مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 2، تابستان 1395، صفحات 124-113

مقایسه خصوصیات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی پوسته سبز گردو قبل و بعد از ریزپوشانی کردن

فاطمه چراغعلی[1]، لیلا میرمقتدایی[2]، سعیده شجاعی علی‌آبادی[2]، سیده مرضیه حسینی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی گرایش کنترل کیفیت، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، واحد بین‌الملل، تهران، ایران
2- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیک: sm_hosseini@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: 94/9/29 تاریخ پذیرش: 94/11/12

چکیده

سابقه و هدف: پوست سبز گردو از ضایعات کشاورزی است که به دلیل داشتن ترکیبات فنولی، می‌تواند به عنوان ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیک مطرح باشد. این تحقیق با هدف استخراج عصاره آبی پوست سبز و بررسی اثر دمای استخراج بر میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی، همچنین اثر فرآیند ریزپوشانی کردن عصاره استخراجی به روش خشک‌کن پاششی در مالتودکسترین بر فعالیت بیولوژیک عصاره بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه عصاره آبی پوست سبز گردو (واریته سوزنی) در دو دمای 25 و 80 درجه سانتی‌گراد استخراج شد. در ادامه فرآیند ریزپوشانی کردن با مالتودکسترین 10 % به عنوان ماده پوشش‌دهنده در سه غلظت مختلف عصاره (2 mg/ml، 1، 0/5) با استفاده از روش خشک‌کن پاششی انجام شد. ترکیبات فنولی کل عصاره آزاد و ریزپوشانی شده تعیین گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی پوسته سبز گردو به روش مهار رادیکال DPPH (2و2 دی فنیل1- پیکریل و هیدرازیل) قبل و بعد از ریزپوشانی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش چاهک‌گذاری در آگار (Agar well diffusion method) بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* و باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشرشیاکلی* تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اثر دمای استخراجی بر میزان ترکیبات فنولی معنی‌دار است (P< 0/05). نمونه‌های استخراج شده در دمای 80°C حاوی ترکیبات فنولی بیشتری (39/77 mg GAE/g) نسبت به نمونه‌های استخراج شده در دمای محیط (28/88 mg GAE/g) بودند. کارایی ریزپوشانی با افزایش میزان غلظت عصاره افزایش یافت. عصاره آزاد و ریز پوشانی شده به دست آمده در دمای 80°C در غلظت 2 mg/ml بیشترین اثر را در مهار رادیکال DPPH داشت (به ترتیب 85/05 و 81/05 %). علاوه بر این عصاره آزاد و ریزپوشانی شده در غلظت 2 mg/ml بیشترین اثر بازدارندگی را روی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت نشان دادند. نتایج نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده پوست سبز گردو بود.

نتیجه‌گیری: پوسته سبز گردوی سوزنی با توجه به مقادیر مناسب ترکیبات فنولی می‌تواند به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروب طبیعی ارزان مورد استفاده قرار گیرد. لذا می‌توان از ریزپوشانی کردن به روش خشک‌کن پاششی به عنوان روشی کارآمد جهت افزایش پایداری عصاره پوست سبز گردو در برابر شرایط محیطی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: پوسته سبز گردو، عصاره آبی، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ریزپوشانی کردن

• مقدمه

گردو با نام علمی Juglans regia از تیره Juglandaceae است که به عنوا ن یک گیاه دارویی (ضد قارچی) توسط بومیان روستاها مورد توجه بوده است (1). دانه گردو دارای منافع اقتصادی زیادی در صنایع غذایی است و به خاطر ویژگی‌های تغذیه‌ای و سلامت‌بخش در سراسر جهان محبوب و با ارزش است (2). ترکیب‌های فنولی گیاهی (آنتی‌اکسیدان) پوست سبز گردو به علت دارا بودن خواص سودمندی مثل ضدرادیکالی، قابلیت پیشگیری از اکسایش LDL و سختی

Archive of SID
www.SID.ir

سرخرگ‌ها، ضدسرطان می‌توانند برای سلامت انسان مفید باشند (5-3). پوست سبز گردو در صنایع آرایشی و بهداشتی و همچنین به عنوان مواد اولیه برای نوشیدنی سنتی گردو مورد استفاده می‌باشد (6). در ایران این گیاه از ارتفاع26 متر پایین-تر از سطح دریا در مازندران و تا ارتفاع بیش از 2500 متر از سطح دریا در چهار محال و بختیاری رویش داشته و به جز استان‌های ساحلی خلیج فارس و دریای عمان در سایر استان‌های کشور کشت می‌گردد (7).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنولی هستند که در همه بخش‌های یک گیاه وجود دارد، و از انواع متابولیت‌های ثانویه هستند که گیاهان در مواجه با گونه‌های فعال اکسیژن آنها را تولید می‌کنند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی اساساً به دلیل خصوصیات اکسایشی و کاهشی آنهاست که این امکان را به آنها می‌دهد که به عنوان یک عامل احیاء کننده، دهنده هیدروژن و خنثی کننده اکسیژن یگانه عمل کنند. به علاوه آنها توانایی شلاته‌کردن فلزات را نیز دارند. این ترکیبات واکنش‌های اکسایشی روغن‌ها، چربی‌ها و ترکیبات محلول در چربی را به تأخیر می‌اندازند و بنابراین از توسعه عطر و طعم نامطبوع در اثر اکسایش ممانعت به عمل می‌آورند. آنتی-اکسیدان‌ها به طور طبیعی در اکثر منابع طبیعی موجود هستند. فرآوری ممکن است باعث تخریب یا حذف این ترکیبات گردد. بنابراین افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای حفظ کیفیت برخی محصولات مورد نیاز است (9، 8).

ترکیبات فنولی عصاره پوست سبز گردو توسط Stampar و همکاران مورد تجزیه قرار گرفت و ترکیبات سازنده آن مشخص گردید. تعداد 13 ترکیب فنولی شامل :هیدروکسی سینامیک اسیدها (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید سیناپیک)، هیدروکسی بنزوئیک اسیدها (اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید پروتوکاتئیک، اسید سیرینژیک و اسید وانیلیک)، فلاونوئیدها (کاتکین، اپی کاتکین، میرستن) و ژوگلون یا جوگلون (5 هیدروکسی 1و 4 نفتوکینون) در گردو شناسایی شده است. ترکیبات فنولی عصاره استخراجی پوست سبز گردو در چهار رقم میوه گردوی رسیده مورد بررسی قرار گرفت. در بین این ترکیب‌ها ژوگلون بیشترین میزان را دارد و ترکیب اصلی موجود در پوست سبز گردو است (10).

پوست سبز گردو می‌تواند به عنوان منبعی از ترکیبات فنولی با خواص بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین برای استفاده از ترکیبات فنولی پوست سبز گردو، استخراج این ترکیبات ضروری می‌باشد. از روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده می‌شود. از این روش‌ها می‌توان به خیساندن (غرقابی)، سوکسله، فراصوت و ماکروویو اشاره نمود (11). استخراج آبی ترکیبات فنولی به عنوان یکی از معمول‌ترین و بهترین روش‌های استخراج می‌باشد. در این روش به دلیل عدم استفاده از حلال‌های آلی برای استفاده در مواد غذایی ایمن و بی‌ضرر است. کارایی استخراج در این روش به شرایط محیطی استخراج مانند دما بستگی دارد که باید بررسی گردد (12). با این وجود فعالیت‌های بیولوژیک عصاره-ها نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی دستخوش تغییر قرار گیرد. به طوری که گزارشاتی مبنی بر ناپایداری این ترکیبات تحت شرایط محیطی به ثبت رسیده است (14، 13). به طوری که بسیاری از این ترکیبات در مواد غذایی پایدار نبوده و در معرض تجزیه هستند. سرعت و میزان تجزیه آنها بستگی به ساختار شیمیایی ریزمغذی‌ها، ویژگی‌های ماتریکس غذایی ، شرایط فرآیند و محیط نگهداری دارد (15). یکی از روش‌های افزایش پایداری ترکیبات حساس ریزپوشانی کردن است. ریزپوشانی کردن می‌تواند فرآیندهای تجزیه (مثل اکسیداسیون یا هیدرولیز) را آهسته کرده و یا جلوی تخریب ترکیبات را تا انتقال فرآورده به مکان مناسب بگیرد. بنابراین، ریزپوشانی کردن می‌تواند مواد زیست فعال حساس را پایدار ساخته و از شرایط محیطی نامناسب محافظت کند و باعث افزایش دسترسی زیستی آنها گردد. علاوه بر این ریزپوشانی کردن می‌تواند برای اصلاح و بهبود ویژگی‌های فیزیکی فرآورده غذایی به منظور حمل و نقل بهتر، کمک به جداسازی اجزاء مخلوط برای جلوگیری از واکنش با یکدیگر، و فراهم کردن غلظت کافی و دیسپرسیون همگنی از ماده فعال به کار گرفته شود (16). در بحث پایداری ترکیبات ریزپوشانی شده دو مسئله مطرح است. در ابتدا تأثیر روش ریزپوشانی بر پایداری ماده ریزپوشینه شده و در مرحله بعد پایداری ماده ریزپوشینه شده در شرایط محیطی قرار گرفته در آن. برای مثال ماتریکس غذایی مهم می‌باشد لذا در گام اول باید روشی استفاده شود که کمترین اثر را بر پایداری ترکیبات ریزپوشانی شده داشته باشد. در میان روش‌های مختلف ریزپوشانی کردن، روش استفاده از خشک‌کن پاششی بیشترین کاربرد را در

Archive of SID

www.SID.ir

صنایع غذایی دارد (17). خشک کردن پاششی در مقایسه با خشک کردن انجمادی 30 تا 50 برابر ارزان‌تر می‌باشد (18). ریزپوشانی کردن توسط خشک‌کن پاششی به طور موفقیت‌آمیزی برای چندین دهه در صنایع غذایی در حال استفاده می‌باشد (19). در این روش به دلیل سرعت تبخیر حلال ترکیبات برای مدت زمان بسیار محدودی در معرض دما بوده و لذا برای ریزپوشانی کردن ترکیبات حساس مانند پلی-فنول‌ها بسیار توصیه شده است (13). در میان بیوپلیمرهای مورد استفاده جهت ریزپوشانی کردن به روش خشک‌کن پاششی، مالتودکسترین به دلیل قیمت نسبتاً پایین، عدم داشتن عطر و طعم خاص، ویسکوزیته کم در مقادیر بالای مقدار ماده جامد و حفاظت مناسب در برابر اکسیداسیون ترکیبات حساس بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (21، 20).

با توجه به کشت گردو در بسیاری از نقاط ایران و درصد بالای پوست سبز که در عمل به صورت ضایعات هدر می‌رود، استفاده از آن به عنوان منبع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی می‌تواند مزایای اقتصادی زیادی را به دنبال داشته باشد. با عنایت به فقدان اطلاعات در خصوص تأثیر دمای استخراج و فرآیند ریزپوشانی کردن بر فعالیت آنتی-اکسیدانی و ضدمیکروبی پوسته سبز گردوی سوزنی، هدف این مطالعه در ابتدای بررسی اثر دمای استخراج و سپس بررسی تأثیر فرآیند ریزپوشانی کردن به روش خشک‌کن پاششی با استفاده از پوشش مالتودکسترین بر پایداری ویژگی‌های ذکر شده می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

مواد مصرفی: مواد شیمیایی شامل معرف فولین، سدیم کربنات، گالیک اسید، معرف 2 ،2 دی فنیل -1- پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد. متانول و اسید استیک از شرکت مرک آلمان خریداری شد. مالتودکسترین (DE =8-13) از شرکت بیوشیمیایی گلدن شل چین خریداری شد.

میوه گردو: میوه گردو در اواسط تیر ماه از یک باغ محلی (طرشت) واقع در شهر تهران تهیه گردید. گردوها از نوع سوزنی و خوشه‌ای و دارای ارتفاع کم بودند. عمر درخت‌ها حدود دوازده سال بود و عمل هرس کردن درختان در مواقع لازم انجام شده بود. در ضمن از هیچ گونه آفت‌کش شیمیایی استفاده نشده بود. در همه مراحل گردوهای کاملاً سالم، به صورت دست‌چین بدون هیچ گونه آسیبی به پوست سبز و به‌صورت کاملاً تصادفی برداشت شدند و تا پایان جداسازی پوست در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پوست-های سبز گردو بعد از پوست‌گیری در دمای اتاق و دور از نور خورشید در زیر پنکه خشک گردید. بعد از خشک شدن کامل پوسته‌ها توسط یک آسیاب برقی به صورت پودر در آمده و برای یکنواخت شدن اندازه ذرات از الک با مش 20 عبور کردند. و تا پایان آزمایش در ظروف تیره در یخچال نگهداری شدند.

فرآیند استخراج عصاره پوست سبز گردو: عمل استخراج عصاره با افزودن 5 گرم پوسته خشک شده گردو در 250 میلی‌لیتر آب در دمای محیط 25 و 80 درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه همزن مغناطیسی(IKA ETS-D5 کشور آلمان) با دور 60 دور در دقیقه انجام شد. بعد از طی مدت زمان استخراج (45 دقیقه) محتوی ارلن به وسیله کاغذ صافی واتمن به شماره 4 فیلتر گردید. و به مدت یک ساعت در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد (Ilshin کشور کره) قرار گرفته و نهایتاً عصاره‌های آبی با خشک‌کن انجمادی (Alpha 2-4 کشور آلمان) طی 14 ساعت لیوفیلیزه و خشک شد. عصاره خشک شده حاصل تا زمان انجام آزمون‌های مربوطه در دسیکاتور نگهداری شد (22).

ریزپوشانی کردن عصاره پوست سبز گردو به روش خشک‌کن پاششی: ریزپوشانی مطابق روش Díaz-Bandera و همکاران صورت پذیرفت (23). جهت ریز پوشانی عصاره‌ها از محلول10 درصد مالتودکسترین (با DE =8-13 از شرکت بیوشیمیایی گلدن شل چین) استفاده شد. بدین ترتیب بعد از اضافه کردن مالتودکسترین در آب مقطر عمل هم زدن در شرایط دمایی آزمایشگاه به آرامی انجام گرفت، تا مالتودکسترین به طور کامل حل شود. به‌منظور آبگیری بیوپلیمر مالتودکسترین، برای مدت 30 دقیقه بعد از حل شدن همزده شد. در مرحله بعد از محلول مادر عصاره (یک درصد) برای رسیدن به غلظت نهایی 0/5، 1 و 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره به محلول آبی مالتودکسترین استفاده شد. سپس به‌مدت 30 دقیقه دیگر عمل هم زدن آرام با همزن مغناطیسی صورت گرفت تا عصاره به‌طور یکنواخت درون محلول پخش شود. در هر سه محلول آماده شده غلظت نهایی

Archive of SID

www.SID.ir

مالتودکسترین 10 درصد بود، برای رسیدن به این امر در مرحله تهیه محلول مالتودکسترین حجم آب مقطر اضافه شده طوری در نظر گرفته می‌شد که در مجموع با اضافه شدن محلول مادر عصاره حجم آب نهایی به 100 برسد، به عبارت دیگر برای تهیه محلول مالتودکسترین حاوی عصاره با غلظت نهایی 0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 10 گرم مالتودکسترین در 95 میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و در ادامه با اضافه شدن 5 میلی‌لیتر از محلول مادر عصاره حجم نهایی به 100 میلی‌لیتر رسید. به همین ترتیب برای تهیه محلول‌های عصاره 1 و 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 10 گرم مالتودکسترین به ترتیب در 90 و 80 میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و با اضافه کردن به ترتیب 10 و 20 میلی‌لیتر محلول مادر عصاره تهیه شدند. نهایتاً محلول‌های تهیه شده به دستگاه خشک‌کن پاششی (مدل Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI ساخت آلمان) تزریق شدند. شرایط بهینه ریزپوشانی دستگاه به شرح ذیل بود: دمای ورودی :120درجه سانتی‌گراد، دمای خروجی : 77-75 درجه سانتی‌گراد ،سرعت تغذیه : 6/6 میلی‌لیتر در دقیقه قطر نازل : 8- 5 میلی‌متر ،جریان هوای خشک :45 –42 لیتر بر ساعت ، آسپیراتور :90 % ، سرعت پمپ :20 % (معادل 5 میلی‌لیتر بر دقیقه).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل: اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل با روش رنگ سنجی فولین سیو کالتو و مطابق روش U. Siripatrawan و همکاران انجام شد (24). ابتدا 0/1میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده (در غلظت‌های 0/5، 1 ،2 mg/ml) با 0/5میلی‌لیتر معرف فولین و 7 میلی‌لیتر آب مقطر را مخلوط نموده و به مدت 8 دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس 1/5 میلی‌لیتر کربنات سدیم (2% حجمی/وزنی) و آب مقطر اضافه شد. پس از مخلوط کردن به مدت 2 ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب آن در 765 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-VIS 1601، کشور ژاپن) خوانده شد. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار گرفته شد و میزان ترکیبات فنولی بر اساس معادل گالیک اسید در گرم وزن عصاره خشک بیان شد که از رابطه زیر محاسبه گردید (25):

$$T = C.V/M$$

که در آن T برابر مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی‌گرم بر گرم عصاره خشک)، C برابر غلظت اسید گالیک به دست آمده از منحنی کالیبراسیون (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، V برابر حجم عصاره (میلی‌لیتر) و M وزن عصاره خشک (گرم).

تعیین بازده استخراج عصاره: جهت تعیین بازده استخراج عصاره خشک، وزن عصاره خشک به دست آمده از خشک‌کن انجمادی به دست آمد و نسبت به مقدار اولیه پودر پوست گردوی مصرفی در طی فرآیند استخراج درصد گرفته شد (11).

تعیین کارایی ریزپوشانی کردن: برای تعیین مقدار عصاره ریزپوشانی شده از مقدار ترکیباتی فنولی کل موجود در ریزپوشینه استفاده شد. استخراج عصاره از ریزپوشینه‌ها طبق روش Robert و همکاران انجام شد (26). برای این منظور 200 میلی‌گرم ریزپوشینه به 2 میلی‌لیتر محلول استخراجی شامل متانول-اسید استیک- آب (به ترتیب به نسبت 50-8-42 جمی/حجمی/حجمی) اضافه شد و به مدت یک دقیقه همزده شد و در ادامه تحت اولتراسوند (Chrom Tech، کشور تایوان، به مدت 20 دقیقه در دو مرحله (با شدت 100 درصد و فرکانس 20 کیلوهرتز) قرار گرفت. بعد از این مرحله سانتریفوژ کردن در 5000 دور بر دقیقه به‌مدت 10 دقیقه انجام گرفت. مقدار ترکیباتی فنولی کل در محلول رویی با استفاده از روش رنگ سنجی فولین سیو کالتو تعیین گردید. برای محاسبه مقدار اولیه ترکیبات فنولی، در ابتدا به صورت تئوری مقدار عصاره‌ای که در 200 میلی‌گرم ریزپوشینه را انتظار داشته محاسبه و سپس مقدار ترکیبات فنولی آن محاسبه به دست آمد. درصد کارایی کپسوله کردن از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{کارایی ریزپوشانی (\%)} = \frac{\text{مقدار ترکیبات فنولی ریزپوشانی شده}}{\text{مقدار اولیه ترکیبات فنولی موجود}} \times 100$$

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: توانایی دادن الکترون یا اتم‌های هیدروژن عصاره آزاد و ریزپوشانی‌شده طبق روش Brand-Williams بر اساس بی‌رنگ شدن محلول متانولی بنفش رنگ 2 ،2 دی فنیل -1- پیکریل هیدرازیل (DPPH) به‌عنوان معرف، تعیین شد (27). برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد، ابتدا 0/1 میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی پوست سبز گردو (0/5، 1، 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را با 3/9 میلی‌لیتر محلول DPPH (محلول متانولی 0/1 میلی مولار) مخلوط نموده. سپس به مدت 60

Archive of SID

www.SID.ir

دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری گردید و سپس جذب در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریزپوشانی‌شده، 0/1 میلی‌لیتر از محلول عصاره استخراج شده از ریز پوشینه (نحوه استخراج در قسمت قبلی توضیح داده شده است) برداشته و باقی مراحل همانند مراحل توضیح داده شده در مورد عصاره آزاد صورت گرفت. درصد مهار رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار رادیکال DPPH} = \frac{\text{جذب شاهد - جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

از محلول متانولی 0/1 میلی مولار DPPH به عنوان شاهد استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریزپوشانی شده، بعد از محاسبه کارایی ریزپوشانی و با احتساب کارایی ریزپوشانی از عصاره ریزپوشانی شده توزین (با توجه به اینکه کارایی ریزپوشینه‌های تهیه شده با غلظت‌های 0/5، 1 و 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره به ترتیب 64/2، 67/7 و 70/9 به دست آمده بود، برای اینکه عصاره استخراجی از ریزپوشینه‌ها معادل میزان عصاره آزاد باشد به ترتیب 0/68، 1/32 و 2/58 میلی‌گرم ریزپوشینه به ازای هر میلی‌لیتر محلول استخراجی توزین گردید) و طبق روش ذکر شده در قسمت قبلی، عصاره از ریزپوشینه‌ها استخراج و مورد آزمون قرار گرفت.

تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره

فعال‌سازی باکتری‌های مورد بررسی: باکتری‌های *Escherichia coli ATCC 25922*، *Salmonella typhimurium ATCC 14028*، *Staphylococcus aureus ATCC 25923* و *Bacillus cereus PTCC 1154* از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. ویال لیوفیلیزه حاوی باکتری‌های فوق الذکر طبق دستورالعمل، تحت شرایط استریل از محل مورد نظر باز شد و از آن کشت مادر و سپس کشت ذخیره تهیه شد. کشت ذخیره در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در مراحل بعدی از آن استفاده شد.

روش چاهک‌گذاری در آگار: فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های 0/5، 1 و2 mg/ml عصاره آبی آزاد و ریز پوشانی شده پوست سبز گردو با استفاده از روش چاهک‌گذاری در آگار (Agar well Diffusion Method) تعیین شد (19). باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیاکلی در محیط آبگوشت BHI 24 ساعت قبل از آزمون در دمای 37 °C گرمخانه گذاری شد. در ادامه کشت سطحی با استفاده از 100 میکرولیتر محیط کشت مایع محتوی تقریباً 10^8 - 10^7 CFU/ml از باکتری‌های مذکور در محیط کشت جامد BHI انجام گرفت.

در مرحله بعد در هر پلیت سه چاهک با قطر 6 میلی‌متر توسط سر پیپت پاستور استریل ایجاد شد. و در درون هر چاهک بیست میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و ریزپوشانی شده (معادل عصاره آزاد، در قسمت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توضیح داده شد) ریخته شد. سپس پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله‌ها با کمک کولیس با دقت 0/02 میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. قطر هاله تشکیل شده (بر حسب میلی‌متر) به عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی در نظر گرفته شد. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری بر روی سطح پلیت، یک پلیت کشت داده شده فاقد عصاره، در نظر گرفته شد. همچنین از یک پلیت فاقد باکتری نیز برای اطمینان از عدم آلودگی محیط‌های کشت استفاده گردید (5).

تجزیه آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت. به منظور مقایسه میانگین‌های به دست آمده از بازده و مقادیر فنولی کل در دو دمای مختلف از آزمون t-test استفاده شد. همچنین به منظور بررسی اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره پوست سبز گردو از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده گردید. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد از آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range Tests) استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، در سطح معنی‌داری (α=0/05) انجام شد و تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

• یافته‌ها

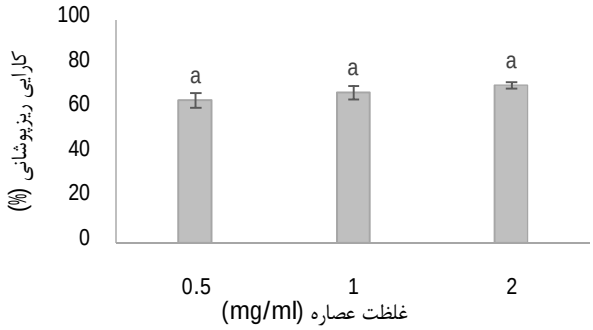
بررسی مقادیر ترکیبات فنولی عصاره: جدول 1 تأثیر دمای استخراج، بر میزان ترکیبات فنولی کل و بازده استخراجی را نشان می‌دهد. نتایج حاصله نشان داد که دمای حلال تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنولی استخراجی و نیز بازده استخـــراج داشت ($P < 0/05$). مقادیر فنول کل عصاره‌های استخراجی پوسته سبز گردو در دماهای مختلف، با یکدیگر متفاوت بودند.به طوری که مقدار ترکیبات فنولی عصاره استخراجی در دمای 80 درجه سانتی‌گراد برابر با 39/77 میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک بود. که معادل 1/4 برابر میزان فنول کل عصاره در دمای 25 درجه بود. بازده استخراجی در 80 درجه سانتی‌گراد تقریباً معادل 1/6 برابر بازده عصاره استخراجی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد بود.

جدول 1. محتوای فنولی کل عصاره آبی پوست سبز گردو و بازده استخراجی در دماهای 25 و 80 درجه سانتی‌گراد [a,b]

دمای استخراج	بازده استخراج (درصد)	محتوای فنولی کل عصاره (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک عصاره)
دمای محیط (25°C)	28/05 ±0/78[a]	28/88 ± 0/75[a]
دمای 80 °C[b]	43/81 ±0 /61[b]	39/77 ± 0/76[b]

[a] میانگین ± انحراف استاندارد ؛ [b] مقادیر با حروف غیرمشابه در هر ستون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0/05$) می‌باشد.

بررسی کارایی ریزپوشانی کردن: شکل 1 درصد کارایی ریز پوشانه‌های عصاره استخراجی پوست سبز گردو در غلظت‌های مختلف (mg/ml 2، 1، 0/5) را در پوشش مالتو دکسترین نشان می‌دهد. نتایج حاصله نشان داد که غلظت عصاره تأثیر معناداری بر روی درصد کارایی ریز پوشـــانه‌هـــا داشت ($P<0/05$). کارایی ریزپوشانی کردن محاسبه شده توسط روش Robert و همکاران در دامنه 70/9-64/4 درصد بود. درصد کارایی ریزپوشینه‌ها در غلظت‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بودند. در غلظت 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر کارایی ریز پوشینه‌ها از سایر غلظت‌ها بیشتر بوده (70/9%). و کمترین میزان کارایی در غلظت 0/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده گردید (64/4%).



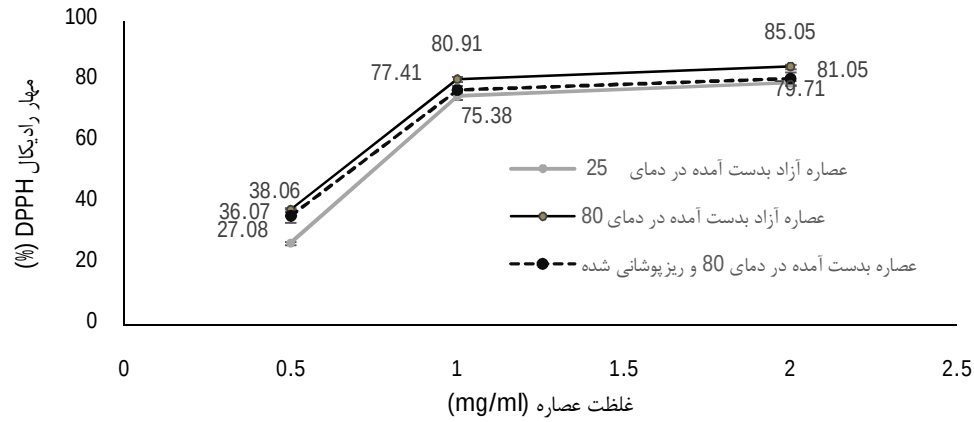
شکل 1. درصد کارایی ریز پوشانه‌های تابع غلظت عصاره استخراج شده پوست سبز گردو در دمای 80 درجه سانتی‌گراد

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده: شکل 2 میزان مهار رادیکال DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف و دمای مختلف استخراج عصـــــاره آزاد و ریز پوشانی شده را، نشـان می‌دهد. با بررسی نتایج مشخص گردید که دما و غلظت عصاره‌ها تأثیر معنی‌داری روی مهار رایکال آزاد DPPH داشتند ($P < 0/05$). فعالیت آنتی رادیکالی عصاره آزاد و ریز پوشانی شده، در هر دو دما وابسته به میزان غلظت عصاره بود. عصاره آزاد و ریز پوشانی شده در دمای 80 درجه سانتی‌گراد در همه غلظت‌ها فعالیت آنتی رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره به دست آمده در دمای 25 درجه سانتی‌گراد را داشت. بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و ریز پوشانی شده تفاوت وجود داشته، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. معمولاً برای مقایسه فعالیت آنتی رادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌گردد. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد، که در آن 50 % از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند، بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده فعالیت آنتی رادیکالی بالاتر عصاره می‌باشد. و با توجه به شکل 2 می‌توان گفت عصاره آزاد استخراج شده در دمای 80 درجه سانتی‌گراد کمترین میزان EC_{50} نسبت به عصاره ریز پوشانی شده و استخراج شده در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و عصاره آزاد استخراجی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد داشت.

بررسی فعالیت ضد میکروبی آزاد و ریزپوشانی شده: جدول 2 نتایج حاصل از میزان هاله عدم رشد باکتری‌های مورد آزمایش در اطراف هر چاهـک را در مورد عصاره آزاد و ریز پوشانی شده استخراج شده در دمای 80 درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2. میزان مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره پوست سبز گردو به‌صورت آزاد و ریزپوشانی شده

جدول 2. فعالیت ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و ریزپوشانی شده پوست سبز گردوی استخراج شده در دمای 80 °C

	غلظت عصاره (mg/ml)	منطقه بازداری (mm)			
		S. aureus	*B. cereus*	*E.coli*	*S. typhimurium*
عصاره آزاد	0/5	8/93 ± 0/89[a]	8/3 ± 1/02 [ab]	-	-
	1	12/13 ± 0/83[b]	10/42 ± 1/13[b]	-	-
	2	15/33 ± 1/04[c]	14/45 ± 1/35[c]	-	-
عصاره ریزپوشانی‌شده	0/5	8/06 ± 1/50[a]	6/23 ± 1/00[a]	-	-
	1	11/06 ± 0/15[b]	9/75 ± 1/65[b]	-	-
	2	14/83 ± 0/ 28[c]	13/76 ± 1/88[c]	-	-

[a] میانگین ± انحراف استاندارد ؛[b] مقادیر با حروف غیرمشابه در هر ستون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0/05$) می‌باشد.

عصاره آزاد و ریز پوشانی شده پوسته سبز گردو بر روی میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیاکلی* بررسی گردید. علی رغم اینکه غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و ریز پوشانی شده پوست سبز دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشند، اما به نظر می‌رسد پاسخ آزمون انجام گرفته روی میکروارگانیسم‌ها یکسان نیست. به طوری که اغلب باکتری‌های گرم مثبت دارای حساسیت، نسبت به ترکیبات ضد میکروبی عصاره پوست سبز می‌باشند. همچنین با افزایش غلظت عصاره آزاد و ریز پوشانی قطر هاله تشکیل شده افزایش یافت. در مورد باکترهای گرم مثبت، *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به باکتری *باسیلوس سرئوس* حساس‌تر بود. به طوری که در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره آزاد از 0/5 به 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب از 8/93 میلی‌متر به 15/33 میلی‌متر و در عصاره ریز پوشانی شده از 8/06 میلی‌متر به 14/83 افزایش یافت. در حالی که در مورد باکتری *باسیلوس سرئوس* این افزایش از 8/3 به 14/45 میلی‌متر در عصاره آزاد و 6/23 به 13/76میلی‌متر در عصاره ریز پوشانی شده بود. و به طور کلی عصاره آزاد در هر سه غلظت به نسبت عصاره ریز پوشانی شده تأثیر بیشتری در رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* داشته است. البته این میزان اختلاف، در سطح معنی‌دار نبوده است. این امر نشان دهنده عدم تأثیر فرآیند ریزپوشانی در فعالیت بیولوژیکی عصاره می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیاکلی* در سه غلظت مورد مطالعه در هر دو آزمون مقاومت نشان دادند. و بر طبق گزارش Darmani و همکاران در سال 2006 که روی گونه‌های مختلف باکتری گرم مثبت و منفی کار کرده‌اند گزارش نمودند که عصاره آبی گردو روی باکتری‌های گرم مثبت اثرگذار است. که با نتیجه حاصل از آزمون ما مطابقت دارد. در غلظت 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

عصاره آزاد و ریز پوشانی شده حاصله دارای بهترین نتیجه جهت مهار فعالیت میکروارگانیسم‌های گرم مثبت بود.

• بحث

مقادیر ترکیبات فنولی: همان‌طور که مشاهده می‌شود در روش استخراج غرقابی آب داغ بیشتر از آب 25 درجه سانتی‌گراد، ترکیبات فنولی را استخراج نمود (28). در استخراج غرقابی، قابلیت استخراج حلال‌های مختلف اساساً بستگی به حلالیت ترکیب مورد نظر در حلال، سینتیک انتقال جرم محصول و قدرت برهم کنش ماتریکس و ماده حل شونده دارد (29). ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از دماهای مختلف از نظر مقدار ترکیبات فنولی کل، بازده استخراجی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتند. مقدار فنول کل در آب داغ به نسبت آب با دمای محیط بالاتر بوده است که دلیل آن را می‌توان این گونه تفسیر کرد که دمای بالا موجب نفوذ بهتر حلال به درون ماتریکس و حلالیت بالاتر ترکیبات فنولی در حلال می‌گردد (18). در واقع آب داغ برخی از پلی ساکاریدهای پکتیکی را از دیواره سلولی استخراج می‌کند و موجب شکستن دیواره سلولی می‌گردد. در نتیجه حلال آب در تماس با مواد فنولی قرار می‌گیرد و بازیابی ترکیبات فنولی بهبود می‌یابد (30). همچنین در بافت نرم میزان استخراج افزایش می‌یابد (11). افزایش دما همچنین کشش سطحی و ویسکوزیته حلال را کاهش داده و سرعت انتشار و سرعت انتقال جرم را در حین استخراج افزایش می‌دهد (31). البته دمای بالای آب (حلال) قطبیت حلال را کاهش داده و بنابراین توانایی حل کردن ترکیباتی با قطبیت کمتر بهبود می‌یابد (32). همچنین دما پایداری ترکیبات فنولی را به علت تجزیه آنزیمی و یا حرارتی تحت تأثیر قرار می‌دهد (28). چرا که آنزیم‌های موجود در پوست سبز گردو (پلی‌فنول اکسیداز - عامل واکنش قهو ه ای شدن آنزیمی) که سوبسترای آنها ترکیبات فنولی هستند، توسط حرارت‌های بالا هر چند که مقاوم هستند غیر فعال می‌شوند (11).

کارایی ریزپوشانی کردن: یکی از اولین ویژگی‌هایی که در مورد فرآیند ریزپوشانی کردن مدنظر قرار می‌گیرد تعیین کارایی ریزپوشانی کردن است تا به‌نوعی به مؤثر بودن فرآیند بکار رفته جهت تهیه ریزپوشینه‌ها پی برد. در این تحقیق از پوشش مالتودکسترین جهت ریزپوشانی‌کردن عصاره پوست سبز گردو استفاده شد. در حقیقت کارایی ریزپوشانی نشان می‌دهد که چه مقدار از عصاره پوست سبز گردو اولیه بکار رفته، در ریزپوشینه‌ها بارگذاری شده است. مطابق پیشنهاد Soppimath و همکاران (2001) بارگذاری داروها در پوشش-های پلیمری تجزیه‌پذیر از طریق دو فرآیند اصلی به دست می‌آید: در ابتدا به‌وسیله بدام افتادن در زمان تشکیل ریزپوشینه و دوم از طریق جذب سطحی دارو بعد از تشکیل ریزپوشینه (33). از آنجایی که یکی از ویژگی‌های مالتودکسترین‌ها خاصیت چسبندگی با قدرت بالا می‌باشد، انتظار می‌رود که عصاره پوست سبز گردو بدام افتاده در داخل ریزپوشینه و پیوند شده در سطح هر دو با هم به‌عنوان کارایی ریزپوشانی در نظر گرفته شود. در ریزپوشینه با افزایش مقدار اولیه عصاره پوست سبز گردو کارایی ریزپوشانی افزایش یافت. دلیل این افزایش می‌تواند به ویژگی نشاسته‌های دکسترینه مرتبط باشد. چراکه در این نوع نشاسته‌ها اتصالات جدیدی غیر از اتصالات (4-1) α و (6-1) α ممکن است به وجود آید و شرایط را برای تمایل بیشتر گلوگزهای موجود به احیاء کنندگی بیشتر با سایر ترکیبات (هسته) را ایجاد نماید. پس با وجود این ظرفیت در ماده پوشاننده، با افزایش مقدار هسته مقادیر بیشتری از ترکیبات هسته با ماده پوشاننده پیوند محکمی را ایجاد می‌نمایند (20).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در این آزمون رادیکال‌های DPPH با آنتی‌اکسیدان یا دیگر گونه‌های رادیکالی فلاونوئیدهای موجود در برگ سبز گردو که دارای ویژگی مهار رادیکال آزاد هستند (34)؛ واکنش داده و در نهایت مقدار DPPH را کاهش می-دهند. بین غلظت (مقدار پلی فنول) و فعالیت ضد رادیکالی ارتباط مستقیم وجود دارد چرا که در غلظت‌های بالا با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیلی ترکیبات فنولی مواجه هستیم که احتمال اهداء هیدروژن را به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (35) و همچنین رادیکال‌های DPPH از رنگ بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌شوند (15). اما در غلظت‌های بالاتر مهار رادیکال‌های آزاد تغییر محسوسی ندارند. زیرا یک غلظت بحرانی از فنول‌ها برای کسب فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب کافی است و در غلظت بالاتر از حد اشباع تأثیری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ندارند (36). عصاره پوست گردو سرشار از ترکیبات فنولی است. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال آزاد را دارند. تفاوت

Archive of SID

www.SID.ir

در میزان فعالیت آنتی رادیکالی به دلایل مختلف مرتبط می‌باشد. ولی عمده‌ترین آن تفاوت در نوع و مقدار ترکیبات مؤثر موجود در عصاره می‌باشد. مهم آن است که تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار آنتی‌اکسیدانی معمولاً فاکتور تعیین کننده نیست. بلکه موقعیت گروه‌های هیدروکسیل، حضور گروه‌های عاملی دیگر مانند پیوند دوگانه و ترکیب گروه‌های هیدروکسیل و گروه کتونی نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند (28). هرچند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریزپوشانی شده نسبت به عصاره آزاد اندکی ضعیف‌تر می‌باشد. این موضوع به این دلیل است که ممکن است برخی از ترکیبات فنولی با نقطه جوش پایین ممکن است در طی فرآیند خشک‌کن پاششی از بین بروند. و یا اینکه ماده هسته ممکن است به جای قرار گرفتن در داخل کپسول، روی سطح کپسول قرار گیرد که این امر اکسیداسیون این ترکیبات و کاهش جزیی را سبب خواهد شد. همچنین این کاهش را می‌توان به عدم دسترسی عصاره ریزپوشانی شده به دلیل برهمکنش آن با اجزای دیواره ریزپوشینه نسبت داد. اما به هر حال، این اختلاف معنی‌دار نبوده است (37). و نتایج حاصله نشان داد که عصاره آزاد و ریز پوشانی شده پوست گردو در واکنش مهار رادیکال توانمند می‌باشد.

فعالیت ضد میکروبی: رتبه بندی‌های به وجود آمده روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد که با افزایش میزان غلظت عصاره آزاد و ریزپوشانی شده در باکتری‌های گرم مثبت میزان هاله عدم رشد نیز به مراتب افزایش می‌یابد، و در باکتری‌های گرم منفی هاله‌ایی مشاهده نگردید. که همه این موارد به محتوای فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی و همچنین کوئرستین و مشتقاتش در عصاره‌ها مرتبط دانست. به طوری که کوئرستین و مشتقات از طریق مهار آنزیم DNA ژیراز موجب مهار رشد باکتری می‌شود (34). و از آنجا که کوئرستین 3 گالاکتوزید ترکیب اصلی فنول‌ها می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت مکانیسم مهاری عصاره‌ها از طریق غیرفعال کردن آنزیم DNA ژیراز باکتری و به دنبال آن مهار تکثیر باکتری اتفاق می‌افتد (17). همان‌طوری که زرین قلم و همکاران در سال 2006 مطالعه‌ای در این زمینه روی فلفل سیاه و قرمز و آویشن شیرازی انجام دادند این مطلب را تأیید می‌کند. که از طریق غیرفعال کردن آنزیم DNase ، *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار می‌گردد (38). همچنین پیشنهاد شده است که ماهیت هیدروفوب ترکیبات تشکیل دهنده عصاره‌ها و اسانس‌ها توانایی نفوذ آنها به لیپیدهای غشای سلولی و میتوکندری را فراهم نموده و سبب بهم ریختگی ساختار و افزایش نفوذپذیری غشا و لذا نشت یون‌ها، ATP و سایر ترکیبات سلولی می‌شوند و یا برهمکنش آنها با آنزیم‌هایی که بر دیواره سلولی قرار گرفته اند، مکانیسم اصلی برای عملکرد ضد میکروبی آنها است (39). به طور عمده باکتری‌های گرم منفی به نسبت گرم مثبت‌ها مقاوم‌تر می‌باشند. این پدیده به علت وجود لایه خارجی لیپوپلی ساکاریدی اطراف دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی است که نفوذ ترکیبات هیدروفیل را محدود نموده و لذا کارایی اثر ضد میکروبی اسانس کاهش می‌یابد (17). Oliveira و همکاران هم در گزارشی در سال 2008 اعلام کردند که عصاره پوسته گردو با MIC 0/1 بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر است *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان حساس‌ترین باکتری بوده است (22) که نتایج حاصله با مطالعه فوق مطابقت دارد. با توجه به اینکه در این تحقیق تا غلظت mg/ml 2 عصاره استفاده شده بود، عدم جلوگیری از فعالیت باکتری *اشرشیاکلی* به این دلیل است که این مقدار برای جلوگیری از رشد کافی نبوده به طوری که محققین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره پوست سبز گردو را برای *اشرشیاکلی* 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند. البته عصاره ریز پوشانی شده به نسبت عصاره آزاد از فعالیت ضد میکروبی کمتری برخوردار بود که می‌توان این امر را به کاهش جزیی در ماهیت ترکیبات فنولی بر اثر حرارت به کار گرفته شده در طی فرآیند خشک‌کن مرتبط دانست (37). هر چند که این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان از ریزپوشانی کردن عصاره پوست سبز گردو به وسیله بیوپلیمر مالتودکسترین به عنوان راهکاری جهت حفاظت و پایداری عصاره از شرایط محیطی استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده میزان رهش عصاره پوست سبز گردو از ریزپوشینه تحت شرایط محیطی مختلف و حتی در سیستم‌های غذایی مورد مطالعه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم صنایع غذایی گرایش کنترل کیفیت شعبه بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

• References

1. Salamat F, Kivani S, Emami M, Amin Gh, Adimi P. Effect of walnut green husk on antifungal activity of microsporum canis,trichophyton mentagrophytes,epidermophyton floccosum,aspergillus niger,candida albicansmicrosporum canis,trichophyton mentagrophytes,epidermophyton floccosum,aspergillus niger,candida albicans;in broth dilution. Midica magsen of azad university 2006; 16: 201-5[in Persian].
2. Lachman J, Orsk M, Hejtmnkov A, Kovrov E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. LWT- Food Science and Technology 2010; 43:52-8.
3. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira I, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (Juglans regia L.) cultivars. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 2103–11.
4. Oliveira I, Anabela S, Valenta P, Bandrade P , Albino B , Federico F,et al. Hazel (Corylus avellana L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. Food Chemistry 2007; 105:108–25.
5. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valenta P, Andrade P , Ferreira I, et al .Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology 2007; 45: 2287-95.
6. Stampar F, Solar A, Hudina M, Veberic R, Colaric M. Traditional walnut liqueur cocktail of phenolics. Food Chemistry 2006; 95: 627-31.
7. Tabatabai M, Ahmadi A. Walnut. 2nd ed. Tehran: Jahad Keshavarzi. Press; 2008, p. 94-110 [in Persian].
8. Bilger B, Solhaug K. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (Malus domestica Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-β irradiation. Postharvest Biology and Technology 2007; 45:1-10.
9. Wijngaard H, Rle H, Brunton C. Survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry 2009; 116: 202-7.
10. Cosmulescu S, Trandafir I, Achim Gh, Botu M, Baciu A, Gruia M. Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici 2010; 38:53-6.
11. Li BB, Smith B, Hossain M. Extraction of phenolics from citrus peels. Separation and Purification Technology 2006 ; 48:182-8.
12. Klein T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCPd. Microparticles containing guarana extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. Revista Brasileira de Farmacognosia 2015; 25: 292–300.
13. Zhiyong H, Mingzhu X, Zeng M , Fang Qin, Chen J. Interactions of milk a- and β-casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts. Food Chemistry 2016;199: 314–22.
14. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. Journal of Liposome Research 2014;25:1-8.
15. Zhang Z, Liao Li, L Moore, J Wu, T Wang. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans regia L.). Food Chemistry2009; 113:160-5.
16. Nedovic V, Manojlovic V, Levic S, Bugarskib B. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science 2011; 1:1806-15.
17. Rahimipanah M, Mirzapour M. Analysis of some factors affecting the phenolic compounds extracted from green husk of walnut (Juglans regia L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2011; 27:419 - 30[in Persian].
18. Pereira PF, Marcelino M, Valento F, Andrade P, Seabra F, Estevinho R, et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (Olea europaea L. Cv. Cobrancosa) leaves Molecules 2007; 12: 1153-62.
19. Hejri A, Gharanjig K, Hejazi M. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (Phaseolus vulgaris L.). Food Research International 2010; 43:516-9[in Persian].
20. Ozyıldız F, Basal G, Uzel A, Bayraktar O. Microencapsulation of ozonated red pepper seed oil with antimicrobial activity and application to nonwoven fabric. Letters in Applied Microbiology 2012; 56: 168-79.
21. Farahnaki A, Mesbahi Gh. Properties of hydrocolloids. 1nd ed. Tehran .food and pharmaceutical applications.: Iran Agriculture of Science .Press; 2008 [in Persian].
22. Oliveira I, Anabela S, Morais J, Ferreira I, Albino B, Estevinho L, Pereira J A. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (Corylus avellana L.) cultivars. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 1801-7.
23. Diaz-Bandera D, Villanueva-Carvajal A, Dublan-Garcia O, Quintero-Salazar B, Domingues-Lopez A. Assessing release kinetics and dissolution of spray-dried Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extract encapsulated with different carrier agents. Food Science and Technology 2015;15: 1 – 27.
24. Siripatrawan U, Harte BR. Physicalproperties and antioxidantactivityofanactive film fromchitosan incorporatedwithgreenteaextract. Food Hydrocolloids 2010; 24: 770-5 .
25. Sharma P, Bhardwaj R, Yada A, Sharma R A. Antioxidant Properties of Methanolic Extracts of Boerhavia diffusa. Reserch Journal of Phytochemistry 2014;8:119-26.
26. Robert P, Gorena T, Romero N, Sepulveda E, Chavez J, Saenz C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (Punica granatum) by spray drying. International Journal of Food Science and Technology 2010; 45: 1386–94.
27. Williams B, Cuvelier ME , Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm-Wiss u-Technol 1995; 28: 25-30.
28. Rezai S, Jafari M, Khamiri M, Bayat H. Effect of solvent and method extraction on antioxidant activity walnut

Archive of SID

www.SID.ir

green husk extraction (shahmirzad). Food Technology & Nutrition2015; 12: 85-95 [in Persian].

29. Spigno G, Marco DFD. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering 2007; 81:200-8.

30. Li BS, Hossain B. Extraction of phenolics from citrus peels. Separation and Purification Technology 2006; 48:182-8.

31. Ramos L, Kristenson E, Brinkman M. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. Journal of Chromatography 2002; 975:3-29.

32. Cacace J, MazzaE. Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed. Food Eng. 2006;77:87-95.

33. Soppimath AT, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. Journal of Controlled Release 2001;70:1-20.

34. Rezai Erami S, Khomeiri M, Bayat H. Evaluation of antimicrobial activity of walnut leaves and green husk extracted by microwave-assisted extraction. EJFPP 2012; 3: 31-41[in Persian].

35. Moreno S, Larrauri C, Saura-Calixto J. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International 1999; 32: 407-12.

36. Rumbaoa C, Gernomio D. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (Solanum tuberosum) tubers. Journal of Food Composition and Analysis 2009; 22: 546-550.

37. Sadif Azadmard SE. Nano encapsulation of bioactive compounds in food systems. Tabriz: Amidi 2013[in Persian].

38. Zaringhalam moghaddam M, Sattari M. Effect of black pepper, red pepper and Zataria multiflora Boiss. alcoholic extracts on growth and DNase activity of Staphylococcus aurous. Journal of Medicinal Plants 2007; 24: 17-21.

39. Hosseini SM, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mortazavian AM, Mohammadi A, Khosravi-Darani K, et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multipleemulsion/ionic gelation process. International Journal of Biological Macromolecules 2013; 62: 582– 8.

Archive of SID

www.SID.ir

A Comprative Study of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Walnut Green Husk Aqueous Extract before and after Microencapsulation

Cheraghali F[1], Mirmoghtadaie L[2], Shojaee-Aliabadi S[2], Hosseini SM[3]*

1-M.Sc Student of Food Science and Technology –Quality control, Faculty of Nutrition Sciences and FoodTechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,International branch Tehran, Iran.

2-Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, NationalNutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and FoodTechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*3-*Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, NationalNutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, E-mail: sm_hosseini@sbmu.ac.ir*

Received 20 Dec, 2015 **Accepted 1 Feb, 2016**

Background and Objectives: Walnut green husk is one of agricultural residues that can be considered as natural compound with biological properties because of its phenolic compounds. In the present work, the goal is extraction of aqueous extract of green walnut skin and studying the effect of extraction temperature on the phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of extract. Meanwhile, the effects of spray dried encapsulation process of extract in maltodextrin on the biological activity of extract are investigated.

Materials and Methods: In this study, walnut green husk (Sozani variety) was extracted in two temperatures of 25 and 80 °C. Then it was encapsulated in 10% maltodextrin in three different concentrations of extract (0.5, 1 & 2 mg/ml) using spray drying method. Total phenol of the extract was evaluated before and after encapsulation. In addition, the antioxidant activity of the aqueous extract of walnut green husk was determined before and after microencapsulation by the scavenging effect on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals. Antimicrobial activity of the extract was determined by Agar well Diffusion Method against gram positive (Bacillus cereus, staphylococcus aureus) and Gram negative bacteria (Escherichia coli, Salmonella Typhimurium).

Result: It was revealed that the effect of extraction temperature on total phenolic compounds was significant ($p<0.05$). The samples extracted in 80°C had more phenol components (39.77 mg GAE/g) than the samples extracted in room temperature (28.88 mg GAE/g). Encapsulation efficiency was increased by increasing the extract concentration. The 2 mg/ml concentration of free and microencapsulated extract obtained at 80 °C had the highest scavenging effect on the DPPH radicals (85.05 & 81.05%, respectively). In addition, 2 mg/ml concentration of free and microencapsulated aqueous extracts of walnut green husk showed the highest inhibitory effect against Gram-positive bacteria. The results further showed no significance differences in the antioxidant and antimicrobial activities of free and microencapsulated aqueous extracts of walnut green husk.

Conclusion: Sozani walnut green husk can be used as a cheap source of antioxidant and antimicrobial compounds due to having high amount of phenolic compounds. Therefore, microencapsulation can be used as an efficient method for increasing the stability of walnut green husk extract against the environmental conditions.

Keywords: Walnut green husk, Aqueous extracts, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Microencapsulation

Archive of SID

www.SID.ir