

بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره قره قاط (*Vaccinium macrocarpon*) به روش خیساندن و

## بررسی اثر ضد باکتریایی آن

اسماعیل عطای صالحی\*، امیر خدنگ نیکفرجام

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

\*نویسنده مسئول: eatayesalehi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۴

## چکیده

در این تحقیق شرایط استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط به روش خیساندن، با رویه آماری سطح پاسخ بهینه‌یابی و اثرات ضد باکتریایی عصاره بررسی گردید. جهت استخراج عصاره از شرایط دمایی ۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲ تا ۱۰ ساعت، نسبت نمونه به حلال ۴ تا ۲۰ درصد و نسبت حلال اتانول به متانول صفر تا ۱۰۰ درصد استفاده شد. اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با تعیین MIC و MBC علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوجنز*، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* ارزیابی شد. شرایط عملیاتی بهینه جهت حصول بیشینه‌ی مقدار عصاره‌ی قره قاط در فرآیند استخراج دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۱۰ ساعت، نسبت نمونه به حلال ۱۱/۴۳ درصد و نسبت اتانول به متانول ۸۸/۸۸ درصد تعیین گردید. در این شرایط راندمان استخراج ۴/۸۸ درصد اندازه‌گیری شد. راندمان استخراج عصاره قره قاط بر اساس مدل ریاضی ۵/۱۷ درصد پیش‌بینی شد. نزدیکی مقدار راندمان استخراج تجربی با مقدار پیش‌گویی شده توسط مدل نشان دهنده‌ی کارایی نسبتاً مناسب مدل می‌باشد. عصاره‌ی الکلی قره قاط حاصله دارای اثر ضدباکتریایی بود و بر رشد کلیه باکتری‌های مورد آزمون تاثیر گذاشت. در این بین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر بود. *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت نشان دادند. به طوری که به ترتیب کمترین و بیشترین مقادیر MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشتند.

واژگان کلیدی: قره قاط، بهینه‌یابی، اثر ضد باکتریایی

## مقدمه

بیوتیک‌ها، موجب از بین رفتن باکتری‌ها می‌شوند که از نظر بالینی، این موضوع در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی حائز اهمیت است (Oussalah et al., 2007). استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی، راه حلی مناسب جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی فرآوری شده می‌باشد که می‌تواند باعث کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروب‌های با منشأ غذایی شود (عزیزخانی و همکاران، ۲۰۰۷).

عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی ایجاد اختلال کنند و یا باعث منعقد و کواگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند (Burt, 2004).

افزودنی‌های طبیعی و سنتزی به منظور ایمنی، ایجاد ظاهری مطلوب و بهبود عطر و طعم مواد غذایی استفاده می‌شوند. مصرف‌کنندگان مواد غذایی نسبت به غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی بوده و در آن‌ها مواد طبیعی به کار رفته است تمایل بیشتری نشان می‌دهند و به همین دلیل مطالعات زیادی در رابطه با امکان جایگزین کردن افزودنی‌های شیمیایی با ترکیبات طبیعی در غذاهای مختلف صورت گرفته است (برزگر و همکاران، ۱۳۸۷؛ Nakamura et al, 1991).

امروزه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که علاوه بر داشتن برخی ویژگی‌های مضر بر سلامتی انسان، امکان ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد (حجتی بناب و نیک‌خواه، ۲۰۱۲). بنابراین تلاش‌های بسیاری جهت جایگزین کردن داروهایی با منشأ گیاهی انجام گرفته است، زیرا ترکیبات ضد میکروبی گیاهی، با ساختارهای متفاوت از آنتی-

می‌روید و از این نواحی صادر می‌شود. گونه از این درختچه که در ایران می‌روید *Vaccinium myrtillus* نام دارد که از نظر خواص درمانی مشابه گونه اروپایی است (سپهری‌فر و حسن‌لو، ۱۳۸۸؛ سپهری‌نیک و همکاران، ۱۳۹۰).

هدف از این مطالعه، معرفی شرایط بهینه استخراج عصاره الکلی قره قاط به روش خیساندن، به کمک روش آماری سطح پاسخ و تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره‌ی الکلی علیه برخی باکتری‌های بیماریزای شاخص در مواد غذایی بود.

#### راندمان استخراج

به منظور تعیین راندمان استخراج عصاره، مقدار نهایی پودر بدست آمده بوسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۱ توزین و نسبت وزنی پودر بدست آمده به مقدار وزنی میوه خشک قره قاط به عنوان راندمان استخراج عصاره محاسبه گردید.

#### طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه به منظور طراحی تعداد آزمون‌ها و مدل ریاضی پیشگوی اثر متغیرهای مستقل شامل  $X_1$  دما،  $X_2$  زمان،  $X_3$  نسبت نمونه به حلال و  $X_4$  نسبت حلال اتانول به متانول، بر راندمان استخراج عصاره‌ی الکلی میوه خشک قره قاط از طرح آماری RSM استفاده شد (Zhang et al., 2010). در جدول ۱ متغیرهای مستقل فرایند و سطوح آنها نشان داده شده است. آزمایش در دو تکرار انجام شد. مدل مورداستفاده در RSM عموماً رابطه‌ی درجه دوم می‌باشد. در روش RSM برای هرمتغیر وابسته، مدلی تعریف شده که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر هرمتغیرجدداً بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد. در معادله ذکر شده  $Y$  پاسخ پیشبینی شده،  $\beta_0$  ضریب ثابت و  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$  اثرات خطی و  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$  اثرمربعات و  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$  اثرات متقابل می‌باشند. از نرم افزار Minitab 16 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد و رسم نمودارهای

قره قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L) متعلق به خانواده Ericaceae گیاهی درختچه‌ای و بدون خار به طول ۱ تا ۳ متر است، که شاخه‌های تازه آن از هم باز بوده و دارای کرک‌های پراکنده می‌باشد. این گیاه دارای برگ‌های پنجه‌ای با پایه قلبی شکل باحاشیه دندانه دار و اره‌ای شکل است. سطح برگ به صورت پراکنده ولی پشت آن به طور انبوه‌ی کرک‌دار می‌باشد. میوه سته، کروی، قرمز رنگ تا ارغوانی مایل به سیاه و بدون کرک است. میوه و برگ بخش‌های دارویی گیاه را تشکیل می‌دهد. جمع‌آوری پس از رسیدن میوه‌ها در اواخر تابستان و اوایل پاییز انجام می‌گیرد. این گیاه بیشتر در نواحی اروپا

#### مواد و روش کار

##### مواد

میوه قره قاط به صورت خشک از بازار محلی قوچان و حلال‌های اتانول و متانول از شرکت مرک آلمان تهیه شد. باکتری‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *لیستریا مونوسایتوجنز* (1165PTCC)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 70876) و *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) از گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. محیط‌های کشت نوترینت برات، تریپتون سوی برات، تریپتون سوی آگار و مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) استفاده شد.

##### روش‌ها

استخراج عصاره‌ی قره قاط برای تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده گردید. وزن مشخصی از میوه خشک و تمیز قره قاط به نسبت ۱ به ۵ در مخلوط حلال‌های اتانول و متانول به نسبت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد اتانول خیسانده شد. عصاره‌های استحصال شده پس از صاف کردن با کاغذ صافی، توسط اواپراتور چرخنده (هیدلف، آلمان) تغلیظ و در نهایت به کمک آون تحت خلأ (شل لب 1410D-2E، آمریکا) خشک شد. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی باندهای دوگانه کونزوگه، طی خشک کردن از دمای پایین ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. (شفیعی نیک و همکاران ۱۳۹۰)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

مربوط به روش سطح پاسخ صورت گرفت ( Yolmeh et al., 2014).

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح آنها

متغیر مستقل	نماد ریاضی	سطوح متغیر			
دما (°C)	X <sub>1</sub>	۶۰	۴۶	۳۲	۱۹
زمان (ساعت)	X <sub>2</sub>	۱۰	۸	۶	۴
نسب نمونه به حلال	X <sub>3</sub>	٪۲۰	٪۱۶	٪۱۲	٪۸
نسبت اتانول به متانول	X <sub>4</sub>	٪۱۰۰	۷۵	٪۵۰	٪۲۵

MIC به کمترین غلظت از یک ترکیب که رشد میکروارگانیسم رامهارمی نماید، اطلاق می شود. به عبارت دیگر، به کمترین مقدار از یک ترکیب گفته می شود که بتواند به طور قابل توجهی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت) مهار نماید. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد از روش رقت های مکرر (serial dilution) استفاده شد. در این روش از غلظت های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد (Manenzhe et al., 2004).

تعیین کمینه غلظت کشنده عصاره الکلی قره قاط (Minimum Bactericidal Concentration) به کمترین غلظت از یک ترکیب اطلاق می شود که بتواند پس از گذشت ۲۴ ساعت جمعیت باکتریایی را به میزان ۹۹/۹ درصد (هزار برابر جمعیت اولیه) کاهش دهد. برای مشخص نمودن حداقل غلظت کشنده باکتری از کشت رقت های فاقد کدورت در محیط آگاردار استفاده شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. غلظتی (رقتی) که شمارش تعداد کلونی ها در آن صفر بود، به عنوان حداقل غلظت کشنده باکتری ها گزارش شد (Manenzhe et al., 2004).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره قره قاط:

جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره قره قاط از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. بدین ترتیب که از باکتری های فعال شده (۲۴ ساعت رشد کرده) سوسپانسیونی معادل با کدورت نیم مک-فارلند استاندارد ایجاد شد. سپس توسط سوآپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقدار برداشت و در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل سطحی کشت شد. دیسک های استریل با قطر ۶ میلی متر در محلول عصاره قره قاط با غلظت های تعیین شده (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۵ میلی گرم بر لیتر) خیسانده و در سطح پتری دیش ها استفاده شدند؛ سپس پتری دیش های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه گیری شد (Skaltsa et al., 2003). همچنین یک پلیت فاقد باکتری به عنوان شاهد (کنترل) منفی و یک پلیت نیز بدون عصاره قره قاط به عنوان شاهد مثبت (کنترل) در نظر گرفته شد. دیسک های آنتی بیوتیک (پنی سیلین و جنتامایسین) نیز به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد استفاده شد.

تعیین کمینه غلظت بازدارنده عصاره الکلی قره قاط (Minimum Inhibitory Concentration)

نتایج

جدول ۲ اثر تیمارهای مختلف بر راندمان استخراج عصاره را نشان می‌دهد.

جدول ۲- اثر تیمارهای مختلف بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

راندمان استخراج (%)	نسبت نمونه به حلال %	درصد اتانول	زمان استخراج (h)	دمای استخراج (°C)	تیمار
۴/۲۹	۱۶	۷۵	۴	۴۶	۱
۳/۷۹	۸	۲۵	۸	۴۶	۲
۳/۲۳	۸	۷۵	۴	۱۸	۳
۳/۵۳	۱۲	۵۰	۶	۳۲/۵	۴
۲/۸۹	۱۲	۱۰۰	۶	۳۲/۵	۵
۲/۷۶	۸	۲۵	۴	۱۸	۶
۳/۳۱	۱۶	۷۵	۸	۱۸	۷
۴/۵۹	۱۶	۷۵	۸	۴۶	۸
۲/۹۳	۱۶	۲۵	۸	۱۸	۹
۴/۳۶	۸	۷۵	۸	۴۶	۱۰
۳/۳۱	۱۶	۷۵	۴	۱۸	۱۱
۳/۱۴	۲۰	۵۰	۶	۳۲	۱۲
۴/۳۵	۸	۷۵	۴	۴۶	۱۳
۳/۲۲	۸	۷۵	۸	۱۸	۱۴
۳/۶۳	۱۲	۵۰	۱۰	۳۲	۱۵
۴/۱۹	۱۲	۵۰	۶	۶۰	۱۶
۳/۵۹	۸	۲۵	۴	۴۶	۱۷
۳/۳۷	۱۲	۵۰	۲	۳۲	۱۸
۳/۲۷	۴	۵۰	۶	۳۲	۱۹
۲/۴۸	۱۲	۵۰	۶	۵	۲۰
۲/۸۷	۱۲	۶	۰	۳۲	۲۱
۲/۷۵	۸	۲۵	۸	۱۸	۲۲
۳/۶۵	۱۶	۲۵	۸	۴۶	۲۳
۳/۵۰	۱۶	۲۵	۴	۴۶	۲۴
۲/۹۲	۱۶	۲۵	۴	۱۸	۲۵

الکلی قره قاط در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ) که نشان‌دهنده‌ی مطلوبیت و دقت مدل پیشنهاد شده می‌باشد.

مدل درجه دوم کامل برای راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط که در آن عبارتهای بی‌معنی حذف شده‌اند، به صورت زیر می‌باشد:

$$\text{راندمان استخراج (\%)} = X_0/4629 + X_1^2/5442 - X_2 X_1/1153 - X_3 X_1/2004 + X_4 X_1/000193 + X_5 X_1/0843$$

جدول ۳، ضریب تعیین،  $R^2$  پیش‌بینی شده و  $R^2$  تصحیح شده برای راندمان استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط در چهار مدل مختلف را نشان می‌دهد. به منظور انتخاب مدل با کارایی مناسب مقادیر  $R^2$  ها مقایسه شد. هر مدلی که بیشترین مقادیر ضرایب را به خود اختصاص داد به عنوان مدل مناسب انتخاب شد (بدویک و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین مطابق جدول، مدل درجه دوم دارای بیشترین قابلیت پیش‌گویی می‌باشد. علاوه بر این، مقدار عدم برازش برای مدل انتخاب شده برای استخراج عصاره‌ی

جدول ۳ - مقایسه ضرایب تعیین مدل‌های مختلف

مدل	پاسخ
خطی	راندمان استخراج
	$R^2$ %
	۷۸/۴۵
خطی - مربعی	$R^2$ % تصحیح شده
	$R^2$ % پیش‌بینی شده
	۷۶/۹۴
خطی - برهمکنش	$R^2$ %
	$R^2$ % تصحیح شده
	$R^2$ % پیش‌بینی شده
درجه دوم کامل	$R^2$ %
	$R^2$ % تصحیح شده
	$R^2$ % پیش‌بینی شده

قره قاط از خود نشان دادند و اثر سایر عبارات‌ها بر پاسخ معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). مطابق جدول ۴ عبارات‌های خطی دمای استخراج و نمای دوم دمای استخراج به ترتیب بیشترین و کمترین اثر را بر میزان راندمان استخراج عصاره‌ی قره قاط از خود نشان دادند. همچنین در نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های انتشار دیسک (جدول ۵) مشخص شد که عصاره‌ی الکلی قره قاط بر رشد باکتری‌های مورد نظر موثر بوده و هاله‌ی عدم رشد با قطرهای متفاوت در باکتری‌های مختلف ایجاد شد.

جدول آنالیز واریانس (جدول ۴) برای تشخیص معنی‌دار بودن عبارات‌های مدل به‌کار می‌رود. به صورتی که هر چه مقدار عددی P کوچکتر و مقدار عددی F بیشتر باشد، اثر معنی‌داری را بر پاسخ پیش‌بینی شده خواهد داشت (کوهان هونگ و کایلی، ۲۰۰۵). مطابق جدول، در عبارت‌های خطی دمای استخراج و درصد اتانول، در بین عبارت‌های مربعی عبارت نمای دوم درصد اتانول و در بین برهم‌کنش‌ها، تنها برهم‌کنش دمای استخراج و درصد اتانول اثر معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بر راندمان استخراج عصاره‌ی الکلی

جدول ۴ - نتایج آنالیز واریانس مدل‌های مختلف بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F احتمال	P احتمال
مدل	۱۴	۱۳/۵۵۷۷	۰/۹۶۸۴	۲۱/۱۷	۰
خطی	۴	۱۲/۲۶۶۰	۳/۰۶۶۵	۷۰/۱۶	۰
$X_1$	۱	۱۰/۲۳۰۵	۱۰/۲۳۰۵	۸۱/۳۷	۰
$X_2$	۱	۰/۱۱۲۱	۰/۱۱۲۱	۲/۶۰	۰/۱۱۴
$X_3$	۱	۰/۹۲۰۰	۱/۹۲۰۰	۴۳/۸۸	۰
$X_4$	۱	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۳	۰/۰۷	۰/۷۹۵
نمای دوم	۴	۰/۹۵۹۶	۰/۲۳۹۹	۵/۴۳	۰/۰۰۱
$X^2$	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰	۰/۹۵۴

۰/۱۵۹	۲/۰۷	۰/۰۹۱۴	۰/۰۹۱۴	۱	$X^2$
.	۱۷/۳۲	۰/۷۵۶۷	۰/۷۵۶۷	۱	$X^2$
۰/۲۲۵	۱/۵۱	۰/۰۶۵۳	۰/۰۶۵۳	۱	$X^2$
۰/۲۷۹	۱/۲۹	۰/۰۵۵۳	۰/۳۳۲۱	۶	برهمکنش
۰/۲۶۴	۱/۲۸	۰/۰۵۷۸	۰/۰۵۷۸	۱	$X_1 X_2$
۰/۰۲۷	۵/۱۸	۰/۲۱۷۸	۰/۲۱۷۸	۱	$X_1 X_2$
۰/۳۴۱	۰/۹۲	۰/۰۴۲۱	۰/۰۴۲۱	۱	$X_1 X_4$
۰/۹۳۳	۰/۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۱	$X_2 X_3$
۰/۶۵۱	۰/۲۱	۰/۰۰۷۲	۰/۰۰۷۲	۱	$X_2 X_4$
۰/۷۰۰	۰/۱۶	۰/۰۰۷۲	۰/۰۰۷۲	۱	$X_2 X_4$
		۰/۰۴۴۲	۲/۰۷۸۲	۴۷	خطای باقیمانده
۰/۰۷۵	۳/۱۴				عدم برازش
			۰/۰۱۲۵	۳۷	خطای خالص

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد باکتری توسط عصاره قره قاط بر حسب میلی‌متر

غلظت عصاره گیاهی باکتری	۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵ میلی‌گرم بر میلی- لیتر *	دیسک آنتی‌بیوتیک
باسیلوس سرئوس	۹/۲±۰/۴۵	۱۰/۹±۰/۵۲	۱۲/۳±۰/۴۵	۱۳/۵±۰/۵۲	۱۴/۲±۰/۵۲	پ ۱۳
لیستریا مونوسایتوزنز	۸/۷±۰/۳۵	۱۰/۲±۰/۲۸	۱۱/۸±۰/۴۵	۱۲/۷±۰/۴۰	۱۳/۹±۰/۴۰	پ ۲۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۹±۰/۳۵	۱۰/۵±۰/۳۵	۱۱±۰/۴۵	۱۲/۴±۰/۲۸	۱۳/۷±۰/۴۵	پ ۳۲
اشریشیا کلی	۸/۷±۰/۲۸	۹/۲±۰/۴۰	۹/۵±۰/۲۸	۱۰/۲±۰/۳۰	۱۱/۳±۰/۳۰	ج ۱۳

پ: دیسک آنتی‌بیوتیک پنی سیلین، ج: دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین.

ترتیب کمترین و بیشترین غلظت بازدارنده از رشد را نشان دادند.

آزمون‌های رقت آگار (جدول ۶) نشان داد که عصاره الکلی قره قاط اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد آزمون دارد، بدین صورت که باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی به

جدول ۶- حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط عصاره الکلی قره قاط

سویه های باکتریایی	۲ میلی گرم	۴ میلی گرم	۸ میلی گرم	۱۶ میلی گرم	۳۲ میلی گرم	۶۴ میلی گرم	شاهد منفی	شاهد مثبت
باسیلوس سرئوس	+	+	+	-	-	-	-	+
لیستریا مونوسایتوزنز	+	+	+	+	-	-	-	+
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	-	-	-	+
اشریشیا کلی	+	+	+	+	+	-	-	+

علامت + نشان دهنده‌ی رشد باکتری و علامت - نشان دهنده‌ی عدم رشد می‌باشد.

جدول ۷ حداقل غلظت کشنده عصاره قره قاط را برای باکتری‌های مورد آزمون نشان می‌دهد. بر این اساس باسیلوس سرئوس پایین‌ترین میزان MBC (۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را در بین باکتری‌های مورد آزمون از خود نشان داد.

جدول ۷ حداقل غلظت کشنده عصاره قره قاط را برای باکتری‌های مورد آزمون نشان می‌دهد. بر این اساس باسیلوس سرئوس پایین‌ترین میزان MBC (۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را در بین باکتری‌های مورد آزمون نشان داد.

جدول ۷- حداقل غلظت کشنده باکتری توسط عصاره الکلی قره قاط

سویه های باکتریایی	۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر
باسیلوس سرئوس	+	-	-	-	-
لیستریا مونوسایتوزنز	+	+	+	-	-
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	-	-
اشریشیا کلی	+	+	+	+	-

### بحث

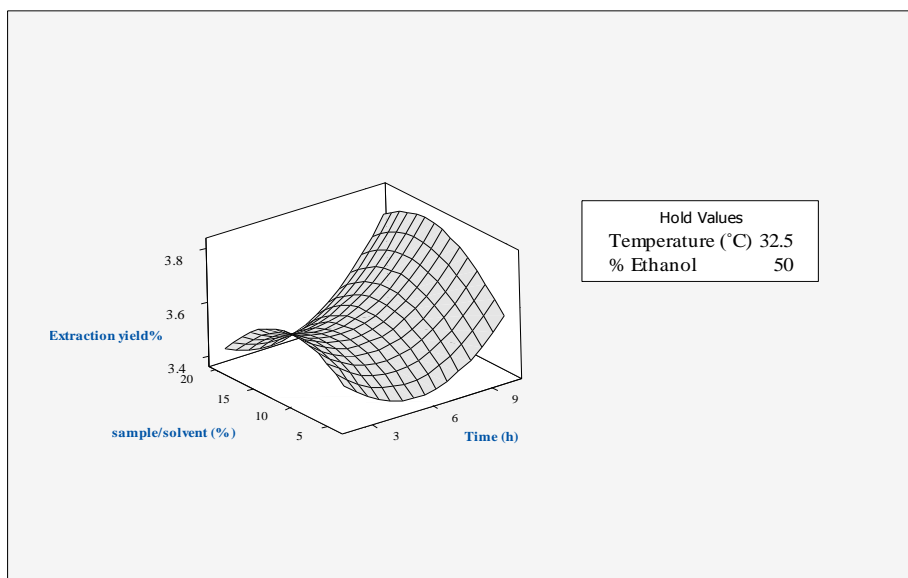
بهبوده‌یابی شرایط استخراج اولئانولیک اسید از گیاه *Lantana camara* و عصاره رنگی آناتو به نتایج مشابه دست یافتند و گزارش نمودند که در مقادیر بالای نسبت ماده جامد به حلال میزان راندمان استخراج کاهش می‌یابد. از سوی دیگر با افزایش زمان استخراج، راندمان استخراج ابتدا به آرامی کاهش و در ادامه به شدت افزایش می‌یابد.

مطابق شکل ۲ با افزایش دمای استخراج بویژه در مقادیر بالای اتانول، میزان راندمان استخراج عصاره افزایش می‌یابد.

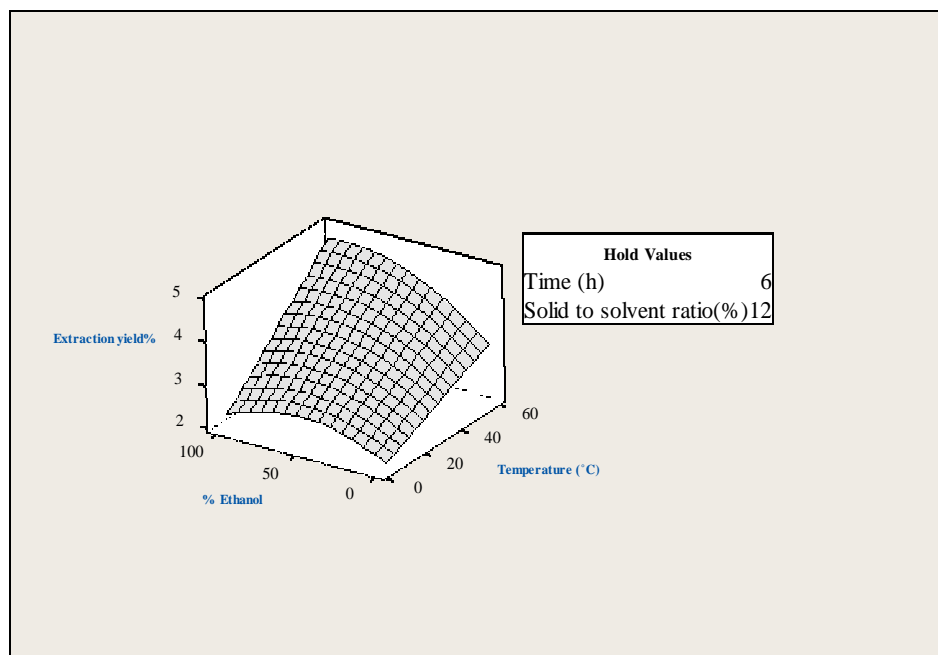
شکل ۱ اثر متقابل نسبت ماده جامد به حلال و زمان استخراج را در مقادیر ثابت دمای استخراج ۳۲/۵ درجه سانتی‌گراد و درصد متانول ۵۰، نشان می‌دهد. مطابق شکل با افزایش نسبت نمونه به حلال، راندمان استخراج ابتدا افزایش ولی در ادامه به علت اشباع شدن حلال، کاهش می‌یابد به طوری که نسبت نمونه به حلال در نقطه مرکزی بیشترین میزان راندمان را نشان داد. بانیک و پاندی (۲۰۰۸) و یلمه و همکاران (۱۳۹۲) به ترتیب در

مقادیر بالای دمای استخراج ای روند کاهشی مشاهده نمی شود که احتمالاً به علت بالا بودن قدرت نفوذ حرارتی بیشتر حلال اتانول ( $\alpha=0/003$ ) نسبت به متانول ( $\alpha=0/002$ ) می باشد بطوری که مطابق شکل بیشترین میزان راندمان استخراج در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و اتانول ۱۰۰ درصد مشاهده شد.

یابد که می تواند به علت بالا بودن سرعت نفوذ ماده در دمای بالا و در نتیجه حلالیت بیشتر عصاره و نیز کاهش ویسکوزیته حلال باشد (میلانی و همکاران، ۱۳۸۹). همان-طور که در شکل مشخص است در دمای پایین استخراج، با افزایش درصد اتانول راندمان استخراج عصاره ابتدا افزایش یافته و در ادامه کاهش می یابد؛ با این حال در



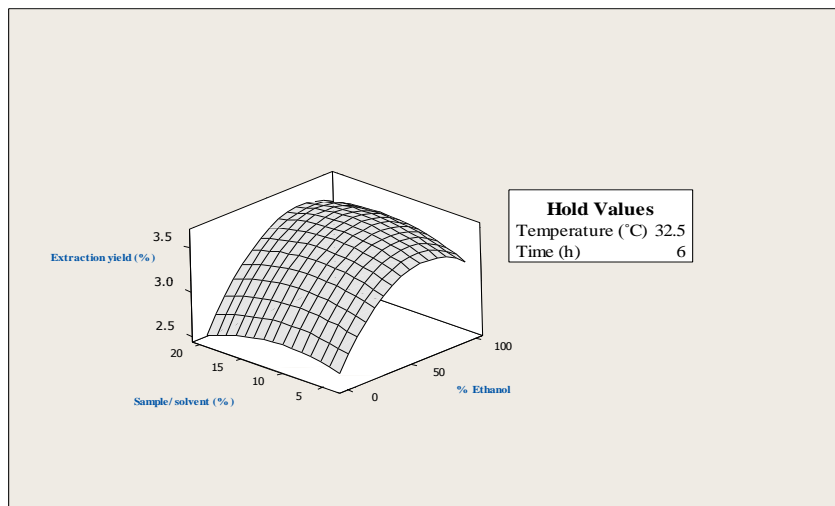
شکل ۱- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال و زمان استخراج بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط



شکل ۲- اثر متقابل نسبت دمای استخراج و درصد اتانول بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط



به سایر درصد ها می باشد. از سوی دیگر، در این شکل نیز اشباع شدن حلال در مقادیر بالای نسبت ماده جامد به حلال مشخص بوده و میزان راندمان کاهش یافته است. مطابق شکل بیشترین میزان راندمان استخراج عصاره در محلولی با غلظت ۷۵ درصد اتانول و ۲۵ درصد متانول و نسبت ماده جامد به حلال ۱۲ درصد حاصل می شود.



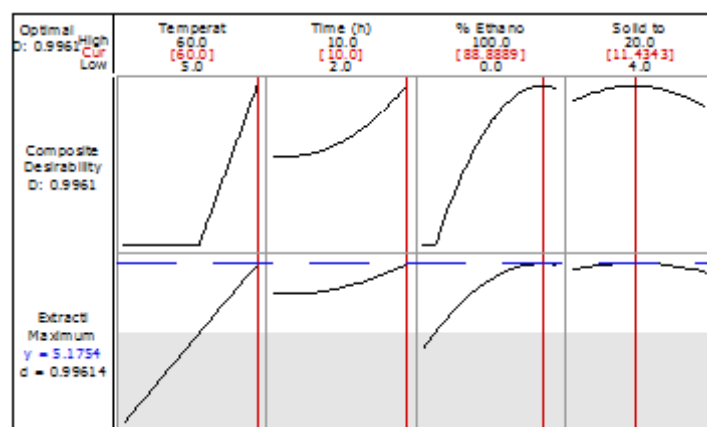
شکل ۳- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال و درصد اتانول بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

بینی شد که میزان مطلوبیت آن ۹۹/۶ درصد بود. شرایط بهینه تعیین شده توسط نرم افزار در شرایط آزمایشگاه اعمال و راندمان استخراج ۴/۸۸ درصد اندازه گیری شد. قرابت مقدار آزمایشگاهی با مقدار پیش گویی شده توسط مدل نشان دهنده ی توانایی نسبتا خوب مدل در پیش گویی می باشد.

اثر متقابل نسبت نمونه به حلال و درصد اتانول در شکل ۳ مشاهده می شود. همان طور که در شکل مشخص است با افزایش میزان اتانول تا ۷۵ درصد، راندمان استخراج افزایش یافته ولی در مقادیر بیشتر اتانول، راندمان استخراج کاهش می یابد که احتمالا به علت قدرت نفوذ بیشتر مخلوط ۷۵ درصد اتانول و ۲۵ درصد متانول نسبت

بهینه یابی شرایط استخراج عصاره ی قره قاط

به منظور بهینه یابی شرایط استخراج عصاره الکلی قره قاط از روش بهینه سازی عددی استفاده شد. دمای ۶۰ °C، زمان استخراج ۱۰ ساعت، میزان اتانول ۸۸/۸۸ درصد و نسبت نمونه به حلال ۱۱/۴۳ به عنوان شرایط بهینه جهت استخراج عصاره الکلی به روش خیساندن انتخاب شد. در این شرایط استخراج، راندمان عصاره ۵/۱۷ درصد پیش-



شکل ۴ - بهینه یابی استخراج گیاه قره قاط

همان طور که در جدول ۷ مشخص است باسیلوس سرئوس پایین ترین میزان MBC (۸ میلی گرم بر میلی لیتر) را بین باکتری های مورد آزمون نشان داد که با غلظت MIC این باکتری برابر می باشد. *اشریشیا کلی* بیشترین MBC (۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر) را در بین باکتری های مورد آزمون نشان داد. لاکومب و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده نمودند که *لیستریا مونوسایتوژنز* کمترین میزان MBC را برای عصاره الکلی قره قاط نسبت به دیگر باکتری های مورد آزمون نشان داد در حالی که عصاره قره قاط اثر کشنده ای بر *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نداشت.

### نتیجه گیری

نتایج نشان داد که روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه یابی شرایط استخراج عصاره الکلی قره قاط طرح آماری مناسبی است و دمای °C ۶۰، زمان استخراج ۱۰ ساعت، میزان اتانول ۸۸/۸۸ درصد و نسبت دانه به حلال ۱۱/۴۳ به عنوان شرایط بهینه استخراج عصاره الکلی قره قاط تعیین شد. در این شرایط استخراج، میزان راندمان عصاره ۵/۱۷ درصد پیش بینی و در حالت تجربی ۴/۸۸ درصد اندازه گیری شد. عصاره الکلی قره قاط حاصله دارای اثرات ضد میکروبی بود و بر رشد کلیه باکتری های مورد آزمون تاثیر گذاشت. در این بین حساسیت باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر بود. *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را بین باکتری های مورد آزمون نشان دادند. به طوری که به ترتیب کمترین و بیشترین مقادیر MIC و MBC را بین باکتری ها داشتند.

### منابع

۱. برزگر، حسن، کرباسی، احمد، جمالیان، جلال. و امین لاری، محمود، (۱۳۸۷). بررسی امکان استفاده از کیتوزان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۲ (۴۳)، ۳۷۰-۳۶۱.
۲. سپهری فر، روشنگر، حسنلو، طاهره. (۱۳۸۸). بررسی ترکیبات پلی فنلی، آنتوسیانین ها و فلاونوئیدهای

اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی قره قاط مطابق جدول ۵ عصاره الکلی قره قاط بر کلیه باکتری های مورد آزمایش اثر بازدارندگی داشت و اندازه قطر هاله برای باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی بود. گالیندو و همکاران (۲۰۰۳)، در مورد عصاره ی آناتو (۲/۸ درصد نوربیکسین)؛ محمدی سیچانی و همکاران (۲۰۱۱)، در مورد اسانس گل های بومادران، مرتضی سمنانی و همکاران ۱۳۸۶، در مورد عصاره ی دو گیاه استخیس و فلومیس و نیز اسمیت پالمر و همکاران ۱۹۹۸ در آزمایش های خود نتایج مشابه گزارش کردند. مطابق نتایج *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد را بین باکتری های مورد آزمایش داشتند. پروین و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که *سالمونلا تایفی موریوم* بیشترین قطر هاله ی عدم رشد را در برابر عصاره ی برگ درخت قره قاط از خود نشان داد. مطابق جدول ۶ حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری های گرم منفی بیشتر از باکتری های گرم مثبت است که نشان دهنده ی مقاومت بیشتر باکتری های گرم منفی به عصاره الکلی قره قاط نسبت به باکتری های گرم مثبت است. اسمیت پالمر و همکارانش (۱۹۹۸) و الهوپرینی (۲۰۰۳) نیز در آزمایشات خود به نتایج مشابهی رسیدند. دلیل احتمالی آن حضور لیپوپلی ساکاریدهای دیواره ی سلولی باکتری های گرم منفی می باشد. لیپوپلی ساکاریدهای دیواره ی سلولی، می توانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری های گرم منفی شوند (محمدی سیچانی و همکاران ۲۰۱۱). در بین باکتری های مورد آزمون *باسیلوس سرئوس* کمترین میزان MIC را نشان داد و به دنبال آن به ترتیب *لیستریا مونوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و در نهایت *اشریشیا کلی* قرار داشتند. لاکومب و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که در بین باکتری های مورد آزمون *لیستریا مونوسایتوژنز* بیشترین حساسیت را به عصاره ی قره قاط دارد.

partially defatted peanut, Int J Food Res, 19 (1), 341-346.

10. Banik, R.M., Pandey, D.K. 2008: Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology, industrial crops and products, Elsevier Sci. 27: 241-248.

11. Burt S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods, a Review. Int J Food Microbiology. 2004; 94: 223-253.

12. Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. 2003. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. J Food Protection. 66: 1074-1078.

13. Hojjati Bonab Z, Nikkhah E. 2012. Evaluation of antioxidant and antibacterial effect of methanolic extract from thyme (*Thymus vulgaris*), senna (*Cassia angustifolia*) and licorice (*Glycyrrhiza glabra*). J Shahed Uni. 19 (100): 111.

14. Lacombe, A., Wu, V.C., White, J., Tadepalli, Sh., Andre, E.E. 2012. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. J Food Microbiology, 30: 124-131.

15. Manenzhe NJ, Potgieter N, Ree TV. 2004. Compostion and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. J phyto Chem. 65: 2333-2336.

16. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. 2011. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci. 13 (3): 9-14.

17. Nakamura, S., Kato, A. & Kobayashi, N., 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme – dextran conjugate. J Agriculture Food Chem, 39 (2), 647-650.

18. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant

تام و خواص آنتی اکسیدانی گیاه دارویی قره قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L.) جمع آوری شده از چهار منطقه مختلف ایران. فصلنامه گیاهان دارویی، ۹ (۱): ۶۶-۷۴.

۳. شفیعی نیک، رضا، پریزاده، سیدمحمد رضا، ذکائی، ندا، قربانی، احمد. (۱۳۹۰). اثر عصاره آبی-الکلی قره قاط (*Vaccinium arctostaphylos*) بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده از موش صحرایی. کومش، ۱۲ (۴): ۴۴۷-۴۵۲.

۴. مرتضی سمنانی، کتایون، سعیدی، مجید، مهدوی، محمد رضا، رحیمی، فاطمه. (۱۳۸۶). بررسی و مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره های متانولی چند گونه گیاه از جنس های *Stachys* و *Phlomis*. مجله دانشکاه علوم پزشکی مازندران، ۷ (۵۷): ۵۷-۶۶.

۵. میلانی، الناز، پورآذرنگ، هاشم، وطن خواه، شهرزاد، وکیلان، حنه. (۱۳۸۹). بهینه سازی استخراج اینولین از غده ی سبب زمینی ترشی به کمک روش سطح پاسخ، نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ششم، شماره ۳، ص ۱۸۳-۱۷۶.

۶. یلمه، محمود، (۱۳۹۲). بهینه سازی شرایط استخراج رنگدانه آناتو به روش ماسراسیون و بررسی اثرات ضد میکروبی آن در شرایط *in vitro* و در سیستم غذایی، سس، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد.

7. Al-Howiriny, T. A. 2003. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Salvia Lanigera*. Pakistan J Biol Sci. 6(2): 133-135.

8. Azizkhani M, Misaghi A, Akhondzade Basti A, Gandomi Nasrabadi H, Hosseini H. 2012. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on Growth and Enterotoxin E Production of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. J Med Plants. 4(44): 185-193.

9. Badwaik, L. S., Prasad, K. & Deka, S. C., 2012, Optimization of extraction conditions by response surface methodology for preparing

- pathogens. *J Letters Food Microbiology.*; 26: 118–122.
24. Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B. & Farhoosh, R., 2014. Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of natural pigment from annatto seeds by Response Surface Methodology (RSM). *J Food chem.* 155, 319-324.
25. Zhang, L.L., Xu, M., Wang, Y.M., Wu, D.M. & Chen, J.H. 2010. Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from Infructescence of *Platycarya strobilacea* using response surface methodology, *J Molecules.* 15, 7923-7932.
26. Stanley, M; Ifeanyi, O; Eziokwu, O. 2014. Antimicrobial effects of Aloe Vera on some human pathogens. *Int J Microbiology Sci.* 3(3):1022-1028.
- essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E-coli O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 18(5): 414- 20.
19. Preston HD, Rickard MD. 1980. Extraction and chemistry of Annatto. *J Food Chem.* 5: 47-56.
20. Quanhong, L. & Caili, F. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *J Food Chem*, 92, 701-706.
21. Skaltsa HD, Demetoz C, Lazari, Sokovic M. 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *J Phyto Chem.* 64 (3): 743-752.
22. Skaltsa HD, Demetoz C, Lazari, Sokovic M. 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *J Phyto Chem.* 64 (3): 743-752.
23. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne

## Optimization of extraction conditions of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract by soaking method and its antibacterial effect

Ataye salehi E<sup>\*</sup>, Khadang Nikfargam A

Department of Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

\*Corresponding author: [eatayesalehi@yahoo.com](mailto:eatayesalehi@yahoo.com)

Received: 25 November 2017

Accepted: 23 February 2018

### Abstract

In this study, optimum conditions for extraction of the alcoholic extract of *Vaccinium macrocarpon* by soaking method and its antibacterial effects were determined by Response Surface Method. Extraction was carried out at a temperature of 5 to 60° C, 2 to 10 hours, and the sample to solvent ratio of 4 to 20%, and an ethanol / methanol solvent ratio of 0 to 100%. The antimicrobial effects of the extracts were evaluated by detection of MIC and MBC against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* bacteria. The optimum operating conditions to obtain the maximum amount of Cranberry extract were at 60°C, 10 hours, and the sample to solvent ratio 11.43% and the ethanol to methanol ratio 88.88%. In these conditions, the extraction yield was 4.88%. Extraction yield of cranberry extract was predicted based on the mathematical model was 5.17%. This value is close to the value predicted by the model indicates a relatively good performance model. Alcoholic extract of *Vaccinium macrocarpon* resulting antibacterial activity and influence on the growth of all bacteria was tested. Gram-positive bacteria were more sensitive than gram-negative bacteria. *Bacillus cereus* and *E. coli*, had the most and the least sensitivity to the alcoholic extract of *Vaccinium macrocarpon*. So that they had the lowest and the highest values of MIC and MBC among bacteria respectively.

**Keywords:** *Vaccinium macrocarpon*, Optimization, Antibacterial effect