



بررسی ویژگی‌های شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی عصاره رازک بر *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* و *Escherichia coli* و *Enterobacter aerogenes* در شرایط

برون‌تنی

محمد نوشاد^{۱*}، بهروز علیزاده بهبهانی^۲، مصطفی رحمتی جنیدآباد^۳

۱-دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

۲-استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

۳-استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	در این مطالعه، عصاره اتانولی گیاه رازک با استفاده از روش خیساندن تهیه شد. فعالیت ضد میکروبی آن در برابر باکتری‌های پاتوژن (<i>Listeria</i> ، <i>Staphylococcus aureus</i>) مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی گردید. از روش رنگ سنجی معرف فولین-سیوکالتو و کلرید آلومینیوم جهت اندازه‌گیری محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نیز با روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS بررسی گردید. بیشترین کمترین قطر هاله عدم رشد در روش‌های دیسک دیفیوژن (۱۶/۹ میلی‌متر در برابر ۱۲/۵ میلی‌متر) و چاهک آگار (۱۷/۶ میلی‌متر در برابر ۱۳/۹ میلی‌متر) به ترتیب در باکتری‌های <i>S. aureus</i> و <i>E. aerogenes</i> مشاهده شد. باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره اتانولی گیاه رازک حساس‌تر بودند. محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره به ترتیب برابر با ۹۶/۴۷mg GAE/g و ۲۸/۵mg QE/g بود. اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی رازک بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۵۸/۶۳ و ۶۶/۵ درصد اندازه‌گیری گردید. با توجه به نتایج، عصاره اتانولی گیاه رازک را می‌توان بعنوان ترکیب ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و گسترش اکسیداسیون لیپید در انواع محصولات غذایی استفاده نمود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳	
کلمات کلیدی:	
عصاره رازک، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، باکتری پاتوژن، نگهدارنده طبیعی.	
DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143	
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6	
* مسئول مکاتبات: Noshad@asnruk.ac.ir	

۱- مقدمه

ضد قارچی و ضد سرطانی دارد. همچنین این گیاه در کاهش مقاومت انسولین، افزایش حجم شیره معده و خواب آوری نقش داشته و دارای اثرات ضد درد و ضد التهاب می باشد. گیاه رازک در صنایع دارویی و نوشیدنی مانند نوشیدنی و آبجو به عنوان تثبیت کننده کف و طعم دهنده استفاده می شود [۷، ۸]. در پژوهش آلونسو استبان و همکاران [۹] مشخص گردید که عصاره دانه گیاه رازک دارای اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می باشد. همچنین اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی برگ و مخروط رازک گزارش شده است [۱۰]. با توجه به خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی گیاه رازک، در این پژوهش میزان فنول کل، فلاونوئید کل، خاصیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره این گیاه بر روی باکتری های پاتوژن مانند بررسی گردید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش می توان به رادیکال آزاد DPPH، معرف فولین-سیوکالتو، رادیکال آزاد ABTS (شرکت سیگما، آمریکا) و محیط های کشت مولر هیتون آگار و مولر هیتون برات (شرکت مرک، آلمان) نام برد.

۲-۲- جمع آوری گیاه و تهیه عصاره

پس از جمع آوری گیاه رازک، در شرایط مناسب خشک شده و برای عصاره گیری پودر گردید. عصاره اتانولی با استفاده از روش خیساندن تهیه شد. جهت تهیه عصاره، ۱۰۰ گرم از گیاه پودر شده با ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه تحت شرایط همزنی قرار گرفت. سپس مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با شعله کم حرارت داده شد. سوپرناتانت حاصل با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. حجم سوپرناتانت به دست آمده به مقادیر اصلی رسیده و با کاغذ واتمن با قطر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. مخلوط جهت انجام آزمون های مختلف در ظروف در بسته، دور از نور و در یخچال نگهداری شدند [۱۱].

۲-۳- اندازه گیری فنول کل

فنول کل با استفاده از روش فولین-سیوکالچو اندازه گیری گردید. ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالچو و ۱ میلی لیتر سدیم کربنات (۱ مولار) مخلوط

با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی بیوتیک-های متفاوت، به تدریج اثرات مضر این داروها و مقاومت آنتی بیوتیکی افزایش یافته است که این امر منجر به افزایش تمایل به استفاده از گیاهان دارویی شده است. داروهای طبیعی و گیاهان دارویی از جمله مواد مورد استفاده جهت درمان به شمار می آیند و مواد اولیه آن ها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می گیرد و جایگزین مناسبی برای داروهای صنعتی به شمار می آیند [۱]. اساس کاربرد عصاره های گیاهی در نگهداری مواد غذایی، دارویی و آرایشی به دلیل خواص عملکردی آنها مانند فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می باشد که این امر به دلیل وجود طیف وسیعی از ترکیبات فعال بیولوژیکی در آن ها گزارش شده است [۲]. عصاره های گیاهی دارای ترکیبات فنولیک مختلف مانند اسیدهای فنولی، تانن ها و فلاونوئیدها، ترکیبات نیتروژنی از جمله آمینواسیدها، مشتقات کلروفیل، آلکالوئیدها، اسید آسکوربیک و کاروتنوئید می باشند. عصاره های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات مهم، ایمن بودن و با ویژگی های بیولوژیکی مختلف از جمله مانند فعالیت ضد میکروبی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته اند [۳]. در مطالعات مختلف اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره گیاهان مختلف گزارش شده است. برزگر و همکاران [۴] با بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره آبی حنا و خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی این گیاه، آن را به عنوان یک ترکیب زیست فعال طبیعی معرفی کردند. گزارش شده است که غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه کلپوره (*Teucrium polium*) دارای اثر ضد میکروبی در برابر بسیاری از باکتری های عامل فساد مواد غذایی می باشد [۵]. همچنین گزارش شده است که عصاره های آبی و اتانولی برگ اکالیپتوس دارای اثر ضد میکروبی بالایی در برابر باکتری های گرم مثبت می باشد [۶].

گیاه رازک با نام علمی *Humulus lupulus* از خانواده شاهدانه (*Cannabaceae*) می باشد. گیاه رازک در آمریکا و اروپا کشت داده می شود و در ایران نیز در مناطق شمالی رشد می کند. این گیاه حاوی روغن های فرار، ترکیبات پلی-فنولی و فلاونوئیدها، ترکیبات رزینی، پروتئین ها، لیپیدها، اسیدهای چرب، قندها، اسیدهای آمینه و املاح می باشد. گیاه رازک اثرات مختلفی از جمله ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی،

۲-۶- تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره

خاصیت ضد میکروبی عصاره در برابر باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Listeria monocytogenes*) و گرم منفی (*Escherichia coli* و *Enterobacter aerogenes*) با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی ارزیابی گردید.

۲-۶-۱- دیسک دیفیوژن آگار

ابتدا دیسک‌های بلانک استریل به مدت ۲۰ دقیقه در هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌های اتانولی گیاه رازک (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) غوطه‌ور شد. دیسک‌ها پس از کشت هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه روی محیط کشت مولر هیتون آگار تثبیت گردید. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۴].

۲-۶-۲- چاهک آگار

در این روش پس کشت سوسپانسیون‌های میکروبی (معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند) در سطح محیط مولر هیتون آگار، ۶۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شده در محیط کشت ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر یک از چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۵].

۲-۶-۳- اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی

جهت اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی از روش رقت‌سازی در مایع در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی عصاره متانولی رازک (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲)، در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید. دو چاهک آخر که یکی حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بود به عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و عصاره اتانولی بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ میکرولیتر از معرف تری‌فنل‌تترازولیم (۵ درصد) به چاهک‌ها

گردید. پس از ۱ ساعت جذب نمونه در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فنول کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید موجود در هر گرم عصاره (mg GAE/g) گزارش گردید [۱۲].

۲-۴- میزان فلاونوئید کل

۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر با ۱ میلی‌لیتر عصاره مخلوط شد. سپس ۷۵ میکرولیتر محلول نیتريت سدیم به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۶ دقیقه محلول آلو مینوم تری کلراید اضافه شد. پس از ۶ دقیقه ۱ میلی‌لیتر سود به محلول اضافه گردید و جذب نمونه در ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. مقدار فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره (mg QE/g) گزارش گردید [۱۳].

۲-۵- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار رادیکال آزاد ABTS جهت تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تهیه شده استفاده شد.

۲-۵-۱- اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

محلول استوک عصاره گیاهی در اتانول جهت رسیدن به غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۲ میلی‌مولار) مخلوط شد. پس از مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول‌های به کار گرفته شده بدون عصاره به عنوان نمونه کنترل شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [۲]:

= فعالیت مهارکنندگی DPPH (درصد)

$$100 \times (A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{کنترل}}$$

۲-۵-۲- مهار رادیکال آزاد ABTS

رادیکال‌های آزاد ABTS (۷ میلی‌مولار) با افزودن پتاسیم پرسولفات با ۲/۴۵ میلی‌مولار رقیق و در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. محلول کاتیونی رادیکالی ABTS تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره یا اتانول (به عنوان کنترل) به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول کاتیونی رادیکال ABTS اضافه شد. پس از ۶ دقیقه جذب نمونه اندازه‌گیری و فعالیت مهارکنندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید [۳]:

$$100 \times (A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{کنترل}} = \text{فعالیت مهارکنندگی (درصد)}$$

و کوچکترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب در باکتری های *S. aureus* و *E. aerogenes* مشاهده گردید و باکتری های گرم مثبت (*S. aureus* و *L. monocytogenes*) نسبت به انواع گرم منفی (*E. coli* و *E. aerogenes*) در برابر عصاره اتانولی رازک حساس تر بودند.

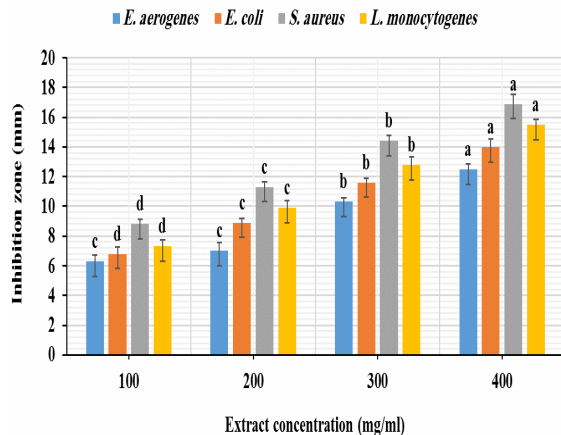


Fig 1 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Humulus lupulus* extract on some microorganism pathogen (disk diffusion agar).

شکل ۲، نتایج اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی رازک در برابر باکتری های پاتوژن بر اساس روش انتشار چاهک آگار را نشان می دهد. روند اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف عصاره مشابه روش دیسک دیفیوژن آگار بود و قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره بطور معنی داری افزایش یافت.

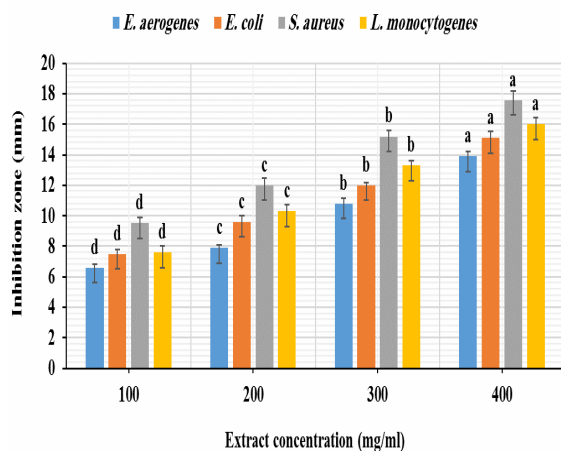


Fig 2 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Humulus lupulus* extract on some microorganism pathogen (well diffusion agar).

علاوه بر این، در غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر، باکتری های *S. aureus* و *E. aerogenes* به ترتیب بالاترین

اضافه شد. مجدداً به مدت ۰/۵ ساعت گرمخانه گذاری تکرار گردید. اولین خانه ای که در آن هیچگونه رشد و تغییر رنگی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید [۱۶].

۲-۶-۴- اندازه گیری حداقل غلظت کشندگی

۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از چاهک های بدون تغییر رنگ بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه گذاری مانند شرایط فوق، کمترین غلظتی که در آن رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد [۱۷].

۲-۷- آنالیز آماری

آزمون های این پژوهش در سه تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. جهت تشخیص معنی دار بودن اختلاف بین میانگین ها، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. ($p < 0.05$)

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت ضد میکروبی

نتایج فعالیت ضد میکروبی غلظت های مختلف عصاره اتانولی رازک بر باکتری های پاتوژن، بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار، در شکل ۱ آورده شده است. مطابق نتایج، افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی دار قطر هاله بازدارندگی گردید. در ارتباط با باکتری *E. aerogenes*، قطر هاله بازدارندگی از ۶/۳ میلی متر در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره به ۱۲/۵ میلی متر در غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر افزایش یافت. قطر هاله بازدارندگی برای باکتری *E. coli* در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره برابر با ۶/۸ میلی متر بود، اما غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره سبب ایجاد هاله عدم رشد با قطر ۱۴ میلی متر در اطراف کلنی های باکتری *E. coli* گردید. نتایج مشابهی در مورد باکتری های مشاهده شد. قطر هاله عدم رشد در حضور ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره به ترتیب ۸/۸ و ۷/۳ میلی متر برای باکتری های *S. aureus* و *L. monocytogenes* بود و افزایش غلظت عصاره به ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر سبب افزایش معنی دار قطر هاله عدم رشد (به ترتیب ۱۶/۹ و ۱۵/۵ میلی متر) شد. بطور کلی، بزرگترین

(۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بیشترین (۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) غلظت مهارکنندگی رشد به ترتیب در باکتری‌های *S. aureus* و *E. aerogenes* مشاهده شد. نتایج حداقل غلظت کشندگی نیز نشان داد که باکتری حساس‌ترین میکروارگانیسم نسبت به عصاره اتانولی رازک می‌باشد و غلظت کمتری از عصاره جهت از بین بردن این باکتری نیاز است (جدول ۱).

(۱۷/۶ میلی‌متر) و کمترین (۱۳/۹ میلی‌متر) قطر هاله عدم رشد را به خود اختصاص دارند و اثر ضد میکروبی عصاره در برابر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود (میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۶/۸ میلی‌متر در برابر ۱۴/۵ میلی‌متر در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). مطابق نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۱)، رشد باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *L. monocytogenes* در حضور غلظت‌های کمتر عصاره اتانولی رازک متوقف گردید و کمترین

Table 1 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Humulus lupulus* extract on some pathogenic microorganisms.

Microorganism	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	256	> 512
<i>Escherichia coli</i>	128	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i>	64	512
<i>Listeria monocytogenes</i>	128	> 512

Enterococcus *E. coli* *Bacillus cereus* *Salmonella typhimurium/ faecalis* بود و این اثر به حضور کاتچین در عصاره نسبت داده شد که قادر به رسوب پروتئین‌های دیواره سلولی و در نتیجه تداخل در تشکیل دیواره سلولی می‌باشند [۹، ۱۸]. لازم به ذکر است که مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به انواع گرم مثبت در برابر عصاره اتانولی رازک عمدتاً ناشی از وجود غشاء‌های خارجی اطراف باکتری‌های گرم منفی است که سبب افزایش مقاومت آن‌ها می‌گردد. گزارش شده است که غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی از ساختار پیچیده لیپوپلی ساکاریدی تشکیل شده است که سرعت نفوذ ترکیبات آبرگیز موجود در عصاره و اسانس‌های گیاهی به داخل سلول را کند می‌سازد. اما لایه موکوپیتیدی ساده در باکتری‌های گرم مثبت دارای نفوذپذیری بالایی می‌باشد که حساسیت بیشتر آن‌ها نسبت به ترکیبات آبرگیز را به دنبال دارد [۱۲، ۱۹].

۳-۲- محتوای فنول و فلاونوئید کل

محتوای فنول کل عصاره اتانولی گیاه رازک برابر با ۹۶۷ mg GAE/g و محتوای فلاونوئید آن برابر با ۲۸۵۰ mg QE/g بود (شکل ۳). کسکین و همکاران [۲۰] گزارش نمودند که میوه کاج و برگ‌های رازک به ترتیب دارای محتوای فنول کل ۷/۱۲ mg GAE/g و ۶/۸۶ می‌باشد. علاوه بر این، میزان فنول کل ۱۵ mg GAE/g در عصاره برگ رازک در

در مطالعه کسری کرمانشاهی و همکاران [۱]، اثر ضد باکتری عصاره الکلی گل گیاه رازک بر روی چهار سویه *S. aureus*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* بررسی گردید. عصاره رازک در تمامی غلظت‌ها بویژه غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری نمود و غلظت‌های ۱۲۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر مهارتی و کشندگی به ترتیب در مورد باکتری‌های *B. subtilis* و *S. aureus* بودند [۱]. محمدی ثانی و همکاران [۷] با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی رازک بر *S. aureus*، *L. monocytogenes* و *Salmonella enterica* نشان دادند که مطابق روش دیسک دیفیوژن و برآش میکرودیولوشن، باکتری‌های گرم مثبت به عصاره آبی رازک نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساس‌تر بودند. بیشترین اثر مهارکنندگی رشد (قطر هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر) در روش ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار در برابر *S. aureus* مشاهده شد. اگرچه، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره آبی رازک بر روی برابر با ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، اما غلظت‌های مورد بررسی عصاره اثر کشندگی (MBC) بر باکتری‌ها نداشتند [۷]. در مطالعه‌ی آلونسو استبان و همکاران [۹]، عصاره متانولی رازک دارای اثر ضد باکتریایی بر میکروارگانیسم‌های *S. aureus*، *L. monocytogenes*

اتانولی گیاه رازک مطابق دو روش مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS اندازه گیری و نتایج در شکل ۴ آورده شده است. مشاهده گردید که عصاره اتانولی گیاه رازک دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد قابل توجهی می باشد. بطوریکه فعالیت مهارکنندگی در برابر رادیکال های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب معادل ۵۸/۶۳ و ۶۶/۵ درصد بود.

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رازک در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. مالیار و همکاران [۲۱] گزارش دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه رازک در برابر رادیکال های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب در محدوده $43/8 - 60/6$ و $23/7 - 44/3$ $\mu\text{g Torolox/g}$ می باشد. آبرام و همکاران [۱۰] نشان دادند که عصاره اتانولی برگ رازک دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کمتری نسبت به عصاره اتانولی میوه گیاه می باشد (حدود ۵ برابر). فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی برگ و میوه رازک در برابر رادیکال های آزاد DPPH ($0/78 - 0/99$ mg/ml) در مطالعه ی کسکین و همکاران [۲۰] گزارش شده است. علاوه بر این، آلونسو استبان و همکاران [۹] بیان نمودند که عصاره متانولی رازک دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی ($50.5 \mu\text{g/ml}$) در برابر رادیکال آزاد DPPH دارد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رازک عمدتاً ناشی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن می باشد؛ بطوریکه اثر آنتی اکسیدانی کاتچین و اپی کاتچین در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۲۶-۲۹].

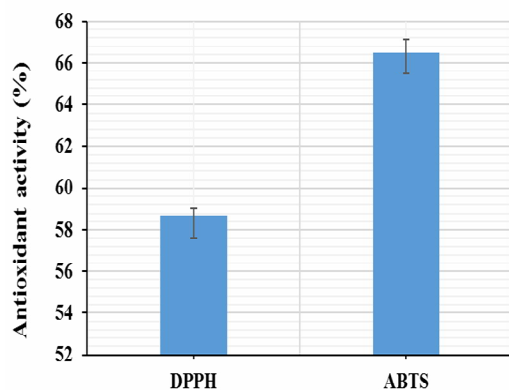


Fig 4 Antioxidant activity of *Humulus lupulus* extract.

با اینحال، مقایسه نتایج این مطالعه با یافته های سایر محققان نشان می دهد که تفاوت میان اعداد گزارش شده برای فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رازک ممکن است به شرایط آب و

مطالعه آبرام و همکاران [۱۰] گزارش شده است. همچنین، مالیار و همکاران [۲۱] و فارکاس و همکاران [۲۲] محتوای فنول کل عصاره متانولی رازک را به ترتیب $7/4 \mu\text{g GAE/g}$ و 239 mg GAE/g گزارش دادند. میزان فنول کل رازک تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل منطقه کشت، شرایط آب و هوایی، روش های استخراج و نوع حلال فرار می گیرد [۱۰]. عصاره گیاه رازک دارای ترکیبات فنولی مختلفی از قبیل کاتچین و اپی کاتچین می باشد. آلونسو استبان و همکاران [۹] گزارش نمودند که عصاره متانولی گیاه رازک حاوی $13/7$ میلی گرم در گرم کاتچین و $3/9$ میلی گرم در گرم اپی کاتچین است. در مطالعه ای دیگر مشخص گردید که میزان کاتچین و اپی کاتچین در عصاره متانولی رازک به ترتیب $0/37$ و $0/83$ میلی گرم در گرم می باشد [۲۰]. علاوه بر این، گزارش شده است که لوتئولین، روتین، فرولیک اسید و کاتچین عمده ترین ترکیبات فنولی شناسایی شده در عصاره میوه رازک و روتین، اپی کاتچین، وانیلیک اسید و دیادزئین فراوان ترین ترکیبات فنولی در عصاره برگ رازک می باشند [۲۰]. لازم به ذکر است که کاتچین و اپی کاتچین بطور گسترده ای بعنوان افزودنی عملگر در مواد غذایی، غذا داروها و مکمل های تغذیه ای به منظور بهبود سلامت مصرف کنندگان، جلوگیری از بیماری های مختلف و افزایش عمر نگهداری محصولات استفاده می شوند [۲۳-۲۵].

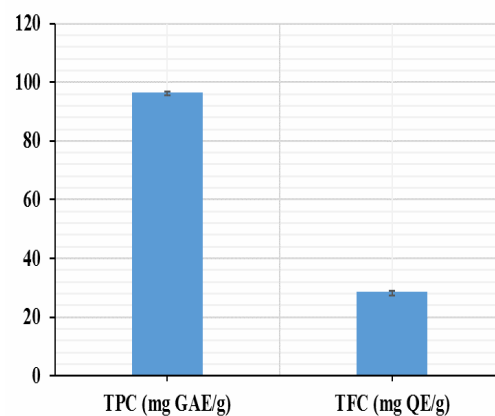


Fig 3 Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *Humulus lupulus* extract.

۳-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی

ترکیبات فنولی نقش ویژه ای در فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها و اسانس های گیاهی ایفا می کنند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

- growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection," *Microbial Pathogenesis*, vol. 116, pp. 62-67, 2018.
- [3] P. Namazi, H. Barzegar, B. Alizadeh behbahani, and M. A. Mehrnia, "Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts," *Food Science and Technology*, vol. 18, no. 113, pp. 301-311, 2021.
- [4] H. Barzegar, B. Alizadeh behbahani, and M. Noshad, "Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* aqueous extract against some gram- positive and gram- negative bacteria," *Food Science and Technology*, vol. 18, no. 116, pp. 327-335, 2021.
- [5] F. Tabatabaei Yazdi and B. Alizadeh Behbahani, "Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro"," *Archives of Advances in Biosciences*, vol. 4, no. 4, 2013.
- [6] B. A. Behbahani, F. T. Yazdi, A. Mortazavi, F. Zendeboodi, and M. M. Gholian, "Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* Lon food infection and intoxication microorganisms "in vitro"" *Archives of Advances in Biosciences*, vol. 4, no. 3, 89-99, 2013.
- [7] A. Mohamadi Sani, M. Azami, and M. Yavarmanesh, "Evaluation of antimicrobial effect of Hop water extract with Humulone from Hop against *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*," (in en), *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 218-224, 2015.
- [8] S. H. Hejazian and S. M. Mahdavi, "Comparison Between the Analgesic Effect of *Humulus Lupulus* (Hops) Extract and Morphine in Mice," *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, vol. 5, no. 4, pp. 265-272, 2006.
- [9] J. I. Alonso-Esteban *et al.*, "Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds," *Industrial Crops and Products*, vol. 134, pp. 154-159, 2019.
- [10] V. Abram *et al.*, "A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones,"

هوایی، شرایط کشت گیاه، زمان جمع‌آوری گیاه، روش استخراج، نوع حلال، روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت داده شود [۳۰-۳۲].

۴- نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه رازک تأثیر ضد میکروبی قابل توجهی بر هر دو نوع باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد. با اینحال، حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی نسبت به عصاره بالاتر بود. بطوریکه قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود و غلظت کمتری از عصاره اتانولی رازک برای جلوگیری از رشد و یا از بین بردن این باکتری‌ها نیاز بود. عصاره اتانولی گیاه رازک دارای میزان فنول و فلاونوئید کل مطلوبی بود و بنابراین بطور قابل توجهی سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS گردید. لذا، عصاره اتانولی گیاه رازک قابلیت کنترل رشد بسیاری از باکتری‌های پاتوژن و همچنین جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها را دارا می‌باشد و می‌توان از این ترکیب زیست فعال جهت افزایش ایمنی، کیفیت و عمر ماندگاری محصولات غذایی استفاده نمود.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] R. Kasra Kermanshahi, B. Nasr Esfahani, A. A. Pour babaie, G. Asghari, and J. Esmi Serkani, "The Study of Antibacterial Effect of *Humulus lupulus* on some of Gram Positive & Gram Negative Bacteria," *Journal of Medicinal Plants*, vol. 8, no. 30, pp. 92-97, 2009.
- [2] M. Yeganegi, F. Tabatabaei Yazdi, S. A. Mortazavi, J. Asili, B. Alizadeh Behbahani, and A. Beigbabaei, "*Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the

- Rhizopus stolonifer* causing strawberry's rot and mold," *Food Science and Technology*, vol. 18, no. 115, pp. 171-180, 2021.
- [18] F. M. S. Gomes *et al.*, "Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains," *Microbial Pathogenesis*, vol. 115, pp. 175-178, 2018.
- [19] H. Zanganeh, F. Shahidi, S. A. Mortazavi, and B. Alizadeh Behbahani, "Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Citrus paradisi* essential oil nanoemulsion on pathogenic microorganisms: A laboratory study," (in en), *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 2021, doi: 10.22067/ifstrj.2021.71660.1074.
- [20] Ş. Keskin, Y. Şirin, H. E. Çakir, and M. Keskin, "An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes," *South African Journal of Botany*, vol. 120, pp. 170-174, 2019.
- [21] T. Maliar *et al.*, "Secondary metabolites, antioxidant and anti-proteinase activities of methanolic extracts from cones of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars," *Chemical Papers*, vol. 71, no. 1, pp. 41-48, 2017.
- [22] A. Fărcaş, M. Tofană, S. Socaci, S. Scrob, L. Salanță, and A. Borşa, "Preliminary study on antioxidant activity and polyphenols content in discharged waste from beer production," *J. Agroaliment. Process. Technol.*, vol. 19, pp. 319-324, 2013.
- [23] V. K. Ananingsih, A. Sharma, and W. Zhou, "Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection," *Food Research International*, vol. 50, no. 2, pp. 469-479, 2013.
- [24] A. F. Massounga Bora, S. Ma, X. Li, and L. Liu, "Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances," *Food Research International*, vol. 105, pp. 241-249, 2018.
- [25] M. Karabin, T. Hudcova, L. Jelinek, and P. Dostalek, "Biotransformations and biological activities of hop flavonoids," *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, Part 2, pp. 1063-1090, 2015.
- [26] T. Inui, K. Okumura, H. Matsui, T. Hosoya, and S. Kumazawa, "Effect of harvest time on some in vitro functional properties of hop polyphenols," *Food Chemistry*, vol. 225, pp. 69-76, 2017.
- Industrial Crops and Products*, vol. 64, pp. 124-134, 2015.
- [11] M. Noshad, B. Alizadeh Behbahani, and S. Dehghani, "Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract," *Food Science and Technology*, vol. 17, no. 100, pp. 117-125, 2020.
- [12] H. Zanganeh, S. A. Mortazavi, F. Shahidi, and B. Alizadeh Behbahani, "Evaluation of the chemical and antibacterial properties of *Citrus paradise* essential oil and its application in *Lallemantia iberica* seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 15, no. 6, pp. 5556-5571, 2021.
- [13] B. Majdi, M. A. Mehrnia, H. Barzegar, and B. Alizadeh Behbahani, "Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil," (in en), *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, vol. 17, no. 2, pp. 261-271, 2021.
- [14] M. Rahmati-Joneidabad and B. Alizadeh behbahani, "Evaluation of chemical activity and antifungal effect of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causing orange rot," *mdrsjrs*, vol. 18, no. 114, pp. 82-73, 2021.
- [15] F. Shahidi, F. Tabatabaei Yazdi, B. Alizadeh Behbahani, S. Roshanak, N. Norouzi, A. Vasiee, "Antibacterial Effect of *Tragopogon graminifolius* Extract on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* "in vitro"," *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, vol. 24, no. 84, pp. 1-10, 2019.
- [16] M. Ebrahimi Hemmati Kaykha, H. Jooyandeh, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, "Antimicrobial Activity of Rosemary Essential Oil and its Interaction with Common Therapeutic Antibiotics on some Gram Positive and Gram Negative Bacteria," *Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, vol. 87, pp. 25-34, 2020.
- [17] M. Rahmati-Joneidabad, B. Alizadeh Behbahani, and M. Noshad, "Antifungal effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and

- Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of *Callistemon Citrinus* Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study," *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, vol. 19, no. 5, pp. 463-484, 2020.
- [31] F. Falah, K. Shirani, A. Vasiee, F. Tabatabaee Yazdi, and B. Alizadeh Behbahani, "In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of *Echinops setifer* extract," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 35, p. 102102, 2021.
- [32] M. A. Mehrnia, B. Alizadeh Behbahani, H. Barzegar, and H. Tanavar, "*Sclerorhachis platyrachis* essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria "in vitro"," *Food Science and Technology*, vol. 18, no. 112, pp. 189-198, 2021.
- [27] M. Grzesik, K. Naparło, G. Bartosz, and I. Sadowska-Bartosz, "Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants," *Food Chemistry*, vol. 241, pp. 480-492, 2018.
- [28] I. Peres, S. Rocha, J. Gomes, S. Morais, M. C. Pereira, and M. Coelho, "Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles," *Carbohydrate Polymers*, vol. 86, no. 1, pp. 147-153, 2011.
- [29] A. A. Zanwar, S. L. Badole, P. S. Shende, M. V. Hegde, and S. L. Bodhankar, "Chapter 21 - Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease," in *Polyphenols in Human Health and Disease*, R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi Eds. San Diego: Academic Press, 2014, pp. 267-271.
- [30] Z. Sosani Gharibvand, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and H. Jooyandeh, "Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging



Investigation of the chemical properties and antimicrobial activities of *Humulus lupulus* extract on *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter aerogenes in vitro*

Noshad, M. ^{1*}, Alizadeh Behbahani, B. ², Rahmati-Joneidabad, M. ³

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 12/ 24

Accepted 2022/ 02/ 22

Keywords:

Humulus lupulus extract,
Antioxidant,
Antimicrobe,
Pathogenic bacteria,
Natural preservative.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6

*Corresponding Author E-Mail:
Noshad@asnrukh.ac.ir

ABSTRACT

In this study, the ethanolic extract of *Humulus lupulus* was prepared by the maceration method. Its antimicrobial effect was evaluated against pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter aerogenes*) through disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration. Total phenol and flavonoid contents of the extract were measured by Folin-Ciocalteu and aluminum chloride colorimetric methods, respectively. The antioxidant activity of the ethanolic extract was also measured by DPPH and ABTS free radical scavenging methods. The highest and lowest inhibition zones in disk diffusion agar (16.9 mm vs. 12.5 mm) and well diffusion agar (17.6 mm vs. 13.9 mm) methods were accounted for *S. aureus* and *E. aerogenes*, respectively. Gram-positive bacterial species were more sensitive to *H. lupulus* ethanolic extract compared to Gram-negative ones. Total phenol and flavonoid contents of the extract were found to be 96.47 mg GAE/g and 28.5 mg QE/g, respectively. The antioxidant effects of the *H. lupulus* ethanolic extract, based on DPPH and ABTS radical scavenging activities, were 58.63% and 66.5%, respectively. Based on the results, the ethanolic extract of *H. lupulus* could be used as a natural antimicrobial and antioxidant agent to inhibit the growth of pathogenic bacteria and lipid oxidation progression in various food products.