Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 2, June. July. 2016, p. 201- 213

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۵ ص.۲۱۳-۲۰۱

# بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش مخلوط و بررسی اثر ضدمیکروبی آن بر *Listeria innocua*، *Enterococcus faecium* و *Escherichia coli*

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، علی الغونه[۲]، فریده طباطبایی یزدی[۳*]، فخری شهیدی[۴]، محبت محبی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۰۶

## چکیده

در این پژوهش اثر حلال‌های آب، اتانول، متانول و گلیسیرین هر کدام در پنج سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از هندسه مخلوط برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا استفاده شد. از مدل چندجمله‌ای شف و بهینه سازی عددی به منظور مدل‌سازی و بهینه‌سازی عصاره استفاده گردید. مدل چند جمله‌ای شف به‌طور معنی‌داری قادر به پیش بینی بازده حاصل از استخراج عصاره برگ حرا می‌باشد (میزان ضریب تبین و ضریب تبین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۴ و۰/۸۴ وغیر معنی‌دار بودن آزمون ضعف برازش و مقدار اندیس F ( ۱۴/۶۲) نشان دهنده صحت مدل برای پیش بینی بازدهی عصاره می‌باشد). به علاوه میزان ضریب تغییرات ۱۴/۶٪ محاسبه شد که نشان دهنده تکرار پذیری قابل قبول برای داده‌های آزمایشی است. میزان تابع مطلوبیت بهینه سازی ۰/۹۴ محاسبه شد که نشانگر صحت عملیات بهینه سازی می‌باشد. بر این اساس، فرمولاسیون بهینه حاوی گلیسیرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول ( ۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود. اثر ضدمیکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا بر سه باکتری *Listeria innocua* ATTC 33090، *Enterococcus faecium* ATTC 51559 و*Escherichia coli* ATTC 25992 به سه روش (انتشار در آگار به کمک دیسک، حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد و حداقل غلظت‌کشندگی) در هشت غلظت مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی بر *Listeria innocua* و بالاترین میزان مقاومت در برابر عصاره، مربوط به *Escherichia coli* بود، همچنین با افزایش غلظت عصاره‌ها قطر هاله بازدارندگی بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) افزایش یافت.

**واژه‌های کلیدی:** حرا، بهینه‌سازی، هندسه مخلوط، اثر ضدمیکروبی

## مقدمه

مدل نمایش ساده‌ای از یک سیستم پیچیده است. اصولاً با مدل‌سازی می‌توان حرکات و واکنش‌های یک سیستم حقیقی را به سادگی در اختیار گرفت. یک مدل با صحت بالا به کاربر اجازه به دست آوردن خصوصیات، پیش بینی کارایی فرآیند و هم چنین بهینه سازی فرآیند را می‌دهد (Ruguo, 1999). توسعه تکنیک‌های موفق مدل سازی، منجر به کاهش لزوم آزمایش‌های تجربی و در نتیجه صرفه جویی در زمان و هزینه در توسعه مراحل فرایند می‌گردد.

سیستم‌های هوشمند، ابزار مناسبی برای مدل سازی فرایندهای پیچیده طبیعی می‌باشند. این سیستم‌ها با پردازش مستقیم داده‌های تجربی دانش یا قانون نهفته در ورای داده‌ها را مشخص می‌نمایند. در حقیقت این مدل‌ها تنها سیستم را توصیف می‌کنند ( Razavi *et al*., 2003).

یکی از این سیستم‌های هوشمند روش سطح پاسخ می‌باشد. متدولوژی رویه ی پاسخ[۶] (RSM) که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون (۱۹۵۱) معرفی شد سیستمی هوشمند می‌باشند، که با به کارگیری مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی، شبیه سازی سیستم‌های خطی و غیر خطی را انجام می‌دهد. در حقیقت روش سطح پاسخ یک ابزار مفید برای زمانی است که سیستم به طور کامل ناشناخته می‌باشد این تکنیک دارای هندسه‌های متنوعی است که از جمله آن می‌توان به روش مخلوط[۷] اشاره نمود (Xie *et al*., 2003).

۱ و ۲- دانشجویان دکترا گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳، ۴ و ۵- استادان گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: tabatabai@um.ac.ir)

6Response Surface Method
7Mixture Design

www.SID.ir

Archive of SID



روش مخلوط به شکل موفقیت‌آمیزی در صنایع غذایی به کاربرده شده است که می‌توان به، بهینه سازی فرمولاسیون تورتیلای حاوی آرد گندم، لوبیای چشم بلبلی و بادام‌زمینی (Holt *et al*., 2006)، بهینه‌سازی فرمولاسیون دسرهای خشک حاوی شیرین کننده (Lop *et al*., 1999)، بهینه‌سازی محیط کشت میکروبی برای تولید فراورده کفیر (Zhou *et al*., 2007)، بررسی اثر متقابل بین صمغ لوبیای لوکاست و نشاسته سیب‌زمینی و کاپاکاراگینان بر ویژگی‌های بافتی و رنگی سوسیس کم چرب اشاره نمود (Garcia & Totosaus, 2008).

یکی از روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشد. اما همواره استفاده از این گونه مواد شیمیایی در مواد غذایی باعث نگرانی بوده است، زیرا اعتقاد عمومی مردم بر این است که مواد شیمیایی ضدمیکروبی ممکن است سلامت آن‌ها را تهدید نماید. به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی بجای مواد شیمیایی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. بدون هیچگونه تردیدی استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان طبیعی جایگزین بسیار مناسبی به‌جای نگهدارنده‌های شیمیایی هستند (Dorman & Deans, 2000; Matan *et al*., 2006).

گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* متعلق به خانواده اوسیناسه معروف به مانگروی سفید یا خاکستری می‌باشد. گیاه حرا در حد فاصل خشکی و دریا و در نواحی جزر و مد رشد می‌کند. گیاه حرا بعنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی‌های بالقوه‌ای می‌باشد. این گیاه به صورت بوته‌ای یا درختچه-ای با ارتفاع‌های متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می‌شود (Kathiresan & Bingham, 2001).

علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر *Penicillium digitatum* و *Alternaria citri* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های برگ گیاه حرا داری اثر بازدارندگی موثری بر هر دو گونه قارچ مورد بررسی داشت. اثر بازدارندگی عصاره بر قارچ *Penicillium digitatum* بیشتر بود.

مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده روی عصاره برگ گیاه حرا وجود متابولیت‌های ثانویه نظیر تانین‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، فلاوونوئیدها، نفتوکینون‌ها ، گلیکوزیدها و سایر ترپن‌ها را گزارش کرده که انتظار می رود این ترکیبات با فعالیت زیستی خود باعث اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا شوند (Zhu *et al*., 2009).

مطالعات توکسیکولوژی انجام شده توسط محققان روی موش‌های آزمایشگاهی، هیچ گونه اثر منفی استفاده از عصاره برگ حرا را بر موش‌ها گزارش ننموده اند (Ali & Bashir, 1998).

*Listeria innocua* یکی از شش گونه متعلق به جنس لیستریا می باشد، که به‌طور گسترده در محیط به ویژه خاک و منابع غذایی یافت می‌شود. این باکتری از لحاظ ظاهری، یک باکتری گرم مثبت میله‌ای شکل می‌باشد، که توانایی تحمل دما و غلظت بالای نمک را دارد. از آنجا که باکتری *L. innocua* ویژگی‌های فیزیولوژیکی مشابهی با *L. monocytogenes* دارد و تنها تفاوت آن‌ها قابلیت بیماری زایی در *L. monocytogenes* است لذا در این پژوهش آزمایشگاهی از *L. innocua* استفاده شد (Banada *et al*., 2007).

*Enterococcus faecium* باکتری گرم مثبت، کروی می‌باشد که جایگاه فعالیت آن دستگاه گوارش انسان و سایر پستانداران است. *E. faecium* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج (Aminoglycosides, Nafcillin, Cephalosporins Clindamycin, Aztreonam و Oxacillin) نسبتا مقاوم است و باعث ایجاد عفونت به ویژه در بیمارستان‌ها، خانه سالمندان و ... می‌شود. *E. faecium* می‌تواند باعث ایجاد باکتریمی و اندوکاردیت عفونت دستگاه ادراری (UTI) و عفونت‌های دیگر در انسان شود (Gonzales *et al*., 2001).

*Escherichia coli* باسیل گرم منفی، متحرک، بی‌هوازی اختیاری و غیر تشکیل‌دهنده اسپور است. این باکتری در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی‌اکسید کربن تولید می‌کند. رشد بهینه باکتری *E. coli* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است اما تا دمای ۴۹ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد و می‌تواند عامل بیماری‌های عفونی در انسان باشد (Barrick *et al*., 2009).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نسبت‌های متفاوت از حلال‌های گلیسیرین، اتانول، متانول و آب بر میزان بازدهی عصاره‌ی برگ گیاه حرا با استفاده از روش سطح پاسخ با هندسه بهینه مخلوط، بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا و در انتها بررسی اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های برگ گیاه حرا بر میکروارگانسیم‌های *L. innocua* ATTC 33090، *E. faecium* ATTC 51559 و *E. coli* ATTC 25992 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

## مواد و روش

### جمع‌آوری برگ گیاه حرا

این پژوهش آزمایشگاهی در فاصله آبان ماه ۱۳۹۱ تا شهریور ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. برگ‌های تازه گیاه حرا در شهریور ماه ۱۳۹۱ از جزیره قشم (استان هرمزگان) جمع آوری و بعد از شناسایی و تایید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی و هماهنگی‌های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، در شرایط مناسب (سایه) خشک گردید و جهت تهیه

www.SID.ir

Archive of SID



عصاره با آسیاب مدل Waring پودر شد.

### سوش‌های میکروبی

سوش‌های میکروبی مورد بررسی در این پژوهش شامل 33090 *L.innocua* ATTC و *E. faecium* ATTC 51559 و *E. coli* ATTC 25992 بود. تمامی سوش‌ها بصورت لیوفلیزه از طرف دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران اهدا گردید. آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها در شرایط استریل باز و به محیط کشت مایع مولر هیلتون براث (مرک آلمان) انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار نوترینت آگار تلقیح انجام پذیرفت، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شستشو و سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی باید حاوی $1/5\times10^{8}$ CFU/ml باکتری باشد (Tabatabaei Yazdi & Alizadeh Behbahani, 2013; Valero & Salmeron, 2003).

### تهیه عصاره‌ها

جهت تهیه عصاره‌ها ( آبی، اتانولی، متانولی و گلیسرینی) ۵۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه حرا به ارلن حاوی۲۵۰ میلی‌لیتر حلال‌های مختلف اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط گردید تا استخراج عصاره بطور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی جنس واتمن از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه بدست آید. مایع رویی پس از جمع‌آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافی ۰/۴۵ µ عبور داده و جهت حذف آلودگی‌های میکروبی از فیلتر سرنگی استفاده شد و در نهایت عصاره‌های اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) گردید و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌های تغلیظ شده در ظروف تیره استریل آلومینیمی ریخته شد و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Alizadeh Behbahani *et al*., 2013; Heidari Sureshjani *et al*., 2013).

### بررسی وزن خشک عصاره‌ها

برای محاسبه وزن خشک ، برای هر کدام از عصاره‌ها یک لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس (۰/۰۰۰۱) توزین، سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی‌لیتر به لوله اضافه و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجددا تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن ml ۱ از عصاره‌های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید (Tabatabaei Yazdi *et al*, 2013).

### بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت های (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌ها درآب مقطر استریل تهیه و به عصاره حرا آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط کش به‌طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام گرفت (Babayi *et al,* 2004).

### تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای عصاره‌ها و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (Benger *et al*, 2004).

### تعیین حداقل غلظت‌کشندگی

حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای برای عصاره‌های برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد

www.SID.ir

Archive of SID



میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله‌هایی که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود، جهت تعیین MBC کشت به‌عمل آمد. لوله‌ای که کم‌ترین غلظت عصاره را داشت و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به‌عنوان حداقل غلظت‌کشندگی در نظر گرفته شد. این روش برای هر عصاره و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید (Espinel *et al*, 2002).

## طرح آماری

در این پژوهش به‌منظور مطالعه‌ی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره گیاه حرا، اثر آب، اتانول، گلیسیرین و متانول هر کدام در ۵ سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از طرح آزمایشی مخلوط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی فرمولاسیون‌ها نسبت حلال به برگ گیاه حرا ۵ به ۱ بود. طرح شامل بیست آزمایش بوده که ۱۰ آزمایش مربوط به تخمین ضرایب مدل، پنج آزمایش مربوط به آزمون ضعف برازش، پنج آزمایش برای محاسبه خطای تصادفی در نظر گرفته شده است. یکی از مزایای روش مخلوط وارد کردن محدودیت دلخواه در انتخاب نقاط مورد آزمایش می‌باشد. همچنین نوع بهینه این روش می‌تواند ماتریسی از نقاط آزمایشی را ایجاد کند که در آن دترمینان ماتریس مینمم باشد، این ویژگی امکان استخراج حداکثر اطلاعات را از فضای آزمایشی مهیا می‌سازد (Ruguo, 1999).

در این پژوهش به‌منظور مدل‌سازی بازدهی استخراج از چند جمله‌ای شف (معادله ۱) استفاده گردید، این معادله فرم مشتق شده بسط تیلور می‌باشد، که به علت رابطه خاص (معادله ۲) میان n جزء در یک هندسه مخلوط به وجود آمده است (Ruguo, 1999).

$$y = \sum_{j=1}^{n} \beta j \,.\, Xj + \sum_{j<k=2}^{n} \beta jk \,.\, Xj.Xk + \sum_{\substack{j<k=2 \\ i>2}}^{n} \beta jki \,.\, Xj.Xk.Xi \quad (۱)$$

$$Xi + Xj + Xk + \cdots + Xn = 1 \quad (۲)$$

در معادلات مذکور y بعنوان پاسخ در نظر گرفته شده و βj ضرایب جملات خطی، βjk ضرایب جملات غیر خطی دوتایی وβjki ضرایب جملات غیرخطی سه‌تایی، بعلاوه از X بعنوان اثرات خطی مخلوط، و XX، XXX بعنوان اثرات غیرخطی مخلوط به صورت دوتایی و سه‌تایی استفاده شده است. همچنین برای بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه حرا از هر یک از تیمار های یاد شده در قسمت فوق در هشت سطح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) محلولی تهیه شده و اثر ضدمیکروبی آن را روی سه باکتری *Listeria innocua*، *Enterococcus faecium* و *Escherichia coli* در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته است. برای بررسی آنالیز واریانس و میزان معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه حرا از نرم افزار Minitab 16 استفاده گردید.

## روش بهینه‌سازی

افزایش راندمان فرایند بدون افزایش هزینه دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. روش به‌کار رفته بدین منظور، بهینه‌سازی نامیده می‌شود. در این پژوهش بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال بر مبنای مدل برازش شده و با استفاده از تابع مطلوبیت صورت پذیرفته است. الگوریتم بهینه‌سازی در این روش بدین ترتیب می‌باشد که ابتدا هر یک ازمتغیرهای مورد بررسی به یک تابع مطلوبیت (d) تبدیل می‌شوند، برد تغییرات تابع مطلوبیت بین صفر تا یک می‌باشد. در این روش تابع مطلوبیت بعنوان یک تابع پنالتی عمل می‌کند و پاسخ را به سمت ناحیه مطلوب میل می‌دهد. هدف این روش جستجوی پاسخ‌های مربوطه در فضایی می‌باشد که تابع مطلوبیت سراسری به یک نزدیک شود. تابع مطلوبیت سراسری در واقع، میانگین هندسی تک تک توابع مطلوبیت می‌باشد و با استفاده‌از (معادله۳) محاسبه می‌شود (Pourfarzad *et al*., 2012). لازم به یادآوری است که روش پنالتی نوعی الگوریتم بهینه‌سازی می‌باشد که اساس آن خارج کردن محدودیت از مساله است.

$$D= (d_1*d_2*d_3\ldots\ldots*dm)^{1/m}$$

**جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف حلال، برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا**

| کد تیمار | آب | اتانول | متانول | گلیسیرین |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۱۵۶/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ |
| ۲ | ۰ | ۱۲۵ | ۱۲۵ | ۰ |
| ۳ | ۰ | ۰ | ۲۵۰ | ۰ |
| ۴ | ۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۱۵۶/۲۵ |
| ۵ | ۱۲۵ | ۱۲۵ | ۰ | ۰ |
| ۶ | ۰ | ۱۲۵ | ۱۲۵ | ۰ |
| ۷ | ۱۲۵ | ۰ | ۱۲۵ | ۰ |
| ۸ | ۰ | ۲۵۰ | ۰ | ۰ |
| ۹ | ۰ | ۰ | ۱۲۵ | ۱۲۵ |
| ۱۰ | ۲۵۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۱ | ۰ | ۱۲۵ | ۰ | ۱۲۵ |
| ۱۲ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲۵۰ |
| ۱۳ | ۳۱/۲۵ | ۱۵۶/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ |
| ۱۴ | ۱۲۵ | ۰ | ۰ | ۱۲۵ |
| ۱۵ | ۱۲۵ | ۱۲۵ | ۰ | ۰ |
| ۱۶ | ۱۲۵ | ۰ | ۰ | ۱۲۵ |
| ۱۷ | ۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۱۵۶/۲۵ | ۳۱/۲۵ |
| ۱۸ | ۰ | ۱۲۵ | ۰ | ۱۲۵ |
| ۱۹ | ۸۳/۳۳ | ۰ | ۸۳/۳۳ | ۸۳/۳۳ |
| ۲۰ | ۱۲۵ | ۰ | ۱۲۵ | ۰ |

www.SID.ir

Archive of SID



## نتایج و بحث

از جمله معضلات شایع در سالیان اخیر مساله مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد، لذا یافتن ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی با کم‌ترین اثر جانبی امر لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به شکل‌های ۱ و ۲، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در یک نسبت ثابت از گلیسرین با نزدیک شدن به نقطه مرکزی هندسه آزمایش، میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش پیدا کرده است. همچنین با توجه به شکل‌های ۳ و ۴، در یک میزان ثابت از متانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$)کاهش یافته است، و بیشترین میزان بازدهی را می‌توان در سطوح برابر آب و اتانول به دست آورد.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و گلیسیرین برگ گیاه حرا را بر *Penicillium digitatum* مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهشگران نشان داد که کمترین میزان بازده عصاره مربوط به حلال گلیسیرین می‌باشد این محققان علتی برای وقوع این پدیده عنوان ننمودند. شاید بتوان علت این پدیده را افزایش قطبیت کل حلال در زمان افزایش حضور حلال گلیسیرین در فرمولاسیون دانست. به‌منظور بررسی فرضیه فوق از آزمون آماری مربع پیرسون برای مشخص کردن میزان همبستگی درجه استحصال و قطبیت استفاده شد. نتایج حاصل بیان‌گر رابط معکوس و معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بین دو متغیر فوق بوده است (جدول ۳). همچنین برای بررسی میزان صحت مدل برازش شده بر داده‌های حاصل از درجه استحصال عصاره برگ گیاه حرا از دو فاکتور آماری ضریب تبین و آزمون ضعف برازش استفاده گردید. میزان ضریب تبین ۹۴ درصد و همچنین عدم معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) آزمون ضعف برازش بیان‌گر مناسب بودن مدل شف برای برآورده داده‌ها می‌باشد (جدول ۲).

**جدول ۲- نتایج جدول آنالیز واریانس مدل برازش یافته بر داده‌های درجه استحصال عصاره برگ گیاه حرا**

| منبع | درجه آزادی | ضرایب | مجموع مربعات | اندیس p |
|---|---|---|---|---|
| Model | ۱۰ | ۴۲۰/۰۷ | ۴۲/۰۱ | ۰/۰۰۰۲ |
| Linear Mixture | ۳ | ۱۸۷/۱۰ | ۶۲/۳۷ | ۰/۰۰۰۲ |
| AB | ۱ | ۶/۹۷ | ۶/۹۷ | ۰/۱۵۳۸ |
| AC | ۱ | ۲/۳۵ | ۲/۳۵ | ۰/۳۸۴۳ |
| AD | ۱ | ۰/۲۵ | ۰/۲۵ | ۰/۷۷۶۲ |
| BC | ۱ | ۲۸/۴۰ | ۲۸/۳۹ | ۰/۰۱۱۸ |
| CD | ۱ | ۱/۰۳ | ۱/۰۳ | ۰/۵۶۳۸ |
| ABC | ۱ | ۱۲۷/۶۱ | ۱۲۷/۶۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| ACD | ۱ | ۱۷/۶۲ | ۱۷/۶۲ | ۰/۰۳۵۲ |
| residual | ۹ | ۲۵/۸۵ | ۲/۸۷ | |
| Lack of fit | ۴ | ۱۹/۱۰ | ۴/۷۸ | ۰/۱۵۲ |
| Pure error | ۵ | ۶/۷۵ | ۱/۳۵ | |
| Total | ۱۹ | ۴۴۵/۹۳ | | |
| $R^2$ | – | ۰/۹۴ | | |

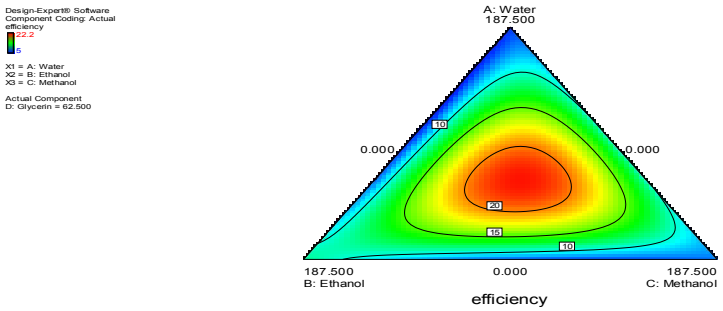
**جدول ۳- نتایج آزمون همبستگی پیرسون بر میزان قطبیت و درجه استحصال**

| | | قطبیت | استحصال |
|---|---|---|---|
| قطبیت | همبستگی پیرسون | ۱ | -۰/۵۱۸ |
| | میزان معنی‌داری | | ۰/۰۲۳ |
| استحصال | همبستگی پیرسون | -۰/۵۱۸ | ۱ |
| | میزان معنی‌داری | ۰/۰۲۳ | |

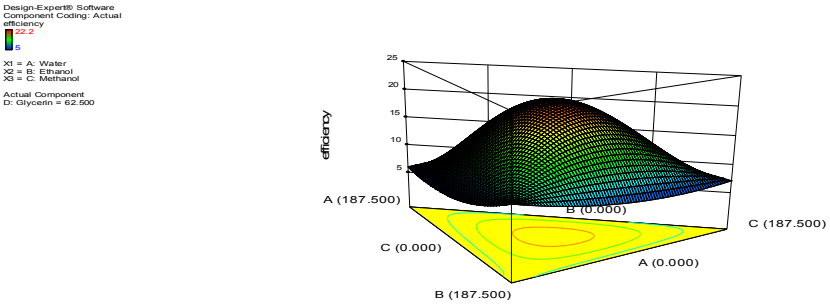
www.SID.ir

Archive of SID

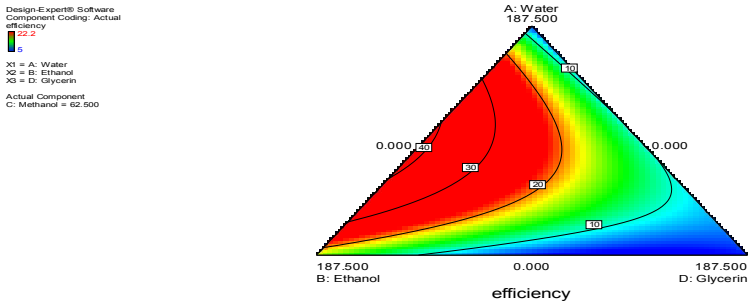




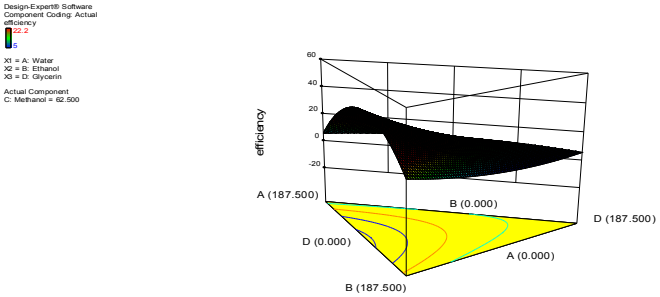

**شکل ۱- تراز تاثیر نسبت‌های متفاوت آب، اتانول و متانول در میزان ثابت گلیسیرین (۶۲/۵ میلی‌لیتر).**




**شکل ۲- سطح پاسخ برای نسبت‌های متفاوت آب، اتانول و متانول در میزان ثابت گلیسیرین(۶۲/۵ میلی‌لیتر).**




**شکل ۳- تراز تاثیر نسبت‌های متفاوت گلیسیرین، اتانول وآب در میزان ثابت متانول (۶۲/۵ میلی‌لیتر).**




**شکل ٤- سطح پاسخ تاثیر نسبت‌های متفاوت گلیسیرین ، اتانول و آب در میزان ثابت متانول(۶۲/۵ میلی‌لیتر).**

www.SID.ir

Archive of SID

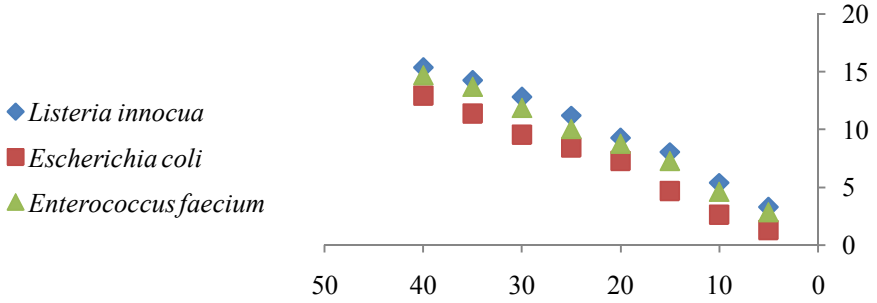


بر اساس نتایج بدست آمده از تیمار حلال‌های مختلف، بیشترین اثر بازدارندگی بر میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش مربوط به تیمار سیزده (جدول۱) می‌باشد. علت این امر را می‌توان درصد استحصال بیشتر عصاره برگ گیاه حرا و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در توسط تیمار سیزده ذکر نمود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر دو گونه قارچ بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادکه عصاره اتانولی برگ گیاه حرا نسبت به عصاره آبی دارای اثر بازدارندگی و کشندگی بیشتری بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه داشت، این محققان علت این امر را استخراج بیشتر عصاره برگ گیاه حرا توسط حلال اتانول ذکر کردند.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثر ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا به روش انتشار در آگار (به کمک دیسک) در جدول های ۴، ۵ و ۶ آورده شده است. این نتایج موید این مطلب می‌باشد که تیمارهای نوع حلال، غلظت عصاره و همچنین برهمکنش آن‌ها به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) موجب تغییر قطر هاله بازدارندگی عدم رشد (شاخص اثر ضد میکروبی عصاره) در سه باکتری مورد آزمایش می‌شود. از نظر تئوری قطر هاله عدم رشد عکس‌العملی از غلظت ماده موثر موجود در عصاره برگ گیاه حرا می‌باشد. در این پژوهش اثر ضد میکروبی عصارهای بدست آمده از تیمار های مختلف (جدول۱) در هشت سطح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر باکتری‌های *L. innocua*، *E. faecium* و *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). با توجه به نتایج می‌توان چنین بیان نمود که با افزایش غلظت عصاره میزان قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش پیدا کرده‌است، که این نتیجه موید تئوری ذکر شده در قسمت قبل می‌باشد. به‌طور کلی اثر ضد میکروبی هر عصاره بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود بطوری که باکترهای گرم مثبت *L. innocua* و *E. faecium* در مقایسه با باکتری گرم منفی *E. coli* حساسیت بیشتری داشتند (شکل ۶) و در غلظت کمتری از عصاره برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی ایجاد کردند.

علت این امر را می‌توان اختلاف ساختمانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ذکر نمود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳ ) اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ *اکالیپتوس کامالدولنس* بر میکروارگانیسم‌های *E. coli*، *S. aureus* و *P. digitatum* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های برگ *اکالیپتوس کامالدولنس* مربوط به باکتری گرم منفی *E. coli* بود. این محققان مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ نسبت دادند.

در این پژوهش برای انتخاب مناسب‌ترین نسبت حلال‌ها از روش بهینه‌سازی عددی با استفاده از نرم افزار (Design Expert) استفاده شد. هدف از بهینه‌سازی، افزایش بازدهی عصاره برگ گیاه حرا و کاهش قطبیت حلال بوده است. میزان تابع مطلوبیت ۰/۹۴ محاسبه شد که نشانگر صحت عملیات بهینه‌سازی می‌باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسیرین ( صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول ( ۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول ( ۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود. با توجه به شکل ۷ و ۸ می‌توان چنین نتیجه گرفت که با نزدیک شدن به مرکز هندسه مخلوط، فضای از نسبت‌های مختلف سه حلال متانول، آب، و اتانول با شرط کمینه بودن قطبیت، ایجاد خواهد شد که میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا را به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از فرمولاسیون بهینه حلال بیانگر افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا نسبت به بالاترین بازدهی مشاهد شده در تیمار ۱۳ (جدول ۱) بود. جهت حصول اطمینان از اثر ضد میکروبی عصاره حاصل از فرمولاسیون بهینه از سه روش ( انتشار در آگار به کمک دیسک، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی) استفاده گردید. نتایج حاصل از انتشار در آگار به کمک دیسک در غلظت ۴۰ میلی‌گرم برلیتر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) افزایش هاله بازدارندگی بر سه میکروارگانیسم مورد آزمایش بود، همچنین نتایج حداقل غلظت معمانت‌کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی در جداول (۷ و ۸) آورده شده است.

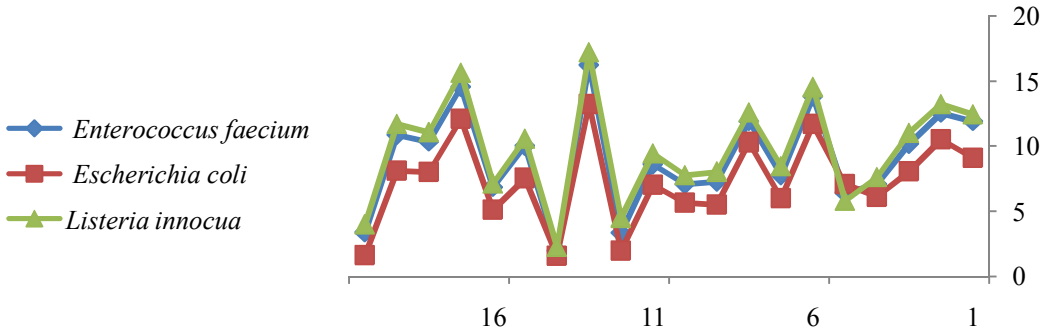



**شکل۵- اثر غلظت عصاره برگ گیاه حرا به روی میزان قطر هاله عدم رشد در سه باکتری Enterococcus faecium،Listeria innocua و Escherichia coli.**

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ٦- اثر تیمارهای مختلف حلال به روی میزان قطر هاله عدم رشد در سه باکتری *Listeria innocua*، *Enterococcus faecium* و *Escherichia coli*.**

**جدول ٤- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Listeria innocua***

| منبع | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مجموع مربعات | اندیس $p^c$ |
|---|---|---|---|---|
| $C_1^a$ | ۱۸ | ۶۸۲۲/۵۱ | ۳۷۹/۰۳ | ۰/۰۰۰ |
| $C_2^b$ | ۷ | ۷۲۷۲/۰۸ | ۱۰۳۸/۸۷ | ۰/۰۰۰ |
| $C_1C_2$ | ۱۲۶ | ۸۱۹/۷۶ | ۶/۵۱ | ۰/۰۰۰ |
| Error | ۳۰۴ | ۹۵/۶۷ | | |
| Total | ۴۴۵ | ۱۵۰۱۰/۳۲ | | |

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c - سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

**جدول ٥ - آنالیز واریانس داده های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Enterococcus faecium***

| منبع | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مجموع مربعات | اندیس $p^c$ |
|---|---|---|---|---|
| $C_1^a$ | ۱۸ | ۶۵۵۰/۹۲ | ۳۶۳/۹۴ | ۰/۰۰۰ |
| $C_2^b$ | ۷ | ۷۰۲۷/۴۷ | ۱۰۰۳/۹۲ | ۰/۰۰۰ |
| $C_1C_2$ | ۱۲۶ | ۸۵۱/۲۷ | ۶/۷۶ | ۰/۰۰۰ |
| Error | ۳۰۴ | ۲۰۲/۶۵ | ۰/۶۷ | |
| Total | ۴۴۵ | ۱۴۶۳۲/۳۱ | | |

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c - سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

**جدول ٦ - آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Escherichia coli***

| منبع | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مجموع مربعات | اندیس $p^c$ |
|---|---|---|---|---|
| $C_1^a$ | ۱۸ | ۵۳۳۰/۸۹ | ۲۹۶/۱۶ | ۰/۰۰۰ |
| $C_2^b$ | ۷ | ۶۸۱۹/۹۹ | ۹۷۳/۸۶ | ۰/۰۰۰ |
| $C_1C_2$ | ۱۲۶ | ۱۲۰۱/۳۳ | ۹/۵۳ | ۰/۰۰۰ |
| Error | ۳۰۴ | ۲۹۲/۰۳ | ۰/۹۶ | |
| Total | ۴۴۵ | ۱۳۶۴۱/۲۴ | | |

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c - سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵)

www.SID.ir

Archive of SID



**جدول۷- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره بهینه برگ گیاه حرا بر *Listeria innocua*، *Enterococcus faecium* و *Escherichia coli***

| نوع عصاره | میکروارگانیسم | غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ۲ | ٤ | ۸ | ١٦ | ٣٢ | ٦٤ | ١٢٨ | ٢٥٦ | کنترل |
| بهینه | *Listeria innocua* | − | + | + | + | + | + | + | + | − |
| بهینه | *Enterococcus faecium* | − | − | + | + | + | + | + | + | − |
| بهینه | *Escherichia coli* | − | − | − | + | + | + | + | + | − |

+: عدم رشد  −: رشد

**جدول۸- نتایج حداقل غلظت کشندگی رشد (MBC) عصاره بهینه برگ گیاه حرا بر *Listeria innocua*، *Enterococcus faecium* و *Escherichia coli***

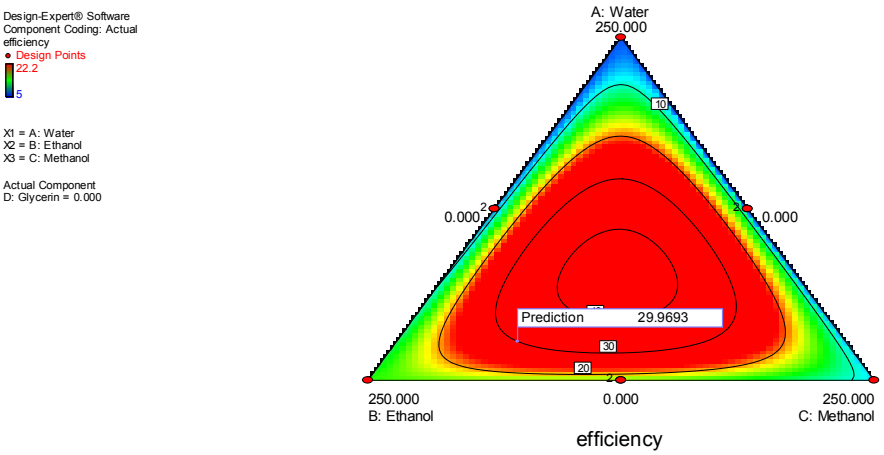
| نوع عصاره | میکروارگانیسم | غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ۲ | ٤ | ۸ | ١٦ | ٣٢ | ٦٤ | ١٢٨ | ٢٥٦ | کنترل |
| بهینه | *Listeria innocua* | − | + | + | + | + | + | + | + | − |
| بهینه | *Enterococcus faecium* | − | − | − | + | + | + | + | + | − |
| بهینه | *Escherichia coli* | − | − | − | − | + | + | + | + | − |

+: عدم رشد  −: رشد

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که چند جمله‌ای شف و روش بهینه‌سازی عددی با استفاده از روش مخلوط، به ترتیب برای برازش داده‌های حاصل از بازدهی استخراج عصاره برگ گیاه حرا و بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال مناسب می‌باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسیرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود.

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر سویه‌های مورد مطالعه داشت. در ادامه لازم است تحقیقات وسیع‌تر و دامنه‌داری در شرایط "*in vivo*" انجام شود تا دوز مناسب این عصاره مشخص گشته و در نهایت اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیمارهای عفونی ناشی از سوش‌های مختلف میکروبی انجام گیرد.

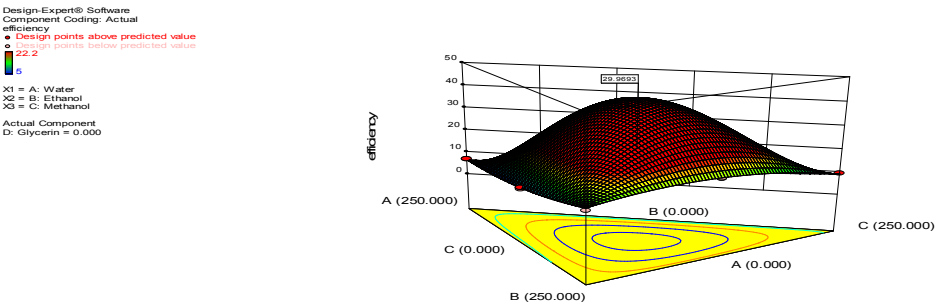



**شکل۷- تراز ترکیب حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا در شرایط بهینه**

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۸-سطح پاسخ ترکیب حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا در شرایط بهینه**

## قدردانی

بدین وسیله از خانم مهندس نجمه خادمی پور، آزاده ظهوری و مـریم حیـدری سورشـجانی کـه در جمـع آوری نمونـه‌هـا و انجـام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند قدردانی می شود.

## منابع

علیزاده بهبهانی، ب. ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) در شرایط "*in vitro*" و پرتقال روکش شده با کربوکسی متیل سلولز در شرایط "*in situ*" پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

Ali, B., & Bashir, A, 1998, Toxicological studies on the leaves of Avicennia marina (mangrove) in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 18(2), 111-116.

Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M., 2013, Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus “in vitro”. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(7), 1652-1658.

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M. M., & Vasiee, A., 2013, Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(3), 89-99.

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M., 2012, Antimicrobial activity of Avicennia marina extracts ethanol, methanol & glycerin against Penicillium digitatum (citrus green mold). *Scientific Journal of Microbiology*, 1(7), 147-151.

Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J., & Ijah, U., 2004, The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri* , 16(2), 106-111.

Banada, P. P., Guo, S., Bayraktar, B., Bae, E., Rajwa, B., Robinson, J. P., Bhunia, A. K. ,2007, Optical forward-scattering for detection of Listeria monocytogenes and other Listeria species. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1664-1671.

Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Kim, J. F., 2009, Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with Escherichia coli. *Nature*, 461(7268), 1243-1247.

Benger, S., Townsend, P., Ashford, R. L., & Lambert, P., 2004, An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of Melaleuca alternifolia against the dermatophyte Trichophyton rubrum . *The Foot*, 14(2), 86-91.

Dorman, H., & Deans, S., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.

Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M., & Walsh, T., 2002, Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp.: NCCLS collaborative study. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3204-3208.

Garcia, E., & Totosaus, A., 2008, Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and κ-carrageenan by a mixture design approach. *Meat science*, 78(4), 406-413.

Gonzales, R. D., Schreckenberger, P. C., Graham, M. B., Kelkar, S., DenBesten, K., & Quinn, J. P., 2001, Infections due to vancomycin-resistant Enterococcus faecium resistant to linezolid. *The Lancet*, 357(9263), 1179-1184.

www.SID.ir

Archive of SID



Heidari Sureshjani, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous, ethanol, methanol and glycerin on Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(2), 53-60.

Holt, S. D., Resurreccion, A., & McWatters, K., 2006, Formulation, Evaluation and Optimization of Tortillas Containing Wheat, Cowpea and Peanut Flours Using Mixture Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 121-127.

Kathiresan, K., & Bingham, B. L., 2001, Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in marine biology*, 40, 81-251.

Lop, S., Silva, R., & Beleia, A., 1999, Formulation and evaluation of dry dessert mix containing sweetener combinations using mixture response methodology. *Food chemistry*, 66(2), 167-171.

Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M., 2006, Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International journal of food microbiology*, 107(2), 180-185.

Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H., & Sedaghat, N., 2012, Coffee silverskin as a source of dietary fiber in breadmaking: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 50(2), 599-606.

Razavi, M. A., Mortazavi, A., & Mousavi, M., 2003, Dynamic modelling of milk ultrafiltration by artificial neural network. *Journal of Membrane Science*, 220(1), 47-58.

Ruguo, Hu., 1999, Food product design: a *computer-aided statistical approach*: CRC Press. 35-174.

Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. , 2013, Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Teucrium polium L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*, 4(4), 55- 61.

Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial properties of plant extracts of Thymus vulgaris L., Ziziphora tenuior L. and Mentha Spicata L., against important foodborne pathogens in vitro. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(2), 23-30.

Valero, M., & Salmeron, M., 2003, Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*, 85(1), 73-81.

Xie, L., Hall, D., Eiteman, M., & Altman, E., 2003, Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in Escherichia coli using factorial design. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 267-273.

Zhou, J. z., Liu, X. L., Huang, K. h., Dong, M. s., & Jiang, H. h., 2007, Application of the mixture design to design the formulation of pure cultures in Tibetan kefir. *Agricultural Sciences in China*, 6(11), 1383-1389.

Zhu, F., Chen, X., Yuan, Y., Huang, M., Sun, H., & Xiang, W., 2009, The chemical investigations of the mangrove plant Avicennia marina and its endophytes. *Open Natural Products Journal*, 2, 24-32.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 2, June. July. 2016, p. 201- 213

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۵ ص. ۲۱۳-۲۰۱

# Optimization of mangroveleaf extraction by mixture design and investigation of its antimicrobial effect on *Listeria innocua, Enterococcus faecium and Escherichia coli*

**B. Alizadeh Behbahani[1], A. Alghooneh[1], F. Tabatabaei Yazdi*[2], F. Shahidi[2], M. Mohebbi[2]**

Received: 2013.11.16
Accepted: 2014.02.25

**Introduction:** *Avicennia marina*, commonly known as gray or white mangrove, is a specie of mangrove tree classified in the plant family *Acanthaceae*. It is distributed along Africa's east coast, south-west, south and south-east Asia, and southern Iran along the Persian Gulf coast. It grows as a shrub or tree to a height of three to ten meters. Mixture design is one of the most popular smart systems which is based on simulation of linear and non-linear systems using mathematical and statistical techniques, and a useful tool for dealing with completely unknown systems. Chemical preservatives are commonly used for inhibition of pathogens in foods, people are concerned about the side effects of preservatives on their health. Replacement of chemical preservatives with natural substances have a great importance in food preservation. Natural preservatives, as well as, essential oils and plant extracts are suitable alternatives for chemical preservatives. The main purposes of this study are the evaluation of the effects of different combinations of four solvents (water, ethanol, methanol and glycerin) on the efficiency of mangrove leaf extraction using response surface method with mixture optimal design, the optimization of solvent formulation for mangrove leaf extraction, and, finally, the evaluation of the in vitro inhibitory and bactericidal effects of mangrove leaf extract on *Listeria innocua* ATTC33090 ، *Enterococcus faecium* ATTC 51559 and *Escherichia coli* ATTC 25992.

**Materials and method:**Fresh mangrove leaves were prepared from Qeshm Island, Persian Gulf, Iran, in August 2012. Water, ethanol, methanol and glycerin extracts were prepared by adding 50 g of powdered mangrove leaf to 250 mL of the solvent. Extraction was carried out for 48h, in ambient temperature. The mixture of extract and leaf powder was separated by Watman filter paper, then the filtrate was centrifuged in 3000g for 10 minutes and filtered using a 0.45 µm Millipore filter. Finally, in order to separate the solvent and concentrated extract, the solutions were evaporated using a rotary vacuum evaporator. The concentrated extract was stored in dark aluminum containers at 4°C. In this study, the effects of water, ethanol, methanol and glycerin at five levels (0, 31.25, 83.33, 125 and 250 ml) on efficiency of mangrove leaf extraction by mixture optimal design has been investigated. Modeling and optimization has been carried out by Scheffe polynomial. The antimicrobial activity of mangrove leaf extract was evaluated using disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of mangrove leaf extract was determined using serial dilution tubes. For each extraction method (based on solvent, Water, Ethanol, Methanol and Glycerin), 8 serial concentrations (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 mg/mL) and 1 control tube of mangrove leaf extract were prepared in Mueller-Hinton broth. The minimum bactericidal concentration (MBC) of mangrove leaf extract was determined using serial dilution tubes.

**Results and Discussion**:The Results indicated that Scheffe polynomial model was highly significant for prediction of efficiency of mangrove leaf extraction ($R^2$ and $R^2_{adj}$ values equal to 0.940 and 0.8447, respectively and The lack-of-fit tests did not result in a significant, also F-value (14.62) indicated that the model is sufficiently accurate). The optimum formulation was found as following: glycerin (0 ml), water (28.22 ml), methanol (59.83ml) and ethanol (161.95 ml) respectively. Maximum of antimicrobial effect on *Listeria innocua* and highest resistance against mangrove leaf extract on *Escherichia coli* were observed. Increasing concentration of mangrove extracts had a significant effect ($p< .05$) on inhibition zone diameter. This may have been resulted from the increment of the solvent polarity associated with glycerin increase. In order to study the mentioned hypothesis, Pearson Square statistical test was used to determine the correlation between the extraction rate and

1- Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.
2- Professors, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.
(*-Corresponding Author Email: tabatabai@um.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID



polarity. The results showed that a significant ($P\leq0.05$) and inverse relationship between the extraction rate and polarity of the solvent. Moreover, in order to check the accuracy of the model fitted on the data obtained from mangrove leaf extraction rate the goodness of fit was investigated using both coefficient of determination ($R^2$) and lack of fit test. A 94% coefficient of determination and lack of significance ($P\leq0.05$) for lack of fit test suggested that Schef model could accurately fitt the data and predict it The results of this study showed that Schef polynomial and numerical optimization using mixture design method were suitable to fit efficiency of mangrove leaf extraction and solvent formulation optimization data, respectively. According to the results, the optimized solvent formulation was glycerin (0 mL), water (28.22 mL) and ethanol (161.95 mL).

**Conclusion:** Finally, the results showed that mangrove leaf extract had a notable antimicrobial effect on the studied strains "*in vitro*". More "*in vivo*" studies seem to be required in order to determine the best extract dosage which leads to inhibition of microbial infection.

**Keywords:** Mangrove Plant, Optimization, Mixture Design, Inhibition Zone Diameter.

www.SID.ir