علمی پژوهشی

بررسی مقایسه ای اثر بازدارندگی و کشندگی عصاره برگ گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) حاصل از روش‌های استخراج متداول با حلال و سیال فوق داغ بر برخی از میکروارگانیسم‌های مواد غذایی

محبوبه سرابی جماب[1*]، منا کاوه[2]، معصومه مدرس[3]

۱- دانشیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه فرآوی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۰)

چکیده

در این پژوهش استخراج عصاره از برگ نوروزک با دو روش استخراج متداول با حلال (دمای استخراج ۷۰ ؛ ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۳۰، ۷۵ و ۱۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۵۰ به ۵۰، ٦۰ به ٤۰ و ۷۰ به ۳۰) و استخراج با سیال فوق داغ (دمای استخراج ۱۳۰، ۱٤٥ و ۱٦۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۱۰ ، ۲۰ و۳۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ٦۰ به ٤۰، ۸۰ به ۲۰ و ۱۰۰ به ۰) انجام شد و قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده روی چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *آسپرژیلوس نیجر* با روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها ارزیابی گردید. نتایج نشان داد در هر دو روش استخراج، کمترین غلظت جهت جلوگیری از رشد اکثر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود؛ این در حالی است که حداقل غلظت کشندگی، بسته به نوع میکروارگانیسم بین ۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. در روش استخراج متداول با حلال، تیمار شامل دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۷۵ دقیقه و نسبت مساوی از دو حلال و در روش استخراج با سیال فوق داغ تیمار شامل دمای ۱٦۰ درجه سانتی-گراد، زمان ۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۸۰ به ۲۰، بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را نشان دادند. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اظهار نمود نوع روش استخراج عصاره ترکیبات گیاهی، تأثیر بسزایی در مهار یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد یا بیماری در مواد غذایی داشته و در صورت بهینه‌یابی هر یک از روش‌های استخراج ، می‌توان از عصاره حاصل بیشترین استفاده را جهت افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی بکار برد.

کلید واژگان: حداقل غلظت بازدارندگی رشد، حداقل غلظت کشندگی، نوروزک، استخراج با سیال فوق داغ.

* مسئول مکاتبات: m.sarabi@rifst.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر به سبب نیاز به درمان نوین برای مقابله با میکروب‌ها، توجه زیادی به عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی شده است؛ چرا که داروهای سنتزی، اثرات جانبی نامطلوبی دارند و تعداد میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو روز به روز در حال افزایش است. در این میان، کشف گیاهان با اثرات ضد میکروبی، عوارض نامطلوب ترکیبات شیمیایی را کاهش خواهد دارد و مقرون به صرفه‌تر نیز خواهد بود [۳-۱].

جنس مریم گلی[1] با ۵۸ گونه یکی از معروف‌ترین جنس‌های تیره نعناست که موارد استفاده دارویی، غذایی و زینتی متعدد دارد (٤). گونه *Salvia leriifolia* که در ایران به نام نوروزک معروف است، بومی استان خراسان و بخشی از استان سمنان می‌باشد [۵]. گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک؛ برای مثال فعالیت ضد درد و آرام‌بخش عصاره برگ نوروزک گزارش شده است [٦]. بعلاوه نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره ریشه و برگ این گیاه بر میکروب‌های مختلف، حاکی از وجود خاصیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در بخش‌های مختلف گیاه است [۷-۱۰]. حضور متابولیت‌های ثانویه با ارزش موجود در این گونه نظیر ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تان‌ها و آلکالوئیدها سبب گردیده است که این گونه از خاصیت ضد میکروبی بالایی برخوردار باشد.

روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره‌های گیاهی و میوه‌ها وجود دارد ولی در بیشتر مطالعات مربوط به خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی، استخراج به روش سنتی با حلال انجام گرفته است [۱۱-۱٤]. استخراج با حلال روشی رایج برای استخراج ترکیبات از ماده جامد یا مایع است. این روش قادر به استخراج ترکیبات با ارزش بالا از منابع و ضایعات مختلف گیاهی است. در روش سنتی استخراج با حلال، نمونه جامد در حلال غوطه‌ور شده و عصاره استخراجی بعد از انجام عمل استخراج، جمع‌آوری می‌شود [۱۵]. از سویی دیگر تحقیقات نشان داده است روش‌های دستگاهی استخراج می‌تواند زمان استخراج را کاهش داده و میزان آن را افزایش دهد [۱٦]. روش‌های دستگاهی و غیر سنتی استخراج را می‌توان به دو دسته روش‌های وابسته به حرارت و غیروابسته به حرارت تقسیم بندی نمود. استخراج با حلال تحت فشار[2] از جمله روش‌های وابسته به حرارت می‌باشد که برای استخراج ترکیبات زیست فعال ازجمله ترکیبات فنولی مورد استفاده قرار گرفته‌است [۱۷]. اساس روش سیال فوق بحرانی، استفاده از حلال در شرایط بالاتر از نقطه بحران است [۱۸]. نقطه بحرانی دما و فشاری است که بالاتر از آن سیال ویژگی‌های گاز و مایع را هم‌زمان دارا می‌باشد. سیال در بالاتر از این نقطه، انتشار، گرانروی و کشش سطحی مانند گازها را نشان می‌دهد و دانسیته و قدرت حلالیت آن مانند مایعات است که باعث افزایش بازده استخراج در زمان کم می‌شود.

تحقیقات محدودی در خصوص بررسی اثر ضد میکروبی اندام‌های مختلف گیاه نوروزک بر میکروارگانیسم‌های شاخص انجام شده و در مطالعات فوق‌الذکر عصاره‌گیری به روش متداول با حلال صورت گرفته و تاکنون بر روی روش‌های استخراج دستگاهی در خصوص گیاه نوروزک تحقیقی صورت نگرفته است؛ با این حال نتایج تحقیقات گذشته حاکی از اثرات ضد میکروبی مؤثر گیاه نوروزک می‌باشد. بررسی اثر عصاره و اسانس برگ گیاه نوروزک بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[3]، *باسیلوس سابتیلیس*[4]، *اشریشیا کلی*[5]، *سودوموناس آئروژینوزا*[6] و *کاندیدا آلبیکنس*[7] نشان داده است عصاره برگ بر تمامی میکروارگانیسم‌های مورد اشاره مؤثر بوده، و اثر آن بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر بوده است؛ اثر اسانس برگ گیاه نیز بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* قابل توجه و به ویژه اثر اسانس آن بر *کاندیدا آلبیکنس* با داروی ضد قارچ کلوتریمازول، قابل قیاس بوده است [۷].

در این پژوهش با توجه به پیش‌تیمارهای انجام شده، جهت کاهش تعداد آزمون‌ها، به منظور مشخص نمودن تیمارها از روش سطح پاسخ بر اساس طرح مکعب مرکزی با ۳ تکرار در نقطه مرکزی با کمک نرم‌افزار Design Expert استفاده گردید و سپس قدرت ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده به دو روش

1. Salvia

2. Pressurized liquid extraction
3. *Staphyllococcus aureuse*
4. *Bacillus subtilis*
5. *Escherichia coli*
6. *Pseudomonas aeruginosa*
7. *Candida albicans*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]
[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

استخراج متداول با حلال و استخراج با روش سیال فوق داغ با تعیین حداقل غلظت بازدارنگی رشد و حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها با یکدیگر مقایسه شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-آماده سازی نمونه‌ها

برگ گیاه نوروزک از ارتفاعات اطراف مشهد جمع‌آوری گردید و سپس در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم آفتاب خشک شد. برگ‌های خشک شده با آسیاب خرد شده و برای به دست آوردن پودر یکنواخت از الک ۳۵ مش عبور داده شد. رطوبت اولیه نمونه به روش آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت طبق استاندارد ملی ایران به شماره‌های ۵۱۹٤ و ۲۷۰۵ اندازه‌گیری شد (۱۹و ۲۰). رطوبت اولیه نمونه‌ها ۰/۰۵±۹/۹٤ درصد بر پایه وزن خشک به دست آمد. سویه‌های میکروبی مورد استفاده شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1764)، *لیستریا مونوسیتوژنز*[8] (PTCC 1997)، *اشریشیا کلی* (PTCC 1329)، *سالمونلا انتریتیدیس*[9] (PTCC 1709)، *ساکارومایسس سرویزیه*[10] (PTCC 5177) و *آسپرژیلوس نیجر*[11] (PTCC 5154) از مرکز کلسکیون سویه‌های میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهیه گردید.

۲-۲-استخراج متداول با حلال

به منظور دستیابی به بیش‌ترین بازده و خواص ضدمیکروبی عصاره استخراجی از برگ گیاه نوروزک، چندین پیش‌آزمون برای انتخاب سطوح فاکتورهای مؤثر در استخراج متداول با حلال انجام شد. در نهایت، آزمایشات در دماهای مختلف (۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های مختلف (۳۰، ۷۵ و ۱۲۰ دقیقه) و نسبت‌های متفاوتی از آب به اتانول (۵۰ به۵۰، ٦۰ به ٤۰ و ۷۰ به ۳۰) انجام شد. تیمارهای اعمال شده در این روش بر اساس طرح RSM انتخاب گردید. نسبت ماده جامد به حلال مورد استفاده ۱ به ۱۰ وزنی/حجمی بود. عصاره‌های حاصل بعد از عبور از صافی پارچه‌ای، با سرعت g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری و در در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد و خلاء ۰/۸ بار در مدت زمان ۵ الی ۸ ساعت (با توجه به نوع حلال) خشک شد. عصاره‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۲].

۲-۳-استخراج با سیال فوق داغ

با بررسی منابع و انجام چندین پیش‌آزمون، دما، زمان و نسبت آب به اتانول به عنوان حلال، فاکتورهای متغیر در روش استخراج عصاره با سیال فوق داغ انتخاب شدند. دما بین ۱۳۰ تا ۱٦۰درجه سانتی‌گراد متغیر بود. زمان استخراج بین ۱۰ تا ۳۰ دقیقه انتخاب شد. نسبت‌های آب به اتانول نیز ٦۰ به ٤۰، ۸۰ به ۲۰ و ۱۰۰ به صفر در نظر گرفته شد. تیمارهای اعمال شده در این روش بر اساس طرح RSM مشخص گردید. برای استخراج عصاره برگ گیاه نوروزک با روش سیال فوق داغ، ۵ گرم برگ گیاه نوروزک خشک و خرد شده (۳۵ مش) در ۵۰ میلی‌لیتر از نسبت‌های مختلفی از حلال به طور کامل به صورت سوسپانسیون در آمده و سپس درون سل دستگاه ریخته شد. بعد از رسیدن به دمای مورد نظر، تا مدت زمان معین نمونه‌ها درون دستگاه قرار گرفت. فشار دستگاه بین ۵ تا ۱۵ بار بر حسب دما و نوع حلال متغیر بود. عصاره‌های به دست آمده بعد از عبور از صافی پارچه‌ای، با سرعت g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری و در آون تحت خلا در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد و خلاء ۰/۸ بار در مدت زمان ۵ الی ۸ ساعت (با توجه به نوع حلال) خشک شدند. عصاره‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۲۱و ۱].

۲-٤-فعال‌سازی میکروارگانسیم‌ها

برای فعال‌سازی سویه‌های باکتری، هر یک از سویه‌ها به محیط کشت Muller Hinton Broth منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از سانتریفیوژ در g×۱٤۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شده و از کدورت باقیمانده به وسیله محلول بافر فسفات سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد نیم مک‌فارلند (cfu/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$) تهیه شد. فعال‌سازی مخمر مشابه فعال‌سازی باکتری‌ها انجام گردید با این تفاوت که از محیط کشت Yeast and Mold Broth بدین منظور استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون قارچی، اسپور کشت داده شده در محیط Yeast and Mold Agar به صورت استریل خراشیده و به داخل آب مقطر استریل

8. *Listeria monocytogenes*
9 . *Salmonella enteritidis*
10. *Sachharomyces cerevisiae*
11 . *Aspergillus niger*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

انتقال یافت و تا به دست آمدن جمعیت میکروبی معادل نیم مک‌فارلند، رقیق شد [۱۲].

۲-۵-تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد[۱۲]

ابتدا به منظور تهیه رقت‌های مختلفی از عصاره، پس از انجام یکسری پیش‌آزمون، از غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها به صورت ده دهی رقت‌های مختلف تهیه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره بعد از عبور از فیلتر استریل ۰/۴۵ میکرومتر، به میکروتیوب‌هایی که حاوی ۹۰ میکرولیتر محیط Muller Hinton Broth (باکتری) و محیط Yeast and Mold Broth (کپک و مخمر) و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (10^6cfu/ml) بود، ریخته شد. سل حاوی محیط کشت بدون سوسپانسیون میکروبی و عصاره به عنوان کنترل منفی و سل حاوی محیط کشت مایع و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسون میکروبی (10^6cfu/ml) بدون حضور عصاره، به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. پلیت الایزا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری‌ها، ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای مخمر و ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ تا ۹۶ ساعت برای کپک گرمخانه‌گذاری شد [۲۲].

با توجه به آن‌که عصاره برگ گیاه نوروزک در غلظت‌های مورد استفاده دارای رنگ سبز متمایل به قهوه‌ای است که سبب می‌گردد رنگ حاصل از کدورت میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتری یا الایزا تشخیص داده نشود، به منظور تعیین حداقل غلظت مهار رشد میکروبی از روش استفاده از معرف تترازولیوم استفاده گردید. در این روش، پس از طی شدن زمان‌های مذکور، به میکروتیوپ‌ها، تترازولیوم افزوده گردید و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۰/۵ ساعت، رنگ هر میکروتیوپ مشاهده گردید. تغییر رنگ به صورتی نشانه فعالیت میکروارگانیسم است که سبب می‌گردد معرف تترازولیوم از حالت بی‌رنگ به صورتی تا قرمز تبدیل شود. حداقل غلظت بازدارندگی رشد، کم‌ترین غلظتی از عصاره است که بتواند مانع رشد میکروبی بعد از گرمخانه‌گذاری گردد [۲۳و ۲۴].

۲-۶-تعیین حداقل غلظت کشندگی[۱۳]

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها، از میکروتیوب‌هایی که پس از افزودن تترازولیوم تغییر رنگ به صورتی در آن‌ها مشاهده نگردید، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به سطح محیط کشت‌های Muller Hinton Agar (برای باکتری)، و Yeast and Mold Agar (برای مخمر و کپک) منتقل گردید و پس از قرار دادن در گرمخانه در دمای مناسب رشد باکتری، کپک و مخمر در مدت زمان لازم، وجود یا عدم وجود کلنی یا رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت کشندگی، کمترین غلظتی از عصاره است که بتواند سبب مرگ سلولی میکروارگانیسم‌ها شود [۲۳و ۲۴].

۳-نتایج و بحث

۳-۱-بررسی اثر روش استخراج متداول بر MIC و MBC میکروارگانیسم‌های شاخص

فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به دو روش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حدقل غلظت کشندگی (MBC) روی چند میکروارگانیسم شاخص در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمام عصاره‌های استخراجی روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون در این مطالعه (*اشریشیا کلی*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نیجر* و *ساکارومایسس سرویزیه*) اثر ضد میکروبی داشتند.

نتایج حاصل از MIC (جدول ۱) نشان داد که کمترین غلظت جهت جلوگیری از رشد همه میکروارگانیسم‌های مورد آزمون ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که البته بر حسب نوع میکروارگانیسم، دما، زمان و نسبت حلال آب به اتانول در فرایند استخراج بر روی مقادیر بدست آمده اثرگذار بود. در مجموع از نتایج حاصله می‌توان این‌گونه استنباط نمود که تیمار استخراج شامل دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان ۱۲۰ دقیقه و نسبت مساوی از هر دو حلال آب و اتانول، بهترین اثر را از جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها نشان داد؛ هرچند در رابطه با باکتری گرم منفی *سالمونلا انتریتیدیس* حداقل غلظت بازدارندگی رشد به تیمار ۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۷۵ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۶۰ به ۴۰ تعلق داشت. همچنین در خصوص کپک *آسپرژیلوس نیجر* در تیمارهای مختلفی حداقل غلظت بازدارندگی رشد بدست آمد.

12 . Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
13 . Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]
[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

Table 1 Minimum inhibitory concentration of microorganisms in conventional solvent extraction method

parameters			Minimum Inhibitory Concentration (mg / ml)					
Temperature (° C)	Time (min)	Water-to-Ethanol ratio	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coli*	*Salmonella enteritidis*	*Saccharomyces cerevisiae*	*Aspergillus niger*
80	75	60 to 40	50	50	500	50	5	0.5
80	75	60 to 40	50	50	50	50	5	0.5
80	120	60 to 40	50	0.5	50	5	50	0.5
70	120	50 to 50	0.5	0.5	0.5	5	0.5	0.5
90	30	70 to 30	50	50	50	50	50	5000
90	120	70 to 30	50	50	50	50	5	0.5
80	75	60 to 40	50	5	5	0.5	5	0.5
80	75	60 to 40	50	50	50	50	50	5
70	30	70 to 30	500	50	50	50	500	0.5
80	30	60 to 40	5	5	5	5	50	500
70	120	70 to 30	5	5	5	5	50	0.5
90	120	50 to 50	50	50	50	0.5	50	5
90	30	50 to 50	50	50	500	50	50	0.5
90	75	60 to 40	50	50	50	50	50	5
70	75	60 to 40	5	50	5	5	500	50
70	30	50 to 50	50	500	50	50	50	0.5
80	75	50 to 50	5	50	5	5	500	50
80	75	70 to 30	5	500	5	50	50	0.5
80	75	60 to 40	50	50	500	50	5	0.5
80	75	60 to 40	5	5	500	500	5	0.5

نتایج MBC حاصل از اثر تیمارهای مختلف استخراج در روش آزمون در جدول ۲ آمده است.

استخراج متداول با حلال بر روی میکروارگانیسم‌های مورد

Table 2 minimum bactericidal concentration of microorganisms in the conventional solvent extraction method

parameters			Minimum bactericidal Concentration (mg / ml)					
Temperature (° C)	Time (min)	*Water-to-Ethanol ratio*	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coli*	*Salmonella enteritidis*	*Saccharomyces cerevisiae*	*Aspergillus niger*
80	75	60 to 40	500	50	500	500	500	5000
80	75	60 to 40	50	50	5000	5000	500	5000
80	120	60 to 40	500	50	50	5	500	5000
70	120	50 to 50	500	5000	5	5000	500	500
90	30	70 to 30	500	500	50	500	500	5000
90	120	70 to 30	500	5000	500	500	500	5000
80	75	60 to 40	50	500	500	500	500	5000
80	75	60 to 40	500	500	500	500	500	500
70	30	70 to 30	5000	5000	5000	5000	5000	5000
80	30	60 to 40	50	500	50	50	500	5000
70	120	70 to 30	500	5000	500	5000	500	5000
90	120	50 to 50	500	5000	500	500	500	5000
90	30	50 to 50	500	5000	5000	5000	500	500
90	75	60 to 40	500	500	500	500	500	5000
70	75	60 to 40	50	500	50	50	5000	5000
70	30	50 to 50	500	500	500	500	500	5000
80	75	50 to 50	5	50	50	5	500	5000
80	75	70 to 30	500	500	50	50	500	500
80	75	60 to 40	50	50	500	500	500	5000
80	75	60 to 40	50	50	500	500	500	5000

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

برخلاف نتایج حاصل از MIC، در خصوص حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها، برای میکروارگانیسم‌های مختلف، غلظت بدست آمده متفاوت بود. به‌طوری که کم‌ترین غلظت کشندگی به میزان ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* محقق گردید. در رابطه با *لیستریا مونوسیتوژنز*، MBC معادل ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در خصوص مخمر و کپک مورد آزمون ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مجموع می‌توان گفت تیمار شامل دمای استخراج ۸۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۷۵ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۵۰ به ۵۰، بیش‌ترین اثر را در زمینه کشندگی اکثر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون داشت.

۳-۲-بررسی اثر روش استخراج با سیال فوق داغ بر MIC و MBC میکروارگانیسم‌های شاخص

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد (جدول ۳) نشان داد که عصاره استخراج شده با روش سیال فوق داغ بر همه میکروارگانیسم‌های مورد آزمون اثرگذار است. البته همان‌طور که از نتایج پیداست اثر تیمارهای مختلف بر حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌های مختلف متفاوت بود (بین ۰/۵ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). در مجموع می‌توان گفت قوی‌ترین عصاره استخراجی علیه اکثر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مربوط به تیمار دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۸۰ به ۲۰ بود. کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت بازدارندگی رشد به ترتیب به کپک و مخمر مورد مطالعه (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و باکتری *اشریشیا کلی* (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تعلق داشت.

Table 3 Minimum Inhibitory Concentration of Microorganisms Growth in Super-Hot Fluid Extraction

parameters			Minimum Inhibitory Concentration (mg / ml)					
Temperature (° C)	Time (min)	*Water-to-Ethanol ratio*	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coli*	*Salmonella enteritidis*	*Saccharomyces cerevisiae*	*Aspergillus niger*
145	20	80 to 20	50	50	50	50	50	5000
145	20	80 to 20	50	50	50	50	50	5000
145	30	80 to 20	50	50	50	50	50	50
130	30	60 to 40	50	500	500	500	50	0.5
160	10	100 to 0	50	50	50	50	5	5000
160	30	100 to 0	50	50	50	50	5	50
140	20	80 to 20	50	50	50	50	50	5000
145	20	80 to 20	50	50	50	50	50	5000
130	10	100 to 0	50	5	50	5	50	5000
145	10	80 to 20	50	50	50	50	500	50
130	30	100 to 0	50	50	50	50	50	500
160	30	60 to 40	50	50	50	50	5	500
160	10	60 to 40	50	500	50	50	5	50
160	20	80 to 20	5	5	50	5	0.5	50
130	20	80 to 20	500	500	500	500	50	50
130	10	60 to 40	50	50	50	50	50	0.5
145	20	60 to 40	50	50	50	50	0.5	500
145	20	100 to 0	50	50	50	50	50	500
145	20	80 to 20	50	50	50	50	50	5000
145	20	80 to 20	50	50	50	50	50	5000

همانند آن‌چه در رابطه با حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌ها عنوان گردید، حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌ها بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود. به‌طوری که دامنه آن از ۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

آمد. باکتری‌های گرم مثبت و *ساکارومایسس سرویزیه* کم‌ترین غلظت کشندگی معادل ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داشتند؛ پس از این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های گرم منفی دارای حداقل غلظت کشندگی معادل ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند و بیش‌ترین عدد MBC به کپک *آسپرژیلوس نیجر* تعلق گرفت. تیمار شامل دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۸۰ به ۲۰ برای همه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، بهترین اثر کشندگی را نشان داد (جدول ٤).

Table 4 minimum bactericidal concentration of microorganisms in Super-Hot Fluid Extraction

parameters			Minimum bactericidal Concentration (mg / ml)					
Temperature (° C)	Time (min)	*Water-to-Ethanol ratio*	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coli*	*Salmonella enteritidis*	*Saccharomyces cerevisiae*	*Aspergillus niger*
145	20	80 to 20	5000	5000	500	500	5000	500
145	20	80 to 20	5000	5000	500	500	500	5000
145	30	80 to 20	5000	5000	5000	5000	5000	500
130	30	60 to 40	50	500	500	500	500	500
160	10	100 to 0	500	500	50	50	500	500
160	30	100 to 0	50	500	50	500	500	500
140	20	80 to 20	5000	5000	500	500	500	5000
145	20	80 to 20	5000	5000	500	500	5000	5000
130	10	100 to 0	5000	5000	5000	5000	5000	500
145	10	80 to 20	500	500	500	500	500	5000
130	30	100 to 0	5000	5000	5000	5000	5000	5000
160	30	60 to 40	50	500	5000	50	5	500
160	10	60 to 40	50	500	50	500	500	5000
160	20	80 to 20	5	5	50	50	5	500
130	20	80 to 20	5000	5000	5000	5000	500	500
130	10	60 to 40	500	500	500	500	500	500
145	20	60 to 40	5000	500	5000	500	500	500
145	20	100 to 0	5000	5000	5000	5000	500	500
145	20	80 to 20	5000	5000	500	500	5000	500
145	20	80 to 20	5000	5000	500	500	5000	5000

تحقیقات مختلف نشان دهنده آن است که به طور کلی عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اثر ضدمیکروبی بیشتری دارند. باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان، دارای یک غشاء خارجی در دیواره سلولی خود می‌باشند. مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدی موجود در سطح این غشاء و خاصیت آب‌دوستی آن، مقاومت این سلول‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد؛ درحالی‌که در باکتری‌های گرم مثبت، ترکیبات ضدمیکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۲۵]. بررسی ساختار سلولی میکروارگانیسم‌ها با میکروسکوپ الکترونی پس از قرار گرفتن در محیط حاوی عصاره‌های گیاهی ضد میکروبی، تغییر در غشاء و ساختار دیواره سلولی، تغییر در فضای بین دیواره و غشاء و نیز کاهش حجم سیتوپلاسم را نشان داده است [۲۷و ۲٦].

خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی را غالباً مربوط به ترکیبات فنولی آن دانسته‌اند [۲۸]. نوع و میزان ترکیبات فنولی در قدرت ضدمیکروبی این ترکیبات تأثیرگذار است؛ همچنین هر ترکیب فنولی قادر است از رشد میکروارگانیسم‌ها بر اساس مکانیسم‌های متفاوتی جلوگیری نماید. Silvan و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی را به اسیدهای فنولی و پس از آن کاتچین‌ها و پروآنتوسیانین‌ها و در انتها به فلاونول‌ها نسبت دادند [۲]. فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نیز خاصیت ضدمیکروبی دارند. ترکیبات فنولی از طریق چند مکانیسم مختلف خاصیت ضد میکروبی ایجاد می‌کنند. ترکیبات فنولی قادرند به پروتئین و یا گروه‌های سولفیدریلی پروتئین‌های

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

دیواره سلولی متصل شده و در ساختار و عملکرد دیواره سلولی تغییر ایجاد نمایند و یا باعث دناتوراسیون برخی آنزیم‌های میکروبی شوند. در واقع ترکیبات فنولی باعث مرگ سلول به دلیل رسوب پروتئین‌ها و اثر بازدارندگی بر آنزیم‌ها مانند گلیکوزیل ترانسفراز می‌شوند (۲۹). علاوه بر آن این ترکیبات با برخی مواد مغذی محیط مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل کمپلکس داده و آن‌ها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کنند (۱۲ و ۳۰). pH محیط و میزان حلالیت ترکیبات فنولی نیز در خواص ضدمیکروبی آن‌ها مهم است. هر چقدر pH پایین و حلالیت بالا باشد، قدرت ضدمیکروبی این ترکیبات بیشتر است [۳]. علاوه بر عوامل گفته شده، نوع میکروارگانیسم نیز در قدرت ضدمیکروبی ترکیبات فنولی حائز اهمیت است. به طوریکه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات فنولی حساس‌تر می‌باشند که این موضوع به تفاوت ساختار دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و منفی مربوط می‌شود [۱۲].

روش استخراج به دلیل تأثیر بر میزان ترکیبات فنولی کل به‌دست آمده، نوع ترکیبات فنولی استخراجی و از بین رفتن آن‌ها در طی استخراج، از جمله عواملی است که می‌تواند خواص ضدمیکروبی عصاره‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [۳۱و ۱۷و ۱٦]. در روش استفاده از سیال فوق داغ، در یک فشار ثابت در دمای بالا، ثابت دی‌الکتریک آب و اتانول کاهش یافته که به دنبال آن قطبیت حلال کم می‌شود و مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش می‌یابد. تغییر قطبیت حلال در دما و فشار بالای روش سیال فوق داغ این امکان را بوجود می‌آورد تا هم ترکیبات زیست‌فعال قطبی و هم غیرقطبی خارج شوند [۳۲]. زمان استخراج با روش سیال فوق داغ در مقایسه با روش استخراج متداول بسیار کوتاه‌تر بوده؛ از این‌رو، در مجموع استفاده از دمای بالا و زمان کوتاه به همراه استفاده از فشار جهت مایع نگهداشتن حلال در حین استخراج سبب افزایش نفوذپذیری آن به درون بافت و استخراج بیشتر ترکیبات موثره می‌گردد. دمای بالای استخراج در روش استفاده از سیال فوق داغ می‌تواند منجر به رها شدن ترکیبات فنولی بیشتر در نتیجه تخریب سلول‌ها گردد. Durmaz و Gokmen در سال ۲۰۱۱ عنوان نمودند که لیگنین (از ترکیبات عمده موجود در بافت‌های گیاهی) در دمای بالا تجزیه می‌شود. لیگنین با پیوندهای اتری و استری به پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای بافت گیاهی متصل می‌باشد که در اثر دماهای بالا این پیوندها می‌شکنند و مقادیر ترکیبات موثره آزاد شده از ماتریکس گیاهی افزایش می‌یابد. برخی ترکیبات فنولی در دماهای بالا استخراج می‌شوند [۳۳]. Plama و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که برخی از ترکیبات فنولی در عصاره حاصل از روش سیال فوق داغ در دماهای ۵۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد وجود نداشتند؛ درحالی‌که همین ترکیبات در عصاره حاصل از این روش استخراج در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد شناسایی شدند [۳٤]. همچنین ذکر این نکته ضروری است که تجزیه ترکیبات فنولی می‌تواند در نتیجه فرایند اکسایش اتفاق افتد. در روش سیال فوق داغ، با تزریق گاز نیتروژن به سیستم، اکسیژن از محفظه استخراج حذف می‌گردد که این امر به حفظ مواد موثره عصاره استخراجی کمک می‌نماید [۳۵].

تحقیقات نشان داده است که الکل سرعت و بازده استخراج را به دلیل تخریب دیواره سلولی و افزایش میزان دسترسی مواد قابل حل شدن، افزایش می‌دهد. در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۰۸) در خصوص استخراج ترکیبات فنولی از برگ درخت انار، در بین غلظت‌های متفاوتی از چند حلال مختلف شامل آب، اتانول، متانول و استون، سیستم حلال شامل ٦۱ درصد اتانول و ۳۹ درصد آب، بیش‌ترین بازده استخراج ترکیبات فنولی را داشت. استفاده از دو حلال در استخراج باعث می‌شود، از قدرت هر دو حلال در استخراج ترکیبات زیست فعال با قطبیت‌های متفاوت بهره برد و بازده استخراج را افزایش داد [۳٦].

بر اساس مطالعه Wang و همکاران (۲۰۰۸) و Oiveira و همکاران (۲۰۱۳)، قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی را می‌توان بر اساس مقادیر MIC آن‌ها تقسیم بندی نمود. عصاره‌هایی که دارای مقادیر MIC کمتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشند، ضدمیکروب قوی، عصاره‌های دارای MIC بین ٦۰۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ضدمیکروب متوسط و عصاره‌هایی با مقادیر MIC بالای ۱٦۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، عصاره‌های ضعیف به حساب می‌آیند [۳۷و ۳٦]. با توجه به این تقسیم‌بندی می‌توان گفت با توجه به این‌که عصاره استخراجی از برگ گیاه نورزک به روش متداول با حلال و سیال فوق داغ، بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، همچنین بر مخمر و کپک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

مورد بررسی، در غلظت معادل ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اثر بازدارندگی نشان داده است، عصاره ضدمیکروبی نسبتاً قوی علیه میکروارگانیسم‌های مذکور به‌شمار می‌آید.

مهربان و همکاران (۲۰۱۷)، به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا*[14] علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: 6538)، *انتروکوکوس فکالیس*[15] (ATCC: 21299) ، *سالمونلا تیفی‌موریوم*[16] (ATCC: 14028) و *اشریشیا کلی* (ATCC: 25922) پرداختند. در این پژوهش اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی شد. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نیز روش میکرودایلوشن به‌وسیله الایزا و افزودن معرف تری‌فنیل تترازولیوم کلراید استفاده گردید. بیشترین قطر هاله بازداری در روش انتشار در آگار مربوط به عصاره‌های آبی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* در مقابل باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بود. میزان MIC محاسبه شده در مورد عصاره‌های آبی و اتانولی اندام‌های هوایی باکتری‌های گرم مثبت معادل۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد *اشریشیا کلی* معادل ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. این مقدار برای عصاره‌های هیدروالکلی در مورد باکتری‌های گرم مثبت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد باکتری‌های گرم منفی برابر با ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۳۸]. در تحقیق دیگری اثر ضد میکروبی عصاره برگ نوروزک بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس*[17] و *کلبسیلا نومونیه*[18] بررسی گردیده و تأثیر بازدارندگی این عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقایسه شد. نتایج این تحقیق نشان داد عصاره برگ در مرحله گلدهی گیاه تأثیر قابل‌توجهی بر باکتری‌های فوق داشته به‌طوری که در مواردی تأثیر آن بیش‌تر یا مساوی با آنتی‌بیوتیک‌های مذکور بود. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش اثر ضد میکروبی برگ نوروزک بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌تر از دیگر باکتری‌ها بود. همچنین تأثیر عصاره ریشه نوروزک نیز بر باکتری‌های فوق مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج پژوهش‌های انجام شده، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به عصاره ریشه بودند. از سویی دیگر تأثیر ضد میکروبی عصاره ریشه به ویژه در مرحله رویشی به طور معنی‌داری بیش‌تر از تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مذکور و در مواردی مشابه با تأثیر آن‌ها گزارش گردید [۱۰و ۹]. قاسمی و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره متانولی گیاه ریحان بر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* پرداختند. عصاره متانولی گیاه ریحان اثر ضد باکتریایی معنی‌داری علیه سه باکتری مورد مطالعه نشان داد به این‌صورت که حداقل غلظت مهاری برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* ۰/۵۵۰ و در مورد اشریشیا کلی ۱/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و قطر هاله عدم رشد برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب ۱۵/۲۵، ۱۲/۵۰ و ۱۲/۰۰ میلی‌متر محاسبه شد [۳۹]. تفاوت در قطر هاله عدم رشد، MIC و MBC گزارش شده در مطالعات تحقیقی مختلف می‌تواند به واسطه تفاوت در روش استخراج، حساسیت متفاوت سویه‌های میکروبی مورد آزمون و روش متفاوت در انجام آزمون باشد؛ همچنین تفاوت در واریته‌های گیاه، خشک کردن و شرایط نگهداری پیش از استخراج عصاره نیز بر حصول نتایج متفاوت در تحقیقات مؤثر است [۴۰].

٤-نتیجه‌گیری کلی

یکی از عوامل مهم در میزان خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی، روش استخراج آن‌ها می‌باشد، چرا که قادر است بر نوع و میزان ترکیبات استخراجی تأثیر زیادی بگذارد. علاوه بر آن در هر روش استخراجی، بدست آوردن شرایط بهینه بر اساس پارامترهای مختلف استخراج سبب می‌گردد که بتوان حداکثر خاصیت مورد نظر را در عصاره استخراج شده بدست آورد. نتایج مطالعه حاضر که در زمینه بهینه سازی و مقایسه دو روش استخراج مختلف (استخراج به روش متداول با حلال و استخراج

14. *Salvia khorasanica*
15. *Enterococcus faecalis*
16. *Salmonella typhimurium*
17. *Proteus mirabilis*
18. *Klebsiella pneumoniae*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

با استفاده از روش سیال فوق داغ) عصاره برگ گیاه نوروزک به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنگی و کشندگی عصاره مذکور بر برخی از میکروارگانیسم‌های شاخص در مواد غذایی انجام شد، نشان داد که در صورت دستیابی به شرایط بهینه، هر دو روش از قابلیت قابل قبولی در مهار و یا از بین بردن میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند عامل بیماری یا فساد از طریق مواد غذایی شوند، برخوردارند. براساس نتایج تحقیق حاضر، در هر دو روش استخراج، MIC اکثر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد؛ درحالی که MBC، بسته به نوع میکروارگانیسم بین ۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. در روش استخراج متداول با حلال، تیمار دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۷۵ دقیقه و نسبت مساوی از دو حلال بهترین اثر ضدمیکروبی را بر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون نشان داد؛ این در حالی است که در روش استخراج با سیال فوق داغ دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۰ دقیقه و نسبت حلال آب به اتانول ۸۰ به ۲۰، بهترین روش جهت عصاره‌گیری برگ گیاه نوروزک به منظور دستیابی به بیشترین خاصیت ضدمیکروبی عصاره حاصل معرفی گردید.

۵- منابع

[1] Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidant from winery wastes using subcritical water. The Journal of Subcritical Fluids, 65: 18- 24.

[2] Silvan, M., Mingo, E., Hidalgo, M., Pascual-Teresa, S., Carrascosa, A. V., Martinez-Rodriguez, A. J. (2013). Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against Campylobacter spp. Food Control, 29: 25- 31.

[3] Perumalla, A., Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts -Potential applications in food safety and quality. Food Research International, 44: 827- 839.

[4] Heywood, V. H. (1985). Flowering Plants of the World. Ed. Dod, B., Croom Helm Pub.239.

[5] Rechinger, K. H. (1982). Flora Iranica. N.150, Academishe Druk.u.Verlag sustalt Gratz.

[6] Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. R., Imenshahidi, M., Fazli Bazzaz, B. S (2009). Review of the Pharmacological and Toxicological Effects of *Salvia leriifolia*. Iranian Journaln of Basic Medical Science, 12: 1-8.

[7] Baghi, N. (1996). Antimicrobial effects of Salvia. Thesis of Ph.D. in Pharmacy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.

[8] Jabarzada, M. (1999). Antimicrobial properties of root and plant extracts of Norouzk. Thesis for Ph.D. in Pharmacy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.

[9] Modatter, M., Abrishamchi, P. (2008) Effect of harvesting time on antibacterial activity of *Salvia leriifolia* leaf. Scientific Journal of Tarbiat Moallem University, 8: 343-356.

[10] Modarres, M., Abrishamchi, P. (2009). Antibacterial activity of Salvia leriifolia roots at different stages of growth. Journal of Biology, 23: 717-707.

[11] Sagdic. O, Ozturk. I, Kisi. O. (2012). Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. Expert Systems with Applications, 39: 6792- 6798.

[12] Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., Beumer, R. R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. Food Control, 23: 66-72.

[13] Adamez, J., Samino, E. G., Sanchez, E. V., Gomez, D. G. (2012). In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera L.*). Food Control, 24: 136- 141. Corrales, M., Garcia, A., Butz, P., Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. Journal of Food Engineering, 90: 415–421.

[14] Martin, J., Porto, E., Correa, C., Alencar, M., Gloria, E., Cabral, I., Aquino, L. (2012). Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. Journal of Natural Products, 5: 27- 3612.

[15] Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C. (2013). Modeling and kinetics study of conventional and assisted bath solvent extraction. Chemical Engineering Research and Design, 92(6): 1169-1186.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

some Chinese plant extracts. Journal of International Antimic, 17: 527- 529.

[24] Fernandes, F. H. A., Santana, C. P., Santos, R. L., Lidiane P. Correia, L. P., Conceicao, M. M., Macedo, R. O., Medeiros, A. C. D. (2013). Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 113 (2): 443–447.

[25] Endo, E. H., Cortez, D., Nakamura, T., Nakamura, C., Filho, B. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against Candidaalbicans. Research in Microbiology, 161: 534-540.

[26] Qu, W., Li, P., Hong, J., Liu, Z., Chen, Y., Breksa, A. P., Pan, Z. (2014). Thermal stability of liquid antioxidative extracts from pomegranate peel. Journal of Science Food and Agriculture, 94: 1005- 1012.

[28] Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. Journal of Ethnopharmacology, 143: 397- 405.

[29] Furneri, P., Marino, M., Saija, A., Uccella, A., Bisignano, N. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. Antimicrobial Agents, 20: 293-296.

[31] Porto. C., Porretto. E., Decorti. D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) seeds. Ultrasonics Sonochemistry, 20: 1076-1080.

[32] Shang, Y. F., Kim, S. M., Um, B. H. (2014). Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. Food Chemistry, 154: 164–170.

[33] Dormaz, G., Gokmen, V. (2011). Changes in oxidative stability, antioxidant capacity and phytochemical composition of Pistacia terebinthus oil with roasting. Food Chemistry, 128(2): 410-414.

[34] Plama, M., Pinerio, Z., Barroso, C. (2001). Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. Chromatography, 921: 169-174.

[16] Corrales, M., Garcia, A., Butz, P., Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. Journal of Food Engineering, 90: 415–421.

[17] Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. Food Research International, 46: 505- 513.

[18] Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A ,.Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. Journal of Food Engineering, 117: 426-436.

[19] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2015). Measuring the moisture content of sugar by weight loss due to drying. National Iranian Standard, No. 5194.

[20] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2010). Cereals and its products, Humidity measurement method, Reference method. National Iranian Standard, No. 2075.

[21] Marino, C., Rivas-Gonzalo, C., Ibanez, E., Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. Analytica Chimica Acta, 563: 44- 50.

[20] Iturriaga, L., Olabarrieta, I., Martinez de Maranon, I. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against Listeria innocua and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. International Journal of Food Microbiology, 158: 58–64.

[21] Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods. 81: 121-126.

[22] Ellof, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica, 64: 711–713.

[23] Duffy, C. F., Power, R. F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

[35] He, L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z., Gao, Y. (2011). Identufication of phenolic compounds from pomegranate seed residues and investigation in to their antioxidant capacities by HPLC assay. Food Research International, 44(5): 1161-1167.

[36] Wang, Y., He, H., Yang, J., De, Y., Hao, X. (2008). New monoterpenoid coumarins from Clausena anisum-olens. Journal of Molecules, 13: 931- 937.

[37] Oliveira, D., Salvador, A., Smânia, A., Smânia, Jr.E., Maraschin, M., Ferreira, S. (2013). Antimicrobial activity and composition profile grape pomace extracts obtained by supercritical fluid. Journal of Biotechnology, 164: 423- 432.

[38] Mehraban, A., Edalatian dovan, M. R., Haddad khodaparast, M. H. Mehraban Sang Atash, M. (2017). Antimicrobial effect of the aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts of Salvia chorasanica (*Salvia chorasanica*) on some bacteria causing corrosivity and poisoning. Journal of Food Science and Technology, 14 (66): 227-217.

[39] Ghasemi, A., Golshahi, H., Mehranzadeh, A. (2011). Antimicrobial effect of alcoholic extract of basil (*Ocimum basilicum*) on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. First International Congress of Medical Bacteriology, Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

[40] Nuamsetti, T., Dechayuenyong, P., Tantipailbulvut, S. (2012). Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils, ScienceAsia, 38: 319-322.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]

Comparative study on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the *Salvia leriifolia* leaf extract using traditional and superheated solvent extraction on some of the food microorganisms

Sarabi-Jamab, M.[1*], Kaveh, M. [2], Modarres, M. [3]

1. Associate Professor, Food Biotechnology Department, Research Institute Of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
2. PhD. Student, Food processing Department, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of basic Science, Farhangian University, Mashhad, Iran

(Received: 2019/06/01 Accepted: 2020/06/09)

Abstract: In this research extraction of *Salvia leriifolia* leaf was carried out using two extraction methods including traditional solvent extraction (with different solvent ratio of water /ethanol 50:50, 60:40 and 70:30 at temperature 70, 80 and 90 ºC and time duration of 30, 75 and 120 min), and superheated solvent extraction (at temperature 130, 145 and 160 ºC, time duration of 10, 20 and 30 minutes and solvent ratio of water/ethanol 60:40, 80:20 and 100:0) and the antimicrobial activity of extracts against some of food microorganisms including *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* using minimum inhibition concentration and minimum bactericidal concentration methods were measured. In both extraction methods, the MIC of most microorganisms was 0.5 mg/ml, while the MBC, depending on the microorganism, was between 5 and 500 mg/ ml. In the conventional solvent extraction procedure, the treatment was carried out at a temperature of 80 ° C, 75 minutes, and equal ratio of two solvents, and in superheated solvent extraction method, treatment including temperature of 160 ° C, time of 20 minutes, and water/ Ethanol ratio of 80 to 20 showed the most antimicrobial activity. Based on the results, it can be stated that the type of plant extraction method has a significant effect on inhibiting or preventing the growth of food borne or spoilage microorganisms, and if any of the plant extraction technique are optimized, they can be better used to increase the shelf life of food.

Key words: Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Salvia, superheated solvent extraction.

*Corresponding Author E-Mail Address: Mahboobe Sarabi-Jamab

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-19]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.45]