(مقاله پژوهشی)

ارزیابی‌خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی کلروفیل استخراج‌شده ازگیاه شبدر ایرانی *(Trifolium resupinatum L.)*

غلامرضا مهدی پور دامیری[۱]، علی معتمدزادگان[۲*]، رضا صفری[۳]، سید احمد شهیدی[۴]، آزاده قربانی حسن‌سرایی[۴]

۱-دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم مهندسی زراعی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

۴-دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱

چکیده

به‌کارگیری‌رنگ‌های طبیعی در مواد غذایی موجب افزایش کیفیت و ویژگی‌های حسی محصول شده و با اثرات ضدالتهابی و ضدسرطانی نیز همراه می‌باشند و بنابراین، نقش مهمی در سلامت انسان بر عهده دارند. کلروفیل نیز به‌عنوان یکی از رنگ‌دانه‌های طبیعی، در انواع مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این تحقیق استفاده از روش آنزیمی به‌منظور استخراج کلروفیل از گیاه شبدر ایرانی و ارزیابی خواص‌آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های ضدباکتریایی آن بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلروفیل استخراج‌شده از گیاه شبدر ایرانی با سه روش مهارراديکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) و اثرات ضد باکتریایی علیه میکروارگانیسم‌های مختلف، با دو روش انتشار دیسک در محیط آگاردار و رقیق‌سازی (MIC و MBC) انجام گرفت. نتایج نشان داد که غلظت کلروفیل a در شبدر ایرانی تقریباً دو برابر غلظت کلروفیل b بوده و غلظت‌های بالاتر کلروفیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و نیز قدرت احیاکنندگی آهن نشان دادند ($p<$ ۰/۰۵). اثرات ضد باکتریایی کلروفیل در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکرومولار متفاوت بوده به‌طوری‌که مقاومت باکتری‌ها در روش انتشار به ترتیب سودوموناس> اشرشیا>سالمونلا> استافیلوکوکوس> لیستریا ($p<$ ۰/۰۵) و در روش رقیق‌سازی به ترتیب سودوموناس> سالمونلا> اشرشیا> استافیلوکوکوس= لیستریا مشاهده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی کلروفیل در غلظت‌های بالاتر، می‌توان از آن به‌عنوان رنگ‌دانه شاخص در مواد غذایی و دارویی استفاده نمود. ولی با این وجود، انجام آزمایش‌های تکمیلی به‌منظور دستیابی به نتایج بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: کلروفیل، شبدر ایرانی، روش آنزیمی، خواص آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد باکتریایی.

* مسئول مکاتبات: amotgan@yahoo.com

۱- مقدمه

گیاهان به علت داشتن منابع کربوهیدراتی، انواع ویتامین‌ها، ترکیبات معدنی و مواد آنتی‌اکسیدان، باعث ارتقاء سیستم ایمنی و افزایش مقاومت بدن در برابر انواع بیماری‌ها و پیری زودرس می‌گردند. امروزه از عصاره گیاهان و نوشیدنی‌های گیاهی مانند چای سبز، عصاره سویا و ... در فرمولاسیون موادغذایی استفاده می‌گردد (۳). رنگ‌های خوراکی گروهی از مواد افزودنی هستند که به‌صورت طبیعی و یا مصنوعی تهیه‌شده و از عوامل مهم و تأثیرگذار در کیفیت ظاهری و بازارپسندی مواد غذایی محسوب می‌شوند. رنگ‌های مصنوعی در صنایع غذایی کاربرد فراوانی داشته ولی به لحاظ داشتن عوارض جانبی نظیر اثرات آلرژیک، عوارض عصبی و رفتاری (مانند پیش فعالی) و همچنین سمیت ناشی از مصرف آن ها در طولانی‌مدت، تمایل و گرایش به استفاده از رنگ‌های طبیعی به‌عنوان جایگزینی برای آن‌ها، رو به افزایش می‌باشد. رنگ‌های طبیعی علاوه بر افزایش کیفیت، کارایی و ویژگی‌های حسی مواد غذایی، دارای اثرات ضد سرطانی، ضدالتهابی، کاهش‌دهنده کلسترول و قند خون نیز بوده و ازاین‌رو نقش مهمی در ارتقاء سلامت انسان بر عهده دارند (۳ و ۱۹). کلروفیل یکی از رنگ‌دانه‌های اصلی در گیاهان بوده که در غشای تیلاکوئید کلروپلاست‌ها قرار داشته و فرآیند فتوسنتز به‌واسطه این رنگ‌دانه انجام می‌گیرد. این رنگ‌دانه غیرمحلول در آب و محلول در روغن بوده و دو کلاس مهم آن شامل کلروفیل a و b به ترتیب مسئول رنگ‌های سبز-آبی و سبز- زرد می‌باشند. کلروفیل، به‌عنوان یکی از رنگ‌دانه‌های طبیعی، در انواع موادغذایی نظیر فرآورده‌های لبنی، روغن‌های خوراکی، کیک، نوشیدنی‌ها، آب‌میوه‌ها، انواع مکمل‌ها، ژله‌ها، پاستا، فرمولاسیون غذای کودک، آدامس، شکر و محصولات قنادی و همچنین در حفظ رنگ سبزی‌های منجمد و یا کنسرو شده مورد استفاده قرار گرفته است (۲۵). فاکتورهای مختلف نظیر دمای بالا، نور، اکسیژن، اسیدها و آنزیم‌ها باعث تجزیه کلروفیل شده و پایداری آن را کاهش می‌دهند. حرارت باعث تخریب دیواره سلولی‌گیاه و آزاد شدن اسیدهای درون سلولی شده و درنتیجه pH اطراف سلول کاهش می‌یابد (۲۱ و ۳۰). یکی از مشکلات عمده در موادغذایی (خصوصاً غذاهای پرچرب) اکسیداسیون چربی بوده زیرا علاوه بر کاهش ارزش تغذیه‌ای (آسیب به پروتئین‌ها، بلوکه شدن و اکسیداسیون اسیدهای آمینه ضروری، کاهش فعالیت امولسیفایری و حلالیت پروتئین‌ها، تولید هیدروپراکسیدها و آلدئیدها) و حسی مواد غذایی (طعم، رنگ، بو و بافت نامطبوع)، سبب آغاز فرآیندهای اکسیداتیو در بدن مانند پیشرفت سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی، آلرژی‌ها، التهابات و سایر بیماری‌ها می‌شود (۳۵). ترکیبات فنولی یک گروه متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به‌طور گسترده‌ای در سراسر گیاه پخش شده‌اند و دارای تأثیرات بیولوژیکی متعددی همچون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی می‌باشند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در گیاهان عمدتاً به دلیل ویژگی‌های اکسایش- کاهش و ساختار شیمیایی آنهاست که می‌توانند نقش‌های مهمی را در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات انتقالی و فرونشاندن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه داشته باشند و این ویژگی‌ها با تأثیرات مفید آنتی‌اکسیدان‌های فنولی بر روی سلامت انسان در ارتباط است (۹). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که فرآیندهای اکسیداتیو را به تأخیر انداخته و به دو صورت مصنوعی و طبیعی وجود دارند. از عوارض جانبی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی می‌توان به سرطان‌زایی و جهش‌زایی اشاره نمود. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی محصول دست بشرند و اغلب مشتقات فنلی هستند. ترکیبات سنتزی متعددی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارند ولی به دلیل قوانین سخت‌گیرانه ایمنی کاربرد صرفاً تعداد اندکی از آنها در مواد غذایی مجاز اعلام شده است. این مشتقات فنلی معمولاً بیش از یک گروه هیدروکسیل یا متوکسی دارند؛ بنابراین لزوم استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها و رنگ‌دانه‌های گیاهان و میکروجلبک‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۲ و ۴). همچنین،

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی فراریت کمتری داشته و مقاومت بیشتری در دماهای بالاتر دارند (۵). ترکیبات فنولی یک گروه متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به‌طور گسترده‌ای در سراسر گیاه پخش شده‌اند و دارای تأثیرات بیولوژیکی متعددی همچون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی هستند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در گیاهان عمدتاً به دلیل ویژگی‌های اکسایش- کاهش و ساختار شیمیایی آن‌هاست که می‌توانند نقش‌های مهمی را در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات انتقالی و فرونشاندن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه داشته باشند این ویژگی‌ها با تأثیرات مفید آنتی‌اکسیدان‌های فنولی بر روی سلامت انسان در ارتباط است که به دلیل تأثیرات بازدارندگی آن‌ها در مقابل پیشرفت بسیاری از بیماری‌های حاصل از تنش‌های ناشی از اکسیداسیون، همچون بیماری‌های قلبی- عروقی، سندرم روده التهابی و بیماری آلزایمر است. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که کلروفیل به دلیل داشتن مقادیر بالای فنل، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و قادر به غیرفعال کردن ترکیبات اکسیدان نظیر ۱ و ۱ دی فنیل ۲ پیکریل هیدرازیل (DPPH)، یون‌های فلزی خصوصاً آهن II و همچنین مهار تشکیل تیوباربیتوریک اسید (TBARS) می‌گردد؛ بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان رنگ‌دانه و آنتی‌اکسیدان‌طبیعی در انواع مواد غذایی استفاده نمود (۲ و ۴). جهت استخراج کلروفیل از روش‌های سنتی (استفاده از حلال‌های مختلف به صورت سوکسله و یا غوطه‌وری) و تکنیک‌های نوین نظیر امواج فراصوت، حلال فوق بحرانی، مایکروویو، آنزیمی میدان پالس الکتریکی و ... و یا تلفیقی از روش‌های قدیم و جدید استفاده می‌گردد. در روش آنزیمی، به دلیل هیدرولیز دیواره سلولی گیاه، ترکیبات درون‌سلولی به‌راحتی آزاد می‌شوند. از مزیت‌های این روش، عدم استفاده از تیمار حرارتی و حلال بوده که آن را از روش‌های دیگر متمایز می‌کند؛ بنابراین انتخاب روش مناسب به‌منظور دستیابی به بیشترین مقدار کلروفیل لازم و ضروری می‌باشد (۱۲، ۱۵، ۳۷ و ۴۰). شبدر ایرانی با نام علمی *Trifolium resupinatum* L. گیاهی است یک‌ساله و پاییزه که بومی آسیای صغیر و ایران است و دارای اکوتیپ های یک چین و چند چین می باشد. اغلب مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثرات درمانی شبدر بر خواص فیتواستروژنیک ایزوفلاون‌های آن تأکید دارند. ایزوفلاون‌های گیاه از طریق فعل و انفعال با گیرنده‌های استروژن علائم یائسگی را در زنان بهبود می‌دهند. ترکیبات استروژنیک با اتصال به رسپتورهای استروژنیک بتا و با تأثیر بر سامانه‌های دوپامینرژیک، سروتونرژیک و کولینرژیک عملکرد شناختی و خلق‌وخو را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر اثرات استروژنیک، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی گیاه شبدر در محیط برون سلولی، سلولی و مدل‌های جانوری نشان داده شده است (۳۸). اگرچه مطالعات اندکی بر روی استخراج کلروفیل از گیاهان و یا بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاه شبدر توسط محققان مختلفی نظیر توسط امینیان و همکاران (۱۳۹۷) و صابریان و همکاران (۱۳۹۶) انجام یافت (۲ و ۸)، اما در هیچ‌یک از روش آنزیمی استفاده نگردید. لذا، در این مطالعه از روش آنزیمی جهت استخراج کلروفیل از گیاه شبدر استفاده شده و پس از تعیین غلظت، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱- تهیه گیاه

گیاه شبدر از شهرستان ساری واقع در استان مازندران در مهرماه ۱۳۹۷ جمع آوری شده و پس از تائید نام علمی، موردبررسی قرار گرفت. کمپلکس آنزیمی PectineX Ultra SP L دارای آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز، همی سلولاز بوده و غلظت و فعالیت آنزیمی آن به ترتیب ۱۶/۶۷ و ۳۳/۳۳ درصد می باشد. این آنزیم از شرکت نووزایم دانمارک تهیه گردید.

۲-۲- روش استخراج

جهت استخراج کلروفیل از گیاه شبدر از روش آنزیمی استفاده شد. ابتدا ۱۰ گرم از نمونه (وزن تر) با ۱۰۰ میلی‌لیتر

از محلول بافر فسفات مخلوط و به مدت یک دقیقه هموژنیزه گردید. در مرحله بعد، محلول آنزیمی (PectineX Ultra SP L) به مقدار ۵درصد نمونه به سوسپانسیون اولیه اضافه‌شده و نمونه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۲۰ دقیقه شیک شد. در مرحله انتهایی، نمونه‌ها در دور g۶۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۳۰).

۲-۳- اندازه‌گیری کلروفیل

برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل، مایع رویی به‌دست‌آمده از مرحله قبل، با استفاده از استن ۸۰ درصد رقیق‌شده و جذب‌کلروفیل در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. از استن نیز به‌عنوان بلانک یا شاهد استفاده شد. در انتها عددهای جذب، در فرمول‌های ذیل جایگزین شده و مقدار کلروفیل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شدند (۱).

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645)\, V/100W \quad (۱)$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663)\, V/100W \quad (۲)$$

A= جذب نور در طول‌موج‌های ۹۹۱، ۹۲۰

V= حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)

W= وزن تر نمونه برحسب گرم

۲-٤- آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

۲-٤-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین‌منظور، ۱میلی‌لیتراز غلظت‌های مختلف کلروفیل به‌طور جداگانه (۲۰، ۶۰، ۱۰۰ میکرو مولار) به ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH[1] اضافه‌شده و مخلوط حاصل پس از تکان دادن، به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. بعدازاین مرحله، جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷nm در مقابل شاهد (آب مقطر و معرف DPPH) قرائت شد (۶). در فرمول ذیل روش محاسبه درصد مهار رادیکال آزاد ارائه شده است.

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH= (جذب شاهد-جذب نمونه)/(جذب شاهد)×۱۰۰ (۳)

1- 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

۲-٤-۲- بررسی قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP[2])

به‌منظور سنجش این ویژگی، مقدار ۰/۱ گرم از رنگ‌دانه با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سرد در حمام یخ هموژن شد. هموژنات حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شده و به ۵۰ میکرو لیتر از غلظت‌های تهیه‌شده (۲۰، ۶۰، ۱۰۰ میکرو مولار)، ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۳۰°C انکوبه شد. جذب محلول‌ها در ۷۰۰ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP)، قرائت شد (۲۶).

۲-٤-۳- سنجش مهار رادیکال ABTS[3]

ارزیابی مهار رادیکال ABTS طبق مطالعه He و همکاران با اندکی تغییر انجام شد. در ابتدا ۷ میلی مولار از محلول ABTS با ۲.۴۵ میلی مولار پرسولفات پتاسیم مخلوط شده و در دمای اتاق و مکان تاریک به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. محلول کاری، با رقیق کردن محلول اولیه در اتانول ۸۰ درصد، تهیه‌شده بطوریکه جذب در طول‌موج ۷۳۴ نانومتر، ۰/۷ قرائت گردد. محلول تهیه‌شده از کلروفیل با محلول نهایی ABTS، مخلوط شده و جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت گردید (۳۸).

۲-۵- بررسی فعالیت ضد میکروبی

۲-۵-۱- آماده‌سازی باکتری

سویه‌های استاندارد و فریزدرایر شده پنج باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) PTCC 1330، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) PTCC 1113، لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) PTCC 1165T، سالمونلا تیفی (*Salmonella typhi*) PTCC 1108 و سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) PTCC 1557 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ابتدا طبق دستورالعمل و تحت شرایط

1- Ferric Reducing Antioxidant Power

3- 2 ,2'-Azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid

استریل سر ویال‌ها شکسته شده و محتوی داخل آن به محیط آبگوشت مغز و قلب گاو[1] (BHI) انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و از پرگنه های رشد یافته، جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد استفاده گردید. بدین ترتیب که پس کشت اولیه پرگنه ها در محیط BHI و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت و مشاهده کدورت در محیط‌کشت آبگوشت، نمونه‌ها در دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از شستشو با سرم بافر فسفات استریل، مجدداً سانتریفوژ شدند. این فرآیند ۳ مرتبه تکرار شده و در کدورت نهایی هر باکتری، با لوله استاندارد مک فارلند (۰/۵ مک فارلند معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml می‌باشد) مقایسه گردید (۱۸).

۲-۵-۲-تعیین حداقل غلظت بازدارندگی MIC و حداقل غلظت کشندگیMBC با استفاده از روش رقیق‌سازی

باکتری‌های موردمطالعه به‌طور جداگانه و در غلظت تقریبی $۱۰^{۶}$cfu/ml به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش حاوی ۱میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت BHI افزوده شدند. در مرحله بعد، غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکرو مولار از کلروفیل به همراه توین[2] 80 هرکدام به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر اضافه‌شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷درجه‌سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ کدورتی در لوله‌های آزمایش مشاهده نگردید به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. پس از تعیین MIC جهت تعیین، MBC در شرایط استریل از محتویات لوله‌هایی که پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری هنوز شفاف بودند و کدورتی در آنها مشاهده نشد به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در محیط کشت BHI آگار کشت سطحی داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب، رشد و عدم رشد باکتری‌ها موردبررسی قرار گرفته و اولین غلظتی که در آن هیچ‌گونه رشدی مشاهده نگردید به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (۷ و ۲۳).

۲-۵-۳- بررسی قطر هاله عدم رشد با استفاده از انتشار در محیط کشت آگار

جهت‌ارزیابی‌هاله‌عدم‌رشد،ابتدا۱۰۰میکرولیتراز سوسپانسیون هر باکتری ($۱۰^{۶}$ cfu/ml) به‌صورت سطحی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در نقاط مختلف محیط کشت تعبیه‌شده و از غلظت‌های مختلف کلروفیل (مشابه روش رقیق‌سازی)، به مقدار ۵۰ میکرولیتر به هریک از چاهک‌ها اضافه شد. از آب‌مقطرودیسک‌آنتی‌بیوگرام استرپتومایسین (۳۰ میلی‌گرم) به ترتیب به‌عنوان کنترل‌های منفی و مثبت استفاده گردید. محیط‌های کشت باکتری‌ها برای مدت ۲۴ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شده و قطر هاله‌های عدم‌رشد در اطراف چاهک‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر تعیین گردید (۷ و ۲۳).

۲-۶- تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین مقادیر حاصل هر شاخص‌ها از آزمون آنالیز واریانس طرفه استفاده شد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه‌وتحلیل خطای مجاز برای رد Ho، ۵ درصد در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقادیر کلروفیل

در جدول (۱) غلظت کلروفیل های a و b استخراج‌شده از شبدر ایرانی با استفاده از روش آنزیمی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن مرطوب ارائه شده است که در آن غلظت کلروفیل a تقریباً دو برابر غلظت کلروفیل b اندازه‌گیری شده است. در تحقیقات پویا و همکاران[3] (۱۹۸۱) نیز که بر روی شبدر سفید انجام شد، غلظت کلروفیل a بیشتر از غلظت کلروفیل b و تقریباً با همین نسبت گزارش گردید (۳۶).

1- Brain Heart Infusion
2- Tween
3- Puia et al.

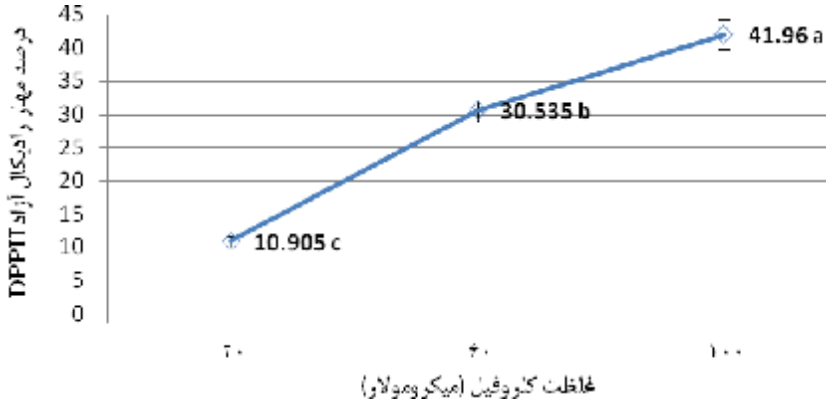
جدول ۱- غلظت کلروفیل های a و b استخراج‌شده از شبدر با استفاده از روش آنزیمی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن مرطوب

نوع کلروفیل	غلظت (mg/g fw)
A	۱/٤۳٥ ± ۰/۱۰
B	۰/۷۱٥ ± ۰/۰٤

۳-۲- نتایج آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

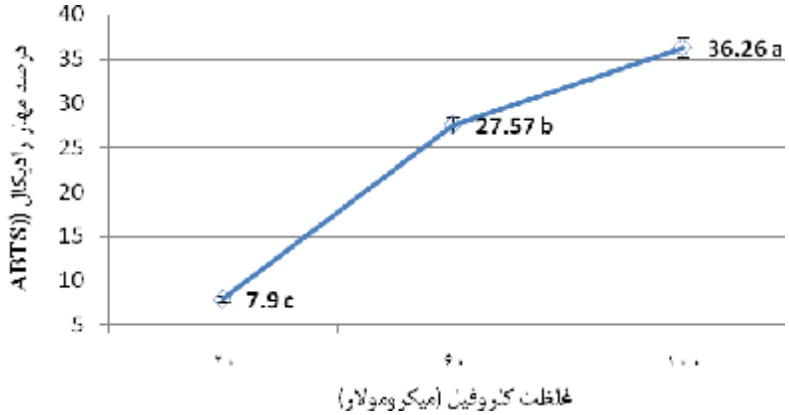
در شکل‌های (۱) تا (۳) نتایج ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه شبدر یعنی اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد DPPH، میزان مهار رادیکال ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن ارائه‌شده‌اند. غلظت‌های بالاتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان داده است.

نتایج ارزیابی آنالیز واریانس نیز حاکی از رد Ho و بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف کلروفیل کل جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود ($p < ۰/۰۵$) و نشان داد که تمامی گروه‌ها با سطح معناداری ۵ درصد با یکدیگر اختلاف دارند.



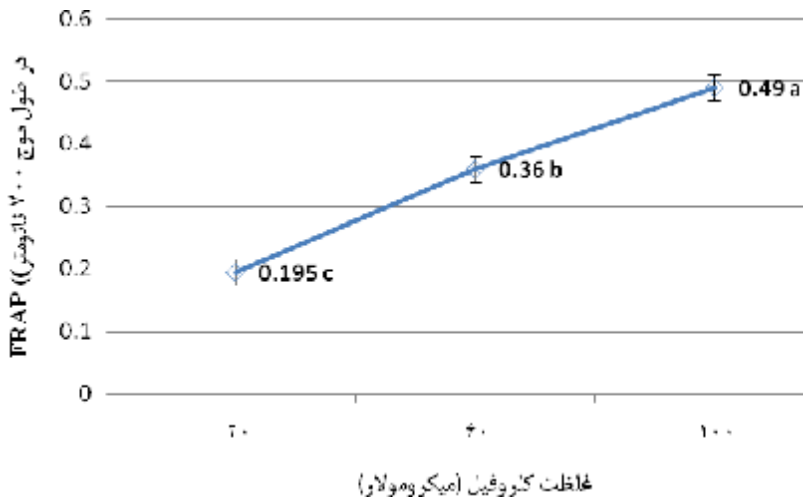
شکل ۱- نتایج درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه شبدر

*حروف متغیر نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵٪ است



شکل ۲- نتایج درصد مهار رادیکال آزاد ABTS در غلظت‌های مختلف کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه شبدر

*حروف متغیر نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵٪ است



شکل ۳- نتایج قدرت احیاکنندگی آهن در غلظت‌های مختلف کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه شبدر

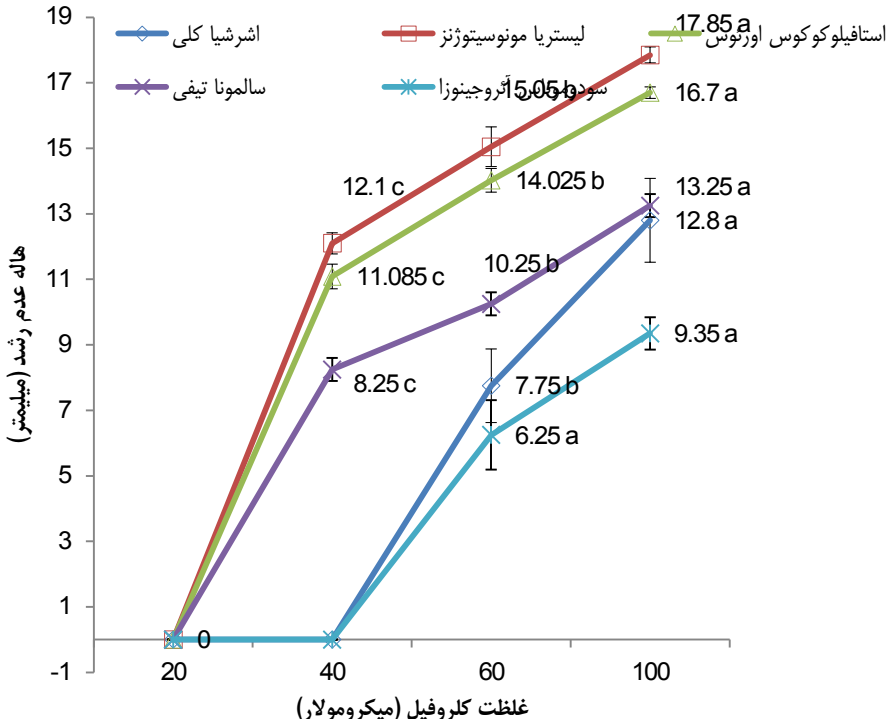
*حروف متغیر نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵٪ است

آزمون فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌احیاءآهن‌روشی‌است که به‌طور مستقیم‌آنتی‌اکسیدان‌ها و یا احیاکننده‌ها را درنمونه‌ها اندازه‌گیری می‌کند و رابطه خطی با غلظت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارد. چنانچه فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن بالا باشد، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد (۲۹ و ۳۳). فرقانی و همکاران نیز در بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌گیاه به نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره، مقدار جذب و اثر آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود (۴). در تحقیقات Choi & Lee نیز با افزایش غلظت کلروفیل فعالیت رادیکال آزاد (DPPH) افزایش یافت (۱۳). نتایج تحقیقات .Kolodziejczyk-Czepas et al نیز پیرامون شبدر ایرانی نشان داد که افزایش غلظت سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی یعنی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن می‌گردد (۲۴). هاشم‌دباغیان و همکاران نیز در آزمایش‌های خود نشان دادند که‌با افزایش غلظت عصاره جلبک، مهاررادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و نیز قدرت احیاکنندگی آهن افزایش‌می‌یابد (۱۶). حسن‌سلطان و همکاران نیز به استخراج کلروفیل‌های a و b از جلبک سبز پرداختند و نتایج نشان داد که با افزایش میزان کلروفیل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی یعنی مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد (۱۷).

۳-۳- نتایج آزمایش‌های ضد میکروبی

۳-۳-۱- نتایج آزمون هاله عدم رشد

همان‌گونه‌که‌در شکل (۴) مشاهده می‌شود، غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلروفیل جهت بررسی هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. در برابر دو میکروارگانیسم *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثرات بازدارندگی چشمگیرتری نشان دادند. تمامی باکتری‌ها در غلظت ۲۰ میکرومولار مقاوم بودند. غلظت ۴۰ میکرومولار کلروفیل بر روی *اشرشیا کلی* و سودوموناس بی‌تأثیر بود. علاوه بر این، بیشترین هاله عدم رشد در تمامی میکروارگانیسم‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار کلروفیل مشاهده گردید. تأثیر بازدارنده کلروفیل بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* بیش از سایر میکروارگانیسم‌ها بود. نتایج ارزیابی آنالیز واریانس نیز حاکی از رد H_0 و بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف کلروفیل کل جهت اندازه‌گیری هاله عدم‌رشد در برابر تمامی میکروارگانیسم‌ها به جز سودوموناس آئروجینوزا بود ($P< ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که تمامی‌گروه‌ها با سطح معناداری ۵ درصد با یکدیگر اختلاف دارند.



شکل ٤- نتایج اثرات مهارکننده کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه شبدر بر باکتری‌های شاخص در روش انتشار در محیط آگاردار از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد (میلی‌متر).

*حروف متغیر در هر باکتری، نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵٪ است

نتایج تحقیق امینیان و همکاران نیز که به بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدرو الکلی شبدر شیرین پرداختند، نشان داد که با افزایش غلظت، هاله عدم رشد افزایش می‌یابد و اثری مشابه اثر آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر پنی‌سیلین و اریترومایسین دارد. در همین تحقیق، میانگین قطر هاله عدم رشد نیز در مقابل برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ۷/۲۴ میلی‌متر گزارش نمودند (۶). میلانی و همکاران نیز در تعیین فعالیت میکروبی رنگ طبیعی بیکسین بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که افزایش غلظت بیکسین سبب افزایش بازدارندگی می‌گردد (۲۸). حسینی و همکاران نیز به بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه شبدر ترشک بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* پرداختند. نتایج نشان داد که میانگین قطر هاله‌های ایجادشده‌توسط گیاه شبدر ترشک بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌های داروهای شیمیایی بوده و از طرفی با افزایش غلظت عصاره از ۵ تا ۲۰ درصد میانگین قطر هاله ایجادشده توسط عصاره افزایش پیدا کرد. بدین معنی که با افزایش غلظت یا به‌عبارت‌دیگر با افزایش ماده مؤثره اثر ضد باکتری بیشتر گردید (۲۰).

۳-٤- نتایج تعیین میزان MIC و MBC

مطابق جدول (۲)، در روش رقت در آگار میزان MIC یعنی کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد باکتری برای *اشرشیا کلی* و *سالمونا تیفی* بیش از سایر میکروارگانیسم‌ها بوده است. نتایج تعیین میزان حداقل غلظت کشنده یعنی MBC نیز برای دو میکروارگانیسم *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با یکدیگر برابر بوده است. در نمونه‌های کنترل مثبت توین ۸۰ و باکتری‌های مذکور اضافه شدند که با رشد باکتری‌ها و ایجاد کدورت همراه بودند. نمونه‌های کنترل منفی نیز شامل توین ۸۰ و بدون باکتری بودند و به همین دلیل تغییری در آنها حاصل نگردید.

جدول ۲- نتایج تغییرات MIC و MBC کلروفیل کل استخراج‌شده از گیاه شبدر بر باکتری‌های شاخص در روش رقیق‌سازی

نوع باکتری	غلظت مورد استفاده MIC (µM)	غلظت مورد استفاده MBC (µM)
اشرشیا کلی	۱۰۰	–
لیستریا مونوسیتوژنز	٦۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	٦۰	۱۰۰
سالمونلا تیفی	۱۰۰	–
سودوموناس آئروجینوزا	–	–

میلانی و همکاران نیز به تعیین MIC و MBC رنگ‌دانه‌های طبیعی بیکسین بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداختند. نتایج نشان داد که MIC برای اشرشیا و لیستریا با هم برابر و بیشتر از استافیلوکوکوس بوده‌اند. بیشترین مقدار MBC نیز به‌ترتیب‌در مقابل اشرشیا، لیستریا و استافیلوکوکوس مشاهده گردید (۲۸).

٤- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق بر مبنای استخراج آنزیمی نشان داد که غلظت کلروفیل a در شبدر ایرانی تقریباً دو برابر غلظت کلروفیلb بوده و در غلظت‌های بالاتر کلروفیل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی یعنی مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن و نیز اثر ضد باکتریایی آن بیشتر بوده است. به‌طورکلی نتایج آزمون میکروبی بیانگر تأثیر بازدارندگی قوی کلروفیل در برابر باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* و استافیلوکوکوس نسبت به باکتری گرم‌منفی*اشرشیاکلی* بود. مطالعات متعددی بیانگر حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در برابر ترکیبات مؤثره یا عطرمایه‌های مختلف نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشند (۱۱، ۲۲، ۳۱، ۳۲ و ۳۴). نتایج تحقیقات امینیان نیز نشان داد که شبدر قرمز سبب بازدارندگی بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقابل باکتری‌های گرم منفی شده است که می‌تواند به دلیل وجود مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌های‌گرم منفی در برابر ترکیبات ضدمیکروبی موجود در عصاره‌گیاهی باشد (۶). غشای فسفولیپیدی بیرونی باکتری‌های گرم منفی سبب مقاومت عمومی آن‌ها در برابر عطرمایه‌ها و عصاره‌ها می‌گردد که تقریباً در برابر ترکیبات لیپوفیلیک نیز غیرقابل نفوذ می‌باشد. به دلیل عدم وجود این مانع در باکتری‌های گرم مثبت، اجزاء هیدورفوب عصاره‌های‌استخراج‌شده در تماس مستقیم با غشاءسلولی قرار می‌گیرند و می‌توانند با اثرگذاری بر میزان نفوذپذیری غشاء در برابر یون‌های مختلف، نشت ترکیبات سلولی حیاتی و یا به‌واسطه‌ی از کار انداختن سامانه‌های آنزیمی، موجب بازدارندگی و یا مرگ آن‌ها شوند (۱۴). برخی پژوهشگران نیز ساختار شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی عطرمایه‌ها و ترکیبات‌طبیعی را با یکدیگر مرتبط برشمرده‌اند (۱۰). بعضی ترکیبات فعال دارای حلقه فنلی، برای میکروارگانیسم‌ها سمی قلمداد می‌گردند که ناشی از تأثیر حلقه فنلی در اکسید نمودن ترکیبات مانند واکنش با گروه‌های سولفیدریل و یا انجام واکنش‌های غیراختصاصی با پروتئین‌ها می‌باشد (۳۹).در کلروفیل‌ها حضور سه یا چهار گروه از مواد فنولیک، از جمله اسیدهای فنولیک، کلوامیدها، ایزوفلاون‌ها و سایر فلاونوئیدها مشاهده شده که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی دارند (۲۴). عصاره شبدر ایرانی نیز مطابق تحقیقات مهدی‌پور و همکاران (۲۷) حاوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد به نحوی که با افزایش محتوای فنل کل و ترکیبات فلاونوئیدی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی کلروفیل نیز به نحو مطلوبی افزایش می‌یابد و ارتباطی مستقیم بین آن‌ها برقرار است. لذا، تحقیقات بیشتر در زمینه خاصیت ضدسرطانی این گیاه و اثرات ضدباکتریایی آن بر روی سایر میکروارگانیسم‌ها قابل‌توجه خواهد بود. با توجه به اثر بازدارندگی قابل‌توجه در مقابل باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس و *اشرشیا کلی*، می‌توان از عصاره این گیاه بعد از شناسایی و

تغلیظ عوامل ضدمیکروبی موجود در عصاره، بررسی بیان ژن دخیل در سنتز آن و نیز به‌کارگیری الیسیتورهای مؤثر در افزایش بیان ژن مورد نظر در تولید دارو و نیز صنایع غذایی استفاده کرد که البته استفاده از روش استخراج آنزیمی خود محرکی جهت افزایش میزان کلروفیل است.

۵-سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارشناسان بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که در آزمایش‌های میکروبی نهایت همکاری را داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

٦-منابع

۱. استاندارد ملی ایران. ۱۳۹۰. شماره ۱٤۸۳۸. تعیین میزان فرآورده‌های حاصل از تجزیه کلروفیل - روش‌های آزمون. ICS 10 67200. ۳-۱.

۲. صابریان، ح.، حسینی، ف.، و بلوریان، ش. ۱۳۹٦a. بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ طبیعی کلروفیل از یونجه و بررسی ویژگی‌های کمی و کیفی آن در مقایسه با منابع گیاهی مختلف، *مجله علوم و صنایع غذایی*. جلد ۷۱، شماره۱٤، ۵۷-٤۷.

۳. صابریان، ح.، حسینی، ف.، و بلوریان، ش. ۱۳۹٦b. تأثیر روش فراصوت بر استخراج رنگ خوراکی کلروفیل از برگ درخت شاتوت. *فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی*. جلد ٤، شماره۱٦، ۷٦-٦۷.

٤. فرقانی، م.، شهیدی، س. ا.، قربانی حسن سرایی، آ. و نقی زاده رئیسی، ش. ۱۳۹۷. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های رئولوژیکی ترکیبات زیست فعال استخراج شده از درخت به با استفاده از روش اولتراسوند. *علوم و صنایع غذایی ایران*، دوره ۱۵، شماره ۷۸، ۱۳-۱.

5. Afshari, K., Samavati, V. and Shahidi, S. A. 2015. Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from Hibiscus leaf. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74: 558-567.

6. Aminian, R., Mardani, M. and Daudenia, B. 2019. Evaluation of the antibacterial effect of hydroalcoholic extract of Plurago major L. and pterygium (*Astragalus hamosus*) on some gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(3):1-12.

7. AOAC. 2000. Official methods of analysis (18th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

8. Ates, E. 2011. Influence of some hard seededness breaking treatments on germination in Persian clover (*Trifolium resupanatum*) seeds. *Romanian Agricultural Research*, 28: 229-236.

9. Azad Mehr, S. 2015. Technology of extraction and purification of vegetable oils. Tabriz: Tabriz University Press.

10. Bachir Raho, G. and Benali, M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9): 739-742.

11. Chaudhry, N. M. A. and Tariq P. 2008. In vitro antibacterial activities of Kalonji, Cumin and Poppy seed. *Pakistan Journal of Botany*, 40: 461-467.

12. Cheok, C. Y. and Salman, H. A. K. and Sulaiman, R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59:16–40.

13. Choi, W. and Lee. H. 2018. Enhancement of Chlorophyll a Production from Marine Spirulina maxima by an Optimized Ultrasonic Extraction Process. *Applied Sciences*. 8(26): 1-10.

14. Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564–582.

15. De Almeida Melo, E., Mancini Filho, J. and Guerra, N.B. 2005. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *LWT-Food Science and Technology*. 38(1): 15-19.
16. Hashem Dabbaghian, H., Rezaei, M. and Tabarsa, M. 2016. Ethanol Extraction and Solution-Solution of Enteromorpha Intestinal Antioxidant Compounds. *Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources*, 69(3): 396-385.
17. Hassan Sultani, T., Noroozi, M. and Amozgar, M. A. 2016. Evaluation of chlorophyll a and b and tototal carotenoid as well as antioxidant activity of four species of green algae isolated from the coasts of Golestan, Caspian Sea. *New Journal of Cellular-Molecular Biotechnology*, 6(24): 31-36.
18. He, J., Huang, B., Ban, X., Tian, J., Zhu, L. and Wang, Y. 2012. In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*. *J Ethnopharmacol*, 141: 104- 110.
19. Hoseini, H., Hindani, S., Parishani, M., Ghezelbash, G. and Ameri, A. 2009. Evaluation of antibacterial effects of aqueous extract of wood sorrels and comparison of its effect with common antibiotics in the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Infections. *Journal of Medicinal Plants*, 1(33):103-107.
20. Hosseini, F., Habibi, N. M. B. and Sadaghat, N. 2009. Effect of different packaging materials and storage conditions on the color of black cherry preserves. *Iranian Journal of Food Science And Technology*, 6(1):45-51.
21. Humphrey, A. 2004. Chlorophyll as a color and functional ingredient. *Journal of Food Science*, 69: 422-425.
22. Johnson M., Wesely, E. G., Kavitha, M. S. and Uma, V. 2011. Antibacterial activity of leaves and inter nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3): 196-200.
23. Khezri, M., Rezaei, M., Rabiei, S. and Garmsiri, E. 2016. Antioxidant and antibacterial activity of three algae from Persian Gulf and Caspian Sea. *Ecopersia*, 4(2): 1425-1435.
24. Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Kowalska, I. and Stochmal, A. 2014. Biological activity of clovers - free radical scavenging ability and antioxidant action of six Trifolium species. *Pharmaceutical Biology*. 52(10): 1308-1314.
25. Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L. and Ferreira, I. C. 2016. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, 52: 1-15.
26. Mazdestan, S., Ebrahimzadeh, M. H. and Khalili, M. 2015. Comparison of the importance of different methods of extraction on antioxidant activity of case leaf, *Mazandaran University of Medical Sciences Journal*, 25(127): 10-24.
27. Mehdipoor Damiri, G. R., Motamedzadegan, A., Safari, R., Shahidi, S. A, Ghorbani-HasanSaraei, A. 2020. Evaluation of stability, physicochemical and antioxidant properties of extracted chlorophyll from Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.). Food Measurement and Characterization, https://doi.org/10.1007/s11694-020-00614-x
28. Milani, A., Hosseini, F., Barjerdi, S. R. and Bolourian, S. 2018. In-vitro determination of antibacterial activity of natural dye bixin and its application in bulk snack food modeling system. *Journal of Food Science and Technology*, 84(15):385-395.
29. Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzai, N., Mirzaei, M. 2011. Evaluation of Antioxidant and Total Phenol Properties of Hydroalcoholic Extract of Ash, Barangeh, Zenian, Coriander and Shenbile. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 1(3):160-167.

during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3961-3966.

36. Sitohy, M., Osman, A., Ali Abdel, G. and Salama, A. 2015. Antibacterial phycocyanin from Anabaena oryzae SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8(4): 27-36 .
37. Socaciu, C. 2008. Updated technologies for extracting and formulating food colorants. In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties, Socaciu, C., Ed., CRC Press, Boca Raton. pp. 303–322.
38. Then, M., Szentmihaly, K., Sarkozi, A. and Varga, I. S. 2003. Examination on antioxidant activity in greater celandine (Chelidonium majus L.) extracts by FRAP method. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4): 115-117.
39. Vatandost, E., Chekin, F. and Shahidi, S.-A. 2016, Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Pepper Extracts Reduction and Its Electocatalytic and Antibacterial Activity. *Russian Journal of Electrochemistry*, 52(10): 960–965.
40. Veggi, P. C., Martinez, J. and Meireles, M. A. A. 2013. Fundamentals of microwave extraction. In: Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, Chemat, F., and Cravotto, G., Eds., Springer, New York. pp. 15–52.
30. Ozkan, G. and Bilek, S. E. 2015. Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food Chemistry*, 176: 152–157.
31. Peixoto, J. R. O., Silva, G. C., Costa, R. A,. Josei res Lira de Sousa Fontenelle, Vieira G.H. and Filho, A. A. F. .2011. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3): 201-204.
32. Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8): 3101–3113.
33. Puia, I. 1981. Variability of the chlorophyll content in white clover (*Trifolium repens* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 11(1). DOI: 10.15835/nbha111141
34. Ravikumar, S., Gokulakrishnan, R. and Boomi, P. 2012. In vitro antibacterial activity of the metal oxide nanoparticles against urinary tract infections bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(2): 85-89.
35. Sinnecker, P., Gomes, M. S. O., Arêas, J. A. G. and Lanfer-Marquez, U.M. 2002. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds

(Original Research Paper)

Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Properties of Chlorophyll Extracted from Persian Clover (*Trifolium resupinatum L.)*

Gholam Reza Mehdipour Damiri[1], Ali Motamedzadegan[2*], Reza Safari[3], Seyyed Ahmad Shahidi[4], Azadeh Ghorbani HasanSaraei[4]

1- PhD Graduated of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, University of Agriculture and Natural Resources, Sari, Iran.
3-Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran.
4 Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received:25/07/2020 Accepted:22/09/2020

Abstract

The use of natural dyes in foods enhances the quality, efficiency and sensory properties of the product and also, they are associated with anti-inflammatory and anti-cancer effects and therefore they play an important role in human health. Chlorophyll is used as a natural pigment in a variety of foods. The aim of this study was extraction of chlorophyll from Persian clover (*Trifolium resupinatum L.*) using enzyme method and evaluation its antioxidant and antibacterial properties. Antioxidant activity of chlorophyll extracted from Persian clover was performed by three methods including DPPH and ABTS free radicals scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) and antibacterial effects against different microorganisms was also carried out using agar disk diffusion and microdilution (MIC and MBC) methods. The results showed that the concentration of chlorophyll a was almost twice of chlorophyll b and higher concentrations of chlorophyll had higher antioxidant activity in DPPH and ABTS free radicals scavenging and FRAP ($p>0.05$). Antibacterial effects of chlorophyll at concentrations of 20, 40, 60 and 100 µM were different, with bacterial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* > *Salmonella typhi* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus* > *Listeria monocytogenes* ($P<0.05$) in agar disk diffusion and *Pseudomonas aeruginosa* > *Salmonella typhi* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus* = *Listeria monocytogenes* in microdilution respectively. Based on the results and the antioxidant and antibacterial effects of chlorophyll at higher concentrations, it can be used as a biocolorant in food and pharmaceuticals. However, further tests are needed to obtain further results.

Keywords: Chlorophyll, Persian Clover, Enzyme Method, Antioxidant Properties, Antibacterial Properties.

[*]Corresponding Author: amotgan@yahoo.com