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[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، علی الغونه[2]، حسین زنگانه[3]

۱- دانشیار و عضو هئیت 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: ۹۳/٤/۲۳ 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 گلیسیرین، 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 ارگانیسم عامل بیماری‌های عفونی در این تحقیق ارزیابی شد. تاثیر هر یک از حلال های آب، اتانول، متانول و گلیسرین هر کدام در پنج سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده ازهندسه 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 مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به روش رقت سازی در چاهک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که مدل چند جمله‌ای شف به طور معنی‌داری قادر به پیش-بینی بازده استخراج عصاره گیاه ازگیل می‌باشد. حداقل غلظت مهارکنندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بررسی تجربی فضای بهینه نشان داد که تفاوت معنی داری بین نتایج خروجی از بهینه سازی عددی و نتایج تجربی وجود ندارد. بر این اساس، فرمولاسیون بهینه حاوی گلیسیرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۳/۷ میلی‌لیتر)، متانول (۱۰۰/۲ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۲٦/۱ 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 می سازد.

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

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

بیماری‌های عفونی در زمره شناخته شده‌ترین بیماری‌هایی هستند که همواره گریبان گیر انسان بوده و باعث تحمیل خسارت‌های جانی و مالی بسیار شده اند. تلاش‌های زیادی جهت شناخت عوامل ایجاد کننده درمان و کنترل بیماری‌های عفونی صورت گرفته است [۱]. با توجه به اینکه بخشی مهمی از علل بیماری‌های عفونی مربوط به باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلو کوکوس اورئوس* و *سودوموناس ائروژینوزا* می‌باشد و از آنجا که جهش کروموزمی در باکتری‌ها بسیار بیشتر از موجودات دیگر می‌باشد، لذا میکروب‌ها مرتب تغییر می‌کنند، این تغییرات ممکن است باعث ظهور بیماری‌های عفونی نوپدید منجر شده و لذا یافتن ترکیبات طبیعی و جدید جهت درمان این قبیل میکروارگانیسم 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 کُنوس و در زبان مازندرانی کنس و کندس می‌گویند، میوه‌ای است از خانواده گلسرخیان از سرده ازگیل‌ها (Mespilus) می باشد [۳]. میوه ازگیل بسیار سخت و اسیدی است و تا زمانی که خوب رسیده نشود قابل خوردن نیست [٤]. از ازگیل جهت تهیه شربت و کنسرو ازگیل نیز استفاده می‌شود [۵]. در حال حاضر ازگیل در همه ی جنگل‌های شمال ایران از ارسباران تا چناران (بجنورد) و در همه ی بلندی‌های کرانه‌های دریا در دامنه جنوبی البرز و مناطق استپی می‌روید [٦]. 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 روده‌ها، 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 حاوی ماده‌ای به نام تانن است که بهترین دارو برای درمان عفونت های روده‌ی بزرگ به شمار می رود. ازگیل همچنین دارای قند، آمینو اسید و اسیدهای آلی نیز می باشد [۱۱].

طراحی فرمولاسیون با استفاده از روش‌های آماری مخلوط برای نخستین بار توسط شیف و همکاران (۱۹۵۱) معرفی شد، که در آن طرح‌های شبکه سادک و مدل‌های چند جمله‌ای مربوط به آن ارائه شده است. کورنل تقریباً کلیه مقالات آماری چاپ شده راجع به طرح‌های 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[1] رواج یافته است. به نظر می‌رسد که این اصلاح بسته به موضوع مورد نظر، شامل توسعه محصول، تولید، مدیریت کیفیت و یا حتی تبلیغات و بازاریابی، دارای معنای متفاوتی می‌باشد. 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 طرح‌های آزمایشی مخلوط برای بررسی اثر گونه‌های متفاوت نمک کلراید بر پارامترهای رشد لاکتوباسیلوس پنتوسوس[١٤]، استفاده از طرح‌های آزمایشی مخلوط برای بهینه سازی بستر کشت رشد مخمرهای غنی شده با سلونیوم [۱۵]، استفاده از سیستم‌های مخلوط برای فرمولاسیون مواد دارویی [١٦]، بهینه سازی ترکیب قرص گلی بنکلامید با استفاده از روش‌های مخلوط و گرماسنجی افتراقی [۱۷] و بهینه سازی شرایط کشت برای تولید اتانول از شیره سورگوم به وسیله مخمر تثبیت شده ساکارومیسس سرویزیا [۱۸] اشاره نمود.

1. Optimization

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نسبت‌های متفاوت از حلال‌های گلیسیرین، 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 تائید 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[2] 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 کاملا 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 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 ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۹].

۲-۲- سویه های میکروبی

در این پژوهش آزمایشگاهی از ۳ سویه استاندارد میکروبی *Escherichia coli* PTCC 1330، *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 ml ۱ از عصاره‌ها در آن ریخته شد. محتوی لوله که حاوی ml ۱ از هر عصاره در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره-ها، وزن لوله آزمایش مجددا توسط ترازوی دیجتال تعیین گردید. اختلاف وزن لوله معادل ml ۱ از عصاره‌ها، است. این روش سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار تکرار، به عنوان وزن خشک گزارش شد [۲۰].

2. Maceration

۲-٤- 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[3] مورد استفاده قرار گرفت.

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

به منظور بررس 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 ٢٤ 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 mg/ml، ۲۰، ۳۰، ٤٠، ٥٠، ٦٠، 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 ٢٤ ساعت شدند. اثر ضد میکروبی براساس هاله عدم رشد در مقیاس میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت [۲۱ و۲۲].

۲-٦- 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 دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت های استریل ۹٦ خانه ای استفاده شد. محلول استوک عصاره در دی متیل سولفوکساید تهیه گردید و در غلظت های مختلف عصاره (از٤٠ تا ۰/۱٥٦ میلی گرم در میلی‌لیتر) با رقیق سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. باکتری ها به مدت ٢٤ ساعت قبل از انجام آزمایش، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس بعد از انجام تلقیح باکتری ها و پر کردن چاهک ها جهت تهیه میکروپلیت ها به مدت ٢٤ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از طی ٢٤ ساعت میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترومنت) در طول موج ٦۳۰ 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 هینتون آگار کشت داده شد و ٢٤ 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 [٢٤].

۲-۸- طرح آزمایشی

در این پژوهش آزمایشگاهی، به منظور مطالعه‌ی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره ازگیل، اثر آب، اتانول، گلیسیرین و متانول هر کدام در ٥ سطح (۰، ۳۱/۲٥ ، ۸۳/۳۳ ، ۱۲٥ ،۲٥۰ میلی لیتر) با استفاده از طرح آزمایشی مخلوط-بهینه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در تمامی فرمولاسیون ها نسبت حلال به گیاه ازگیل ٥ 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.

3. Micro-broth dilution

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

گلیسیرین	متانول	اتانول	آب	کد تیمار
۰	۰	۲۵۰	۰	۱
۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۲
۰	۰	۰	۲۵۰	۳
۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	٤
۰	۱۲۵	۱۲۵	۰	۵
۰	۰	۲۵۰	۰	٦
۲۵۰	۰	۰	۰	۷
۰	۰	۱۲۵	۱۲۵	۸
۰	۱۲۵	۰	۱۲۵	۹
۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۰
۰	۲۵۰	۰	۰	۱۱
٦۲/۵	٦۲/۵	٦۲/۵	٦۲/۵	۱۲
۱۲۵	۱۲۵	۰	۰	۱۳
۰	۲۵۰	۰	۰	۱٤
۲۵۰	۰	۰	۰	۱۵
۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵٦/۲۵	۱٦
۱۲۵	۰	۰	۱۲۵	۱۷
۱۲۵	۰	۰	۱۲۵	۱۸
۱۲۵	۰	۱۲۵	۰	۱۹
۰	۰	۰	۲۵۰	۲۰

۲-۹- آنالیز آماری

در این پژوهش به منظور مدل سازی بازدهی استخراج از چند جمله ای شف[4] (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 آن بوده، دارای درجه مشابه و تعداد اجزای یکسان می باشد [۱۲].

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j + e \qquad (۱)$$

$$y=\beta_0+\sum_{i=1}^{k}\beta_i X_i+\sum_{i=1}^{k}\beta_{ii}X_i^2+\sum\sum_{i<j}\beta_{ij}X_iX_j+e \qquad (۲)$$

$$X_1 + X_2 + X_3 + ... + X_n = 1 \qquad (۳)$$

در معادلات مذکور y به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده و βj ضرایب جملات خطی، βjk ضرایب جملات غیر خطی دوتایی و βjki ضرایب جملات غیر خطی سه تایی، به

4. Schef ploynomial

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 گیاه ازگیل، برای بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره مذکور، ابتدا در هشت سطح غلظت (۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤٠، ٥٠، ٦٠، ۷۰، ۸۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) محلولی تهیه شده و اثر ضدمیکروبی آن را بر روی *Escherichia coli* PTCC 1330، *Staphylococcus aureus* PTCC 1337 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 ٤) استفاده گردیده است؛ همچنین به منظور بررسی آنالیز واریانس و میزان معنی داری (p_{value}<۰/۰۵) اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه حرا از نرم افزار Minitab 16 استفاده گردید.

(٤)

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

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 بیشنه کردن یا کمینه کردن آن صورت می پذیرد. لازم به ذکر می باشد که در روش های بهینه سازی کلاسیک اثرات برهمکنش بین متغییرها نادیده گرفته می شود. به منظور غلبه بر این مشکل بهینه سازی تک متغییره، در این پژوهش از متدولوژی مخلوط که بهینه سازی همزمان چندین متغییره 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 ازگیل روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد و در کم ترین غلظت مورد بررسی (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) توانسته 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 میلی‌گرم 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 *استافیلو کوکوس اورئوس* می‌باشد، 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. نتایج نشان داد که کم‌ترین 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.

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 گیاه ازگیل در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که ضریب تبیین و ضریب تبین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۹٤ بود و همچنین عدم معنی دار بودن (P_{value}<۰/۰۵) آزمون ضعف برازش (نشانه‌ای از ضعف داده‌های آزمایشی برای یک مدل است که در آن نقاط، مدل نمی‌تواند خطای تصادفی داده‌های آزمایشی را محاسبه کند) که این امر نشان دهنده مناسب بودن مدل چند جمله شف برای استخراج عصاره گیاه ازگیل می باشد (جدول ٤). یکی دیگر از شاخص-های کارایی مدل های رگرسیونی میزان Q-squared می‌باشد. Q-squared نشان می دهد که مدل چقدر می تواند پاسخ ها را برای شرایط آزمایشی جدید پیشگویی کند برعکس ضریب

تبین، 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 ٤ 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 ($p<۰/۰۵$) افزایش پیدا کرد. همچنین با توجه به شکل‌های ۳ و ٤ در یک میزان ثابت از متانول و اتانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافته است، بیشترین میزان بازدهی را می‌توان 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 ($p<۰/۰۵$) 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 ($p<۰/۰۵$) کاهش می یابد.

هدف از بهینه یابی، افزایش بازدهی 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 (۱۲٦/۱ 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 ٦ آورده شده است. نتایج نشان داد که بسط تیلور درجه اول به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) قادر به پیش بینی شاخص قطر هاله عدم رشد می باشد، بدین ترتیب که میزان ضریب تبیین و ضریب تبین 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 می‌باشد (جدول ٦). یکی دیگر از شاخص‌های کارایی مدل‌های رگرسیونی‌آزمون کفایت دقت (Adequacy precision) می‌باشد. این شاخص دامنه خروجی مدل در نقاط آزمایشی را با میانگین خطای پیش بینی شده توسط مدل مقایسه می‌کند. برای یک مدل با دقت بالا مقدار شاخص مذکور حداقل باید ٤ باشد. در این پژوهش میزان پارامتر کفایت دقت ۱۵/۸٦ بدست آمد.

جدول۲ نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ازگیل

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

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

نتایج	اندیس p	اندیس F	میانگین مجموع مربعات	درجه آزادی	
معنی دار	۰/۰۰۰٤	۲۵/۵۹	۱٤/۸۷	۱۳	Model
	۰/۰۰۰۱	۹۹/٤٦	۵۷/۵۸	۳	Linear
	۰/۰۲٤	۹/۷۷	۵/٦۵	۱	AB
	۰/٤۳٦	۰/٦۹۵	۰/٦۲۰	۱	AC
	۰/۳۳٦	۰/۹٦٦	۰/۵۵	۱	AD
	۰/۹۲٦	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵۳	۱	BC
	۰/۱۳۲	۳/۰۱۳	۱/۷۵	۱	BD
	۰/۸۸	۰/۰۳	۰/۰۱	۱	CD
	۰/۰۹	۳/۹۳	۲/۲۵	۱	ABC
	۰/۱۸	۲/۲۸	۱/۳۲	۱	ABD
	/۰۸۸	٤/۱۳	۲/۲۹	۱	ACD
	۰/۰۲۰	۹/۷۲	۵/٦٤	۱	BCD
			۰/۵۷	٦	Residual
عدم معنی داری	۰/۱۷	۲/٤۷	۱/۱٤	۱	Lack of Fit
			۰/٤٦۵	۵	Pure Error
				۱۹	Cor Total

A= آب B=اتانول C=متانول D=گلیسرین

جدول ٤ ضرائب مدل رگرسیونی شف و شاخص های آماری کارایی مدل

A	B	C	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD	R^2	R^2ADJ	MSE	RMSE
۸/۸۷	۱۵/٦۲	۱۲	۵/۵	۱۰	۲/۸	۲/۵	۰/۳	۵/۹	۰/۵۱	۱۸۲	۱۳۹	۱۸٤	۰/۹۸	۰/۹٤	۰/۷	۰/۸۳

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

متغییر ها	هدف	میزان بهینه	میزان تجربی	کم ترین میزان	بیشترین میزان
میزان آب	در محدوده	۲۳/۷	۲۳/۷	۰	۲۵۰
میزان اتانول	در محدوده	۱۲٦/۱	۱۲٦/۱	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	۱٦

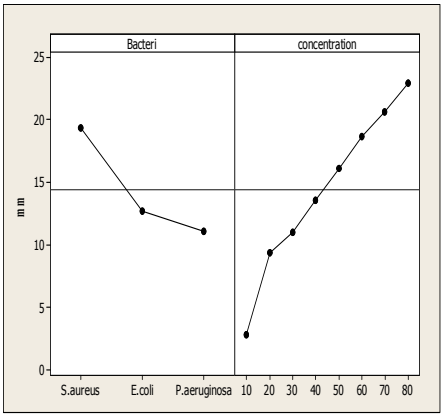
جدول ٦ نتایج آنالیز واریانس و ضرایب مدل برازش یافته بر داده های قطر هاله عدم رشد عصاره گیاه

اندیس p^c	میانگین مجموع مربعات	مجموع مربعات	ضرایب	درجه آزادی	منبع
۰/۰۰۰	٤٦۰/۰۲	۹۲۰/۰۵	-۰/٤۲	۲	C_1[a]
۰/۰۰۰	۳۹۱/۲۹	۲۷۳۹/۰٦	۰/۹	۷	C_2[b]
۰/۰۰۰	۱/۲۳	۱۷/۲۰	۰/۰۸	۱٤	C_1C_2
	۰/۱۷	۷/۹۲		٤۸	Error
				۷۱	Total

a- نوع باکتری

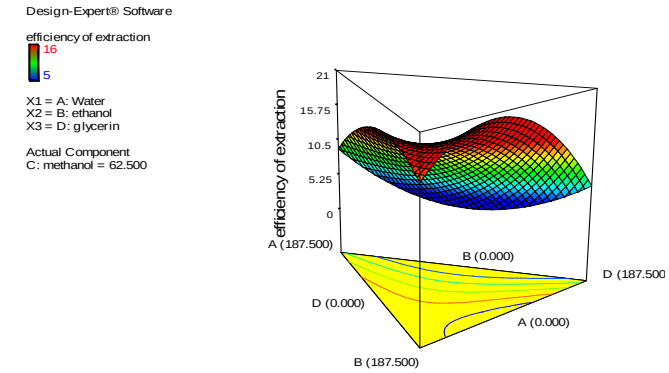
b- غلظت حلال

c - سطح معنی داری (p<۰/۰۵)



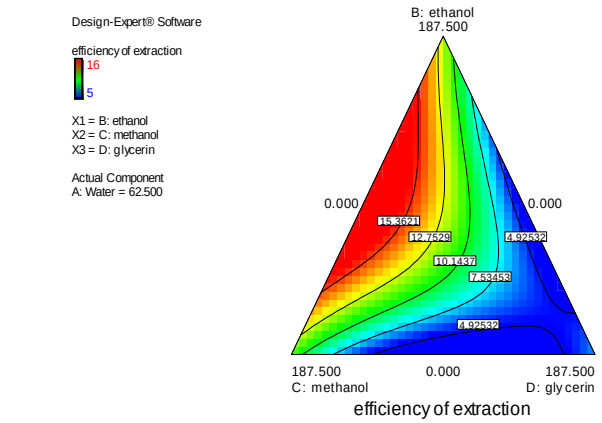
شکل۱ نمودار قطر هاله بازدارندگی به روش کربی_ بوئر بر حسب میلی متر بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا*

(الف)

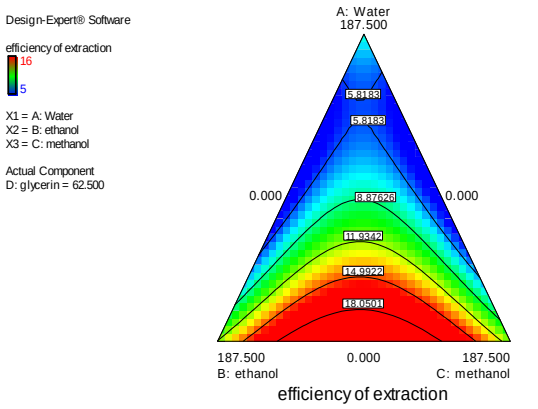


(ب)

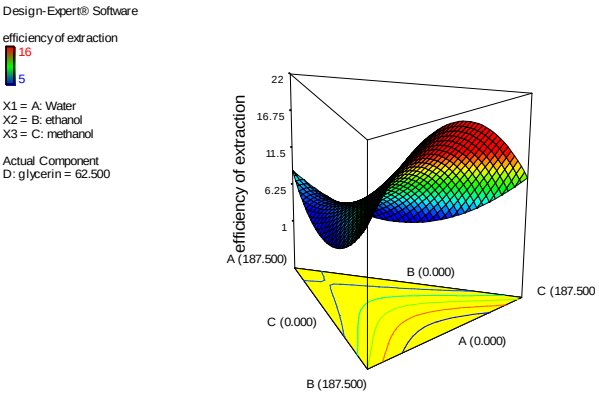
شکل۳ تاثیر تغییرات حلال های آب، اتانول و گلیسرین بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ۶۲/۵ میلی لیتر متانول الف- نمودار تراز (کانتور)، ب- نمودار سطح پاسخ.



(الف)



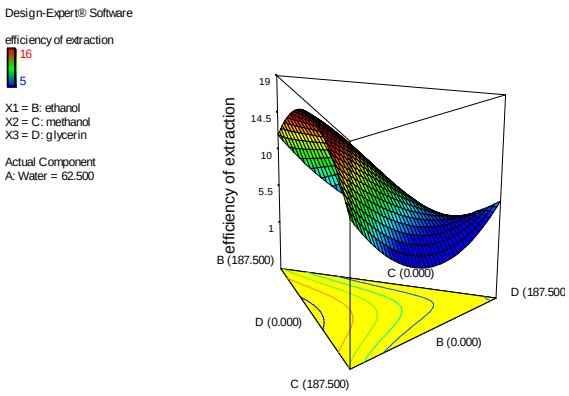
(الف)



(ب)

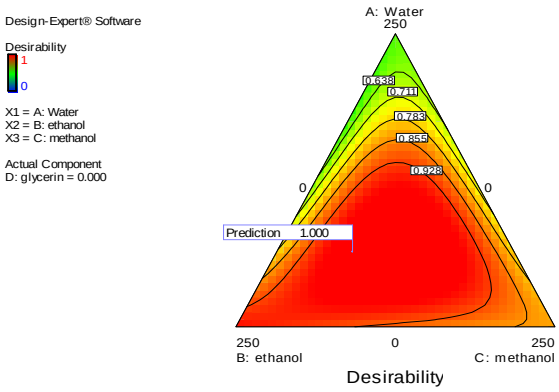
شکل۲ تاثیر تغییرات حلال های آب، اتانول و متانول بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ۶۲/۵ میلی‌لیتر گلیسرین الف- نمودار تراز (کانتور)، ب- نمودار سطح پاسخ.

شکل٤ تاثیر تغییرات حلال های گلیسرین، اتانول و متانول بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ٦٢/٥ میلی لیتر آب الف- نمودار تراز (کانتور)،



(ب)

شکل٤ تاثیر تغییرات حلال های گلیسرین، اتانول و متانول بر درجه استحصال عصاره گیاه ازگیل در میزان ثابت ٦٢/٥ میلی لیتر آب، ب- نمودار سطح پاسخ.



شکل٥ 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 [٢]. از آنجایی که برخی عصاره‌های 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 سویی کشور ایران با توجه به موقعیت جغرافیایی و تنوع آب و هوایی دارای گیاهان دارویی 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 *استافیلو کوکوس اورئوس* می‌باشد، به نحوی که در غلظت ١٠ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ازگیل نتوانست از رشد باکتری های *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* جلوگیری کند. همچنین نتایج نشان داد که کم‌ترین 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 (١٣٩٣) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی خرفه را بر ٥ 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 باکتری‌های گرم مثبت دارامی باشند [٢٦].

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 ($p<٠/٠٥$) افزایش پیدا کرد. همچنین با توجه به شکل‌های ٤ و ٥، در یک میزان ثابت از متانول و اتانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره گیاه ازگیل به طور معنی داری ($p<٠/٠٥$) کاهش یافته است، و بیشترین میزان بازدهی را می-توان در سطوح برابر متانول و اتانول به دست آورد. ممشلو و همکاران (١٣٩١)، 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 حلاهای متفاوت بستگی

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 ترپنن 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]. آساموبک 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 اکثرعصاره 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 ضدمیکروبی بسیاری از گیاهان دارویی احتمالا به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی است. فلاوونوئیدها 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 تاثیر فوق العاده ای در کاهش قطر زخم ها و تعداد انگل‌ها در ضایعات لیشمانیوزی دارد [۳۲].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه ازگیل به خوبی از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی جلوگیری نمود. نتایج این مطالعه حساسیت بیش‌تر باکتری‌های 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 باکتری‌های گرم منفی دارای یک لایه خارجی در اطراف دیواره سلولی خود باشند که به عنوان یک سد نفوذپذیر عمل نموده و دسترسی ترکیبات آبگریز 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 تاثیر آن ها روی باکتری های گرم منفی است [۳٤]. شاید علت حساسیت کمتر گرم منفی ها به اثرات ضد باکتریایی عصاره ها به خاطر غشاء خارجی اطراف دیواره سلولی گرم منفی‌ها 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 *آئروموناس هیدروفیلا* حساسیت زیادی به عصاره ها و اسانس ها نشان می دهد [۳٤]. 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، می‌تواند 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 باکتری‌های 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 معنی‌دار میانگین قطر هاله بازدارندگی غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر و ترکیبات استخراج شده توسط حلال های متفاوت به کار رفته در عصاره‌ها نسبت داد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌ها گیاه ازگیل میزان قطر هاله

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 ($p<۰/۰۵$) کاهش می‌یابد، 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 ($p<۰/۰۵$) کاهش می‌یابد. اسدی و همکاران (۱۳۹۰) به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی 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 [۳٦].

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

٤- نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ضریب تبیین و ضریب تبین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۸ و ۰/۹٤ بود و همچنین عدم معنی دار بودن ($P_{value}<۰/۰۵$) آزمون ضعف برازش (نشانه‌ای از ضعف داده‌های آزمایشی برای یک مدل است که در آن نقاط، مدل نمی‌تواند خطای تصادفی داده‌های 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 میلی‌لیتر)، آب (۲۳/۷ میلی لیتر)، متانول (۱۰۰/۲ میلی لیتر) و اتانول (۱۲٦/۱ میلی لیتر) بود. نتایج این پژوهش نشان داد که 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 ارزنده‌ای جهت بهبود بیمارهای عفونی ناشی از سوش‌های مختلف میکروبی انجام گیرد.

٥- تشکر و قدردانی

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

٦- 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 *Pesudomonas aeroginosa*. 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 germanicaL.) 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

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.
[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

evaluation of antioxidant properties and stability of phenolic copmpounds 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].

[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, Vlielander 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 hydroalcohlic extracts on lishmania major (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2010; 5(1): 39-43.

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