بررسی فعالیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف برگ بنه (*Pistacia atlantica*)

حسن برزگر[۱*]، محمد حجتی[۲]، مرضیه پناهی[۳]

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۹)

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی فعالیت‌های ضداکسایشی و ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی (EE)، متانولی (ME) و آبی (AE) برگ بنه (*Pistacia atlantica*) زیرگونه‌ی *mutica* از گونه‌های بومی ایران بود. محتوای ترکیبات فنولی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ها به ترتیب توسط روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتو و سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH بررسی گردید. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها علیه سه باکتری گرم مثبت، سه باکتری گرم منفی و یک مخمر با روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره آبی بیشترین محتوای ترکیبات فنولی و بالاترین میزان از مهار رادیکال DPPH را داشت. اما EC_{50} عصاره آبی در مقایسه با ضداکسایش سنتزی BHT به ترتیب ۵/۸۷ و ۳/۹۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که عصاره‌ها بر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش اثر بازدارندگی داشته و باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشتند. همچنین عصاره آبی به خاطر داشتن مقادیر بیشتر ترکیبات فنولی بالاترین اثر ضدمیکروبی را بر گونه‌های باکتریایی و مخمر مورد آزمون داشت. در بین میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، *استرپتوکوکوس فاسیوم* و مخمر *کاندیدا آلبیکانس* به ترتیب حساسترین و مقاوم‌ترین بودند. براساس نتایج حاصل از این پژوهش عصاره آبی برگ بنه می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا استفاده گردد.

کلید واژگان: بنه، مهار رادیکال آزاد، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی، حداقل غلظت باکتری‌کشی

* مسئول مکاتبات: barzegarha@yahoo.com

۱- مقدمه

اکسیداسیون در محصولات غذایی در تمام مراحل تولید از مواد اولیه خام تا فرآوری و نگهداری محصولات نهایی اتفاق افتاده و سبب فساد مواد غذایی می‌شود، به علاوه محصولاتی که از اکسیداسیون لیپیدها حاصل می‌شوند، می‌توانند روی دیگر اجزای موجود در ماده غذایی نیز تاثیر منفی داشته باشند، بطوری که علاوه بر اثرات نامطلوب ارگانولپتیک در محصولات غذایی با از بین بردن ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری بدن و ایجاد ترکیبات سمی می‌توانند منجر به اثرات نامطلوب در بدن انسان شوند [۱]. رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیداسیون، مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیری هستند که در غشای خارجی خود الکترون جفت نشده دارند و قادر به اکسید کردن مولکول‌های زیستی هستند. آسیب‌های ناشی از آن‌ها نقش مهمی در پیری، سرطان، بیماری‌های قلبی، فشار خون، بیماری‌های عصبی و جهش دارند. تنها راه برای محافظت بدن در مقابل پیامد تنش‌های اکسیداتیو، بهبود تغذیه از طریق دریافت مواد ضداکسایشی است [۲]. ضداکسایش‌ها ترکیباتی هستند که از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد، مهار کردن فلزات و جلوگیری از اتواکسیداسیون لیپیدها در فرایند اکسیداسیون اختلال ایجاد می‌کنند. ضداکسایش‌های طبیعی که عمدتاً در گیاهان دارویی، میوه‌جات و سبزیجات وجود دارند در میان مصرف کنندگان، طرفداران زیادی پیدا نموده و به نظر می‌آید در پیشگیری از ابتلاء به تعدادی از بیماری‌ها حائز اهمیت باشند، زیرا گیاهان دارویی منابع مهم و غنی از ضداکسایش‌های طبیعی هستند [۳]. ترکیبات ضداکسایشی در گیاهان نقش مهمی را به عنوان عوامل محافظت از سلامت بازی می‌کنند، چنانچه شواهد علمی مبنی بر کاهش خطر بیماری‌های مزمن همچون سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی توسط ضداکسایش‌ها گزارش شده است [٤,٥]. علاوه بر این، وقتی که ترکیبات ضداکسایشی به محصولات غذایی اضافه می‌شوند، باعث کاهش تند شدگی[1]، تأخیر در تولید ترکیبات سمی، حفظ کیفیت غذا و افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی می‌شوند [٦].

از طرفی یکی از مهمترین چالش‌های درمانی، مقابله با عوامل بیماری‌های عفونی و مسمومیت‌زا به دلیل شیوع و گسترش بالای آن می‌باشد و استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش مقاومت دارویی در بیشتر باکتری‌ها گردیده است. بنابراین یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید با کم ترین اثرات جانبی امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد [۷]. بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی بیش از ۸۰ درصد از مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر) برای درمان بیماری‌ها هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً یک چهارم داروهای تهیه شده در دنیا دارای منشاء گیاهی هستند که یا بطور مستقیم از گیاهان عصاره‌گیری شده اند و یا براساس ترکیبات گیاهی سنتز گردیده‌اند. بنابراین استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی، یک راه حل مناسب جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی فرآوری شده می‌باشد که باعث کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروارگانیسم‌هایی با منشاء غذایی می‌شوند [۸].

تاکنون مطالعات زیادی مبنی بر ویژگی‌های ضداکسایشی و ضدمیکروبی گیاهان مختلف نظیر گیاه آدمک[2]، زنجبیل، کاکوتی، مریم گلی، گیاه علف هیضه[3] از خانواده کاسنی، خوشاریزه، پوست پسته، نعناع ایرانی و آویشن شیرازی [۹، ۱۰ و ۱۱] انجام شده است.

بنه (*Pistacia Atlantica*) از خانواده *Anacardiaceae*، یکی از گونه‌های پسته‌ی وحشی در ایران است که دارای ارقام موتیکا[4]، کردیکا[5] و کابولیکا[6] می‌باشد. درختی دوپایه و برگ‌ریز است و دارای برگچه‌های کوچک و تا حدودی کوتاه، با شکل و اندازه‌ی گوناگون، نوک کند با لبه‌ای تقریباً محدب می‌باشد. انتشار بنه از جزایر قناری و کشورهای ساحل دریای مدیترانه شروع می‌شود و تا آسیای صغیر، سوریه، قفقاز، ایران، افغانستان و پاکستان امتداد می‌یابد. بنه در ایران در حد فاصل استان‌های فارس و کردستان بصورت انبوه و در بقیه نقاط کشور بصورت پراکنده دیده می‌شود [۱۲]. درختان بنه زیرگونه موتیکا و کردیکا در جمعیت بزرگی از منطقه زاگرس در ایران که ۳۰۰۰-۶۰۰ متر از سطح دریا بالاتر است، بطور وحشی می‌روید و بیش از ۱۲۰۰۰۰۰ هکتار از بخش‌های غربی، مرکزی و شرقی ایران را پوشش می‌دهد[۱۳]. این گیاه دارای نقش مهمی در طب سنتی می‌باشد و در درمان اگزما، عفونت

1. Rancidity

2. *Biebersteinia multifida*
3. *Pulicaria gnaphalodes*
4. Mutica
5. Kurdica
6. Cabulica

گلو، سنگ کلیه و آسم و همچنین به عنوان قابض، ضدالتهاب، ضدتب، ضدباکتری، ضدویروس استفاده می‌شود [۱۴]. قسمت‌های هوایی آن نیز بطور سنتی به عنوان یک محرک برای خواص ادرارآور و به منظور درمان فشارخون، سرفه، جراحت گلو، اگزما، درد معده، سنگ کلیه و زردی بکار می‌رود و برگ و پوست آن به علت داشتن تانن به عنوان قابض و برای درمان اسهال‌های ساده استفاده می‌شود [۱۵]. تاکنون مطالعات گوناگونی در جهت تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی میوه و روغن دانه‌های انواع بنه و شیره‌ی حاصل از درخت آن [۱۶و ۱۷] و فعالیت ضدمیکروبی عصاره برخی از گونه‌های بنه [۱۸و۱۹] صورت گرفته است. با توجه به بومی بودن درخت بنه در مناطق مختلف ایران و دسترسی آسان و ارزان به این منبع و از طرفی عدم مطالعات گسترده مبنی بر بررسی ویژگی‌های ضداکسایشی و ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی حاصل از برگ درخت بنه‌ی آتلانتیکی زیرگونه‌ی موتیکا، مطالعه‌ی حاضر در پی آن است که ویژگی‌های بیولوژیکی ترکیبات فعال عصاره‌های مختلف این گیاه، از جمله خواص ضداکسایشی و اثر ضدمیکروبی آن‌ها علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مورد بررسی قرار دهد تا به این طریق امکان استفاده از یک منبع سهل الوصول و مقرون به صرفه فراهم‌گشته و در نهایت گامی جهت اعتلای بهداشت و ایمنی موادغذایی جامعه برداشته شود.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

اسید گالیک، پودر رادیکال ۲و۲ دی‌فنیل‌هیدرازین (DPPH)، معرف فولین سیوکالتو از شرکت Sigma، اتانول از شرکت نصر، متانول از شرکت پارس بیوشیمی و محیط کشت‌های BHI[1] ، MHA[2]، MHB[3] و SDB[4] از شرکت Merck تهیه شدند، همچنین سویه های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

1. Brain Heart Infusion
2. Mueller-Hinton Agar
3. Mueller-Hinton Broth
4. Sabouraud Dextrose Broth

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱-تهیه مواد گیاهی

برگ‌های درخت بنه زیرگونه‌ی موتیکا از درختان در حال رشد در جنگل بنه واقع در شهرستان اقلید، در فاصله‌ی ۲۷۵ کیلومتری شیراز در آبان ۱۳۹۳ جمع آوری شد. سپس نوع و گونه‌ی گیاهی نمونه توسط کارشناس گروه داروسازی سنتی در دانشکده داروسازی شیراز مورد تأیید قرار گرفت. برگ‌ها در سایه خشک و سپس آسیاب شدند.

۲-۲-۲-عصاره‌گیری

برای تهیه عصاره ها، مقدار ۵۰ گرم از پودر برگ بنه بطور جداگانه به ۵۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر، اتانول ۹۶درصد و متانول اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس عصاره ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شده و حلال‌ها توسط دستگاه روتاری (N-1000S-W، ژاپن) تحت خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حذف گردید [۲۰].

۲-۲-۳-سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH

به منظور بررسی فعالیت رادیکال آزاد از روش بوریتس و باکار استفاده شد [۲۱]. معرف ۲و۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن یک منبع رادیکال پایدار است که با گرفتن یک الکترون از ترکیب ضداکسایش رنگ آن از بنفش به رنگ زرد (ترکیب دی فنیل پیکریل هیدرازین) تغییر می‌کند. در این مطالعه نمونه‌های عصاره بطور جداگانه در غلظت‌های ۵۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و از ترکیب ضداکسایشی BHT به عنوان نمونه استاندارد استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها با ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH متانولی (۰/۰۰۴ درصد) مخلوط شد سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (SPEKOL مدل۲۰۰۰، شرکت Analytikjena، آلمان) در مقابل متانول خالص در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. فعالیت مهار رادیکال نمونه‌ها به عنوان درصد مهارکنندگی (RSA) با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید[۲۱].

$$RSA\% = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100$$

که در این رابطه، Ab: میزان جذب در نمونه کنترل (حاوی تمامی بجز ترکیب مورد آزمون) و As: میزان جذب در ترکیبات نمونه مورد آزمون می‌باشد.

پس از محاسبه‌ی درصد مهارکنندگی، معمولاً برای مقایسه فعالیت مهار رادیکال آزاد عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان (EC_{50})[1] استفاده می‌شود و بنابر تعریف، غلظتی از عصاره است که قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH می‌باشد که از روی نمودار فعالیت ضداکسایشی هر عصاره محاسبه می‌شود. بدیهی است که هرچه این عدد کوچکتر باشد قدرت مهار رادیکال آزاد یا ضداکسایشی بیشتر می‌باشد.

۲-۲-٤-سنجش محتوای ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل به روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو با توجه به روش رضایی و همکاران انجام شد [۲۰]. بدین منظور، ابتدا نمونه‌ای با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها تهیه شد. بطور خلاصه ۰/۵میلی‌لیتر از عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین سیوکالتو حل شد و پس از ٤ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول نمک کربنات سدیم (۷/۵٪) و در نهایت ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از مدت زمان ۲ ساعت نگهداری نمونه‌ها در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SPEKOL مدل۲۰۰۰، شرکت Analytikjena، آلمان) اندازه‌گیری گردید. میزان ترکیبات فنولی کل براساس منحنی کالیبراسیون اسیدگالیک (۱۰۰۰-۰ میلی‌گرم بر لیتر)، برحسب میلی‌گرم اسیدگالیک موجود در هر گرم عصاره بیان شد. برای تعیین میزان فنول کل (TPC) از فرمول زیر استفاده شد[۲۰]:

$$TPC = \frac{C \times V}{m} \times 100$$

که در این رابطه، C: غلظت معادل اسیدگالیک حاصل از معادله‌ی منحنی استاندارد (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، V: حجم عصاره مصرفی (میلی‌لیتر) و m: وزن عصاره مصرفی در آزمون (گرم) می‌باشد.

۲-۲-۵-تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

۲-۲-۵-۱-آماده‌سازی و تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی از میکروارگانیسم‌های مورد آزمون

کلیه میکروارگانیسم‌ها بصورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش-های علمی و صنعتی ایران تهیه شده و مورد آزمون قرار گرفتند. آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری ابتدا در شرایط آسپتیک باز و در محیط کشت مایع BHI به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد و چند بار از کشت اولیه به کشت دیگر منتقل شدند تا بطور کامل فعال شوند. مخمر نیز در محیط کشت سابرو دکستروز آگار به اضافه‌ی کلرامفنیکل (۰/۰۰۵درصد برای جلوگیری از رشد باکتری‌های احتمالی) به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۹°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی و مخمری، توسط لوپ استریل ٦-۵ کلونی برداشته و در ۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی به مدت ۱۵ ثانیه هم‌زده شد و به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۲۵ نانومتر کدورت سوسپانسیون مورد بررسی قرار گرفته و سوسپانسیون میکروبی با میزان جذب بین ۱-۰/۰۸ معادل با کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند ($1-5\times10^{8}$ cfu/ml) برای باکتری و ($1-5\times10^{6}$ cfu/ml) برای مخمر تهیه شد [۲۲].

۲-۲-۵-۲-روش انتشار دیسک[2]

ابتدا عصاره‌ها در غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در DMSO ۱۰ ٪ تهیه شدند. از طرفی، محیط کشت مولر هینتون آگار به میزان کافی تهیه و در اتوکلاو استریل شده و قبل از ریختن درون پتری دیش‌های ۷۰ میلی‌متری تا دمای ۵۰-٤۵ درجه سلسیوس سرد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده، بر سطح پلیت‌های مولر هینتون اگار ریخته شد و با استفاده از لوپ به طور کامل و بصورت چمنی بر سطح پلیت پخش[3] شد. پلیت‌های آگار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تا زمان خشک شدن پوشش میکروبی، انکوبه شدند. دیسک آزمون حساسیت استریل (کاغذ واتمن شماره ۱، قطر ٦ میلی‌متر و ضخامت ۱ میلی‌متر) بر سطح پلیت‌ها قرار داده شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره بر روی دیسک تزریق شد. از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و نیستاتین در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر دیسک به عنوان کنترل مثبت و از دیسک بدون اسانس به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌های حاوی سوش باکتریایی به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C و پلیت حاوی مخمر به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۲۸°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر ناحیه

1 . Effective concentration 50%

2. Disc diffusion method
3. Spread

ممانعت[1] با یک کولیس اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر میکروارگانیسم در سه تکرار انجام شد [۲۳].

۲-۲-۵-۳-تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC[2])

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی با توجه به روش رقت-سازی سری در محیط مایع[3] به صورت رقت دو برابر رقت اول[4]، با بکارگیری میکروپلیت‌های استریل ۹۶خانه‌ای انجام شد. از عصاره‌ها یک محلول استوک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دی متیل سولفوکساید (DMSO) ٪۱۰ تهیه شد و پس از آن بصورت متوالی رقیق سازی دوبرابر در محدوده‌ی غلظت ۱/۵۶-۱۰۰ گرم بر میلی‌لیتر درون ۶ لوله آزمایش حاوی محیط نوترینت براث برای سوش های باکتریایی و سابرو دکستروز براث برای سوش‌های کپک و مخمر انجام شد. سپس میکروپلیت ۹۶ خانه با توزیع ۹۵ میکرولیتر محیط مایع و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی در هر خانه آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استوک و رقت‌های متوالی آن به ترتیب درون ستون‌های پلیت بجز ستون آخر که به عنوان کنترل در نظر گرفته شد، ریخته شد بطوریکه حجم نهایی در هر خانه به ۲۰۰ میکرولیتررسید. در نهایت میکروپلیت حاوی سوش باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و میکروپلیت حاوی مخمر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. در این آزمون از آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل و نیستاتین (در محدوده غلظت ۱/۵۶ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان شاهد مثبت به ترتیب برای باکتری‌ها و کپک و مخمر استفاده شد. پس از زمان گرمخانه-گذاری، کمترین غلظتی از عصاره که در آن رشد میکروارگانیسم بصورت کدورت در خانه‌های پلیت مشاهده نشد، به عنوان MIC گزارش شد [۲۴].

۲-۲-۵-۴-تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MBC[5])

به منظور تعیین پایین‌ترین غلظت کشنده باکتری‌ها تا سه غلظت بعد از MIC از خانه‌هایی که در آن کدورت مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر بر روی محیط کشت جامد (مولر هینتون آگار) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد. تمامی آزمون‌ها سه بار انجام شد [۲۴].

۲-۳-آنالیز آماری

طرح آماری مورد استفاده در این پژوهش، طرح کاملاً تصادفی بوده و در سه تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و میانگین آن‌ها با آزمون مقایسه‌ی چند دامنه‌ای دانکن و سطح احتمال ($P < ۰/۰۵$) مقایسه شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹,۳ اجرا و نمودارها با نرم افزار EXCEL رسم شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-محتوای ترکیبات فنولی کل

عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند که می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی و آب و هوایی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد. علاوه بر این درجه قطبیت حلال‌های مختلف، میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۵].

محتوای ترکیبات فنولی کل عصاره‌های اتانولی (EE)، متانولی (ME) و آبی (AE) برگ بنه با روش فولین سیوکالتیو براساس خط منحنی استاندارد اسیدگالیک به صورت $Y= 0.0019X-0.0003, R^2= 0.986$ محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، محتوای فنولی کل برای عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی برگ بنه به ترتیب ۱۲۶۶/۳۳۸، ۱۰۶۹/۶۶۵ و ۱۷۵۴/۹۹۶ میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره به دست آمد که ترکیبات فنولی کل در عصاره آبی بطور معناداری از ترکیبات فنولی کل عصاره‌های اتانولی و متانولی بیشتر می‌باشد. همچنین طی پژوهش‌هایی که روی عصاره‌ی برگ بنه‌ی لنتیکوس [۲۶] و پسته‌ی ورا [۱۱و۲۷] صورت گرفت، مشاهده شد که عصاره آبی بهترین بازده ترکیبات فعال فنولی را داراست. این امر در توافق با پژوهش شرافتی-چلشتری و همکاران روی گیاه خوشاریزه بود که در آن ترکیبات فنولی کل حاصل از عصاره آبی در مقایسه با عصاره اتانولی، بالاتر بود [۱۰].

1. Inhibition zone
2. Minimum Inhibitory Concentration
3. Broth Serial microdilution
4. Two fold serial dilutions
5 . Minimum bactericidal concentration

Table1 Total phenolic content and free radical scavenging activities of extracts expressed as **EC_{50}.**

Extract	Total phenolic content (mg/g)	EC50 (µg/ml)
Ethanol extract (EE)	1266.338 ± 120.932[b]	9225.09 ± 479.44[a]
Methanol extract (ME)	1069.665 ± 212.235[b]	8561.64 ± 105.58[b]
Aqueous extract (AE)	1745.996 ± 359.886[a]	5876.82 ± 214.15[c]
BHT	_	3946.33 ± 391.23[d]

Values in the same columns followed by different low case letters are significantly different at $p < 0.05$.

همانطور که مشخص است ترکیبات فنولی کل در عصاره اتانولی، بیشتر از عصاره متانولی می‌باشد. چنین نتیجه ای در مطالعات صورت گرفته روی پوست بنه [۲۰]، گونه‌های چای کوهی [۲۸] و گیاه گل مغربی [۲۹] نیز گزارش شده است. محققین تفاوت در قطبیت حلال‌های مورد استفاده جهت استخراج و حلالیت ترکیبات فنولی در این حلال‌ها را دلیل اصلی تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های مختلف بیان نموده‌اند [۳۰]. بطور کلی ویژگی‌های آب‌دوستی و آب‌گریزی ترکیبات فیتوشیمیایی، تأثیر مهمی بر حلالیت آن‌ها در حلال مورد استفاده جهت استخراج دارد. از این رو قطبیت حلال می‌تواند نقش مهمی در کارایی استخراج این ترکیبات داشته باشد [۳۱].

۳-۲-فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ها

روش سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH معمولاً برای ارزیابی فعالیت ضداکسایشی استفاده می‌شود و اساس آن توانایی اهداء هیدروژن می‌باشد. به نظر می‌رسد اهداء هیدروژن توسط ترکیبات فنولیک، مکانیسم اصلی فعالیت ضداکسایشی آن‌ها می‌باشد و هرچه باند هیدروژنی ضعیف‌تر باشد، منجر به قدرت مهار بالاتر می‌شود. این رادیکال یکی از مهمترین رادیکال‌های سنتزی برای بررسی خصوصیات رادیکال گیرندگی ترکیبات زیست فعال و عصاره‌های غذایی بوده و از پایداری بیشتری نسبت به رادیکال‌های هیدروکسی و سوپراکسید برخوردار می‌باشد[۳۲].

فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های آبی (AE)، متانولی (ME) و اتانولی (EE) برگ بنه با روش میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۵۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد و نتایج حاصل بطور خلاصه در نمودار ۱ آورده شده است.

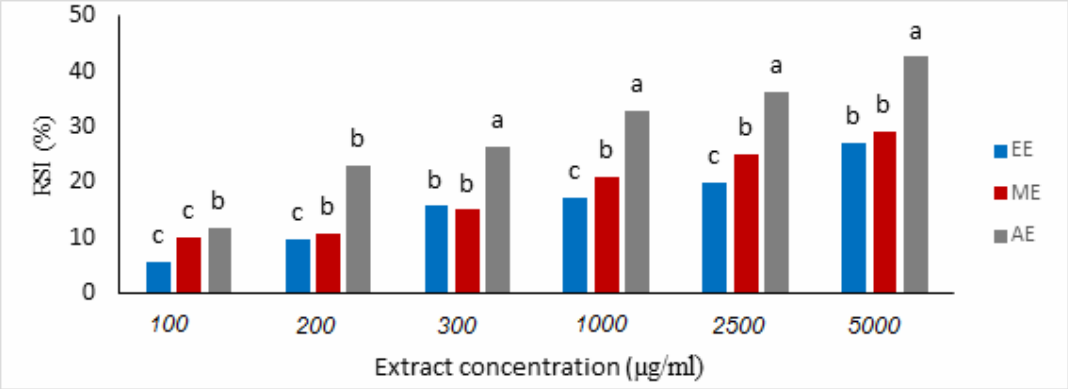

Fig1 DPPH radical scavenging activity of different extracts

چنانچه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، در میان عصاره‌ها، عصاره آبی بالاترین و عصاره اتانولی کمترین میزان مهار رادیکال DPPH را داراست و با افزایش غلظت، ظرفیت ضداکسایشی عصاره افزایش می‌یابد، بطوریکه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان مهار رادیکال آزاد عصاره آبی، متانولی و اتانولی به ترتیب ۱۱/۷۳، ۱۰/۰۱ و ۵/۷۹ درصد می‌باشد و در غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب به ٤٢/٥٤، ۲۹/۲۱ و ۲۷/۱۰ درصد می‌رسد. به منظور مقایسه دقیق‌تر توانایی مهار رادیکال آزاد ترکیب ضداکسایشی سنتزی BHT و عصاره‌ها، EC_{50} هریک از آن‌ها تعیین گردید (جدول ۱ و نمودار ۲). بطوریکه مقادیر EC_{50} در عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و BHT به ترتیب شامل ۹۲۲۵، ۸۵٦۲،

۵۸۷۷ و ۳۹۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود بطوریکه سطح EC_{50} درعصاره آبی پایین تر از ضداکسایش سنتزی BHT مشاهده شد که این اختلاف معنی دار می‌باشد.

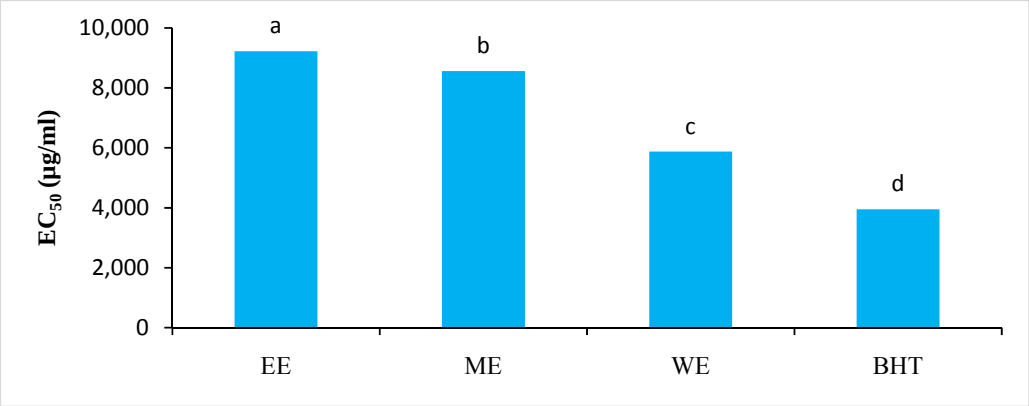

Fig 2 EC_{50} of different extracts compared with BHT

EC_{50}، عبارت است از غلظتی از عصاره که قادر به مهار کردن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH در محیط واکنش می‌باشد. براساس جدول ۱ و نمودار ۲، در بین عصاره‌ها، عصاره آبی که حاوی بالاترین میزان از ترکیبات فنولی است، دارای اثر مهار کنندگی بالاتری می‌باشد (کمترین میزان EC_{50}). ارتباط مثبت بین محتوای ترکیبات فنولی و فعالیت ضداکسایشی بدست آمده، نشان می‌دهد که فعالیت ضداکسایشی این عصاره‌ها با میزان ترکیبات فنولی ارتباط مستقیم دارد. بطور کلی قدرت مهارکنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنولی بستگی دارد. در ترکیبات فنولی با وزن مولکولی پایین‌تر، گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند [۳۳]. در مطالعات انجام شده روی گونه‌های مختلف بنه مانند پوست پسته‌ی ورا [۱۱] و برگ بنه لنتیسکوس [۲۶] نیز مشخص شد که عصاره آبی، فعالیت ضداکسایشی بالایی دارد که محققین اخیر دلیل این امر را بالا بودن میزان تانن در برگ بنه بیان کردند. در پژوهش‌های صورت گرفته روی عصاره‌های مختلف از برگ بنه تربینتوس [۳۴]، پوست میوه بنه [۲۰]، برگ بنه لنتیسکوس [۳۵و۳۶] نیز به بالا بودن ظرفیت ضداکسایشی گونه‌های این گیاه اشاره شده است. در واقع برگ گیاه بنه حاوی ترکیبات ضداکسایشی نظیر ایزومرهای اسید کوئینیک گلایکول[1]، کوئرستین[2]، گلیکوزیدهای کامفرول[3] و لوتئولین[4] می‌باشد [۳۵و۳۷].

1. Galloyl quinic acid
2. Quercetin

بطورکلی تفاوت‌هایی که در میزان خواص ضداکسایشی و محتوای فنولیک عصاره‌های گیاهی مشاهده می‌شود می‌تواند متأثر از فاکتورهایی همچون موقعیت جغرافیایی، دما، مرحله رشد گیاه، زمان برداشت گیاه، فاکتور زمین و بطورکلی فاکتورهای محیطی و فاکتورهای ژنتیکی گیاه باشد [۳۸].

۳-۳-فعالیت ضدمیکروبی

اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی (EE)، متانولی (ME) و آبی (AE) برگ بنه بر رشد میکروارگانیسم‌های مورد آزمون و همچنین مقایسه‌ی اثر آن‌ها با آنتی‌بیوتیک متداول، بطور خلاصه در جدول ۲ آورده شده است. هر سه عصاره بر رشد میکروارگانیسم‌های مورد آزمون اثر مهارکنندگی از خود نشان دادند ولی این اثر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک روی برخی از میکروب‌های مورد آزمون بطور معناداری ($p < ۰/۰۵$) کمتر بود. همانطور که مشخص است، بطور کلی هر سه عصاره روی باکتری‌های گرم مثبت اثر مهارکنندگی بالاتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشتند. محققین وجود یک غشای خارجی هیدروفیل متشکل از لیپوپروتئین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها با خاصیت نفوذپذیری انتخابی در باکتری‌های گرم منفی را از عوامل مهم در مقاومت آن‌ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی می‌دانند. ترکیبات فنولی بویژه ترکیباتی با ماهیت آبدوست قادرند به راحتی از دیواره سلولی باکتری گرم مثبت عبور کنند، از طرفی فضای پری‌پلاسمیک سلول باکتری گرم

3. Kaempferol glucosides
4. Luteolin

منفی حاوی آنزیم‌های بسیاری است که قادر به تجزیه‌ی مولکول‌های خارجی که از فضای بیرون وارد می‌شوند، هستند [۳۹]. چنانچه مشاهده می‌شود مخمر کاندیدا آلبیکانس به عنوان نماینده‌ای از قارچ‌ها، بالاترین مقاومت را نسبت به اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها دارد که می‌توان گفت مکانیسم بازدارندگی عصاره‌ها روی رشد قارچ‌ها می‌تواند به حضور ترکیبات فعال از جمله گلوکوزیداز و رزین‌های محلول در آب و مهار فعالیت آنزیمی در غشای سیتو پلاسمی نسبت داده شود [۴۰]. علاوه بر این، این ترکیبات ممکن است به داخل غشای سیتو پلاسمیک نفوذ کرده و برای سایت‌های فعال آنزیم‌های خاص داخل سلولی رقابت ایجاد کنند که برای تکثیر میکروارگانیسم‌ها ضروری می‌باشد [۴۱].

Table 2 Antimicrobial activities of *Pistacia atlantica* leaf extracts against tested microorganisms based on inhibition zone (mm)

Microorganism	Extract			
	EE	ME	AE	A
Escherichia coli	13.50 ± 0.50^{Ed}	16.50 ± 1.50^{Dc}	20.50 ± 1.50^{Bb}	23.00 ± 0.50^{EFa}
Salmonella typhi	12.50 ± 0.50^{Ec}	17.750 ± 0.25^{Db}	18.25 ± 2.75^{Bb}	22.00 ± 0.50^{Fa}
Shigella dysenteriae	17.25 ± 0.25^{Cc}	25.00 ± 1.25^{Bb}	27.25 ± 0.75^{Aa}	24.00 ± 0.50^{Deb}
Streptococcus faecium	24.25 ± 0.66^{Ac}	25.50 ± 1.14^{Abc}	27.75 ± 1.00^{Aa}	26.00 ± 0.50^{Bab}
Staphylococcus aureus	20.00 ± 1.00^{Bd}	22.50 ± 0.50^{Bc}	27.50 ± 1.00^{Aa}	25.58 ± 0.63^{BCb}
Bacillus cereus	15.75 ± 0.75^{Dc}	20.50 ± 0.50^{Cb}	13.33 ± 1.26^{Cd}	24.67 ± 1.04^{Aa}
Candida albicans	12.83 ± 0.76^{Eb}	13.67 ± 0.58^{Eb}	9.67 ± 0.58^{Dc}	37.67 ± 1.04^{Aa}

EE: Ethanol extract, ME: Methanol extract, AE: Aqueous extract, A: Antibiotic.
Values in the same columns followed by different low case letters are significantly different at $p < 0.05$. Values in the same rows followed by different high case letters are significantly different at $p < 0.05$.

درصورتیکه اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها به تنهایی و بدون در نظر گرفتن آنتی‌بیوتیک متداول مقایسه شود، مشاهده می‌شود که عصاره آبی بالاترین اثر ضدمیکروبی را بر میکروارگانیسم-های مورد آزمون دارا می‌باشد که علت این امر رامی‌توان به بالا بودن ترکیبات فنولی این عصاره مربوط دانست.

در بررسی حساسیت میکروارگانیسم‌ها به عصاره، می‌توان گفت که حساس‌ترین میکروارگانیسم به عصاره اتانولی و متانولی *استرپتوکوکوس فاسیوم* و مقاوم‌ترین میکروارگانیسم نیز *کاندیدا آلبیکانس* می‌باشد، در حالیکه در عصاره آبی حساس‌ترین میکروارگانیسم *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که از لحاظ آماری اختلافی با حساسیت *استرپتوکوکوس فاسیوم* ندارد. در واقع در بین باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس فاسیوم* حساس‌ترین و *باسیلوس سرئوس* مقاوم‌ترین میکروارگانیسم نسبت به عصاره‌ها شناخته شد. از طرفی در بین باکتری‌های گرم مثبت نیز باکتری *شیگلا دیسنتری* حساس‌ترین میکروارگانیسم و *سالمونلا تیفی* مقاوم-ترین میکروارگانیسم نسبت به اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها بودند که مقاومت باکتری *سالمونلا تیفی* را نیز می‌توان به وجود سیستم چندگانه ترکیبی که مسئول ایجاد تغییر در محیط خارجی است، نسبت داد [۴۲].

نتایج آزمون MIC و MBC عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی برگ بنه در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد هر سه عصاره مورد بررسی در غلظت‌های مختلف توانستند روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی اثر مهارکنندگی داشته باشند ولی فقط *شیگلا دیسنتری* و *سالمونلا تیفی* تحت تأثیر خاصیت باکتری‌کشی عصاره اتانولی و متانولی قرار گرفتند. این بدان معناست که اگرچه رشد میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های پایین مهار می‌گردد، اما جهت اعمال اثر کشندگی به غلظت‌های بیشتری از عصاره‌ها نیاز است.

Table 3 MIC and MBC of *Pistacia atlantica* extracts (mg/ml)

Microorganism	**Extracts**					
	EE		ME		AE	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Escherichia coli	50	100 <	25	100 <	50	100 <
Salmonella typhi	50	100 <	25	100 <	50	100 <
Shigella dysenteriae	25	100	12.5	100	12.5	100 <
Streptococcus faecium	12.5	100	12.5	100	12.5	100 <
Staphylococcus aureus	12.5	100 <	12.5	100 <	12.5	100 <
Bacillus cereus	25	100 <	25	100 <	25	100 <
Candida albicans	100	*	50	*	100	*

EE: Ethanol extract, ME: Methanol extract, AE: Aqueous extract

٤-نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که برگ بنه می‌تواند به عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس حاوی ترکیبات فعال زیستی استفاده گردد. عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی این گیاه، بویژه عصاره آبی آن حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولیک بوده و آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH خاصیت ضداکسایشی هر سه عصاره بویژه آبی را تصدیق می-کند و می‌توان گفت این عصاره‌ها توانایی جلوگیری یا به تأخیر انداختن اکسیداسیون را داشته و در صورت خالص‌سازی می-توان انتظار داشت که به نحو مؤثرتری از پیشرفت اکسیداسیون جلوگیری کنند. لذا انجام تحقیقات بیشتر در زمینه بکارگیری این عصاره‌ها بصورت خالص‌سازی شده در بستر مواد غذایی و بویژه بررسی فعالیت نگهدارندگی عصاره‌ها طی مدت زمان نگهداری ضروری می‌باشد.

٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی طرح تحقیقاتی شماره ٩٣١/٠٧ معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان که این مقاله مستخرج از آن طرح می-باشد قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Vercellotti, J.R., St. Angelo, A.J. and Spanier, A.M., 1992. Lipid oxidation in foods, an overview. In: Lipid Oxidation in Food. Ed. St. Angelo. A.J., Washington, D.C., American Chemical Society Press. pp. 112-145.

[2] Tchakam, P. D., Lunga, P. K., Kowa, T. K., Lonfouo, A. H. N., Wabo, H. K., Tapondjou, L. A., ... and Kuiate, J. R. 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum Engl*. and *Hypericum lanceolatum Lam*. *BMC Complementary and alternative medicine*, 12(1): 136.

[3] Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T. A., de Waard, P., Linares-Palomino, P. J., Sánchez, A., and Altarejos, J. 2011. Isolation of antioxidative secoiridoids from olive wood (*Olea europaea* L.) guided by on-line HPLC–DAD–radical scavenging detection. *Food chemistry*, 124(1): 36-41.

[4] Yang, C. S., Wang, H., Li, G. X., Yang, Z., Guan, F. and Jin, H. 2011. Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*, 64(2): 113-122.

[5] Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A. ... and Cassidy, A. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 88(1): 38-50.

[6] Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., and Tounsi, M. S. 2012. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate Blanco*) and bitter orange (*Citrus aurantium L.*) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39: 74-80.

[7] Rios, J. L., and Recio, M. C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1): 80-84.

[8] Ali, M. S., Saleem, M., Ali, Z., and Ahmad, V. U. 2000. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 55(8): 933-936.

[9] Kamali, H., Golmakani, E., Golshan, A., Mohammadi, A. and Sani, T. A. 2014. Optimization of ethanol modified supercritical carbon dioxide on the extract yield and antioxidant activity from *Biebersteinia multifida* DC. *The Journal of Supercritical Fluids*, 91: 46-52.

[10] Sharafati-chaleshtori, R., Rafieian-kopaei, M., Mortezaei, S., Sharafati-chaleshtori, A., and Amini, E. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of *Echinophora platyloba* DC. *African Journal of Pharmacy and Pharmacol*ogy, 6(37): 2692-2695.

[11] Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A. M., Sahari, M. A. and Esfahani, Z.H. 2010. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1): 107-112.

[12] Padulosi, S. and Hadj-Hassan, A. 1998. Towards a comprehensive documentation of distribution and use of Pistacia: genetic diversity in central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. Report of the IPGRI Workshop. 16-26.

[13] Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M.H. and Sharif, A. 2013. Assaying Antioxidant Characteristics of Sesame Seed, Rice Bran, and Bene Hull Oils and their Unsaponifiable Matters by Using DPPH Radical-Scavenging Model System. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 15: 241-253.

[14] Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V. and Meftahizade, H. 2011. Evaluation of antibacterial activity and wound healing of Pistacia atlantica and Pistacia khinjuk. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5: 4310-4314.

[15] Salehi Sormaghi, M., 2010, Medicinal Plants and Herbal Therapy, Tehran, *Donyaye Taghzieh Publishing.* pp:434.

[16] Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N. and Mayer, P. 2012. Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food chemistry*, 131(2): 434-440.

[17] Farhoosh, R., Tavakoli, J. and Khodaparast, M. H. H. 2008. Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85: 723–729.

[18] Meftahizade, H. 2011. Evaluation of antibacterial activity and wound healing of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 4310-4314.

[19] Hosseini, F., Adlgostar, A. and Sharifnia, F. 2013. Antibacterial activity of Pistacia extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2(2):1-7.

[20] Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., and Golmohamadzadeh, S. 2015. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica subsp. mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food chemistry*, 173: 577-583.

[21] Burits, M., and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5): 323-328.

[22] Bellik, Y. 2014. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale Roscoe*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(1): 40-44.

[23] Eidi, S., Azadi, H. G., Rahbar, N., and Mehmannavaz, H. R. 2015. Evaluation of antifungal activity of hydroalcoholic extracts of *Citrullus colocynthis* fruit. *Journal of Herbal Medicine*, 5(1): 36-40.

[24] Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., and Bakhrouf, A. (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8): 2186-2192.

[25] Faller, A. L. K., and Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, 42(1): 210-215.

[26] Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H. ... and Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2): 303-309.

[27] Goli, A. H., Barzegar, M., and Sahari, M. A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3): 521-525.

[28] Khanavi, M., Hajimahmoodi, M., Cheraghi-Niroomand, M., Kargar, Z., Ajani, Y., Hadjiakhoondi, A., and Oveisi, M. R. 2009. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some Stachys species. *African Journal of Biotechnology*, *8*(6): 1143-1147.

[29] Mardani Ghahfarokhi,V, Aalami, M., Arabshahi, S, Khodabakhshi, R, Ghaderi Ghahfrokhi, M. 2013, Evaluation of antioxidative antimicrobial activity of phenolic extracts of Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.). *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 9(2): 182-189.

[30] Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz and Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, *55*(2): 217-225.

[31] Tsao, R., and Deng, Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring

antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography B*, 812(1): 85-99.

[32] Locatelli, M., Travaglia, F., Coïsson, J. D., Martelli, A., Stevigny, C. and Arlorio, M. 2010. Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. *Food chemistry*, 119(4): 1647-1655.

[33] Jung, C. H., Seog, H. M., Choi, I. W., Park, M. W., and Cho, H. Y. 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT-Food Science and Technology*, *39*(3): 266-274.

[34] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of Pistacia terebinthus. *Food Chemistry*, 103(3): 816-822.

[35] Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Aligiannis, N., Magoulas, K., and Krokida, M. 2014. Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*, 167: 25–31.

[36] Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T., and Atmani, D. 2015. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7: 274–286.

[37] Kavak, D. D., Altıok, E., Bayraktar, O., and Ülkü, S. 2010. Pistacia terebinthus extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β-glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3): 167-171.

[38] Goze, I., Alim, A., Tepe, A. S., Sokmen, M., Sevgi, K., and Tepe, B. 2009. Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 246-254.

[39] Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., and Mount, J. R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64(7): 1019-1024.

[40] Viuda Martos, M., Ruiz□Navajas, Y., Fernández□López, J., and Pérez□Álvarez, J. A. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9): R117-R124.

[41] Cota, B. B., Bertollo, C. M., and de Oliveira, D. M. 2013. Anti-allergic potential of herbs and herbal natural products-activities and patents. Recent patents on endocrine, metabolic and immune drug discovery, 7(1): 26-56.

[42] Chi, P.T.L. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from citrus varieties in Vietnam. Thesis of master degree. Hochiminh city international university. Vietnam, 1-75.

Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts of *Pistacia atlantica* leaf

Barzegar, H.[1*], Hojjati, M.[2], Panahi, M.[3]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan
2. Former MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan

(Received: 2016/02/03 Accepted: 2016/09/19)

The objective of this study was to investigate the antioxidant and antimicrobial activities of the ethanol (EE), methanol (ME), and water (AE) extracts from the leaf of *Pistacia atlantica* subspecies *mutica* which naturally grown in Iran. The total phenol content and antioxidant activity of extracts were determined using spectrometric method according to the Folin–Ciocalteu phenol reagent and scavenging effect on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals. The extracts were evaluated for their antimicrobial activity against three Gram-positive, three Gram-negative bacteria and one yeast by assay for minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) using disc diffusion method. Results showed that the water extract had the highest total phenol content. But EC_{50} of water extract was 5.87 compared with BHT as synthetic antioxidant (3.94 mg/ml). The water extract with higher level phenolic compounds and scavenging DPPH showed the highest antioxidant and antibacterial effects, in comparison with the other extracts.

It was found to be effective against all the test organisms with Gram positive strains being more sensitive than Gram negative strains. Also, the water extract were the most effective against the examined bacteria and yeast species, based on its higher content of phenolic compounds. Among the examined microorganisms, *Streptococcus faecium* and *Candida albicans* were found to be the most sensitive and resistant, respectively. According to finding of this study, water extract of *Pistacia atlantica* leaf could be used as a natural preservative in the food industry.

Key words*:* *Pistacia atlantica*, Free radical scavenging, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration

*Corresponding Author E-Mail Address: barzegarha@yahoo.com