

بهینه سازی استخراج عصاره ازگیل با استفاده از روش مخلوط و اثر آن بر تعدادی از باکتری های عامل عفونت در شرایط آزمایشگاهی

فریده طباطبایی یزدی^{۱*}، بهروز علیزاده بهبهانی^۲، علی الغونه^۲، حسین زنگانه^۳

۱- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۷)

چکیده

ازگیل با نام علمی *Mespilus germanica* به عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند در طب سنتی در ایران استفاده فراوانی دارد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نسبت‌های مختلف حلال‌های گلیسرین، اتانول، متانول و آب بر میزان بازدهی استخراج عصاره گیاه ازگیل با روش‌های هندسه بهینه مخلوط، بهینه سازی فرمولاسیون حلال بوده، همچنین تاثیر ضد میکروبی عصاره ازگیل به سه روش انتشار در آگار، حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی روی سه میکرو ارگانیزم عامل بیماری‌های عفونی در این تحقیق ارزیابی شد. تاثیر هر یک از حلال‌های آب، اتانول، متانول و گلیسرین هر کدام در پنج سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از هندسه مخلوط برای استخراج عصاره گیاه ازگیل استفاده شد. برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری از آزمون انتشار در آگار جهت بررسی قطر هاله بازدارندگی عدم رشد، حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی به روش رقت سازی در چاهک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که مدل چند جمله‌ای شیف به طور معنی‌داری قادر به پیش‌بینی بازده استخراج عصاره گیاه ازگیل می‌باشد. حداقل غلظت مهار کنندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس انروژینوزا* به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بررسی تجربی فضای بهینه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نتایج خروجی از بهینه سازی عددی و نتایج تجربی وجود ندارد. بر این اساس، فرمولاسیون بهینه حاوی گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۳/۷ میلی‌لیتر)، متانول (۱۰۰/۲ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۲۶/۱ میلی‌لیتر) بود. به طور کلی عصاره گیاه ازگیل به خوبی قادر است از رشد باکتری‌های عامل عفونت جلوگیری نماید. همچنین روش آماری مخلوط بررسی فرآیند استخراج با حداقل آزمایشات را مهیا می‌سازد.

کلید واژگان: ازگیل، بهینه سازی، باکتری های عامل عفونت، هندسه مخلوط

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

حاوی ماده‌ای به نام تانن است که بهترین دارو برای درمان عفونت های رودی بزرگ به شمار می رود. ازگیل همچنین دارای قند، آمینو اسید و اسیدهای آلی نیز می باشد [۱۱].

طراحی فرمولاسیون با استفاده از روش های آماری مخلوط برای نخستین بار توسط شیف و همکاران (۱۹۵۱) معرفی شد، که در آن طرح های شبکه سادک و مدل های چند جمله ای مربوط به آن ارائه شده است. کورنل تقریباً کلیه مقالات آماری چاپ شده راجع به طرح های مخلوط را در سال ۱۹۷۳ مرور کرد و کتابش را در سال ۱۹۸۱ به نام (آزمایشات با مخلوط ها) منتشر نمود [۱۲].

اخیراً اصلاح بهینه سازی^۱ رواج یافته است. به نظر می رسد که این اصلاح بسته به موضوع مورد نظر، شامل توسعه محصول، تولید، مدیریت کیفیت و یا حتی تبلیغات و بازاریابی، دارای معنای متفاوتی می باشد. مفهوم بهینه سازی عبارت است از تهیه طرحی دقیق به نحوی که بالاترین احتمال دستیابی به پاسخ مورد نظر وجود داشته باشد [۱۳].

روش های مخلوط به طور موفقیت آمیزی برای مدل سازی و بهینه سازی در حوزه میکروبیولوژی به کار رفته اند که از جمله می توان به استفاده از طرح های آزمایشی مخلوط برای بررسی اثر گونه های متفاوت نمک کلراید بر پارامترهای رشد لاکتوباسیلوس پنتوسوس [۱۴]، استفاده از طرح های آزمایشی مخلوط برای بهینه سازی بستر کشت رشد مخمرهای غنی شده با سلونیوم [۱۵]، استفاده از سیستم های مخلوط برای فرمولاسیون مواد دارویی [۱۶]، بهینه سازی ترکیب قرص گلی بنکلامید با استفاده از روش های مخلوط و گرماسنجی افتراقی [۱۷] و بهینه سازی شرایط کشت برای تولید اتانول از شیربه سورگوم به وسیله مخمر تثبیت شده ساکارومیسس سرویزیا [۱۸] اشاره نمود.

بیماری های عفونی در زمره شناخته شده ترین بیماری های هستند که همواره گریبان گیر انسان بوده و باعث تحمیل خسارت های جانی و مالی بسیار شده اند. تلاش های زیادی جهت شناخت عوامل ایجاد کننده درمان و کنترل بیماری های عفونی صورت گرفته است [۱]. با توجه به اینکه بخشی مهمی از علل بیماری های عفونی مربوط به باکتری های /شرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس اثرورینوزا می باشد و از آنجا که جهش کروموزمی در باکتری ها بسیار بیشتر از موجودات دیگر می باشد، لذا میکرووب ها مرتب تغییر می کنند، این تغییرات ممکن است باعث ظهور بیماری های عفونی نوپدید منجر شده و لذا یافتن ترکیبات طبیعی و جدید جهت درمان این قبیل میکروارگانسیم های عامل عفونت ضروری و لازم به نظر می رسد [۲].

ازگیل با نام علمی (*Mespilus germanica*) که در زبان گیلکی به آن کونوس یا گُنوس و در زبان مازندرانی کنس و کندس می گویند، میوه ای است از خانواده گلسرخیان از سرده ازگیل ها (*Mespilus*) می باشد [۳]. میوه ازگیل بسیار سخت و اسیدی است و تا زمانی که خوب رسیده نشود قابل خوردن نیست [۴]. از ازگیل جهت تهیه شربت و کنسرو ازگیل نیز استفاده می شود [۵]. در حال حاضر ازگیل در همه ی جنگل های شمال ایران از ارسباران تا چناران (بجنورد) و در همه ی بلندی های کرانه های دریا در دامنه جنوبی البرز و مناطق استپی می روید [۶]. خواص دارویی ازگیل از روزگاران بسیار دور مورد توجه بوده است [۷]. گیاه ازگیل در درمان آبسه دهان و گلو، آنژین، درمان برفک، سالک، اسهال، منظم کننده کار روده ها، ورم گلو و ناراحتی های حلق موثر می باشد [۸ و ۹]. به طور کلی ازگیل به عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند و یک گیاه سنتی در کشورهای آسیایی بسیار مورد توجه می باشد و از این گیاه در طب سنتی استفاده می کنند [۱۰]. ازگیل سرشار از ویتامین های گروه B و C می باشد لذا در تقویت اعصاب و در کم خونی ناشی از فقر آهن مفید است. ازگیل

عصاره به آرامی عمل همزدن درون انکوباتور ادامه یافت تا هر یک از حلال‌های به طور مناسب و موثر با تمامی اجزا و ترکیبات پودر ازگیل برهمکنش ایجاد کرده و به طور کامل ترکیبات تشکیل دهنده استخراج شده و باعث بالا رفتن درصد ترکیبات در عصاره‌های حاصل شود. بعد از طی ۷۲ ساعته ارلن‌های حاوی عصاره ابتدا از کاغذ صافی واتمن عبور داده شده سپس جهت انجام عمل شفاف سازی بیشتر از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. جهت استریل نمودن عصاره‌ها از اشعه UV استفاده شد. جهت حذف هر گونه حلال از عصاره‌ها از اواپراتور تحت خلا استفاده گردید. سپس تا انجام آزمایش‌ها عصاره‌های بدست آمده از هر یک از حلال‌ها در ظروف جداگانه داری فویل آلومینیومی به دور از نور، در درجه حرارت یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۹].

۲-۲- سویه های میکروبی

در این پژوهش آزمایشگاهی از ۳ سویه استاندارد میکروبی *Escherichia coli* PTCC 1330 و *Staphylococcus aureus* PTCC 1337 و *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310 استفاده شد.

۲-۳- تعیین وزن خشک عصاره‌ها

برای تعیین وزن خشک هر یک از عصاره ها از روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا یک لوله آزمایش توسط ترازوی دیجیتال به دقت (۰/۰۰۰۱) توزین سپس ۱ ml از عصاره‌ها در آن ریخته شد. محتوی لوله که حاوی ۱ ml از هر عصاره در دمای اتاق (۲۵) درجه سانتی گراد) خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره-ها، وزن لوله آزمایش مجدداً توسط ترازوی دیجیتال تعیین گردید. اختلاف وزن لوله معادل ۱ ml از عصاره‌ها، است. این روش سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک گزارش شد [۲۰].

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نسبت‌های متفاوت از حلال‌های گلیسرین، اتانول، متانول و آب بر میزان بازدهی عصاره‌ی گیاه ازگیل با استفاده از روش هندسه بهینه مخلوط، بهینه سازی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره گیاه ازگیل و در انتها بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه ازگیل به سه روش انتشار در آگار، حداقل غلظت مهار کنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی بر سه میکرو ارگانیسم عامل بیماری-های عفونی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری میوه ازگیل و عمل عصاره

گیری

در این مطالعه تجربی، میوه تازه ازگیل از شهرستان علی آباد کتول در استان گلستان جمع آوری شد. پس از تایید جنس و گونه این گیاه توسط هرباریوم دانشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، برای تهیه عصاره مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه عصاره، از روش خیساندن^۲ استفاده شد. برای انجام عمل عصاره گیری ابتدا جهت حذف رطوبت اضافه، میوه ازگیل به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط و در محلی به دور از آفتاب (سایه) خشک گردید. سپس بعد از خشک شدن گیاه ازگیل، گیاه مورد نظر توسط دستگاه آسیاب برقی کاملاً پودر گردید و درون ظروف شیشه ای نگهداری شد. برای تهیه عصاره‌های مختلف متانولی، اتانولی، آبی و گلیسرینی ابتدا ۵۰ گرم از پودر ازگیل به ۲۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌ها مورد استفاده در این پژوهش اضافه گردید. هر یک از ارلن‌های حاوی پودر ازگیل و حلال را بعد از اینکه درب آن‌ها را با پارا فیلم بسته به مدت ۷۲ ساعت در درون انکوباتور مجهز به سیستم لرزان قرار گرفت تا عمل همزدن صورت پذیرد. جهت استخراج

2. Maceration

۲-۴- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های**ازگیل**

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره های ازگیل از سه روش استاندارد میکروبی شامل، آزمون انتشار در آگار جهت بررسی قطر هاله بازدارندگی عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به روش رقت سازی در چاهک^۳ مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵- آزمون انتشار دیسک به روش**کربی- بوئر**

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های ازگیل به روش کربی- بوئر، ابتدا سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری هایی که از قبل کشت داده شده بود و به مدت ۲۴ ساعت از کشت آن ها می گذشت تهیه و سپس توسط اسپریدر شیشه‌ای استریل (کشت چمنی) بر سطح آگار پخش شد. دیسک‌هایی که قبلا در غلظت‌های مشخص عصاره (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰) خیس‌انده شده بودند با فاصله مشخص از یکدیگر، توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردید. پس از آن پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت شدند. اثر ضد میکروبی براساس هاله عدم رشد در مقیاس میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت [۲۱ و ۲۲].

۲-۶- تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی**(MIC)**

حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره های متانولی، اتانولی، آبی و گلیسرینی با استفاده از روش رقت سازی در چاهک (میکروبراث دایلوژن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت های استریل ۹۶ خانه ای استفاده شد. محلول

استوک عصاره در دی متیل سولفوکساید تهیه گردید و در غلظت های مختلف عصاره (از ۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی گرم در میلی لیتر) با رقیق سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هیتتون براث تهیه شد. باکتری ها به مدت ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شدند. سپس بعد از انجام تلقیح باکتری ها و پر کردن چاهک ها جهت تهیه میکروپلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از طی ۲۴ ساعت میزان کدورت توسط دستگاه الیزا ریدر (بیوتک اینسترومنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. اولین خانه ای که در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد [۲۳].

۲-۷- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

با توجه به نتایج حاصله از حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد، از تمام خانه هایی که رشد باکتری های عامل عفونت در آن ها کاملا متوقف شده بود، به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) گزارش شد. آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد [۲۴].

۲-۸- طرح آزمایشی

در این پژوهش آزمایشگاهی، به منظور مطالعه‌ی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره ازگیل، اثر آب، اتانول، گلیسرین و متانول هر کدام در ۵ سطح (۰، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی لیتر) با استفاده از طرح آزمایشی مخلوط-بهینه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در تمامی فرمولاسیون ها نسبت حلال به گیاه ازگیل ۵ به ۱ بود. طرح شامل بیست آزمایش بوده که ۱۰ آزمایش مربوط به تخمین ضرایب مدل، پنج آزمایش مربوط به آزمون ضعف برازش، پنج آزمایش برای محاسبه خطای تصادفی در نظر گرفته شده است.

جدول ۱ فرمولاسیون های مختلف حلال، برای استخراج عصاره گیاه ازگیل

کد تیمار	آب	اتانول	متانول	گلیسرین
۱	۰	۲۵۰	۰	۰
۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵
۳	۲۵۰	۰	۰	۰
۴	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۵	۰	۱۲۵	۱۲۵	۰
۶	۰	۲۵۰	۰	۰
۷	۰	۰	۰	۲۵۰
۸	۱۲۵	۱۲۵	۰	۰
۹	۱۲۵	۰	۱۲۵	۰
۱۰	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵
۱۱	۰	۰	۲۵۰	۰
۱۲	۶۲/۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۶۲/۵
۱۳	۰	۰	۱۲۵	۱۲۵
۱۴	۰	۰	۲۵۰	۰
۱۵	۰	۰	۰	۲۵۰
۱۶	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۱۷	۱۲۵	۰	۰	۱۲۵
۱۸	۱۲۵	۰	۰	۱۲۵
۱۹	۰	۱۲۵	۰	۱۲۵
۲۰	۲۵۰	۰	۰	۰

۲-۹- آنالیز آماری

آن بوده، دارای درجه مشابه و تعداد اجزای یکسان می باشد [۱۲].

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (1)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (2)$$

$$X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n = 1 \quad (3)$$

در معادلات مذکور y به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده و β_j ضرایب جملات خطی، β_{ijk} ضرایب جملات غیر خطی دوتایی و β_{ijki} ضرایب جملات غیر خطی سه تایی، به

در این پژوهش به منظور مدل سازی بازدهی استخراج از چند جمله ای شف^۴ (معادله ۱) استفاده گردید، این معادله فرم اصلاح شده بسط تیلور درجه دوم (معادله ۲) می باشد، که به علت رابطه خاص (معادله ۳) میان n جزء در یک هندسه مخلوط به وجود آمده است. تفاوت آشکار میان بسط تیلور و چند جمله ای شف در این است که چند جمله ای شف فاقد جملات ثابت و درجه دوم محض می باشد. لیکن مدل چند جمله ای شف شکل مشتق شده بسط تیلور می باشد و معادل

4. Scheff polynomial

از رشد این باکتری جلوگیری نماید. همچنین با افزایش غلظت عصاره مورد استفاده قطر هاله عدم رشد به صورت معنی داری رو به افزایش است، به نحوی که در غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر میزان قطر هاله عدم رشد ۲۷/۸ میلی متر گزارش شد. نتایج نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد روی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به طور معنی داری کم تر از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد، به نحوی که در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره از گیله نتوانست از رشد باکتری های *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* جلوگیری کند. نتایج نشان داد که کم ترین اثر بازدارندگی عصاره از گیله بر باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* می باشد در حالی که بیشترین اثر بازدارندگی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت کشندگی برای باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج حاصل از بررسی اثر برهمکنش اثرات حلال ها (متانول، اتانول، گلیسرین و آب) بر استخراج عصاره گیله از گیله در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۹۴ بود و همچنین عدم معنی دار بودن ($P_{value} < 0/05$) آزمون ضعف برازش (نشانه ای از ضعف داده های آزمایشی برای یک مدل است که در آن نقاط، مدل نمی تواند خطای تصادفی داده های آزمایشی را محاسبه کند) که این امر نشان دهنده مناسب بودن مدل چند جمله شف برای استخراج عصاره گیله از گیله می باشد (جدول ۴). یکی دیگر از شاخص های کارایی مدل های رگرسیونی میزان Q -squared می باشد. Q -squared نشان می دهد که مدل چقدر می تواند پاسخ ها را برای شرایط آزمایشی جدید پیشگویی کند برعکس ضریب

علاوه از X به عنوان اثرات خطی مخلوط و XX ، XXX به عنوان اثرات غیر خطی مخلوط به صورت دوتایی و سه تایی استفاده شده است. لازم به ذکر می باشد که بعد از مرحله بهینه سازی استخراج عصاره گیله از گیله، برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره مذکور، ابتدا در هشت سطح غلظت (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر) محلولی تهیه شده و اثر ضد میکروبی آن را بر روی *Escherichia coli* PTCC 1330، *aureus* PTCC 1337، *Staphylococcus* و *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310 در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته است. برای مدل سازی اثر ضد میکروبی از بسط تیلور درجه اول (معادله ۴) استفاده گردیده است؛ همچنین به منظور بررسی آنالیز واریانس و میزان معنی داری ($P_{value} < 0/05$) اثرات ضد میکروبی عصاره برگ گیله حرا از نرم افزار Minitab 16 استفاده گردید.

(۴)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + e$$

۲-۱۰- بهینه یابی فرایند

بهینه یابی در واقع یک سری محاسبات ریاضی محض می باشد که خصوصیت مطلوب پاسخ را طوری تعریف می کند که فرمولاسیون و شرایط فراوری بهینه بتواند تهیه شود. به عبارت دیگر در این روش یک یا چند تابع هدف تعریف می شود و سپس عملیات بیشینه کردن یا کمینه کردن آن صورت می پذیرد. لازم به ذکر می باشد که در روش های بهینه سازی کلاسیک اثرات برهمکنش بین متغیرها نادیده گرفته می شود. به منظور غلبه بر این مشکل بهینه سازی تک متغیره، در این پژوهش از متدولوژی مخلوط که بهینه سازی همزمان چندین متغیره را انجام می دهد بهره گرفته شده است [۱۳].

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی به روش انتشار در آگار به روش کربی-بوئر در شکل ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی عصاره از گیله روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد و در کم ترین غلظت مورد بررسی (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) توانسته

هدف از بهینه یابی، افزایش بازدهی عصاره گیاه ازگیل می باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسرین (صفر میلی لیتر)، آب (۲۳/۷ میلی لیتر)، متانول (۱۰۰/۲ میلی لیتر) و اتانول (۱۲۶/۱ میلی لیتر) بود. جهت حصول اطمینان از صحت عملیات بهینه سازی از شاخص تابع مطلوبیت کلی و همچنین بررسی تجربی فضای بهینه استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان تابع مطلوبیت کلی برابر با یک می باشد و همچنین تفاوت معنی داری بین نتایج خروجی از بهینه سازی عددی و نتایج تجربی مشاهده نشد (جدول ۵) که هر دو عامل نشان دهنده صحت بالای عملیات بهینه یابی می باشند. به منظور مدل سازی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه ازگیل از شاخص قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) استفاده شد. نتایج حاصل از مدل سازی رگرسیونی در جدول ۶ آورده شده است. نتایج نشان داد که بسط تیلور درجه اول به طور معنی داری ($p < 0/05$) قادر به پیش بینی شاخص قطر هاله عدم رشد می باشد، بدین ترتیب که میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۳ بود. همچنین نتایج نشان دهنده برهمکنش معنی دار غلظت عصاره و نوع باکتری بر میزان هاله عدم رشد می باشد (جدول ۶). یکی دیگر از شاخص های کارایی مدل های رگرسیونی آزمون کفایت دقت (Adequacy precision) می باشد. این شاخص دامنه خروجی مدل در نقاط آزمایشی را با میانگین خطای پیش بینی شده توسط مدل مقایسه می کند. برای یک مدل با دقت بالا مقدار شاخص مذکور حداقل باید ۴ باشد. در این پژوهش میزان پارامتر کفایت دقت ۱۵/۸۶ بدست آمد.

تبیین، Q-squared خوبی برازش یک مدل را دست پائین گزارش می کند. میزان Q-squared در این پژوهش ۰/۹۱ به دست آمده که همان طور که اشاره شد نشان دهنده توانایی بالای مدل برای برآورد پاسخ ها در شرایط جدید آزمایشی و مطلوب بودن قالب آزمایشی هندسه مخلوط بهینه برای تحلیل آماری فرایند استخراج با حداقل آزمایشات ممکن می باشد. نتایج حاصل از استخراج عصاره گیاه ازگیل توسط حلال ها (متانول، اتانول، گلیسرین و آب) به روش هندسه مخلوط در شکل های ۲ تا ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد که در یک نسبت ثابت از گلیسرین با نزدیک شدن به فضای محوری هندسه آزمایش (ترکیب اتانول و متانول)، میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p < 0/05$) افزایش پیدا کرد. همچنین با توجه به شکل های ۳ و ۴ در یک میزان ثابت از متانول و اتانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p < 0/05$) کاهش یافته است، بیشترین میزان بازدهی را می توان در سطوح برابر متانول و اتانول به دست آورد. نتایج نشان داد که اثر حلال آب بر راندمان استخراج عصاره گیاه ازگیل به صورت غیر خطی می باشد، بدین صورت که تا هنگامی که حدود ۲۵٪ در فرمولاسیون کل حلال از آب استفاده شود تاثیر مثبتی بر راندمان استخراج عصاره گیاه ازگیل می توان مشاهده نمود، اما زمانی که میزان حلال آب از این محدوده بیشتر شود میزان استخراج عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p < 0/05$) کاهش می یابد، دلیل این امر را می توان به قطبیت حلال نهایی مرتبط دانست. بدین صورت که با توجه به بالا رفتن قطبیت کل حلال و کاهش برهمکنش حلال نهایی با پودر گیاه ازگیل میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p < 0/05$) کاهش می یابد.

جدول ۲ نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ازگیل

MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	میکروارگانیزم
۲/۵	۱/۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس
۵	۲/۵	اشرشیا کلی
۱۰	۵	سودوموناس اثرورژینوزا

جدول ۳ نتایج آنالیز واریانس داده های درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل

نتایج	اندیس p	اندیس F	میانگین مجموع مربعات	درجه آزادی	معنی دار
Model	۰/۰۰۰۴	۲۵/۵۹	۱۴/۸۷	۱۳	
Linear	۰/۰۰۰۱	۹۹/۴۶	۵۷/۵۸	۳	
AB	۰/۰۲۴	۹/۷۷	۵/۶۵	۱	
AC	۰/۴۳۶	۰/۶۹۵	۰/۶۲۰	۱	
AD	۰/۳۳۶	۰/۹۶۶	۰/۵۵	۱	
BC	۰/۹۲۶	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵۳	۱	
BD	۰/۱۳۲	۳/۰۱۳	۱/۷۵	۱	
CD	۰/۸۸	۰/۰۳	۰/۰۱	۱	
ABC	۰/۰۹	۳/۹۳	۲/۲۵	۱	
ABD	۰/۱۸	۲/۲۸	۱/۳۲	۱	
ACD	۰/۸۸	۴/۱۳	۲/۲۹	۱	
BCD	۰/۰۲۰	۹/۷۲	۵/۶۴	۱	
Residual			۰/۵۷	۶	
Lack of Fit	۰/۱۷	۲/۴۷	۱/۱۴	۱	عدم معنی داری
Pure Error			۰/۴۶۵	۵	
Cor Total				۱۹	

A= آب B=اتانول C=متانول D=گلیسرین

جدول ۴ ضرائب مدل رگرسیونی شیف و شاخص های آماری کارایی مدل

A	B	C	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD	R ²	R ² ADJ	MSE	RMSE
۸/۸۷	۱۵/۶۲	۱۲	۵/۵	۱۰	۲/۸	۲/۵	۰/۳	۵/۹	۰/۵۱	۱۸۲	۱۳۹	۱۸۴	۰/۹۸	۰/۹۴	۰/۷	۰/۸۳

جدول ۵ شرایط و نتایج بهینه یابی فرایند استخراج عصاره گیاه ازگیل

متغیرها	هدف	میزان بهینه	میزان تجربی	کم ترین میزان	بیشترین میزان
میزان آب	در محدوده	۲۳/۷	۲۳/۷	۰	۲۵۰
میزان اتانول	در محدوده	۱۲۶/۱	۱۲۶/۱	۰	۲۵۰
میزان متانول	در محدوده	۱۰۰/۲	۱۰۰/۲	۰	۲۵۰
میزان گلیسرین	کمینه	۰	۰	۰	۲۵۰
درجه استحصال	بیشینه	۱۹/۲۵	۱۸/۷	۵	۱۶

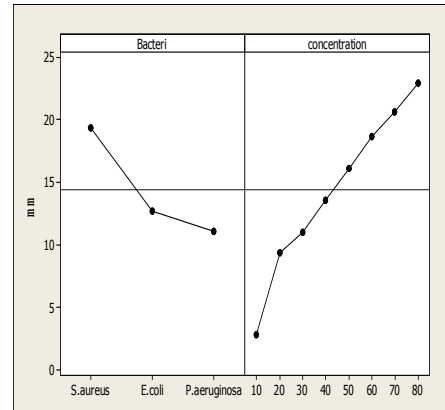
جدول ۶ نتایج آنالیز واریانس و ضرائب مدل برازش یافته بر داده های قطر هاله عدم رشد عصاره گیاه

اندیس p ^c	میانگین مجموع مربعات	مجموع مربعات	ضرائب	درجه آزادی	منبع
۰/۰۰۰	۴۶۰/۰۲	۹۲۰/۰۵	-۰/۴۲	۲	C ₁ ^a
۰/۰۰۰	۳۹۱/۲۹	۲۷۳۹/۰۶	۰/۹	۷	C ₂ ^b
۰/۰۰۰	۱/۲۳	۱۷/۲۰	۰/۰۸	۱۴	C ₁ C ₂
	۰/۱۷	۷/۹۲		۴۸	Error
				۷۱	Total

a- نوع باکتری

b- غلظت حلال

C - سطح معنی داری ($p < 0.05$)



شکل ۱ نمودار قطر هاله بازدارندگی به روش کربی- بوئر بر حسب میلی متر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس

اثرورژینوزا

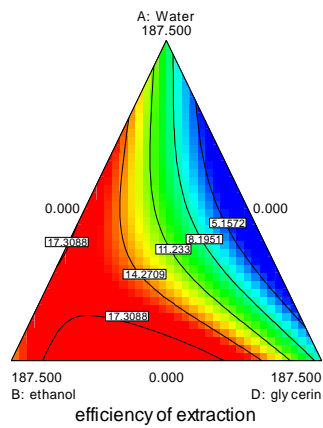
Design-Expert® Software

efficiency of extraction



X1 = A: Water
X2 = B: ethanol
X3 = D: glycerin

Actual Component
C: methanol = 62.500



(الف)

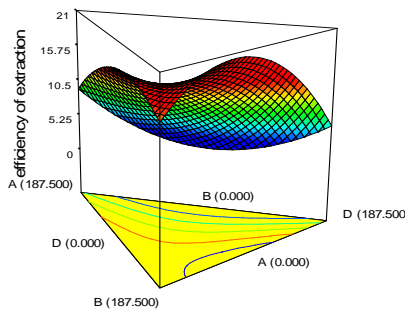
Design-Expert® Software

efficiency of extraction



X1 = A: Water
X2 = B: ethanol
X3 = D: glycerin

Actual Component
C: methanol = 62.500



(ب)

شکل ۳ تاثیر تغییرات حلال های آب، اتانول و گلیسرین بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ۶۲/۵ میلی لیتر متانول الف- نمودار تراز (کانتور)، ب- نمودار سطح پاسخ.

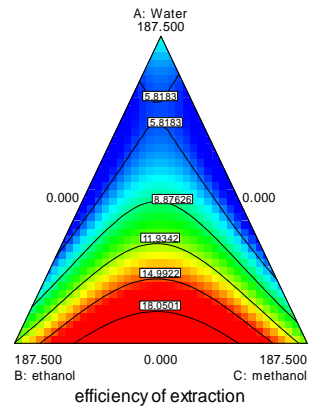
Design-Expert® Software

efficiency of extraction



X1 = A: Water
X2 = B: ethanol
X3 = C: methanol

Actual Component
D: glycerin = 62.500



(الف)

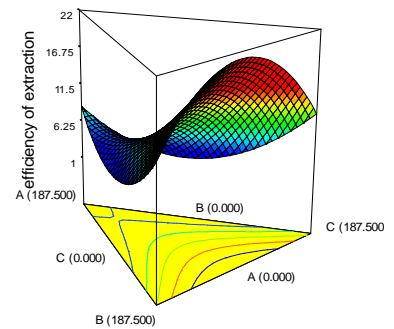
Design-Expert® Software

efficiency of extraction



X1 = A: Water
X2 = B: ethanol
X3 = C: methanol

Actual Component
D: glycerin = 62.500



(ب)

شکل ۲ تاثیر تغییرات حلال های آب، اتانول و متانول بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ۶۲/۵ میلی لیتر گلیسرین الف- نمودار تراز (کانتور)، ب- نمودار سطح پاسخ.

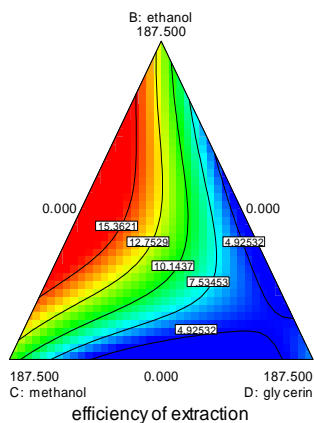
Design-Expert® Software

efficiency of extraction



X1 = B: ethanol
X2 = C: methanol
X3 = D: glycerin

Actual Component
A: Water = 62.500



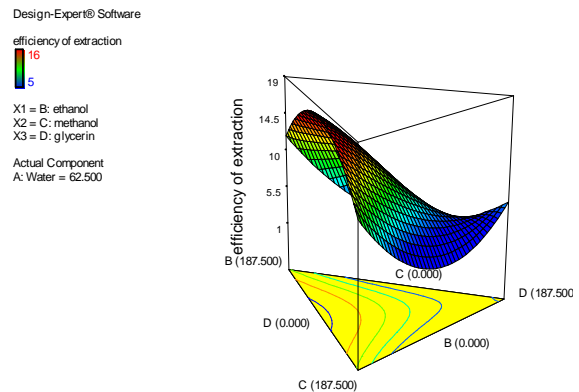
(الف)

منحصر به فردی است لذا در این پژوهش اثر ضد باکتریایی عصاره های ازگیل بر روی سه گونه عامل عفونی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد بر باکتری *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به طور معنی داری کم تر از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد، به نحوی که در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ازگیل نتوانست از رشد باکتری های *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* جلوگیری کند. همچنین نتایج نشان داد که کم ترین اثر بازدارندگی عصاره ازگیل بر باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* می باشد، در حالی که بیشترین اثر بازدارندگی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. وسیعی و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی خرفه را بر ۵ سوش عامل بیماری های عفونی و مسمومیت زا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره اتانولی خرفه دارای اثر ضد میکروبی به مراتب بیشتر از عصاره آبی خرفه می باشد. همچنین این پژوهشگران نشان دادند که اثر ضد میکروبی عصاره های خرفه دارای اثر ضد میکروبی بیشتری روی باکتری های گرم مثبت دارامی باشند [۲۶].

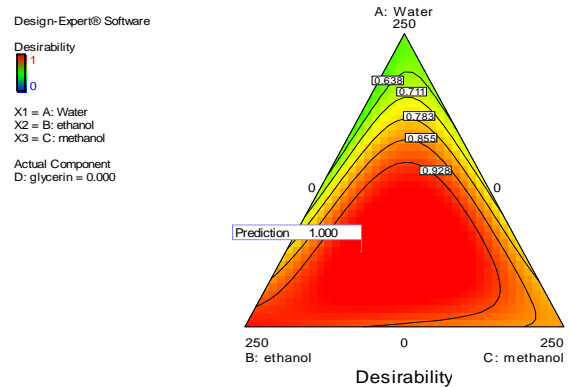
نتایج نشان داد که در یک نسبت ثابت از گلیسرین با نزدیک شدن به فضای محوری هندسه آزمایش (ترکیب اتانول و متانول)، میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p < 0.05$) افزایش پیدا کرد. همچنین با توجه به شکل های ۴ و ۵. در یک میزان ثابت از متانول و اتانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p < 0.05$) کاهش یافته است، و بیشترین میزان بازدهی را می توان در سطوح برابر متانول و اتانول به دست آورد. ممشلو و همکاران (۱۳۹۱)، فعالیت آنتی اکسیدانی و پایداری ترکیبات فنولی ازگیل را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران از حلال های متفاوتی که شامل استون، متانول، اتانول و آب را برای استخراج عصاره ازگیل استفاده کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد ترکیبات فنولی ازگیل وجود دارد. این محققین تفاوت های مشاهده شده بین عصاره های مختلف را به تفاوت در قطبیت حلال های مورد استفاده مربوط دانستند. استخراج ترکیبات مختلف از مواد گیاهی به حلالیت ترکیبات مختلف در حلال های متفاوت بستگی

شکل ۴ تاثیر تغییرات حلال های گلیسرین، اتانول و متانول بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ۶۲/۵ میلی لیتر آب الف- نمودار تراز (کانتور)،



(ب)

شکل ۴ تاثیر تغییرات حلال های گلیسرین، اتانول و متانول بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ۶۲/۵ میلی لیتر آب، ب- نمودار سطح پاسخ.



شکل ۵ تراز ترکیب حلال های مختلف برای استخراج عصاره گیاه ازگیل در فضای بهینه.

بیماری های عفونی ازجمله مشکلات عمده ای است، که بشر از دیرباز با آن دست به گریبان بوده است. با توجه به پدیده بروز مقاومت میکروبی در برابر آنتی بیوتیک ها رایج درمانی و عمل موتاسیون (جهش) در میکروارگانیسم های عامل عفونت، ضرورت دستیابی به ترکیبات طبیعی با فعالیت ضد میکروبی بیشتر احساس می گردد [۲]. از آنجایی که برخی عصاره های گیاهی و ترکیبات شیمیایی آن ها دارای اثرات ضد باکتریایی بوده و به عنوان عوامل ضد میکروبی در درمان عفونت ها به کار می رود و از سوی کشور ایران با توجه به موقعیت جغرافیایی و تنوع آب و هوایی دارای گیاهان دارویی

دارد. به علاوه قطبیت حلال های مورد استفاده نقش کلیدی را در افزایش حلالیت بازی می کند [۲۷].

مسئول خواص ضد باکتریایی عصاره ها و اسانس ها ترکیبات فنلی هستند. تیمول، کارواکرول، پ-سیمن و گاما ترپن فعال ترین ترکیبات فنولی هستند که بخشی عظیمی از اثر ضد میکروبی عصاره های ازگیل را می توان به آن ها نسبت داد. برای توضیح مکانیسمی که به وسیله آن عصاره ها اثرات ضد میکروبی اعمال می نمایند، چند نظریه پیشنهاد شده است. با فرض اینکه عصاره ها از تعداد زیادی اجزاء تشکیل شده اند، پس به احتمال زیاد فعالیت ضد باکتریایی آن ها به واسطه یک مکانیسم عمل خاص نبوده بلکه شامل اهداف متعددی در سلول باکتری می باشد [۲۸]. آسامویک و بوکر (۲۰۰۵)، پیشنهاد نمودند چون متابولیت های ثانویه گیاهی، از جمله عصاره ها، با طیف گسترده ای از اجزای سلولی واکنش داده و می توانند در اهداف خود پاسخ ایجاد نمایند، پس این ترکیبات دارای قابلیت و توانایی تأثیر بر تعداد زیادی از اهداف سلولی هستند [۲۹]. اعتقاد بر این است که اکثر عصاره ها فعالیت های ضد میکروبی خود را از طریق تعامل با فرآیندهای مرتبط با غشای سلولی باکتری ها، از جمله انتقال الکترون، شیب یونی، جابجایی پروتئین، فسفوریلاسیون و سایر واکنش های وابسته به آنزیم، اعمال می کنند [۳۰].

اثر ضد میکروبی بسیاری از گیاهان دارویی احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی است. فلاونوئیدها از جمله ترکیباتی که وجود آن به فراوانی در ازگیل توسط سایر محققین اثبات شده است. این ترکیبات در تمام سلول های فتوسنتزی و از این رو در تمام گیاهان وجود دارند و به طور گسترده ای در میوه، ساقه، گل و برگ گیاهان موجود اند [۳۱]. شریعتی فر و همکاران نشان داد که عصاره اتانولی ازگیل در غلظت ۴۰ درصد تأثیر فوق العاده ای در کاهش قطر زخم ها و تعداد انگل ها در ضایعات لیشمانیوزی دارد [۳۲].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه ازگیل به خوبی از رشد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی جلوگیری نمود. نتایج این مطالعه حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی در مقابل عوامل ضد میکروبی را نشان داد. علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۳) بیان نمودند که باکتری های گرم مثبت حساسیت بیشتری به خواص ضد باکتریایی ترکیبات عصاره های گیاهی نسبت به باکتری های گرم منفی

دارند. این محققان بیان نمودند که باکتری های گرم منفی دارای یک لایه خارجی در اطراف دیواره سلولی خود باشند که به عنوان یک سد نفوذپذیر عمل نموده و دسترسی ترکیبات آبرگیز را محدود می نماید [۳۳]. اغلب مطالعات انجام شده روی اثرات عصاره ها بر میکروارگانیسم های عامل عفونی موافق این مسئله هستند که اثر عصاره ها روی باکتری های گرم مثبت قدری بیشتر از تأثیر آن ها روی باکتری های گرم منفی است [۳۴]. شاید علت حساسیت کمتر گرم منفی ها به اثرات ضد باکتریایی عصاره ها به خاطر غشاء خارجی اطراف دیواره سلولی گرم منفی ها باشد که سبب محدود کردن انتشار اجزاء هیدروفوبیک به لایه لیپوپلی ساکاریدی می گردد. البته گاهی موارد استثنایی نیز مشاهده شده که حساسیت گرم مثبت ها کمتر بوده است، به عنوان مثال *آتروموناس هیدروفیلا* حساسیت زیادی به عصاره ها و اسانس ها نشان می دهد [۳۴]. این مسئله مشخص شده که هر جزء از اجزاء عصاره ها درجات متفاوتی از فعالیت را علیه باکتری های گرم مثبت یا گرم منفی نشان می دهد. همچنین ترکیبات شیمیایی عصاره های به دست آمده از یک گونه گیاهی خاص برحسب اینکه از مناطق مختلف جغرافیایی و یا مراحل مختلف برداشت به دست آمده باشند، می تواند متفاوت باشد. شاید علت تفاوت اثرات عصاره ها بین گرم مثبت ها و گرم منفی ها همین تغییرات در یک نوع عصاره باشد. علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی مرزه بختیاری را بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره مرزه بختیاری دارای اثر ضد میکروبی بیشتری بر روی باکتری گرم مثبت می باشد و در غلظت های پایین قادر است از رشد این باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند، به عبارت دیگر برای اینکه قطر هاله عدم رشد برای یک سوش گرم مثبت و گرم منفی برابر شود باید از غلظت های بالاتری برای باکتری گرم منفی استفاده نمود [۳۵].

وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار میانگین قطر هاله بازدارندگی غلظت های مختلف را می توان به مقدار ماده مؤثر و ترکیبات استخراج شده توسط حلال های متفاوت به کار رفته در عصاره ها نسبت داد. ولی به طوری کلی می توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره ها گیاه ازگیل میزان قطر هاله

عصاره گیاه ازگیل در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای بر روی هر سه سوش میکروبی مورد مطالعه داشت. لذا پیشنهاد می گردد آزمایشات تکمیلی در زمینه شناسایی ترکیب و اجزای تشکیل دهنده عصاره ازگیل انجام گیرد تا در نهایت اقدام ارزنده ای جهت بهبود بیمارهای عفونی ناشی از سوش های مختلف میکروبی انجام گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم مهندس شهناز افشاریان که در انجام آزمایش ها ما را یاری کردند، قدردانی می شود. مقاله علمی - پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۲۹۹۸۷ در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] Abbasi N, Azizi-Jalilian F, Abdi M, Saifmanesh M. A comparative study of the antimicrobial effect of *Scrophularia striata* Boiss. Extract and selective antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants*. 2007; 6(1):10-8. [Persian].
- [2] Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2013; 34(1):1-14.
- [3] Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark J, Morgan DR. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*. 2007; 266(1-2):5-43.
- [4] Ozcan M, Sonmete MH, Ozbek O. Some physical and chemical parameters of wild medlar (*Mespilus germanica*L.) fruit grown in Turkey. *Journal of Food Engineering*. 2005; 69(1):1-7.
- [5] Ayaz F, Demir O, Torun H, Kolcuoglu Y, Colak A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic

عدم رشد افزایش پیدا می کند. نتایج نشان داد که اثر حلال آب بر راندمان استخراج عصاره گیاه ازگیل به صورت غیر خطی می باشد، بدین صورت که تا هنگامی که حدود ۲۵٪ در فرمولاسیون کل حلال از آب استفاده شود تاثیر مثبتی بر راندمان استخراج عصاره گیاه ازگیل می توان مشاهده نمود، اما زمانی که میزان حلال آب از این محدوده بیشتر شود میزان استخراج عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($P < 0/05$) کاهش می یابد، دلیل این امر را می توان به قطبیت حلال نهایی مرتبط دانست. بدین صورت که با توجه به بالا رفتن قطبیت کل حلال و کاهش برهمکنش حلال نهایی با پودر گیاه ازگیل میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($P < 0/05$) کاهش می یابد. اسدی و همکاران (۱۳۹۰) به بررسی اثر عصاره هیدروآلکلی ازگیل بر روی پروماستیگوت لیشمانیا در شرایط آزمایشگاهی پرداختند و دریافتند که با افزایش غلظت عصاره ازگیل تعداد پروماستیگوت ها کاهش می یابد و در نتیجه عصاره برگ ازگیل می تواند به عنوان یک داروی ضد لیشمانیا مورد استفاده قرار گیرد. نتیجه این محققان با یافته های این پژوهش همخوانی دارد [۳۶].

از نتایج حاصل حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ازگیل نیز می توان نتیجه گرفت، بیشترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس اتروژینوزا* بود. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می تون بیان نمود که عصاره گیاه ازگیل دارای اثر ضد میکروبی مناسبی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیزم های عامل بیماری های عفونی است.

۴- نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۹۴ بود و همچنین عدم معنی دار بودن ($P_{value} < 0/05$) آزمون ضعف برازش (نشانه ای از ضعف داده های آزمایشی برای یک مدل است که در آن نقاط، مدل نمی تواند خطای تصادفی داده های آزمایشی را محاسبه کند) که این امر نشان دهنده مناسب بودن مدل چند جمله شف برای استخراج عصاره گیاه ازگیل می باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسیرین (صفر میلی لیتر)، آب (۲۳/۷ میلی لیتر)، متانول (۱۰۰/۲ میلی لیتر) و اتانول (۱۲۶/۱ میلی لیتر) بود. نتایج این پژوهش نشان داد که

- [18] Yu J, Zhang X, Tan T. Optimization of media conditions for the production of ethanol from sweet sorghum juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 2009; 33(3):521-6.
- [19] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and methanolic *Avicennia marina* leaves extracts on *Alternaria alternata* and *Penicillium citrinum*. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 12(12): 1015-24. [Persian].
- [20] Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". *Inter Agro Plant Produc* 2013; 4(7): 1652-8.
- [21] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences* 2013; 4(3): 89-99.
- [22] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Sci J Microbiol* 2013; 2: 15-22.
- [23] Rozman T, Jeršek B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*. 2009; 93(1):51-8.
- [24] Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 2007; 100(2): 553-9.
- [25] Luck-Vogel M, O'Farrell PJ, Roberts W. Remote sensing based ecosystem state assessment in the Sandveld Region, South Africa. *Ecological Indicators*. 2013; 33: 60-70.
- [26] Vasiee A, Zanganeh H, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F. The in vitro investigating of Antimicrobial Effect of *Portulaca oleracea* Extract on Infectious Microorganisms. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2014; 19(66).
- [27] Mamashloo S, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Alami M, Khomeiri M. The contents in medlar *Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*. 2008; 106(1):291-8.
- [6] Potter D, Eriksson T, Evans RC, Oh S, Smedmark J, Morgan DR. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*. 2007; 266(1-2):5-43.
- [7] Phipps JB, O'Kennon R, Lance RW. Hawthorns and medlars: Timber Press; 2003.
- [8] SafariZarafshan M. Child Cultivation in Islam. Tehran: Fateh Press; 1979. [Persian].
- [9] Gruz J, Ayaz FA, Torun H, Strnad M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry*. 2011; 124(1):271-7.
- [10] Cushnie T, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005; 26(5):343-56.
- [11] Khoshbakht K, Hammer K. Savadkouh (Iran)—an evolutionary centre for fruit trees and shrubs. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2006; 53(3):641-51.
- [12] Hu R. Food product design: A computer-aided statistical approach: CRC Press; 1999.
- [13] Erdogdu F. Optimization in food engineering: CRC Press, Inc.; 2008.
- [14] Arroyo-Lopez F, Bautista-Gallego J, Chiesa A, Duran-Quintana M, Garrido-Fernández A. Use of a D-optimal mixture design to estimate the effects of diverse chloride salts on the growth parameters of *Lactobacillus pentosus*. *Food Microbiology*. 2009; 26(4):396-403.
- [15] Yin H, Chen Z, Gu Z, Han Y. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. *LWT-Food Science and Technology*. 2009; 42(1):327-31.
- [16] Cafaggi S, Leardi R, Parodi B, Caviglioli G, Bignardi G. An example of application of a mixture design with constraints to a pharmaceutical formulation. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 2003; 65(1):139-47.
- [17] Mura P, Furlanetto S, Cirri M, Maestrelli F, Marras A, Pinzauti S. Optimization of glibenclamide tablet composition through the combined use of differential scanning calorimetry and D-optimal mixture experimental design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 37(1):65-71.

- [33] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Hossein Zanganeh. Investigation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Aqueous and Ethanolic *Avicennia Marina* Extracts on Gram Positive and Gram Negative Bacteria "in vitro". *Sadra Med Sci J* 2014; 2(2): 123-134. [Persian].
- [34] Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*. 2005; 68(5):919-26.
- [35] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Heidari Sureshjani M, Mortazavi A, Tabatabaei Yazdi F. Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Satureja bachtiarica* extracts on gram positive and gram negative bacterias "in vitro". *Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2014; 19 (64).
- [36] Asadi M, Bahrami S, Ansari Samani R. The effect of *Stachys Lavandulifolia vahl*. And *Mespilus Germanica L.* leaves hydroalcoholic extracts on *lishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2010; 5(1): 39-43.
- evaluation of antioxidant properties and stability of phenolic compounds from medlar (*Mespilus germanica L.*) fruit. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2012; 1(3): 219-228.
- [28] Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas GE. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157: H7. *Italian journal of food science*. 2001;13 (1):65-75.
- [29] Acamovic T, Brooker J. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2005; 64(03):403-12.
- [30] Dorman H, Deans S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88(2):308-16.
- [31] Ahmady-Asbchin S, Safari M, Moradi H, Sayadi V. Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (*Mespilus germanica*) against bacteria isolated from hospital environment. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2013; 16(75): 1-13. [Persian].
- [32] Shariatifar N, Rahimnia R, Jamshidi AM, Pirali Hamedani M, Shoeibi Sh. Effect of Ethanolic Extract of *Mespilus germanica* on Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. *Journal of Medicinal Plants*. 2011; 10(39): 76-81. [Persian].

Optimization of extraction of *Mespilus germanica* by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms “in vitro”

Tabatabaei Yazdi, F. ^{1*}, Alizadeh Behbahani, B. ², Alghooneh, A. ², Zanganeh, H. ³

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
 2. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
 3. M.Sc. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
- (Received: 93/4/23 Accepted: 93/8/7)

Mespilus germanica as a valuable medicinal plants used in traditional medicine. Aim of this study, investigated effect of combination various ratio of solvents (Glycerin, Ethanol, Methanol and Water) on the efficiency of *Mespilus* extract by mixture optimal design. Numerical optimization was used to obtain the optimal formulation of solvent. At the end of the day, the antimicrobial effect of *Mespilus* extracts based on three methods (agar diffusion Method, Minimum Inhibitory Concentration and Minimum *Bactericidal* Concentration) on the three microorganisms managing infectious diseases was investigated in vitro. In this study, investigated effect water, ethanol, methanol and glycerin on the five levels (0, 31.25, 83.33, 125,250 mm) on efficiency of *Mespilus* extracts by mixture optimal design. Diffusion agar test, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum *Bactericidal* Concentration by microbroth dilution method was used to determination Susceptibility of bacterial isolate. The Result indicated that Scheffe polynomial model was highly significant for efficiency of *Mespilus* extracts. Minimum Inhibitory Concentration of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* were 1.25, 2.5 and 5 mg/ml, respectively. The optimum condition has been found as following: glycerin (0 ml), water (23.7 ml), methanol (100.2ml) and ethanol (126.1 ml) respectively. It's worth to mention that there was no significant difference between experimental and predicted value in optimum condition. *Mespilus* extract was highly significant for reduce of Infectious bacteria. Mixture methodology based on the D-optimal design was able to statistical assessment extraction process with the minimum experiment.

Key words: *Mespilus germanica*, Optimization, Infectious bacteria, Mixture design

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