DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2012.3044

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۹۲-۲۸۰ (۱۳۹۱)

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ زیتون (*Olea Europaea* L.) رقم زراعی میشن به روش الایزا

زهرا رفیعی[۱]، سید مهدی جعفری[۲*]، مهران اعلمی[۳] و مرتضی خمیری[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
پست الکترونیک: Smjafari@gau.ac.ir
۳- استادیار، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۰

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر استخراج به روش خیساندن و استخراج به کمک امواج مایکروویو بر میزان ترکیب‌های فنولی برگ‌های زیتون (*Olea Europaea* L.) واریته میشن با حلال‌های آب، متانول ۸۰٪ و استون بود. عصاره متانولی در روش استخراج به کمک مایکروویو بیشترین میزان ترکیب‌های فنولی (۰/۱۳±۲۱۱/۳۸۵ میلی‌گرم معادل تانیک‌اسید در گرم عصاره) را به خود اختصاص داد. در مقایسه دو روش استخراج، عصاره‌های مایکروویوی در مورد هر سه حلال مورد آزمون کارایی استخراج بالاتری داشتند. در بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ زیتون، کمترین غلظت بازدارندگی (۳۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کمترین غلظت کشندگی (۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در برابر *Staphylococcus aureus* به‌ترتیب مربوط به عصاره استونی حاصل از روش مایکروویو و عصاره‌های متانولی در مورد هر دو روش استخراج بود. در مورد باکتری *Escherichia coli* کمترین میزان غلظت بازدارندگی، ٦٢٥ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و کمترین غلظت کشندگی (۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای نابودی این باکتری در عصاره‌های آبی و متانولی استخراجی به کمک روش مایکروویو بدست آمد. در مورد *Salmonella typhi* کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی به‌ترتیب ۳۱۵ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بنابراین مشخص شد که *S. typhi* مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌ها بوده و در بیشتر موارد، عصاره‌های مایکروویوی نسبت به عصاره‌های استخراج شده با روش خیساندن، فعالیت ضدمیکروبی بیشتری داشتند.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون (*Olea Europaea* L.)، ترکیب‌های فنولی، استخراج، امواج مایکروویو، فعالیت ضدمیکروبی.

مقدمه

با افزایش جمعیت و محدودیت منابع غذایی، تهیه غذای کامل یکی از مسائل پیچیده در دنیا به‌ویژه در کشورهای جهان سوم به‌شمار می‌آید. تأمین سلامت و افزایش کیفیت محصولات غذایی علاوه بر کاهش ضایعات، سلامت مصرف‌کننده را نیز بدنبال خواهد داشت. در این میان باکتریها علاوه بر اینکه به‌عنوان عوامل فساد مواد غذایی مطرح می‌باشند، عامل بسیاری از

بیماریها و مسمومیت‌های غذایی ناشی از غذا هستند. ازجمله راههای مبارزه با این میکروارگانیسم‌ها استفاده از مواد ممانعت‌کننده از رشد آنها می‌باشد. استفاده از مواد نگهدارنده در مواد غذایی عوارض جانبی، تولید متابولیت‌های ثانویه مضر و ایجاد مقاومت میکروارگانیسم‌ها را به همراه خواهد داشت (مهدی‌زاده و رضوی روحانی، ۱۳۷۸). با این تفاسیر لزوم توجه به روشهای جدید نگهداری و مواد نگهدارنده طبیعی بیش از پیش روشن می‌گردد. در سال‌های اخیر عصاره های گیاهی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این عصاره ها، عصاره برگ زیتون بوده که ویژگی‌های ضدمیکروبی این عصاره به‌دلیل وجود ترکیب های فنولی می‌باشد. الئوروپین مهمترین ترکیب فنولی برگ زیتون است (Japón-Lujan *et al*., 2006). این ترکیب و ترکیب های فنولی دیگر موجود در عصاره برگ زیتون نظیر پاراهیدروکسی‌بنزوئیک، فرولیک‌اسید، کافئیک‌اسید، وانیلیک‌اسید، پروکاتکوئیک، سینرژیک‌اسید، پاراکوماریک‌اسید، الئوروپین، کوئرستین، تیروزول، هیدروکسی‌تیروزول و النولیک‌اسید فعالیت ضدمیکروبی دارند (Korukluoglu *et al*., 2004). بنابراین عصاره برگ زیتون می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. Majeed و همکاران (۲۰۰۶) عنوان کردند که عصاره برگ زیتون، دارای ویژگی‌های ضدمیکروبی است. در پژوهش دیگری، ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره هیدرولیزی برگ زیتون و تأثیر آن بر باکتریهای *Streptococcus thermophilus*، *Lactobacillus delbruechii* و *Lactobacillus bulgaricus* بررسی شد (Leonardis *et al*., 2007). همچنین مشخص شده‌است که عصاره هیدرولیزی برگ‌های زیتون اثر منفی روی زنده‌مانی باکتریهای لاکتیک‌اسید ندارد و می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای افزایش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای شیرهای تخمیر شده بکار رود. Markin و همکاران (۲۰۰۳) با مطالعه فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی برگ‌های زیتون دریافتند که همه باکتریها بجز *Bacillus subtilis* در غلظت ۰/۶ درصد وزنی- حجمی در طی ۳ ساعت نابود شدند. Oliveira و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که عصاره‌های آبی پوست گردو در جلوگیری از رشد باکتریهای گرم مثبت *Bacillus cereus*، *B. subtilis* و *S. aureus* مؤثر بوده و *S. aureus* حساسترین باکتری نسبت به این عصاره گزارش شد.

از روشهای مختلفی برای استخراج ترکیب‌های فنولی موجود در برگ زیتون استفاده می‌شود. در گذشته استخراج با حلال متداولترین روش استخراج بود. در این روش حلال زیادی مصرف می‌شود و روش زمان‌بری است. به همین دلیل در سال‌های اخیر استفاده از روشهای مختلفی برای تسریع و تسهیل استخراج ترکیب های فنولی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. یکی از این روشها استخراج با امواج مایکروویو (MAE: Microwave assisted extraction) است. امواج جذب شده توسط نمونه تولید گرما می‌کند. این گرما باعث تبخیر آب نمونه و در نتیجه ایجاد فشار زیاد روی دیواره سلولی نمونه و متلاشی شدن این دیواره می‌شود. به این ترتیب ترکیب های فعال به راحتی از نمونه خارج می‌شود. این روش در مقایسه با روشهای سنتی استخراج (استخراج با حلال) برتری دارد، زیرا این روش نیاز به حلال ندارد و زمان کمتری لازم دارد و بازدهی استخراج و دقت آن بیشتر می‌باشد (Mandal

et al., 2007). نتایج پژوهش Japón-Lujan و همکاران (۲۰۰٦)، نشان داد که برای رسیدن به بازده استخراجی معادل روش MAE، نیاز به زمان ۲٤ ساعت و دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. استخراج ترکیب های فنولی پوست بادام زمینی توسط Ballard (۲۰۰۸) نشان داد که روش MAE نسبت به روش خیساندن ترکیب‌های فنولی بیشتری با صرف زمان و حلال کمتر استخراج می‌کند. Pan و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که بیشترین میزان استخراج کافئین و ترکیب‌های فنولی به کمک امواج مایکروویو بعد از ٤ دقیقه اشعه‌دهی بدست آمد که در مقایسه با روش خیساندن (۲۰ ساعت) روش مناسبتری برای استخراج این ترکیب‌ها می‌باشد.

هدف این پژوهش بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ زیتون واریته میشن استخراج شده با حلال‌های مختلف به کمک امواج مایکروویو و روش خیساندن بر باکتری *S. aureus*، *E. coli* و *S. typhi* بود.

مواد و روشها

استخراج عصاره با روش خیساندن (Soaking)

برگ‌های زیتون واریته میشن در اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۸ از باغ زیتون جهاد کشاورزی کردکودی برداشت و در سایه خشک شد. سپس با استفاده از آسیاب (ساخت شرکت ایران خودساز) پودر و از الک با مش ٤۰ عبور داده شد. پودر برگ‌های زیتون با نسبت ۱:۱۰ با ۳ حلال (آب، متانول ۸۰٪ و استون) در دمای محیط به مدت ۳ ساعت به خوبی مخلوط و عصاره حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جدا شد.

استخراج عصاره به کمک امواج مایکروویو

یک مایکروفر خانگی (سامسونگ مدل سی‌اف ۳۱۱۰ ان- ٥) مطابق شکل ۱ در آزمایشگاه با انجام اصلاحاتی (افزودن کندانسور و همزن مغناطیسی) برای استخراج ترکیب‌های فنولی طراحی گردید (قره‌خانی و همکاران، ۱۳۸۸). ترکیب‌های فنولی با ۳ حلال ذکر شده با نسبت ۱:۱۰ استخراج شد. همزمان با مخلوط شدن محتویات داخل بالن به کمک همزن مغناطیسی، اشعه‌دهی در طی ۱٥ دقیقه انجام شد. بعد از پایان اشعه‌دهی و سرد شدن بالن، عصاره حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. عصاره‌های حاصل از هر دو روش پس از صاف شدن با دستگاه تبخیرکننده چرخان (IKA مدل آر وی بیسیک ۰٥) با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و با دستگاه خشک‌کن انجمادی (ساخت شرکت اپرون مدل اف‌دی‌بی ٥٥۰۳) خشک و منحنی استاندارد براساس تانیک‌اسید رسم ($Y = ۰/۰۰۱۱٤X + ۰/۰۱۰٦۲$، Y عدد جذب و X غلظت بر حسب پی‌پی‌ام) و میزان ترکیب های فنولی موجود در عصاره بلافاصله اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌گرم معادل تانیک‌اسید در گرم عصاره بیان گردید (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007).

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مذکور در ۹ غلظت ۱٥٦/۲٥، ٦۲٥/٥، ۳۱۲، ۱۲٥۰، ۲٥۰۰، ٥۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰ و ٤۰۰۰۰ پی‌پی‌ام بر باکتریهای *E. coli* PTCC 1533، *S. aureus* 1112 و *S. typhi* PTCC1609 بررسی شد. سوش‌های خالص این باکتریها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران خریداری شد. برای بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی از میکروپلیت‌های ۹٦ چاهک

استفاده نموده و بعد از پُرکردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور (ساخت شرکت بیندر) ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از طی این دوره میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (شرکت بیوتک اینسترومنت آمریکا مدل CLX800) در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت و کمترین غلظت بازدارندگی (MIC: Minimum inhibitory concentration) و کمترین غلظت کشندگی (MBC: Minimum bactericidal concentration) تعیین شد (Oroojalian *et al*., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش تیمارها در سه تکرار انجام شده و نتایج بدست آمده با استفاده از روش تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p<$ ۰/۰۵) انجام گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم شکل‌ها با نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

نتایج

میزان ترکیب‌های فنولی

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین مقدار کل ترکیب‌های فنولی تیمارهای مختلف نشان داد که اثر حلال، روش استخراج و اثر متقابل این فاکتورها بر میزان ترکیب های فنولی در سطح احتمال ($p<$ ۰/۰۵) معنی‌دار است (جدول ۱).

عصاره متانولی در روش مایکروویو و عصاره استونی استخراج شده به روش خیساندن به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان ترکیب‌های فنولی را به خود اختصاص دادند. در مورد هر سه حلال مورد آزمون، روش مایکروویو بازده استخراج بالاتری نسبت به روش خیساندن نشان داد و عصاره‌های متانولی بیشترین و عصاره‌های استونی کمترین میزان استخراج را داشتند.

اثر عصاره‌ها بر باکتری *S. aureus*

جدول ۲ و ۳، MIC و MBC عصاره‌ها را در برابر باکتریهای *S. aureus* نشان می‌دهند. با توجه به داده‌های این جدول ها، عصاره استونی در روش MAE کمترین MIC (۳۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) را داشت. در بین عصاره‌های استخراج شده به روش خیساندن، عصاره‌های متانولی و استونی MIC یکسانی داشتند و از این جهت عصاره آبی کمترین فعالیت ضدمیکروبی را از خود نشان داد. در مقایسه دو روش استخراج، شاهد MIC یکسان عصاره های متانولی (۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در هر دو روش بودیم و در کل عصاره‌های مایکروویوی در مهار باکتری *S. aureus* بهتر عمل کردند و برای مهار این باکتری غلظت پایین‌تری از عصاره مورد نیاز بود.

کمترین MBC (۲۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در برابر این باکتری مربوط به عصاره متانولی در هر دو روش استخراج بود. عصاره های آبی استخراج شده با روش خیساندن در نابودی باکتری *S. aureus* نقشی نداشتند، اما در مورد MAE افزایش میزان استخراج ترکیب های فنولی، موجب نابودی این باکتری با عصاره های آبی شد. عصاره‌های استونی استخراج شده با امواج مایکروویو، MBC بالاتری نسبت به روش خیساندن نشان دادند که با توجه به پایین بودن دمای جوش استون، دلیل این امر می‌تواند به تجزیه یا از بین رفتن یکسری ترکیب های ضدمیکروبی عصاره ها در برابر امواج مایکروویو مربوط باشد.

اثر عصاره‌ها بر باکتری *E. coli*

جدول ٤ و ٥، MIC و MBC عصاره ها را بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در برابر باکتری *E. coli* نشان می‌دهد. با توجه به داده‌های جدول ٤، کمترین میزان MIC، ٦٢٥ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که این رقم در عصاره‌های متانولی و استونی در روش استخراج با مایکروویو مشاهده شد. در مقایسه دو روش استخراج، عصاره‌های مایکروویوی MIC کمتری برای مهار این باکتری نیاز داشتند و در مورد روش خیساندن، عصاره آبی کمترین میزان بازدارندگی را از خود نشان داد.

در مورد MBC عصاره ها همان‌طور که در جدول ٥ مشاهده می‌شود عصاره آبی استخراج شده با روش خیساندن در غلظت‌های مورد آزمون، قادر به نابودی باکتری *E. coli* نبود. کمترین MBC برای نابودی این باکتری ٥٠٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در عصاره های آبی و متانولی استخراجی به کمک روش مایکروویو بدست آمد. بجز عصاره های استونی، در سایر موارد، عصاره‌های مایکروویوی در غلظت کمتری قادر به نابودی باکتری *E. coli* بودند.

اثر عصاره‌ها بر باکتری *S. typhi*

جدول ٦ و ٧، MIC و MBC عصاره ها را بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در برابر باکتری *S. typhi* نشان می‌دهد. با توجه به داده‌های جدول ٦، کمترین میزان MIC، ٣١٥ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که این رقم در عصاره استونی در روش خیساندن مشاهده شد و بعد از آن عصاره مایکروویوی استون قرار گرفت. عصاره‌های متانولی در هر دو روش استخراج قدرت بازدارندگی یکسانی داشتند. در بین عصاره‌های آبی هم عصاره مایکروویوی با MIC برابر با ٥٠٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر توانایی بیشتری در مهار این باکتری از خود نشان داد.

همان‌طوری که در جدول ٧ مشاهده می‌شود، کمترین MBC (١٠٠٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر) در برابر *S. typhi* مربوط به عصاره‌های استونی در هر دو روش استخراج و عصاره مایکروویوی متانول بود. همانند دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* عصاره‌های آبی استخراج شده با روش خیساندن در نابودی این باکتری نیز نقشی نداشتند، اما عصاره آبی استخراج شده با امواج مایکروویو در غلظت ٢٠٠٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به نابودی این باکتری بود. شکل‌های ٢، ٣ و ٤ اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها را به‌ترتیب در برابر باکتریهای *S. aureus*، *E. coli* و *S. typhi* نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به این شکل‌ها، با افزایش غلظت عصاره‌ها در تمامی موارد فعالیت ضدمیکروبی افزایش یافت.

جدول ١- بررسی اثر روش استخراج و نوع حلال بر میزان ترکیب‌های فنولی

روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ٨٠٪	استون
مایکروویو	١٧٣/٤٧٧ ± ٠/٠١ c	٢١١/٣٨٥ ± ٠/١٣ a	١٣٦/٠٥٣ ± ٠/٤٧ e
خیساندن	١٥٥/٤٢٩ ± ٠/٣١ d	١٨٧ ± ٠/٢٨ b	١٢٠/١٢١ ± ٠/٥٣ f

حرف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ٥٪ می‌باشد.

جدول ۲- کمترین غلظت بازدارندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری *S. aureus*

روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ۸۰٪	استون
خیساندن	۲۵۰۰	۱۲۵۰	۱۲۵۰
مایکروویو	۵۰۰۰	۱۲۵۰	۳۱۵

جدول ۳- کمترین غلظت کشندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری *S. aureus*

روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ۸۰٪	استون
خیساندن	-	۲۵۰۰	۵۰۰۰
مایکروویو	۱۰۰۰۰	۲۵۰۰	۲۰۰۰۰

جدول ٤- کمترین غلظت بازدارندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری *E. coli*

روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ۸۰٪	استون
خیساندن	۱۰۰۰۰	۱۲۵۰	۱۲۵۰
مایکروویو	۱۲۵۰	٦۲۵	٦۲۵

جدول ۵- کمترین غلظت کشندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری *E. coli*

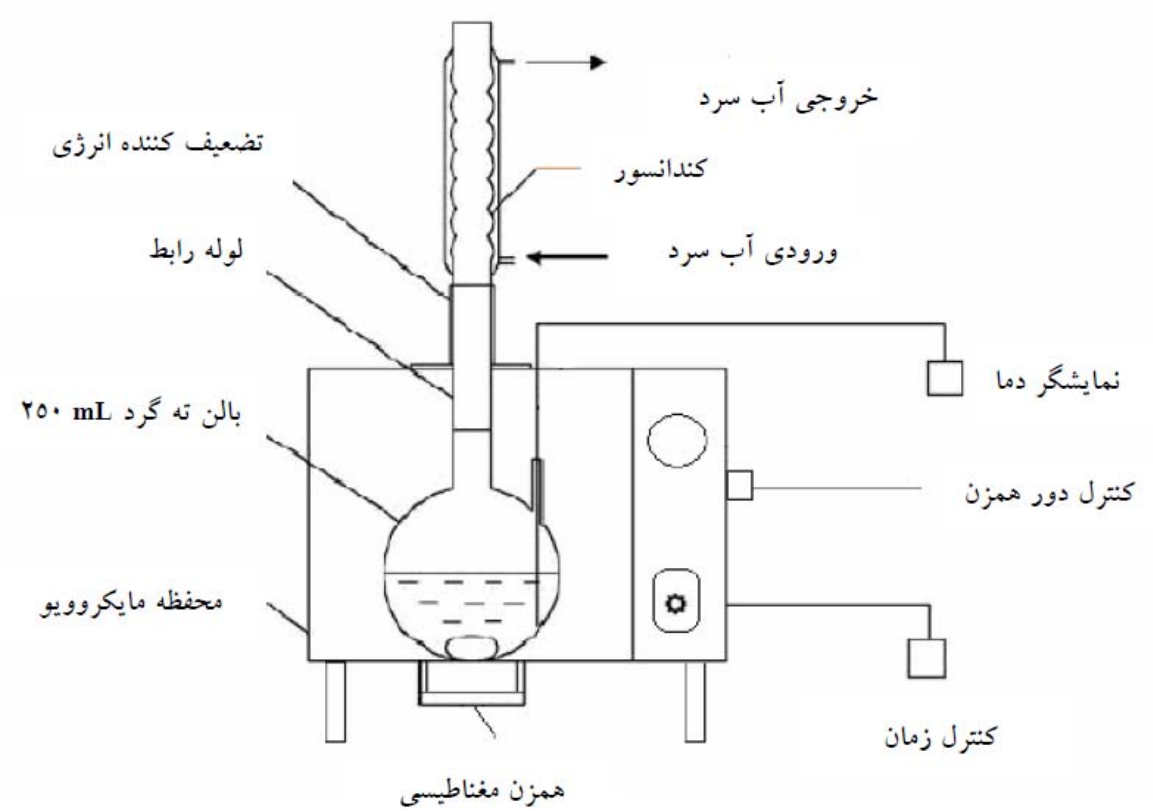
روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ۸۰٪	استون
خیساندن	-	۲۰۰۰۰	۲۰۰۰۰
مایکروویو	۵۰۰۰	۵۰۰۰	٤۰۰۰۰

جدول ٦- کمترین غلظت بازدارندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری *S. typhi*

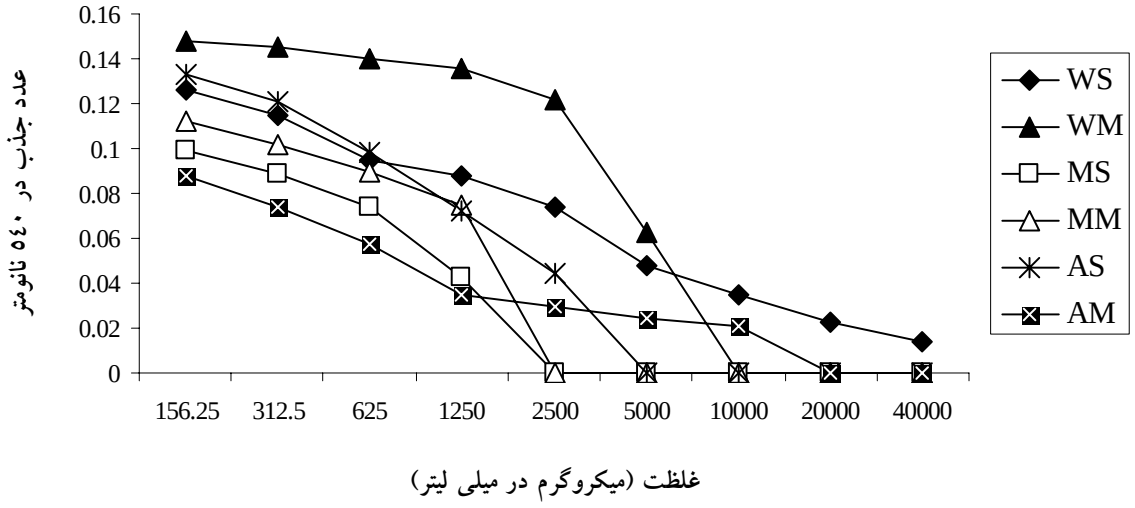
روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ۸۰٪	استون
خیساندن	۵۰۰۰	۲۵۰۰	۳۱۵
مایکروویو	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۱۲۵۰

جدول ۷- کمترین غلظت کشندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف در برابر باکتری *S. typhi*

روش استخراج	حلال		
	آب	متانول ۸۰٪	استون
خیساندن	-	۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰
مایکروویو	۲۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰

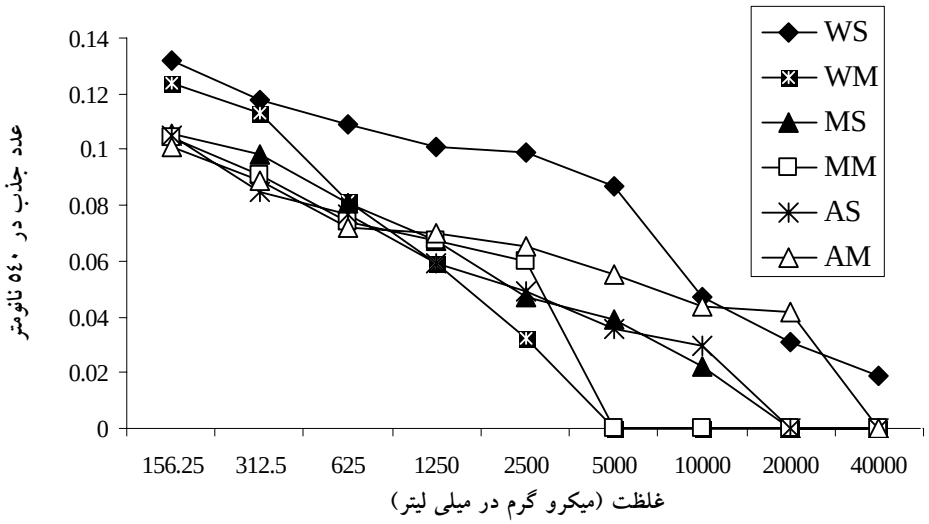


شکل ۱- دستگاه ساخته شده برای استخراج به کمک امواج مایکروویو



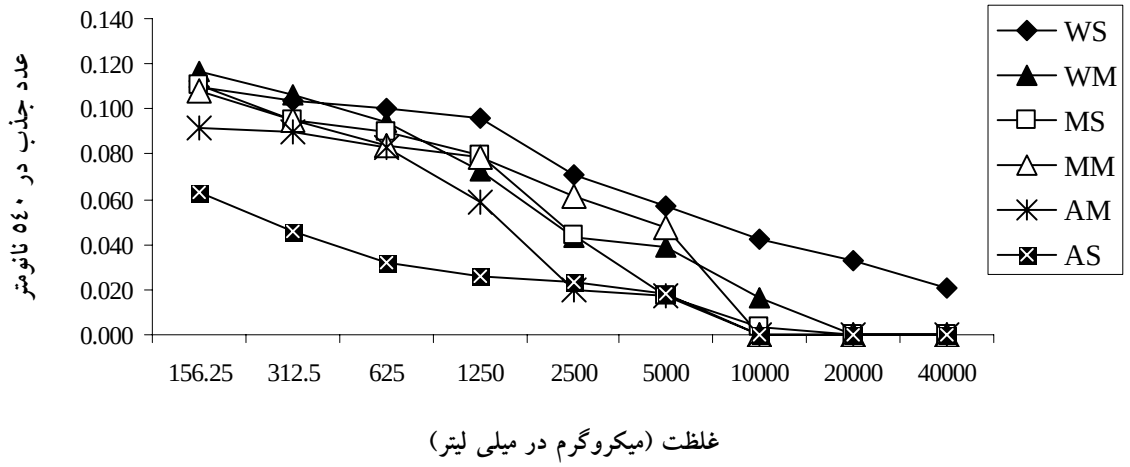
شکل ۲- میزان کدورت حاصل از باکتری *S. aureus* در حضور عصاره‌های مختلف

حرف اول نشانه حلال (W: آب، M: متانول، A: استون) و حرف دوم نشانه روش استخراج (M: مایکروویو، S: خیساندن) می‌باشد.



شکل ۳- میزان کدورت حاصل از باکتری *E. coli* در حضور عصاره‌های مختلف

حرف اول نشانه حلال (W: آب، M: متانول، A: استون) و حرف دوم نشانه روش استخراج (M: مایکروویو، S: خیساندن) می‌باشد.



شکل ٤- میزان کدورت حاصل از باکتری *S. typhi* در حضور عصاره‌های مختلف

حرف اول نشانه حلال (W: آب، M: متانول، A: استون) و حرف دوم نشانه روش استخراج (M: مایکروویو، S: خیساندن) می‌باشد.

بحث

حلال‌های با قطبیت بالا مثل آب و حلال‌های غیرقطبی مثل استون برای استخراج ترکیب‌های فنولی مناسب نیستند. از طرفی، استفاده از آب به‌عنوان حلال موجب استخراج ناخالصی‌های زیادی ازجمله قندها، اسیدهای آلی، پروتئین‌های محلول همراه با ترکیب‌های فنولی می‌شود، اما استفاده از آب به‌عنوان حلال به شکل ترکیب شده با دیگر حلال‌های آلی ایجاد محیطی با قطبیت متوسط می‌کند که بهترین شرایط برای استخراج ترکیب‌های فنولی است. علاوه براین استفاده از آب همراه با الکل برای استخراج، باعث تورم بافت گیاهی و افزایش سطح تماس ماتریکس و حلال و در نتیجه بهبود بازدهی استخراج می‌شود (Chirinos *et al.*, 2007؛ Xiao *et al.*, 2008). از آنجایی که استون یک حلال غیرقطبی می‌باشد، برای استخراج ترکیب‌های قطبی ازجمله فنول‌ها مناسب نبوده و با توجه به موارد ذکر شده، علت میزان بالای استخراج ترکیب‌های فنولی در عصاره‌های متانولی نسبت به آب در روش خیساندن توجیه می‌شود. در روش استخراج به کمک امواج مایکروویو، حلال‌های غیرقطبی به دلیل داشتن ثابت دی‌الکتریک و فاکتور اتلاف پایین نسبت به حلال‌های قطبی، در برابر امواج مایکروویو شفاف هستند، ازاین‌رو حرارتی تولید نمی‌کنند و برای استخراج ترکیب‌ها با روش مایکروویو مناسب نیستند (Mandal *et al.*, 2007). دلایل فوق، کارایی پایین استون در استخراج ترکیب‌های فنولی را توجیه می‌کند، اما در میان حلال‌های قطبی آب به دلیل داشتن ثابت دی‌الکتریک بالا انرژی مایکروویو را به خوبی جذب می‌کند و منجر به تولید حرارت و جنبش مولکولی بیشتر می‌شود. متانول نسبت به آب ثابت دی‌الکتریکی کمتری دارد ولی زمانی که همراه با آب به‌عنوان حلال استفاده شود نتیجه بهتری حاصل می‌شود (Zhang *et al.*, 2008). در بین دو روش، MAE ترکیب‌های فنولی بیشتری در یک زمان کوتاه استخراج نمود، بنابراین این روش می‌تواند جایگزین روش خیساندن شود. افزایش استخراج ترکیب‌های فنولی

با MAE به اثر حرارت‌دهی آن نسبت داده می‌شود. این حرارت در نتیجه چرخش دو قطبی حلال در مقابل اشعه‌های مایکروویو اتفاق می‌افتد که خود باعث افزایش دمای حلال و در نتیجه افزایش حلالیت ترکیب‌ها هدف می‌گردد (Hemwimon *et al.*, 2007). علاوه بر این اشعه‌دهی به کمک مایکروویو، با افزایش ناگهانی دما و فشار داخلی تخریب دیواره سلولی را تسریع کرده و خروج ترکیب‌ها از داخل بافت به درون حلال را افزایش می‌دهد (Pereira *et al.*, 2007).

با توجه به موارد گفته شده، MBC در مورد باکتری *S. aureus*، *E. coli* و *S. typhi* به‌ترتیب برابر با ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده مقاومتر بودن باکتریهای *S. typhi* و *E. coli* نسبت به *S. aureus* بود. *S. aureus* یک باکتری گرم مثبت و باکتریهای *E. coli* و *S. typhi* گرم منفی می‌باشند. باکتریهای گرم منفی علاوه بر پپتیدوگلیکان، یک هم دارند که سطح هیدروفیلی آن غنی از مولکول‌های لیپوپلی ساکاریدی می‌باشد و به‌عنوان مانع در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کند. همچنین آنزیم‌های موجود در فضای پری‌پلاسمایی قادرند مولکول‌های ورودی از بیرون را بشکنند، اما در مورد باکتریهای گرم مثبت، مواد ضدمیکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شوند (Kalemba & Kunicka, 2003؛ Duffy & Power, 2001). با توجه به موارد گفته شده علت MBC بالاتر در مورد *E. coli* و *S. typhi* نسبت به *S. aureus* توجیه می‌شود. عصاره‌های گیاهی اثر ضدمیکروبی خوبی به‌ویژه در برابر باکتریهای گرم مثبت دارند (Acar *et al.*, 2010). در پژوهش Tambekar و همکاران (۲۰۰۸) مشخص شد که عصاره استونی میوه *Helicteres isora* در مقایسه با *S. aureus* فعالیت ضدمیکروبی کمتری نسبت به *E. coli* و *S. typhi* دارد. در یک پژوهش مشابه، Lei و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که *S. aureus* حساسترین و *S. typhi* مقاومترین باکتری در برابر اسانس *Dictamnus dasycarpus* بودند.

فعالیت ضدمیکروبی ترکیب‌های فنولی شناخته شده‌است (Fattouch *et al.*, 2007؛ Estevinho *et al.*, 2008). عصاره‌های مایکروویوی به‌دلیل اینکه حاوی ترکیب‌های فنولی بیشتری بودند، فعالیت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به عصاره‌های استخراج شده به روش خیساندن داشتند. عصاره‌های آبی در مقایسه با عصاره‌های متانولی و استونی در روش خیساندن فعالیت ضدمیکروبی ضعیفتری نشان دادند و متانول با استخراج مناسبتر ترکیب‌های فنولی باعث افزایش فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های حاصل شد. نتایج پژوهش Karthikumar و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که عصاره اتانولی گیاه *Eclipta prostrata* در مقایسه با سایر حلال‌ها (آب، هگزان، اتیل‌استات) نقش مؤثری در جلوگیری از رشد همه باکتریهای مورد آزمون داشت. علاوه بر این پژوهش، این نتیجه در بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و متانولی دو گیاه مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی (منصف اصفهانی و همکاران، ۱۳۸۸) و گیاه بومادران (تاجیک و شکوهی ثابت جلالی، ۱۳۸۷) نیز به اثبات رسیده‌است.

از طرفی عصاره‌های استونی به دلیل میزان بالای استخراج فنول‌های دی‌کربوکسیلیک از نظر بازدارندگی روی میکروارگانیسم‌ها، فعالیت ضدباکتریایی بهتری در مقایسه با عصاره‌های آبی نشان دادند که در پژوهش Korukluoglu و همکاران (۲۰۰٤) به اثبات رسیده‌است.

اثرهای بازدارندگی ترکیب‌های فنولی به جذب سطحی به غشاهای سلولی، واکنش با آنزیم‌ها، سوبسترا و یون‌های فلزی مرتبط است (Duman *et al*., 2009)، اما علاوه بر این ترکیب‌های دیگری نیز در ایجاد ویژگی‌های ضدمیکروبی شرکت دارند. همچنین، ترکیب شیمیایی، نوع و مکانیسم عمل ترکیب‌های فنولی هر یک از عصاره‌ها از عوامل مؤثر در ایجاد اختلاف نتایج در فعالیت ضدمیکروبی حلال‌ها می‌باشند. نتایج مشابه با این موارد در پژوهش‌های Wen و همکاران (۲۰۰۳) و Esekhiagbe و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شده‌است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های این پژوهش مشخص شد که در بین دو روش مورد آزمون، روش استخراج به کمک امواج مایکروویو و در میان حلال‌ها، متانول بازده استخراج بالاتری دارند. از نظر فعالیت ضدمیکروبی باکتریهای *E. coli* و *S. typhi* نسبت به *S. aureus* مقاومت بیشتری نسبت به عصاره‌ها نشان دادند. در بین عصاره‌ها، عصاره متانولی بیشترین و عصاره آبی کمترین میزان فعالیت ضدمیکروبی را به خود اختصاص داده و در بیشتر موارد عصاره‌های استخراج شده به روش مایکروویو توانایی بیشتری در مهار باکتریها نشان دادند. بنابراین روش استخراج به کمک امواج مایکروویو به‌واسطه بازدهی بالای استخراج می‌تواند در استخراج آنالیت‌های هدف از گیاهان دارویی در کارخانجات مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، با توجه به قدرت باکتری‌کشی خوب عصاره برگ زیتون، این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای افزایش طول عمر نگهداری شود و برای کاهش مصرف نگهدارنده‌های سنتزی در مواد غذایی مختلف بکار رود.

منابع مورد استفاده

- تاجیک، ح. و شکوهی ثابت جلالی، ف.، ۱۳۸۷. ارزیابی مقایسه‌ای تأثیرات ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه بومادران بر روی میکروارگانیسمهای پاتوژن. پزشکی ارومیه، ۱۹(٤): ۳۰۹-۳۰۲.
- قره‌خانی، م.، رفیعی، ز.، قربانی، م. و جعفری، س.م.، ۱۳۸۸. سیستم مایکروویو محفظه باز برای استخراج ترکیبات مؤثره از گیاهان دارویی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، شماره ثبت ۵۹۳۲۱.
- منصف اصفهانی، ح.ر.، شریفی اقدم، ا.، امینی، م.، فرامرزی، م.ع.، شاهوردی، ا.ر. و حاجی‌آقایی، ر.، ۱۳۸۸. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های گیاه *Geum kokanicum*. گیاهان دارویی، ۹(۳۰): ۱۵۱-۱٤۵.
- مهدی‌زاده، ت. و رضوی روحانی، س.م.، ۱۳۷۸. بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره روغن‌های اسانسی سه نوع پیاز مختلف بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس آرئوس و اشیرشیاکلی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۵(۲): ۱۵٤-۱٥٤.
- Acar, G., Dogan, N.M., Duru, M.E. and Kıvrak, I., 2010. Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts of Crocus species in Anatolia. African Journal of Microbiology Research, 4(11): 1154-1161.
- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102(4): 1233-1240.
- Ballard, T.S., 2008. Optimizing the extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. Polytechnic Institute, Virginia, 169p.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruız & Pavon) tubers. Separation and Purification Technology, 55(2): 217-225.
- Duffy, C.F. and Power, R.F., 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents, 17: 527-529.

- Duman, A.D., Ozgen, M., Dayisoylu, K.S., Erbil, N. and Durgac, C., 2009. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. Molecules, 14(5): 1808-1817.
- Esekhiagbe, M., Agatemor, M.M.U. and Agatemor, C., 2009. Phenolic content and antimicrobial potentials of *Xylopia aethiopica* and *Myristica argentea*. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 28(2): 159-162.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G. and Pereira, E., 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food and Chemical Toxicology, 46(12): 3774-3779.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N. and Cabras, P., 2007. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 963-969.
- Hemwimon, S., Pavasant, P. and Shotipruk, A., 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. Separation and Purification Technology, 54(1): 44-50.
- Japón-Lujan, R., Luque-Rodriguez, J.M. and Castro, M.D.L., 2006. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385(4): 753-759.
- Kalemba, D. and Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10(10): 813-829.
- Karthikumar, S., Vigneswari, K. and Jegatheesan, K., 2007. Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of *Eclipta prostrata* (L). Scientific Research and Essay, 2(4):101-104.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Ozer, E.T. and Gucer, S., 2004. In-Vitro antibacterial activity of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts and their chemical characterization. Proceedings of 4th AACD Congress. Turkey, 29 Sept.-3 Oct.: 563-565.
- Lei, J., Yu, J., Yu, H. and Liao, Z., 2008. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. Food Chemistry, 107(3): 1205-1209.
- Leonardis, A.D., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V. and Ranalli, G., 2007. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. European Food Research and Technology, 226(4): 653-659.
- Majeed, M., Prakash, L. and Corporation, S., 2006. Natural antimicrobial and preservatives: an emering trend in personal care. Cosmetics and toiletries manufacture worldwide, 1-5.
- Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S., 2007. Microwave assisted extraction an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Reviews, 1: 7-18.
- Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I., 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses, 46(3-4): 132-136.
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J.A. and Baptista, P., 2009. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. Food and Chemical Toxicology, 47(7): 1507-1511.
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. and Bassami, M.R., 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120(3): 765-770.
- Pan, X., Niu, G. and Liu, H., 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 42(2): 129-133.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F.,Valentao, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. and Pereira, J.A., 2007. Phenolic Compound and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) leaves. Journal of Molecules Basel Switzerland, 12(5): 1153-1162.
- Tambekar, D.H., Khante, B.S., Panzale, B.K., Dahikar, S.B. and Banginwar, Y.S., 2008. Evaluation of phytochemical and antibacterial potential of helicteres isora l. fruits against enteric bacterial pathogens. African Journal of Traditional, Complementaery and Alternative Medicines, 5(3): 290-293.
- Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. and Toivonen, P., 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. food microbiology, 20(3): 305-311.
- Xiao, W.H., Han, L. and Shi, B., 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*. Separation and Purification Technology, 62(3): 614-618.
- Zhang, B., Yang, R. and Liu, C.Z., 2008. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. Separation and Purification Technology, 62(2): 480-483.

Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method

Z. Rafiei[1], S.M. Jafari[2*], M. Alami[3] and M. Khomeiri[3]

1- MSc graduate of Food Science and Technology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural resources, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural resources, Gorgan, Iran, E-mail: Smjafari@gau.ac.ir
3- Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural resources, Gorgan, Iran

Received: September 2010 Revised: March 2011 Accepted: April 2011

Abstract

The aim of the study was to investigate the effect of extraction through two methods of maceration and microwave-assisted extraction on phenolic compounds of olive leaves (Mishen cultivar) with solvents of water, 80% methanol and acetone. The highest total phenolic content (211.385±0.13 mg tannic acid/g extract) was related to the methanol extract produced by microwave-assisted extraction but acetone extracts gave the lowest amount for both methods. Comparing the extraction methods showed that MAE had higher extraction efficiency in all three tested solvents. Regarding antimicrobial activity of olive leaf extracts, we evaluated the bactericidal effects of different solvent extracts on *Staphilococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Escherishia coli*. In terms of *S. aureus*, the lowest minimum inhibitory concentration (MIC= 315 µg/ml) and minimum bactericidal concentration (MBC= 2500 µg/ml) were observed with acetone extract in MAE and methanol extracts in both methods, respectively. As for *E.coli* the lowest MIC was 625 µg/ml and the lowest MBC (5000 µg/ml) was associated with water and methanol extracts in microwave-assisted extraction. In terms of *S. typhi*, the lowest MIC and MBC were 315 and 10000 µg/ml, respectively. To conclude, it was found that *S. typhi* was the most resistant bacteria against the extracts; in most cases MAE-produced extracts showed more antimicrobial activity compared to traditional-produced extracts.

Key words: *Olea Europaea* L., phenolic compounds, extraction, microwave, antimicrobial activity.