibacterial power against *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The highest ability of *Candida albicans* (36 mm) was with ultrasonic extract, and in the investigation of the growth of *Aspergillus niger* after spraying for 8 days, the lowest growth rate was obtained with ultrasonic extract (9 mm) and then 70% ethanol extract (10 mm). Based on this, the amount of phenolic, flavonoid, antioxidant and antimicrobial compounds was 70% more than the 20% ethanol extract, and in the ultrasound, method based on Hurdel technology, a large number of active compounds were found in the 20% ethanol solvent in a short period of time.

Keywords: physicochemical properties, ethanolic extract, antioxidant activities, antimicrobial, natural preservative.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.