

(مقاله پژوهشی)

## بررسی خصوصیات ضد اکسایشی و ضد میکروبی عصاره آبی پوست انار در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی

پروین شرایعی<sup>\*</sup>، الهام آذرپژوه<sup>۱</sup>

۱-استادیار پژوهش بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۰۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۰۳

### چکیده

پژوهش حاضر با هدف استفاده بهینه از پوست انار به عنوان پسماند کشاورزی و کارخانه‌های تولید آب انار و بررسی خواص ضد اکسایشی و ضد میکروبی آن انجام پذیرفت. بدین منظور، پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده سویا در حضور مقادیر مختلف عصاره آبی پوست انار (استخراج شده با کمک فرآیند فراصوت؛ ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد) در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی-بوتیل‌تولون (۰/۰۱ درصد) طی ۲۸۰ ساعت آزمون گرمخانه‌گذاری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس مورد پایش قرار گرفت. هم‌چنین خواص ضد میکروبی عصاره آبی پوست انار در غلظت ۰/۱ و ۰/۳ درصد در مقایسه با نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (با غلظت ۰/۱ درصد)، بر بازدارندگی از رشد کپک آسپرژیلوس نایجر و باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکولی در شرایط آزمایشگاهی و غذایی (کیک روغنی) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد پایداری اکسایشی بر مبنای عدد پراکسید روغن تخلیص شده سویا (نمونه شاهد)، ۰/۴ درصد بود، که در حضور مقادیر مختلف عصاره آبی پوست انار و آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی‌بوتیل‌تولون به ترتیب از ۰/۹۶ تا ۸/۲۱ درصد و تا ۸/۳۳ درصد افزایش یافت. هم‌چنین، نتایج نشان داد که تمامی غلظت‌های عصاره آبی دارای فعالیت ضد میکروبی بودند، اما تاثیر عصاره بر میکروارگانیسم‌های مختلف یکسان نبود؛ به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره برای اشرشیاکولی (حدود ۱۹ میلی‌متر) و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (حدود ۱۲ میلی‌متر) بدست آمد. هم‌چنین عصاره آبی پوست انار باعث کنترل رشد کپک و مخمر در محصول کیک روغنی طی مدت نگهداری شد و اثر ضدقارچی آن در غلظت ۳ درصد تقریباً معادل اثر نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم بود.

**واژه‌های کلیدی:** ترکیبات فنلی، ضد قارچ، عصاره آبی پوست انار، کیک روغنی.

## ۱- مقدمه

امروزه محدوده وسیعی از افزودنی‌ها با اهداف گوناگون در تهیه فرآورده‌های غذایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت این افزودنی‌ها به حدی است که بدون بهره‌گیری از آنها، تولید و مصرف بسیاری از فرآورده‌های غذایی تقریباً غیرممکن می‌شود. یکی از مهم‌ترین افزودنی‌های غذایی، ترکیبات ضداکسایشی و ضد میکروبی سنتزی می‌باشند که نقش مهمی در طولانی شدن عمر نگهداری مواد غذایی و کاهش ضایعات دارند (۴۳). اکسایش لیپیدی از جمله مشکلات بزرگ در استفاده از روغن‌ها و چربی‌های خوراکی است که باعث تولید مواد مضر در آنها می‌شود و سلامت انسان را به خطر می‌اندازد (۳۸). تاکنون تلاش زیادی برای کاهش میزان واکنش‌های اکسایشی صورت پذیرفته و روش‌های مختلفی به منظور پایدارسازی روغن‌های خوراکی پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به اختلاط روغن‌های چند غیراشباع با انواع اشباع یا تک غیر اشباع، هیدروژنه کردن روغن‌های غیراشباع، اصلاح ژنتیکی ساختار اسید چرب و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد (۴۳). اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله روش‌های رایج برای بهبود پایداری روغن‌های خوراکی است. در حال حاضر، آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مجاز در فرآورده‌های غذایی شامل هیدروکسی-تولون بوتیل، هیدروکسی‌آیزول بوتیل، پروپیل گالات و ترسیوبوتیل هیدروکینون می‌باشند (۴۵). نگرانی ناشی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به لحاظ مسایل مربوط به سلامت و ایمنی و نیز محدودیت در حدود مجاز مصرف، مصرف کنندگان مواد غذایی را به استفاده از فرآورده‌های طبیعی در مواد غذایی ترغیب نموده است (۳۶). هم‌چنین، کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها نیز یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری مواد غذایی است. فرآورده‌های شیرینی و قنادی بخش مهمی از تولیدات غذایی کشور را تشکیل می‌دهند که به صورت صنعتی و صنفی تولید و عرضه می‌گردند. رشد کپک و مخمر، یکی از مهم‌ترین مشکلات صنعت تولید

محصولات پخت (نظیر کیک) می‌باشد که سبب کاهش عمر مفید این دسته از مواد غذایی می‌شود (۳۷). با توجه به مصرف زیاد این فرآورده‌ها، لازم است که کنترل‌های میکروبی هم از نظر بهداشتی و هم از نظر صنعتی به منظور بالا بردن زمان ماندگاری و حفظ کیفیت فرآورده بکار برده شود. سوربات پتاسیم از جمله موادی نگهدارنده‌ای است که سبب جلوگیری از فساد میکروبی در مواد غذایی و افزایش عمر انبارمانی می‌گردد. این ماده به عنوان نگهدارنده در نان و سایر محصولات نانویی، لبنیات، مرباها و شربت‌ها، ترشی‌ها، آب‌میوه‌ها، و میوه‌های خشک قابل استفاده است (۳۲). از آنجایی که استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله سوربات پتاسیم، بنزوات و پروپیونات و غیره به علت مسمومیت، آسیب کبدی، سرطان‌زایی و به مخاطره انداختن سلامتی محدود گشته است، صنایع تولید کیک و کلوچه، به دنبال استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی و بی‌ضرر (همانند عصاره‌های گیاهی) می‌باشند، که ضمن حفظ کیفیت و خواص حسی، باعث افزایش زمان ماندگاری و بهبود سلامتی جامعه نیز گردد. افزودنی‌های طبیعی از بافت‌های مختلف گیاهی و حیوانی استخراج می‌شوند که میزان ترکیبات فعال آنها بسته به نوع منبع متفاوت است. رایج‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شامل ترکیبات فنلی می‌باشند (۱۹). پوست انار، منبعی سرشار و غنی از ترکیبات پلی‌فنلی، تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فلاونوئیدی است (۲۶، ۲۷ و ۳۳) و می‌تواند یکی از منابع با ارزش برای تولید افزودنی‌های طبیعی باشد. انار با نام علمی *punica granatum* از خانواده پونیکاسه، بومی مناطق نیمه گرمسیری ایران می‌باشد. میزان تولید انار در ایران در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۳، ۱۰۸۶۶۲۹۸ تن و سطح زیرکشت آن ۸۳۹۳۳/۱ هکتار برآورد شده است (۲)، بنابراین می‌توان تخمین زد که سالیانه در حدود ۸۰۳۳۲۰/۴۳ تن پوست انار به صورت ضایعات تولید و دور ریخته می‌شود (پوست انار تقریباً ۳۰ تا ۴۰ درصد وزن کل میوه را شامل می‌شود). این امر از سویی باعث هدر رفتن سرمایه‌های ملی شده و از سوی دیگر دفع آن

های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ پی پی ام را با آنتی اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل آنیزول مورد مقایسه قرار داده و گزارش نمودند که عصاره متانولی پوست انار دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل آنیزول است (۳۳). یثوبی<sup>۶</sup> و همکاران (۲۰۱۰)، نیز گزارش نمودند که عصاره استخراج شده با حلال استون در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ درصد، خواص آنتی اکسیدانی به مراتب بالاتری نسبت به آنتی اکسیدان‌های سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن و هیدروکسی آنیزول تولوئن دارند (۴۶). بر طبق بررسی‌های به عمل آمده، مشخص شده است که در اکثر تحقیقات انجام شده عصاره پوست انار با استفاده از حلال‌های آلی استخراج شده است؛ که این امر استفاده از عصاره حاصله را در مواد غذایی به دلیل کاهش ایمنی، محدود می‌نماید. بنابراین با توجه به این امر و هم چنین با توجه به اهمیت استفاده بهینه از پسماند محصولات کشاورزی و کارخانه‌های صنایع غذایی (کارخانه‌های تولید آب انار)، پژوهش حاضر با اهداف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده سویا در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن و بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی در غلظت‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و غذایی (کیک روغنی) در مقایسه با نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم انجام پذیرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

پوست انار (رقم ملس) از کارخانه تولید آب میوه انار واقع در شهر مشهد (کارخانه شهد ایران) تهیه و پس از جداسازی ضایعات در فیلم بسته‌بندی پلی اتیلن با دانسیته پایین با ضخامت ۱۴۰ میکرون بسته‌بندی گردیدند. بسته‌ها در دمای ۱۸- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایشات بعدی نگهداری شدند.

نیز باعث ایجاد مشکلات زیست محیطی خواهد شد؛ در حالی که در دنیای امروز توجه ویژه‌ای به استفاده بهینه از ضایعات گیاهی و استخراج ترکیبات زیست فعال (مانند ترکیبات ضد اکسایشی و ضد میکروبی) از آن‌ها می‌شود (۳۶). نظیری و همکاران (۱۳۹۱)، اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی پوست انار ترش و انار شیرین را در مقایسه با محلول آبی آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و کلرامفنیکل، با روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک و رقیق‌سازی متوالی بر روی ده باکتری بیماری‌زای جدا شده از دام مورد بررسی قرار دادند. بیشترین قطر هاله مهار رشد باکتری توسط عصاره‌های گیاهی برای استافیلوکوکوس اورئوس حدود ۲۵ میلی‌متر و کم‌ترین قطر هاله مهار رشد برای پاستورلا مولتوسیدا<sup>۱</sup> حدود ۹ میلی‌متر به دست آمد. کم‌ترین غلظت مهار کننده رشد باکتری و حداقل غلظت کشنده باکتری عصاره‌های گیاهی فوق برای استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۷/۸ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید (۱۰). ابراهیم<sup>۲</sup> (۲۰۱۰)، فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و اتانولی پوست انار را بر علیه رشد استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکولی، اسپرژیلوس نیجر و ساکارومایسز سرویزیه و خواص آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی آن را بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان بررسی نمود. نتایج این تحقیق مشخص نمود که فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره متانولی پوست انار بالاتر از عصاره اتانولی می‌باشد (۲۲). اقبال<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۸) و کانات<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۰)، نیز گزارش نمودند عصاره متانولی پوست انار می‌تواند به ترتیب باعث پایداری روغن آفتابگردان و روغن ماهی شود (۲۳، ۲۴). نگی و جایپراشکا<sup>۵</sup> (۲۰۰۳)، خواص ضد اکسایشی عصاره متانولی، استونی و اتیل استاتی پوست انار (استخراج شده به روش ماسراسیون) را در غلظت

- 1- Pasteurella Multicida
- 2- Ibrahium
- 3- Iqbal
- 4- Kanatt
- 5- Negi and Jayaprakasha

۲-۳- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد میکروب ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره آبی پوست انار، با روش حداقل غلظت بازدارندگی تعیین شد (۴۱). برای تعیین خواص ضدباکتریایی از دو باکتری استفیلوکوکوس اورئوس با شماره ATCC2۵۹۲۳ به عنوان گرم مثبت و اشرشیاکولی O157:H7 با شماره ATCC1۰۵۳۶ به عنوان گرم منفی و برای تعیین خواص ضدقارچی از کپک اسپرژیلوس نایجر با شماره ATCC1۶۴۰۴ استفاده شد. میزان قطرهاؤه عدم رشد باکتری‌ها و کپک با روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک تعیین گردید (۲۹).

#### ۲-۴- تخلیص روغن سویا

تخلیص روغن سویا با استفاده از کروماتوگرافی ستونی چندلایه‌ای (آلومینا-سیلیکاژل) به همراه اصلاحاتی در روش Belhaj و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت (۱۵). برای اطمینان از حذف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، روغن دوبار از ستون پر شده با آلومینا و سیلیکاژل عبور داده شد و مقادیر ترکیبات پلی‌فنلی کل و عدد پراکسید بعد از هر مرحله تخلیص اندازه‌گیری شد.

#### ۲-۵- آزمون گرمخانه‌گذاری

مقدار ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد از عصاره آبی پوست انار و نیز ۰/۱ درصد از آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی‌بوتیل‌تولون به روغن تخلیص شده سویا اضافه شد (هر مخلوط در دو تکرار تهیه شد). ۱۰ گرم از مخلوط‌های فوق در ظرفی به قطر ۶ میلی‌متر و ارتفاع ۹۰ میلی‌متر اضافه و در اینکوباتور با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. نمونه‌برداری از مخلوط روغن‌ها، در ابتدای گرمخانه‌گذاری و در فواصل زمانی معین طی فرآیند اکسایش تسریع یافته انجام شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمون عدد پراکسید در فریزر (دمای ۱۸- درجه سلسیوس) نگهداری شدند (۵).

معرف فولین سیوکالچو،<sup>۱</sup> TPTZ،<sup>۲</sup> DPPH، متانول، کربنات-سدیم، سولفات آهن II، کلرید آهن III شش‌آبه، استات سدیم سه‌آبه، پتاسیم کلراید، اسید کلریدریک غلیظ و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت‌های مرک، سیگما-آلدریج، شارلو و کالدون با درجه تجزیه‌ای<sup>۳</sup> خریداری شدند.

#### ۲-۲- فرآیند استخراج ترکیبات موثر پوست انار

استخراج ترکیبات موثر با استفاده از حلال آب و با کمک فرآیند فراصوت انجام شد. بدین منظور، ابتدا پوست انار به نسبت ۱ به ۴ وزنی حجمی با آب مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با شدت ۶۰ درصد صوت‌دهی گردید (۵). برای اعمال امواج فراصوت از دستگاه فراصوت ساخت شرکت هلشر آلمان مدل یویی ۴۰۰ اس<sup>۴</sup> با قدرت ۴۰۰ وات و پروب از نوع H7 از جنس تیتانیوم با قطر ۷ میلی‌متر و طول ۱۰۰ میلی‌متر، استفاده شد. سپس عملیات استخراج عصاره با هم زدن شدید به مدت ۴۸ ساعت در محیط تاریک ادامه یافت. محلول تحت خلاء صاف گردید و با تبخیر کننده دوار تحت خلاء (مدل Laborota 4000 efficient، ساخت کشور آلمان) تحت دمای ۴۵ درجه سلسیوس تا حد آبگیری کامل تغلیظ گردید (۶). جهت جلوگیری از کف کردن و همچنین جهت رسیدن به دمای مناسب برای ورود به خشک‌کن انجمادی، محلول تغلیظ شده به مدت ۱۹ ساعت در فریزر با دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری و سپس به خشک‌کن انجمادی (مدل Operon 550-FDB، ساخت کشور کره) منتقل شد. نمونه‌ها در خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجه سلسیوس با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی ۲۰ ساعت خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی، در تاریکی و دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

1- 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-s-triazine

2- 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

3- Analytical grade

4- Heilscher, Germany – UP400S

## ۲-۶- ساختار اسید چربی

ترکیب اسید چربی نمونه روغن به وسیله کروماتوگرافی گزماغ تعیین شد و بر اساس درصد نسبی سطوح گزارش شد. استرهای متیل اسیدهای چرب با اختلاط روغن و هگزان (۰/۳ گرم در ۷ میلی لیتر) با هفت میلی لیتر هیدروکسید پتاسیم متانولی دو نرمال دردمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه تهیه شدند. استرهای اسیدهای چرب با کروماتوگراف (Hewlett-Packard, HP-5890 CA, USA) مجهز به ستونهای موبینه CP-FIL88 شیشه‌ای سیلیکا (۶۰ متر طول، ۰/۲۲ میلی متر قطر داخلی، ۰/۲ میکرومتر ضخامت لایه داخلی) و آشکارساز یونی شعله‌ای شناسایی گردیدند. گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. دمای آون، بخش تزریق و آشکارساز به ترتیب ۱۹۸، ۲۸۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس بود. آزمایشها در دو تکرار انجام شدند (۲۱).

## ۲-۷- اندازه گیری عدد پراکسید

یک دهم تا ۰/۲ گرم نمونه روغن، بسته به میزان اکسایش آن، در لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی لیتری وزن شد و با ۹/۸ میلی لیتر حلال کلروفرم: متانل (به نسبت ۳:۷) مخلوط و به مدت ۲ تا ۴ ثانیه هم زده شد. عدد پراکسید از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$PV = \frac{(As - Ab) \times m}{55.84 \times W \times 2} \quad (\text{رابطه ۱})$$

که As، جذب نمونه و Ab جذب شاهد در طول موج ۵۰۰ نانومتر است. m شیب به دست آمده از منحنی کالیبراسیون است (۴۰/۸۶ با ضریب تبیین ۰/۹۹) و W وزن نمونه روغن است (۴۰).

## ۲-۸- روش تهیه خمیر و پخت کیک روغنی (یزدی)

کیک روغنی به روش نقی پور (۱۳۹۱) تهیه و پخت شد (۱۱). سوربات پتاسیم به عنوان نگهدارنده شیمیایی ضد میکروبی در سطح ۰/۱ درصد و همچنین عصاره بهینه استخراج شده انار در غلظت‌های ۰/۳ و ۱ درصد به مخلوط اضافه شدند (مقادیر بر

اساس آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی رشد کپک با استفاده از روش انتشار دیسک انتخاب شدند). پس از اتمام عمل پخت و خروج سینی‌ها از درون فر، کیک‌های پخته شده به آزمایشگاه انتقال و اجازه داده شد در معرض هوای آزمایشگاه سرد گردند. کیک‌ها در بسته‌های پلی اتیلنی با ضخامت ۷۰ میکرون بسته‌بندی شدند و به مدت ۹ روز در شرایط محیط (دمای ۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شدند و در روز تولید (بعد از ۴ ساعت خنک شدن)، ۳ و ۹ روز پس از تولید، آزمایش اندازه‌گیری تعداد کل کپک و مخمر انجام شد.

## ۲-۹- کشت و شمارش کپک و مخمر در محصول کیک

## روغنی

آزمون میکروبی شامل شمارش کلی کپک و مخمر طبق استاندارد ۲-۱۰۸۹۹ و با استفاده از محیط کشت پوتیتودکستروز آگار<sup>۱</sup> و آماده‌سازی نمونه‌ها مطابق با استاندارد ۴-۸۹۲۳ انجام شد (۸ و ۹). پلیت‌های کشت داده شده در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت تعداد کلنی‌های تشکیل شده مورد بررسی و شمارش قرار گرفت.

## ۲-۱۰- تعیین ترکیبات فنلی

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش فولین سیوکالچو تعیین گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره (مخلوط ۱۰۰ میلی گرم عصاره خشک شده انار با ۲۰۰۰ میکرولیتر متانول) با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالچو مخلوط و به مدت ۳ دقیقه در حالت سکون قرار داده شد تا واکنش صورت گیرد. در ادامه ۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه و بعد از یک دقیقه با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در مکانی تاریک نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر در برابر شاهد قرائت شد.

1 -Potato Dextrose Agar

2 -Ciocalteu's phenol

نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت نمونه، منحنی مناسب روی داده‌ها برازش داده شد و سپس غلظتی را که در آن، نمونه قادر به مهار کردن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است تحت عنوان  $IC_{50}$  محاسبه گردید (۲۰).

### ۲-۱۳- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شدند. میانگین‌های حاصل از انجام آزمون‌ها با نرم‌افزار MStatC و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ( $p < 0.05$ ) مقایسه شدند.

### ۳-نتایج و بحث

#### ۳-۱- بررسی میزان ترکیبات فنلی و قدرت

##### آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی پوست انار

ویژگی‌های عصاره آبی استخراج شده از پوست انار در مقایسه با آلفا-توکوفرول در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، عصاره آبی استخراج شده از پوست انار دارای مقدار قابل توجهی ترکیبات فنلی می‌باشد. به طور کلی، پوست انار دارای ترکیبات فنلی با وزن مولکولی کم و یا متوسط مانند آنتوسیانین‌ها، گالوتانین‌ها<sup>۲</sup>، هیدروکسی-سینامیک اسید<sup>۳</sup>، هیدروبنزوئیک اسید<sup>۴</sup> و یا ترکیبات فنلی با جرم مولکولی بالا همانند الایژیتانین<sup>۵</sup>، استرهای گالاژیل<sup>۶</sup> و پروآنتوسیانیدین‌ها<sup>۷</sup> می‌باشد (۲۵). نتایج تحقیقات نشان داده است پلی‌فنل‌های قابل هیدرولیز به‌خصوص الایژیتانین‌ها و ترکیبات حاصل از هیدرولیز آن از مهمترین ترکیبات فنلی موجود در پوست انار هستند (۳۹). الایژیتانین‌ها، ترکیبات فنلی حل شونده در آب با جرم مولکولی بالا هستند که به آسانی

میزان ترکیبات فنولی کل موجود در نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین شد. منحنی استاندارد با ترسیم داده‌های جذب اسید گالیک در طول موج ۷۶۵ نانومتر در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۹۵۰ پی‌پی‌ام بدست آمد. نتایج بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم نمونه با استفاده از معادله برازش داده شده بر منحنی استاندارد گزارش گردید (۱۳).

#### ۲-۱۱- تعیین قدرت احیا کنندگی آهن III (FRAP)

ابتدا محلولی شامل ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه در ۲ میلی‌لیتر متانول تهیه شد و ۳۰ میکرولیتر آن با ۹۰۰ میکرولیتر محلول FRAP و ۹۰ میکرولیتر آب مقطر در لوله آزمایش مخلوط شد. لوله آزمایش بعد از ورتکس در بن‌ماری قرار گرفت و پس از رسیدن دمای آن به ۳۷ درجه سلسیوس، مقدار جذب در مقابل شاهد و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مقدار آهن II با استفاده از معادله برازش داده شده بر منحنی استاندارد (مقدار جذب محلول‌های استاندارد سولفات آهن II با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومول در لیتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر) به دست آمد (۱۶).

#### ۲-۱۲- تعیین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

ابتدا محلول ۰/۰۰۶ درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول تهیه شد. سپس به لوله‌های آزمایش دارای یک میلی‌لیتر محلول متانولی نمونه با غلظت‌های مختلف (بسته به قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد)، یک میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه شد. لوله‌های آزمایش بعد از هم‌زدن به مدت یک ساعت در جای تاریک نگهداری شدند و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۲ نانومتر در برابر شاهد قرائت گردید. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

$$A\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

که در آن: A% درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH،  $A_c$  جذب شاهد و  $A_s$  جذب نمونه است. پس از ترسیم

- 2- gallotannins
- 3 -hydroxycinnamic acids
- 4 -hydroxybenzoic acids
- 5- ellagitannins
- 6 -gallagyl esters
- 7 -proanthocyanidins

است. به طور کلی، قابلیت نسبی ترکیبات فنلی عصاره پوست انار برای عمل کردن به عنوان آنتی اکسیدان، به تعداد و قرارگیری گروه‌های هیدروکسیل آن مربوط است. این گروه‌ها، مانند گروه‌های هیدروکسیل موجود در کاتکول<sup>۳</sup>، با قابلیت گیرندگی آهن و فلزات واسطه از انتشار رادیکال‌های آزاد حاصل از واکنش اکسایش جلوگیری بعمل می‌آورند (۳۵ و ۴۴).

هیدرولیز می‌شوند و فرآورده‌های جانبی متفاوتی مانند الایژیک اسید، پونیکالاین<sup>۱</sup> و گالاژیک<sup>۲</sup> اسید را تولید می‌کنند. الایژیک اسید، ترکیب فنلی مونومری با ساختاری نسبتاً پایدار می‌باشد که قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارد (۳۴).  
هم چنین از جدول ۱ مشاهده می‌شود، عصاره آبی پوست انار دارای فعالیت آنتی اکسیدانی به مراتب بالاتر از توکوفرول

جدول ۱- میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره آبی انار در مقایسه با عصاره متانولی- آبی آلفا- توکوفرول

جزء اندازه گیری شده	عصاره آبی	آلفا- توکوفرول
ترکیبات فنلی کل (میلی گرم بر گرم)	۶۰/۸۹ ± ۱/۸۴	-
قدرت احیاء کنندگی آهن سه ظرفیتی (میکرومول آهن II بر لیتر)	۱۴۳۰/۲۹ ± ۱۱/۶۰ <sup>a</sup>	۱۰۴/۵۴ ± ۲/۶۴ <sup>b</sup>
قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (درصد)	۷۸/۷۸ ± ۱/۸۷ <sup>a</sup>	۲۵/۴۸ ± ۰/۹۵ <sup>b</sup>
IC <sub>50</sub> (میلی گرم بر میلی لیتر)	۰/۴۲ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۳۱/۵۰ ± ۱/۴۵ <sup>a</sup>

\* اعداد (± انحراف استاندارد)، میانگین ۳ تکرار است. ارقام دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (P < ۰/۰۵).

### ۲-۳- بررسی تاثیر عصاره آبی پوست انار بر پایداری اکسایشی روغن سویا

کیفیت و ساختار اسید چرب روغن تصفیه شده سویا بدون آنتی اکسیدان (روغن مورد مطالعه) در جدول ۲ آورده شده است. اسیدهای چرب اشباع عمده روغن سویا، اسید پالمیتیک و پس از آن اسید استئاریک بودند. مقدار اسیدهای چرب تک

غیر اشباع و چند غیر اشباع روغن سویا به ترتیب ۲۴/۳۱ و ۵۷/۴۰ درصد بود. نسبت اسیدهای چرب چند غیر اشباع به اشباع ۲/۳۶ درصد بود؛ این نسبت معمولاً به عنوان معیاری از سیرناشدگی لیپیدها و نیز تمایل آن‌ها به خود اکسایش لیپیدی در نظر گرفته می‌شود (۳۱). اعداد پراکسید و اسیدی

جدول ۲- ساختار اسید چرب روغن تخلیص شده سویا

روغن تخلیص شده سویا	کمیت اندازه گیری شده
۰/۱۱ ± ۰/۰۱	اسید میریستیک (C۱۴:۰)
۱۱/۱۰ ± ۰/۰۴	اسید پالمیتیک (C۱۶:۰)
۰/۱۵ ± ۰/۰۱	اسید پالمیتولئیک (C۱۶:۱)
۵/۶۰ ± ۰/۰۶	اسید استئاریک (C۱۸:۰)
۲۴/۰۱ ± ۰/۰۴	اسید اولئیک (C۱۸:۱)
۴۹/۸۵ ± ۰/۰۶	اسید لینولئیک (C۱۸:۲)
۷/۵۵ ± ۰/۰۲	اسید لینولنیک (C۱۸:۳)
۰/۶۵ ± ۰/۰۴	اسید آراشیدیک (C۲۰:۰)
۰/۱۵ ± ۰/۰۴	اسید گادولئیک (C۲۰:۱)
۰/۴۵ ± ۰/۰۱	اسید بهینیک (C۲۲:۰)
۱۷/۹۲ ± ۰/۰۹	اسید چرب اشباع (SFA)
۲۴/۳۱ ± ۰/۱۱	اسید چرب چند تک اشباع (MUFA)
۵۷/۴۰ ± ۰/۱۲	اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA)
۲/۳۶ ± ۰/۰۳	نسبت USFA/SFA
۲/۲۵ ± ۰/۶۶	عدد پراکسید (میلی‌اکی‌والان‌گرم اکسیژن بر کیلوگرم)
۰/۸۵ ± ۰/۰۳	اسیدهای چرب آزاد (میلی‌گرم هیدروکسید پتاسیم بر گرم)

\* اعداد (±) انحراف استاندارد.

اولیه مواد لیپیدی به کار برده می‌شوند (۲۸). حد مجاز اعداد پراکسید و اسیدی برای روغن‌های تصفیه شده به ترتیب ۱۰ میلی‌اکی‌والان‌گرم بر کیلوگرم و ۰/۶ میلی‌گرم بر گرم و برای روغن‌های استخراج شده به روش پرس سرد یا روغن‌های بکر به ترتیب ۱۵ میلی‌اکی‌والان‌گرم بر کیلوگرم و ۰/۴ میلی‌گرم بر گرم تعیین شده‌است (۱۸).

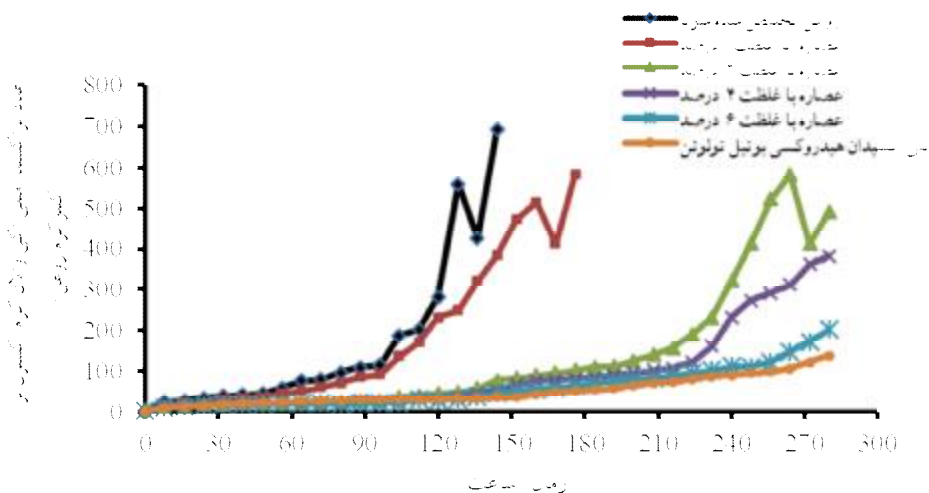
روغن مورد مطالعه، به ترتیب ۲/۲۵ میلی‌اکی‌والان‌گرم اکسیژن بر کیلوگرم روغن و ۰/۸۵ میلی‌گرم پتاس بر گرم بود؛ که نشان دهنده کیفیت مناسب و غیراکسایشی روغن مورد مطالعه بود. اعداد پراکسید و اسیدی به ترتیب نمادهای میزان کل ترکیبات هیدروپراکسیدی و تندی ناشی از هیدرولیز روغن‌ها و چربی‌های خوراکی بوده، به منظور ارزیابی کیفیت



### ۳-۳-آزمون گرمخانه گذاری

تغییرات عدد پراکسید روغن تخلیص شده سویا تحت تاثیر افزودن ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره آبی پوست انار (استخراج

شده در شرایط بهینه) و نیز ۰/۰۱ درصد آنتی اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن طی ۲۸۰ ساعت آزمون گرمخانه-گذاری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در شکل ۱ آورده شده است.

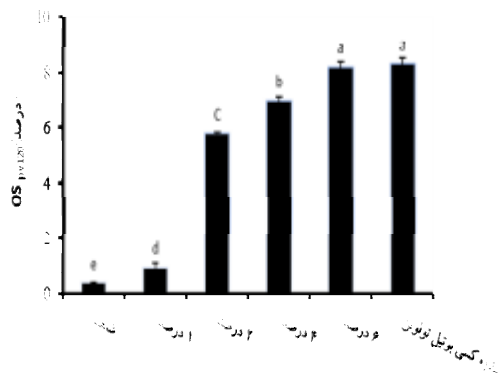


شکل ۱- منحنی‌های سینتیکی تولید هیدروپراکسید طی اکسایش روغن تخلیص شده سویا در حضور ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره آبی پوست انار (استخراج شده در شرایط بهینه) و در حضور ۰/۰۱ درصد آنتی اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن در ۵۰ درجه سلسیوس در تاریکی. تمام منحنی‌های سینتیکی حاصل میانگین سه آزمایش مستقل می‌باشند.

میزان اولیه عدد پراکسید روغن تخلیص شده سویا و روغن سویا حامل درصدهای مختلف عصاره آبی پوست انار از ۲/۲ تا ۲/۸۶ میلی‌اکی‌والان گرم بر کیلوگرم متغیر بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت (آزمون دانکن،  $P < 0/05$ ). همانطور که از شکل ۱ مشاهده می‌شود، عدد پراکسید روغن تخلیص شده سویا (نمونه شاهد)، طی اکسایش روندی افزایشی داشت که پس از رسیدن به حداکثر مقدار خود (پس از ۱۲۸ ساعت) کاهش یافت. روند مشابهی در مورد تیمارهای حاوی ۱ و ۲ درصد عصاره آبی پوست انار پس گذشت به ترتیب ۱۶۰ و ۱۷۲ ساعت مشاهده شد؛ اما روند تغییرات عدد پراکسید سایر تیمارها تا پایان ۲۸۰ ساعت افزایشی بود و شکستی در منحنی پراکسید آنها مشاهده نشد. هیدروپراکسیدها محصولات اولیه اکسایش لیپیدها هستند و

مقدار آنها طی اکسایش لیپیدی افزایش و سپس کاهش می‌یابد (۲۰). تغییرات عدد پراکسید نمونه‌های روغن در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طی زمان ۱۲۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و درصد معکوس تغییرات عدد پراکسید ( $\frac{PV_{t_1}}{PV_{t_2}}$ ) به عنوان شاخص پایداری اکسایشی بر مبنای پراکسید (OSP<sub>PV</sub>)<sup>۱</sup> در نمونه‌های مختلف در نظر گرفته شد. شایان ذکر است تغییرات پراکسید نمونه‌ها صرفاً در مرحله انتشار مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. پایداری اکسایشی بر مبنای پراکسید روغن تخلیص شده سویا تحت تاثیر افزودن ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره آبی پوست انار و نیز ۰/۰۱ درصد هیدروکسی بوتیل تولوئن طی آزمون گرمخانه‌گذاری (دمای ۵۰ درجه سلسیوس) در مدت ۱۲۰ ساعت در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که از شکل ۲ مشاهده می‌شود،

پایداری اکسایشی روغن سویا خالص در حضور عصاره آبی پوست انار افزایش یافت.



شکل ۲- اثر افزودن ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره آبی پوست انار (استخراج شده در شرایط بهینه) و ۰/۰۱ درصد آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن بر معکوس تغییرات عدد پراکسید (OS<sub>PV</sub>) روغن تخلیص شده سویا پس از ۱۲۰ ساعت نگهداری در ۵۰ درجه سلسیوس. ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P < 0/05$ ). تیرک‌های ترسیم شده در انتهای هر ستون نشان دهنده انحراف استاندارد داده‌های اندازه‌گیری شده است.

همانطور که از شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، تمامی غلظت‌های عصاره آبی پوست انار حائز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی پوست انار با غلظت ۶ درصد (۸/۳۱ درصد)، تقریباً معادل قدرت آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن (۸/۳۳ درصد) بود. این پدیده، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنلی در عصاره آبی پوست انار و خواص آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات می‌باشد. به طور کلی، ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که به خاطر داشتن عوامل احیاء کننده، قدرت هیدروژن دهنده، فرونشاندن اکسیژن یگانه و گیرندگی فلزات سنگین، سبب شکستن واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایش شده، به این ترتیب اسیدهای چرب چند غیر اشباع و روغن‌های حاوی این اسیدهای چرب را در برابر اکسایش حفظ می‌نمایند. از طرفی،

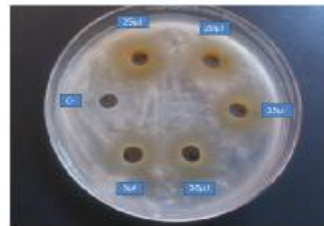
اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی در روغن‌ها به غلظت این ترکیبات، دما، محتوای اسیدچرب و فیزیکی روغن بستگی دارد (۱۳). ابراهیم (۲۰۱۰) و اقبال و همکاران (۲۰۰۸)، نیز نشان دادند عصاره متانولی پوست انار می‌تواند باعث پایداری روغن آفتابگردان شود (۲۲ و ۲۳). کانان و همکاران (۲۰۱۰)، نیز گزارش نمودند که عصاره متانولی پوست انار باعث پایداری روغن ماهی می‌شود (۲۴). نگئی و جایا پراشکا (۲۰۰۳)، نیز گزارش نمودند که عصاره متانولی پوست انار دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل آنیزول است (۳۳). یعقوبی و همکاران (۲۰۱۰)، نیز گزارش نمودند که عصاره استخراج شده با حلال استون، خواص آنتی‌اکسیدانی به مراتب بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی هیدروکسی بوتیل-تولوئن و هیدروکسی آنیزول تولوئن دارند (۴۶). بنابر نتایج حاصل از پژوهش حاضر، عصاره آبی پوست انار استخراج شده در شرایط بهینه فراصوت‌دهی (شدت ۶۰ درصد و زمان ۵ دقیقه با قدرت ۴۰۰ وات)، نیز دارای ترکیبات موثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و قادر است در پایداری روغن سویا مورد استفاده قرار گیرد.

### ۳-۳- بررسی تاثیر عصاره آبی پوست انار بر بازدارندگی از میکروارگانسیم‌ها

تاثیر حجم‌های مختلف (۵ تا ۲۵ میکرولیتر) از عصاره آبی پوست انار (غلظت ۰/۳ درصد) در مقایسه با نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم، بر بازدارندگی از رشد کپک آسپرژیلوس نایجر بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در ۲۵ درجه سلسیوس و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکولی بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در ۳۷ درجه سلسیوس در شکل ۳ و نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد میکروارگانسیم در جدول ۳ نشان داده شده است.



ب



الف

شکل ۳- اثر حجم‌های مختلف عصاره آبی پوست انار (غلظت ۰/۳ درصد) بر الف) رشد و مهار کپک اسپرژیلوس نایجر بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در ۲۵ درجه سلسیوس و ب) رشد و مهار اشرشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در ۳۷ درجه سلسیوس.

جدول ۳- اثر عصاره آبی پوست انار در مقایسه با نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم بر میانگین قطر هاله عدم رشد کپک اسپرژیلوس نایجر، اشرشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس

نمونه	منطقه بازداری (میلی متر)	اسپرژیلوس نایجر	اشرشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس
عصاره آبی پوست انار (۰/۱ درصد)	$13/24 \pm 0/15^b$	$14/87 \pm 0/51^b$	$11/7 \pm 0/65^c$	
عصاره آبی پوست انار (۰/۳ درصد)	$17/7 \pm 0/28^a$	$19/01 \pm 0/89^a$	$13/81 \pm 0/38^b$	
سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد)	$18/3 \pm 0/30^a$	$13/7 \pm 1/08^b$	$12/20 \pm 0/78^a$	
اتانول ۷۰ درصد (شاهد)	-	-	-	-

ارقام دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ( $P < 0/05$ ). خط تیره به معنای عدم تشکیل هاله مهار رشد می‌باشد.

پدیده، به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز در اکسیداسیون اسیدچرب، مهار آنزیم‌های حاوی سولفیدریل و در نتیجه جفت نشدن فسفوریلاسیون اکسایشی، مهار کاتالاز و افزایش دهیدروژن پراکسید در سلول می‌باشد. اما بر باکتری‌ها اثر ضد میکروبی کمتری دارد (۱۷). اثر ضد میکروبی عصاره آبی پوست انار، نیز احتمالاً به دلیل ترکیبات فنلی موجود در آن است. ترکیبات فنلی نقش مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند و میزان تاثیر این ترکیبات بسته به نوع ترکیبات فنلی، غلظت ترکیبات فنلی، روش عصاره‌گیری و حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری و ... متفاوت است (۱۹). سلاح‌ورزی و همکاران (۱۳۹۰)، و ابراهیم (۲۰۱۰)، نیز گزارش نمودند، عصاره متانولی پوست انار دارای خاصیت مهارکنندگی رشد کپک اسپرژیلوس نایجر است (۴ و ۲۲). هم چنین، الایزیتان‌های موجود در پوست انار و برخی از

همانطور که از جدول ۳ مشاهده می‌شود، تمامی غلظت‌های عصاره آبی پوست انار دارای فعالیت ضد میکروبی بودند، اما تاثیر عصاره بر میکروارگانیزم‌های مختلف یکسان نبود. به طوری که تاثیر آن بر کپک و باکتری گرم منفی اشرشیا کولی به مراتب بالاتر از تاثیر آن بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. با افزایش غلظت عصاره از ۰/۱ به ۰/۳ درصد، میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیزم‌ها افزایش یافت. هم‌چنین، اثر ضد میکروبی عصاره آبی حاصله در غلظت ۰/۳ درصد بر کپک اسپرژیلوس نایجر (با قطر هاله عدم رشد ۱۷/۷ میلی‌متر) تقریباً معادل با نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (با قطر هاله عدم رشد ۱۸/۳ میلی‌متر) بود و اثر ضد باکتریایی آن (هم برای باکتری گرم مثبت و هم گرم منفی) به مراتب بالاتر از سوربات پتاسیم بود. سوربات پتاسیم، بر طیف وسیعی از کپک‌ها و مخمرها موثر است. علت این

ترکیبات پلی فنلی دیگر، فعالیت ضدباکتریایی بر تعداد زیادی از پاتوژن‌های موجود در غذا و میکروارگانیسم‌های واگیردار مانند استافیلوکوکوس اورئوس، نیز نشان داده‌اند (۴۳،۱۲) و (۴۴).

نتایج ارزیابی میکروبی کیک روغنی (تعداد کل کپک و مخمر) تحت تاثیر افزودن عصاره آبی خشک شده انجمادی (۰/۱ و ۰/۳ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع ماده افزودنی) طی ۹ روز نگهداری در شرایط محیط (دمای ۲۵ درجه سلسیوس) در جدول ۴ نشان داده شده است.

### ۳-۴- ارزیابی اثر ضد کپکی عصاره در کیک روغنی

جدول ۴- میزان رشد کپک مخمر ( $\text{Log}_{10} \text{ (cfu/g)}$ ) در کیک روغنی طی ۹ روز نگهداری در شرایط محیطی تحت تاثیر افزودن سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد)، عصاره آبی خشک شده انجمادی (۰/۱ و ۰/۳ درصد)

مدت زمان نگهداری (روز)			نمونه کیک
۹	۳	در روز اول تولید	
$1/63 \pm 0/50^a$	$1/18 \pm 0/48^a$	-	شاهد
$0/12 \pm 0/00^d$	-	-	سوربات پتاسیم ۰/۱ درصد
$1/48 \pm 0/10^b$	$1/01 \pm 0/31^b$	-	عصاره آبی خشک شده انجمادی - ۰/۱ درصد
$1/24 \pm 0/32^c$	$0/87 \pm 0/18^c$	-	عصاره آبی خشک شده انجمادی - ۰/۳ درصد

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $p < 0/05$ ).

همانطور که از جدول ۴ نیز مشاهده می‌شود، با افزایش زمان نگهداری، میزان رشد کپک و مخمر افزایش یافت؛ اما، هر دو نوع افزودنی طبیعی و سنتزی سبب کاهش میزان رشد کپک و مخمر در نمونه‌های تولیدی نسبت به نمونه شاهد شدند. کمترین میزان رشد کپک و مخمر بعد از ۹ روز نگهداری در شرایط محیطی در نمونه حاوی ۱ درصد عصاره آبی و نمونه حاوی ۰/۱ درصد سوربات پتاسیم مشاهده شد. البته لازم به ذکر است مطابق با استاندارد ملی ایران در خصوص فرآورده‌های قنادی به شماره ۲۳۹۵، تمام نمونه‌های کیک حاوی افزودنی‌های طبیعی و سنتزی تا پایان ۹ روز نگهداری در شرایط محیطی، در محدوده قابل قبول به لحاظ بار میکروبی قرار داشتند (۷). اثر بازدارندگی از رشد کپک و مخمر توسط سوربات پتاسیم، همانطور که قبلاً نیز ذکر گردید، احتمالاً به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز، سولفیدریل اکسیداز و کاتالاز در سلول میکروبی می‌باشد (۱۷). حیدری‌نیا و همکاران (۱۳۸۵)، نیز تحقیقاتی در رابطه با اثر نگهدارندگی

بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم در مواد غذایی بر آسپیرژیلوس نایجر انجام داده و گزارش نمودند که سوربات پتاسیم باعث مهار رشد آسپیرژیلوس می‌گردد (۳). مارین<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۲)، تاثیرات نگهدارنده‌های بر پایه اسیدضعیف (سوربات پتاسیم، بنزوات سدیم، پروپیونات کلسیم) را در انواع فرآورده‌های قنادی بر محافظت از فساد آسپیرژیلوس نایجر و آسپیرژیلوس فلاووس بررسی و گزارش نمودند که سوربات پتاسیم با غلظت ۰/۳ درصد به طور چشم‌گیری مانع از رشد و فساد قارچی در این نوع محصولات می‌شود (۳۰). افشاریان طرهبه و همکاران (۱۳۹۵) نیز گزارش نمودند که سوربات پتاسیم در غلظت ۰/۱ درصد باعث مهار رشد کپک و مخمر در کیک روغنی می‌شود (۱). محافظت از رشد کپک و مخمر توسط عصاره پوست انار، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنلی می‌باشد. مشخص شده است ترکیبات فنلی با دارابودن خواص ضد میکروبی به لیسیدهای غشاء سلولی و میتوکندری وارد

۲. آمارنامه کشاورزی. ۱۳۹۴. انتشارات وزارت کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و پشتیبانی، اداره کل آمار و اطلاعات.
۳. حیدری نیا، آ.، کلانتر، ح.، افروی، آ.، سدادی، آ. ۱۳۸۵. اثرات حفاظت غلظت‌های مختلف سدیم بنزوات، پتاسیم سوربات بر رشد اسپرژیلوس نایجر، نهمین کنگره ملی تغذیه، دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز.
۴. سلاح ورزی، و.، تهرانی فر، ع.، جهانبخش مشهدی، و. ۱۳۸۹. مکانیسم کنترل قارچ‌های پس از برداشت توسط عصاره قسمت‌های مختلف انار. اولین همایش ملی کشاورزی پایدار و تولید محصول.
۵. شرایعی، پ. ۱۳۹۶. بررسی اثر امواج فراصوت و ریزپوشانی بر خواص ضد اکسایشی و ضد قارچی عصاره پوست انار در سیستم مدل و غذایی. گزارش پروژه پژوهشی. ۹۶/۴۵۷.
۶. فرهوش، ر. ۱۳۸۲. استخراج، تخلیص و شناسایی فراکسیون عمده آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه نوروزک و بررسی خصوصیات آن. پایان نامه دکتری. دانشگاه فردوسی مشهد.
۷. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۳. ویژگی‌های میکروبیولوژیک در فرآورده‌های شیرینی و قنادی. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۳۹۵.
۸. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۵. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایشه - سوسپانسیون اولیه ورق‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی - قسمت چهارم: مقررات ویژه برای آماده‌سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آن‌ها. استاندارد ملی ایران شماره ۴ - ۸۹۲۳.

شوند و ضمن تغییر شکل سلولی و ایجاد نفوذ پذیری بیشتر آنها، باعث خروج یون و دیگر محتویات سلولی می‌گردند. اگرچه خروج مقادیر مشخصی از مواد داخل باکتری، می‌تواند برای سلول قابل تحمل باشد، ولی خروج مقادیر زیاد محتویات سلولی با خروج مولکول‌ها و یون‌های حیاتی سبب مرگ سلول می‌شود (۳۴).

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج نشان داد تمامی غلظت‌های عصاره آبی پوست انار، حائز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی پوست انار با غلظت ۶ درصد تقریباً معادل قدرت آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن بود. هم‌چنین، نتایج نشان داد عصاره آبی حاصله دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی بوده و رشد کپک و مخمر رادر محصول غذایی کیک روغنی کنترل نمود. به طوریکه میزان رشد کپک و مخمر در نمونه کیک حاوی ۱ درصد عصاره آبی بعد از ۹ روز نگهداری در شرایط محیطی بسیار کم و معادل اثر نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم بود. بنابراین، پوست انار با توجه به دارا بودن مقادیر مناسبی ترکیبات فنلی، می‌تواند به عنوان منبعی برای تولید ترکیبات ضد اکسایشی و ضد میکروبی طبیعی و ارزان قیمت مورد استفاده قرار گیرد تا علاوه بر کاهش ضایعات محصولات کشاورزی باعث ایجاد ارزش افزوده و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی نیز گردد.

#### ۵- منابع

۱. افشاریان طرقله، س.، شیخ الاسلامی، ز.، عطایی صالحی، ا. ۱۳۹۵. تاثیر اسانس پوست پرتقال به عنوان نگهدارنده طبیعی بر خصوصیات رئولوژیک، حسی و میکروبی کیک روغنی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۵۰، دوره ۱۳. ۱۴۳-۱۳۳.

- FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.
17. Buazzi, M.M., and Marth, E. H. 1991. Mechanism in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. *Food Microbiol*, 8: 249-56.
  18. CX-STAN 210. 1999. Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius, 8:11-25. Frankel, E.N. 1998. Lipid Oxidation. The Oily Press LTD.
  19. Das, K., Tiwari, R. K. S., and Shrivastava, D. K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2): 104-111.
  20. Ersus, S. and Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80:805-812
  21. Farhoosh, R., Tavakkoli, J., and Hadad Khodaparast, M.H. 2008. Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85: 723-729.
  22. Ibrahim .M.I. 2010. Efficiency of Pomegranate Peel Extract as Antimicrobial, Antioxidant and Protective Agents. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6 (4): 338-344.
  23. Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., and Akbar, J. 2008. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Research International*, 41: 194-200.
  24. Kanatt, S. R., Chander, R., and Sharma, A. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 216-222
  25. Kumari, A., Dora, J., Kumar, A., and Kumar, A. 2012. Pomegranate (*Punica granatum*) –overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1:1218-1222.
  ۹. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۷. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کپکها و مخمرها، قسمت دوم: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی ( $a_w$ ) مساوی یا کم‌تر از ۰/۹۵. استاندارد ملی ایران، شماره ۲، ۹۹-۱۰۸
  ۱۰. نظیری، ز.، رجاییان، ح.، فیروزی، ر. ۱۳۹۱. اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های پوست انار ترش و شیرین (پونیکا گراناتوم) بومی ایران بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا. تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز). جلد ۴۱، شماره ۱۳، ۲۸۸-۲۸۲.
  ۱۱. نقی‌پور، ف.، حبیبی نجفی، م. ح.، کریمی، م.، حداد خداپرست، م. ح. شیخ الاسلامی، ز. ۱۳۹۱. بررسی امکان تولیدکیک بدون گلوتن با استفاده سورگوم، شیر سویا و صمغ زانتان. رساله دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی.
  12. Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., and Aguilar, C. N. 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 189-199.
  13. Arab – Tehrani, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desorby, S., and Linder, M. 2012. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long – chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science and Technology*, 25: 24-33.
  14. Arapitsas, P. 2012. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135: 1708-1717.
  15. Belhaj, N., Arab- Tehrani, E. and Linder, M. 2010. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry*, 45: 187- 195.
  16. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the

36. Sagdic, O., Ozturk, I., and Kisi, O. 2012. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems with Applications*, 39: 6792- 6798.
37. Sahari, M. A. and Asgari, S. 2013. Effects of Plants Bioactive Compounds on Foods Microbial Spoilage and Lipid Oxidation. *Food Science and Technology*, 1(3): 52-61.
38. Samarin, A.M., Poorazarang, H. Hematyar, N., and Elhamirad, A. 2012. Phenolics in potato peels: Extraction and utilization as natural antioxidants. *World Applied Sciences Journal*, 18(2): 191-195.
39. Seeram, N. P., and Heber, D. 2011. Purification of pomegranate ellagitannins and their uses thereof. US patents, no. US 7919636 B2.
40. Shantha, N.C., and Decker E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of the American Oil Chemis' Society*, 77: 21.
41. Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A. 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal Ethnopharmacol.* 65(1): 71-77.
42. Teixeira, M. I., Andrade, L. R., Farina, M., and Rocha-Leao, M. H. M. 2004. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. *Materials Science and Engineering*, 24:653-658.
43. Torronen, R. 2009. Source and health effect of dietary ellagitannins. In S. Quideau (Ed.), *Chemistry and biology of ellagitannins – an underestimated class of bioactive plant polyphenols*. Singapore: Imperial College Press/World Scientific Publishing.
44. Vennat, B., Bos, M. A., Pourrat, A., and Bastide, P. 1994. Procyanidins from tormentil: Fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17: 1613-1615.
26. Li, Y. f., Guo, C. j., Yang, J. J., Wei, J. Y., Xu, J., and Cheng, S. 2004. Study on extraction of antioxidants in pomegranate peel and its antioxidant activities in vitro. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2: 018.
27. Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food chemistry*, 96(2): 254-260.
28. Lovaas, E.A. 1992. Sensitive spectrophotometric method for lipid hydroperoxide determination. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69: 777-783.
29. Mangena, T., and Muyima, N.Y. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett Appl Microbiol.* 28(4): 291-296.
30. Marin, S., Guynot, M.E., Neira, P., Bernadi, M., Sanchis, V. and Ramos, A. J. 2002. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 203-211.
31. Mendez, E., Sanhueza, J., Speisky, H., and Valenzuela, A. 1996. Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 73: 1033-1037.
32. Namiki, M. 1990. Antioxidant/ antimutagens in food. *Critical reviews in food science and nutrition*, 29: 273-300.
33. Negi, P. and Jayaprakasha, G. 2003. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *Journal of food science*, 68(4): 1473-1477.
34. Pauli, A. 2006.  $\alpha$ - Bisabolol from chamomile-A specific ergosterol biosynthesis inhibitor. *Journal of Aromatherapy*, 16:5-21.
35. Rangan, C., and Barceloux, D.G. 2009. Food Additives and Sensitivities. *Disease-a-Month*, 55(5): 292-311.

46. Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M., and Azizi, M. 2010. Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9: 35-42.
45. Warner, C., Daniels, D., Lin, F., Joe, F., and Fazio, T. 1986. Fate of antioxidants and antioxidant-derived products in deep-fat frying and cookie baking, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 1-5.



(Original Research Paper)  
**Investigation on Anti-Microbial and Anti-Oxidative Effects of  
Pomegranate Peel Extract in *Vitro* and Food Model**

Parvin Sharayei<sup>1\*</sup>, Elham Azar Pazhooh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Assistant Professor., Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research, Agricultural Research Education and Extension Organization, Mashhad, Iran.

Received: 26/11/2017

Accepted: 23/01/2018

**Abstract**

The present study was carried out with the aim of optimal use of pomegranate peel as agricultural and pomegranate juice factories residues and investigation of antioxidant and antimicrobial properties. For this purpose, the oxidative stability of purified soybean oil (control) was evaluated in presence of different concentrations of pomegranate peel (extract with ultrasound assisted; 1, 2, 4 and 6%) and compared with the synthetic antioxidant butylated hydroxyl toluene (BHT, 0.01%) during 280 hours at 50 °C in oven test. And also antimicrobial properties of pomegranate peel with the concentration of 0.1 and 0.3 % was investigated in comparison with the synthetic preservative of potassium sorbate (0.1%) on inhibiting the growth of *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro and food system (cake). The results showed that the oxidative stability based on peroxide value (OS<sub>PV</sub>) in the purified soybean oil was 0.4% that increased in presence of different concentrations of pomegranate peel extract and BHT from 0.96 to 8.21% and up to 8.33%, respectively. Also, the results showed that all the aqueous extract concentrations had antimicrobial activity, but the effect of the extract on the different microorganisms was not the same, so that the highest diameter of inhibition zone were obtained for *Escherichia coli* (about 19 mm) and the lowest diameter of inhibition zone for *Staphylococcus aureus* (12 mm). Moreover, the aqueous extract controlled the growth of mold and yeast in oily cake during storage, and its antifungal effect at 3% concentration was almost equivalent to the chemical preservation of potassium sorbate.

**Keywords:** Phenolic Compounds, Anti-Fungal, Pomegranate Aqueous Peel Extract, Cake.

---

\* Corresponding Author: [parvin\\_sharayei@yahoo.com](mailto:parvin_sharayei@yahoo.com)

