www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۵، جلد ۵، شماره ۱، صفحات ۱۱۸-۱۰۵
Doi: 10.22101/JRIFST.2016.06.01.518

JRIFST

ارزیابی تاثیر حذف حلال در استخراج به کمک مایکروویو بر میزان ترکیبات موثره و فعالیت ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو

محمدتقی گلمانی[1*]، آرمین قاسمی[2]، محمدهادی اسکندری[3]، مهرداد نیاکوثری[4]

۱. استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
* نویسنده مسئول (golmakani@shirazu.ac.ir)
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۳. دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۴. دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۰۴/۰۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۱۱/۰۷

واژه‌های کلیدی
اسانس
برگ به‌لیمو
روش استخراج
فعالیت ضد میکروبی
مایکروویو

چکیده

در این تحقیق اثر روش‌های مختلف استخراج، تقطیر با آب به کمک مایکروویو و استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال، بر بازدهی، ترکیبات موثره و فعالیت ضد میکروبی (۴ باکتری گرم مثبت و ۴ باکتری گرم منفی) اسانس برگ به‌لیمو در مقایسه با روش سنتی تقطیر با آب بررسی شده است. نتایج کروماتوگرافی گازی/ طیف سنج جرمی بیانگر آن بود که ژرانیال (۲۸/۵۳-۲۵/۵۴ درصد)، نرال (۲۳/۵۱-۲۰/۷۶ درصد) و لیمونن (۱۲/۵۱-۱۱/۲۱ درصد) اصلی‌ترین ترکیبات موثره اسانس‌های برگ به‌لیمو بودند. میان ترکیبات موثره اسانس بدست‌آمده با روش استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال با اسانس روش‌های تقطیر با آب و تقطیر با آب به کمک مایکروویو، اختلافات آماری معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). فعالیت ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو بدست‌آمده با روش استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال نسبت به اسانس روش‌های تقطیر با آب و تقطیر با آب به کمک مایکروویو بالاتر بوده که به دلیل بیشتر بودن میزان ترکیبات اکسیژن داری مانند ژرانیال (افزایش ۱۱/۷۰-۴/۹۶ درصدی) و نرال (افزایش ۱۳/۲۴-۴/۰۹ درصدی) می‌باشد. در نتیجه، روش استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال را می‌توان به عنوان یک روش جایگزین سریع، کارآمد و انتخابگر برای استخراج اسانس از گیاهان دارویی پیشنهاد می‌شود.

مقدمه

استخراج، یکی از اساسی‌ترین مراحل جهت بازیافت و خالص‌سازی اسانس از گیاهان دارویی می‌باشد. انتخاب روش استخراج به نوع گیاه، مواد موثره و همچنین درجه خلوص محصول نهایی بستگی دارد. روش تقطیر با آب، متداول‌ترین روش استخراج اسانس می‌باشد. این روش نیازمند زمان طولانی استخراج بوده و علاوه بر این، امکان آسیب حرارتی ترکیبات استخراج شده وجود دارد (Wang & Weller, 2006).

اخیرا روش‌های استخراج جدید مانند سیال فوق بحرانی، امواج فراصوت و مایکروویو مورد توجه قرار گرفته‌اند. با به‌کارگیری این روش‌ها، استخراج در زمانی کوتاه‌تر و با سرعتی بیشتر امکان‌پذیر می‌باشد. استخراج به کمک مایکروویو به عنوان

جایگزینی کارآمد جهت استخراج جامد-مایع ترکیبات موثره گیاهی مطرح می‌باشد (Wang Fellows, 2000 & Weller, 2006). از مزایای استخراج به کمک مایکروویو می‌توان به کاهش زمان استخراج و مصرف حلال، نفوذ سریع، سهولت کاربرد، افزایش بازدهی نهایی، انتقال موثر و سریع‌تر حرارت و کاهش مصرف انرژی اشاره کرد (Xiao *et al*., 2012; Ferhat *et al*., 2006).

از آنجایی که یکی از روش‌های انتقال حرارت در روش استخراج به کمک مایکروویو تابش می‌باشد، این امواج می‌توانند با گرم کردن داخلی و موضعی آب درون سلولی موجبات تخریب دیواره سلولی و غده‌های حاوی اسانس و در نتیجه آزادسازی اسانس را فراهم آورند (Golmakani & Moayyedi, 2015).

Golmakani و همکاران (۲۰۰۸a,b) اسانس آویشن شیرازی و آویشن باغی را با دو روش تقطیر با آب و تقطیر با آب به کمک مایکروویو استخراج و اسانس‌های حاصل از دو روش را از لحاظ کمی و کیفی با هم مقایسه کردند. نتایج کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنج جرمی بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار اسانس استخراج شده به کمک روش‌های مختلف بود. در نتیجه، روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو به عنوان یک روش جدید نه تنها بر روی کیفیت اسانس اثر نامطلوبی نداشته بلکه در مقایسه با روش تقطیر با آب، منجر به کاهش قابل توجه زمان استخراج (۱ ساعت در برابر ۴ ساعت) و انرژی مصرفی (۱/۲۴ کیلووات ساعت در برابر ۲ کیلووات ساعت) گردید (Golmakani & Rezaei, 2008a,b).

Rezvanpanah و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت ضد میکروبی اسانس مرزه تابستانی استخراج شده به کمک روش‌های تقطیر با آب به کمک مایکروویو و الکترومنتل بر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی را بررسی نموده و دریافتند که اسانس‌های استخراج شده با این دو روش فعالیت ضد باکتریایی مشابهی داشتند (Rezvanpanah *et al*., 2011). Qi و همکاران (۲۰۱۴) اسانس برگ لوبیای سودانی را با دو روش تقطیر با آب و استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال[1] استخراج کردند و فعالیت ضد باکتریایی آنها را مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که بازدهی استخراج در روش‌های مایکروویو بدون حلال (۴۴ دقیقه) و تقطیر با آب (۵ ساعت) به ترتیب ۰/۳۳۰ و ۰/۲۹۶ درصد وزنی/وزنی بود. همچنین دریافتند که اسانس برگ لوبیای سودانی استخراج شده با روش مایکروویو بدون حلال فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری از خود نشان داد (Qi *et al*., 2014).

به‌لیمو[2] درختچه‌ای است خزان‌پذیر از خانواده شاه‌پسند که ارتفاع آن به ۳-۲ متر نیز می‌رسد. برگ‌های این گیاه به صورت کشیده و سبز کم‌رنگ به طول ۷ تا ۱۰ سانتی‌متر بوده که عموما به صورت دسته‌های سه‌تایی بر روی ساقه قرار می‌گیرند. برگ‌ها را در اواخر تابستان جمع‌آوری می‌کنند. پودر برگ گیاه به رنگ سبز و دارای بوی معطر، تند، کمی تلخ و شبیه بوی لیمو می‌باشد (مظفریان، ۱۳۹۴). برگ‌های این گیاه دارای خواص درمانی بوده و از سال‌های دور در طب سنتی کشورهای آمریکای جنوبی و اروپایی در درمان بیماری‌ها نقش بسزایی داشته است. از جمله خواص دارویی دم نوش برگ به‌لیمو می‌توان به خاصیت تب‌بر، درمان سوءهاضمه، نفخ، درمان صرع و دردهای عصبی، سرگیجه و علایم سرماخوردگی، کمک کننده به هضم غذا (Pascual *et al*., 2001)، درمان اختلالات گوارشی و ضداسهالی آن (Velazquez *et al*., 2006) اشاره نمود.

اسانس‌های گیاهی ترکیباتی طبیعی، پیچیده و با عطر شدید هستند که در گیاهان دارویی به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شوند. اسانس‌ها به وسیله قسمت‌های مختلف گیاه مانند اندام‌های هوایی، دانه، گل، برگ و میوه سنتز می‌شوند. اسانس‌ها دارای فعالیت ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد قارچی بوده و در پزشکی و صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارند (Shareef, 2011). برگ به‌لیمو دارای ۱/۵-۰/۹ درصد اسانس می‌باشد. این اسانس سبک‌تر از آب و زرد رنگ با عطری مشابه لیمو می‌باشد. بسته به زمان کاشت، برداشت، شیوه نمونه‌برداری و استخراج، نوع و مقدار ترکیبات موجود در اسانس برگ به‌لیمو متفاوت می‌باشد. اگرچه در نمونه‌های خارجی ترکیبات عمده

[1] Solvent-free microwave extraction

[2] *Aloysia citrodora*

موجود در اسانس برگ به‌لیمو شامل سیترال[1]، لیمونن[2]، ژرانیول[3]، نرال[4] و ۸،۱-سینئول[5] می‌باشند اما در نمونه‌های ایرانی ترکیبات عمده این اسانس شامل لیمونن، ژرانیال[6]، نرال، ۱-اکتان-۳- ال[7] و آلفا کورکومن[8] می‌باشند (مظفریان، ۱۳۹۴).

هدف از این تحقیق مقایسه اثر روش‌های مختلف استخراج اسانس برگ به‌لیمو به کمک مایکروویو با روش متداول تقطیر با آب و بررسی ترکیبات موثره و فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های استخراج شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه

برگ به‌لیمو از باغ‌های استان فارس در ۲۰ شهریور ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. جنس و گونه به‌لیمو توسط متخصصین هرباریوم بخش زیست‌شناسی دانشگاه شیراز با شماره ثبت ۲۵۰۰ مورد تأیید قرار گرفت. برگ‌های این گیاه با روش دستی جدا و در دمای محیط (۲±۳۰ درجه سلسیوس) و رطوبت نسبی ۱±۱۰ درصد به مدت ۳ روز خشک شدند. میزان رطوبت نمونه‌ها طبق روش ۴۴-۱۹ استاندارد AACC با استفاده از آون آزمایشگاهی و در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری گردید (AACC, 1983). میزان رطوبت برگ به‌لیمو خشک شده ۰/۳۱±۵/۳۳ درصد بود. تمام نتایج این تحقیق بر اساس وزن خشک برگ به‌لیمو گزارش شده‌اند.

استخراج اسانس برگ به‌لیمو

روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل

روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل یکی از روش‌های مرجع و متداول استخراج اسانس می‌باشد. در این روش انتقال حرارت فقط به صورت هدایت و جابجایی صورت پذیرفته و نمونه و آب با حرارت تولید شده به وسیله انرژی الکتریکی گرم می‌شوند. حرارت باعث تخریب غده‌های حاوی اسانس و در نتیجه خروج اسانس می‌گردد. استخراج‌ها در شرایط یکسان بر روی ۵۰ گرم برگ خشک شده به‌لیمو و ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با نسبت جامد:مایع (نمونه:آب) برابر با ۹:۱ و توان الکترومنتل ۳۳۵ وات تا تکمیل فرایند استخراج اسانس (۱۲۰ دقیقه) انجام پذیرفت.

روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو

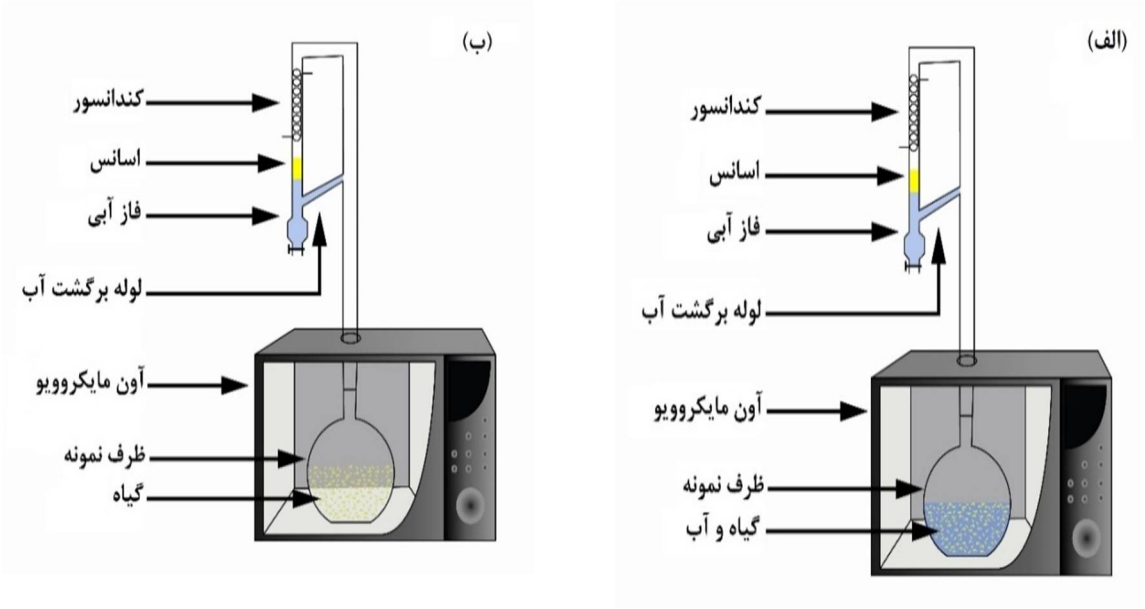
اساس روش استخراج تقطیر با آب به کمک مایکروویو همانند استخراج به وسیله دستگاه الکترومنتل می‌باشد با این تفاوت که در این روش استخراج، منبع تولید حرارت به‌جای گرم‌کن برقی، امواج مایکروویو می‌باشد. در این روش از یک مایکروویو خانگی تغییر یافته (سامسونگ، مدل 3140 W، ساخت کشور مالزی) و حداکثر توان خروجی ۱۰۰۰ وات استفاده شد (شکل ۱ (الف)). در این روش از ۵۰ گرم برگ به-لیمو خشک شده و ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با نسبت جامد:مایع (نمونه:آب) برابر با ۹:۱ و توان ۱۰۰۰ وات مایکروویو به مدت ۱۰ دقیقه برای استخراج کامل اسانس برگ به‌لیمو استفاده گردید.

روش استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال

اساس استخراج با این روش همانند استخراج با روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو می‌باشد (شکل ۱ (ب)). امواج مایکروویو سبب افزایش دمای آب موجود در برگ به‌لیمو و به دنبال آن تورم و پارگی غده‌های حاوی اسانس می‌گردند. در این روش از ۲۵۰ گرم برگ به‌لیموی تازه و ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با نسبت نمونه:آب برابر با ۱:۱ و توان ۱۰۰۰ وات مایکروویو به مدت ۵ دقیقه برای استخراج اسانس برگ به‌لیمو استفاده شد.

---

[1] Citral
[2] Limonene
[3] Geraniol
[4] Neral
[5] 1,8-Cineole
[6] Geranial
[7] 1-octan-3-ol
[8] α-Curcumene



شکل ۱- دستگاه استخراج اسانس با روش‌های (الف) تقطیر با آب به کمک مایکروویو و ب) مایکروویو بدون حلال.

تعیین ترکیب اسانس برگ به‌لیمو با استفاده از کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرم

اسانس‌های استخراج شده به وسیله سولفات سدیم بی آب، خشک و به وسیله یک میلی‌لیتر نرمال هگزان رقیق شدند. پس از مخلوط کردن کامل اسانس با حلال، یک میکرولیتر از آن، به دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق گردید.

دستگاه GC/MS شامل دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent Technologies 7890A، ساخت کشور آمریکا) و طیف سنج جرمی (مدل AgilentTechnologies 5975C، ساخت کشور آمریکا) بود. دمای قسمت تزریق نمونه، ۲۸۰ درجه سلسیوس و گاز مورد استفاده، هلیم (٪۹۹/۹۹) با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. سیستم در حالت تقسیم با نسبت تقسیم ۱:۱۰۰ تنظیم شده بود. ستون (مدل HP-5MS)، از نوع موینه با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای ستون، با سرعت ۳ درجه سلسیوس در دقیقه، از ۶۰ درجه سلسیوس به ۲۱۰ درجه سلسیوس افزایش یافت. بلافاصله پس از آن با سرعت ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه سلسیوس رسانده شد و به مدت ۸/۵ دقیقه در این دما نگهداری شد (کل زمان اجرایی دستگاه: ۶۰ دقیقه). زمان تأخیر حلال در شناساگر طیف جرمی ۳ دقیقه، دامنه جرم ۴۵-۵۵۰ amu، دمای منبع طیف جرمی ۲۳۰ درجه سلسیوس، دمای کواد طیف جرمی ۱۵۰ درجه سلسیوس و دمای خط انتقال ۲۸۰ درجه سلسیوس بود.

پس از انجام تزریقات و به دست آوردن کروماتوگرام‌ها، شناسایی و تعیین مقدار هر یک از ترکیبات با استفاده از طیف جرمی آنها انجام شد. تعیین نوع ماده ورودی به طیف سنج جرمی بر اساس داده‌های کتابخانه‌ای وایلی Wiley Registry 10th Spectral Library (Edition/ NIST 2012 Mass ((Upgrade)) ISBN: 978-1-118-61613-0) صورت گرفت. جهت محاسبه شاخص ماند، نمونه استانداردی از نرمال آلکان‌های تحت همان برنامه دمایی و ستون به دستگاه GC/MS تزریق شد. شاخص ماند ترکیبات موجود در اسانس برگ به‌لیمو با استفاده از زمان ماند نرمال آلکان‌های تزریق شده، تعیین گردید.

خاصیت ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو

برای ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو، قطر هاله‌ی ممانعت از رشد، حداقل غلظت بازدارندگی

(MIC)[1] و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)[2] بر روی ۴ باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC:۱۱۱۲)، باسیلوس سرئوس (PTCC:۱۱۵۴)، لوکونوستوک مزونتروئیدس (PTCC:۱۰۵۹)، لیستریا مونوسایتوژنز (PTCC:۱۲۹۸) و ۴ باکتری گرم منفی اشرشیاکلی (PTCC:۱۲۷۶)، سالمونلا تایفی (PTCC:۱۶۰۹)، انتروباکتر آئروژنز (PTCC:۱۲۲۱) و سودوموناس پوتیدا (PTCC:۱۶۹۴) بررسی گردید. نگهداری و آماده‌سازی تمامی سوش‌ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه شیراز انجام پذیرفت.

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو از روش ارزیابی انتشار دیسک استفاده شد (Andrews, 2001). به منظور اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، ابتدا غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ cfu/ml از هر یک از باکتری‌ها با روش سطحی بر روی پلیت مولر هینتون آگار کشت گردید. سپس، بر روی سطح هر یک از پلیت‌ها دیسک‌های شاهد استریل (با قطر ۶/۴ میلی‌متر) قرار داده شد. بر روی سطح هر یک از دیسک‌ها ۱۰ میکرولیتر از هر یک از اسانس‌ها تزریق گردید. در ادامه پلیت‌ها تا زمان رشد کامل نمونه کنترل منفی در دمای ۲±۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی، از روش تعیین حساسیت در محیط مایع استفاده گردید (Rezvanpanah *et al.*, 2011). به منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی هر یک از اسانس‌ها از روش رقت‌سازی در پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. پایین‌ترین غلظتی از اسانس که هیچ‌گونه رشدی در آن مشاهده نگردید، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی انتخاب گردید. در مرحله بعد به منظور تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی برای هر باکتری، سه خانه آخری (مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی) که در آنها هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشده بود، بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار کشت و پایین‌ترین غلظت پلیتی که هیچ‌گونه رشدی در آن مشاهده نگردید، به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی انتخاب گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام و نتایج حاصل به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف از استاندارد گزارش گردیدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و بر اساس دستورالعمل GLM و با آزمون مقایسه میانگین‌های LSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2010 نسخه ۱۴ ترسیم گردیدند.

نتایج و بحث

بازدهی و زمان استخراج اسانس برگ به‌لیمو

زمان تکمیل استخراج اسانس برگ به‌لیمو در روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل ۱۲۰ دقیقه، در روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو ۱۰ دقیقه و در روش مایکروویو بدون حلال ۵ دقیقه بود. استفاده از مایکروویو منجر به کاهش بیش از ۹۰ درصدی زمان استخراج گردیده است. زمان استخراج در روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو به دلیل انتقال سریع و همگن‌تر حرارت، کوتاه‌تر می‌باشد. البته با توجه به ثابت بودن مقدار اسانس در برگ به‌لیمو، روش‌های تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو و مایکروویو بدون حلال تأثیری بر مقدار نهایی اسانس (به ترتیب ۰/۰۸±۱/۲۶، ۰/۰۴±۱/۲۱ و ۰/۰۴±۱/۲۶ درصد) نداشته و استخراج به کمک مایکروویو تنها باعث کاهش زمان استخراج شده است. این نتایج با یافته‌های Rezvanpanah و همکاران (۲۰۱۱) که نشان دادند بازدهی استخراج اسانس مرزه تابستانه با هر دو روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو یکسان (۳/۱ درصد وزنی-وزنی) می‌باشد، مطابقت دارد (Rezvanpanah *et al.*, 2011).

[1] Minimum inhibitory concentration
[2] Minimum bactericidal concentration

ترکیبات اسانس برگ به‌لیمو

اسانس برگ به‌لیمو استخراج شده به کمک روش‌های تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو و استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرمی مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). مجموعاً ۲۱ ترکیب در اسانس برگ به‌لیمو وجود دارد که بیش از ۹۹ درصد ترکیبات موجود در اسانس برگ به‌لیمو (بر مبنای سطح زیر پیک اجزای کروماتوگرام) را تشکیل می‌دهند. سه ترکیب ژرانیال، نرال و لیمونن ترکیبات عمده اسانس برگ به‌لیمو را تشکیل می‌دهند. ژرانیال اصلی‌ترین ترکیب موجود در اسانس برگ به‌لیمو (۲۸/۵۳-۲۵/۵۴ درصد) می‌باشد. بعد از ژرانیال، نرال با ۲۳/۵۱-۲۰/۷۶ درصد در رتبه دوم و لیمونن با ۱۲/۵۱-۱۱/۲۱ درصد در رتبه سوم قرار داشتند. این نتایج با یافته‌های شاه‌حسینی و همکاران (۱۳۹۰)، که ترکیبات اسانس بذر به‌لیمو را توسط GC/MS شناسایی کرده بودند، مطابقت دارد. آنها نیز گزارش کرده بودندکه ژرانیال، نرال و لیمونن اصلی‌ترین ترکیبات اسانس بذر به‌لیمو می‌باشند (شاه‌حسینی و همکاران، ۱۳۹۰). Lira و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات اصلی شناسایی شده در به‌لیموی آرژانتینی را ژرانیال (۲۹ درصد)، نرال (۲۰ درصد)، لیمونن (۱۰ درصد) و کاریوفیلن‌اکسید (۱۱/۱ درصد)گزارش کردند (Lira *et al.*, 2008).

میزان ترکیبات اصلی (ژرانیال و نرال) در روش استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال به شکل معنی‌داری بیشتر بود؛ در روش‌های استخراج به کمک مایکروویو ترکیبات اکسیژن‌دار مانند ژرانیال و نرال بیشتر استخراج می‌شوند. از آنجایی که شدت استخراج در روش‌های استخراج به کمک مایکروویو بیشتر می‌باشد، ترکیبات اکسیژن‌دار و سنگین‌تر به مقدار بیشتری استخراج می‌شوند (Wang & Weller, 2006). اگر چه این مقادیر در روش استخراج تقطیر با آب به کمک مایکروویو نیز بیشتر از روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل بود اما تفاوت معنی‌داری میان آنها مشاهده نگردید. مشابه یافته‌های این تحقیق، Mazidi و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که بین ترکیبات اصلی اسانس زیره کوهی (زیره سیاه ایرانی) استخراج شده با دو روش تقطیر با آب و مایکروویو تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Mazidi *et al.*, 2012). اگر چه روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو روش سریع‌تری بوده اما مایکروویو اثر مخربی بر ترکیبات زیست فعال اسانس نداشته است.

جدول ۱- ترکیبات موجود در اسانس برگ به‌لیمو استخراج شده به کمک روش‌های مختلف

ردیف	نام ترکیب	زمان ماند (دقیقه)	شاخص ماند	روش استخراج اسانس		
				تقطیر با آب به کمک الکترومنتل	تقطیر با آب به کمک مایکروویو	استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال
۱	6-Methyl-5- hepten-2-one	۷/۳	۹۸۵	۱/۰۲±۰/۰۷^{b}	۱/۷۶±۰/۱۲^{a*}	۰/۵۵±۰/۰۴^{c}
۲	Limonene	۸/۷	۱۰۲۸	۱۱/۳۳±۰/۸۱^{a}	۱۲/۵۱±۰/۸۹^{a}	۱۱/۲۱±۰/۷۸^{a}
۳	1,8-Cineole	۸/۹	۱۰۳۳	۱/۸۵±۰/۱۳^{b}	۱/۸۳±۰/۱۳^{b}	۲/۲۳±۰/۱۶^{b}
۴	(E)-β-Ocimene	۹/۳	۱۰۴۷	۲/۱۴±۰/۱۵^{a}	۲/۰۰±۰/۱۴^{a}	۱/۹۱±۰/۱۳^{a}
۵	α-Terpineol	۱۵/۰	۱۱۹۰	۱/۶۸±۰/۱۲^{b}	۲/۱۵±۰/۱۶^{a}	۱/۷۹±۰/۱۳^{b}
۶	Nerol	۱۶/۶	۱۲۳۰	۲/۷۱±۰/۱۹^{c}	۳/۸۴±۰/۲۷^{b}	۶/۱۰±۰/۴۳^{a}
۷	Neral	۱۷/۱	۱۲۴۱	۲۰/۷۶±۱/۴۷^{b}	۲۱/۶۱±۱/۵۳^{b}	۲۳/۵۱±۰/۹۴^{a}
۸	Geraniol	۱۸/۰	۱۲۶۳	۱/۳۱±۰/۰۹^{c}	۱/۶۲±۰/۱۱^{b}	۳/۴۴±۰/۲۵^{a}
۹	Geranial	۱۸/۴	۱۲۷۱	۲۵/۵۴±۱/۸۰^{b}	۲۷/۱۸±۱/۹۲^{b}	۲۸/۵۳±۰/۷۳^{a}
۱۰	Geranyl acetate	۲۳/۱	۱۳۸۴	۲/۱۴±۰/۱۵^{a}	۲/۱۴±۰/۱۶^{a}	۱/۹۳±۰/۱۴^{a}
۱۱	(E)-Caryophyllene	۲۴/۶	۱۴۲۰	۴/۸۲±۰/۳۴^{a}	۳/۴۵±۰/۲۴^{b}	۲/۹۲±۰/۲۰^{b}
۱۲	Germacrene D	۲۷/۱	۱۴۸۱	۳/۹۱±۰/۲۸^{a}	۲/۳۳±۰/۱۷^{b}	۲/۲۲±۰/۱۶^{b}
۱۳	α-Curcumene	۲۷/۲	۱۴۸۵	۳/۸۶±۰/۲۷^{a}	۳/۲۷±۰/۲۳^{ab}	۲/۶۶±۰/۱۸^{b}
۱۴	α-Zingiberene	۲۷/۶	۱۴۹۴	۱/۳۲±۰/۰۹^{a}	۰/۷۳±۰/۰۶^{b}	۰/۵۹±۰/۰۴^{b}
۱۵	Bicylogermacrene	۲۷/۷	۱۴۹۷	۱/۸۴±۰/۱۳^{a}	۱/۲۶±۰/۰۹^{b}	۱/۱۵±۰/۰۹^{b}
۱۶	β-Curcumene	۲۸/۲	۱۵۱۱	۱/۳۴±۰/۰۹^{a}	۰/۷۳±۰/۰۶^{b}	۰/۸۲±۰/۰۵^{b}
۱۷	Cubebol	۲۸/۴	۱۵۱۴	۱/۱۲±۰/۰۸^{a}	۱/۰۳±۰/۰۸^{a}	۰/۷۵±۰/۰۵^{b}
۱۸	(E)-Nerolidol	۳۰/۴	۱۵۶۷	۲/۱۵±۰/۱۶^{a}	۱/۷۲±۰/۱۲^{b}	۱/۲۶±۰/۰۹^{c}
۱۹	Spathulenol	۳۰/۹	۱۵۸۱	۴/۷۱±۰/۳۴^{a}	۳/۹۹±۰/۲۸^{a}	۲/۱۵±۰/۱۵^{b}
۲۰	Caryophyllene oxide	۳۱/۱	۱۵۸۵	۲/۸۳±۰/۲۵^{b}	۳/۶۷±۰/۲۵^{a}	۳/۴۲±۰/۲۴^{ab}
۲۱	epi- α-Cadinol	۳۳/۱	۱۶۴۰	۱/۶۳±۰/۱۰^{a}	۱/۱۹±۰/۰۹^{b}	۰/۸۴± ۰/۰۶^{c}

* میانگین‌های ارائه شده با حروف مختلف در هر ردیف، به شکل معنی‌داری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) متفاوت می‌باشند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو

قطر هاله عدم رشد باکتری

نتایج قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی در اثر افزودن حجم‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ میکرولیتر) اسانس برگ به‌لیمو استخراج شده با روش‌های مختلف تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو و همچنین مایکروویو بدون حلال در جدول ۲ نشان داده شده است. به طور کلی، اگر چه اسانس‌های برگ به‌لیمو حاصل از روش‌های مختلف استخراج بر روی باکتری‌های گرم مثبت اثر ضد میکروبی قابل قبولی داشته‌اند، اما بر روی باکتری‌های گرم منفی اثر بازدارندگی مناسبی نداشته‌اند. این امر به خاطر این است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت دارای غشای بیرونی نمی‌باشد. مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس برگ به‌لیمو به دلیل پیچیدگی غشای بیرونی این ارگانیسم‌ها در مقایسه با غشای گلیکوپروتئینی/اسید تایکوئیک باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. ترکیبات ضد میکروبی موجود در اسانس برگ به‌لیمو، دیواره سلولی و غشای باکتری را تخریب نموده و منجر به خروج سیتوپلاسم می‌گردند (برومند و همکاران، ۱۳۸۷). البته مقاوم‌تر بودن باکتری‌های گرم منفی یک قاعده کلی نبوده و برخی محققین به مقاومت مشابه و حتی بالاتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس‌ها نیز اشاره نموده‌اند (اجاق و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج حاصل از مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت با استفاده از حجم‌های مختلف اسانس در مقایسه با تتراسایکلین نشان داد که حجم ۵ میکرولیتر اسانس برگ به‌لیمو عملکردی مشابه یا ضعیف‌تر از تتراسایکلین داشته، اما حجم‌های ۱۰ و ۱۵ میکرولیتر اسانس بهتر از تتراسایکلین عمل کرده‌اند. در مورد باکتری‌های گرم منفی، اگر چه حجم‌های ۵ و ۱۰ میکرولیتر اسانس ضعیف‌تر از تتراسایکلین عمل کرده‌اند اما حجم ۱۵ میکرولیتر اسانس عملکرد بهتری نسبت به تتراسایکلین از خود نشان داده است.

ارتباط مستقیمی بین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها با حجم اسانس افزوده شده مشاهده گردید. با افزایش حجم اسانس، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز به شکل معنی‌داری افزایش یافته است. بنابراین، حجم بالای اسانس تا ۱۵ میکرولیتر نیز به نسبت از قدرت ضد باکتریایی مناسبی برخوردار است.

در میان روش‌های مختلف استخراج، بالاترین قطر هاله عدم رشد و در نتیجه بیشترین فعالیت ضد میکروبی مربوط با روش مایکروویو بدون حلال بوده است. بالاتر بودن فعالیت ضد میکروبی در این روش را می‌توان به استخراج بیشتر ترکیبات ضد میکروبی بر پایه آلدئید نظیر نرال و ژرانیال نسبت داد. مشابه یافته‌های این تحقیق، Rezvanpanah و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت ضد میکروبی اسانس مرزه تابستانی استخراج شده به کمک روش‌های مختلف استخراج را بر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی و گزارش کردند که اسانس‌های استخراج شده به کمک روش‌های تقطیر با آب به کمک مایکروویو و الکترومنتل، فعالیت ضد باکتریایی مشابهی داشتند. در نتیجه، استخراج به کمک مایکروویو به عنوان یک روش سریع، هیچ‌گونه اثر نامطلوبی بر فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های استخراج شده نداشته است (Rezvanpanah *et al*., 2011).

Uysal و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ضد باکتریایی اسانس پونه کوهی حاصل از روش‌های تقطیر با آب و استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال را مورد بررسی قرار دادند. آنها فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های بدست‌آمده را با روش ارزیابی انتشار دیسک در برابر باکتری‌های سودوموناس آئروجینوز، کلپسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز و اشرشیاکلی مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی اسانس استخراج شده به کمک مایکروویو بدون حلال بیشتر از روش تقطیر با آب می‌باشد (Uysal *et al*., 2010).

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها (میلی‌متر) توسط اسانس برگ به‌لیمو

	باکتری	حجم اسانس (میکرولیتر)	روش استخراج اسانس			تتراسایکلین
			تقطیر با آب به کمک الکترومنتل	تقطیر با آب به کمک مایکروویو	استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال	
گرم مثبت	باسیلوس سرئوس	۵	۱/۷±۰/۱۶^{Ac*}	۱/۸±۰/۱۳^{Abc}	۲/۱±۰/۱۶^{Aab}	۲/۳۶±۰/۲۳^{Aa}
		۱۰	۲/۹±۰/۱۸^{Ab}	۳/۱±۰/۱۲^{Aab}	۳/۵±۰/۲۳^{Aa}	۲/۳۶±۰/۲۳^{Ac}
		۱۵	۴/۱±۰/۰۸^{Ab}	۴/۴±۰/۱۳^{Aab}	۴/۸±۰/۲۹^{Aa}	۲/۳۶±۰/۲۳^{Ac}
	استافیلوکوکوس	۵	۱/۶±۰/۱۳^{Ab}	۱/۸±/۰۰۷^{Ab}	۲/۱±۰/۱۸^{Aa}	۲/۳۵±۰/۱۷^{Aa}
	اورئوس	۱۰	۳/۱±۰/۱۴^{Ab}	۳/۴±۰/۱۷^{Aab}	۳/۶±۰/۱۸^{Aa}	۲/۳۵±۰/۱۷^{Ac}
		۱۵	۴/۳±۰/۱۹^{Aa}	۴/۳±۰/۳۸^{Aa}	۴/۸±۰/۳۳^{Aa}	۲/۳۵±۰/۱۷^{Ab}
	لیستریا	۵	۱/۵±۰/۱۴^{Ac}	۱/۹±۰/۱۵^{Ab}	۲/۲±۰/۱۱^{Aa}	۱/۸۳±۰/۰۶^{Bb}
	مونوسایتوژنز	۱۰	۲/۹±۰/۲۱^{Aa}	۳/۱±۰/۱۷^{Aa}	۳/۱±۰/۱۹^{Ba}	۱/۸۳±۰/۰۶^{Bb}
		۱۵	۴/۱±۰/۱۴^{Ab}	۴/۴±۰/۱۶^{Aab}	۴/۵±۰/۱۹^{Aa}	۱/۸۳±۰/۱۴^{BCc}
	لوکونوستوک	۵	۱/۷±۰/۱۱^{Ac}	۱/۷±۰/۲۲^{Ac}	۱/۹±۰/۲۱^{Ab}	۲/۴۳±۰/۱۰^{Aa}
	مزنتروئیدس	۱۰	۲/۶±۰/۱۱^{Bbc}	۲/۷±۰/۱۵^{Bb}	۳/۱±۰/۲۱^{Ba}	۲/۴۳±۰/۱۰^{Ac}
		۱۵	۴/۱±۰/۱۷^{Ab}	۴/۴±۰/۱۱^{Aa}	۴/۶±۰/۱۵^{Aa}	۲/۴۳±۰/۱۰^{Ac}
گرم منفی	سودوموناس پوتیدا	۵	-	-	-	۱/۵۶±۰/۱۷^{BC}
		۱۰	۱/۰۳±۰/۱۲^{Cb}	۱/۰۳±۰/۱۰^{Cb}	۱/۰۳±۰/۰۸^{Cb}	۱/۵۷±۰/۱۷^{BCa}
		۱۵	۲/۱±۰/۳۳^{Bb}	۲/۳±۰/۳۲^{Bab}	۲/۷±۰/۱۵^{Ba}	۱/۵۷±۰/۱۷^{Cc}
	انتروباکتر آئروژنز	۵	-	-	-	۱/۴۳±۰/۱۵^{C}
		۱۰	۱/۰۶±۰/۰۶^{Cb}	۱/۰۶±۰/۰۳^{Cb}	۱/۰۵±۰/۱۸^{Cb}	۱/۴۳±۰/۱۵^{Ca}
		۱۵	۱/۹±۰/۱۷^{BCb}	۲/۲±۰/۲۸^{Bb}	۲/۷±۰/۲۶^{Ba}	۱/۴۳±۰/۱۵^{Cc}
	سالمونلا تایفی	۵	-	-	-	۱/۷۲±۰/۲۱^{BC}
		۱۰	۱/۰۸±۰/۰۶^{Cb}	۱/۰۵±۰/۰۹^{Cb}	۰/۹۱±۰/۱۳^{Cb}	۱/۷۲±۰/۲۱^{Ba}
		۱۵	۱/۹±۰/۲۳^{BCbc}	۲/۱±۰/۱۱^{Bab}	۲/۳±۰/۳۹^{BCa}	۱/۷۲±۰/۲۱^{BCc}
	اشرشیاکلی	۵	-	-	-	۱/۴۵±۰/۱۳^{C}
		۱۰	۱/۰۱±۰/۰۸^{Cb}	۱/۰۵±۰/۱۷^{Cb}	۰/۹۶±۰/۱۳^{Cb}	۱/۴۵±۰/۱۳^{Ca}
		۱۵	۱/۷±۰/۱۶^{Cbc}	^{Bab}۱/۹±۰/۲۶	۲/۱±۰/۱۷^{Ca}	۱/۴۵±۰/۱۳^{Cc}

*حروف بزرگ و کوچک یکسان به ترتیب در هر ستون (هر غلظت) و ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

حداقل غلظت بازدارندگی

جدول ۳ حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های استخراج شده به کمک روش‌های مختلف علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را نشان می‌دهد. حداقل غلظت اسانس برگ به‌لیمو برای بازداری از رشد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کمتر بوده که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این باکتری‌ها در مقابل اسانس برگ به‌لیمو می‌باشد. حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود دیواره پلی‌ساکاریدی است. دیواره پلی‌ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی از ورود ترکیبات فعال به سیتوزول جلوگیری می‌کند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات ضد باکتریایی با سطح هیدروفیلی غشای خارجی نیز در ارتباط می‌باشد. سطح هیدروفیلی غشا غنی از مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدی بوده و مانند سدی در برابر نفوذ ترکیبات عمل می‌کند (برومند و همکاران، ۱۳۸۷).

روش استخراج اثر معنی‌داری بر حداقل غلظت بازدارندگی اسانس برگ به‌لیمو در مقابل تمامی باکتری‌ها (به جز لیستریا مونوسایتوژنز و سالمونلا تایفی) داشته است. کمترین حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به اسانس استخراج شده با روش مایکروویو بدون حلال علیه باکتری لیستریا مونوسایتوژنز بوده است.

مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های استخراج شده با روش‌های تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین این دو روش استخراج بود. تنها در مورد

باکتری اشرشیاکلی اختلاف معنی‌داری بین دو روش مشاهده گردید که در این مورد نیز اسانس استخراج شده به کمک مایکروویو عملکرد بهتری از خود نشان داد. Karakaya و همکاران (۲۰۱۲) اسانس رزماری را با دو روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو استخراج نموده و نشان دادند که اسانس‌های حاصل از هر دو روش، اثر بازدارندگی یکسانی روی باکتری‌های اشرشیاکلی، لیستریا مونوسایتوژنز و سالمونلا تایفی موریم داشتند. البته، اسانس حاصل از روش تقطیر با آب به کمک مایکروویو فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری علیه استافیلوکوس اورئوس از خود نشان داده بود (Karakaya *et al.*, 2012).

در اکثر موارد اختلاف آماری معنی‌داری بین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس استخراج شده به کمک روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو بدون حلال مشاهده گردید. اسانس استخراج شده به کمک مایکروویو بدون حلال موثرتر عمل کرده بود و غلظت کمتری از این اسانس برای بازداری باکتری‌های مورد مطالعه نیاز بود.

Okoh و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری را با دو روش تقطیر با آب و استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال مورد بررسی قرار دادند. مشابه یافته‌های این تحقیق، نشان داده شد که کمترین حداقل غلظت بازدارندگی و در نتیجه بهترین فعالیت ضد میکروبی مربوط به اسانس استخراج شده با روش مایکروویو بدون حلال بوده است (Okoh *et al.*, 2010).

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) اسانس برگ به‌لیمو استخراج شده به کمک روش‌های مختلف

	باکتری	روش استخراج اسانس		
		تقطیر با آب به کمک الکترومنتل	تقطیر با آب به کمک مایکروویو	استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال
گرم مثبت	باسیلوس سرئوس	$۲/۸۱\pm۰/۲۷^{Db*}$	$۳/۲۸\pm۰/۰۰^{Da}$	$۲/۸۱\pm۰/۵۴^{DEab}$
	استافیلوکوکوس اورئوس	$۳/۲۸\pm۰/۲۷^{CDa}$	$۳/۲۸\pm۰/۲۷^{Da}$	$۳/۲۸\pm۰/۲۷^{Da}$
	لوکونوستوک مزنتروئیدس	$۳/۸۱\pm۰/۰۰^{Ca}$	$۳/۲۸\pm۰/۲۷^{Dab}$	$۲/۸۱\pm۰/۵۴^{DEb}$
	لیستریا مونوسایتوژنز	$۲/۸۱\pm۰/۲۷^{Da}$	$۲/۸۱\pm۰/۲۷^{Ea}$	$۲/۸۱\pm۰/۰۰^{Da}$
گرم منفی	سودوموناس پوتیدا	$۶/۵۶\pm۰/۵۴^{Ba}$	$۶/۵۶\pm۰/۵۴^{Ca}$	$۵/۶۲\pm۰/۰۰^{Cb}$
	انتروباکتر آئروژنز	$۶/۵۶\pm۰/۵۴^{Bab}$	$۷/۵۰\pm۰/۰۰^{Ba}$	$۵/۶۲\pm۰/۰۰^{Cb}$
	سالمونلا تایفی	$۶/۵۶\pm۰/۰۰^{Bb}$	$۷/۵۰\pm۰/۵۴^{BCa}$	$۶/۵۶\pm۰/۰۰^{Bb}$
	اشرشیاکلی	$۱۳/۱۳\pm۰/۰۰^{Aa}$	$۱۱/۲۵\pm۰/۰۰^{Ab}$	$۱۱/۲۵\pm۰/۰۰^{Ab}$

*حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در هر ستون و ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند.

حداقل غلظت باکتری‌کشی

جدول ۴ نتایج آزمون حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس برگ به‌لیمو حاصل از روش‌های مختلف استخراج بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فاسد کننده مواد غذایی را نشان می‌دهد. حداقل غلظت باکتری‌کشی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی کمتر بوده که بیانگر حساسیت بیشتر این باکتری‌های گرم مثبت در برابر اسانس برگ به‌لیمو (مستقل از روش استخراج) می‌باشد. این پدیده عمدتا به دلیل وجود دیواره لیپوپلی‌ساکاریدی در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. Ali و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت ضد میکروبی اسانس به‌لیمو استخراج شده به کمک روش تقطیر با بخار آب را مورد مطالعه قرار دادند. اگر چه اسانس به‌لیمو فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سابتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داد، اما هیچ‌گونه فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم منفی سالمونلا تایفی و سودوموناس آئروجینوزا از خود نشان نداد (Ali *et al.*, 2011).

مقایسه حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس‌های استخراج شده با روش‌های تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین دو روش استخراج می‌باشد. بین حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس‌های استخراج شده با

روش تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و روش مایکروویو بدون حلال اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد. به طور کلی مشخص گردید که اسانس برگ به‌لیموی بدست‌آمده با روش استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال نسبت به سایر روش‌ها اثر ضد باکتریایی قوی‌تری دارد. مشابه نتایج این مطالعه، Qi و همکاران (۲۰۱۴) اسانس برگ لوبیای سودانی را با دو روش تقطیر با آب و مایکروویو بدون حلال استخراج کرده و نشان دادند فعالیت ضد باکتریایی اسانس استخراج شده با روش مایکروویو بدون حلال بیشتر می‌باشد (Qi *et al*., 2014).

جدول ۴- حداقل غلظت باکتری‌کشی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) اسانس برگ به‌لیموی استخراج شده به کمک روش‌های مختلف

	باکتری	روش استخراج اسانس		
		تقطیر با آب به کمک الکترومنتل	تقطیر با آب به کمک مایکروویو	استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال
گرم مثبت	باسیلوس سرئوس	$۵/۷۴\pm۰/۴۷^{Ea*}$	$۵/۷۴\pm۰/۴۷^{Ca}$	$۴/۲۲\pm۰/۵۵^{Db}$
	استافیلوکوکوس اورئوس	$۸/۴۴\pm۰/۰۰^{Da}$	$۴/۹۲\pm۰/۴۷^{Cb}$	$۴/۲۲\pm۰/۸۱^{Db}$
	لوکونوستوکمزنتروئیدس	$۴/۹۲\pm۰/۴^{Eb}$	$۶/۵۶\pm۰/۹۵^{Ca}$	$۴/۲۲\pm۰/۰۰^{Db}$
	لیستریا مونوسایتوژنز	$۴/۲۲\pm۰/۴^{Ec}$	$۵/۷۴\pm۰/۴۷^{Ca}$	$۴/۸۱\pm۰/۰۰^{Db}$
گرم منفی	سودوموناس پوتیدا	$۱۱/۲۵\pm۱/۰۹^{Ba}$	$۹/۸۴\pm۰/۰۰^{Bb}$	$۹/۸۴\pm۰/۰۰^{Cb}$
	انتروباکتر آئروژنز	$۱۳/۱۳\pm۱/۰۹^{Bb}$	$۱۵/۰۰\pm۰/۰۰^{Aa}$	$۹/۸۴\pm۰/۰۰^{Cc}$
	سالمونلا تایفی	$۹/۸۴\pm۰/۰۰^{Cc}$	$۱۵/۰۰\pm۱/۰۹^{Aa}$	$۱۳/۱۲\pm۱/۸۹^{Bb}$
	اشرشیاکلی	$۱۶/۴۱\pm۱/۸۹^{Aa}$	$۱۶/۸۸\pm۱/۰۹^{Aa}$	$۱۶/۸۸\pm۰/۰۰^{Aa}$

*حروف بزرگ وکوچک متفاوت به ترتیب در هر ستون و ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

نتیجه‌گیری کلی

خواص ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیموی استخراج شده با روش‌های تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو و مایکروویو بدون حلال با استفاده از روش‌های انتشار دیسک، حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی بر روی ۴ باکتری گرم مثبت و ۴ باکتری گرم منفی بررسی گردید. مستقل از روش استخراج اسانس برگ به‌لیمو، باکتری‌های گرم مثبت از حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی برخوردار بودند. اگر چه، بین فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات اسانس‌های استخراج شده با روش‌های تقطیر با آب به کمک الکترومنتل و مایکروویو اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت، اما فعالیت ضد میکروبی اسانس استخراج شده با روش مایکروویو بدون حلال به شکل معنی‌داری نسبت به سایر روش‌ها بیشتر بود که به دلیل استخراج بیشتر ترکیبات اکسیژن‌دار نظیر ژرانیال و نرال در این روش بود. از این‌رو، روش استخراج مایکروویو بدون حلال به دلیل فعالیت ضد میکروبی قوی‌تر و زمان استخراج کوتاه‌تر می‌تواند در مقیاس صنعتی جایگزین روش‌های سنتی استخراج اسانس گردد.

منابع

۱- اجاق، س. م.، رضایی، م.، رضوی، س. ه. و حسینی، س. م. ه. ۱۳۹۱. مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس پوست دارچین (*Cinnamomum Zeylanicum*) در شرایط آزمایشگاهی در برابر پنج باکتری عامل فساد غذایی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۳۵: ۷۶-۶۷.

۲- برومند، ع.، حامدی، م.، امام جمعه، ز.، رضوی، س. ه. و گلمکانی، م. ت. ۱۳۸۷. بررسی خاصیت میکروبی اسانس بذرهای شوید (*Anethum garaveolens*)، گشنیز (*Coriangrum Sativum*) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی 0157:H7، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع. مجله پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱: ۶۸-۵۹.

۳- شاه حسینی، ر.، قربانی، ح.، صالح، ر. و امیدبیگی، ر. ۱۳۹۰. بررسی صفات کمی و کیفی اسانس بذر به لیمو (*Lippia citriodora*). مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، ۱۸: ۹۶-۹۱.

۴- مظفریان، و. ۱۳۹۴. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، صفحه ۱۰۵۰.

5- AACC. 1983. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 8th ed. Salem, MA: Library of Congress.

6- Ali, H.F.M., El-Beltagi, H.S., & Nasr, N.F. 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla.* Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 10:2689-2699.

7- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48:5-16.

8- Fellows, P.J. 2000. Food Processing Technology, 2nd Ed., CRC Press Inc, New York.

9-Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., & Chemat, F. 2006. An improved microwave clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. Journal of Chromatography A, 1112:121-126.

10- Golmakani, M.T., & Moayyedi, M. 2015. Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from *Citrus limon* (Lisbon variety) peel. Food Science & Nutrition, 3:506-518.

11- Golmakani, M.T., & Rezaei, K. 2008a. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chemistry, 109:925-930.

12- Golmakani, M.T., & Rezaei, K. 2008b. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss. European Journal of Lipid Science and Technology, 110:448-454.

13- Karakaya, S., El, S.N., Karagozlu, N., Sahin, S., Sumnu, G., & Bayramoglu, B. 2012. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from Rosemary. Journal of Food Science and Technology, 51:1056-1065.

14- Lira, P.D.L., van Baren, C.M., Retta, D., Bandoni, A.L., Gil, A., Gattuso, M., & Gattuso, S. 2008. Characterization of *Lemon Verbena* (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina by the Essential Oil. Journal of Essential Oil Research, 20(4):350-353.

15- Mazidi, S., Rezaei, K., Golmakani, M.-T., Sharifan, A., & Rezazadeh, Sh. 2012. Antioxidant activity of essential oil from Black Zira (*Bunium persicum* Boiss.) obtained by microwave-assisted hydrodistillation. Journal of Agricultural Science and Technology, 14:1013-1022.

16- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., & Afolayan, A.J. 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods. Food Chemistry, 120:308-312.

17- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez, M.D., & Villar, A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology, 76:201-214.

18- Qi, X.-L., Li, T.-T., Wei, Z.-F., Guo, Na., Luo, M., Wang, W., Zu, Y.G., Fu, Y.J., & Peng, X. 2014. Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pea leaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and evaluation of its antimicrobial activity. Industrial Crops and Products, 58:322-328.

19- Rezvanpanah, S., Rezaei, K., Golmakani, M.-T., & Razavi, S.H. 2011. Antibacterial properties and chemical characterization of the essential oils from summer savory extracted by microwave-assisted hydrodistillation. Brazilian Journal of Microbiology, 42:1453-1462.

20- Shareef, A.A. 2011. Evaluation of Antibacterial activity of essential oils of *Cinnamomum* sp. and *Boswellia* sp. Journal of Basrah Researches (Sciences), 37(5A):60-71.

21- Uysal, B., Sozmen, F., Kose, E.O., Gokhan Deniz, I., & Oksal, B.S. 2010. Solvent-free microwave extraction and hydrodistillation of essential oils from endemic *Origanum husnucanbaseri* H. Duman, Aytac & A. Duran: comparison of antibacterial activity and contents. Natural Product Research, 24:1654-1663.

22- Velazquez, C., Calzada, F., Torres, J., Gonzalez, F., & Ceballos, G. 2006. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. Journal of Ethnopharmacology, 103: 66-70.

23- Wang, L., & Weller, L.C. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17:300-312.

24- Xiao, X., Song, W., Wang, J., & Li, G. 2012. Microwave-assisted extraction performed in low temperature and in vacuo for the extraction of labile compounds in food samples. Analytica Chimica Acta, 712:85-93.

Effect of different microwave-extraction methods on active components and antimicrobial activities of lemon verbena essential oils

Mohammad-Taghi Golmakani[1*], Armin Ghassemi[2], Mohammad Hadi Eskandari[3], Mehrdad Niakosari[4]

1- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
* Corresponding author (golmakani@shirazu.ac.ir)
2- M.Sc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran

Abstract

In this study, effects of different extraction methods, namely microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and solvent-free microwave extraction (SFME) were investigated in comparison with that of conventional hydrodistillation (HD) in terms of yield, active components, and antimicrobial activities (4 Gram-positive bacteria and 4 Gram-negative bacteria) of lemon verbena leaves essential oils (EOs). Gas chromatography/ mass spectrometry results indicated that geranial (25.54-28.53 %), neral (20.76-23.51 %), and limonene (11.21-12.51 %) were main active components of lemon verbena EOs. There were significant differences among active components of EO obtained by SFME method with those of HD and MAHD methods (P<0.05). Antimicrobial activity of lemon verbena EO obtained by SFME method was higher than those of HD and MAHD methods, which is due to its higher oxygenated components such as geranial (increased by 4.96-11.70%) and neral (increased by 4.09-13.24%). Hence, SFME method can be proposed as a fast, efficient, and selective alternative method for extraction of EO from medicinal plants.

Keywords: Antimicrobial activity, Essential oil, Extraction method, Lemon verbena leaf, Microwave