مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

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

محمد نوشاد[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، مصطفی رحمتی جنیدآباد[3]

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

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

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

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳

کلمات کلیدی:

عصاره رازک،

آنتی‌اکسیدان،

ضد میکروب،

باکتری پاتوژن،

نگهدارنده طبیعی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6

* مسئول مکاتبات:

Noshad@asnrukh.ac.ir

چکیده

در این مطالعه، عصاره اتانولی گیاه رازک با استفاده از روش خیساندن تهیه شد. فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر باکتری‌های پاتوژن (*Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* و *Enterobacter aerogenes*) مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی گردید. از روش رنگ سنجی معرف فولین-سیوکالتو و کلرید آلومینیوم جهت اندازه‌گیری محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نیز با روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS بررسی گردید. بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد در روش‌های دیسک دیفیوژن (۱۶/۹ میلی‌متر در برابر ۱۲/۵ میلی‌متر) و چاهک آگار (۱۷/۶ میلی‌متر در برابر ۱۳/۹ میلی‌متر) به ترتیب در باکتری‌های *S. aureus* و *E. aerogenes* مشاهده شد. باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره اتانولی گیاه رازک حساس‌تر بودند. محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره به ترتیب برابر با ۹۶/۴۷mg GAE/g و ۲۸/۵mg QE/g بود. اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی رازک بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۵۸/۶۳ و ۶۶/۵ درصد اندازه‌گیری گردید. با توجه به نتایج، عصاره اتانولی گیاه رازک را می‌توان بعنوان ترکیب ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و گسترش اکسیداسیون لیپید در انواع محصولات غذایی استفاده نمود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

۱- مقدمه

با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی‌بیوتیک-های متفاوت، به تدریج اثرات مضر این داروها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی افزایش یافته است که این امر منجر به افزایش تمایل به استفاده از گیاهان دارویی شده است. داروهای طبیعی و گیاهان دارویی از جمله مواد مورد استفاده جهت درمان به شمار می‌آیند و مواد اولیه آن‌ها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد و جایگزین مناسبی برای داروهای صنعتی به شمار می‌آیند [۱]. اساس کاربرد عصاره‌های گیاهی در نگهداری مواد غذایی، دارویی و آرایشی به دلیل خواص عملکردی آنها مانند فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می-باشد که این امر به دلیل وجود طیف وسیعی از ترکیبات فعال بیولوژیکی در آن‌ها گزارش شده است[۲]. عصاره‌های گیاهی دارای ترکیبات فنولیک مختلف مانند اسیدهای فنولی، تانن‌ها و فلاونوئیدها، ترکیبات نیتروژنی از جمله آمینواسیدها، مشتقات کلروفیل، آلکالوئیدها، اسید آسکوربیک و کاروتنوئید می‌باشند. عصاره‌های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات مهم، ایمن بودن و با ویژگی‌های بیولوژیکی مختلف از جمله مانند فعالیت ضد میکروبی، ضدالتهابی وآنتی‌اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۳]. در مطالعات مختلف اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهان مختلف گزارش شده است. برزگر و همکاران [٤] با بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره آبی حنا و خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه، آن را به عنوان یک ترکیب زیست فعال طبیعی معرفی کردند. گزارش شده است که غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه کلپوره (*Teucrium polium*) دارای اثر ضد میکروبی در برابر بسیاری از باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی می‌باشد[۵]. همچنین گزارش شده است که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ اکالیپتوس دارای اثر ضد میکروبی بالایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد[٦].

گیاه رازک با نام علمی *Humulus lupulus* از خانواده شاهدانه (*Cannebinaceae*) می‌باشد. گیاه رازک در آمریکا و اروپا کشت داده می‌شود و در ایران نیز در مناطق شمالی رشد می‌کند. این گیاه حاوی روغن‌های فرار، ترکیبات پلی-فنولی و فلاونوئیدها، ترکیبات رزینی، پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای چرب، قندها، اسیدهای آمینه و املاح می‌باشد. گیاه رازک اثرات مختلفی از جمله ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی و ضد سرطانی دارد. همچنین این گیاه در کاهش مقاومت انسولین، افزایش حجم شیره معده و خواب‌آوری نقش داشته و دارای اثرات ضد درد و ضدالتهاب می‌باشد. گیاه رازک در صنایع دارویی و نوشیدنی مانند نوشیدنی و آبجو به عنوان تثبیت کننده کف و طعم دهنده استفاده می‌شود[۷, ۸]. در پژوهش آلونسو استبان و همکاران [۹]مشخص گردید که عصاره دانه گیاه رازک دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشد. همچنین اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی برگ و مخروط رازک گزارش شده است [۱۰]. با توجه به خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی گیاه رازک، در این پژوهش میزان فنول کل، فلاونوئید کل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره این گیاه بر روی باکتری‌های پاتوژن مانند بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲- ۱- مواد

از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش می‌توان به رادیکال آزادDPPH، معرف فولین-سیوکالتو، رادیکال آزاد ABTS (شرکت سیگما، آمریکا) و محیط‌های کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث (شرکت مرک، آلمان) نام برد.

۲-۲- جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره

پس از جمع‌آوری گیاه رازک، در شرایط مناسب خشک شده و برای عصاره‌گیری پودر گردید.عصاره اتانولی با استفاده از روش خیساندن تهیه شد. جهت تهیه عصاره، ۱۰۰ گرم از گیاه پودر شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹٦ درصد مخلوط و به مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه تحت شرایط همزنی قرار گرفت. سپس مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با شعله کم حرارت داده شد. سوپرناتانت حاصل با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. حجم سوپرناتانت به دست آمده به مقادیر اصلی رسیده و با کاغذ واتمن با قطر ۰/٤۵ میکرومتر فیلتر شد. مخلوط جهت انجام آزمون‌های مختلف در ظروف در بسته، دور از نور و در یخچال نگهداری شدند[۱۱].

۲- ۳- اندازه‌گیری فنول کل

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

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

۲- ٤- میزان فلاونوئید کل

۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر با ۱ میلی‌لیتر عصاره مخلوط شد. سپس ۷۵ میکرولیتر محلول نیتریت سدیم به آن اضافه گردید. پس از گذشت ٦ دقیقه محلول آلومینیوم تری کلراید اضافه شد. پس از ٦ دقیقه ۱ میلی‌لیتر سود به محلول اضافه گردید و جذب نمونه در ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. مقدار فلاوونوئید کل برحسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره (mg QE/g) گزارش گردید [۱۳].

۲-۵- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

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

۲-۵-۱- اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

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

= فعالیت مهارکنندگی DPPH (درصد)

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

۲-۵-۲- مهار رادیکال آزادABTS

رادیکال‌های آزاد ABTS (۷ میلی‌مولار) با افزودن پتاسیم پرسولفات با ۲/٤۵ میلی‌مولار رقیق و در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. محلول کاتیونی رادیکالی ABTS تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول‌موج ۷۳٤ نانومتر رقیق شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره یا اتانول (به عنوان کنترل) به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول کاتیونی رادیکال ABTS اضافه شد. پس از ٦ دقیقه جذب نمونه اندازه‌گیری و فعالیت مهارکنندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید [۳]:

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

۲-٦- تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره

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

۲-٦- ۱- دیسک دیفیوژن آگار

ابتدا دیسک‌های بلانک استریل به مدت ۲۰ دقیقه در هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌های اتانولی گیاه رازک (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) غوطه‌ور شد. دیسک-ها پس از کشت هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه روی محیط کشت مولر هینتون آگار تثبیت گردید. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد[۱٤].

۲- ٦- ۲- چاهک آگار

در این روش پس کشت سوسپانسیون‌های میکروبی (معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند) در سطح محیط مولر هینتون آگار، ٦۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌هایی با قطر ٦ میلی‌متر ایجاد شده در محیط کشت ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر یک از چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۵].

۲-٦- ۳- اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی

جهت اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی از روش رقت‌سازی در مایع در میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی عصاره متانولی رازک (۲، ٤، ۸، ۱٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸، ۲۵٦ و ۵۱۲)، در چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای ریخته شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه گردید. دو چاهک آخر که یکی حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بود به عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر که حاوی محیط کشت و عصاره اتانولی بود به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ میکرولیتر از معرف تری‌فنل‌تترازولیوم (۵ درصد) به چاهک‌ها

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

اضافه شد. مجدداً به مدت ۰/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری تکرار گردید. اولین خانه‌ای که در آن هیچگونه رشد و تغییر رنگی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید [۱٦].

۲- ٦- ٤- اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی

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

۲-۷- آنالیز آماری

آزمون‌های این پژوهش در سه تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزارSPSS نسخه ۱۸ انجام شد. جهت تشخیص معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<0.05$) استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت ضدمیکروبی

نتایج فعالیت ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی رازک بر باکتری‌های پاتوژن، بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار، در شکل ۱ آورده شده است. مطابق نتایج، افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله بازدارندگی گردید. در ارتباط با باکتری *E. aerogenes*، قطر هاله بازدارندگی از ٦/۳ میلی‌متر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره به ۱۲/۵ میلی‌متر در غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش یافت. قطر هاله بازدارندگی برای باکتری *E. coli* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره برابر با ٦/۸ میلی‌متر بود، اما غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره سبب ایجاد هاله عدم رشد با قطر ۱٤ میلی‌متر در اطراف کلنی‌های باکتری *E. coli* گردید. نتایج مشابهی در مورد باکتری‌های مشاهده شد. قطر هاله عدم رشد در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره به ترتیب ۸/۸ و ۷/۳ میلی‌متر برای باکتری‌های *S. aureus* و *L. monocytogenes* بود و افزایش غلظت عصاره به ٤۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد (به ترتیب ۱٦/۹ و ۱۵/۵ میلی‌متر) شد. بطور کلی، بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب در باکتری‌های *S. aureus* و *E. aerogenes* مشاهده گردید و باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *L. monocytogenes*) نسبت به انواع گرم منفی (*E. coli* و *E. aerogenes*) در برابر عصاره اتانولی رازک حساس‌تر بودند.

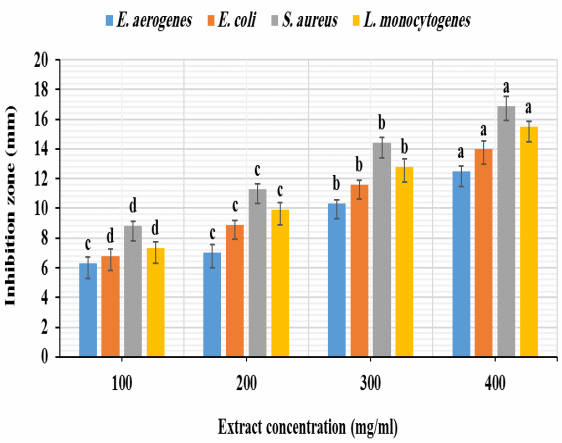

Fig 1 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Humulus lupulus* extract on some microorganism pathogen (disk diffusion agar).

شکل ۲، نتایج اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی رازک در برابر باکتری‌های پاتوژن بر اساس روش انتشار چاهک آگار را نشان می‌دهد. روند اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره مشابه روش دیسک دیفیوژن آگار بود و قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره بطور معنی‌داری افزایش یافت.

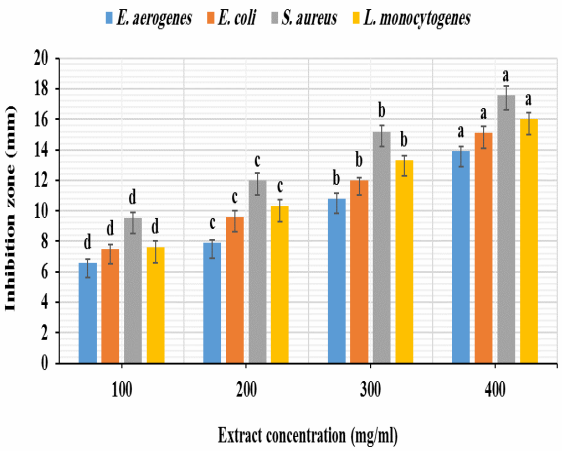

Fig 2 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Humulus lupulus* extract on some microorganism pathogen (well diffusion agar).

علاوه بر این، در غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، باکتری‌های *S. aureus* و *E. aerogenes* به ترتیب بالاترین

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

(۱۷/۶ میلی‌متر) و کمترین (۱۳/۹ میلی‌متر) قطر هاله عدم رشد را به خود اختصاص دارند و اثر ضدمیکروبی عصاره در برابر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود (میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۶/۸ میلی‌متر در برابر ۱۴/۵ میلی‌متر در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). مطابق نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۱)، رشد باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *L. monocytogenes* در حضور غلظت‌های کمتر عصاره اتانولی رازک متوقف گردید و کمترین (۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بیشترین (۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) غلظت مهارکنندگی رشد به ترتیب در باکتری‌های *S. aureus* و *E. aerogenes* مشاهده شد. نتایج حداقل غلظت کشندگی نیز نشان داد که باکتری حساس‌ترین میکروارگانیسم نسبت به عصاره اتانولی رازک می‌باشد و غلظت کمتری از عصاره جهت از بین بردن این باکتری نیاز است (جدول ۱).

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

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

در مطالعه کسری کرمانشاهی و همکاران [۱]، اثر ضد باکتری عصاره الکلی گل گیاه رازک بر روی چهار سویه *S. aureus*، *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* بررسی گردید. عصاره رازک در تمامی غلظت‌ها بویژه غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری از رشد باکتری‌های‌گرم مثبت جلوگیری نمود و غلظت‌های ۱۲۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر مهاری و کشندگی به ترتیب در مورد باکتری‌های *B. subtilis* و *S. aureus* بودند [۱]. محمدی ثانی و همکاران [۷]با بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی رازک بر *S. aureus*، *L. monocytogenes*، *E. aerogenes* و *Salmonella enterica* نشان دادند که مطابق روش دیسک دیفیوژن و براث میکرودیلوشن، باکتری‌های گرم مثبت به عصاره آبی رازک نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساس‌تر بودند. بیشترین اثر مهارکنندگی رشد (قطر هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر) در روش ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار در برابر *S. aureus* مشاهده شد. اگرچه، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره آبی رازک بر روی برابر با ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، اما غلظت‌های مورد بررسی عصاره اثر کشندگی (MBC) بر باکتری‌ها نداشتند [۷]. در مطالعه‌ی آلونسو استبان و همکاران [۹]، عصاره متانولی رازک دارای اثر ضد باکتریایی بر میکروارگانیسم‌های بر *S. aureus*، *L. monocytogenes*، *Bacillus cereus*، *E. coli*، *Enterococcus faecalis* و *Salmonella typhimurium* بود و این اثر به حضور کاتچین در عصاره نسبت داده شد که قادر به رسوب پروتئین‌های دیواره سلولی و در نتیجه تداخل در تشکیل دیواره سلولی می‌باشند[۹, ۱۸]. لازم به ذکر است که مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به انواع گرم مثبت در برابر عصاره اتانولی رازک عمدتاً ناشی از وجود غشاءهای خارجی اطراف باکتری‌های گرم منفی است که سبب افزایش مقاومت آن‌ها می‌گردد. گزارش شده است که غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی از ساختار پیچیده لیپوپلی‌ساکاریدی تشکیل شده است که سرعت نفوذ ترکیبات آبگریز موجود در عصاره و اسانس‌های گیاهی به داخل سلول را کند می‌سازد. اما لایه موکوپپتیدی ساده در باکتری‌های گرم مثبت دارای نفوذپذیری بالایی می‌باشد که حساسیت بیشتر آن‌ها نسبت به ترکیبات آبگریز را به دنبال دارد [۱۲, ۱۹].

۳- ۲- محتوای فنول و فلاونوئید کل

محتوای فنول کل عصاره اتانولی گیاه رازک برابر با ۹۶/۴۷mg GAE/g و محتوای فلاونوئید آن برابر با برابر با ۲۸/۵۰mg QE/g بود(شکل ۳). کسکین و همکاران [۲۰] گزارش نمودند که میوه کاج و برگ‌های رازک به ترتیب دارای محتوای فنول کل ۷/۱۲ mg GAE/g و ۶/۸۶ می‌باشد. علاوه بر این، میزان فنول کل ۱۵ mg GAE/g در عصاره برگ رازک در

مطالعه آبرام و همکاران [۱۰] گزارش شده است. همچنین، مالیار و همکاران [۲۱] و فارکاس و همکاران [۲۲] محتوای فنول کل عصاره متانولی رازک را به ترتیب ۷/٤ µg GAE/g و ۲/۳۹ mg GAE/g گزارش دادند. میزان فنول کل رازک تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل منطقه کشت، شرایط آب و هوایی، روش‌های استخراج و نوع حلال قرار می‌گیرد [۱۰].

عصاره گیاه رازک دارای ترکیبات فنولی مختلفی از قبیل کاتچین و اپی‌کاتچین می‌باشد. آلونسو استبان و همکاران[۹] گزارش نمودند که عصاره متانولی گیاه رازک حاوی ۱۳/۷ میلی‌گرم در گرم کاتچین و ۳/۹ میلی‌گرم در گرم اپی‌کاتچین است. در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که میزان کاتچین و اپی‌کاتچین در عصاره متانولی رازک به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۸۳ میلی‌گرم در گرم می‌باشد [۲۰]. علاوه بر این، گزارش شده است که لوتئولین، روتین، فرولیک اسید و کاتچین عمده‌ترین ترکیبات فنولی شناسایی شده در عصاره میوه رازک و روتین، اپی‌کاتچین، وانیلیک اسید و دیادزئین فراوان‌ترین ترکیبات فنولی در عصاره برگ رازک می‌باشند [۲۰]. لازم به ذکر است که کاتچین و اپی‌کاتچین بطور گسترده‌ای بعنوان افزودنی عملگرا در مواد غذایی، غذا داروها و مکمل‌های تغذیه‌ای به منظور بهبود سلامت مصرف کنندگان، جلوگیری از بیماری‌های مختلف و افزایش عمر نگهداری محصولات استفاده می‌شوند [۲۳-۲۵].

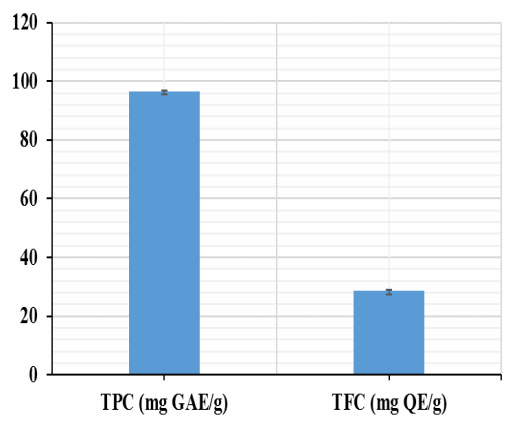

Fig 3 Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *Humulus lupulus* extract.

۳-۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ترکیبات فنولی نقش ویژه‌ای در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی ایفا می‌کنند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی گیاه رازک مطابق دو روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPHو ABTSاندازه‌گیری و نتایج در شکل ٤ آورده شده است. مشاهده گردید که عصاره اتانولی گیاه رازک دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد قابل‌توجهی می‌باشد. بطوریکه فعالیت مهارکنندگی در برابر رادیکال‌های آزاد DPPHو ABTSبه ترتیب معادل ۵۸/٦۳ و ٦٦/۵ درصد بود.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رازک در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. مالیار و همکاران [۲۱] گزارش دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه رازک در برابر رادیکال‌های آزاد DPPHو ABTSبه ترتیب در محدودهµgTorolox/g ٤٤/۳- ۲۳/۷ و ٦۰/٦- ٤۳/۸ می‌باشد. آبرام و همکاران [۱۰] نشان دادند که عصاره اتانولی برگ رازک دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPHکمتری نسبت به عصاره اتانولی میوه گیاه می‌باشد (حدود ۵ برابر). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی برگ و میوه رازک در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH(mg/ml ۰/۹۹ – ۰/۷۸) در مطالعه‌ی کسکین و همکاران [۲۰] گزارش شده است. علاوه بر این، آلونسو استبان و همکاران [۹] بیان نمودند که عصاره متانولی رازک دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی (۵۰۵µg/ml) در برابر رادیکال آزاد DPPHدارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رازک عمدتاً ناشی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن می‌باشد؛ بطوریکه اثر آنتی‌اکسیدانی کاتچین و اپی‌کاتچین در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۲٦-۲۹].

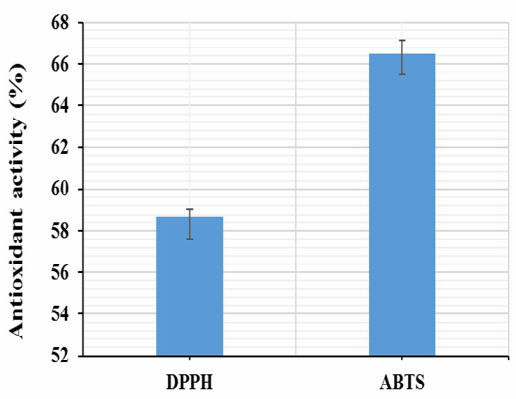

Fig 4 Antioxidant activity of *Humulus lupulus* extract.

با اینحال، مقایسه نتایج این مطالعه با یافته‌های سایر محققان نشان می‌دهد که تفاوت میان اعداد گزارش شده برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رازک ممکن است به شرایط آب و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

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

٤- نتیجه‌گیری نهایی

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

٥- تقدیر و تشکر

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

٦- منابع

[1] R. Kasra Kermanshahi, B. Nasr Esfahani, A. A. Pour babaie, G. Asghari, and J. Esmi Serkani, "The Study of Antibacterial Effect of *Humulus lupulus* on some of Gram Positive & Gram Negative Bacteria," *Journal of Medicinal Plants,* vol. 8, no. 30, pp. 92-97, 2009.

[2] M. Yeganegi, F. Tabatabaei Yazdi, S. A. Mortazavi, J. Asili, B. Alizadeh Behbahani, and A. Beigbabaei, "*Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection," *Microbial Pathogenesis,* vol. 116, pp. 62-67, 2018.

[3] P. Namazi, H. Barzegar, B. Alizadeh behbahani, and M. A. Mehrnia, "Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts," *Food Science and Technology,* vol. 18, no. 113, pp. 301-311, 2021.

[4] H. Barzegar, B. Alizadeh behbahani, and M. Noshad, "Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* aqueous extract against some gram- positive and gram- negative bacteria," *Food Science and Technology,* vol. 18, no. 116, pp. 327-335, 2021.

[5] F. Tabatabaei Yazdi and B. Alizadeh Behbahani, "Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”," *Archives of Advances in Biosciences,* vol. 4, no. 4, 2013.

[6] B. A. Behbahani, F. T. Yazdi, A. Mortazavi, F. Zendeboodi, and M. M. Gholian, "Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* Lon food infection and intoxication microorganisms “in vitro”" *Archives of Advances in Biosciences,* vol. 4, no. 3, 89-99, 2013.

[7] A. Mohamadi Sani, M. Azami, and M. Yavarmanesh, "Evaluation of antimicrobial effect of Hop water extract with Humulune from Hop against *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*," (in en), *Iranian Food Science and Technology Research Journal,* vol. 11, no. 2, pp. 218-224, 2015.

[8] S. H. Hejazian and S. M. Mahdavi, "Comparison Between the Analgesic Effect of *Humulus Lupulus* (Hops) Extract and Morphine in Mice," *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences,* vol. 5, no. 4, pp. 265-272, 2006.

[9] J. I. Alonso-Esteban *et al.*, "Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds," *Industrial Crops and Products,* vol. 134, pp. 154-159, 2019.

[10] V. Abram *et al.*, "A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones,"

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

Rhizopus stolonifer causing strawberry's rot and mold," *Food Science and Technology,* vol. 18, no. 115, pp. 171-180, 2021.

[18] F. M. S. Gomes *et al.*, "Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains," *Microbial Pathogenesis,* vol. 115, pp. 175-178, 2018.

[19] H. Zanganeh, F. Shahidi, S. A. Mortazavi, and B. Alizadeh Behbahani, "Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Citrus paradisi* essential oil nanoemulsion on pathogenic microorganisms: A laboratory study," (in en), *Iranian Food Science and Technology Research Journal,* 2021, doi: 10.22067/ifstrj.2021.71660.1074.

[20] Ş. Keskin, Y. Şirin, H. E. Çakir, and M. Keskin, "An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes," *South African Journal of Botany,* vol. 120, pp. 170-174, 2019.

[21] T. Maliar *et al.*, "Secondary metabolites, antioxidant and anti-proteinase activities of methanolic extracts from cones of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars," *Chemical Papers,* vol. 71, no. 1, pp. 41-48, 2017.

[22] A. Fărcaş, M. Tofană, S. Socaci, S. Scrob, L. Salanţă, and A. Borşa, "Preliminary study on antioxidant activity and polyphenols content in discharged waste from beer production," *J. Agroaliment. Process. Technol,* vol. 19, pp. 319-324, 2013.

[23] V. K. Ananingsih, A. Sharma, and W. Zhou, "Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection," *Food Research International,* vol. 50, no. 2, pp. 469-479, 2013.

[24] A. F. Massounga Bora, S. Ma, X. Li, and L. Liu, "Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances," *Food Research International,* vol. 105, pp. 241-249, 2018.

[25] M. Karabin, T. Hudcova, L. Jelinek, and P. Dostalek, "Biotransformations and biological activities of hop flavonoids," *Biotechnology Advances,* vol. 33, no. 6, Part 2, pp. 1063-1090, 2015.

[26] T. Inui, K. Okumura, H. Matsui, T. Hosoya, and S. Kumazawa, "Effect of harvest time on some in vitro functional properties of hop polyphenols," *Food Chemistry,* vol. 225, pp. 69-76, 2017.

Industrial Crops and Products, vol. 64, pp. 124-134, 2015.

[11] M. Noshad, B. Alizadeh Behbahani, and S. Dehghani, "Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract," *Food Science and Technology,* vol. 17, no. 100, pp. 117-125, 2020.

[12] H. Zanganeh, S. A. Mortazavi, F. Shahidi, and B. Alizadeh Behbahani, "Evaluation of the chemical and antibacterial properties of *Citrus paradise* essential oil and its application in *Lallemantia iberica* seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage," *Journal of Food Measurement and Characterization,* vol. 15, no. 6, pp. 5556-5571, 2021.

[13] B. Majdi, M. A. Mehrnia, H. Barzegar, and B. Alizadeh Behbahani, "Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil," (in en), *Iranian Food Science and Technology Research Journal,* vol. 17, no. 2, pp. 261-271, 2021.

[14] M. Rahmati-Joneidabad and B. Alizadeh behbahani, "Evaluation of chemical activity and antifungal effect of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causing orange rot," *mdrsjrns,* vol. 18, no. 114, pp. 82-73, 2021.

[15] F. Shahidi, F. Tabatabaei Yazdi, B. Alizadeh Behbahani, S. Roshanak, N. Norouzi, A. Vasiee, "Aantibacterial Effect of *Tragopogon graminifolius* Extract on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* "in vitro"," *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine,* vol. 24, no. 84, pp. 1-10, 2019.

[16] M. Ebrahimi Hemmati Kaykha, H. Jooyandeh, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, "Antimicrobial Activity of Rosemary Essential Oil and its Interaction with Common Therapeutic Antibiotics on some Gram Positive and Gram Negative Bacteria," *Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine,* vol. 87, pp. 25-34, 2020.

[17] M. Rahmati-Joneidabad, B. Alizadeh Behbahani, and M. Noshad, "Antifungal effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and

Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of *Callistemon Citrinus* Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study," *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences,* vol. 19, no. 5, pp. 463-484, 2020.

[31] F. Falah, K. Shirani, A. Vasiee, F. Tabatabaee Yazdi, and B. Alizadeh Behbahani, "In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of Echinops setifer extract," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* vol. 35, p. 102102, 2021.

[32] M. A. Mehrnia, B. Alizadeh Behbahani, H. Barzegar, and H. Tanavar, "*Sclerorhachis platyrachis* essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria “in vitro”," *Food Science and Technology,* vol. 18, no. 112, pp. 189-198, 2021.

[27] M. Grzesik, K. Naparło, G. Bartosz, and I. Sadowska-Bartosz, "Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants," *Food Chemistry,* vol. 241, pp. 480-492, 2018.

[28] I. Peres, S. Rocha, J. Gomes, S. Morais, M. C. Pereira, and M. Coelho, "Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles," *Carbohydrate Polymers,* vol. 86, no. 1, pp. 147-153, 2011.

[29] A. A. Zanwar, S. L. Badole, P. S. Shende, M. V. Hegde, and S. L. Bodhankar, "Chapter 21 - Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease," in *Polyphenols in Human Health and Disease*, R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi Eds. San Diego: Academic Press, 2014, pp. 267-271.

[30] Z. Sosani Gharibvand, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and H. Jooyandeh, "Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

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

Noshad, M. [1*], Alizadeh Behbahani, B. [2], Rahmati-Joneidabad, M. [3]

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

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 12/ 24
Accepted 2022/ 02/ 22

Keywords:

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

DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6

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

ABSTRACT

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.126.15.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.126.143]