

بهینه‌سازی استخراج عصاره حاوی ترکیبات ضد میکروبی برگ گیاه نوروبک (*Salvia leriifolia*) با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

محبوبه سرابی جماب^{۱*}، منا کاوه^۲، معصومه مدرس^۳

- ۱- دانشیار، گروه زیست‌فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسنده مسئول (m.sarabi@rifst.ac.ir)
۲- دانشجوی دکتری، گروه فرآوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، مشهد، ایران

چکیده

در این پژوهش به منظور تعیین شرایط بهینه استخراج عصاره از برگ گیاه نوروبک (دمای استخراج ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۳۰، ۷۵ و ۱۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول (۵۰:۵۰، ۶۰:۴۰ و ۷۰:۳۰) جهت بررسی قدرت ضد میکروبی عصاره (تعیین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار چاهک) بر چند میکروارگانیسم شاخص مواد غذایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *شریشیاکلی*، *سالمونلا انترتیدیس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *آسپرژیلوس نیچر*، از روش سطح پاسخ استفاده گردید. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر هر سه متغیر مستقل بر متغیرهای وابسته معنی‌دار بود ($P < 0.05$). شرایط بهینه استخراج به منظور دستیابی به عصاره‌ای با حداکثر خاصیت ضد میکروبی شامل دمای بهینه ۸۳/۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۶۰/۹۲ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۵۹/۰۹ تعیین گردید. بیشترین قطر هاله عدم رشد در این روش استخراج به مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تعلق داشت. علاوه بر آنکه بهینه‌یابی روش استخراج سبب دستیابی به عصاره‌ای با بیشترین خاصیت ضد میکروبی به‌ویژه علیه مخمر و باکتری‌های گرم مثبت گردید؛ پیش‌بینی مدل‌های ارزیابی، گامی مؤثر در جهت انتخاب شرایط استخراج به منظور دستیابی به ترکیبی با خصوصیات ضد میکروبی علیه هر یک از گروه‌های میکروبی فراهم آورد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸

واژه‌های کلیدی

استخراج متداول با حلال
ترکیبات ضد میکروبی
روش سطح پاسخ
نوروبک

مقدمه

دارند (Heywood, Moore, Richardson, & Stearn, 1993). این گیاه دارای ۵۶ گونه در نقاط مختلف ایران (قهرمان، ۱۳۷۳) و بومی استان خراسان و بخشی از استان سمنان است و برای اولین بار در فلور ایرانیکا به آن اشاره شده است (Rechinger, 1982). گزارش‌های مختلفی درباره خواص درمانی گیاه نوروبک از جمله؛ فعالیت ضد درد و آرام‌بخش عصاره برگ نوروبک در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در

گونه *سالویا لریفولیا*^۱ که در ایران به نام نوروبک معروف است؛ متعلق به جنس مریم‌گلی از تیره *Lamiaceae* می‌باشد (Rechinger, 1982). جنس مریم‌گلی با ۵۸ گونه یکی از معروف‌ترین جنس‌های تیره نعناست که گیاهانی پایا، به صورت بوته‌هایی چوبی یا درختچه و غالباً نیز معطر می‌باشند و موارد استفاده دارویی، غذایی و زینتی متعدد

¹ *Salvia leriifolia*

کاندیدا/آلبیکنس (PTCC-5027)^{۱۶} بود که در این میان؛ اثر آن بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بیشتر بوده است. اثر اسانس آن بر کاندیدا/آلبیکنس با داروی ضدقارچ کلوتریمازول^{۱۷}، قابل مقایسه بوده است (باغی، ۱۳۷۵).

همچنین؛ نتایج پژوهش دیگری نشان داد اثر پودر عصاره برگ نوروزک در کاهش تعداد استافیلوکوکوس اورئوس و شمارش کلی میکروب‌ها در طی دوره زمانی ۴۵ روزه در همبرگر نگهداری شده در دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد معنی‌دار بود (یوسفلی، آذرنبوند، حسینی، حدادخداپرست و پزشکی، ۱۳۹۰).

روش استخراج عصاره‌های گیاهی به دلیل تأثیر بر میزان ترکیبات استخراجی حاصل، از جمله عواملی است که می‌تواند خواص ضد میکروبی عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (Corrales, García, Butz, & Tauscher, 2009). روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره‌های گیاهی و میوه‌ها وجود دارد ولی در بیشتر مطالعه‌های مربوط به خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی، استخراج به روش متداول با حلال انجام گرفته است (Adamez, Samino, Sánchez, & González-Gómez, 2012; Hayrapetyan, Hazeleger, & Beumer, 2012; Martin et al., 2012; Sagdic, Ozturk, & Kisi, 2012).

استخراج با حلال روشی رایج برای استخراج ترکیبات از ماده جامد یا مایع است و به صورت استاندارد شامل روش‌های گوناگونی است که در نهایت منجر به قرارگیری نمونه در معرض یک حلال مایع می‌شود. این روش قادر به استخراج ترکیبات با ارزش بالا از منابع و ضایعات مختلف گیاهی است. در روش متداول استخراج با حلال، نمونه جامد در حلال غوطه‌ور شده و عصاره استخراجی بعد از انجام عمل استخراج، جمع‌آوری می‌شود. منحنی استخراج با حلال به طور معمول از دو قسمت استخراج سریع و استخراج با سرعت کم تشکیل شده است. با نفوذ مولکول‌های حلال در ماتریس گیاهی یعنی قرارگیری سیتوپلاسم در تماس مستقیم حلال؛ مکانیسم استخراج آغاز می‌شود که این پدیده منجر به حل شدن ترکیبات فعال در حلال می‌شود. در ابتدای فرایند، استخراج سریع باعث ایجاد سرعت استخراج ثابت می‌شود. در طی استخراج با

کیلوگرم قابل مقایسه با دوز ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم دیازپام، وجود دارد (Hosseinzadeh & Lary, 2000). به علاوه نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره ریشه و برگ این گیاه بر میکروب‌های مختلف، حاکی از وجود خاصیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در بخش‌های مختلف این گیاه است (باغی، ۱۳۷۵؛ جبارزاده، ۱۳۷۸؛ مدرس و ابریشم‌چی، ۱۳۸۷؛ ۱۳۸۹). حضور متابولیت‌های ثانویه با ارزش موجود در برگ گیاه نوروزک نظیر ترپنوئیدها^۱، ساپونین‌ها^۲، فلاونوئیدها^۳، تانن‌ها^۴ و آلکالوئیدها^۵ سبب گردیده است که از خاصیت ضد میکروبی بالایی برخوردار باشد (طباطبایی یزدی، ۱۳۷۴). در بررسی‌های انجام شده روی اندام‌های هوایی گیاه نوروزک وجود ترکیبات فلاونوئیدی ۵-هیدروکسی ۴ و ۶-تری متوکسی فلاون (I)^۶ و دی‌ترین لابدین (II)^۷ با روش‌های اسپکتروفتومتری مشخص شده است (حبیبی و روستائیان، ۱۳۷۷). اخیراً اسیدهای فنولیک شامل کافئیک اسید^۸، رزمارینیک اسید^۹ و سالویانولیک اسید^{۱۰} B در برگ و ریشه گیاه نوروزک شناسایی شده‌اند و میزان آنها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)^{۱۱} تعیین گردیده است. براساس نتایج تحقیق فوق، میزان رزمارینیک اسید نسبت به دیگر اسیدهای فنولیک بیشتر بود؛ به طوری که مقدار آن در برگ و ریشه به ترتیب ۴/۶۵ و ۰/۳۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک می‌باشد (Masoomah Modarres et al., 2014).

هرچند تحقیق‌های محدودی در خصوص بررسی اثر ضد میکروبی اندام‌های مختلف گیاه نوروزک بر میکروارگانیسم‌های شاخص انجام شده، نتایج آنها، حاکی از اثر عصاره و اسانس برگ گیاه نوروزک بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC-1337)^{۱۲}، باسیلوس سابتیلیس (PTCC-1023)^{۱۳}، اشریشیاکلی (PTCC-1330)^{۱۴}، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC-1074)^{۱۵} و

¹ Terpenoids

² Saponins

³ Flavonoids

⁴ Tannins

⁵ Alkaloids

⁶ 5-hydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone (I)

⁷ Diterpene labdane (II)

⁸ Caffeic acid

⁹ Rosmarinic acid

¹⁰ Salvanolic acid B

¹¹ High Performance Liquid Chromatography

¹² *Staphylococcus aureus* (PTCC-1337)

¹³ *Bacillus subtilis* (PTCC-1023)

¹⁴ *Escherichia coli* (PTCC-1330)

¹⁵ *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC-1074)

¹⁶ *Candida albicans* (PTCC-5027)

¹⁷ Clotrimazole

برای به‌دست‌آوردن پودر یکنواخت از الک ۳۵ مش عبور داده شد. رطوبت اولیه نمونه به روش آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت طبق استاندارد ملی ایران به شماره‌های ۵۱۹۴ و ۲۷۰۵ اندازه‌گیری شد (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI], ۱۳۸۹؛ ۱۳۹۴) رطوبت اولیه نمونه‌ها $9/94 \pm 0/05$ درصد بر پایه وزن خشک به‌دست آمد.

استخراج متداول با حلال

به‌منظور دستیابی به بیشترین بازدهی و خواص ضد میکروبی عصاره استخراجی از گیاه نوروک، چندین پیش‌آزمون برای انتخاب سطوح فاکتورهای مؤثر در استخراج متداول با حلال انجام شد. در نهایت، آزمایش‌ها در دماهای مختلف (۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های مختلف (۳۰، ۷۵ و ۱۲۰ دقیقه) و نسبت‌های متفاوتی از آب به اتانول (۵۰:۵۰، ۴۰:۶۰ و ۳۰:۷۰) انجام شد. نسبت ماده جامد به حلال مورد استفاده ۱:۱۰ وزنی/حجمی بود. عصاره‌های حاصل بعد از عبور از صافی پارچه‌ای، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (پویا الکترونیک، ساخت ایران) شدند. مایع رویی جمع‌آوری و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و خلأ ۰/۸ بار در مدت زمان ۵ الی ۸ ساعت (باتوجه به نوع حلال) خشک شد. عصاره‌های خشک‌شده تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hayrapetyan et al., 2012).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره

روش انتشار چاهک

ابتدا از تمام سویه‌ها، سوسپانسیون میکروبی معادل 10^5 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده باکتری، کپک و مخمر بر سطح محیط کشت MHA (باکتری) و YMA (کپک و مخمر) به‌طور یکنواخت پخش شد. پس از آن با کمک پی‌پت پاستور استریل چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر روی محیط کشت ایجاد شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر عصاره با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بعد از انجام یکسری پیش‌آزمون، درون چاهک‌ها ریخته شد. محلول عصاره قبل از استفاده از فیلتر استریل ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. چاهک حاوی حلال عصاره (آب/اتانول) به‌عنوان کنترل

سرعت پایین، ترکیبات فعال از لایه‌های داخلی ماتریس گیاهی انتشار می‌یابند و در حلال حل می‌شوند. خردکردن نمونه و خیساندن آن در حلال از روش‌های رایج است که قبل از استخراج به‌منظور کاهش اندازه ذرات نمونه برای انجام بهتر مکانیسم انتشار انجام می‌گیرد (Chan, Yusoff, & Ngoh, 2014).

روش سطح پاسخ (RSM^1) مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و تجربی مفید برای بررسی تأثیر چند متغیر بر عملکرد و کیفیت فرایند یا محصول تحت بررسی با هدف مدل‌سازی و بهینه‌یابی فرایندهای پیچیده است. روش سطح پاسخ به‌دلیل پیش‌بینی بهینه روند طبیعی بهینه‌سازی و کاهش روش‌های پرهزینه بهینه‌سازی بسیار مورد استفاده است. این روش جهت توصیف اثرات منفرد و متقابل متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هدف از پژوهش حاضر، بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره حاوی ترکیبات ضد میکروبی از برگ گیاه نوروک به‌منظور دستیابی به عصاره‌ای با بیشترین خاصیت ضد میکروبی روی گروهی از میکروب‌های شاخص مواد غذایی به کمک روش سطح پاسخ است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های میکروبی شامل *اشریشیاکلی* (PTCC-1329)، *سالمونلا انتریتیدیس* (PTCC-1709)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC-1764)، *لیستریا مونوسی‌توژنز* (PTCC-1997)^۲، *ساکارومایسس سرویزیه* (PTCC-5177)^۳ و *آسپرژیلوس نیجر* (PTCC-5012)^۴ از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد؛ همچنین از محیط کشت‌های مولر هینتون آگار (MHA)^۵ و کپک و مخمر آگار (YMA)^۶ (شرکت مرک، ساخت آلمان) استفاده گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها

برگ گیاه نوروک از ارتفاعات اطراف مشهد جمع‌آوری گردید و سپس در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم آفتاب خشک شد. برگ‌های خشک‌شده با آسیاب خرد شد و

¹ Response Surface Methodology

² *Listeria monocytogenes* (PTCC-1997)

³ *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC-5177)

⁴ *Aspergillus niger* (PTCC-5012)

⁵ Muller Hinton Agar

⁶ Yeast and Mold Agar

جدول ۱- طرح آزمایشی مرکب مرکزی جهت تعیین سطوح پارامترهای مستقل در روش استخراج عصاره برگ گیاه نوروبوک

شماره تیمار	دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد)	زمان استخراج (دقیقه)	نسبت حلال آب به اتانول
۱	۸۰	۷۵	۵۰:۵۰
۲	۷۰	۳۰	۵۰:۵۰
۳	۹۰	۳۰	۳۰:۷۰
۴	۸۰	۷۵	۴۰:۶۰
۵	۸۰	۱۲۰	۴۰:۶۰
۶	۷۰	۱۲۰	۳۰:۷۰
۷	۸۰	۳۰	۴۰:۶۰
۸	۹۰	۱۲۰	۵۰:۵۰
۹	۸۰	۷۵	۴۰:۶۰
۱۰	۷۰	۷۵	۴۰:۶۰
۱۱	۹۰	۳۰	۵۰:۵۰
۱۲	۷۰	۱۲۰	۵۰:۵۰
۱۳	۸۰	۷۵	۳۰:۷۰
۱۴	۸۰	۷۵	۴۰:۶۰
۱۵	۹۰	۷۵	۴۰:۶۰
۱۶	۸۰	۷۵	۴۰:۶۰
۱۷	۸۰	۷۵	۴۰:۶۰
۱۸	۹۰	۱۲۰	۳۰:۷۰
۱۹	۸۰	۷۵	۴۰:۶۰
۲۰	۷۰	۳۰	۳۰:۷۰

نتایج و بحث

ارزیابی صحت مدل برازش شده در خصوص متغیرهای وابسته قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* همان گونه که در **جدول (۲)** مشاهده می‌شود، از نظر آماری مدل بهینه پیشنهادی توسط نرم‌افزار Design Expert برای شاخص‌های قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*، مدل چندجمله‌ای درجه دوم بود (رابطه ۱ و ۲). مقادیر بالای ضریب تبیین و ضریب تبیین تصحیح شده بیانگر تناسب بالای مدل برای برازش داده‌هاست.

منفی و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین^۱ (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت مورداستفاده قرار گرفت. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت (باکتری)، ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت (مخمر) و ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ تا ۹۶ ساعت (کپک) گرم‌خانه‌گذاری شدند و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد (Iturriaga, Olabarrieta, & de Maraño, 2012).

طراحی آزمایش

در این پژوهش آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به روش استخراج با حلال عصاره برگ گیاه نوروبوک با استفاده از روش سطح پاسخ براساس طرح مرکب مرکزی با ۳ تکرار در نقطه مرکزی با کمک نرم‌افزار Design Expert نسخه ۷ (Minn, Minneapolis, Stat-Ease Inc) ساخت آمریکا) صورت گرفت (جدول ۱). ۶ تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش و محاسبه تکرارپذیری فرایند استفاده شد. براساس آنالیزها برای هر یک از پاسخ‌های مورد ارزیابی نیز یک مدل چندمتغیره برای پیش‌بینی اثر متغیرها تعریف شد که در آن β_0 ضریب ثابت، β_1 ، β_2 و β_3 ضرایب خطی، β_{12} ، β_{13} و β_{23} اثرات متقابل و β_{11} ، β_{22} و β_{33} اثرات توان دو متغیرهای مستقل می‌باشد. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش‌یافته، آزمون ضعف برازش^۲، همچنین مقادیر ضریب تغییرات^۳، ضریب تبیین (R^2)، ضریب تبیین تصحیح شده^۴ و ارزش P تعیین شدند. آزمون F نیز جهت تأیید واریانس به دست آمده از مدل رگرسیونی با ارزیابی معنی‌داری آن نسبت به واریانس باقی مانده و همچنین بررسی تعیین عدم برازش مدل (خطای مدل) مورداستفاده قرار گرفت. مرحله بعد شامل ارائه گرافیکی رابطه مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه بود که به وسیله نمودار رویه پاسخ انجام پذیرفت. در نهایت شرایط عملیاتی بهینه با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی جستجو شد. با استفاده از تکنیک ذکر شده، فضای پاسخ با استفاده از مدل‌های ایجاد شده و به منظور یافتن بهترین شرایطی که اهداف بهینه‌سازی مورد نظر را برآورده کند؛ جستجو شد.

¹ Gentamicin

² Lack of fit

³ Coefficient of Variation

⁴ Adjusted R²

جدول ۲- آنالیز ANOVA و تحلیل آزمون ضعف برازش مدل‌های چندمتغیره در روش متداول استخراج با حلال جهت متغیرهای وابسته قطر هالهٔ عدم رشد/استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسییتوزنز

منبع	درجهٔ آزادی	قطر هالهٔ عدم رشد/استافیلوکوکوس اورئوس			قطر هالهٔ عدم رشد لیستریا مونوسییتوزنز		
		P	مجموع مربعات	ضریب معادله	P	مجموع مربعات	ضریب معادله
مدل خطی	۹	۰/۰۰	۲۲۸/۰۵	-۳۳۳/۶۷	۰/۰۱	۱۷۸/۹۵	-۱۴۷/۶۶
X ₁	۱	۰/۰۵	۳۹/۳۶	۶/۲۴	۰/۲۴	۷/۶۰	۰/۷۵
X ₂	۱	۰/۴۸	۰/۲۸	۰/۱۱	۰/۰۳	۲۷/۶۹	۰/۳۷
X ₃	۱	۰/۲۵	۰/۳۷	۳/۵۸	۰/۳۵	۴/۷۱	۴/۱۸
درجهٔ دوم							
X ₁ X ₁	۱	۰/۰۰	۳۸/۹۲	-۰/۰۴	۰/۷۹	۰/۳۵	۰/۰۰
X ₂ X ₂	۱	۰/۹۹	۰/۰۰	-۸/۹۸	۰/۲۴	۷/۷۴	۰/۰۰
X ₃ X ₃	۱	۰/۰۱	۲۱/۵۹	-۰/۰۳	۰/۰۳	۳۲/۳۲	-۰/۰۳
اثر متقابل							
X ₁ X ₂	۱	۰/۰۰	۱۰/۳۱	۰/۰۰	۰/۰۷	۱۹/۹۷	۰/۰۰
X ₁ X ₃	۱	۰/۸۴	۱/۱۹	۰/۰۰			
X ₂ X ₃	۱	۰/۸۷	۳/۲۳	۱/۴۱			
باقی مانده	۱۰		۲۱/۵۳			۵۹/۵۳	
ضعف برازش	۵	۰/۲۱	۱۴/۶۹		۰/۰۷	۵۰/۷۰	
خطای باقی مانده	۵		۶/۸۳			۸/۸۳	
مجموع	۱۹		۲۴۹/۵۸			۲۳۸/۴۸	
R ²			۰/۹۱				۰/۸۵
Adj-R ²			۰/۸۴				۰/۸۰
ضریب تغییرات			۸/۶۶				۱۱/۸۹

عبارات معنی‌دار مدل شامل اثر خطی زمان استخراج و اثر درجهٔ دوم نسبت حلال آب به اتانول بود. محدودهٔ قطر هالهٔ عدم رشد/استافیلوکوکوس اورئوس بین ۱۰ و ۲۳ میلی‌متر محاسبه گردید. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که عبارات معنی‌دار مدل شامل اثر متقابل دما و زمان استخراج و اثرات درجهٔ دوم دما و نسبت حلال آب به اتانول بود. اثر متقابل دما و زمان استخراج بر قطر هالهٔ عدم رشد/استافیلوکوکوس اورئوس در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در نسبت حلال آب به اتانول، ۴۰:۶۰، با افزایش دما از ۷۰ به ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد و افزایش زمان استخراج از ۳۰ به ۷۵ دقیقه، شاخص قطر هالهٔ عدم رشد/استافیلوکوکوس اورئوس افزایش یافت؛ اما با افزایش دما از ۸۰ به ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد، این شاخص به تدریج کاهش یافت؛ این درحالی‌است که افزایش زمان استخراج از ۷۵ به ۱۲۰ دقیقه باز هم سبب افزایش قطر هالهٔ عدم رشد باکتری ذکر شده گردید.

رابطهٔ (۱)

$$Y = -333.669 + 6.240 X_1 + 0.113 X_2 + 3.583 X_3 - 0.002 X_1 X_2 - 0.003 X_1 X_3 + 1.411 X_2 X_3 - 0.038 X_1^2 - 8.979 X_2^2 + 0.028 X_3^2$$

در رابطهٔ (۱)، Y: نشان‌دهندهٔ قطر هالهٔ عدم رشد/استافیلوکوکوس اورئوس، X₁: دمای استخراج، X₂: زمان استخراج و X₃: نسبت حلال آب به اتانول می‌باشد.

رابطهٔ (۲)

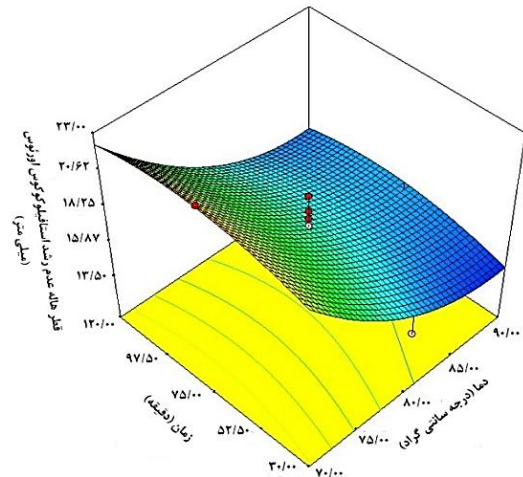
$$Y = -167.661 + 0.749 X_1 + 0.368 X_2 + 4.182 X_3 - 0.003 X_1 X_2 - 0.003 X_1^2 - 0.0008 X_2^2 - 0.034 X_3^2$$

در رابطهٔ (۲)، Y: قطر هالهٔ عدم رشد لیستریا مونوسییتوزنز، X₁: دمای استخراج، X₂: زمان استخراج و X₃: نسبت حلال آب به اتانول می‌باشد.

در خصوص قطر هالهٔ عدم رشد لیستریا مونوسییتوزنز، بیشترین میزان قطر هاله ۲۲ و کمترین آن ۸ میلی‌متر به دست آمد. همچنین نتایج آنالیز واریانس نشان داد که

ارزیابی صحت مدل برازش شده در خصوص متغیرهای وابسته قطر هاله عدم رشد باکتری های گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا انتریتیدیس

نتایج آنالیز واریانس و تجزیه و تحلیل داده های حاصل از اثر متغیرهای مستقل دما، زمان و نسبت حلال استخراج بر قطر هاله عدم رشد دو باکتری گرم منفی اشریشیاکلی و سالمونلا انتریتیدیس به عنوان میکروارگانیسم های پاتوژن مواد غذایی در جدول (۳) قابل مشاهده است. در خصوص قطر هاله عدم رشد دو باکتری ذکر شده مدل های چندمتغیره درجه دوم (رابطه ۳ و ۴) جهت پیش بینی اثر متغیرهای مستقل، اثرات متقابل و همچنین اثرات درجه دوم پیش بینی گردید.



شکل ۱- اثر متقابل دما و زمان بر قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس در روش استخراج متداول با حلال

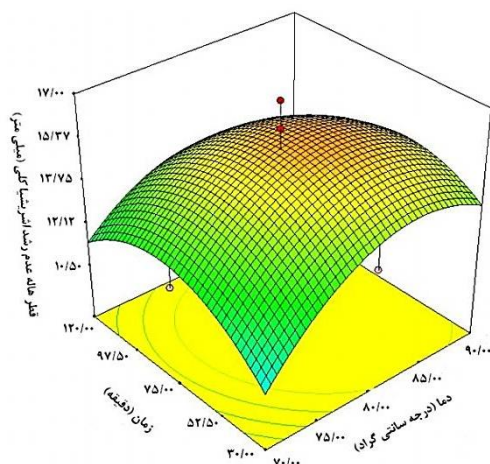
جدول ۳- آنالیز ANOVA و تحلیل آزمون ضعف برازش مدل های چندمتغیره در روش متداول استخراج با حلال جهت متغیرهای وابسته قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی و سالمونلا انتریتیدیس

قطر هاله عدم رشد سالمونلا انتریتیدیس			قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی			منبع	
ضریب معادله	مجموع مربعات	P احتمال	درجه آزادی	ضریب معادله	مجموع مربعات	P احتمال	درجه آزادی
-۳۰۸/۴۰	۱۹۳/۵۰	۰/۰۰	۹	-۲۱۱/۸۸	۱۴۴/۶۶	۰/۰۰	۹
۳/۸۲	۰/۷۸	۰/۵۷	۱	۳/۲۹	۶/۴۳	۰/۱۰	۱
-۰/۰۱	۱۶/۸۰	۰/۰۲	۱	۰/۲۴	۰/۵۱	۰/۹۳	۱
۵/۷۳	۰/۰۰	۰/۹۹	۱	۲/۷۹	۰/۰۱	۰/۹۳	۱
							درجه دوم
-۰/۰۲	۱۲/۲۷	۰/۰۴	۱	-۰/۰۲	۱۰/۲۲	۰/۰۱	۱
۴/۱۸	۱/۹۷	۰/۳۷	۱	۰/۰۰	۸/۹۹	۰/۰۲	۱
-۰/۰۵	۵۹/۵۳	۰/۰۰	۱	-۰/۰۲	۱۴/۶۵	۰/۰۰	۱
							اثر متقابل
۰/۰۰	۱۰/۰۴	۰/۰۶	۱	۰/۰۰	۳/۴۶	۰/۰۰	۱
۰/۰۰	۱/۱۰	۰/۵۰	۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۵۷	۱
۱/۹۳	۶/۰۶	۰/۱۳	۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۱
	۲۲/۳۹		۱۰		۱۰/۷۲		۱۰
	۸/۳۹	۰/۷۱	۵		۶/۷۲	۰/۲۹	۵
	۱۴/۰۰		۵		۴/۰۰		۵
	۲۱۵/۸۹		۱۹		۱۵۵/۳۹		۱۹
							باقی مانده
							ضعف برازش
							خطای باقی مانده
							مجموع
							R ²
							Adj-R ²
							ضریب تغییرات

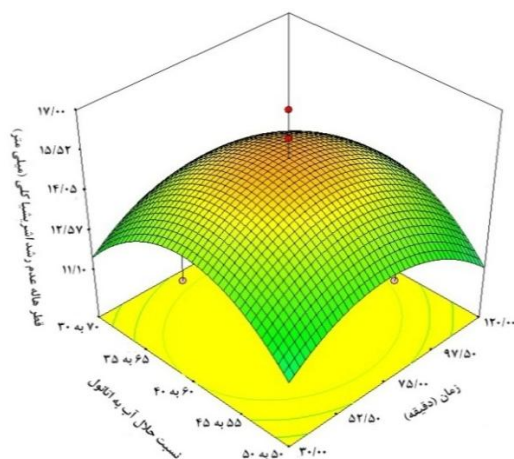
در رابطه (۳)، Y: قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی، X₁: دمای استخراج، X₂: زمان استخراج و X₃: نسبت حلال آب به اتانول می باشد.

رابطه (۳)

$$Y = -211.882 + 3.294X_1 + 0.241X_2 + 5.734X_3 - 0.001X_1X_2 - 0.0003X_1X_3 + 0.00007X_2X_3 - 0.019X_1^2 - 0.0008X_2^2 - 0.023X_3^2$$



شکل ۲- اثر متقابل دما و زمان بر قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی در روش استخراج متداول با حلال



شکل ۳- اثر متقابل زمان و نسبت حلال آب به اتانول بر قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی در روش استخراج متداول با حلال

ارزیابی صحت مدل برازش شده در خصوص متغیرهای وابسته قطر هاله عدم رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه و کپک آسپرژیلوس نیجر

تجزیه و تحلیل آزمون ضعف برازش مدل‌ها برای متغیرهای وابسته قطر هاله عدم رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه و کپک آسپرژیلوس نیجر در روش استخراج متداول با حلال در جدول (۴) آمده است. همان‌طور که نتایج آنالیز نشان می‌دهد در خصوص قطر هاله عدم رشد ساکارومایسس سرویزیه مدل خطی (درجه اول) برای پیش‌گویی، مدل مناسبی تعیین گردیده است؛ چرا که تنها اثرات ساده دما و نسبت حلال آب به اتانول بر قطر هاله عدم رشد در فرایند استخراج متداول با حلال معنی‌دار بوده است (رابطه ۵). در این مدل آزمون عدم برازش معنی‌دار نبود و مقادیر ضریب تبیین و ضریب تبیین نسبتاً، صحت درجه تناسب مدل برازش شده را نشان می‌دهد.

رابطه (۴)

$$Y = -308.395 + 3.817X_1 - 0.008X_2 + 3.583X_3 - 0.002X_1X_2 - 0.003X_1X_3 + 1.933X_2X_3 - 0.021X_1^2 + 4.184X_2^2 - 0.046X_3^2$$

در رابطه (۴)، Y: قطر هاله عدم رشد سالمونلا اینتریتیدیس، X₁: دمای استخراج، X₂: زمان استخراج و X₃: نسبت حلال آب به اتانول می‌باشد. در این مدل‌ها آزمون عدم برازش معنی‌دار نبود و مقادیر ضریب تبیین و ضریب تغییرات نسبتاً مناسب، صحت درجه تناسب مدل برازش شده را نشان داد.

همان‌گونه که در جدول (۳) مشاهده می‌شود، در خصوص قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی، اثرات متقابل دما و زمان و نیز زمان و نسبت حلال آب به اتانول و همچنین اثرات درجه دوم هر سه متغیر مستقل دما، زمان و نسبت حلال در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار بود؛ این درحالی‌است که در رابطه با قطر هاله عدم رشد باکتری سالمونلا اینتریتیدیس اثر ساده زمان و اثرات درجه دوم دما و نسبت حلال آب به اتانول معنی‌دار بود.

شکل‌های (۲) و (۳) اثر متقابل متغیرهای مستقل را بر هاله عدم رشد اشریشیاکلی نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده شده است با افزایش دما از ۷۰ به ۸۰ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد افزایش نشان داده است درحالی‌که افزایش بیشتر دمای استخراج، سبب ایجاد روند کاهشی در قطر هاله عدم رشد گردیده است. این شرایط در خصوص زمان استخراج نیز صدق می‌کند. همان‌گونه که گفته شد اثر متقابل دما و زمان استخراج بر میزان قطر هاله عدم رشد معنی‌دار بوده به طوری که با افزایش دما تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد، هنگامی که زمان استخراج ۷۵ دقیقه بوده است، بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیاکلی به دست آمده است.

در رابطه با اثر متقابل زمان و نسبت حلال آب به اتانول نیز بیشترین قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی مربوط به نقطه مرکزی (زمان ۷۵ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۴۰:۶۰) می‌باشد (شکل ۳).

بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری سالمونلا اینتریتیدیس معادل ۲۰ میلی‌متر در دمای استخراج ۸۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال آب به اتانول ۴۰:۶۰ و زمان ۳۰ دقیقه به دست آمد و کمترین قطر هاله عدم رشد در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۵۰:۵۰ حاصل شد.

جدول ۴- آنالیز ANOVA و تحلیل آزمون ضعف برازش مدل‌های چندمتغیره در روش متداول استخراج با حلال جهت متغیرهای وابسته قطر هاله عدم رشد ساکارومایسس سرویزیه و اسپرژیلوس نیجر

منبع	درجه آزادی	قطر هاله عدم رشد ساکارومایسس سرویزیه			درجه آزادی	قطر هاله عدم رشد اسپرژیلوس نیجر		
		P	احتمال	مجموع مربعات		ضریب معادله	P	احتمال
مدل خطی	۳	۰/۰۰	۴۰۶/۴۰	-۱۷/۸۲	۷	۰/۰۰	۱۹۰/۳۵	۱۷۴/۳۹
X ₁	۱	۰/۰۰	۳۶۰/۰۰	۰/۶۰	۱	۰/۰۰	۱۳۶/۹۰	-۳/۴۲
X ₂	۱	۰/۲۶	۶/۴۰	-۰/۰۲	۱	۰/۳۵	۱/۶۰	۰/۰۸
X ₃	۱	۰/۰۱	۴۰/۰۰	-۰/۲۰	۱	۰/۰۰	۲۷/۲۲	-۰/۴۷
درجه دوم								
X ₁ X ₁	۱	۰/۰۲	۱۱/۷۶		۱	۰/۰۲		۰/۰۲
X ₂ X ₂	۱	۰/۲۶	۲/۳۹		۱	۰/۲۶		۰/۰۰
X ₃ X ₃	۱	۰/۳۲	۱/۸۴		۱	۰/۳۲		۰/۰۱
اثر متقابل								
X ₁ X ₂								
X ₁ X ₃								
X ₂ X ₃								
باقی مانده	۱۶		۷۴/۱۵		۱۲		۲۰/۴۵	
ضعف برازش	۱۱	۰/۴۰	۵۵/۳۲		۷	۰/۰۶	۱۷/۵۸	
خطای باقی مانده	۵		۱۸/۸۳		۵		۲/۸۸	
مجموع	۱۹		۴۸۰/۵۵		۱۹		۲۱۰/۸۰	
R ²				۰/۸۵				۰/۹۰
Adj-R ²				۰/۸۲				۰/۸۵
ضریب تغییرات				۱۰/۷۸				۷/۲۱

رابطه (۵)

$$Y = -17.816 + 0.600X_1 - 0.017X_2 - 0.200X_3$$

در رابطه (۵)، Y: قطر هاله عدم رشد ساکارومایسس سرویزیه، X₁: دمای استخراج، X₂: زمان استخراج و X₃: نسبت حلال آب به اتانول می‌باشد.

در رابطه با قطر هاله عدم رشد کپک اسپرژیلوس نیجر، مدل پیش‌گویی شده مدل چندمتغیره درجه دوم است (رابطه ۶). در این زمینه اثر ساده و درجه دوم دما و اثر ساده نسبت حلال آب به اتانول در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

رابطه (۶)

$$Y = 174.385 - 3.416X_1 - 0.008X_2 - 0.466X_3 - 0.004X_1X_3 + 11.76X_1^2 + 2.39X_2^2 + 0.008X_3^2$$

در رابطه (۶)، Y: قطر هاله عدم رشد اسپرژیلوس نیجر، X₁: دمای استخراج، X₂: زمان استخراج و X₃: نسبت حلال آب به اتانول می‌باشد.

با افزایش دما، قطر هاله عدم رشد اسپرژیلوس نیجر روندی نزولی را نشان می‌دهد؛ به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد است. در خصوص نسبت حلال آب به اتانول، بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به نمونه‌ای است که در آن میزان آب در سیستم حلال، حداکثر مقدار خود، یعنی ۷۰ درصد بوده است.

در رابطه با مخمر ساکارومایسس سرویزیه، با افزایش دمای استخراج از ۷۰ به ۹۰ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد افزایش یافته است؛ به طوری که کمترین قطر هاله عدم رشد با میزان ۱۰ میلی‌متر مربوط به دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و بیشترین میزان آن، مربوط به دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد با میزان ۲۷ میلی‌لیتر به دست آمد. این در حالی است که زمان استخراج و نسبت حلال آب به اتانول، رابطه معکوسی را با قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم ذکر شده نشان داد؛ به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد ساکارومایسس سرویزیه در مدت زمان

Endo, Cortez, Ueda-) است (Nakamura, Nakamura, & Dias Filho, 2010; Fernandes *et al.*, 2013).

یک رابطه مستقیم بین میزان ترکیبات فنولی کل و قدرت ضد میکروبی وجود دارد. خواص ضد میکروبی ترکیبات فنولی مربوط به توانایی آنها در دنا توره کردن آنزیم‌ها، اتصال به سوبسترای مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها مانند مواد معدنی، ویتامین‌ها و کربوهیدرات‌ها و از دسترس خارج کردن آنهاست. همچنین ترکیبات فنولی می‌توانند جذب دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها شده و ساختار و عملکرد غشاء را تحت تأثیر قرار دهند (Hayrapetyan *et al.*, 2012). در واقع ترکیبات فنولی به پروتئین و یا گروه‌های سولفیدریلی^۱ پروتئین‌های دیواره سلولی متصل شده و باعث مرگ سلول به دلیل رسوب پروتئین‌ها و اثر بازدارندگی بر آنزیم‌ها مانند گلیکوزیل ترانسفراز^۲ می‌شوند (Ismail, Sestili, & Akhtar, 2012). نوع و میزان ترکیبات فنولی در قدرت ضد میکروبی این ترکیبات تأثیرگذار است. هرچه میزان ترکیبات فنولی بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی بیشتری نیز مشاهده می‌شود. همچنین برخی ترکیبات فنولی مانند اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها خاصیت ضد میکروبی قوی تری نشان می‌دهند. Silván و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی را به اسیدهای فنولی و پس از آن کاتچین‌ها^۳ و پروآنتوسیانین‌ها^۴ و در انتها به فلاونول‌ها نسبت دادند. فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نیز خاصیت ضد میکروبی دارند. pH محیط و میزان حلالیت ترکیبات فنولی نیز در خواص ضد میکروبی آنها مهم است. هر چقدر pH پایین و حلالیت بالا باشد، قدرت ضد میکروبی این ترکیبات بیشتر است (Perumalla & Hettiarachchy, 2011).

خانواده نعناعیان به‌ویژه جنس *salvia* حاوی فلاونوئیدها به‌عنوان گروه دیگری از متابولیت‌های ثانویه گیاهی با خواص ضد میکروبی می‌باشند. تحقیق‌ها نشان‌دهنده حضور بوتئین^۵ در عصاره برگ گیاه نوروزک می‌باشد. ترکیب ذکر شده از خانواده چالکون‌ها^۶ بوده که

۳۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۵۰:۵۰ به‌دست آمد.

تعیین شرایط بهینه

نتایج بهینه‌یابی استخراج عصاره از برگ گیاه نوروزک به روش متداول با حلال، با ویژگی مقادیر حداکثری برای همه متغیرهای وابسته به‌طور هم‌زمان بررسی شد که براین اساس دمای بهینه ۸۳/۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۶۰/۹۲ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۵۹/۰۹ تعیین گردید. پس از تعیین تیمار بهینه، مجدداً استخراج انجام شد و براین اساس، نتایج به‌دست‌آمده برای متغیرهای وابسته نمونه بهینه، شامل قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *آسپرژیلوس نیجر* به ترتیب معادل ۱۹، ۱۸، ۱۵، ۱۶، ۱۹ و ۱۱ میلی‌متر بود.

عصاره‌های گیاهی مخازنی غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند. خاصیت ضد میکروبی گیاهان غالباً مربوط به وجود ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها و ساپونین موجود در ساختار آنها می‌باشد (Qu *et al.*, 2014). این ترکیبات قادرند از رشد میکروارگانیسم‌ها بر اساس مکانیسم‌های متفاوتی جلوگیری نمایند. ترکیبات ضد میکروبی با تأثیر بر غشای پلاسمایی یا دیواره سلولی و یا با مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی، خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. به‌طور مثال ممکن است با پروتئین‌های دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها واکنش داده و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد نمایند و یا باعث دنا توره‌سازی برخی آنزیم‌های میکروبی شوند. علاوه بر آن، این ترکیبات با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و آنها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کنند؛ همچنین می‌توانند در عملکرد میکروارگانیسم‌ها در انتقال الکترون و سنتز DNA اختلال ایجاد نمایند (Furneri, Marino, Saija, Uccella, & Bisignano, 2002). بررسی ساختار سلولی میکروارگانیسم‌ها با میکروسکوپ الکترونی پس از قرارگرفتن در محیط حاوی عصاره‌های گیاهی ضد میکروبی، تغییر در غشاء و ساختار دیواره سلولی، تغییر در فضای بین دیواره و غشاء و نیز کاهش حجم

¹ Sulfhydryl group (-SH)

² Glycosyl transferase

³ Catechins

⁴ Proanthocyanins

⁵ Butein

⁶ Chalcones

متداول با حلال انجام گرفته است (Adáméz *et al.*, 2012; Hayrapetyan *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2012). مهربان، عدالتیان دوم، حدادخداپرست و مهربان سنگ‌آتش (۱۳۹۶) به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا*^۲ علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: 6538)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC: 21299)^۳، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC: 14028)^۴ و *اشریشیاکلی* (ATCC: 25922) پرداختند. در این پژوهش اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی شد. بیشترین قطر هاله‌ بازدارنده در روش انتشار در آگار مربوط به عصاره‌های آبی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* در مقابل باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بود.

اثر ضد میکروبی عصاره برگ نوروک بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی*، *پروتئوس میرابیلیس*^۵ و *کلبسیلا نومونیه*^۶ بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد عصاره برگ در مرحله گلدهی گیاه تأثیر قابل توجهی بر باکتری‌های فوق داشته به طوری که در مواردی تأثیر آن بیشتر یا مساوی با آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده بود. براساس نتایج حاصل از این پژوهش اثر ضد میکروبی برگ نوروک بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از دیگر باکتری‌ها بود. همچنین تأثیر عصاره ریشه نوروک نیز بر باکتری‌های فوق مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج پژوهش فوق، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به عصاره ریشه بودند. از سوی دیگر تأثیر ضد میکروبی عصاره ریشه به ویژه در مرحله رویشی به طور معنی‌داری بیشتر از تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده و در مواردی مشابه با تأثیر آنها گزارش گردید (مدرس و ابریشم‌چی، ۱۳۸۷؛ ۱۳۸۹). ریشه گیاه نوروک نیز اثر ضد میکروبی داشته به طوری که عصاره ریشه در روش چاهک‌پلیت، بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سانتیلیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* و با روش رقت آگار، علاوه بر سه باکتری فوق بر *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکنس* نیز مؤثر بوده است (جبارزاده، ۱۳۷۸).

پیش‌ساز طبیعی فلاونوئیدها می‌باشند که فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی آنها به اثبات رسیده است (Miski, Ulubelen, Johansson, & Mabry, 1983).

براساس گزارش طباطبایی یزدی (۱۳۷۴)، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها و تانن‌ها از دیگر ترکیبات موجود در عصاره اندام‌های مختلف گیاه نوروک می‌باشند که در خاصیت ضد میکروبی عصاره استخراجی مؤثرند. براساس نتایج آزمون‌های انجام‌شده توسط طباطبایی یزدی (۱۳۷۴)، در برگ گیاه نوروک میزان ساپونین بیش از تانن و آلکالوئید گزارش گردید.

تحقیق‌های مختلف نشان‌دهنده آن است که به‌طور کلی عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اثر ضد میکروبی بیشتری دارند که این موضوع به تفاوت ساختار دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و منفی مربوط می‌شود (Hayrapetyan *et al.*, 2012). باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان^۱، دارای یک غشاء خارجی در دیواره سلولی خود می‌باشند. مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدی موجود در سطح این غشاء و خاصیت آب‌دوستی آن، مقاومت این سلول‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد؛ درحالی‌که در باکتری‌های گرم مثبت، ترکیبات ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Duffy & Power, 2001).

مواد با اثرات ضد میکروبی در هر گیاه بسته به ویژگی‌های ساختمان آن می‌توانند قطبی یا غیرقطبی باشند لذا نوع حلال مورد استفاده و میزان قطبیت در استخراج مواد مؤثره گیاهی بسیار مهم است. تحقیق‌ها نشان داده است که الکل سرعت و بازده استخراج را به دلیل تخریب دیواره سلولی و افزایش میزان دسترسی مواد قابل حل شدن، افزایش می‌دهد. استفاده از دو حلال در استخراج باعث می‌شود، از قدرت هر دو حلال در استخراج ترکیبات زیست‌فعال با قطبیت‌های متفاوت بهره برد و بازده استخراج را افزایش داد (Wang, He, Yang, Di, & Hao, 2008).

روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره‌های گیاهی و میوه‌ها وجود دارد ولی در بیشتر مطالعه‌های مربوط به خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی، استخراج به روش

² *Salvia chorasana*

³ *Enterococcus faecalis* (ATCC: 21299)

⁴ *Salmonella typhimurium* (ATCC: 14028)

⁵ *Proteus Mirabilis*

⁶ *Klebsiella pneumoniae*

¹ Peptidoglycan

در خصوص هر یک از متغیرهای وابسته، مدل مناسبی پیش‌بینی گردید. نتایج نشان داد در خصوص قطر هاله عدم رشد میکروارگانسیم‌ها، بیشترین قطر هاله عدم رشد در روش استخراج با حلال به مخمر ساکارومایسس سرویزیه و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تعلق داشت و کمترین میزان هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم منفی *اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* به دست آمد. بهینه‌یابی شرایط استخراج و استفاده از مدل‌های پیش‌گو، سبب دستیابی به عصاره‌ای با بیشترین خصوصیات ضد میکروبی علیه برخی از مهم‌ترین میکروارگانسیم‌های شاخص مواد غذایی گردید.

باتوجه به آنکه روش استخراج بر نوع ترکیبات استخراج‌شده از عصاره‌های گیاهی مؤثر است بررسی روش‌های نوین استخراج و بهینه‌یابی هر روش جهت به دست آوردن بیشترین میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال از جمله ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی از عصاره گیاهان از جمله برگ گیاه نوروزک، جهت انجام پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌گردد.

قاسمی، گلشاهی و مهران‌زاده (۱۳۹۰) به بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه ریحان پرداختند. قطر هاله عدم رشد برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و *اشریشیاکلی* به ترتیب ۱۵/۲۵، ۱۲/۵۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌متر محاسبه شد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نخست، استخراج عصاره از برگ گیاه نوروزک به روش استخراج متداول با حلال براساس روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد و قدرت ضد میکروبی عصاره‌های استخراج‌شده روی چند میکروارگانسیم شاخص در مواد غذایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیژنوز*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *آسپرژیلوس نیجر* براساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با روش انتشار چاهک محاسبه گردید و به منظور پیش‌گویی رفتار پاسخ‌ها و اثرات ساده، درجه دوم یا متقابل متغیرهای مستقل دمای استخراج، زمان استخراج و نسبت حلال آب به اتانول،

منابع

- باغی، ن. (۱۳۷۵). بررسی اثرات ضد میکروبی گیاه نوروزک. (پایان‌نامه منتشر نشده کتری)، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
- جبارزاده، م. (۱۳۷۸). بررسی خواص ضد میکروبی عصاره های ریشه ودانه‌ی گیاه نوروزک. (پایان‌نامه منتشر نشده دکتری)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
- حبیبی، ز. و روستائیان، ع. (۱۳۷۷، بهمن). بررسی شیمیایی سالویا لریفولیا، ارائه شده در سیزدهمین کنگره شیمی و مهندسی شیمی ایران - شیمی آلی تهران، دانشگاه تربیت مدرس.
- سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]. (۱۳۸۹). غلات و فرآورده های آن - روش اندازه گیری رطوبت - روش مرجع. (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۷۰۵، تجدیدنظر اول)، برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=46619>
- سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]. (۱۳۹۴). اندازه گیری رطوبت شکر به وسیله کاهش وزن در اثر خشک کردن. (استاندارد ملی ایران، شماره ۵۱۹۴، تجدیدنظر اول)، برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=42747>
- طباطبایی یزدی، ف. (۱۳۷۴). بررسی اثر آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره برگ گیاه نوروزک و شناسایی فیتوشیمیایی آن. (پایان‌نامه منتشر نشده کارشناسی ارشد)، دانشگاه فردوسی مشهد.
- قاسمی، ا.، گلشاهی، ح.، مهران‌زاده، ا. (۱۳۹۰، شهریور). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره الکی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) بر *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس*. ارائه شده در اولین کنگره بین‌المللی باکتری‌شناسی پزشکی ایران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشت درمانی تبریز.
- قهرمان، ا. (۱۳۷۳). کوروموفیت های ایران (سیستماتیک گیاهی). (جلد سوم): مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

- مدرس، م.، ابریشم چی، پ. (۱۳۸۷). بررسی تاثیر زمان برداشت بر فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه نوروزک. علوم-دانشگاه خوارزمی، ۳۵۶-۳۴۳، (۴)۸.
- مدرس، م.، و ابریشم چی، پ. (۱۳۸۹). بررسی فعالیت ضد باکتریایی ریشه گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia Benth*) در مراحل مختلف رشد و نمو. زیست شناسی ایران، ۲۳(۵)، ۷۱۷-۷۰۷.
- مهربان، ا.، عدالتیان دوم، م.، حدادخداپرست، م.، و مهربان سنگ آتش، م. (۱۳۹۶). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام های هوایی گیاه سالویا خراسانیکا (*Salvia chorasana*) علیه برخی باکتری های عامل فساد و مسمومیت. مجله علوم و صنایع غذایی، ۱۴(۶۶)، ۲۲۷-۲۱۷.
- یوسفلی، م.، ژ.، آذرینوند، ح.، حسینی، ز.، حدادخداپرست، م.، و پزشکی، پ. (۱۳۹۰). مطالعه اثر ضد میکروبی پودر عصاره برگ نوروزک بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در همبرگر. علوم و صنایع غذایی ایران - انجمن علوم و صنایع غذایی ایران، ۸(۲۹)، ۱۳۶-۱۲۶.
- Adámez, J. D., Samino, E. G., Sánchez, E. V., & González-Gómez, D. (2012). In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24(1-2), 136-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.016>
- Baghi, N. (1996). *Investigation of antimicrobial effects of Salvia leriifolia*. (Unpublished doctoral dissertation), Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, (in Persian)
- Chan, C.-H., Yusoff, R., & Ngho, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical engineering research and design*, 92(6), 1169-1186. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>
- Corrales, M., García, A. F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 415-421. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.003>
- Duffy, C. F., & Power, R. F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International journal of antimicrobial agents*, 17(6), 527-529.
- Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, 161(7), 534-540. doi:<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.002>
- Fernandes, F. H., Santana, C. P., Santos, R. L., Correia, L. P., Conceição, M. M., Macêdo, R. O., & Medeiros, A. C. D. (2013). Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 113(2), 443-447. doi:<https://doi.org/10.1007/s10973-012-2807-3>
- Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International journal of antimicrobial agents*, 20(4), 293-296. doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00181-4)
- Ghahreman, A. (1994). *Iranian chromophytes (plant systematic)* (Vol. 3): Institute for University Publishing. (in Persian)
- Ghasemi, E., Golshahi, H., & Mehranzadeh, A. (2011, September). *Antimicrobial effect of alcoholic extract of basil (Ocimum basilicum) on Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis*. Paper presented at the 1st International Congress of Medical Bacteriology, Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. (in Persian)
- Habibi, Z., & Roostaeian, A. (1999, February). *Chemical investigation of Salvia leriifolia*. Paper presented at the Proceedings of the 13th Iranian Congress of Chemistry and Chemical Engineering - Organic Chemistry, Tarbiat Modares University, Tehran. (in Persian)
- Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23(1), 66-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.012>
- Heywood, V. H., Moore, D., Richardson, I., & Stearn, W. T. (1993). *Flowering plants of the world*: Oxford University Press.

- Hosseinzadeh, H., & Lary, P. (2000). Effect of *Salvia leriifolia* leaf extract on morphine dependence in mice. *Phytotherapy Research*, 14(5), 384-387. doi:[https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<384::AID-PTR641>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<384::AID-PTR641>3.0.CO;2-F)
- Iranian National Standardization Organization [ISIRI]. (2010). Cereal and cereal products- Determination of moisture content ñ Reference method. (ISIRI Standard No. 2705, 1st.Revision). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=46619> (in Persian)
- Iranian National Standardization Organization [ISIRI]. (2016). Determination of Sugar Moisture by Loss on Drying. (ISIRI Standard No. 5194, 1st.Revision). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=42747> (in Persian)
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 397-405. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & de Marañón, I. M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International journal of food microbiology*, 158(1), 58-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.001>
- Jabarzadeh, M. (1999). *Investigation of Antimicrobial Properties of Root Extract of Salvia L.* (Unpublished doctoral dissertation), Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, (in Persian)
- Martin, J. G. P., Porto, E., Corrêa, C. B., Alencar, S., Gloria, E., Cabral, I., & Aquino, L. (2012). Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. *J. Nat. Prod*, 5, 27-36.
- Mehraban, A., Edalatian Dovom, M. R., Haddad Khodaparast, M. H., & Mehraban Sang Atash, M. (2017). Study of Antibacterial Effect of Aqueous, Ethanolic and Hydroalcoholic Extracts of Aerial Organs of *Salvia chorassanica* against Some Spoilage and Poisoning Bacteria. *Food Science and Technology*, 14(66), 227-217. (in Persian)
- Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C., & Mabry, T. J. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *Journal of Natural Products*, 46(6), 874-875. doi:<https://doi.org/10.1021/np50030a007>
- Modarres, M., & Abrisham Chi, P. (2010). The effect of harvesting time on the antibacterial activity of *Salvia leriifolia* benth. leaf extract. *Journal of Science Kharazmi University*, 8(4), 343-356. (in Persian)
- Modarres, M., & Abrishamchi, P. (2011). Antibacterial activity of *Salvia leriifolia* Benth. root extract in different stages of growth and development. *Iranian Journal of Biology*, 23(5), 707-717. (in Persian)
- Modarres, M., Asili, J., Lahouti, M., Gangali, A., Iransahy, M., & Sahebkar, A. (2014). Simultaneous determination of rosmarinic acid, salvianolic acid B and caffeic acid in *Salvia leriifolia* Benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(12), 1721-1730. doi:<https://doi.org/10.1080/10826076.2013.807466>
- Perumalla, A., & Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44(4), 827-839. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.022>
- Qu, W., Li, P., Hong, J., Liu, Z., Chen, Y., Breksa III, A. P., & Pan, Z. (2014). Thermal stability of liquid antioxidative extracts from pomegranate peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 1005-1012. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.6361>
- Rechinger, K. H. (1982). Flora iranica. *Graz-Austria: Akademic Druck-u Verlagsanstalt*, 150, 292-313.
- Sagdic, O., Ozturk, I., & Kisi, O. (2012). Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems with Applications*, 39(8), 6792-6798. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eswa.2011.12.047>
- Silvan, J. M., Mingo, E., Hidalgo, M., de Pascual-Teresa, S., Carrascosa, A. V., & Martinez-Rodríguez, A. J. (2013). Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp. *Food Control*, 29(1), 25-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.063>
- Tabatabai Yazdi, F. (1995). *Antioxidant effect of essential oil and leaf extract of Salvia L. and its phytochemical identification.* (Unpublished master's thesis), Ferdowsi University of Mashhad, (in Persian)
- Wang, Y.-S., He, H.-P., Yang, J.-H., Di, Y.-T., & Hao, X.-J. (2008). New monoterpenoid coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules*, 13(4), 931-937. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules13040931>
- Yousefli, M., Hosseini, Z., Haddad Khodaparast, M. H., Azarnivand, H., & Pezeshki, P. (2011). Antimicrobial effect of *Salvia leriifolia* leaf extract powder against the growth of *Staphylococcus aureus* in hamburger. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 8(29), 126-136. (in Persian)

The Optimization of Solvent Extraction Process from *Salvia Leriifolia* Leaf Extract Containing Antimicrobial Compounds Using Response Surface Methodology (RSM)

Mahboobe Sarabi-Jamab^{1*}, Mona Kaveh², Masoomeh Modarres³

1- Associate Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

* Corresponding author (m.sarabi@rifst.ac.ir)

2- PhD. Student, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Farhangian University, Mashhad, Iran

Abstract

In this research, determining the optimal conditions for extraction of *Salvia leriifolia* leaf by traditional solvent extraction method (with different solvent ratio of water/ethanol 50:50, 60:40 and 70:30 at temperatures of 70, 80 and 90 °C and time duration of 30, 75 and 120 min) in order to investigate the antimicrobial activity of the extract, using response surface method was carried out. The analysis of variances showed that the effect of all three independent variables on the dependent variables (the diameter of the inhibition zone of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*) was significant ($P < 0.05$). Optimum extraction conditions including temperature of 83.60 °C, extraction time of 60.92 min and water to ethanol ratio of 59.09 were obtained. Regarding the diameter of the inhibition zone of microorganisms, the highest inhibition zone belonged to *Saccharomyces cerevisiae* and *Staphylococcus aureus*. The optimization of extraction method resulted in extracts with the highest antimicrobial activity, especially against yeast and Gram-positive bacteria. In addition, predicting evaluation models provided an effective step in selecting extraction conditions to achieve a combination of antimicrobial properties against each microbial group.

Keywords: Antimicrobial compounds, Response surface methodology, *Salvia leriifolia*, Traditional solvent extraction