فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٦٢٧-٦١٦ (۱۳۹۱)

خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌زدایی سوپر اکساید آنیونی و ضدتیروسینازی اسانس‌های مرزه سهندی (*Satureja sahendica* Bornm.) و مرزه زراعی (*Satureja hortensis* L.)

مهدی داداش‌پور[۱]، ایرج رسولی[۲*]، فاطمه سفیدکن[۳]، الهه زاده‌حسینقلی[٤] و شکیبا درویش علیپور آستانه[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، پست الکترونیک: rasooli@shahed.ac.ir
۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
٤- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، تهران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۰

چکیده

در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های مرزه سهندی (*Satureja sahendica* Bornm.) و مرزه زراعی (*Satureja hortensis* L.) ارزیابی شد. نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس مرزه سهندی و مرزه زراعی براساس حساسترین به مقاومترین *Candida albicans* > *E. coli*> *S. aureus* > *P. aeruginosa* بود. کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس‌ها در طیف ۰/۵ تا ۱۰ mg/ml قرار داشت. فنل کل اسانس‌های مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب معادل ۸/۵۳ ± ۱۷۰/۵ و ۲/۱٤ ± ٤۷/۲۵ میکروگرم گالیک‌اسید در هر میلی‌گرم نمونه تعیین شد. سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها با روش DPPH، نشان داد که قدرت رادیکال‌زدایی اسانس‌ها تقریباً برابر هم ولی به‌مراتب بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش بتاکاروتین و قدرت احیای فریک اسانس مرزه سهندی قویتر از مرزه زراعی است. مقدار اسانس لازم برای ۵۰٪ رادیکال‌زدایی اسانس مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب ٦/۲۵ و ۵/۸۲ µg/ml بود. قدرت احیای فریک (FRAP) اسانس مرزه بیش از اسانس مرزه زراعی بود. فعالیت رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیونی اسانس مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب ۱/۱٦ ± ۵۵/۲۸ و ۲/٤٦ ± ۲۱/۸۱ درصد به‌ازای ۱۵µg/ml اسانس با IC50 معادل ۹/٤ و ۱۰۱/۲ میکروگرم تعیین گردید. درصد فعالیت ضدتیروسینازی به‌ازای یک میکروگرم اسانس مرزه سهندی ۱/۳۳ ± ٤۷/۸۸ و به‌ازای ۱۵ میکروگرم اسانس مرزه زراعی ۲/۹ ± ۱۵/۳۵ بود. در مجموع، مطالعه خواص بیولوژیک اسانس مرزه سهندی نشان می‌دهد که قابلیت خوبی برای بررسی کاربرد آن در صنعت غذا و دارو وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان، رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیونی، ضدتیروسینازی، روغن‌های اسانسی، مرزه.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

از زمان‌های قدیم گیاهان و چاشنی‌ها برای بهبود طعم و خاصیت organoleptic به انواع مختلف غذاها اضافه می‌شدند. بسیاری از ترکیب‌های طبیعی بدست آمده از گیاهان دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی هستند. بین انواع مختلف مواد اولیه، عوامل طبیعی بالقوه‌ای مانند روغن‌های اسانسی استخراج شده از گیاهان آروماتیک و پزشکی (گیاهان که مصارف پزشکی دارند) دارای خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی هستند. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر فشار قابل‌توجهی از طرف مصرف‌کننده‌ها برای کاهش یا محدود کردن استفاده از افزودنی‌های سنتتیک در غذاهایشان، اعمال می‌شود، یک راه جدید برای جلوگیری از تکثیر میکروارگانیسم‌ها و گسترش عوامل بیماری‌زا استفاده از این ترکیب‌ها به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی است. روغن‌های اسانسی دارای تأثیرهای مختلف دارویی مانند برطرف‌کنندگی انقباض عضلات، ضدنفخ، محافظت از کبد، ضدویروسی و ضدسرطانی نیز هستند (Lahlou, 2004؛ Lambert *et al*., 2001؛ Soliman & Badeaa, 2002). جنس مرزه *Satureja* (خانواده Lamiaceae، زیرخانواده Nepetoideae) حدوداً دارای ۲۰۰ گونه گیاهی و درختچه‌ای است. گیاهان این جنس آروماتیک، یک‌ساله یا همیشگی، نیمه‌انبوه و اغلب آروماتیک بوده و به‌طور گسترده‌ای در مناطق خشک، آفتابی، سنگلاخی و صخره‌ای مدیترانه، آسیا و آمریکای شمالی رشد می‌کنند (Catino *et al*., 1992). به‌علت محتوای فنلی زیاد، طعم و بوی این گیاه مشابه آویشن و پونه کوهی زراعی است (Skocibusic *et al*., 2006). خیلی از اعضای جنس مرزه گیاه چند منظوره‌ای هستند که ویژگی‌های آروماتیک و پزشکی دارند. در پزشکی سنتی، برای درمان بیماریهای مزمن، مثل قولنج، دردهای عضلانی، تهوع، سوءهاضمه، اسهال و بیماریهای عفونی استفاده می‌شده‌اند (Gulluce *et al*., 2003). امروزه نیز مطالعاتی برای بررسی اثرهای دارویی و درمانی آن نظیر ضدنفخ، اثرهای گوارشی، ضدتشنج، خلط‌آور، قارچ‌کشی، ضداسهال، مسکن و آنتی‌اکسیدانی انجام شده‌است (Skocibusic *et al*., 2006). اهمیت آن در سلامتی انسان به دلیل وجود مواد تری‌ترپنوئیدی (Escudero *et al*., 1985) و فلاونوئیدی (Thomas-Barberan *et al*., 1987) آن است. روغن‌های اسانسی جدا شده از گونه های مختلف مرزه خصوصیات زیستی خاصی مثل اثر ضدمیکروبی (Azaz *et al*., 2005؛ Bezbradica *et al*., 2005؛ Gulluce *et al*., 2003)، ضد HIV-1 (Yamasaki *et al*., 1998)، ضدویروسی (Abad *et al*., 1999)، آنتی‌اکسیدانی (Esquived *et al*., 1999؛ Radonic & Milos, 2003)، ضدتشنج و ضداسهال (Hajhashemi *et al*., 2000؛ Skocibusic *et al*., 2006) هستند. فعالیت ضدمیکروبی و ضداسهال روغن‌های اسانسی، به‌دلیل فنل‌های موجود در اسانس است (Sefidkon *et al*., 2004). در ایران گونه های مرزه در قسمت‌های کوهستانی شمال و غرب ایران وجود دارند. *S. intermedia* C. A. Mey یک گونه نادر و بومی ایران (تالش) است. این گیاه چند ساله بوده و از سنگ‌ها سر برآورده‌است. *S. mutica* Fisch & C. A. Mey گونه بسیار خوشبوی دیگری است که روی سنگ‌های آهکی، در شمال شرق ایران رشد می‌کند. *S. macrantha* C. A. Mey درختچه

Archive of SID

www.SID.ir

کوچکی است که در غرب و شمال غربی ایران وجود دارد (Rechinger, 1982). گونه *Satureja sahendica* Bornm. یک گونه بومی ایران است که در شمال، غرب و شرق ایران وجود دارد. این گونه دیر گل می‌دهد (آخر تابستان و پاییز) و روی دیوارهای سنگی و سرازیری‌های سنگی رشد می‌کند (Rechinger, 1982).

اکسیژن و نیتروژن واکنش‌دهنده (رادیکالی) ROS/RNS به‌طور مداوم در بدن انسان تولید می‌شوند و توسط آنزیم‌های داخلی (سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز) کنترل می‌شوند. زمانی‌که تولید این رادیکال‌ها بیش از حد باشد، سوبستراها در معرض اکسیداسیون قرار می‌گیرند، مکانیسم‌های دفاعی بدن ناتوان می‌شوند و تخریب مولکول‌های زیستی (DNA، لیپید و پروتئین) اتفاق می‌افتد (Oke *et al*., 2009). برخی آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند از خطر اکسیداتیو توسط ROS/RNS، بروز بیماریهای خاصی مثل سرطان و روند پیری جلوگیری کنند. آنها می‌توانند از طریق فرایند اکسیداسیون، واکنش با رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزات و همچنین واکنش به‌عنوان رادیکال‌زداینده اکسیژن، مداخله کنند (Oke *et al*., 2009). تحقیقات اخیر کشف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از گیاهان را نشان می‌دهد. استفاده از گونه ها و گیاهان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها در فرایندهای غذایی، امیدی برای استفاده از آنها به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک است. گزارشها نشان می‌دهد با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه، مصرف آنها به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی افزایش یافته‌است (Lindberg Madsen & Bertelsen, 1995). روغن‌های اسانسی مرزه حاوی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی قوی نظیر کارواکرول، پارا-سیمین، و گاما-ترپینن، تیمول، لینالول و بتا-کاریوفیلن هستند (Ruberto & Baratta, 2000). مطالعه گزارشهای موجود نشان می‌دهد که بین ترکیب های شیمیایی اسانس گونه‌های مختلف *Satureja* گوناگونی وجود دارد (Sefidkon *et al*., 2007). ترکیب‌های اصلی روغن‌های اسانسی ۸ جمعیت از *S. sahandica* Bornm که به روش تقطیر با آب جدا شده و توسط کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی آنالیز شده‌اند شامل: تیمول (۴۱/۷-۱۹/۶٪)، پاراسیمین (۵۴/۹-۳۲/۵٪) و گاما-ترپینن (۱۲/۸-۱٪) بوده‌است (Sefidkon & Ahmadi, 2000؛ Sefidkon *et al*., 2004). چون ترکیب‌های شیمیایی در خواص بیولوژیک اسانس ها تأثیر دارند و تابه‌حال خواص بیولوژیک این گونه از گیاه مرزه مطالعه نشده، بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا برخی از این خواص را بررسی کنیم.

مواد و روشها

اسانس مرزه

مرزه سهندی با نام علمی *Satureja sahendica* Bornm. در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور شناسایی و اسانس‌گیری شد. اسانس زراعی مرزه از منابع تولیدی داخل کشور که در داروخانه‌ها به فروش می‌رسد تهیه گردید.

سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به شرح زیر بودند:

E. coli (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC8830), *Candida albicans* (ATCC 5027).

بررسی اثر ضدمیکروبی

اثر ضدمیکروبی با روش یادگاری‌نیا و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. برای مطالعه اثر ضدمیکروبی از دو روش انتشار

Archive of SID

www.SID.ir

(Diffusion test) و رقت (Dilution test) استفاده شد که از میان روشهای انتشار از روش دیسک پلیت (Disk-plate method) و از میان روشهای رقت از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. مقدار ۳۰µl اسانس با رقت‌های ۱/۸، ۱/٤، ۱/۲ و ۱ در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی ریخته و پس از هم‌زدن در انکوباتور به مدت ۲٤–۱۸ ساعت قرار داده شد و بعد به‌وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory concentration) مشخص گردید، سپس از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند ۰/۱ میلی‌لیتر روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal concentration) ماده ضدمیکروبی تعیین گردید. برای مطالعه سینتیک میکرب‌کشی اسانس پس از تعیین MBC از سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی ۱۰٦ سلول میکروبی تهیه و مقدار ۵۰µl اسانس در ۵ml سوسپانسیون ریخته و در فواصل زمانی معین، مقدار ۱۰µl از هر لوله برداشته و پس از رقیق‌سازی بر سطح محیط نوترینت آگار به‌طور یکنواخت گسترده و به مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور گذاشته و بعد تعداد کلنی‌ها با کلنی کانتر شمارش و با ضرب عکس رقت در تعداد کلنی‌ها تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین گردید. با استفاده از سینتیک مرگ میکروبی ارزش D (Decimal Reduction Value) براساس زمان لازم برای کاهش ۹۰٪ جمعیت میکروبی در نمونه محاسبه شد.

حلال‌های مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرند قبلاً در رقت‌های مختلف تهیه و تأثیر آنها روی میکروب‌های مورد مطالعه با روشهای انتشار و رقت آزمایش شد. البته متانول و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) تأثیر ضدمیکروبی نداشتند و مورد استفاده رقیق‌سازی قرار گرفتند. در کلیه مراحل آزمایشها از DMSO به‌عنوان شاهد مواد ضدمیکروبی استفاده شد.

تعیین محتوای کل فنل Total phenolic content (TPC)

با استفاده از روش Kahkonen و همکاران (۱۹۹۹) فنل اسانس‌ها به شرح زیر سنجیده شد:

۳۰۰ میکرولیتر از نمونه در لوله آزمایش ریخته شد و ۱/۵ میلی‌لیتر Folin-Ciocalteau's reagent (10x dilution) و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷/۵٪ ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و جذب در ۷٦۵nm سنجیده شد. فنل کل براساس معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر ۱۰۰ گرم نمونه بیان شد (y= 0. 0111x-0.0148; r2= 0.9998).

تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس

خواص آنتی‌اکسیدانی با روشهای بتاکاروتین‌زدایی، تعیین قدرت رادیکال‌زدایی DPPH، سنجش قدرت احیا فریک (FRAP) و رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیون با روشهای استاندارد انجام شد.

روش بتاکاروتین‌زدایی

در روش بتاکاروتین‌زدایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از مهار ترکیب‌های آلی فرّار و conjugated diene hydroperoxides روش توصیف شده به‌وسیله‌ی Miraliakbari و Shahidi (۲۰۰۸) با اصلاح جزئی

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. محلول استوک بتا-کاروتن و لینولئک‌اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بتا-کاروتن در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم، ۲۵ میکرولیتر لینولئک‌اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ آماده شد و کلروفرم در خلأ تبخیر شد و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب هوادهی شده اضافه شد. نمونه‌ها (۲ گرم/لیتر) حل شد و ۳۵۰ میکرولیتر از آن به ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط بالا موجود در لوله‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد همراه با دو تا بلانک گذاشته شدند که یکی از آنها دارای آنتی‌اکسیدان BHT به‌عنوان کنترل مثبت و دیگری حاوی DMSO به جای اسانس به‌عنوان کنترل منفی بودند. لوله‌ی دارای BHT در طول انکوباسیون رنگ خودش را حفظ کرد. جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (درصد ممانعت‌کنندگی) با استفاده از فرمول زیر بدست آمد.

$$I\% = (A\beta\text{-carotene after 2h assay}/A\text{initial }\beta\text{-carotene}) \times 100$$

A-βcarotene after 2 h assay جذب بتا-کاروتن بعد از ۲ ساعت باقی ماندن در نمونه‌ها و Ainitial β-carotene جذب بتا-کاروتن در شروع آزمایشها می‌باشد. تمام آزمون‌ها سه بار تکرار شده و درصد ممانعت‌کنندگی با انحراف معیار سه‌تایی گزارش شد.

تعیین فعالیت رادیکال‌زدایی با آزمون DPPH

۱۰ µl اسانس را با ۹۰۰µl میکرولیتر (pH 7.4) 100mM Tris-HCl؛ ۴۰ میکرولیتر اتانول و ۵۰ میکرولیتر TWEEN 20 (0.5% w/w) مخلوط کرده و مخلوط فوق به یک میکرولیتر DPPH (0.5 mM=0.2 mg/ml) در اتانول اضافه گردید. مخلوط را به شدت هم زده و جذب فوراً با طول موج 517nm ثبت گردید. ثبت تا ۷۰ دقیقه ادامه یافت و نوسانها یادداشت گردید تا جایی‌که دیگر نوسانی دیده نشد. برای شاهد به جای اسانس از آب مقطر استفاده شد و Trolox (1mM) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان پایدار استفاده شد.

فعالیت رادیکال‌زدایی اسانس با فرمول زیر و براساس درصد ممانعت DPPH محاسبه گردید:

$$\text{Inhibition percentage (IP)} = [(AB\text{-}AA)/AB] \times 100$$

AB= Absorbance value of blank checked after 70 minutes

AA= Absorbance value of sample checked after 70 minutes

سنجش قدرت احیا فریک Ferric-reducing power (FRAP) assay

یک میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف اسانس به ۲/۵ میلی‌لیتر بافر ۰/۲M فسفات پتاسیم با pH ۶/۶ و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱٪ اضافه شده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به آن اضافه شد. این ترکیب به چند بخش ۲/۵ میلی‌لیتری تقسیم و با ۲/۵ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر FeCl3 ۰/۱٪ (وزن/حجم) به هر کدام اضافه شده و پس از ۳۰ دقیقه جذب در 700nm سنجیده شد (Lim *et al.*, 2009). FRAP به‌صورت معادل

Archive of SID

www.SID.ir

گالیک‌اسید (GAE) در mg/g نمونه محاسبه شد ($y = 16.66x + 0.0038$; $r2 = 0.999$).

سنجش رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیون
Superoxide anion radical scavenging

قدرت رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیون اسانس‌ها با روش استاندارد (Lee *et al*., 2002) انجام شد. به مقدار ۱۰۰µl از رقت‌های هر اسانس محلول زیر افزوده شد:

100µl (30mmol/l) Na2EDTA, 100µl (3mmol/l) hypoxanthine in 50 mmol/l NaOH and 200µl (1.42mmol/l) nitroblue tetrazolium (NBT) in NaH_2PO_4-NaOH (50mmol/l, pH 7.4).

پس از ۳ دقیقه مقدار ۱۰۰µl (0.5U/ml) xanthine oxidase در بافر NaH_2PO_4-NaOH اضافه شده و ۲/٤ml بافر NaH_2PO_4-NaOH اضافه شد. محلول حاصل در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شده و جذب در 560nm اندازه‌گیری گردید. همچنین جذب در ۲۹۳nm اندازه‌گیری شد تا چنانچه اسانس مانع تولید اسید اوریک شده باشد مشخص شود. وقتی که از عدم تشکیل اسید اوریک اطمینان حاصل شد درصد ممانعت در ٥٦٠nm با فرمول زیر محاسبه می‌شود و نیز ارزش IC50 تعیین می‌گردد.

$$\text{Inhibition}(\%) = [(\text{Acontrol}-\text{Asample})/\text{Acontrol}] \times 100$$

بازدارندگی تیروسینازی اسانس‌های Tyrosinase inhibition

فعالیت بازدارندگی تیروسینازی اسانس‌ها با روش اسپکتروفتومتری (Chan *et al*., 2008) و با استفاده از روش dopachrome با استفاده از L-DOPA به‌عنوان سوبسترا سنجیده شد. مقدار ۵ میلی‌گرم اسانس در ۲ میلی‌لیتر 50% DMSO حل شده مقدار ٤۰µl از نمونه به ۸۰µl بافر فسفات 0.1 M (pH 6.8) اضافه و ٤۰µl از 0.02 mg/ml tyrosinase و ٤۰µl از L-DOPA (2.5mM) در یک چاهک از پلیت ۹٦ چاهکی ریخته شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. هر نمونه همزمان با یک بلانکی که همه ترکیب‌های فوق بجز L-DOPA را دارد، بود. جذب در طول موج 475nm با استفاده از طول موج 700nm به‌عنوان رفرانس، اندازه‌گیری می‌شود. نتایج با یک کنترل و بلانک محتوی DMSO 50% (به جای نمونه) مقایسه می‌شوند. quercetin به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. درصد ممانعت تیروسیناز با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Tyrosinase inhibition}(\%) = [(\text{Acontrol}-\text{Asample})/\text{Acontrol}] \times 100$$

نتایج

نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس مرزه سهندی و مرزه زراعی براساس حساسترین به مقاومترین *Candida albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *P. aeruginosa* بود. اسانس‌ها خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی نشان دادند (جدول ۱). کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس ها در طیف ۰/۵ تا ۱۰ mg/ml قرار داشت. در رقت‌های تعیین‌شده در آزمایش MBC در برابر سوسپانسیون میکروبی قرار داده شدند تا سینتیک مرگ میکروبی و ارزش D (Decimal Reduction Value) بدست آید (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

فنل کل اسانس های مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب معادل ۸/۵۳ ± ۱۷۰/۵ و ۲/۱٤ ± ٤۷/۲۵ میکروگرم گالیک‌اسید در هر میلی‌گرم نمونه تعیین شد (جدول ۲). خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا-کاروتن‌زدایی نیز انجام و نتایج مقایسه‌ای آنها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک استاندارد در جدول ۲ نشان داده شده‌است. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به‌وسیله هر دو اسانس قابل‌توجه بود (جدول ۲). مقدار اسانس لازم برای ۵۰٪ رادیکال‌زدایی اسانس مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب ٦/۲۵ و ۵/۸۲ µg/ml بود. قدرت احیای فریک (FRAP) اسانس مرزه به‌مراتب بیش از اسانس مرزه زراعی بود (جدول ۲). فعالیت رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیونی اسانس مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب ۱/۱٦ ± ۵۵/۲۸ و ۲/٤٦ ± ۲۱/۸۱ درصد به‌ازای ۱۵µg/ml اسانس با IC50 معادل ۹/٤ و ۱۰۱/۲ میکروگرم تعیین گردید. درصد فعالیت ضدتیروسینازی به‌ازای یک میکروگرم اسانس مرزه سهندی ۱/۳۳ ± ٤۷/۸۸ و به‌ازای ۱۵ میکروگرم اسانس مرزه زراعی ۲/۹ ± ۱۵/۳۵ بود. مقدار IC50 برای فعالیت ضدتیروسینازی اسانس‌های مرزه سهندی و مرزه زراعی به‌ترتیب ۲ و ۱۲۵ میکروگرم محاسبه شد (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های مرزه سهندی و مرزه زراعی توسط روشهای انتشار در آگار و رقت‌های مایع ارزیابی شد و نتایج نشان داد که اسانس‌ها دارای پتانسیل‌های ضدمیکروبی بالایی هستند (جدول ۱). فعالیت ضدمیکروبی روغن اسانسی بعضی از گونه‌های مرزه مانند *S. cuneifolia* بر علیه خیلی از باکتریهای مولد فساد و مسمومیت‌های غذایی گزارش شده‌است. میزان MIC (minimum inhibitory concentration) برای باکتریهایی که به روغن اسانسی *S. cuneifolia* حساس هستند در حد 600-1400µg/ml بوده‌است (Oke *et al*., 2009). در مطالعه حاضر کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس‌ها در طیف ۵۰۰-۱۰۰۰۰µg/ml قرار داشت. نتایج مطالعه فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها نشان داده‌است که اسانس‌های مرزه دارای پتانسیل‌های ضدمیکروبی بالایی بر علیه ۱۳ باکتری و ۹ قارچ بوده و باکتریهای گرم مثبت به روغن‌های اسانسی حساسترند (Skocibusic *et al*., 2006). در این مطالعه کاندیدا آلبیکنس حساسترین میکروارگانیسم با ارزش ٤/۲۹D و ٦/٤۳ به‌ترتیب در برابر اسانس‌های مرزه سهندی و مرزه زراعی بود (جدول ۱). پس از آن باکتری گرم منفی *E. coli* حساستر از باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بود. این تفاوت‌ها نشان می‌دهند که علاوه‌بر نوع میکروارگانیسم‌ها ترکیب شیمیایی اسانس‌ها تأثیر معنی‌داری در خواص ضدمیکروبی آنها دارند.

غربال‌گری خاصیت ضدمیکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک از روغن‌های فرّار تقطیر شده از قسمت‌های هوایی *Satureja montana* L. و *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. در بوسنی و هرزه‌گووین، بر علیه باکتریهای سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس آورئوس و اشرشیاکلی انجام شده و نتایج حکایت از توقف رشد تمام میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه داشته‌است (Cavar *et al*., 2008). مطالعه حاضر مؤید تأثیر مشابه مرزه سهندی و مرزه زراعی ساخت ایران است. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که گونه‌های مرزه می‌توانند به‌عنوان یک منبع ضدباکتریایی برای صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تأثیر ضدمیکروبی اسانس مرزه براساس ایجاد هاله عدم رشد

میانگین هاله ممانعت رشد (میلی‌متر) و غلظت اسانس (mg/ml)	*E. coli*		*S. aureus*		*Pseudomonas aeruginosa*		*Candida albicans*	
	اسانس خالص	اسانس زراعی	اسانس خالص	اسانس زراعی	اسانس خالص	اسانس زراعی	اسانس خالص	اسانس زراعی
۱۰	٤٠/٣ ± ١/٥	١٨/٦ ± ١/١	٢٨/٦ ± ١/١	١٦/٣ ± ١/٥	١٨/٣ ± ٠/٥	١٢/٦ ± ١/١	٥٣/٦ ± ١/٥	٣٥ ± ١
٥	٣١ ± ٢/٦	١١ ± ١	١٨/٦ ± ١/١	١٤ ± ٢	١٤/٣ ± ١/٥	١٠/٦ ± ٠/٥	٤٣/٦ ± ١/٥	٢٨/٦ ± ١/١
٢/٥	١٩/٣ ± ١/١	٨/٦ ± ٠/٥	١٤/٣ ± ٢/١	٨/٦ ± ١/١	١١ ± ١	٧/٣ ± ٠/٥	٣٥/٦ ± ٢/١	٢٠/٣ ± ١/٥
(mg/ml) MIC-MBC	١-٢/٥	٥-١٠	١-٢/٥	٢/٥-٥	٢/٥-٥	٥-١٠	٠/٥-١	١-٢/٥
ارزش D (دقیقه)	٦/٤٣	٨/٥٧	٨/٥٧	١٢/٨٦	١٧/١٤	١٧/١٤	٤/٢٩	٦/٤٣

جدول ۲- محتوای فنلی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های مرزه و آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد

اسانس	درصد بازدارندگی DPPH (مقدار اسانس)	IC_{50} (µg)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪) با روش بتاکاروتین (مقدار اسانس)	قدرت احیای فریک(FRAP) معادل گالیک‌اسید (میلی‌گرم در گرم نمونه)	محتوای فنلی (µg/mg GAE)
مرزه سهندی	٦٣/٢ ± ٢/٣ (١٠mg/ml)	٦/٢٥	٦٣/٦٦ ± ٤/٠٦ (٠/٦٢٥mg/ml)	٠/٥٥ ± ١٢/٥٦	١٧٠/٥ ± ٨/٥٣
مرزه زراعی	٦٩/٢١ ± ٠/٥٢ (١٠mg/ml)	٥/٨٢	٤٤/٠١ ± ٢/٣٤ (٠/٦٢٥mg/ml)	٠/٠٧ ± ٠/٨٢	٤٧/٢٥ ± ٢/١٤
BHT 1mM	٣٥/٩ ± ٠/٤٧				
BHA 1mM	٤٧/٧ ± ٠/٥				
Trolox 1mM	٣٤/٥ ± ٠/٤				

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- فعالیت‌های رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیون و درصد فعالیت ضد تیروسینازی اسانس‌های مرزه

اسانس	درصد رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیون (مقدار اسانس)	IC_{50} (µg)	درصد فعالیت ضدتیروسینازی (مقدار اسانس)	IC_{50} (µg) معادل quercetin در هر گرم نمونه
مرزه سهندی	۵۵/۲۸ ± ۱/۱۶ (۱۵µg/ml)	۹/٤	٤۷/۸۸ ± ۱/۳۳ (۱µg)	۲
مرزه زراعی	۲۱/۸۱ ± ۲/٤٦ (۱۵µg/ml)	۱۰۱/۲	۱۵/۳۵ ± ۲/۹ (۱۵µg)	۱۲۵

زمینه تحقیقات جالبی پیرامون ترکیب‌های شیمیایی و ویژگی‌های زیستی روغن‌های اسانسی مرزه وجود دارد. مطالعه مقالات نشان می‌دهد که تعداد کمی گزارش در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانی مرزه وجود دارد و اسانس مرزه سهندی و اسانس زراعی آن تاکنون مورد مطالعه و بررسی قرار نگرفته‌است. در مقالات دیگران خواص آنتی‌اکسیدانی *S. montana* مورد مطالعه قرار گرفته‌است (Koleva *et al*., 2002؛ Radonic & Milos, 2003). سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ها با روش DPPH، نشان داد که قدرت رادیکال‌زدایی اسانس‌ها تقریباً برابر هم ولی به‌مراتب بیشتر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش بتاکاروتین و قدرت احیای فریک اسانس‌ها نشان می‌دهد که اسانس مرزه سهندی با محتوای فنلی بالاتر، قوی‌تر از مرزه زراعی است (جدول ۲). نتایج سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی روغن‌های فرّار تقطیر شده از قسمت‌های هوایی *Satureja montana* L. و *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. بوسنی و هرزه‌گووین با روش DPPH، نتایج قابل مقایسه‌ای را در مقایسه با تیمول به‌عنوان پروب مثبت نشان داده‌است (Cavar *et al*., 2008).

رادیکال‌زدایی سوپراکساید آنیون اسانس‌ها نشان داد که اسانس مرزه سهندی دارای IC50 معادل ۹/٤ میکروگرم در برابر ۱۰۱/۲ میکروگرم IC50 اسانس زراعی مرزه است (جدول ۳). فنل‌ها و فلاونوئیدهای گیاهی ممانعت پراکسیداسیون لیپید را با فرونشانی رادیکال‌های پروکسی و احیا یا کلاته‌کردن آهن در آنزیم لیپوکسیژناز و نهایتاً ممانعت از شروع واکنش پراکسیداسیون لیپید را انجام می‌دهند (Torel *et al*., 1986). تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مربوط به توانایی زدودن رادیکال‌های پروکسی، رادیکال‌های آزاد DPPH و رادیکال‌های هیدروکسی باشد (Singh *et al*., 2005). نتایج نشان‌دهنده ارزش غذایی این گونه گیاهان به‌ویژه قابلیت تیمول که براساس گزارش Sefidkon و همکاران (۲۰۰٤) از ترکیب های اصلی مرزه سهندی است، در پیشگیری از تشکیل محصولات سمی از راه نیتروژن واکنشگر (RNS) بوده‌اند (Cavar *et al*., 2008؛ Prieto *et al*., 2007). بازدارنده‌های تیرسیناز آن دسته از مواد شیمیایی هستند که واکنش‌های شیمیایی مانند تیره شدن رنگ غذا یا پوست انسان (ملانیزاسیون) را احیا می‌کنند، بنابراین دارای پتانسیل خوبی با دیدگاه صنعتی هستند. در

Archive of SID

www.SID.ir

این مطالعه مرزه سهندی بازدارندگی بسیار قوی با IC50 برابر ۲ میکروگرم نشان داد (جدول ۳). در مجموع مطالعه خواص بیولوژیک اسانس مرزه سهندی نشان می‌دهد که قابلیت خوبی برای بررسی کاربرد آن در صنعت غذا و دارو وجود دارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد که با تأمین هزینه‌های این طرح امکان عملی‌شدن آن را فراهم آوردند اعلام می‌داریم.

منابع مورد استفاده

- Abad, M.J., Bermejo, P., Gonzales, E., Iglesias, I., Irurzun, A. and Carrasco, L., 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. General Pharmacology: The Vascular System, 32(4): 499-503.
- Azaz, A.D., Kurkcuoglu, M., Satil, F., Baser, K.H.C. and Tumen, G., 2005. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of some Satureja essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 20(6): 587-591.
- Bezbradica, D.I., Tomovic, J.M., Vukasinovic, M.S., Siler-Marinkovic, S. and Ristic, M.M., 2005. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja montana* L. collected in Serbia and Montenegro. Journal of Essential Oil Research, 17(4): 462-465.
- Catino, P.D., Harley, R.M. and Wagstaff, S.J., 1992. Genera of Labiatae: Status and Classification. 511-522. In: Harley, R.M. and Reynolds, T., (Eds.). Advances in Labiatae Science. Royal Botanical Gardens, Kew, 872p.
- Cavar, S., Maksimovic, M., Solic, M.E., Jerkovic-Mujkic, A. and Besta, R., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. Food Chemistry, 111(3): 648-653.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E. and Lim, T.Y., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. Food Chemistry, 109(3): 477-483.
- Escudero, J., Lopez, J.C., Rabanol, R.M. and Valverde, S., 1985. Secondary metabolites from Satureja species-new triterpenoid from Satureja acinos. Journal of Natural Products, 48: 128-132.
- Esquived, M.M., Ribeiro, M.A. and Bernardo-Gil, M.G., 1999. Supercritical extraction of savory oils: study of antioxidant activity and extract characterisation. Journal Supercritical Fluids, 14(2): 129-138.
- Gulluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A. and Sahin, F., 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(14): 3958-3965.
- Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A.R. and Mohseni, M., 2000. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 71: 187-192.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 3954-3962.
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A. and Evstatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis, 13: 8-17.
- Lahlou, M., 2004. Essential oils and fragrance compounds: Bioactivity and mechanisms of action. Flavour and Fragrance Journal, 19: 159-165.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91(3): 453-462.
- Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J. and Jang, Y.S., 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(22): 6490-6496.
- Lim, T.Y., Lim, Y.Y. and Yule, C.M., 2009. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. Food Chemistry, 114(2): 594-599.
- Lindberg Madsen, H. and Bertelsen, G., 1995. Spices as antioxidants. Trends in Food Science and Technology, 6(8): 271-277.
- Miraliakbari, H. and Shahidi, F., 2008. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. Food Chemistry, 111(2): 421-427.

Archive of SID

www.SID.ir

- Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Mirza, M., 2004. Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahendica* from Iran. Food Chemistry, 88(3): 325-328.
- Singh, G., Marimuthu, P., Murali, H.S. and Bawa, A.S., 2005. Antioxidative and antibacterial potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. Journal of Food Safety, 25(2): 130-145.
- Skocibusic, M., Bezic, N. and Dunkic, V., 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. Food Chemistry, 96: 20-28.
- Soliman, K.M. and Badeaa, R.I., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology, 40(3): 1669-1675.
- Thomas-Barberan, F.A., Huisain, S.Z. and Gil, M.J., 1987. The distribution of methylated flavones in the Lamiaceae. Biochemical Systematics and Ecology, 16: 43-46.
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P., 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry, 25(2): 383-385.
- Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., Oishi, I., Inami, R., Yamane, M., Nakamura, M., Murata, H. and Nakanishi, T., 1998. Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 21(8): 829-833.
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S. and Altundag, S., 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry, 112(4): 874-879.
- Prieto, J.M., Iacopini, P., Cioni, P. and Chericoni, S., 2007. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. Food Chemistry, 104(3): 889-895.
- Radonic, A. and Milos, M., 2003. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. Free Radical Research, 37(6): 673-679.
- Rechinger, K.H., 1982. Satureja in: Flora Iranica. No. 150, Akademische Druck-u Verlagsanstalt.
- Ruberto, G. and Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry, 69(2): 167-174.
- Sefidkon, F. and Ahmadi, S., 2000. Essential oil of *Satureja khuzestanica* Jamzad. Journal of Essential Oil Research, 12: 427-428.
- Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z. and Ahmadi, S., 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. Food Chemistry, 100(3): 1054-1058.

Archive of SID

www.SID.ir

Antimicrobial, antioxidative, superoxide anion radical scavenging and anti tyrosinase properties of *Satureja sahendica* Bornm. and *Satureja hortensis* L. essential oils

M. Dadashpour[1], I. Rasooli[2*], F. Sefidkon[3], E. Zaad Hosseingholi[4] and Sh. Darvish Alipour Astaneh[4]

1- MSc. Student, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: rasooli@shahed.ac.ir
3- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran
4- Ph.D Student, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

Received: October 2010 Revised: August 2011 Accepted: August 2011

Abstract

In the present study, the antimicrobial properties of *Satureja sahendica* Bornm. and summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oils were studied. The bacterial strains sensitive to the oils were in *Candida albicans*> *E. coli*> *S. aureus*> *P. aeruginosa* order. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations were observed in the range of 0.5-10mg/ml. Total phenolics of *S. sahendica* and the *S. hortensis* were 170.5±8.53 and 47.25±2.14 µg Gallic acid equivalent per mg sample. Antioxidative property of the oils was carried out using DPPH free radical scavenging and beta-carotene bleaching tests and the results were compared with the standard synthetic antioxidants. Lipid peroxidation inhibitions were comparable to or higher than the synthetic antioxidants. The concentrations from *S. sahendica* and *S. hortensis* oils required for 50% free radical scavenging (IC50) were 6.25 and 5.82 µg/ml respectively. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of *S. sahendica* oil was greater than that of the *S. hortensis* oil. The superoxide anion radical scavenging activities of *S. sahendica* and *S. hortensis* oils were 55.28%±1.16 and 21.81%±2.46 at 15µg/ml oil with an IC50 of 9.4 and 101.2 µg respectively. Tyrosinase activity of one µg *S. sahendica* oil was 47.88±%1.33 while that of the *S. hortensis* oil at 15 µg level was 15.35%±2.9. In conclusion, the results from biological properties of *Satureja sahendica* are indicative of its potentials for food and drug industries applications.

Key words: Antimicrobial, antioxidant, superoxide anion radical scavenging, antityrosinase, essential oils, *Satureja*.

Archive of SID

www.SID.ir