کارایی روش سطح پاسخ در بهینه سازی شرایط استخراج عصاره اتانولی میوه سپستان و بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره علیه تعدادی از میکروارگانیسم های پاتوژن

مطهره پیرنیا[۱]، محمدرضا عدالتیان [۲*]، فریده طباطبایی یزدی [۳]، فخری شهیدی [۴]

۱- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه آموزشی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
٤- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۹)

چکیده

با ظهور بیماری‌های عفونی و گسترش سویه‌های مقاوم به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی با منشا گیاهی در این زمینه ضرورت می‌یابد. در این پژوهش عصاره اتانولی میوه سپستان برای ارزیابی اثر ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم هایی نظیر *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichiacoli*، *Salmonella typhi*، *Aspergillusniger* و *Candida albicans* استفاده شد. هم‌چنین عصاره گیری با کمک فراصوت تحت تاثیر سه پارامتر مستقل زمان (٤٠- ٥ دقیقه)، دما (٥٠-٢٠ درجه سانتی‌گراد) و شدت صوت (١٠٠-٢٠ درصد) انجام گرفت. از متدلوژی رویه سطح پاسخ جهت یافتن حالت بهینه اثر متقابل فاکتورها و برآورد بهترین شرایط فرایند با کمترین میزان آزمون استفاده گردید. اثر ضدمیکروبی با روش‌هایی چون انتشار دیسک در آگار، کشت آمیخته و تعیین حداقل غلظت مهار کننده و کشنده تعیین شد. نتایج نشان داد که در زمان استخراج ۳۹/۸ دقیقه، دما ٤٢/٢ درجه سانتی‌گراد و شدت صوت ٩٤/٤٦ درصد بیشترین میزان درصد استحصال عصاره اتانولی معادل ۸/۵ درصد بدست آمد. در تمامی روش‌های مذکور، اثر بازدارندگی عصاره اتانولی بهینه علیه دو سویه باکتریایی *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* و سویه قارچی *Candida albicans* قابل ملاحظه بود ($p\leq$۰/۰۵).

کلید واژگان: میوه سپستان، عصاره اتانولی، اثر ضدمیکروبی، روش سطح پاسخ

* مسئول مکاتبات: edalatian@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

امروزه به علت بروز مقاومت‌های میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها به عنوان جایگزین آنتی-بیوتیک‌های شیمیایی رایج مطرح شده است. بدین لحاظ گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضدمیکروبی جدید کاربردهای زیادی از جمله در پزشکی، صنایع غذایی و غیره پیدا نموده اند[۱]. عقیده بر این است که استفاده از عصاره خام گیاه به جای مواد موثره‌ی جدا شده از آن به علت اثر هم افزایی و اثر پوشاننده سمیّت بین مواد موجود در گیاه در بسیاری موارد ارجحیت داشته و اثر درمانی بهتری دارد[۲]. از جمله گیاهان دارویی که اثر درمانی آن از گذشته تا کنون به اثبات رسیده است، گیاه درختی سپستان (*Cordia myxa L.*) از انواع گونه‌های جنس Cordia است. این گیاه از خانواده گاوزبانیان[1] و بومی مناطق حاره ای و نیمه حاره ای است[۳]. به لحاظ ریخت شناسی درختی برگ ریز به ارتفاع حداکثر ۱۲متر، با تنه صاف و بدون انشعاب است که در تابستان ثمر می‌دهد. اندام هوایی پوشیده از کرک‌های خشن است. دارای برگ‌های چرمی، بیضی، ضخیم و دمبرگ بزرگ است[٤]. فرمولاسیونی از چند گیاه دارویی به طور گسترده‌ای در هند برای درمان سرماخوردگی، سرفه، اختلالات تنفسی و زکام استفاده می شود که *C.myxa* ترکیب اصلی فرمولاسیون می باشد. میوه‌ها و برگ‌ها حاوی آلکالوئیدهای پیرولیزیدین، کومارین‌ها، فلاوونوئیدها، ساپونین، ترپن‌ها و استرول‌ها هستند[۳]. لرکی و همکاران در مطالعه ای که به بررسی اثرات ضد تشنجی میوه سپستان و کُنار ناشی از استریکنین در موش های آزمایشگاهی پرداخته بودند، اثرات ضد تشنجی قابل توجهی را برای عصاره میوه سپستان در مقایسه با کُنار ذکر کردند[۵]. در پژوهشی که اُکوسا و همکارانش انجام دادند فعالیت آنتی اکسیدانی گونه ای دیگر از جنس سپستان (*Cordia gilletiiDe Wild*) را بررسی و خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی را برای آن گزارش کردند[٦]. میکروارگانیسم‌ها از جمله عوامل اصلی آلوده کننده مواد غذایی و بروز مسمومیت و عفونت غذایی نیز می باشند که در ذیل به تعدادی از آنها اشاره می شود. *باسیلوس سرئوس* باسیل گرم مثبت و اسپورزا از خانواده باسیلاسه است. این باکتریقادر به ایجاد انتروتوکسین‌های اسهال و تهوع می‌باشد[۷]. *استافیلوکوکوس اورئوس*کوکسی گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و مهم‌ترین گونه در جنس *استافیلوکوک* از نظر پزشکی محسوب می‌شود، به دلیل تولید کلنی‌های طلایی رنگ به *استافیلوکوک* طلایی نیز معروف است[۷]. *اشرشیاکلی* که به طور اختصار *E.coli* نیز نامیده می شود، یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. برخی از سروتیپ‌ها از طریق مسیر مدفوعی- دهانی از یک فرد به فرد دیگر منتقل می شود[۷]. *سالمونلا تیفی*، باکتری هایی کوچک، گرم منفی و میله ای شکل هستند که به شکل هاگ در نمی آیند. این میکروب به طور وسیع بوسیله انسان و حیوانات که منشأ اولیه این میکروب هستند در طبیعت پراکنده می گردد.مسمومیت غذایی سالمونلایی با علائمی نظیر تب، سردرد، درد عمومی و همچنین بوسیله اسهال و استفراغ همراه است[۸]. *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده بیماری و جز فلور طبیعی بدن است که موجب عفونت در زیر بغل، واژن و ناخن دست و پا می گردد. چهارمین عامل شایع عفونت های بیمارستانی است که معمولا به دنبال آلودگی ابزارها و تجهیزات پزشکی ایجاد می شود[۹]. *آسپرژیلوس نیجر* به طور گسترده در طبیعت پراکنده شده و قادر به تکثیر در بدن انسان به عنوان یک مهاجم فرصت طلب بوده است، این قارچ در ایجاد اوتیت گوش خارجی و اندوفتالمیت موثر است. در مواردی چون تزریق نامناسب دارویی، اندوکاردیت و در افراد با عضو پیوندی به وجود می آید[۱۰]. لذا هدف از این پژوهش در وهله نخست استخراج عصاره اتانولی میوه سپستان به کمک فراصوت و دستیابی به شرایط بهینه استخراج با تعیین مقادیر بهینه فاکتورهای آزمایش توسط روش سطح پاسخ و نهایتاً ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی تیمار بهینه علیه برخی از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت در صنایع غذایی مانند *Staphylococcus aureus* PTCC1112، *Bacillus cereus*PTCC 1247، *Escherichiacoli*PTCC 1330، *Salmonella typhi*

1. Boraginaceae

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

*Aspergillusniger*PTCC 5021 ،PTCC 1609و *Candida albicans* PTCC 5027 بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

سویه های میکروبی مورد استفاده در این مطالعه شامل *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Bacillus cereus* PTCC1247، *Escherichia coli* PTCC 1330، *Salmonella typhi* PTCC 1609، *Aspergillus niger* ، PTCC 5021 و *Candida albicans* PTCC 5027 بودند که توسط دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد اهدا گردید. میوه سپستان از مناطق بومی شهرستان کهنوج واقع در استان کرمان تهیه شد. به لحاظ تاکسونومیکی[2] این گیاه دارویی در بخش بیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی و تایید گردید.

۲-۲- روش‌ها

پس از حذف هسته، میوه تازه در شرایط مناسب و به دور از آفتاب خشک شد، سپس توسط آسیاب آزمایشگاهی مدل(WARING ساخت آلمان) به پودر تبدیل گردید.

۲-۲-۱- چگونگی تهیه عصاره

با توزین ۵۰ گرم نمونه سپستان و اختلاط آن با ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول۹۶٪ (رعایت نسبت ۱:۱۰) ارلن حاوی مخلوط نمونه و حلال درون حمام فراصوت (فرکانس ۲۵ کیلوهرتز و توان ۵۰۰ وات) با توجه به تیمارهای مختلف دما، زمان و شدت‌صوت قرار داده شد تا فرآیند عصاره‌گیری سپری شود، به منظور حذف ناخالصی‌ها وذرات معلق پس از عمل فیلتراسیون از سانتریفیوژ با دور g × ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد تا در نهایت عصاره خام میوه سپستان بدست آید. در این نوع از فرایند استخراج، از متدولوژی سطح پاسخ[3] که مجموعه ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است برای بهینه‌سازی فرایند و همچنین بررسی ارتباط بین یک یا چند متغیر پاسخ استفاده شد. یک طرح مرکب مرکزی سه فاکتوره انتخاب شد تا اثر ترکیبی سه متغیر مستقل را ارزیابی کند، زمان (۴۰-۵ دقیقه)، دما (۵۰-۲۰درجه سانتی‌گراد) و شدت صوت (۱۰۰-۲۰ درصد) که به ترتیب به صورت X_1 ، X_2و X_3 کدگذاری شدند[۱۱].

۲-۲-۲- تعیین درصد استخراج عصاره اتانولی

برای تعیین وزن خشک عصاره‌اتانولی میوه سپستان ابتدا وزن یک پلیت آزمایشگاهی خالی تعیین شد، سپس یک میلی‌لیتر عصاره اتانولی درون پلیت ریخته و در دمای اتاق نگهداری شد تا کاملا خشک شود. پس از این مدت وزن پلیت حاوی عصاره خشک شده یادداشت و از وزن پلیت خالی کسر گردید، میانگین سه بار تکرار به عنوان وزن خشک و یا درصد استخراج عصاره در نظر - گرفته شد[۱۲].

۲-۲-۳- فعال‌سازی سوسپانسیون‌های میکروبی

سوش‌های قارچی در شرایط استریل به محیط کشت مایع تریپتون سویا (مرک آلمان) انتقال یافتند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند، سپس از محیط کشت ۴۸ ساعته بر روی محیط کشت سابرود دکستروز آگار (مرک آلمان) حاوی ۵ درصد کلرامفنیکل کشت خطی به عمل آمد و مجددا در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا به عنوان منبع قارچی مورد استفاده قرارگیرند. برای تهیه سوسپانسیون قارچی از کشت ۴۸ ساعته سوسپانسیونی در محلول نمکی استریل که در هر میلی‌لیتر حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$CFU/ml قارچ بود، با استفاده از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد (جلالی، ۲۰۰۷). در مورد سوش های باکتریایی نیز باکتری‌ها در شرایط استریل به محیط کشت مایع مولر هینتون (مرک آلمان) انتقال یافتند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط‌های مورب و همچنین بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت خطی انجام داده شد و در گرم‌خانه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شدند تا به عنوان منبع باکتری مورد استفاده

2. Taxonomically
3. Response Surface Methodology

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

قرار گیرند و همانند تهیه سوسپانسیون قارچی، سوسپانسیون باکتریایی ایجاد شد [۱۳].

۲-۲-٤- تکنیک‌های ارزیابی اثر ضدمیکروبی

۲-۲-٤-۱- کشت آمیخته

در روش کشت آمیخته، ۰/۲ گرم عصاره اتانولی به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و به منظور یکنواخت شدن، با دستگاه ورتکس هم‌زده شدند، سپس یک میلی‌لیتر از این محلول به پتری‌های استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتررسید. در مرحله بعد محیط کشت استریل سابرود دکستروز آگار (قارچ‌ها) و مولر هینتون آگار (باکتری‌ها) به پتری‌ها اضافه شده و در دمای اتاق زیر هود لامینار قرار گرفت، تا اینکه محیط کشت‌ها ببندد. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به مدت ٤٨ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (قارچ) و ٢٤ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (باکتری) قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون میکروب نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید[١٤].

۲-۲-٤-۲- دیسک- پلیت

با قرار دادن ٦ دیسک در اطراف و یک دیسک در مرکز پلیت استریل به عنوان شاهد منفی (حلال اتانول ٩٦ درصد) و در دیسک‌های محیطی به ترتیب شش غلظت از عصاره مورد نظر (١٠ ، ٢٠ ، ٣٠ ، ٤٠ ، ٥٠ و ٦٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزوده و سپس پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون‌آگار در حرارت ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت (باکتری) و پلیت‌های حاوی محیط کشت سابرود دکستروز آگار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت (قارچ) گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی مدت انکوباسیون، منطقه بازدارندگی یا عدم رشد[4] در محیط اطراف دیسک‌ها با در نظر گرفتن قطر دیسک (٦mm) توسط خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متری گزارش شد. قابل ذکر است که اثر ضدمیکروبی عصاره بر روی هر سوش در سه تکرار انجام شد[١٥].

4. Inhibition Zone

۲-۲-٤-۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی

با استفاده از روش رقت- لوله[5] حداقل غلظت مهار کنندگی[6] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی[7](MBCو[8]MFC) عصاره اتانولی میوه سپستان تعیین شد. برای تعیین MIC از لوله‌های آزمایش که هر کدام به صورت مجزا حاوی غلظت‌های مختلفی از عصاره بودند، استفاده گردید. پس از تلقیح ١٠٠µl از سوسپانسیون میکروبی به درون لوله‌ها و انجام تمامی مراحل کشت، لوله‌های آزمایش به مدت ٤٨ ساعت در ۲۵ درجه سانتی-گراد (برای قارچ) و به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (برای باکتری) گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه-گذاری لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد گونه‌های قارچی و باکتریایی با لوله کنترل مقایسه و نتایج ثبت شدند. در ادامه به منظور تعیین MFC و MBCاز غلظت‌های دو یا چهار برابر غلظت‌هایی که به عنوان MIC در نظر گرفته شده بود استفاده گردید و در نهایت از لوله‌هایی که فاقد کدورت بود کشت آمیخته به عمل آمد و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت (قارچ) و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت (باکتری) گرم‌خانه‌گذاری شدند، پس از این مدت پلیتی که دارای کمترین غلظت عصاره بود و در آن قارچ یا باکتری رشد نکرده بود به عنوان MFC و MBC در نظر گرفته شد[١٦ و ١٧].

۲-۳- طراحی آزمایش و آنالیز و تحلیل آماری

از آنجا که یکی از اهداف پژوهش، بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای شدت صوت، دما و زمان استخراج در فرایند استخراج عصاره اتانولی و راندمان استخراج بود، طرح آماری رویه سطح- پاسخ انتخاب شد(جدول۱). از این رو نخست بر اساس تعداد فاکتورها و سطوح آن‌ها مطابق جدول۲، شرایط ۲۰ استخراج معین شد و سپس آزمایش‌ها تصادفی انجام شدند. ٦ تکرار نقطه مرکزی جهت تعیین خطای آزمایش منظور گردید.

5. Broth macro dilution
6. Minimum Inhibition Concentration
7. Minimum Bactericide Concentration
8. Minimum Fungicide Concentration

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۱ نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن ها

متغیر مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		+۱	۰	−۱
زمان	X_1	٤۰	۲۲/۵	۵
دما	X_2	۵۰	۳۵	۲۰
شدت صوت	X_3	۱۰۰	٦۰	۲۰

میانگین درصد استحصال (وزن‌خشک) عصاره اتانولی بدست آمده از دو مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) درنظرگرفته شد، در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌کند. مدل چندمتغیره به صورت زیر می‌باشد.

$$Y= \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

در معادله‌ی مذکور Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_1 ، β_2، β_3 اثرات خطی، β_{11} ، β_{22} ، β_{33} اثر مربعات و β_{12} ، β_{13}، β_{23}اثرات متقابل بوده و به منظور تجزیه و تحلیل و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار Design-Expert v.6استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی و همچنین مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS 16 و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده و اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان $p \leq ۰/۰۵$ درصد انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش-یافته برای عصاره اتانولی

به منظور حصول مدل‌های تجربی برای پیش بینی پاسخ، رابطه-های خطی و چند جمله‌ای درجه‌دوم بر داده‌های بدست‌آمده از آزمایش‌ها برازش شدند. سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفته تامدل مناسب گزینش گردد.

جدول ۲ تیمارهای حاصل از طرح سطح پاسخ(RSM) در استخراج با کمک فراصوت

تیمار	شدت صوت (٪)	دما (C̊)	زمان (دقیقه)	تیمار	شدت صوت (٪)	دما (C̊)	زمان (دقیقه)
۱	۲۰	۲۰	۵	۱۱	٦۰	۲۰	۲۲ /۵
۲	۲۰	۲۰	٤۰	۱۲	٦۰	۵۰	۲۲ /۵
۳	۲۰	۵۰	۵	۱۳	۲۰	۳۵	۲۲ /۵
٤	۲۰	۵۰	٤۰	۱٤	۱۰۰	۳۵	۲۲ /۵
۵	۱۰۰	۲۰	۵	۱۵	٦۰	۳۵	۲۲ /۵
٦	۱۰۰	۲۰	٤۰	۱٦	٦۰	۳۵	۲۲ /۵
۷	۱۰۰	۵۰	۵	۱۷	٦۰	۳۵	۲۲ /۵
۸	۱۰۰	۵۰	٤۰	۱۸	٦۰	۳۵	۲۲ /۵
۹	٦۰	۳۵	۵	۱۹	٦۰	۳۵	۲۲ /۵
۱۰	٦۰	۳۵	٤۰	۲۰	٦۰	۳۵	۲۲ /۵

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون ضعف برازش (Lack of fit) آن معنی‌دار نبوده، دارای بالاترین مقدار $R^2_{adjusted}$ و $R^2_{predicted}$ باشد. نتایج آزمون ضعف برازش و ارزیابی صحت مدل‌های برازش شده به منظور گزینش بهترین مدل برای استخراج بیشینه‌ی عصاره اتانولی از میوه سپستان به ترتیب در جداول ۳ و ٤ آورده شده است. مطابق جدول ۳، آزمون ضعف برازش مربوط به مدل برازش یافته (چند جمله‌ای درجه دوم) بر پاسخ معنی‌دار نبوده، همچنین در جدول ٤، مدل چند-جمله‌ای درجه‌دوم به دلیل دارابودن مقادیر بالای R^2 ، $R^2_{adjusted}$ و $R^2_{predicted}$در برازش داده‌ها، توان بیشتری را دارا بود.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، مدل درجه‌دوم چند جمله‌ای برای راندمان استخراج عصاره اتانولی از نظر آماری معنی‌دار است (P≤۰/۰۰۱). سایر عبارت‌های معنی‌دار مدل شامل زمان، دما، شدت صوت و همچنین برهم‌کنش زمان – شدت صوت و دما – شدت صوت بودند لذا فاکتورهای بی معنی از مدل حذف شدند.

جدول ۳ نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم برای راندمان عصاره اتانولی از میوه سپستان

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزشP
مدل درجه دوم	۷/۸۰	۹	۰/۸۷	۲۱/۰۸	۰/۰۰۰۱
زمان(X_1)	۳/۹۷	۱	۳/۹۷	۹٦/۵۰	۰/۰۰۰۱
دما(X_2)	۰/٦۳	۱	۰/٦۳	۱۵/۲٤	۰/۰۰۳
شدت صوت (X_3)	۱/۸۵	۱	۱/۸۵	٤٤/۹٦	۰/۰۰۰۱
X_1X_2	۰/۱۸	۱	۰/۱۸	٤/۳٦	۰/۰٦۳۳
X_1X_3	۰/۳۳	۱	۰/۳۳	۷/۹٤	۰/۰۱۸۲
X_2X_3	۰/۳۳	۱	۰/۳۳	۷/۹٤	۰/۰۱۸۲
X_1^2	۰/۱۲	۱	۰/۱۲	۳/۰٤	۰/۱۱۱۹
X_2^2	۰/۰٤۵	۱	۰/۰٤۵	۱/۰۹	۰/۳۲۰۲
X_3^2	۰/۰۲۰	۱	۰/۰۲۰	۰/٤۹	۰/۵۰۱۵
باقی مانده	۰/٤۱	۱۰	۰/۰٤۱		
خطای خالص	۰/۰۸۸	۵	۰/۰۱۸		
عدم برازش	۰/۳۲	۵	۰/۰٦۵	۳/٦٦	۰/۰۹۰٦

جدول ٤ نتایج آنالیز آماری مدل برازش یافته بر پاسخ

Source	R-Squared	Adj R-Squared	Pred R-Squared	PRESS
درجه دوم	۰/۹٤۹۹	۰/۹۰٤۹	۰/۷۹٤۹	۱/٦۸

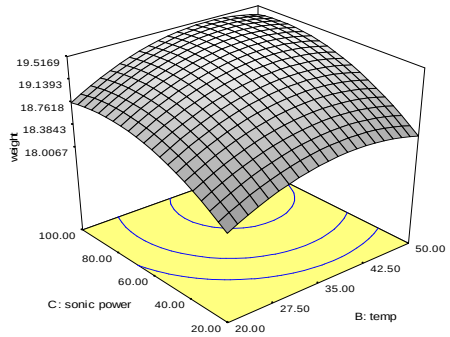
بر اساس شکل۱ تا زمان ۲۲/۵ دقیقه روند محسوسی در درصد استخراج عصاره اتانولی مشاهده نگردید در حالی‌که از آن پس تا ٤۰ دقیقه فاکتور متغیر (پاسخ) افزایش یافته است. توجه به این نکته ضروری است که زمان استخراج ممکن است بسته به ماهیت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

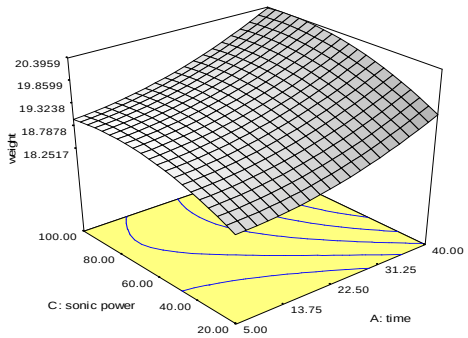
و خواص بیولوژیکی مواد گیاهی متفاوت باشد. اختلاف در زمان استخراج فراصوت در بین مواد گیاهی ممکن است به اختلاف در دسترس پذیری و نوع اجزای قابل استخراج نسبت داده شود که ناشی از ترکیب شیمیایی متفاوت مواد گیاهی است[۱۸]. همچنین مشاهده شد با افزایش شدت صوت تا ۸۰ درصد، نرخ استخراج افزایش ولی از آن به بعد تا ۱۰۰ درصد نمایش درصد استحصال به صورت ثابت پیش رفته است. ژی و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر مثبت شدت صوت بر راندمان استخراج را به علت حفره‌زایی[۹] و شکستن بافت‌ها و دیواره سلول‌های گیاهی در اثر ارتعاشات صوتی که منجر به خروج بهتر و بیشتر محتویات سلولی می‌شود، می‌دانند[۱۹].

تاثیر فاکتور دما- شدت صوت بر راندمان وزن خشک عصاره اتانولی به صورت لگاریتمی و درجه دوم است به این صورت که با افزایش دما تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغییر قابل توجهی در درصد استخراج مشاهده شد ولی با افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، نرخ استخراج کاهش یافت. ذکر این نکته ضروری است که افزایش بازده در اثر افزایش دما احتمالا به دلیل بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت ترکیبات موثر در استخراج عصاره اتانولی و کاهش ویسکوزیته‌ی حلال است و روند ثابت دما در این مطالعه پس از ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند در اثر افزایش یا شروع فرایند تجزیه حرارتی و یا افزایش دپلیمریزاسیون ترکیبات قندی موجود در میوه سپستان به قندهای آزاد در اثر افزایش دما باشد. علاوه بر آن افزایش دمای استخراج می‌تواند منجر به شتابدهی تبخیر حلال و افزایش هزینه های تامین انرژی و تقویت استخراج ناخالصی‌ها شود[۲۰]. کاکاکه و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که افزایش دما سبب افزایش استخراج آنتوسیانین از انگور سیاه شده است. این محققان دلیل این امر را اثر دما روی افزایش حلالیت و افزایش ضریب نفوذ می دانستند[۱۷].

9. Cavitation



الف)



ب)

شکل ۱ نمودار سطح پاسخ بازده استخراج عصاره اتانولی از میوه سپستان، برهم‌کنش‌های بین متغیرها در استخراج عصاره اتانولی از میوه سپستان با استفاده از استخراج با کمک فراصوت: الف) برهم‌کنش بین شدت صوت و زمان استخراج; ب) برهم‌کنش بین شدت‌صوت و دما استخراج

۳-۲- بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره اتانولی از میوه سپستان

با به‌کارگیری روش آماری سطح-پاسخ، معادله‌ی زیر که نشان-دهنده‌ی ارتباط تجربی میان راندمان استخراج عصاره اتانولی و متغیرهای آزمایش به صورت کدگذاری شده است، بدست آمد.

$$Y= ۱۹/۳۳+۰/۶۳X_1+۰/۲۵X_2+۰/۴۳X_3+۰/۷۵X_1 X_3+۰/۰۵X_2 X_3$$

با استفاده از نمودارهای سه بعدی سطح - پاسخ، مقادیر بهینه متغیرهای مورد آزمون فرآیند استخراج با کمک فراصوت را برای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

بدست آوردن بالاترین راندمان می‌توان پیش بینی کرد: زمان استخراج ۳۹/۸۷ دقیقه، دما ٤۲/۲٤ درجه سانتی‌گراد و شدت صوت ۹٤/٤٦ درصد. تحت شرایط بهینه فوق، مدل پاسخ ماکزیممی برابر با ۸/۵ گرم را ارائه کرد. پس از اصلاح و تغییر متغیرهای آزمایش، با استفاده از شرایط بهینه‌ی اصلاح شده راندمان استخراج عصاره اتانولی اندازه گیری شد و مقدار بیشینه‌ی ۹/۱±۰/٤ گرم بدست آمد.

از میان فاکتورهای آزمایش، زمان اثر معنی دارتری بر مقدار پاسخ داشت و به طور کلی ترتیب میزان اثر گذاری سه متغیر مورد بررسی بر افزایش راندمان استخراج عصاره اتانولی از میوه سپستان به صورت زمان> شدت صوت> دما بود.

جدول۵ اثر ضدمیکروبی غلظت ۲mg/ml عصاره اتانولی تیمار بهینه

عصاره اتانولی	سویه های میکروبی
S	*Aspergillus niger*
S	*Candida albicans*
S	*Staphylococcus aureus*
S	*Bacillus cereus*
S	*Escherichia coli*
R	*Salmonella typhi*

S: Sensitive R: Resistance

۳-۳- نتایج اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی میوه سپستان

پس از یافتن تیمار بهینه، بررسی های ضد میکروبی روی عصاره بدست آمده از تیمار بهینه با کمک فراصوت اعمال گردید که نتایج در ذیل آورده شده است. نتایج ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره به روش کشت آمیخته در جدول۵ ارائه شده است عصاره اتانولی در غلظت ۲mg/ml علیه تمامی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به جز *Salmonella typhi* مناسب عمل کرده و از رشد آن‌ها ممانعت نموده است.

جدول ٦ میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم ها در حضور عصاره اتانولی میوه سپستان (روش انتشار دیسک در آگار)

عصاره اتانولی	میکروارگانیسم	غلظت های عصاره اتانولی میوه سپستان (میلی گرم بر میلی لیتر)					
		۱۰	۲۰	۳۰	٤۰	۵۰	٦۰
	A.niger	–	۷/۳±۰/۱۷^{a}	۹/۹ ±۰/٤ ^{b}	۱۰/۵ ±۰/۳۲ ^{c}	۱۲/۲ ±۰/۲ ^{d}	۱۳/۸ ±۰/٤ ^{e}
	C.albicans	۱۰ ±۰/۳۵ ^{a}	۱۱/۹ ±۰/۱۵^{b}	۱۳/۸ ±۰/٤^{c}	۱۵ ±۰/۲^{d}	۱٦/۷±۰/۳٦^{e}	۱۹/۱ ±۰/۱۱^{f}
	S.aureus	۹/۱ ±۰/۳۵^{a}	۱۱/۳ ±۰/۲^{b}	۱۲/۳ ±۰/ ^{c}	۱۵/٦ ±۰/۳ ^{d}	۱٦/۷±۰/۲٦^{e}	۱۸/۷ ±۰/۳۵^{f}
	B.cereus	۱۱/۷±۰/۳٦^{a}	۱۳/۱± ۰/٦^{b}	۱٤/۸±۰/٤^{c}	۱٦/۱± ۰/٤^{d}	۱۸/٤±۰/۱۵^{e}	۲۰/۳±۰/۷٦^{f}
	E.coli	۷/۵٦±۰/۵^{a}	۹±۰/۱۱^{b}	۱۰/۸۳±۰/۳۲^{c}	۱۲/۱±۰/۲٦^{d}	۱۳/۸±۰/۳^{e}	۱٦/۲±۰/٤۵^{f}
	S.typhi	–	۷/۱±۰/۵۵^{a}	۸/٦±۰/۲۵^{b}	۱۰/۲±۰/۱۱^{c}	۱۱/۱±۰/۳^{d}	۱۲/۳ ±۰/۳^{e}

* علامت (–) نشان دهنده‌ی عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌اتانولی میوه سپستان می باشد.

* حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.

* واحد اندازه گیری قطر هاله عدم رشد میلی‌متر است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

داده های حاصل از روش انتشار دیسک در آگار نشان داد که عصاره اتانولی در غلظت ۱۰mg/mlقادر به مهار رشد دو سویه-ی *Aspergillus niger* و *Salmonella typhi* نبوده و قطر هاله‌ای را اطراف دیسک های عصاره ایجاد ننموده است، در حالی‌که در تمامی غلظت‌ها علیه چهار سویه‌ی باکتریایی و قارچی دیگر موثر عمل کرده و با ایجاد قطر هاله‌ای در اطراف دیسک‌ها مانع از رشد آنها شده است.در یک بررسی آزمایشگاهی که توسط احمد و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد، فعالیت ضدقارچی قوی روغن اسانسی میخک علیه گونه‌های قارچی مختلفی بررسی و دیده شد که اثر روغن اسانس میخک بر گونه *Candida albicans* چشمگیر بود. نتیجه بدست آمده مشابه نتیجه‌ای بود که از مطالعه ما بدست آمد[۲۱]. هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر که استانیساو و همکاران (۲۰۰۹) به ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره‌های تهیه شده با کمک فراصوت و به روش کلاسیک از گیاه *Echinacea purpurea L.* پرداختند، مشخص شد که در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دو نوع عصاره ایجاد شده با کمک فراصوت و به روش کلاسیک، قطر هاله بازداری برای گونه *Candida albicans* ATCC ۱۰۲۳۱ به ترتیب ۱۸/۲±۰/۳و ۲۱±۰/۱میلی متر شد، در حالی‌که در همین غلظت بر گونه *Aspergillus niger* ATCC ۱٦٤۰٤ اثر بازدارندگی نداشت و هیچ‌گونه هاله‌ای ایجاد نشد[۲۲].نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی به روش انتشار دیسک در آگار نشان داد با افزایش غلظت عصاره اتانولی و به تبع آن افزایش غلظت مواد موثره، بر اندازه قطر هاله بازدارندگی افزوده شد. همچنین یافته های حاصل از بررسی اختلاف بین میانگین‌ها، نشان از تفاوت معنی‌دار بین میانگین قطر هاله بازداری دارد به این صورت که می‌توان نتیجه گرفت با افزایش غلظت عصاره اتانولی، قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند.

جدول ۷ نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره اتانولی میوه سپستان علیه میکروارگانیسم های آزمایش

عصاره اتانولی	میکروارگانیسم	غلظت‌های به کار رفته از عصاره‌های میوه سپستان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)						
		۲	٤	۸	۱٦	۳۲	٦٤	کنترل
	A.niger	–	–	–	–	+	+	–
	C.albicans	–	+	+	+	+	+	–
	S.aureus	–	–	+	+	+	+	–
	B.cereus	–	+	+	+	+	+	–
	E.coli	–	–	+	+	+	+	–
	S.typhi	–	–	–	–	+	+	–

+ : عدم رشد – : رشد

جدول ۸ نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC , MFC) عصاره اتانولی بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

عصاره اتانولی	میکروارگانیسم	غلظت‌های به کار رفته عصاره اتانولی سپستان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)								
		۲	٤	۸	۱٦	۳۲	٦٤	۱۲۸	۲٥٦	کنترل
	A.niger	–	–	–	–	–	–	+	+	–
	C.albicans	–	–	–	–	+	+	+	+	–
	S.aureus	–	–	–	–	+	+	+	+	–
	B.cereus	–	–	–	+	+	+	+	+	–
	E.coli	–	–	–	–	–	+	+	+	–
	S.typhi	–	–	–	–	–	–	+	+	–

+ : عدم رشد – : رشد

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

نتایج حاصل از جداول فوق نشان داد که اثر ضدمیکروبی تا حدودی بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود. همچنین مشخص شد که سویه های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* در مقایسه با سوش‌های گرم‌منفی *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* از حساسیت بیشتری در برابر عصاره های مورد استفاده برخوردار بودند و در غلظت کمتری از عصاره اتانولی میوه سپستان رشد آن‌ها متوقف شد. اساسا باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به عصاره میوه سپستان از خود نشان دادند، علت آن را می توان به اختلاف ساختمانی دیواره باکتری‌های گرم مثبت و منفی نسبت داد. ناریا و همکاران (۲۰۱۱) طی انجام مطالعه‌ای بر روی فعالیت ضدمیکروبی پوست درخت *C.dichotoma*(از انواع گونه‌های Cordia) علیه تعدادی از قارچ‌ها و باکتری‌های گرم منفی و مثبت، قطر هاله بازداری قابل توجهی برای باکتری‌ها و قارچ‌ها گزارش کردند[۲۳]. نتایج نشان داد که بالاترین میانگین قطر هاله‌ی بازداری در سطح معنی‌دار $p\leq$ ۰/۰۵ مربوط به سویه‌های گرم-مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* است. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که در سطح $p\leq$ ۰/۰۵ قطر هاله عدم رشد به طور معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره، افزایش می‌یابد. همچنین یافته ها نشان دادند که باکتری های گرم منفی و به طور ویژه *Salmonella typhi* بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره اتانولی دارا بودند به طوریکه *Salmonella typhi* در غلظت‌های بالاتری از عصاره اتانولی مهار و از رشد آن ممانعت شد.همچنین *Aspergillus niger* نسبت به اثر ضد-قارچی عصاره اتانولی میوه سپستان مقاوم‌تراز *Candida albicans* بود.در مطالعه‌ای سدابی (۲۰۰٦) گزارش کرد که حساسیت بیشتر *Candida albicans* می‌تواند به علت متفاوت بودن درصد ترکیبات و نوع ترکیبات دیواره سلولی و غشای قارچی و فاکتورهای ویرولانسی مربوط باشد که احتمالا در *Candida albicans* به مراتب کمتر از *Aspergillus niger* می‌باشد[۲٤].

۳-٤- بررسی حساسیت میکروارگانیسم‌ها به آنتی بیوتیک‌های تجاری

نتایج مربوط به تاثیر چهار آنتی‌بیوتیک رایج بر میزان هاله عدم رشد بر دو باکتری گرم‌منفی و دو باکتری گرم‌مثبت آورده شده است (جدول ۹).

جدول ۹ میانگین قطر هاله بازداری ایجاد شده با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری

باکتری	آنتی بیوتیک			
	ونکومایسین	استرپتومایسین	آمپی سیلین	پنی سیلین
S.aureus	۱۹/۸۵±۰/۳۵	۱۹/۰۳±۰/۲۵	۳۱/۲ ±۰/۲۱	۲۸ /۲٦±۰/۲۵
B.cereus	۲۰/۳٦±۰/٤	۱۹/۱٦±۰/۲	۲٦/٤±۰/٤	۲۸/٦±۰/٦۵
E.coli	۱٦/۰۱±۰/۱۷	۱۷/۰٤±۰/۲٤	۲۰/٦٦±/۳۳	۱۷/۹۱±۰/۳
S.typhi	۱۸/۹۳ ±۰/۳	۱۷/۹۸±۰/۱۲٦	۲۸/۲۳±۰/۷۵	۱۸/۲۳±۰/۲۵

*واحد اندازه گیری قطر هاله عدم رشد میلی متر می باشد.

مقایسه نتایج میان اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی میوه سپستان در برابر چهار آنتی‌بیوتیک رایج درمانی در این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی بر *Bacillus cereus* در بالاترین غلظت حداکثر بود و این میزان بازدارندگی از دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و پنی-سیلین کمتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی بر روی باکتری‌های گرم‌منفی *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* در مقایسه با همه آنتی‌بیوتیک‌های رایج اثر ضدمیکروبی کمتری داشت. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر موجب شده است که باکتری‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌های رایج از گروه‌های مختلف مقاوم شوند به طوری‌که در حال حاضر وجود سویه‌هایی با مقاومت چندگانه نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مشکل اصلی در درمان میکروارگانیسم‌های عامل

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

عفونت و مسمومیت می‌باشد. طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱٤) در مطالعه‌ای نیز بیان کردند که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه چویل (*Ferulago angulate*) بر *Staphylococcus epidermidis* در بالاترین غلظت حداکثر بود این میزان ۱۷/٦۰±۰/۵ از تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به جز آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشتر بود. همچنین تاثیر عصاره اتانولی بر باکتری *enterobacter aeroginosae* در مقایسه با همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر بود[۲۵]. از سویی تاثیر کمتر عصاره ها و اسانس‌های گیاهی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی شیمیایی به علت ترکیب شیمیایی پیچیده و عدم وجود یک ترکیب خالص درمانی می‌باشد، در حالی‌که آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی ساختمان و ترکیب مشخصی دارند که تاثیرگذاری بیشتر آنها را علیه میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت باعث می‌شود.

٤- نتیجه گیری

عصاره اتانولی حاصل از تیمار بهینه به علت راندمان استخراج بالاتر و احتمالا بالا بودن درصد ترکیبات بازدارنده، دارای اثر ضدمیکروبی قابل توجهی علیه میکروارگانیسم‌های آزمایش بود. در تمامی روش های مورد استفاده دو سویه باکتریایی *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus* و سویه قارچی *Candida albicans* نسبت به تاثیر ضدمیکروبی عصاره اتانولی حساسیت بیشتری را نشان دادند.

۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات جناب آقای مهندس بهروز علیزاده بهبهانی که در انجام آزمایش ها ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود. مقاله علمی - پژوهشی حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت موادغذایی و مدل‌سازی سنتیکی رشد *Bacillus cereus* تحت تاثیر دما و غلظت با کد ۳۰۰۳۷ در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

۵- منابع

[1] Mitscher, L. A., Drake, S., Golloapudi, S. R., Okwute, S. K. 1987. A modern look at folkloric use of anti infective agents. *Journal of National Product*, 50(6): 1025-1040.

[2] Kermanshahi, R. H., Moattar, F., Soleimanimanesh. A. R. 2006. Antibacterial effects of *Carthamus tinctorius* alcoholic and aqueous extracts on number of bacteria. *SCUJ*, 15:18-26 [Persian]

[3] Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. 2013. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of Cordia dichotoma (Indian cherry): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. (12):1009-12.

[4] Amin GH R. 2005. Most common traditional medicinal plants of Iran . *MSJT*, P:184 [Persian]

[5] Larki S, Bolouki A, Khandan S, Najafzade-varzi H. 2008. Comparision extract effect of *Cordia myxa* and *Ziziphus spina-christii* on induced seizures of Stricknin in rat. *15th Iran Veterinary Congress*.[Persian]

[6] Okusa P, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P.2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gilletii De Wild* (Boraginaceae). *Journal of ethnopharmacology*. 112(3):476-81.

[7] Safavi F, Ebrahimi P, Mighani H. 2013. *In vitro* antibacterial activity of root and aerial parts of *Scrophularia striata bioss* on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *YUMSJ* 18(8): 603-614.[Persian]

[8] Jay, M.J., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2000. Modern Food Microbiology. Seventh Ed. New York.

[9] Emami S, Foroumadi A, Falahati M, Lotfali E, Rajabalian S, Ebrahimi S-A, et al. 2008. 2-Hydroxyphenacyl azoles and related azolium derivatives as antifungal agents. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 18(1):141-6.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[10] Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J, Van Dijck P. 2002. On the safety of Aspergillus niger–a review. Applied microbiology and biotechnology. 59(4-5):426-35

[11] Heydari Majd, M., Rajaei, A., Salar Bashi, D., Mortazavi, A., Bolourian, Sh. 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomidoschema parviflorum*) leaves using Response Surface Methodology. *Industerial crops and products*, 57: 195-202.

[12] Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM. 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensisL*. *Journalof Paramed Sciences*. 4(3).89-99

[13] Jalali M, Abedi D, Asghari G, Rezaie Z. 2007. A study of anti-microbial effect of *pycnocycla spinosa's* fruit extracts. *MMUJ*. 17(59):76-86. [Persian]

[14] Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. 2004. The antimicrobial activities of methanoli extracts of *Eucalyptuscamaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms.16(2):106-111

[15] Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., Cañigueral, S,. 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 76(1):93-8.

[16] Moshafi MH, Mehrabani M, Zolhasab H. 2004. Antibacterial activity studies of Salvia Mirzayanii and Salvia Atropatana against six standard gram-positive and gram-negative bacteria. *KMUJ*. 11(2):109-18. [Persian]

[17] Cacace, J.E., Maza, G. 2003. Optimization of extraction of antocyanins from black Currant with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68: 240-248

[18] Wang, Y. J., Cheng, Z., Mao, J. W., Fan, M. G., & Wu, X. Q. (2009). Optimizationof ultrasonic-assisted extraction process of Poria cocos polysaccharides byresponse surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 713–717..

[19] Xie, X.H., Shen. M.U., Xie. M.U., Nie. Sh.P., Chen, Y., Li. C., Huang. D.F., Wang, Y.X. 2012.Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. *Carbogydrate Polymers*, 89: 177-184

[20] Li, Jin-wei., dong Ding, Shao, Xiao-lin Ding. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction ofpolysaccharides from Zizyphus jujuba cv. Jinsixiaozao.*Journal of Food Engineering*, 80: 176–183

[21] Ahmad, N., Alam, M.K., Shehbaz, A. Khan. A, Mannan, A., Hakim, S.R, et al. 2005. Antimicrobial activity of *Clue* oil and it's potential in the treatment of Vaginal Candidiasis. *Journal Drug Target*, 13(10): 555-561

[22] Stanisavljevic I , Stojicevic S , Velickovic D , Veljkovic V , Lazic M . 2009. Antioxidant and antimicrobial activity of *Echinocea purpurea L*. extracts obtained by classical and ultrasound extraction. Chinese Journal of Chemical Engineering. 17(3):478-483

[23] Nariya, P.B., Bhalodia, N.R., Shukla, V., Acharya, R.2011. Antimicrobial and antifungal activities of *Cordia dichotoma* (Forster F.) bark extracts. *Ayu*, 32(4):585-9

[24] Saadabi AM. 2006. Antifungal activity of some Saudi plants used in traditional medicine. Asian J Plant Sci.5(5):907-9

[25] Tabatabaee Yazdi F., Alizadeh Behbahani B., Heidari Soureshjani M. 2014. Comparision of antimicrobial effect *Ferulago angulate* extract by some of synthetic antibiotics in vitro. *Arak Medical Science Journal*.17(84): 35-46.[Persian]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Efficiency of response surface methodology to optimization ethanolic extract from *Cordia myxa* and evaluation of antimicrobial activity of extract against a number of pathogenic microorganisms

Pirnia, M. [1], Edalatian, M. R. [2*], Tabatabaee Yazdi, F. [3], Shahidi, F.[4]

1. M.Sc graduate , Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran,
3. Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 93/8/18 Accepted: 93/10/19)

With emerging of infectious diseases and spread of antibiotic resistant strains, use of antimicrobial compounds with plant origin seems necessary. In this study, ethanolic extract of *Cordia myxa* fruit was used to evaluate antimicrobial effects against microorganisms including *Bacillus cereus*, S*taphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans*. Ultrasound-assisted extraction was performed to investigate three independent variables: time (5- 40 min), temperature (20-50°C) and sonic power (20- 100%). Response surface methodology was also employed to optimize multiple variables to predict the best process conditions. Antimicrobial activity was done by methods including disk diffusion agar, pour-plate, minimum inhibition concentration and minimum bactericide (fungicide) concentration. The results showed that the highest amount of extraction rate of ethanolic extract which was equal to 8.5%, was obtained in extraction time of 39.8 min, temperature of 42.2°C and sonic power of 94.4%.In all above-mentioned methods, inhibitory effect of optimum ethanolic extract was more significant against*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*than other strains ($p \leq 0.05$).

Key words: *Cordia myxa*, Ethanolic extract, Antimicrobial activity, Response surface methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: edalatian@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]