بهینه یابی شرایط استخراج عصاره قره قاط (*Vaccinium macrocarpon*) به روش خیساندن و بررسی اثر ضد باکتریایی آن

اسماعیل عطای صالحی*، امیر خدنگ نیکفرجام

گروه علوم وصنایع غذائی، دانشکده علوم وصنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *eatayesalehi@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۴

چکیده

در این تحقیق شرایط استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط به روش خیساندن، با رویه آماری سطح پاسخ بهینه یابی و اثرات ضد باکتریایی عصاره بررسی گردید. جهت استخراج عصاره از شرایط دمایی ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد، زمان ۲ تا ۱۰ ساعت، نسبت نمونه به حلال ۴ تا ۲۰ درصد و نسبت حلال اتانول به متانول صفر تا ۱۰۰ درصد استفاده شد. اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با تعیین MIC و MBC علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوجنز*، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* ارزیابی شد. شرایط عملیاتی بهینه جهت حصول بیشینه‌ی مقدار عصاره‌ی قره قاط در فرآیند استخراج دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۱۰ ساعت، نسبت نمونه به حلال ۱۱/۴۳درصد و نسبت اتانول به متانول ۸۸/۸۸ درصد تعیین گردید. در این شرایط راندمان استخراج ۴/۸۸ درصد اندازه‌گیری شد. راندمان استخراج عصاره قره قاط بر اساس مدل ریاضی ۵/۱۷ درصد پیش‌بینی شد. نزدیکی مقدار راندمان استخراج تجربی با مقدار پیش‌گویی شده توسط مدل نشان دهنده‌ی کارایی نسبتا مناسب مدل می‌باشد. عصاره‌ی الکلی قره قاط حاصله دارای اثر ضدباکتریایی بود و بر رشد کلیه باکتری‌های مورد آزمون تاثیر گذاشت. در این بین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر بود. *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت نشان دادند. به‌طوری‌که به ترتیب کمترین و بیشترین مقادیر MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشتند.

واژگان کلیدی: قره قاط، بهینه یابی، اثر ضد باکتریایی

مقدمه

افزودنی‌های طبیعی و سنتزی به منظورایمنی، ایجاد ظاهری مطلوب و بهبود عطر و طعم مواد غذایی استفاده می‌شوند. مصرف‌کنندگان مواد غذایی نسبت به غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی بوده و در آن‌ها مواد طبیعی به کار رفته است تمایل بیشتری نشان می‌دهند و به همین دلیل مطالعات زیادی در رابطه با امکان جایگزین کردن افزودنی‌های شیمیایی با ترکیبات طبیعی در غذاهای مختلف صورت گرفته است (برزگر و همکاران، ۱۳۸۷؛ Nakamura et al, 1991).

امروزه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که علاوه بر داشتن برخی ویژگی‌های مضر بر سلامتی انسان، امکان ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد (حجتی بناب و نیک‌خواه، ۲۰۱۲). بنابراین تلاش‌های بسیاری جهت جایگزین کردن داروهایی با منشاء گیاهی انجام گرفته است، زیرا ترکیبات ضد میکروبی گیاهی، با ساختارهای متفاوت از آنتی-بیوتیک‌ها، موجب از بین رفتن باکتری‌ها می‌شوند که از نظر بالینی، این موضوع در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی حائز اهمیت است (Oussalah et al., 2007). استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی، راه حلی مناسب جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی فرآوری شده می‌باشد که می‌تواند باعث کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروب‌های با منشاء غذایی شود (عزیزخانی و همکاران، ۲۰۰۷).

عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی ایجاد اختلال کنند و یا باعث منعقد و کواگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند (Burt, 2004).

قره قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L) متعلق به خانواده Ericaceae گیاهی درختچه‌ای و بدون خار به طول ۱ تا ۳ متر است، که شاخه های تازه آن از هم باز بوده ودارای کرک‌های پراکنده می‌باشد. این گیاه دارای برگ‌های پنجه ای با پایه قلبی شکل باحاشیه دندانه دار و اره‌ای شکل است. سطح برگ به صورت پراکنده ولی پشت آن به طور انبوه ی کرکدار می‌باشد. میوه سته، کروی، قرمز رنگ تا ارغوانی مایل به سیاه و بدون کرک است. میوه و برگ بخش‌های دارویی گیاه را تشکیل می‌دهد. . جمع آوری پس از رسیدن میوه‌ها در اواخر تابستان و اوایل پاییز انجام می‌گیرد. این گیاه بیشتر در نواحی اروپا می‌روید و از این نواحی صادر می‌شود. گونه از این درختچه که در ایران می‌روید Vaccinium myrtillus نام دارد که از نظر خواص درمانی مشابه گونه اروپایی است (سپهری‌فر و حسن‌لو، ۱۳۸۸؛ سپهری‌نیک و همکاران، ۱۳۹۰).

هدف از این مطالعه، معرفی شرایط بهینه استخراج عصاره الکلی قره قاط به روش خیساندن، به کمک روش آماری سطح پاسخ و تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره‌ی الکلی علیه برخی باکتری های بیماریزای شاخص در مواد غذایی بود.

مواد و روش کار

مواد

میوه قره قاط به صورت خشک از بازار محلی قوچان و حلال‌های اتانول و متانول ازشرکت مرک آلمان تهیه شد. باکتری‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *لیستریا مونوسایتوجنز* (1165PTCC)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 70876) و *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) از گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. محیط های کشت نوترینت براث، تریپتون سوی براث، تریپتون سوی آگار و مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) استفاده شد.

روش‌ها

استخراج عصاره‌ی قره قاط برای تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده گردید. وزن مشخصی از میوه خشک و تمیز قره قاط به نسبت۱ به ۵ در مخلوط حلال‌های اتانول و متانول به نسبت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد اتانول خیسانده شد. عصاره‌های استحصال شده پس از صاف کردن با کاغذ صافی ، توسط اواپراتور چرخنده (هیدلف، آلمان) تغلیظ و در نهایت به کمک آون تحت خلأ (شل لب 1410D-2E، آمریکا) خشک شد. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی باندهای دوگانه کونژوگه، طی خشک کردن از دمای پایین ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. (شفیعی نیک و همکاران ۱۳۹۰)

راندمان استخراج

به منظور تعیین راندمان استخراج عصاره، مقدار نهایی پودر بدست آمده بوسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۱ توزین و نسبت وزنی پودر بدست آمده به مقدار وزنی میوه خشک قره قاط به عنوان راندمان استخراج عصاره محاسبه گردید.

طرح آزمایش وتجزیه وتحلیل آماری

دراین مطالعه به منظور طراحی تعداد آزمون‌ها و مدل ریاضی پیشگوی اثر متغیرهای مستقل شامل X_1 دما، X_2 زمان، X_3 نسبت نمونه به حلال و X_4 نسبت حلال اتانول به متانول، بر راندمان استخراج عصاره‌ی الکلی میوه خشک قره قاط از طرح آماری RSM استفاده شد (Zhang et al., 2010). در جدول۱متغیرهای مستقل فرایند و سطوح آنها نشان داده شده است. آزمایش در دو تکرار انجام شد. مدل مورداستفاده در RSM عموما رابطه‌ی درجه دوم می‌باشد. درروش RSM برای هرمتغیر وابسته، مدلی تعریف شده که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر هرمتغیرجداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیرمی‌باشد. درمعادله ذکرشده Y پاسخ پیشبینی شده، β_0 ضریب ثابت و β_1، β_2، β_3، β_4 اثرات خطی و β_{11}، β_{22}، β_{33}، β_{44} اثرمربعات و β_{12}، β_{13}، β_{14}، β_{23}، β_{24}، β_{34} اثرات متقابل می‌باشند. ازنرم افزار Minitab 16 جهت تجزیه وتحلیل اطلاعات استفاده شد و رسم نمودارهای

مربوط به روش سطح پاسخ صورت گرفت (Yolmeh et al., 2014).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

جدول۱- متغیرهای مستقل و سطوح آنها

متغیر مستقل	نماد ریاضی	سطوح متغیر			
دما (°C)	X_1	۵	۱۹	۳۲	۴۶	۶۰
زمان (ساعت)	X_2	۲	۴	۶	۸	۱۰
نسب نمونه به حلال	X_3	٪۴	٪۸	٪ ۱۲	٪۱۶	٪۲۰
نسبت اتانول به متانول	X_4	٪۰	٪۲۵	٪ ۵۰	۷۵	٪۱۰۰

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ی قره قاط:

جهت بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌ی قره قاط از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. بدین ترتیب که از باکتری‌های فعال شده (۲۴ ساعت رشد کرده) سوسپانسیونی معادل با کدورت نیم مک-فارلند استاندارد ایجاد شد. سپس توسط سواپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشت و در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل سطحی کشت شد. دیسک‌های استریل با قطر ۶ میلی‌متر در محلول عصاره‌ی قره قاط با غلظت‌های تعیین شده (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۵ میلی‌گرم بر لیتر) خیسانده و در سطح پتری‌دیش‌ها استفاده شدند؛ سپس پتری‌دیش‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه‌گیری شد (Skaltsa et al., 2003). همچنین یک پلیت فاقد باکتری به عنوان شاهد (کنترل) منفی و یک پلیت نیز بدون عصاره قره قاط به عنوان شاهد مثبت (کنترل) در نظر گرفته شد. دیسک های آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و جنتامایسین) نیز به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد استفاده شد.

تعیین کمینه غلظت بازدارنده عصاره‌ی الکلی قره قاط (Minimum Inhibitory Concentration)

MIC به کمترین غلظت ازیک ترکیب که رشدمیکروارگانیسم رامهارمی‌نماید،اطلاق می‌شود. به عبارت دیگر، به کمترین مقدار از یک ترکیب گفته می-شودکه بتواند به طور قابل توجهی رشد یک ارگانیسم را پس ازگذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت) مهار نماید. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد از روش رقت‌های مکرر (serial dilution) استفاده شد. در این روش از غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ میلی-گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (Manenzhe et al., 2004).

تعیین کمینه غلظت کشنده عصاره‌ی الکلی قره قاط (Minimum Bactericidal Concentration)

MBC به کمترین غلظت ازیک ترکیب اطلاق می‌شودکه بتواندپس ازگذشت۲۴ساعت جمعیت باکتریایی را به میزان۹۹/۹درصد (هزار برابر جمعیت اولیه) کاهش دهد. برای مشخص نمودن حداقل غلظت کشنده باکتری از کشت رقتهای فاقد کدورت در محیط آگاردار استفاده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند.. غلظتی (رقتی)که شمارش تعدادکلونی‌ها درآن صفربود، به عنوان حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها گزارش شد (Manenzhe et al., 2004).

نتایج

جدول ۲ اثر تیمارهای مختلف بر راندمان استخراج عصاره را نشان می‌دهد.

جدول ۲- اثر تیمارهای مختلف بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

تیمار	دمای استخراج (°C)	زمان استخراج (h)	درصد اتانول	نسبت نمونه به حلال ٪	راندمان استخراج (٪)
۱	۴۶	۴	۷۵	۱۶	۴/۲۹
۲	۴۶	۸	۲۵	۸	۳/۷۹
۳	۱۸	۴	۷۵	۸	۳/۲۳
۴	۳۲/۵	۶	۵۰	۱۲	۳/۵۳
۵	۳۲/۵	۶	۱۰۰	۱۲	۲/۸۹
۶	۱۸	۴	۲۵	۸	۲/۷۶
۷	۱۸	۸	۷۵	۱۶	۳/۳۱
۸	۴۶	۸	۷۵	۱۶	۴/۵۹
۹	۱۸	۸	۲۵	۱۶	۲/۹۳
۱۰	۴۶	۸	۷۵	۸	۴/۳۶
۱۱	۱۸	۴	۷۵	۱۶	۳/۳۱
۱۲	۳۲	۶	۵۰	۲۰	۳/۱۴
۱۳	۴۶	۴	۷۵	۸	۴/۳۵
۱۴	۱۸	۸	۷۵	۸	۳/۲۲
۱۵	۳۲	۱۰	۵۰	۱۲	۳/۶۳
۱۶	۶۰	۶	۵۰	۱۲	۴/۱۹
۱۷	۴۶	۴	۲۵	۸	۳/۵۹
۱۸	۳۲	۲	۵۰	۱۲	۳/۳۷
۱۹	۳۲	۶	۵۰	۴	۳/۲۷
۲۰	۵	۶	۵۰	۱۲	۲/۴۸
۲۱	۳۲	۰	۶	۱۲	۲/۸۷
۲۲	۱۸	۸	۲۵	۸	۲/۷۵
۲۳	۴۶	۸	۲۵	۱۶	۳/۶۵
۲۴	۴۶	۴	۲۵	۱۶	۳/۵۰
۲۵	۱۸	۴	۲۵	۱۶	۲/۹۲

جدول ۳، ضریب تعیین، R^2 پیش‌بینی شده و R^2 تصحیح شده برای راندمان استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط در چهار مدل مختلف را نشان می‌دهد. به منظور انتخاب مدل با کارایی مناسب مقادیر R^2 ها مقایسه شد. هر مدلی که بیشترین مقادیر ضرایب را به خود اختصاص داد به عنوان مدل مناسب انتخاب شد (بدویک و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین مطابق جدول، مدل درجه دوم دارای بیشترین قابلیت پیش‌گویی می‌باشد. علاوه بر این، مقدار عدم برازش برای مدل انتخاب شده برای استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$) که نشان‌دهنده‌ی مطلوبیت و دقت مدل پیشنهاد شده می‌باشد.

مدل درجه دوم کامل برای راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط که در آن عبارت‌های بی‌معنی حذف شده‌اند، به صورت زیر می‌باشد:

$$\text{راندمان استخراج (٪)} = ۳/۵۴۴۲ + ۰/۴۶۲۹ X_۱ - ۰/۲۰۰۴ X_۲ - ۰/۱۱۵۳ X_۳^۲ + ۰/۰۰۰۱۹۳ X_۱X_۲ + ۰/۰۸۴۳ X_۱X_۳$$

جدول ۳ - مقایسه ضرایب تعیین مدل‌های مختلف

مدل		پاسخ
		راندمان استخراج
خطی		
	R^2 ٪	۷۸/۴۵
	R^2 ٪ تصحیح شده	۷۶/۹۴
	R^2 ٪ پیش‌بینی شده	۷۳/۵۶
خطی- مربعی		
	R^2 ٪	۸۴/۵۸
	R^2 ٪ تصحیح شده	۸۲/۲۶
	R^2 ٪ پیش‌بینی شده	۷۴/۴۶
خطی- برهمکنش		
	R^2 ٪	۸۰/۵۷
	R^2 ٪ تصحیح شده	۷۶/۷۶
	R^2 ٪ پیش‌بینی شده	۷۳/۳۴
درجه دوم کامل		
	R^2 ٪	۸۶/۷۱
	R^2 ٪ تصحیح شده	۸۲/۷۵
	R^2 ٪ پیش‌بینی شده	۷۳/۵۳

جدول آنالیزواریانس (جدول۴) برای تشخیص معنی‌دار بودن عبارت‌های مدل به‌کار می‌رود. به صورتی که هر چه مقدار عددی P کوچکتر و مقدار عددی F بیشتر باشد، اثر معنی‌داری را بر پاسخ پیش‌بینی شده خواهد داشت (کووان هونگ و کایلی، ۲۰۰۵). مطابق جدول، در عبارت-های خطی دمای استخراج و درصد اتانول، در بین عبارت-های مربعی عبارت نمای دوم درصد اتانول و در بین برهم-کنش‌ها، تنها برهم‌کنش دمای استخراج و درصد اتانول اثر معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بر راندمان استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط از خود نشان دادند و اثر سایر عبارت‌ها بر پاسخ معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). مطابق جدول ۴ عبارت‌های خطی دمای استخراج و نمای دوم دمای استخراج به ترتیب بیشترین و کمترین اثر را بر میزان راندمان استخراج عصاره‌ی قره قاط از خود نشان دادند. همچنین در نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های انتشار دیسک (جدول ۵) مشخص شد که عصاره‌ی الکلی قره قاط بر رشد باکتری‌های مورد نظر موثر بوده و هاله‌ی عدم رشد با قطرهای متفاوت در باکتری‌های مختلف ایجاد شد.

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس مدل های مختلف بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F احتمال	Pاحتمال
مدل	۱۴	۱۳/۵۵۷۷	۰/۹۶۸۴	۲۱/۱۷	۰
خطی	۴	۱۲/۲۶۶۰	۳/۰۶۶۵	۷۰/۱۶	۰
X_1	۱	۱۰/۲۳۰۵	۱۰/۲۳۰۵	۸۱/۳۷	۰
X_2	۱	۰/۱۱۲۱	۰/۱۱۲۱	۲/۶۰	۰/۱۱۴
X_3	۱	۰/۹۲۰۰	۱/۹۲۰۰	۴۳/۸۸	۰
X_4	۱	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۳	۰/۰۷	۰/۷۹۵
نمای دوم	۴	۰/۹۵۹۶	۰/۲۳۹۹	۵/۴۳	۰/۰۰۱
X_1^2	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰	۰/۹۵۴

X_2^2	۱	۰/۰۹۱۴	۰/۰۹۱۴	۲/۰۷	۰/۱۵۹
X_3^2	۱	۰/۷۵۶۷	۰/۷۵۶۷	۱۷/۳۲	۰
X_4^2	۱	۰/۰۶۵۳	۰/۰۶۵۳	۱/۵۱	۰/۲۲۵
برهمکنش	۶	۰/۳۳۲۱	۰/۰۵۵۳	۱/۲۹	۰/۲۷۹
X_1X_2	۱	۰/۰۵۷۸	۰/۰۵۷۸	۱/۲۸	۰/۲۶۴
X_1X_3	۱	۰/۲۱۷۸	۰/۲۱۷۸	۵/۱۸	۰/۰۲۷
X_1X_4	۱	۰/۰۴۲۱	۰/۰۴۲۱	۰/۹۲	۰/۳۴۱
X_2X_3	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱	۰/۹۳۳
X_2X_4	۱	۰/۰۰۷۲	۰/۰۰۷۲	۰/۲۱	۰/۶۵۱
X_3X_4	۱	۰/۰۰۷۲	۰/۰۰۷۲	۰/۱۶	۰/۷۰۰
خطای باقیمانده	۴۷	۲/۰۷۸۲	۰/۰۴۴۲		
عدم برازش				۳/۱۴	۰/۰۷۵
خطای خالص	۳۷	۰/۰۱۲۵			

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد باکتری توسط عصاره قره قاط بر حسب میلی‌متر

غلظت عصاره گیاهی / باکتری	۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر	دیسک آنتی‌بیوتیک *
باسیلوس سرئوس	۹/۲±۰/۴۵	۱۰/۹±۰/۵۲	۱۲/۳±۰/۴۵	۱۳/۵±۰/۵۲	۱۴/۲±۰/۵۲	۱۳ پ
لیستریا مونوسایتوژنز	۸/۷±۰/۳۵	۱۰/۲±۰/۲۸	۱۱/۸±۰/۴۵	۱۲/۷±۰/۴۰	۱۳/۹±۰/۴۰	۲۲ پ
استافیلوکوکوس اورئوس	۹±۰/۳۵	۱۰/۵±۰/۳۵	۱۱±۰/۴۵	۱۲/۴±۰/۲۸	۱۳/۷±۰/۴۵	۳۲ پ
اشریشیا کلی	۸/۷±۰/۲۸	۹/۲±۰/۴۰	۹/۵±۰/۲۸	۱۰/۲±۰/۳۰	۱۱/۳±۰/۳۰	۱۳ ج

پ : دیسک آنتی‌بیوتیک پنی سیلین، ج : دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین.

آزمون‌های رقت آگار (جدول ۶) نشان داد که عصاره الکلی قره قاط اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد آزمون دارد، بدین صورت که باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی به ترتیب کمترین و بیشترین غلظت بازدارنده از رشد را نشان دادند.

.

جدول ۶- حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط عصاره الکلی قره قاط

سویه های باکتریایی	۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۴ میلی گرم بر میلی لیتر	۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر	شاهد منفی	شاهد مثبت
باسیلوس سرئوس	+	+	+	–	–	–	–	+
لیستریامونوسایتوژنز	+	+	+	+	–	–	–	+
استافیلوکوکس اورئوس	+	+	+	+	–	–	–	+
اشریشیا کلی	+	+	+	+	+	–	–	+

علامت + نشان دهنده‌ی رشد باکتری و علامت - نشان دهنده‌ی عدم رشد می‌باشد.

جدول ۷ حداقل غلظت کشنده عصاره‌قره قاط را برای باکتری‌های مورد آزمون نشان می‌دهد. بر این اساس *باسیلوس سرئوس* پایین‌ترین میزان MBC (۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را در بین باکتری‌های مورد آزمون نشان داد که با غلظت MIC این باکتری برابر می‌باشد در حالیکه اشریشیا کلی بیشترین MBC (۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی-لیتر) را در بین باکتری‌های مورد آزمون از خود نشان داد.

جدول ۷- حداقل غلظت کشنده باکتری توسط عصاره الکلی قره قاط

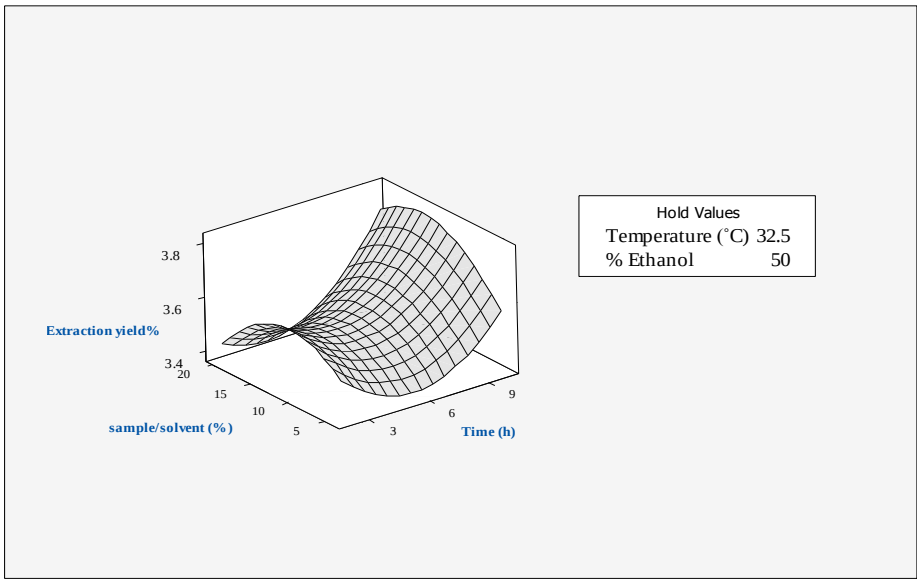
سویه های باکتریایی	**۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر**	**۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر**	**۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر**	**۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر**	**۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر**
باسیلوس سرئوس	+	–	–	–	–
لیستریا مونوسایتوژنز	+	+	+	–	–
استافیلوکوکس اورئوس	+	+	+	–	–
اشریشیا کلی	+	+	+	+	–

بحث

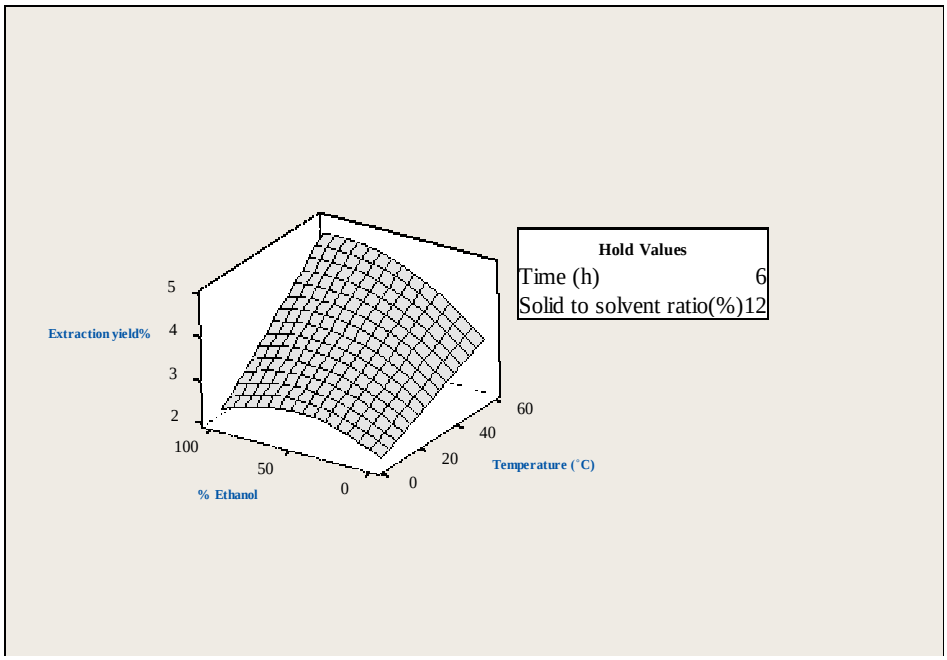
شکل ۱ اثر متقابل نسبت ماده جامد به حلال و زمان استخراج را در مقادیر ثابت دمای استخراج ۳۲/۵ درجه سانتی‌گراد و درصد متانول ۵۰، نشان می‌دهد. مطابق شکل با افزایش نسبت نمونه به حلال، راندمان استخراج ابتدا افزایش ولی در ادامه به علت اشباع شدن حلال، کاهش می‌یابد به‌طوری که نسبت نمونه به حلال در نقطه مرکزی بیشترین میزان راندمان را نشان داد. بانیک و پاندی (۲۰۰۸) و یلمه و همکاران (۱۳۹۲) به ترتیب در بهینه‌یابی شرایط استخراج اولئانولیک اسید از گیاه *Lantana camara* و عصاره رنگی آناتو به نتایج مشابه دست یافتند و گزارش نمودند که در مقادیر بالای نسبت ماده جامد به حلال میزان راندمان استخراج کاهش می-یابد. از سوی دیگر با افزایش زمان استخراج، راندمان استخراج ابتدا به آرامی کاهش و در ادامه به‌شدت افزایش می‌یابد.

مطابق شکل ۲ با افزایش دمای استخراج بویژه در مقادیر بالای اتانول، میزان راندمان استخراج عصاره افزایش می-

یابد که می‌تواند به علت بالا بودن سرعت نفوذ ماده در دمای بالا و در نتیجه حلالیت بیشتر عصاره و نیز کاهش ویسکوزیه حلال باشد (میلانی و همکاران، ۱۳۸۹). همان-طور که در شکل مشخص است در دمای پایین استخراج، با افزایش درصد اتانول راندمان استخراج عصاره ابتدا افزایش یافته و در ادامه کاهش می‌یابد؛ با این حال در مقادیر بالای دمای استخراج ای روند کاهشی مشاهده نمی‌شود که احتمالا به علت بالا بودن قدرت نفوذ حرارتی بیشتر حلال اتانول (α=۰/۰۰۳) نسبت به متانول (α=۰/۰۰۲) می‌باشد بطوری‌که مطابق شکل بیشترین میزان راندمان استخراج در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و اتانول ۱۰۰ درصد مشاهده شد.

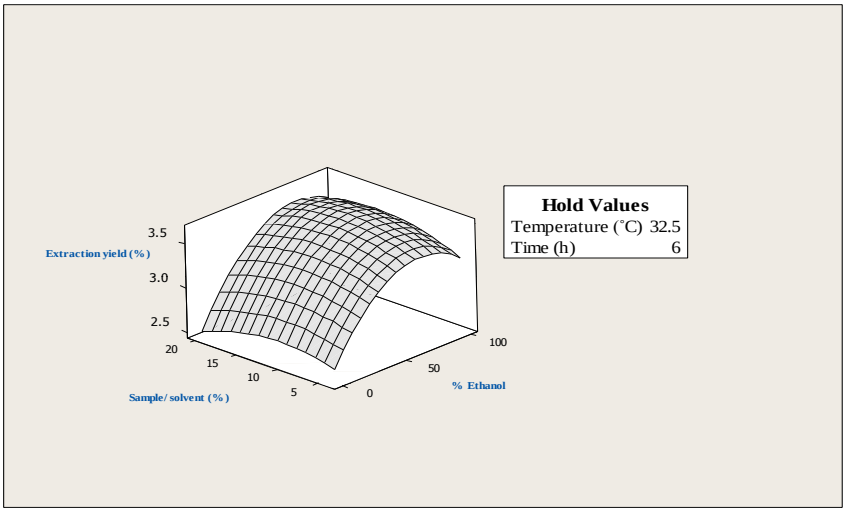


شکل ۱- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال و زمان استخراج بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط



شکل ۲- اثر متقابل نسبت دمای استخراج و درصد اتانول بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

اثر متقابل نسبت نمونه به حلال و درصد اتانول در شکل ۳ مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل مشخص است با افزایش میزان اتانول تا ۷۵ درصد، راندمان استخراج افزایش یافته ولی در مقادیر بیشتر اتانول، راندمان استخراج کاهش می‌یابد که احتمالا به‌علت قدرت نفوذ بیشتر مخلوط ۷۵ درصد اتانول و ۲۵ درصد متانول نسبت به سایر درصد ها می باشد. از سوی دیگر، در این شکل نیز اشباع شدن حلال در مقادیر بالای نسبت ماده جامد به حلال مشخص بوده و میزان راندمان کاهش یافته است. مطابق شکل بیشترین میزان راندمان استخراج عصاره در محلولی با غلظت ۷۵ درصد اتانول و ۲۵ درصد متانول و نسبت ماده جامد به حلال ۱۲ درصد حاصل می‌شود.

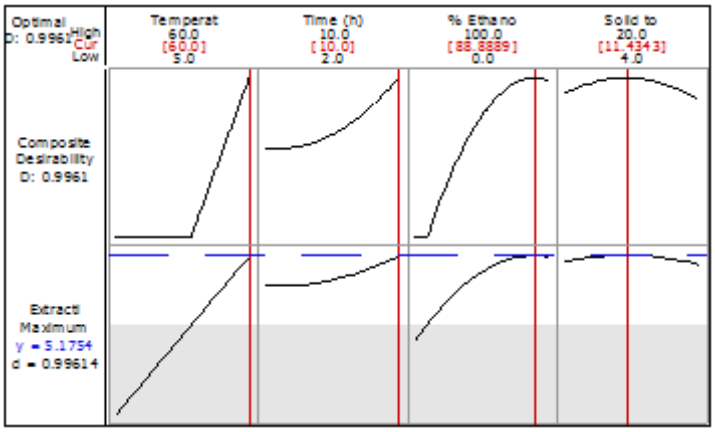


شکل ۳- اثر متقابل نسبت نمونه به حلال و درصد اتانول بر راندمان استخراج عصاره الکلی قره قاط

بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره‌ی قره قاط

به منظور بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره الکلی قره قاط از روش بهینه سازی عددی استفاده شد. دمای ۶۰ °C، زمان استخراج ۱۰ ساعت، میزان اتانول ۸۸/۸۸ درصد و نسبت نمونه به حلال ۱۱/۴۳ به عنوان شرایط بهینه جهت استخراج عصاره الکلی به روش خیساندن انتخاب شد. در این شرایط استخراج، راندمان عصاره ۵/۱۷ درصد پیش-بینی شد که میزان مطلوبیت آن ۹۹/۶ درصد بود. شرایط بهینه تعیین شده توسط نرم افزار در شرایط آزمایشگاه اعمال و راندمان استخراج ۴/۸۸ درصد اندازه‌گیری شد. قرابت مقدار آزمایشگاهی با مقدار پیش‌گویی شده توسط مدل نشان دهنده‌ی توانایی نسبتا خوب مدل در پیش-گویی می‌باشد.

.



شکل ۴ – بهینه یابی استخراج گیاه قره قاط

اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی قره قاط

مطابق جدول ۵ عصاره الکلی قره قاط بر کلیه باکتری‌های مورد آزمایش اثر بازدارندگی داشت و اندازه قطر هاله برای باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. گالیندو و همکاران (۲۰۰۳) ، در مورد عصاره‌ی آناتو (۲/۸ درصد نوربیکسین)؛ محمدی سیچانی و همکاران ۲۰۱۱، در مورد اسانس گل‌های بومادران، مرتضی سمنانی و همکاران ۱۳۸۶، در مورد عصاره‌ی دو گیاه استخیس و فلومیس و نیز اسمیت پالمر و همکاران ۱۹۹۸ در آزمایش‌های خود نتایجی مشابه گزارش کردند. مطابق نتایج *باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد را بین باکتری‌های مورد آزمایش داشتند. پروین و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که *سالمونلا تایفی‌موریوم* بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد را در برابر عصاره‌ی برگ درخت قره قاط از خود نشان داد. مطابق جدول ۶ حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری-های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است که نشان دهنده‌ی مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به عصاره الکلی قره قاط نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است. اسمیت پالمر و همکارانش (۱۹۹۸) و الهویرینی (۲۰۰۳) نیز در آزمایشات خود به نتایج مشابهی رسیدند.دلیل احتمالی آن حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. لیپوپلی-ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی، می‌توانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی شوند (محمدی سیچانی و همکاران ۲۰۱۱). در بین باکتری‌های مورد آزمون باسیلوس سرئوس کمترین میزان MIC را نشان داد و به دنبال آن به ترتیب *لیستریا مونوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و در نهایت *اشریشیا کلی* قرار داشتند. لاکومب و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که در بین باکتری‌های مورد آزمون *لیستریا مونوسایتوژنز* بیشترین حساسیت را به عصاره‌ی قره قاط دارد.

همان‌طور که در جدول۷ مشخص است *باسیلوس سرئوس* پایین‌ترین میزان MBC (۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را بین باکتری‌های مورد آزمون نشان داد که با غلظت MIC این باکتری برابر می‌باشد. *اشریشیا کلی* بیشترین MBC (۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را در بین باکتری‌های مورد آزمون نشان داد. لاکومب و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده نمودند که *لیستریا مونوسایتوژنز* کمترین میزان MBC را برای عصاره الکلی قره قاط نسبت به دیگر باکتری‌های مورد آزمون نشان داد در حالی که عصاره قره قاط اثر کشنده ای بر *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه-یابی شرایط استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط طرح آماری مناسبی است و دمای C ˚ ۶۰، زمان استخراج ۱۰ ساعت، میزان اتانول ۸۸/۸۸ درصد و نسبت دانه به حلال ۱۱/۴۳ به‌عنوان شرایط بهینه استخراج عصاره‌ی الکلی قره قاط تعیین شد. در این شرایط استخراج، میزان راندمان عصاره ۵/۱۷ درصد پیش‌بینی و در حالت تجربی ۴/۸۸ درصد اندازه‌گیری شد. عصاره‌ی الکلی قره قاط حاصله دارای اثرات ضد میکروبی بود و بر رشد کلیه باکتری‌های مورد آزمون تاثیر گذاشت. در این بین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر بود. *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را بین باکتری‌های مورد آزمون نشان دادند. به-طوری‌که به ترتیب کمترین و بیشترین مقادیر MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشتند.

منابع

۱. برزگر، حسن.، کرباسی، احمد.، جمالیان، جلال. و امین لاری، محمود.، (۱۳۸۷). بررسی امکان استفاده از کیتوزان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۲ (۴۳)، ۳۷۰-۳۶۱.

۲. سپهری‌فر، روشنک.، حسنلو، طاهره. (۱۳۸۸). بررسی ترکیبات پلی فنلی، آنتوسیانین ها و فلاونوییدهای

تام و خواص آنتی اکسیدانی گیاه دارویی قره قاط (Vaccinium arctostaphylos L.) جمع آوری شده از چهار منطقه مختلف ایران. فصلنامه گیاهان دارویی، ۹ (۱): ۶۶-۷۴.

۳. شفیعی‌نیک، رضا.، پریزاده، سیدمحمدرضا.، ذکائی، ندا.، قربانی، احمد. (۱۳۹۰). اثر عصاره آبی- الکلی قره قاط (Vaccinium arctostaphylos) بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده از موش صحرایی. کومش، ۱۲ (۴): ۴۴۷-۴۵۲.

۴. مرتضی سمنانی، کتایون.، سعیدی، مجید.، مهدوی، محمدرضا.، رحیمی، فاطمه. (۱۳۸۶). بررسی و مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی چند گونه گیاه از جنس‌های Stachys و Phlomis. مجله دانشکاه علوم پزشکی مازندران، ۷ (۵۷): ۵۷-۶۶.

۵. میلانی، الناز.، پورآذرنگ، هاشم.، وطن خواه، شهرزاد.، وکیلیان، حنه. (۱۳۸۹). بهینه‌سازی استخراج اینولین از غده‌ی سیب‌زمینی ترشی به کمک روش سطح پاسخ، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ششم، شماره ۳، ص۱۸۳- ۱۷۶.

۶. یلمه، محمود، (۱۳۹۲). بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه آناتو به روش ماسراسیون و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن در شرایط in vitro و در سیستم غذایی سس ،پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد.

7. Al-Howiriny, T. A.2003. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Salvia Lanigera. Pakistan J Biol Sci. 6(2): 133-135.

8.Azizkhani M, Misaghi A, Akhondzade Basti A, Gandomi Nasrabadi H, Hosseini H. 2012. Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential Oil on Growth and Enterotoxin E Production of Staphylocuccus aureus ATCC 29213. J Med Plants. 4(44): 185-193.

9.Badwaik, L. S., Prasad, K. & Deka, S. C., 2012, Optimization of extraction conditions by response surface methodology for preparing partially defatted peanut, Int J Food Res, 19 (1), 341-346.

10. Banik, R.M., Pandey, D.K. 2008: Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from Lantana camara roots using response surface methodology, industrial crops and products, Elsevier Sci .27: 241-248.

11. Burt S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods, a Review. Int J Food Microbiology. 2004; 94: 223-253.

12. Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. 2003. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. J Food Protection. 66: 1074-1078.

13. Hojjati Bonab Z, Nikkhah E. 2012. Evaluation of antioxidant and antibacterial effect of methanolic extract from thyme (Thymus vulgar), senna (Cassia angustifolia) and licorice (Glycyrrhiza glabra). J Shahed Uni. 19 (100): 111.

14.Lacombe, A., Wu, V.C., White, J., Tadepalli, Sh., Andre, E.E. 2012.The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (Vaccinium angustifolium) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic Lactobacillus rhamnosus. J Food Microbiology, 30: 124-131.

15. Manenzhe NJ, Potgieter N, Ree TV. 2004. Compostion and antimicrobial activities of volatile components of lippia javanica .J phyto Chem. 65: 2333-2336.

16. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. 2011. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of Achillea wilhelmsii against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci. 13 (3): 9-14.

17. Nakamura, S., Kato, A. & Kobayashi, N., 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme – dextran conjugate. J Agriculture Food Chem, 39 (2), 647-650.

18. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant

essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E-coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. 18(5): 414- 20.

19. Preston HD, Rickard MD. 1980. Extraction and chemistry of Annatto. J Food Chem. 5: 47-56.

20. Quanhong, L. & Caili, F. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. J Food Chem, 92, 701-706.

21. Skaltsa HD, Demetoz C, Lazari, Sokovic M. 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. J Phyto Chem. 64 (3): 743-752.

22. Skaltsa HD, Demetoz C, Lazari, Sokovic M.2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. J Phyto Chem.64 (3): 743-752.

23. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L.1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens.J Letters Food Microbiology.; 26: 118–122.

24. Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B. & Farhoosh, R., 2014. Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of natural pigment from annatto seeds by Response Surface Methodology (RSM). J Food chem.155, 319-324.

25. Zhang, L.L., Xu, M., Wang, Y.M., Wu, D.M. & Chen, J.H. 2010. Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from Infructescence of Platycarya strobilacea using response surface methodology,
J Molecules.15, 7923-7932.

26. Stanley, M; Ifeanyi, O; Eziokwu, O. 2014. Antimicrobial effects of Aloe Vera on some human pathogens. Int J Microbiology Sci. 3(3):1022-1028.

Optimization of extraction conditions of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract by soaking method and its antibacterial effect

Ataye salehi E*, Khadang Nikfargam A

Department of Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

***Corresponding author:** *eatayesalehi@yahoo.com*

Received: 25 November 2017 Accepted: 23 February 2018

Abstract

In this study, optimum conditions for extraction of the alcoholic extract of *Vaccinium macrocarpon* by soaking method and its antibacterial effects were determined by Response Surface Method. Extraction was carried out at a temperature of 5 to 60° C, 2 to 10 hours, and the sample to solvent ratio of 4 to 20%, and an ethanol / methanol solvent ratio of 0 to 100%. The antimicrobial effects of the extracts were evaluated by detection of MIC and MBC against *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus* and *Escherichia coli* bacteria. The optimum operating conditions to obtain the maximum amount of Cranberry extract were at 60°C, 10 hours, and the sample to solvent ratio 11.43% and the ethanol to methanol ratio 88.88%. In these conditions, the extraction yield was 4.88%. Extraction yield of cranberry extract was predicted based on the mathematical model was 5.17%. This value is close to the value predicted by the model indicates a relatively good performance model. Alcoholic extract of *Vaccinium macrocarpon* resulting antibacterial activity and influence on the growth of all bacteria was tested. Gram-positive bacteria were more sensitive than gram-negative bacteria. Bacillus cereus and E. coli, had the most and the least sensitivity to the alcoholic extract of *Vaccinium macrocarpon*. So that they had the lowest and the highest values of MIC and MBC among bacteria respectively.

Keywords: *Vaccinium macrocarpon*, Optimization, Antibacterial effect