

بررسی متغیرهای زمان، ترکیب حلال استخراجی و نسبت حلال به گیاه بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی گیاه تشنه داری و برگ زیتون به کمک روش استخراج ریزموج و مافوق صوت

مهسا ابوالفتح^۱، نازنین چلوبی^۱، ساناز عسگری^۱، سید احسان بلادیان^۲، وحید قاسم زاده محمدی^۳

۱- گروه تغذیه و بهداشت مواد غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان ایران

۲- گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول: استادیار گروه تغذیه و بهداشت مواد غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان ایران. پست الکترونیکی: v.gh-mo@umsha.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از روش‌های نوین عصاره‌گیری برای دستیابی بهینه به خواص عصاره‌های گیاهی بسیار قابل توجه است. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره گیاه تشنه‌داری و برگ زیتون در دو روش استخراج با امواج ریزموج و فراصوت بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: پس از طراحی آزمایش به روش Box-Behnken، استخراج‌ها با دستگاه‌های مایکروویو برای بررسی اثر ریزموج و حمام فراصوت برای بررسی اثر فراصوت انجام شد. محتوای فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی به ترتیب با استفاده از ترکیب فنلی کل یا TPC و ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) تعیین شد. روش میکرودایلوشن برات برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بکار گرفته شد.

یافته‌ها: مؤثرترین متغیر مستقل در استخراج در هر دو روش و در هر دو گیاه نسبت حلال به گیاه بود. نسبت اتانول در حلال استخراج کننده بر TPC و بازده تأثیرگذار بود. بیشترین میزان TPC برای برگ زیتون 0.26 ± 5.34 میلی‌گرم بر گرم و برای تشنه‌داری 0.14 ± 2.89 میلی‌گرم بر گرم با روش فراصوت به دست آمد. همچنین بیشترین درصد بازداری رادیکال DPPH برای برگ زیتون $2/6 \pm 52/13$ درصد و برای تشنه‌داری $2/76 \pm 55/24$ درصد و با تابش ریزموج بود. کمترین میزان MIC برای عصاره برگ زیتون و به روش فراصوت بدست آمد (0.05 ± 0.47 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

نتیجه‌گیری: هر دو روش استخراج به دلایل تفاوت‌های ساختاری و ترکیبات موجود در دو گیاه، اثرگذاری متفاوتی بر خصوصیات عصاره داشته‌اند. بیشترین میزان ترکیبات فنولی هر دو گیاه را استخراج با امواج فراصوت و بیشترین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی را استخراج به کمک تابش ریزموج داشت. برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری پتانسیل مناسبی برای کاهش آلودگی لیستریا مونوسیتوژنز از خود نشان دادند.

واژگان کلیدی: ریزموج، فراصوت، برگ زیتون، گیاه تشنه‌داری، لیستریا مونوسیتوژنز

پیام‌های اصلی

- نسبت حلال به گیاه مؤثرترین متغیر بر پاسخ‌ها در هر دو روش و هر دو گیاه بود.
- روش ریزموج و فراصوت عصاره‌ها با خصوصیات مختلف آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی تولید کردند.
- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH در هر دو روش کمتر از سایر پاسخ‌ها تحت تاثیر زمان استخراج بود.

● مقدمه

عصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، در جهان و مخصوصاً ایران پیشینه پربری داشته و در صنایع مختلفی استفاده می‌شوند (۱، ۲). گیاهان متنوعی مثل *Oleo Europea* یا زیتون و گیاه *Scrophularia striata* معروف به تشنه‌داری در ایران و بسیاری دیگر از گیاهان این مناطق نیز اکنون به عنوان منبع دارویی، افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی، مورد توجه هستند (۳، ۴). گیاه زیتون شامل تقریباً ۲۰ گونه از درختان خانواده زیتونیان با برگ‌های همیشه سبز بوده و در حوزه دریای مدیترانه و جنوب شرقی آسیا و مناطق دیگر پراکندگی گسترده‌ای دارد. اولئوروپین (Oleuropein) فراوان‌ترین نوع بیوفنول در برگ‌های این گیاه است. این ماده اثرات ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی از خود نشان داده است (۵-۷).

Scrophularia striata که از تیره *Scrophulariaceae* و عضو خانواده بزرگی از نهان‌دانگان است، به‌طور گسترده در جنگل‌های برگ‌ریز اروپا، آسیای میانه و بخصوص در ناحیه مدیترانه وجود دارد، ۵ گونه آن در ایران و در رشته‌کوه‌های زاگرس می‌روید و نام محلی آن در استان ایلام تشنه‌داری است. این گیاه از قدیم به‌عنوان یک داروی ضد باکتری برای درمان عفونت چشم، سرماخوردگی و مشکلات تنفسی استفاده می‌شده و تحقیقات متعددی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه را نشان داده است (۸). ترکیباتی مانند آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای رزین و اسید کریپتوفیلیک نیز معمولاً در قسمت‌های مختلف این گیاه یافت می‌شود (۹). به کارگیری تکنیک‌های نوین استخراج که بهترین و بیشترین بازده را از گیاهان دارویی در اختیار ما بگذارد اهمیت بالایی دارد. روش‌های سنتی دستیابی به عصاره‌ها مثل تقطیر آبی یا بخار آب و استخراج با حلال آلی معایبی مانند اتلاف ترکیبات فرار، بازده پایین، طولانی‌شدن زمان استخراج و باقی ماندن حلال سمی را به دنبال دارند، همچنین کاربرد گسترده، قیمت بالا و گسترش روش‌های نوین شده است (۱۰). در دهه‌های اخیر تکنیک‌های مختلفی شامل استخراج با فراصوت (UAE) (Ultrasound-assisted extraction) و ریزموج (MAE) (Microwave-assisted extraction) و غیره مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۱). امواج ریزموج، تشعشع الکترومغناطیسی غیر یونیزه کننده می‌باشد که به‌طور چشمگیری مدت استخراج را

کاهش و عملکرد را افزایش داده و کیفیت عصاره را بهبود می‌بخشد (۱۲). در این روش، فرایند استخراج مبتنی بر اصل چرخش دوقطبی و هدایت یونی می‌باشد که استخراج به کمک ریزموج را به یک روش امیدوارکننده تبدیل می‌کند. گرمایش ریزموج‌ها اساساً متفاوت از گرمایش معمولی است و به طور انتخابی و کارآمد فقط توسط ترکیبات قطبی جذب می‌شود (۱۳). فرآیند ریزموج با انجام سه مرحله شامل ۱- ایجاد حرارت با ارتعاش مولکول‌های آب و سایر مولکول‌های قطبی در مواد گیاهی، ۲- شکستن دیواره‌های سلولی به کمک حرارت تولید شده در داخل بافت گیاهی و ۳- تسریع انتشار مواد در اثر دو عامل قبلی و حلال به کار گرفته شده در نهایت منجر به استخراج ترکیبات در حلال استخراج‌کننده می‌شود (۱۴). استخراج به کمک امواج فراصوت را می‌توان جایگزین جدید، ارزان، سریع و کارآمد برای روش‌های متداول استخراج دانست (۱۵). این امواج در فرکانس‌های ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز در ماده پخش می‌شوند و چرخه‌های انبساط و فشرده‌سازی ایجاد می‌کنند. در یک مایع با ایجاد چرخه‌های فشار منفی با استفاده از انرژی صوتی باعث ایجاد حفره و رشد حباب می‌شود. عملکرد فراصوت به پدیده کاویتاسیون (تشکیل، رشد و متلاشی شدن حباب‌های کوچک در اثر ایجاد فشار منفی بزرگ در محیط مایع) نسبت داده شده که منجر به اختلال در سلول و بهبود استخراج و انتقال مواد از گیاه به محیط مایع (حلال) می‌شود (۱۶). استخراج به کمک فراصوت نیز با کاهش مدت زمان انجام کار، تشدید انتقال حرارت و انتقال جرم، بازده و کیفیت عصاره‌ها را افزایش می‌دهد (۱۷). هر دو روش ریزموج و فراصوت معمولاً برای افزایش انحلال پلی‌ساکاریدها به دلیل کارآمدی آن‌ها در تخریب مکانیکی یا بیولوژیکی دیواره سلول‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند و به حلال کمتری نیاز دارند. با این حال پایداری اکسیداتیو و خواص فیزیکوشیمیایی روغن‌ها از ماتریکس گیاهان مختلف تحت تأثیر این دو روش قرار می‌گیرند ولی تأثیر آن‌ها بر ثبات اکسیداتیو و خصوصیات فیزیکوشیمیایی عصاره‌ها مشخص نیست (۱۸). استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مثل عصاره‌های گیاهی، جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی پرخطر هستند. هدف از استفاده از این نگهدارنده‌ها تولید غذاهای ایمن بوده و می‌توان از آن‌ها به منظور کنترل رشد میکروارگانیسم‌های انتقال یافته از مواد غذایی از جمله لیستریا مونوسیتوژنز استفاده کرد. باکتری‌های جنس لیستریا،

معرف (DPPH) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ، Folin Ciocalteu، اسید آسکوربیک، اتانول، کربنات سدیم، اسید گالیک و حلال دی متیل سولفواکسید DMSO از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. محیط‌های کشت مولر هینتون آگار و برات نیز از شرکت Quelab کانادا و بافر فسفات سالین از شرکت فارمد ایران تهیه شدند. گیاهان تشنه داری و برگ زیتون نیز از فروشنده‌های معتبر در شهر همدان خریداری شد.

استخراج عصاره‌های برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری به روش ریز موج و تشنه‌داری

جهت تهیه عصاره‌ها به روش ریزموج، ۱ گرم گیاه خشک (برگ تازه آسیاب شده) به داخل ظرف استخراج دستگاه منتقل شد. دستگاه ریزموج از نوع درب باز با توان ۹۰۰ وات بود (بوتان مدل CE245G) که با کمک مبرد از خروج آب و اسانس جلوگیری شد (۲۱). مدت زمان تابش، نسبت آب و الکل و نسبت آب به برگ طبق طراحی آزمایش انجام شده لحاظ شد. بعد از انجام استخراج، نمونه‌ها سرد شده و جهت آزمایش‌های بیشتر در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تهیه عصاره‌ها به روش فراصوت از حمام اولتراسونیک (Backer vCLEAN 1-L6, IRAN) با فرکانس ۱۳۰ KHz استفاده شد. بطور خلاصه یک گرم گیاه خشک به ظرف شیشه‌ای درپوش دار منتقل شد و زمان و نسبت حلال به گیاه و ترکیب حلال استخراجی طبق طراحی آزمایش تغییر داده شدند (جدول ۱).

باسیل‌های گرم مثبت میکروآئروفیل هستند و اصلی‌ترین گونه این جنس که مسبب بیماری لیستریوزیس در انسان و حیوان است، لیستریا مونوسی‌توزنز می‌باشد. عفونت‌های لیستریایی به اشکال مختلف بروز می‌کند و در بیشتر موارد کودکان، افراد مسن و زنان باردار را مورد تهاجم قرار داده و می‌تواند موجب سقط جنین شود (۱۹). استفاده از طراحی آزمایش منجر به کاهش تعداد تیمارها و افزایش کارایی کلی آزمون‌ها می‌گردد. در مواردی که هم زمان احتیاج به بهینه‌سازی چند پاسخ به صورت هم زمان است، با استفاده روش مطلوبیت (Desirability) می‌توان با انجام تعداد کمتر آزمایش، حالت بهینه بین ۲ و یا بیشتر از پاسخ‌ها را مورد سنجش قرار داد. رویکرد مطلوبیت شامل مراحل زیر است، ۱- انجام آزمایش‌ها و مدل‌های پاسخ مناسب برای همه پاسخ‌ها ۲- تعریف توابع مطلوبیت انفرادی برای هر پاسخ و ۳- مطلوبیت کلی با توجه به متغیرهای مستقل به حداکثر رسانیده شود (۲۰).

هدف از انجام این پژوهش، بهینه‌سازی متغیرهای موثر نظیر زمان استخراج، نسبت آب به گیاه، ترکیب حلال استخراجی بر خواص آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی و خصوصیات ضدباکتری عصاره‌های گیاه تشنه‌داری و برگ زیتون با دو روش ریزموج و فراصوت بود.

• مواد و روش‌ها

مواد

باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز (*Listeria Monocytogenes*) ATCC 19115 از شرکت PTCC در ایران تهیه شد.

جدول ۱. متغیرهای مستقل و حدود آن‌ها در بهینه‌سازی اولیه و ثانویه فرایند استخراج عصاره‌ها به کمک ریزموج و فراصوت

زمان (دقیقه)	فراصوت		ریز موج		نسبت آب به کل	نسبت حلال به گیاه
	نسبت حلال به گیاه	نسبت آب به کل	زمان (دقیقه)	نسبت حلال به گیاه		
بهینه‌سازی اولیه						
۲۰	۴/۵	۱	۵	۴/۵	۱	۱
۳۰	۶/۵	۲	۳	۶/۵	۲	۲
۴۰	۱۰	۳	۱	۱۰	۳	۳
بهینه‌سازی ثانویه						
زیتون ۱						
۲۰	۴/۵	۳	۵	۱۰	۱	۱
۴۰	۴/۵	۲/۵	۵	۶/۵	۳	۲
تشنه داری ۱						
۲۰	۴/۵	۳	۵	۱۰	۲	۱
تشنه داری ۲						
۴۰	۴/۵	۱	۵	۶/۵	۳	۲

اندازه گیری ظرفیت فنلی و آنتی اکسیدانی عصاره های

برگ زیتون

در روش DPPH غلظت های متفاوتی از هر دو عصاره با محلول ۰/۰۰۴٪ DPPH در متانول مخلوط شده سپس با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب اندازه گیری شد. در روش TPC محلول متانولی عصاره با Folin Ciocalteu مخلوط و پس از ماندن در تاریکی (۵ دقیقه) با کربنات سدیم مخلوط شده و مجدداً در تاریکی نگهداری شد در نهایت، جذب با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۴۵ نانومتر اندازه گیری شد (۲۲). از فرمول ۱ درصد بازداری رادیکال DPPH و فرمول شماره ۲ ظرفیت فنلی تام (TPC) بدست آمد.

$$\text{DPPH free-radical scavenging activity (\%)} = (\text{Ac-As})/\text{Ac} \times 100 \quad (1)$$

Ac میزان جذب محلول کنترل، As میزان جذب محلول DPPH حاوی عصاره گیاهی

$$\text{TPC} = ((C \times DF \times \text{mg}) / \text{g}) \times 100 \quad (2)$$

C غلظت نمونه، DF ضریب رقت، mg میلی گرم نمونه

اولیه، g گرم عصاره مصرفی

محاسبه حداقل غلظت بازداری MIC عصاره های برگ

زیتون و گیاه تشنه داری

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز پس از کشت روی محیط های Blood Agar، به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۶). از کلنی های انتخابی، استاندارد ۰/۵ مک فارلند با تراکم $10^8 \times 1/5$ CFU/ml در محلول بافر فسفات سالین آماده شد. رقت سازی های مختلف در چاهک از عصاره برگ زیتون و گیاه تشنه داری از غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر در ۱۰ درصد DMSO انجام شد. حداقل غلظت بازداری برای تعیین خاصیت ضد میکروبی به روش میکرودیالوشن براث در میکروپلیت با ۹۶ چاهک استریل انجام گرفته است. ۱۹۵ میکرولیتر مولر هینتون براث با ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی و همچنین ۱۰۰ میکرو لیتر اسانس با رقت سازی سریالی به چاهک ها اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان کدورت چاهک ها و رشد یا عدم رشد آن بررسی و گزارش شد (۲۳). مولر هینتون براث به عنوان کنترل منفی و سوسپانسیون باکتریایی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و از اولین چاهک شفاف و فاقد هر گونه کدورت کشت تهیه شد و با مشاهده کلنی به عنوان حداقل غلظت بازداری (MIC) بر مبنای میلی گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد.

بازده

حلال موجود در عصاره ها حاصل از دو روش استخراج و خیساندن در نهایت توسط بن ماری تبخیر شد. با محاسبه وزن اولیه پلیت و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده است، مقدار کل ماده خشک استخراج شده محاسبه شده و بر مبنای میلی گرم بر گرم بیان شد (۲۴).

طراحی تجربی و تجزیه و تحلیل آماری

روش طراحی (BBDs) Box-Behnken یک طراحی سطح پاسخ کارآمد بر اساس طرح های فاکتوریل ناقص سه سطحی است. فاز ۱ بهینه سازی به کمک این طرح آزمایش انجام گرفت. برای این کار از نرم افزار نسخه Design Expert ver 11 نسخه آزمایشی استفاده شد. در این طراحی آزمایش هر متغیر مستقل کمی سه سطح پیدا می کند که با ترکیب این سطوح فضای آزمون ها ساخته می شود. حدود متغیرهای مستقل در جدول ۱ آورده شده است. ۱۶ تیمار برای هر یک از انواع روش های استخراج و برای هر یک از انواع گیاهان طراحی شد. جدول ANOVA جهت مشخص کردن اثر هر یک از متغیرها و برهم کنش آن ها استفاده شد. برای انتخاب سطوح متغیرها از روش مطلوبیت استفاده شد. ۴ تیمار با بالاترین سطح مطلوبیت وقتی هر دو پاسخ فاز ۱ برای ما در بیشترین حالت بودند توسط نرم افزار پیشنهاد شد. در فرآیند تعیین تیمارها بازه متغیرهای مستقل بدون تغییر لحاظ گردید و هیچ متغیری نسبت به دیگری وزن بیشتری نداشت. همچنین اهمیت هر دو پاسخ برابر لحاظ شد. این تیمارها در فاز دوم باهم مقایسه شدند. سطوح این ۴ تیمار تحت عنوان بهینه سازی ثانویه در جدول ۱ آورده شده است. برای مقایسه میانگین تیمارهای انتخاب شده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی دانکن استفاده شده و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. همه آزمایش ها به جز آزمون های طرح BBDs با سه بار تکرار انجام گرفت.

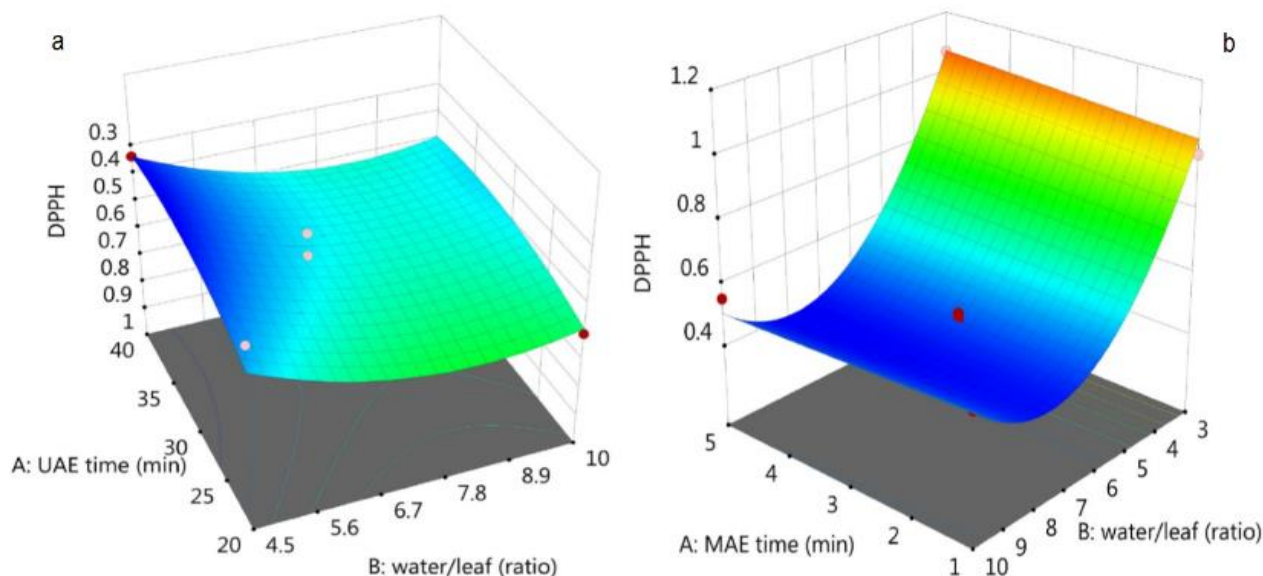
• یافته ها

در فاز اولیه بهینه سازی به کمک متغیرهای وابسته (درصد بازداری رادیکال DPPH و TPC) اثر متغیرهای مستقل (جدول ۱) در هر دو گیاه و هر دو روش استخراجی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در استخراج به کمک ریزموج در مورد برگ زیتون مؤثرترین متغیر مربوط به نسبت آب به گیاه است که بطور معنی داری بر هر دو متغیر وابسته تأثیر داشت. کم اثرترین متغیر مستقل در این فرآیند در مورد پاسخ درصد بازداری رادیکال DPPH مربوط به زمان ریزموج و در پاسخ وابسته TPC مربوط به میزان الکل در حلال استخراجی بود. در

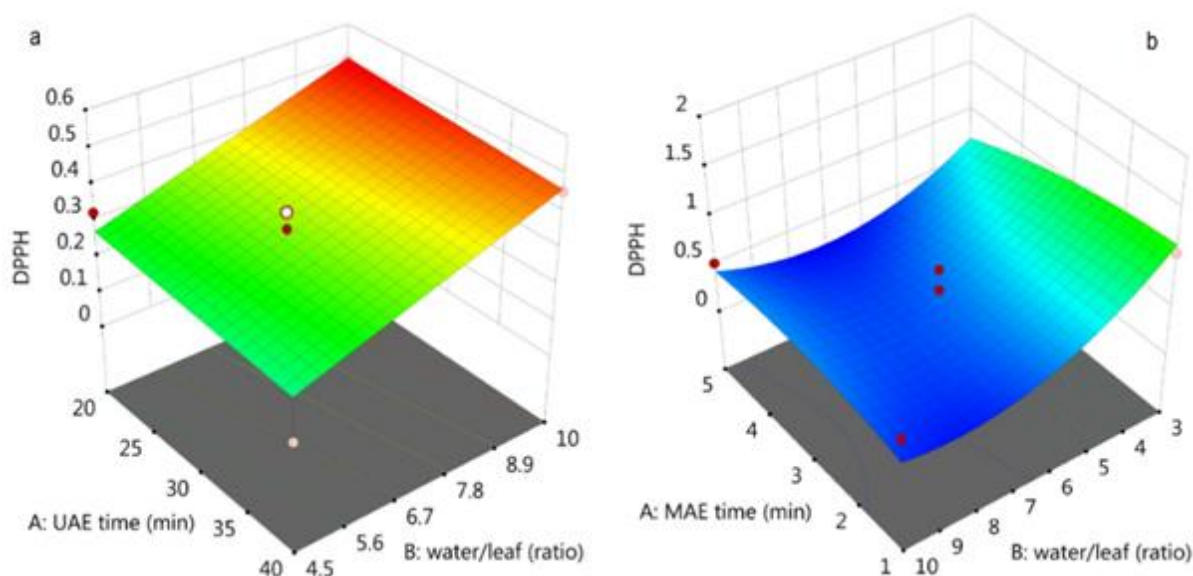
بهینه سازی اولیه

شکل ۱ قسمت a تأثیر مدت زمان‌های مختلف تابش فراصوت در مقابل نسبت آب به گیاه بر میزان بازداری رادیکال DPPH گیاه تشنه‌داری را نشان می‌دهد. افزایش نسبت آب به گیاه تأثیر زیادی بر میزان بازداری رادیکال DPPH نداشت ولی با افزایش زمان فراصوت افزایش جزئی در این پاسخ مشاهده شد. در شکل b-۱ با کاهش نسبت آب به گیاه و تقریباً در تمام سطوح مدت زمان تابش ریز موج میزان بازداری رادیکال DPPH افزایش می‌یابد. مقایسه تأثیر فراصوت و ریزموج بر میزان این پاسخ در برگ زیتون به ترتیب در شکل ۲-a و ۲-b نمایش داده شده است. در شکل ۲-a با افزایش نسبت آب به گیاه و افزایش مدت زمان تابش فراصوت میزان بازداری رادیکال DPPH افزایش پیدا کرد. در شکل ۲-b با کاهش نسبت آب به گیاه و کاهش زمان تابش ریزموج میزان بازداری رادیکال DPPH در سطوح بالایی قرار گرفت. در هر دو روش عصاره‌گیری نسبت آب به گیاه از سایر متغیرهای مستقل اثرگذاری بیشتری داشت (جدول مربوطه نمایش داده نشده است).

استخراج به کمک فراصوت نیز مؤثرترین متغیر مستقل نسبت آب به گیاه بود که به طور معنی‌دار بر هر دو متغیر وابسته تأثیر داشت. در حالی که در مورد TPC کم‌ترین اثر مربوط به نسبت اتانول به آب در حلال استخراجی و در مورد درصد بازداری رادیکال DPPH این مورد مربوط به زمان فراصوت بود. در مورد گیاه تشنه‌داری نسبت آب به گیاه اثر چند برابری و معنی‌دار نسبت به سایر متغیرها در استخراج به کمک ریزموج بر متغیرهای وابسته درصد بازداری رادیکال DPPH و TPC داشت. همچنین در این فرآیند کم‌اثرترین متغیر در هر دو پاسخ مورد ارزیابی مربوط به مدت زمان ریزموج بود. در این گیاه اثر نسبت گیاه به آب در استخراج به کمک فراصوت بر درصد بازداری رادیکال DPPH بیشترین بود هر چند این اثر معنی‌دار نبود. در مورد TPC اثر نسبت آب به گیاه به طور معنی‌دار و چند برابری از سایر متغیرها و معنی‌دار بود. در استخراج به کمک فراصوت کمترین اثر متغیرهای مستقل مربوط به مدت زمان فرآیند در هر دو پاسخ وابسته بود. در فاز دوم بهینه‌سازی با توجه به بررسی سطوح پاسخ برای متغیرهای مستقل سطح مطلوبیت برابر با ۰/۹۱ برای ترکیب هر دو پاسخ وابسته در هر دو گیاه بدست آمد. با توجه به این سطح از مطلوبیت برای بهینه‌سازی ثانویه در روش استخراج به کمک فراصوت و ریز موج متغیرهای مستقل مطابق جدول ۱ انتخاب شدند.



شکل ۱. مقایسه تأثیر مدت زمان فراصوت a و ریزموج b و نسبت آب به گیاه بر نسبت بازداری رادیکال DPPH در گیاه تشنه‌داری در تیمارهای بهینه‌سازی اولیه



شکل ۲. مقایسه تأثیر مدت زمان فراصوت a و ریزموج b و نسبت آب به گیاه بر میزان نسبت بازداری رادیکال DPPH در برگ زیتون در تیمارهای بهینه سازی اولیه

برای گیاه تشنه‌داری از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین کاهش مدت زمان تابش فراصوت و افزایش نسبت آب به الکل برای عصاره برگ زیتون بازده را به طور معنی‌داری افزایش داد. برای عصاره گیاه تشنه‌داری افزایش زمان تابش امواج فراصوت و کاهش نسبت آب به الکل باعث افزایش معنی‌دار بازده شد. MIC برگ زیتون با ثابت ماندن نسبت حلال به گیاه و کاهش مدت زمان تابش افزایش یافت که این اثر معنی‌دار بود، ولی در همین شرایط برای عصاره گیاه تشنه‌داری میزان MIC ثابت ماند (جدول ۲).

تأثیر فراصوت بر متغیرهای میزان MIC، درصد بازداری رادیکال DPPH و TPC در برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری در بهینه سازی ثانویه

با کاهش مدت زمان تابش امواج و افزایش نسبت آب به الکل برای عصاره‌ها، TPC عصاره برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری افزایش یافته ولی از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (جدول ۲). همچنین در جدول ۲ مشخص است که میزان بازداری رادیکال DPPH در هر دو گیاه افزایش یافته ولی این افزایش

جدول ۲. نتایج فرآیند فراصوت بر متغیرهای وابسته بر مبنای بهینه سازی ثانویه برای برگ زیتون و گیاه تشنه داری

متغیرها	میانگین \pm انحراف معیار				نتایج			
	زیتون ۱		زیتون ۲		t		p-value	
محتوی فنولی کل (mg/g)	$0.26 \pm 5/34$	$0.24 \pm 4/85$	$0.14 \pm 2/89$	$0.14 \pm 2/81$	۲/۳۵۱	۰/۰۷۸	۲/۳۵۱	۰/۰۷۸
DPPH (%)	$1/62 \pm 32/51$	$0.54 \pm 10/89$	$1/8 \pm 37/6$	$1/7 \pm 35/6$	۲۱/۸۴	۰/۰۰۱	۲۱/۸۴	۰/۰۰۱
بازده (mg/g)	$3/5 \pm 71$	$1/1 \pm 22$	$1/8 \pm 37$	$8/35 \pm 167$	۲۲/۸۳	۰/۰۰۱	۲۲/۸۳	۰/۰۰۱
حداقل غلظت بازداری (mg/ml)	$0.15 \pm 4/2$	$0.05 \pm 0/47$	$0.05 \pm 1/1$	$0.01 \pm 1/1$	۲۰/۱۵	۰/۰۰۱	۲۰/۱۵	۰/۰۰۱

شرایط آزمایش‌ها	نسبت آب به الکل	نسبت حلال به گیاه	زمان (دقیقه)
زیتون ۱	۳	۴/۵	۲۰
زیتون ۲	۲/۵	۴/۵	۴۰
تشنه‌داری ۱	۳	۴/۵	۲۰
تشنه‌داری ۲	۱	۴/۵	۴۰

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار n=۳ بیان شده اند ($p < 0.05$).

تأثیر ریزموج بر متغیرهای میزان MIC، درصد بازداری رادیکال DPPH و TPC در برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری در بهینه سازی ثانویه

با کاهش نسبت حلال به گیاه، افزایش نسبت آب به الکل و ثابت ماندن زمان تابش، TPC، بازداری رادیکال DPPH، MIC و میزان بازده برای برگ زیتون به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳). با ثابت ماندن زمان تابش امواج و نسبت آب به الکل و کاهش نسبت حلال به گیاه، TPC، بازداری رادیکال DPPH و بازده به طور معنی‌داری برای گیاه تشنه‌داری افزایش داشت ولی

تغییرات MIC مربوط به عصاره گیاه تشنه‌داری معنی دار نبود (جدول ۳).

مقایسه دو روش تابش امواج فراصوت و ریزموج و تأثیر بر متغیرهای مستقل

مقایسه این دو روش بر مبنای داده‌های فاز دوم بهینه‌سازی صورت پذیرفت. تابش فراصوت بیشترین میزان TPC را برای برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری به دست داد، درحالی که بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (تست DPPH) برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری با ریزموج بوده است (جدول ۴).

جدول ۳. نتایج فرآیند ریزموج بر متغیرهای وابسته بر مبنای بهینه‌سازی ثانویه برای برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری

نتایج		میانگین \pm انحراف معیار		نتایج		میانگین \pm انحراف معیار		متغیرها
p-value	t	تشنه‌داری ۲	تشنه‌داری ۱	p-value	t	زیتون ۲	زیتون ۱	
۰/۰۰۱	-۱۹/۳۶	۰/۰۶۵ \pm ۱/۲۸	۰/۰۲۵ \pm ۰/۵	۰/۰۰۱	-۱۰/۹۴	۰/۲۵ \pm ۵/۱۸	۰/۱۶ \pm ۳/۱۶	محتوی فنولی کل (mg/g)
۰/۰۰۶	۵/۳۱۲	۲/۳۷ \pm ۴۴/۰۷	۲/۷۶ \pm ۵۵/۲۴	۰/۰۰۵	۵/۵۷۰	۲/۰۷ \pm ۴۱/۴۲	۲/۶ \pm ۵۲/۱۳	DPPH (%)
۰/۰۰۱	۱۴/۲۹	۳/۵ \pm ۶۴	۶/۵ \pm ۱۲۵	۰/۰۲۵	۳/۴۸۷	۶/۵ \pm ۱۳۲	۷/۵ \pm ۱۵۲	بازده (mg/g)
۰/۳۷۴	-۱	۰/۰۵ \pm ۱/۱	۰/۰۱ \pm ۱/۱	۰/۰۰۱	۱۳/۴۳	۰/۰۰۵ \pm ۰/۵	۰/۰۰۵ \pm ۱/۱	حداقل غلظت بازداری (mg/ml)

شرایط آزمون	نسبت آب به الکل	نسبت حلال به گیاه	زمان (دقیقه)
تشنه‌داری ۱	۳	۱۰	۵
تشنه‌داری ۲	۳	۶/۵	۵
زیتون ۱	۱	۱۰	۵
زیتون ۲	۳	۶/۵	۵

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار n=۳ بیان شده‌اند (p<۰/۰۵).

جدول ۴. مقایسه بین دو روش استخراج فراصوت و ریزموج - آزمون ANOVA

شرایط	گروه‌ها	محتوی فنولی کل (mg/g)	DPPH (%)	بازده (mg/g)	حداقل غلظت بازداری (mg/ml)
فراصوت	زیتون ۱	۰/۲۶ \pm ۵/۳۴	^b ۱/۶۲ \pm ۳۲/۵۱	^b ۳/۵ \pm ۷۱	^b ۰/۰۱۵ \pm ۲/۴
	زیتون ۲	۰/۲۴ \pm ۴/۸۵	^a ۰/۵۴ \pm ۱۰/۸۹	^a ۱/۱ \pm ۲۲	^a ۰/۰۰۵ \pm ۰/۴۷
ریزموج	زیتون ۱	^{a,b} ۰/۱۶ \pm ۳/۲۶	^b ۲/۶ \pm ۵۲/۱۳	^{a,b} ۷/۵ \pm ۱۵۲	^{a,b} ۰/۰۰۵ \pm ۱/۱
	زیتون ۲	۰/۲۵ \pm ۵/۱۸	^{a,b} ۲/۰۷ \pm ۴۱/۴۲	^{a,b} ۶/۵ \pm ۱۳۲	^b ۰/۰۰۵ \pm ۰/۵
فراصوت	تشنه‌داری ۱	۰/۱۴ \pm ۲/۸۹	۱/۸ \pm ۳۷/۶	^b ۱/۸ \pm ۳۷	۰/۰۰۵ \pm ۱/۱
	تشنه‌داری ۲	۰/۱۴ \pm ۲/۸۱	۱/۷ \pm ۳۵/۶	^a ۸/۳۵ \pm ۱۶۷	۰/۰۱ \pm ۱/۱
ریزموج	تشنه‌داری ۱	^{a,b} ۰/۰۲۵ \pm ۰/۵	^{a,b} ۲/۷۶ \pm ۵۵/۲۴	^{a,b} ۶/۵ \pm ۱۲۵	۰/۰۱ \pm ۱/۱
	تشنه‌داری ۲	^{a,b} ۰/۰۶۵ \pm ۱/۲۸	^{a,b} ۲/۳۷ \pm ۴۴/۰۷	^{a,b} ۳/۵ \pm ۶۴	۰/۰۵ \pm ۱/۱

Data are expressed as Mean \pm SD (n=3).

^a p<0.05 Vs. ۱ تشنه‌داری

^a p<0.05 Vs. ۱ زیتون

^b p<0.05 Vs. ۲ تشنه‌داری

^b p<0.05 Vs. ۲ زیتون

شرایط فرآیند فراصوت			شرایط فرآیند ریزموج		
زمان (دقیقه)	نسبت حلال به گیاه	نسبت آب به الکل	زمان (دقیقه)	نسبت حلال به گیاه	نسبت آب به الکل
۲۰	۴/۵	۳	۵	۱۰	۱
۴۰	۴/۵	۲/۵	۵	۶/۵	۳
۲۰	۴/۵	۳	۵	۱۰	۳
۴۰	۴/۵	۱	۵	۶/۵	۳

• بحث

اثر فراصوت بر خصوصیات عصاره استخراجی

در این پژوهش تأثیر دو روش استخراج به کمک امواج ریزموج و فراصوت بر خواص آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی و خصوصیات ضد باکتری عصاره‌های گیاه تشنه‌داری و برگ زیتون بررسی شد. بیشترین میزان TPC برای برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری با امواج فراصوت و در مدت زمان تابش ۲۰ دقیقه و نسبت آب به الکل ۳:۱ به دست آمد، با افزایش زمان و کاهش میزان الکل در حلال استخراجی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بازده کاهش پیدا کردند. مطالعات نشان داده‌اند که میزان ۲۰ الی ۳۰ درصد الکل شرایط بهینه استخراجی برای خواص عصاره برگ زیتون ایجاد می‌کند (۲۶، ۲۵). نتایج ما نشان داد با کاهش میزان الکل در حلال استخراجی بازده استخراج با فراصوت از گیاه تشنه‌داری افزایش می‌یابد ولی تغییر محسوسی در سایر متغیرهای وابسته دیده نشد (جدول ۲). در پژوهشی نشان داده شد که استفاده از الکل در ترکیب با آب در مقایسه با آب تنها منجر به فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بیشتر در گیاه تشنه‌داری می‌شود (۹). همچنین Alcantara و همکاران نیز که تأثیر امواج فراصوت و حلال معمولی را بر محتوی فنلی، فعالیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ زیتون و برگ انجیر مدیترانه‌ای بررسی کرده بودند اثبات کردند که با فراصوت در مقایسه با روش معمولی، کاروتنوئید بیشتری استخراج می‌شود (۳). امواج فراصوت ممکن است برای بهینه‌سازی میزان استخراج ترکیبات فنولی مناسب‌تر باشد. بیشترین بازده برای گیاه تشنه‌داری با تابش فراصوت به دست آمده و Vural و همکاران (۲۰۲۰) که به بررسی حلال الکی سبز و استخراج اولئوروپین برگ‌های گیاه *L. Olea europaea* با روش فراصوت پرداخته بودند، نشان دادند که استخراج با حلال برای اولئوروپین و سایر فنل‌ها در عصاره برگ زیتون سودمندتر است (۲۷). مطالعه Cifar و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز نشان داد که بازده استخراج اولئوروپین از برگ‌های زیتون با استفاده از تابش فراصوت ۳۰٪ بیشتر از روش سنتی بوده است. همچنین استفاده از این روش مزایای دیگری از جمله استفاده از حلال و زمان استخراج کمتر در دماهای پایین‌تر را نشان داده است (۲۸). عصاره‌های برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری به خوبی با فراصوت و ریزموج استخراج می‌شوند و این روش‌ها توانستند بازده و ترکیبات فنولی عصاره را به طور معنی‌دار افزایش دهند همچنین برگ زیتون اثر ضد باکتریایی معنی‌دار در برابر لیستریا مونوسیتوزنز نشان داد. در مطالعه ای MIC عصاره برگ زیتون در مقابل این باکتری ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست

آمد (۲۹). احتمالاً پدیده کاویتاسیون که منجر به تشکیل میکروجت‌ها می‌شود به نفوذ بهتر حلال به داخل بافت‌های گیاهی و تخریب دیواره سلولی گیاهان کمک کرده که این امر با افزایش کارایی استخراج به کمک فرآیند فراصوت است (۳۰).

اثر ریزموج بر خصوصیات عصاره استخراج شده

بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH برای برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری، با تابش ریزموج و در نسبت حلال به گیاه ۱۰:۱ و نسبت آب به الکل ۱:۱ برای زیتون و ۳:۱ برای گیاه تشنه‌داری به دست آمد (جدول ۳). نسبت حلال ۱۰ برابر گیاه خشک شرایط را برای مصرف حداقلی حلال و کارایی بالای استخراج فراهم می‌کند در میزان حلال کمتر استخراج به خوبی انجام نمی‌پذیرفت. نتایج جدول ۳ رابطه قوی بین میزان ترکیبات فنلی کل و اثر ضد میکروبی را نشان می‌دهد. فنول‌ها از ترکیبات با مقدار بالا در عصاره‌های هیدروالکی تشنه‌داری است (۳۱). در پژوهشی G.S. daRosa و همکاران اثرات مختلف پارامترهای استخراج بر ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ زیتون را با استفاده از ریزموج فراصوت بررسی کرده بودند که مشخص شد تأثیر تابش ریزموج بر TPC کارآمدتر بوده است (۳۲). همچنین Alara و همکاران از ریزموج در بازیابی ترکیبات فنلی از برگ‌های گیاه Carcia papaya استفاده کرده بودند و در بهترین شرایط ریزموج، ۷۲ ترکیب فنلی شناسایی شده بود. این نتایج استنباط می‌کند که ریزموج به‌عنوان یک روش می‌تواند ترکیبات فنلی را به خوبی استخراج کند (۱۴). درحالی که در مطالعه حاضر تابش ریزموج بیشترین بازده را برای برگ زیتون داده است (جدول ۳) که می‌تواند به خاطر تأثیر حرارت بر دیواره سلولی، ساختار گیاه و ترکیبات قطبی عصاره باشد. افزایش حرارت در حلال استخراجی، و نفوذ سریع آن به داخل بافت گیاه و احتمالاً افزایش تراوش دیواره سلولی گیاه می‌تواند از دلایل بالا بودن راندمان این روش باشد (۳۳). بازده استخراج برای گیاه تشنه‌داری در استفاده از روش فراصوت در مدت زمان ۴۰ دقیقه و نسبت آب به الکل ۱:۱ در مقادیر بالایی بود که ممکن است به دلیل تأثیر ارتعاش‌های مولکولی و مدت زمان تابش بر شکافتن دیواره سلولی و استخراج عصاره باشد. همچنین استفاده از این روش مزایای دیگری از جمله استفاده از حلال و زمان استخراج کمتر در دماهای پایین‌تر را نشان داده است (۲۸). N. Medina- Martiny و همکاران مطالعه‌ای به منظور ارزیابی پتانسیل عصاره برگ زیتون به‌عنوان افزودنی غذایی با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی انجام دادند. برای عصاره‌گیری از روش ریزموج استفاده کردند و عصاره به دست آمده فعالیت ضد باکتریایی علیه *شریشیا کلی* با MIC ۵۰ میلی

کل مؤثرتر بود و این اختلاف در زیتون شماره ۱ (ریزموج) نسبت به ۱ (فراصوت) معنی دار بود (جدول ۴). در متغیرهای وابسته میزان بازداری رادیکال DPPH و بازده عملکرد ریز موج به طور معنی داری بهتر بود. هر چند در فعالیت ضد میکروبی بین دو روش استخراج اختلاف کم بود. در پژوهشی نشان داده شد که ریز موج کارایی بالاتری نسبت به فراصوت در استخراج ترکیبات موثر برگ زیتون دارد (۳۲). احتمالاً ماهیت غیر فرار ترکیبات برگ زیتون نظیر اولئوروپین و حرارت بالاتر فرآیند ریز موج منجر به این نتیجه شده است. هر چند مدت زمان فرآیند، توان بکار گرفته شده و نسبت حلال به برگ و ماهیت حلال می تواند منجر به نتایج مختلف شود (۳۸).

تفاوت در بیشترین بازده و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ زیتون و گیاه تشنه‌داری مشاهده شد. نسبت حلال به گیاه در روش ریزموج و فراصوت نسبت به سایر متغیرها اثر گذاری بیشتری بر پاسخ‌ها داشتند. در روش ریزموج و فراصوت مدت زمان تابش کم اثرترین متغیر در مورد پاسخ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بود که احتمالاً پایین‌ترین سطح زمان برای استخراج مناسب عصاره کافی بوده است و در هر دو گیاه و هر دو روش در مورد TPC میزان الکل در حلال استخراجی نقش زیادی نداشت. همچنین ترکیبی از این عوامل بر محتوای کل فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها مؤثر است. هر دو عصاره می‌توانند اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر لیستریامونوسیتوزنز داشته باشند.

گرم بر میلی لیتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی برابر با ۸۷/۹۲ درصد بازداری را نشان داد (۳۴). گزارش شده است عصاره برگ زیتون به طور موثری توانست مقاومت حرارتی لیستریا مونوسیتوزنز را کاهش می دهد (۳۵). همچنین مطالعه ای MIC عصاره استخراج شده از برگ زیتون به کمک ریزموج در برابر *استافیلوکوکوس ارئوس* ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۳۶).

مقایسه روش فراصوت و ریز موج بر کارایی استخراج

در جدول ۴ نتایج این مقایسه برای چهار تیمار انتخابی فاز دوم بهینه سازی آورده شده است. به طور کلی مکانیسم استخراج در فراصوت و ریز موج متفاوت است. نتایج نشان داد میزان MIC برای گیاه تشنه‌داری با هر دو روش تابش فراصوت و با تابش ریزموج ثابت است. این احتمالاً به عدم تحت تأثیر قرار گرفتن ترکیبات ضد میکروبی این گیاه به نحوه استخراج آن‌ها مرتبط است. بطور کلی محتوای فنلی کل در گیاه تشنه‌داری در روش فراصوت بهتر از ریز موج استخراج شد و این تفاوت معنی دار بود. این محتوای فنلی کل تا حدود زیادی منجر به بازده بیشتر نیز در این روش شد. احتمالاً طولانی‌تر بودن زمان استخراج در روش فراصوت امکان استخراج بیشتر ترکیبات را از بافت گیاهی فراهم می کند (۳۷). هر چند این شرایط تفاوتی در MIC گیاه تشنه‌داری نداشت. در استخراج عصاره برگ زیتون، فراصوت نسبت به ریز موج اندکی در استخراج فنل

References

1. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017;6(4):42.
2. Şahin S, Elhoussein E, Bilgin M, Lorenzo JM, Barba FJ, Roohinejad S. Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (*Olea europaea*) leaf. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018;42(5):e13604.
3. Alcántara C, Žugčić T, Abdelkebir R, García-Pérez JV, Jambrak AR, Lorenzo JM, et al. Effects of Ultrasound-Assisted Extraction and Solvent on the Phenolic Profile, Bacterial Growth, and Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities of Mediterranean Olive and Fig Leaves Extracts. *Molecules*. 2020;25:(7):1718.
4. Kerdar T, Moradkhani S, Dastan D. Phytochemical and Biological Studies of *Scrophularia striata* from Ilam. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2018;13(3):e62705.
5. Li X, Liu Y, Jia Q, LaMacchia V, O'Donoghue K, Huang Z. A systems biology approach to investigate the antimicrobial activity of oleuropein. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2016;43(12):1705-17.
6. Dominciano LCdC, Oliveira CAFd, Lee S, Corassin C. Individual and combined antimicrobial activity of oleuropein and chemical sanitizers. *J Food Chem Nanotechnol*. 2016;2(3):124-7.
7. Omar SH, Kerr PG, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK. Olive (*Olea europaea* L.) Biophenols: A Nutraceutical against Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Molecules*. 2017;22(11):1858.
8. Zargoosh Z, Ghavam M, Bacchetta G, Tavili A. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Scientific Reports*. 2019;9(1):16021.
9. Shohrati M, Mahmoudi R, Nosratpour S, Pajohi-Alamoti M. Chemical composition and biological activities of *Scrophularia striata* extracts. *Minerva Biotechnologica*. 2014;26(3):183-9.
10. Giacometti J, Bursac Kovačević D, Putnik P, Gabrić D, Bilušić T, Krešić G, et al. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*. 2018;113:245-62.
11. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020;12(1):1-10.
12. Cruz RMS, Brito R, Smirniotis P, Nikolaidou Z, Vieira MC. Chapter 11 - Extraction of Bioactive Compounds From Olive Leaves Using Emerging Technologies. In:

- Grumezescu AM, Holban AM, editors. *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*: Academic Press; 2017. p. 441-61.
13. Swamy GJ, Muthukumarappan K. Optimization of continuous and intermittent microwave extraction of pectin from banana peels. *Food Chemistry*. 2017;220:108-14.
 14. Alara OR, Abdurahman NH, Ali HA, Zain NM. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Carica papaya* leaves: An optimization study and LC-QTOF-MS analysis. *Future Foods*. 2021;3:100035.
 15. Esmaeelian M, Jahani M, Feizy J, Einafshar S. Effects of Ultrasound-Assisted and Direct Solvent Extraction Methods on the Antioxidant and Antibacterial Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.) Corm Extract. *Food Analytical Methods*. 2021;14(1):74-87.
 16. Polanco-Lugo E, Martínez-Castillo JI, Cuevas-Bernardino JC, González-Flores T, Valdez-Ojeda R, Pacheco N, Ayora-Talavera T. Citrus pectin obtained by ultrasound-assisted extraction: Physicochemical, structural, rheological and functional properties. *CyTA - Journal of Food*. 2019;17(1):463-71.
 17. Chemat F, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Strube J, Uhlenbrock L, Gunjevic V, Cravotto G. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;118:248-63.
 18. He J-L, Guo H, Wei S-Y, Zhou J, Xiang P-Y, Liu L, et al. Effects of different extraction methods on the structural properties and bioactivities of polysaccharides extracted from Qingke (Tibetan hullless barley). *Journal of Cereal Science*. 2020;92:102906.
 19. Sheehan B, Kocks C, Dramsi S, Gouin E, Klarsfeld AD, Mengaud J, Cossart P. Molecular and Genetic Determinants of the *Listeria monocytogenes* Infectious Process. In: Dangl JL, editor. *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals: Molecular and Cellular Mechanisms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1994. p. 187-216.
 20. Costa NR, Lourenço J. Multiresponse problems: desirability and other optimization approaches. *Journal of Chemometrics*. 2016;30(12):702-14.
 21. Abedi A-S, Rismanchi M, Shahdoostkhany M, Mohammadi A, Mortazavian AM. Microwave-assisted extraction of *Nigella sativa* L. essential oil and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*. 2017;54(12):3779-90.
 22. Rodríguez-Pérez C, Quirantes-Piné R, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*. 2015;66:246-54.
 23. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008;3(2):163-75.
 24. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*. 2009;14(6):2167-80.
 25. De Oliveira C, Rodrigues CdC. Extraction of oleuropein from olive leaves using a hydroalcoholic solvent. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2017;20.
 26. Šimat V, Skroza D, Tabanelli G, Čagalj M, Pasini F, Gómez-Caravaca AM, et al. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Hydroethanolic Leaf Extracts from Six Mediterranean Olive Cultivars. *Antioxidants*. 2022;11(9):1656.
 27. Vural N, Algan Cavuldak Ö, Kenar A, Akay MA. Green alcoholic solvent and UAE extraction of oleuropein from the *Olea europaea* L. leaves: Experimental design, optimization, and comparison with Pharmacopoeia method. *Separation Science and Technology*. 2020;55(10):1813-28.
 28. Cifá D, Skrt M, Pittia P, Di Mattia C, Poklar Ulrih N. Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*. 2018;6(4):1128-37.
 29. Guo L, Sun Q, Gong S, Bi X, Jiang W, Xue W, Fei P. Antimicrobial Activity and Action Approach of the Olive Oil Polyphenol Extract Against *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol* [Internet]. 2019; 10:[1586 p.].
 30. Soria AC, Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(7):323-31.
 31. Mahboubi M, Kazempour N, Boland Nazar AR. Total phenolic, total flavonoids, antioxidant and antimicrobial activities of *scrophularia striata* boiss extracts. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*. 2013;8(1):15-9.
 32. da Rosa GS, Vanga SK, Gariepy Y, Raghavan V. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2019;58:102234.
 33. Jiang H, Liu Z, Wang S. Microwave processing: Effects and impacts on food components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(14):2476-89.
 34. Martiny TR, Raghavan V, de Moraes CC, da Rosa GS, Dotto GL. Optimization of green extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive crops and evaluation of its potential as a natural preservative. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2021;9(2):105130.
 35. Coşansu Akdemir S, Kıymetli Ö. Antimicrobial activity of olive leaf extract on selected foodborne pathogens and its effect on thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in sous vide ground beef. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*. 2021;5(2):236-42.
 36. Şahin S, Samli R, Tan ASB, Barba FJ, Chemat F, Cravotto G, Lorenzo JM. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Molecules*. 2017;22(7):1056.
 37. Rodsamran P, Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*. 2019;28:66-73.
 38. Hannachi H, Benmoussa H, Saadaoui E, Saanoun I, Negri N, Elfalleh W. Optimization of ultrasound and microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves by response surface methodology. *Res. J Biotechnol*. 2019;14:7-17.

Investigating Variables of Time, Extraction Solvent Composition and Ratio of Solvent-to-plant on Antioxidant and Antibacterial Characteristics of *Striata* Plants and Olive Leaves Using Microwave and Ultrasonic Extraction Methods

Aboalfath M¹, Cheloei N¹, Asgari S¹, Beladian E², Ghasemzadeh-mohammadi N^{3*}

1- Department of Nutrition and Food Hygiene, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

2- Community Medicine Department, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- *Corresponding author: Asistant Professor, Department of Nutrition and Food Hygiene, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. E-mail: v.gh-mo@umsha.ac.ir

Received 10 Mar, 2024

Accepted 5 Jun, 2024

Background and Objectives: It is critical to use modern extraction strategies to show ideal characteristics of the plant extricates. In this study, antioxidant and antimicrobial characteristics of the extracts of *Scrophularia striata* plant and olive leaves were assessed using microwave and ultrasound extraction strategies.

Materials & Methods: After designing the experiment using Box-Behnken method, extractions were carried out using microwave devices to check effects of microwaves and ultrasonic bath. Phenolic content and antioxidant characteristics were assessed using total phenolic compound and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl methods, respectively. Microdilution broth method was used to assess the minimum inhibitory concentration for *Listeria monocytogenes*.

Results: The most effective independent variable in extraction in the two methods and in plants was the ratio of solvent to plant. The ratio of ethanol in the extractor solvent affected total phenolic compound and yield. Ultrasound extraction yielded the highest total phenolic compound concentrations for olive leaves (5.34 ± 0.26) and *Scrophularia striata* (2.89 ± 0.14 mg.g⁻¹). The best minimum inhibitory concentration (0.47 ± 0.005 mg.ml⁻¹) was reported for the olive leaves using ultrasound extraction.

Conclusion: The two extraction methods included various effects on characteristics of the extracts due to the structure and compounds in the two plants. The ultrasound extraction method extracted the highest quantity of phenolic compounds from the two plants. The highest quantity of antioxidant characteristics was linked to microwave extraction. It can be concluded that olive leaves and *Scrophularia striata* plants can potentially decrease *Listeria monocytogenes* contamination.

Keywords: Microwave, Ultrasound, Olive leaf, *Scrophularia striata*, *Listeria monocytogenes*