

بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش مخلوط و بررسی اثر ضد میکروبی

Escherichia coli و *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* بر آن

بهروز علیزاده بهبهانی^۱، علی الفگونه^۲، فریده طباطبایی یزدی^{۳*}، فخری شهیدی^۴، محبت محبی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۰۶

چکیده

در این پژوهش اثر حلال‌های آب، اتانول، متانول و گلیسرین هر کدام در پنج سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از هندسه مخلوط برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا استفاده شد. از مدل چندجمله‌ای شف و بهینه‌سازی عددی به منظور مدل‌سازی و بهینه‌سازی عصاره استفاده گردید. مدل چند جمله‌ای شف به‌طور معنی‌داری قادر به پیش‌بینی بازده حاصل از استخراج عصاره برگ حرا می‌باشد (میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۴ و ۰/۸۴ و غیر معنی‌دار بودن آزمون ضعیف برازش و مقدار اندیس F (۱۴/۶۲) نشان دهنده صحت مدل برای پیش‌بینی بازدهی عصاره می‌باشد). به علاوه میزان ضریب تغییرات ۱۴/۶٪ محاسبه شد که نشان دهنده تکرار پذیری قابل قبول برای داده‌های آزمایشی است. میزان تابع مطلوبیت بهینه‌سازی ۰/۹۴ محاسبه شد که نشانگر صحت عملیات بهینه‌سازی می‌باشد. بر این اساس، فرمولاسیون بهینه حاوی گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود. اثر ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا بر سه باکتری *Escherichia coli* ATTC 25992 و *Enterococcus faecium* ATTC 51559 و *Listeria innocua* ATTC 33090 به سه روش (انتشار در آگار به کمک دیسک، حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد و حداقل غلظت کشندگی) در هشت غلظت مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی بر *Listeria innocua* و بالاترین میزان مقاومت در برابر عصاره، مربوط به *Escherichia coli* بود، همچنین با افزایش غلظت عصاره‌ها قطر هاله بازدارندگی بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: حرا، بهینه‌سازی، هندسه مخلوط، اثر ضد میکروبی

مقدمه

مدل‌نمایش ساده‌ای از یک سیستم پیچیده است. اصولاً با مدل‌سازی می‌توان حرکات و واکنش‌های یک سیستم حقیقی را به سادگی در اختیار گرفت. یک مدل با صحت بالا به کاربر اجازه به دست آوردن خصوصیات، پیش‌بینی کارایی فرآیند و هم‌چنین بهینه‌سازی فرآیند را می‌دهد (Ruguo, 1999). توسعه تکنیک‌های موفق مدل‌سازی، منجر به کاهش لزوم آزمایش‌های تجربی و در نتیجه صرفه جویی در زمان و هزینه در توسعه مراحل فرآیند می‌گردد.

سیستم‌های هوشمند، ابزار مناسبی برای مدل‌سازی فرایندهای پیچیده طبیعی می‌باشند. این سیستم‌ها با پردازش مستقیم داده‌های تجربی دانش یا قانون نهفته در ورای داده‌ها را مشخص می‌نمایند. در حقیقت این مدل‌ها تنها سیستم را توصیف می‌کنند (Razavi et al., 2003).

یکی از این سیستم‌های هوشمند روش سطح پاسخ می‌باشد. متدولوژی رویه‌ی پاسخ (RSM) که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون (۱۹۵۱) معرفی شد سیستمی هوشمند می‌باشند، که با به کارگیری مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی، شبیه‌سازی سیستم‌های خطی و غیر خطی را انجام می‌دهد. در حقیقت روش سطح پاسخ یک ابزار مفید برای زمانی است که سیستم به طور کامل ناشناخته می‌باشد این تکنیک دارای هندسه‌های متنوعی است که از جمله آن می‌توان به روش مخلوط^۶ اشاره نمود (Xie et al., 2003).

۱ و ۲- دانشجویان دکترا گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳، ۴ و ۵- استادان گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: tabatabai@um.ac.ir)

یافت می‌شود. این باکتری از لحاظ ظاهری، یک باکتری گرم مثبت میله‌ای شکل می‌باشد، که توانایی تحمل دما و غلظت بالای نمک را دارد. از آنجا که باکتری *L. innocua* ویژگی‌های فیزیولوژیکی مشابهی با *L. monocytogenes* دارد و تنها تفاوت آن‌ها قابلیت بیماری‌زایی در *L. monocytogenes* است لذا در این پژوهش آزمایشگاهی از *L. innocua* استفاده شد (Banada et al., 2007).

Enterococcus faecium باکتری گرم مثبت، کروی می‌باشد که جایگاه فعالیت آن دستگاه گوارش انسان و سایر پستانداران است. *E. faecium* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج (Aminoglycosides, Aztreonam, Cephalosporins, Clindamycin, Nafcillin, Oxacillin) نسبتاً مقاوم است و باعث ایجاد عفونت به ویژه در بیمارستان‌ها، خانه سالمندان و ... می‌شود. *E. faecium* می‌تواند باعث ایجاد باکتریی و اندوکاردیت عفونت دستگاه ادراری (UTI) و عفونت‌های دیگر در انسان شود (Gonzales et al., 2001).

Escherichia coli باسیل گرم منفی، متحرک، بی‌هوازی اختیاری و غیر تشکیل‌دهنده اسپور است. این باکتری در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی‌اکسید کربن تولید می‌کند. رشد بهینه باکتری *E. coli* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است اما تا دمای ۴۹ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد و می‌تواند عامل بیماری‌های عفونی در انسان باشد (Barrick et al., 2009).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نسبت‌های متفاوت از حلال‌های گلیسیرین، اتانول، متانول و آب بر میزان بازدهی عصاره‌ی برگ گیاه حرا با استفاده از روش سطح پاسخ با هندسه بهینه مخلوط، بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا و در انتها بررسی اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های برگ گیاه حرا بر میکروارگانیسم‌های *L. innocua* ATTC 33090 و *E. faecium* ATTC 51559 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش

جمع‌آوری برگ گیاه حرا

این پژوهش آزمایشگاهی در فاصله آبان ماه ۱۳۹۱ تا شهریور ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. برگ‌های تازه گیاه حرا در شهریور ماه ۱۳۹۱ از جزیره قشم (استان هرمزگان) جمع‌آوری و بعد از شناسایی و تایید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی و هماهنگی‌های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، در شرایط مناسب (سایه) خشک گردید و جهت تهیه

روش مخلوط به شکل موفقیت‌آمیزی در صنایع غذایی به کاربرده شده است که می‌توان به، بهینه‌سازی فرمولاسیون تورتیلیای حاوی آرد گندم، لوبیای چشم بلبلی و بادام‌زمینی (Holt et al., 2006)، بهینه‌سازی فرمولاسیون دسرهای خشک حاوی شیرین کننده (Lop et al., 1999)، بهینه‌سازی محیط کشت میکروبی برای تولید فراورده کفیر (Zhou et al., 2007)، بررسی اثر متقابل بین صمغ لوبیای لوکاست و نشاسته سیب‌زمینی و کاپاکاراگینان بر ویژگی‌های بافتی و رنگی سوسیس کم چرب اشاره نمود (Garcia & Totosaus, 2008).

یکی از روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشد. اما همواره استفاده از این گونه مواد شیمیایی در مواد غذایی باعث نگرانی بوده است، زیرا اعتقاد عمومی مردم بر این است که مواد شیمیایی ضد میکروبی ممکن است سلامت آن‌ها را تهدید نماید. به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی بجای مواد شیمیایی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. بدون هیچگونه تردیدی استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان طبیعی جایگزین بسیار مناسبی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی هستند (Dorman & Deans, 2000; Matan et al., 2006).

گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* متعلق به خانواده اوسیناسه معروف به مانگروی سفید یا خاکستری می‌باشد. گیاه حرا در حد فاصل خشکی و دریا و در نواحی جزر و مد رشد می‌کند. گیاه حرا بعنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو دارای توانایی‌های بالقوه‌ای می‌باشد. این گیاه به صورت بوته‌ای یا درختچه‌ای با ارتفاع‌های متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می‌شود (Kathiresan & Bingham, 2001).

علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر *Penicillium digitatum* و *Alternaria citri* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های برگ گیاه حرا دارای اثر بازدارندگی موثری بر هر دو گونه قارچ مورد بررسی داشت. اثر بازدارندگی عصاره بر قارچ *Penicillium digitatum* بیشتر بود.

مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده روی عصاره برگ گیاه حرا وجود متابولیت‌های ثانویه نظیر تانین‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، فلاونوئیدها، نفتوکینون‌ها، گلیکوزیدها و سایر ترپن‌ها را گزارش کرده که انتظار می‌رود این ترکیبات با فعالیت زیستی خود باعث اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا شوند (Zhu et al., 2009).

مطالعات توکسیکولوژی انجام شده توسط محققان روی موش‌های آزمایشگاهی، هیچ گونه اثر منفی استفاده از عصاره برگ حرا را بر موش‌ها گزارش نموده اند (Ali & Bashir, 1998).

Listeria innocua یکی از شش گونه متعلق به جنس لیستریا می‌باشد، که به‌طور گسترده در محیط به ویژه خاک و منابع غذایی

عصاره با آسیاب مدل Waring پودر شد.

سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی‌لیتر به لوله اضافه و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین شد. اختلاف وزن لوله معادل با وزن ۱ ml از عصاره‌های آبی یا اتانولی بود. میانگین سه بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره محاسبه گردید (Tabatabaei Yazdi *et al*, 2013).

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی شد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت‌های (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌ها در آب مقطر استریل تهیه و به عصاره حرا آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط کش به‌طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام گرفت (Babayi *et al*, 2004).

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) عصاره برگ گیاه حرا با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، این روش برای عصاره‌ها و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد (Benger *et al*, 2004).

تعیین حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای برای عصاره‌های برگ گیاه حرا تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد

سوش‌های میکروبی

سوش‌های میکروبی مورد بررسی در این پژوهش شامل 33090 *E. coli* و *E. faecium* ATTC 51559 *L. innocua* ATTC 25992 بود. تمامی سوش‌ها بصورت لیوفلیزه از طرف دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران اهدا گردید. آمپول‌های لیوفلیزه باکتری‌ها در شرایط استریل باز و به محیط کشت مایع مولر هیلتون برات (مرک آلمان) انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی نیاز به کشت تازه از هر میکروارگانیسم بود. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار نوترینت آگار تلقیح انجام پذیرفت، سپس کشت مربوطه توسط محلول رینگر شستشو و سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید. مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد. سوسپانسیون تولیدی باید حاوی 1×10^8 CFU/ml باکتری باشد (Tabatabaei Yazdi & Alizadeh Behbahani, 2013; Valero & Salmeron, 2003).

تهیه عصاره‌ها

جهت تهیه عصاره‌ها (آبی، اتانولی، متانولی و گلیسرینی) ۵۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه حرا به ارلن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال‌های مختلف اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط گردید تا استخراج عصاره بطور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی جنس واتمن از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه بدست آید. مایع رویی پس از جمع‌آوری با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافی 0.45μ عبور داده و جهت حذف آلودگی‌های میکروبی از فیلتر سرنگی استفاده شد و در نهایت عصاره‌های اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) گردید و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌های تغلیظ شده در ظروف تیره استریل آلومینیومی ریخته شد و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2013; Heidari, 2013; Sureshjani *et al.*, 2013).

بررسی وزن خشک عصاره‌ها

برای محاسبه وزن خشک، برای هر کدام از عصاره‌ها یک لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس (۰/۰۰۱) توزین،

روش بهینه‌سازی

افزایش راندمان فرایند بدون افزایش هزینه دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. روش به کار رفته بدین منظور، بهینه‌سازی نامیده می‌شود. در این پژوهش بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال بر مبنای مدل برازش شده و با استفاده از تابع مطلوبیت صورت پذیرفته است. الگوریتم بهینه‌سازی در این روش بدین ترتیب می‌باشد که ابتدا هر یک از متغیرهای مورد بررسی به یک تابع مطلوبیت (d) تبدیل می‌شوند، برد تغییرات تابع مطلوبیت بین صفر تا یک می‌باشد. در این روش تابع مطلوبیت بعنوان یک تابع پناالتی عمل می‌کند و پاسخ را به سمت ناحیه مطلوب میل می‌دهد. هدف این روش جستجوی پاسخ‌های مربوطه در فضایی می‌باشد که تابع مطلوبیت سراسری به یک نزدیک شود. تابع مطلوبیت سراسری در واقع، میانگین هندسی تک تک توابع مطلوبیت می‌باشد و با استفاده از (معادله ۳) محاسبه می‌شود (Pourfarzad et al., 2012). لازم به یادآوری است که روش پناالتی نوعی الگوریتم بهینه‌سازی می‌باشد که اساس آن خارج کردن محدودیت از مساله است.

$$D = (d_1 * d_2 * d_3 * \dots * d_m)^{1/m}$$

جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف حلال، برای استخراج عصاره برگ

کد تیمار	آب	اتانول	متانول	گلیسرین	گیاه حرا
۱	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۲	.	۱۲۵	۱۲۵	.	.
۳	.	.	۲۵۰	.	.
۴	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵
۵	۱۲۵	۱۲۵	.	.	.
۶	.	۱۲۵	۱۲۵	.	.
۷	۱۲۵	.	۱۲۵	.	.
۸	.	۲۵۰	.	.	.
۹	.	.	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
۱۰	۲۵۰
۱۱	.	۱۲۵	.	۱۲۵	۱۲۵
۱۲	.	.	.	۲۵۰	۲۵۰
۱۳	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۱۴	۱۲۵	.	.	۱۲۵	۱۲۵
۱۵	۱۲۵	۱۲۵	.	.	.
۱۶	۱۲۵	.	.	۱۲۵	۱۲۵
۱۷	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۱۵۶/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵
۱۸	.	۱۲۵	.	۱۲۵	۱۲۵
۱۹	۸۳/۳۳	.	۸۳/۳۳	۸۳/۳۳	۸۳/۳۳
۲۰	۱۲۵	.	۱۲۵	.	.

میکروارگانیزم‌های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، از تمام لوله‌هایی که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود، جهت تعیین MBC کشت به عمل آمد. لوله‌ای که کم‌ترین غلظت عصاره را داشت و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. این روش برای هر عصاره و هر میکروارگانیزم ۳ بار تکرار گردید (Espinell et al., 2002).

طرح آماری

در این پژوهش به منظور مطالعه‌ی فرمولاسیون حلال برای استخراج عصاره گیاه حرا، اثر آب، اتانول، گلیسرین و متانول هر کدام در ۵ سطح (صفر، ۳۱/۲۵، ۸۳/۳۳، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر) با استفاده از طرح آزمایشی مخلوط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی فرمولاسیون‌ها نسبت حلال به برگ گیاه حرا ۵ به ۱ بود. طرح شامل بیست آزمایش بوده که ۱۰ آزمایش مربوط به تخمین ضرایب مدل، پنج آزمایش مربوط به آزمون ضعف برازش، پنج آزمایش برای محاسبه خطای تصادفی در نظر گرفته شده است. یکی از مزایای روش مخلوط وارد کردن محدودیت دلخواه در انتخاب نقاط مورد آزمایش می‌باشد. همچنین نوع بهینه این روش می‌تواند ماتریسی از نقاط آزمایشی را ایجاد کند که در آن دترمینان ماتریس مینیمم باشد، این ویژگی امکان استخراج حداکثر اطلاعات را از فضای آزمایشی مهیا می‌سازد (Ruguo, 1999).

در این پژوهش به منظور مدل‌سازی بازدهی استخراج از چند جمله‌ای شف (معادله ۱) استفاده گردید، این معادله فرم مشتق شده بسط تیلور می‌باشد، که به علت رابطه خاص (معادله ۲) میان n جزء در یک هندسه مخلوط به وجود آمده است (Ruguo, 1999).

$$y = \sum_{j=1}^n \beta_j \cdot X_j + \sum_{j < k=2}^n \beta_{jk} \cdot X_j \cdot X_k + \sum_{j < k=2}^n \beta_{jki} \cdot X_j \cdot X_k \cdot X_i \quad (۱)$$

$$X_i + X_j + X_k + \dots + X_n = 1 \quad (۲)$$

در معادلات مذکور y بعنوان پاسخ در نظر گرفته شده و β_j ضرایب جملات خطی، β_{jk} ضرایب جملات غیر خطی دوتایی و β_{jki} ضرایب جملات غیر خطی سه‌تایی، بعلاوه از X بعنوان اثرات خطی مخلوط، و XX، XXX بعنوان اثرات غیر خطی مخلوط به صورت دوتایی و سه‌تایی استفاده شده است. همچنین برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا از هر یک از تیمارهای یاد شده در قسمت فوق در هشت سطح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) محلولی تهیه شده و اثر ضد میکروبی آن را روی سه باکتری *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli* در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته است. برای بررسی آنالیز واریانس و میزان معنی‌داری ($p < 0.05$) اثرات ضد میکروبی عصاره برگ گیاه حرا از نرم افزار Minitab 16 استفاده گردید.

نتایج و بحث

از جمله معضلات شایع در سالیان اخیر مساله مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد، لذا یافتن ترکیبات ضد میکروبی طبیعی با کم‌ترین اثر جانبی امر لازم و ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به شکل‌های ۱ و ۲، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در یک نسبت ثابت از گلیسرین با نزدیک شدن به نقطه مرکزی هندسه آزمایش، میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش پیدا کرده است. همچنین با توجه به شکل‌های ۳ و ۴، در یک میزان ثابت از متانول با افزایش حلال گلیسرین میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافته است، و بیشترین میزان بازدهی را می‌توان در سطوح برابر آب و اتانول به دست آورد.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی و گلیسرین برگ گیاه حرا را بر *Penicillium*

digitatum مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهشگران نشان داد که کمترین میزان بازده عصاره مربوط به حلال گلیسرین می‌باشد این محققان علتی برای وقوع این پدیده عنوان نمودند. شاید بتوان علت این پدیده را افزایش قطبیت کل حلال در زمان افزایش حضور حلال گلیسرین در فرمولاسیون دانست. به‌منظور بررسی فرضیه فوق از آزمون آماری مربع پیرسون برای مشخص کردن میزان همبستگی درجه استحصال و قطبیت استفاده شد. نتایج حاصل بیان‌گر رابط معکوس و معنی‌داری ($p < 0.05$) بین دو متغیر فوق بوده است (جدول ۳). همچنین برای بررسی میزان صحت مدل برازش شده بر داده‌های حاصل از درجه استحصال عصاره برگ گیاه حرا از دو فاکتور آماری ضریب تبیین و آزمون ضعف برازش استفاده گردید. میزان ضریب تبیین ۹۴ درصد و همچنین عدم معنی‌داری ($p < 0.05$) آزمون ضعف برازش بیان‌گر مناسب بودن مدل شف برای برآورده داده‌ها می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج جدول آنالیز واریانس مدل برازش یافته بر داده‌های درجه استحصال عصاره برگ گیاه حرا

منبع	درجه آزادی	ضرایب	مجموع مربعات	اندیس p
Model	۱۰	۴۲/۰۷	۴۲/۰۱	۰/۰۰۰۲
Linear Mixture	۳	۱۸۷/۱۰	۶۲/۳۷	۰/۰۰۰۲
AB	۱	۶/۹۷	۶/۹۷	۰/۱۵۲۸
AC	۱	۲/۳۵	۲/۳۵	۰/۳۸۴۳
AD	۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۷۷۶۲
BC	۱	۲۸/۴۰	۲۸/۳۹	۰/۰۱۱۸
CD	۱	۱/۰۳	۱/۰۳	۰/۵۶۳۸
ABC	۱	۱۲۷/۶۱	۱۲۷/۶۱	<۰/۰۰۰۱
ACD	۱	۱۷/۶۲	۱۷/۶۲	۰/۰۳۵۲
residual	۹	۲۵/۸۵	۲/۸۷	
Lack of fit	۴	۱۹/۱۰	۴/۷۸	۰/۱۵۲
Pure error	۵	۶/۷۵	۱/۳۵	
Total	۱۹	۴۴۵/۹۳		
R ²	-	۰/۹۴		

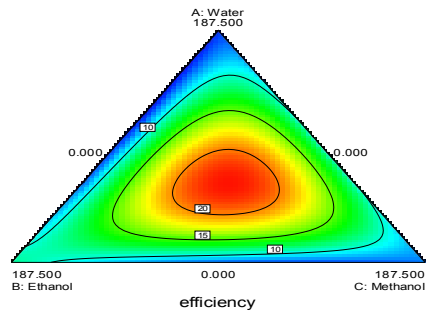
جدول ۳- نتایج آزمون همبستگی پیرسون بر میزان قطبیت و درجه استحصال

		استحصال قطبیت	
قطبیت	همبستگی پیرسون	۱	-۰/۵۱۸
	میزان معنی‌داری		۰/۰۲۳
استحصال	همبستگی پیرسون	-۰/۵۱۸	۱
	میزان معنی‌داری	۰/۰۲۳	

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
22.2
5

X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = C: Methanol

Actual Component
D: Glycerin = 62.500

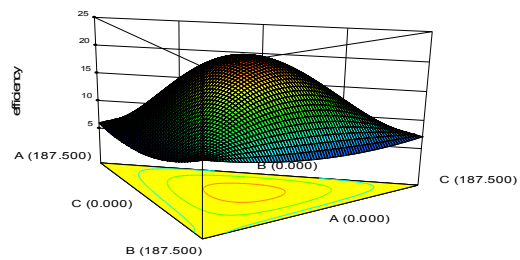


شکل ۱- تراز تاثیر نسبت‌های متفاوت آب، اتانول و متانول در میزان ثابت گلیسرین (۶۲/۵ میلی لیتر).

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
22.2
5

X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = C: Methanol

Actual Component
D: Glycerin = 62.500

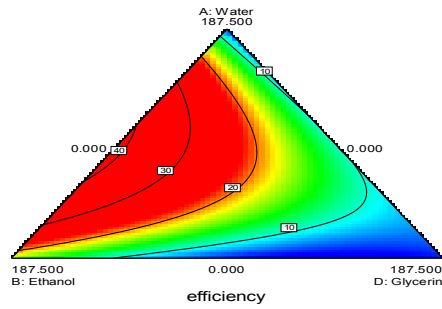


شکل ۲- سطح پاسخ برای نسبت‌های متفاوت آب، اتانول و متانول در میزان ثابت گلیسرین (۶۲/۵ میلی لیتر).

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
22.2
5

X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = D: Glycerin

Actual Component
C: Methanol = 62.500

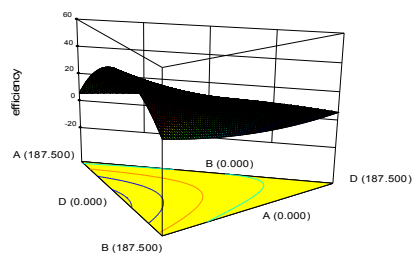


شکل ۳- تراز تاثیر نسبت‌های متفاوت گلیسرین، اتانول و آب در میزان ثابت متانول (۶۲/۵ میلی لیتر).

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
22.2
5

X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = D: Glycerin

Actual Component
C: Methanol = 62.500



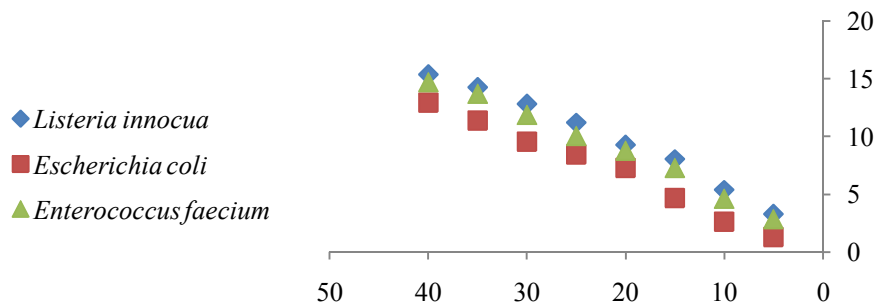
شکل ۴- سطح پاسخ تاثیر نسبت‌های متفاوت گلیسرین، اتانول و آب در میزان ثابت متانول (۶۲/۵ میلی لیتر).

علت این امر را می‌توان اختلاف ساختمانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ذکر نمود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ *اکالیپتوس کامالدولانس* بر میکروارگانیسم‌های *E. coli*، *S. aureus* و *P. digitatum* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های برگ *اکالیپتوس کامالدولانس* مربوط به باکتری گرم منفی *E. coli* بود. این محققان مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ نسبت دادند.

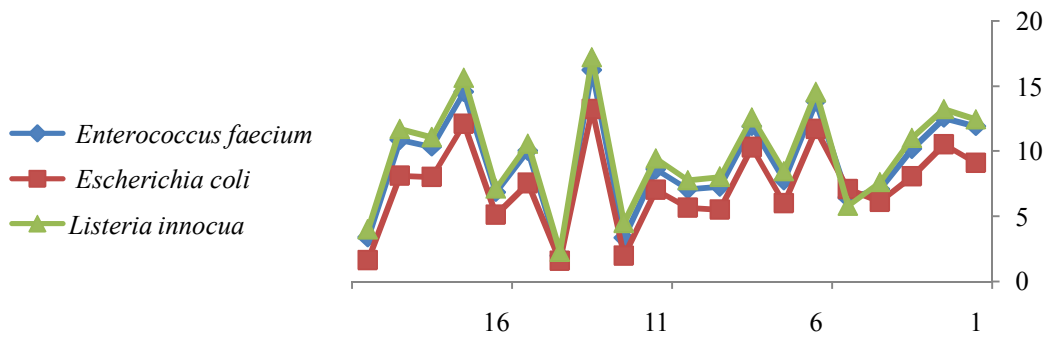
در این پژوهش برای انتخاب مناسب‌ترین نسبت حلال‌ها از روش بهبه‌سازی عددی با استفاده از نرم افزار (Design Expert) استفاده شد. هدف از بهبه‌سازی، افزایش بازدهی عصاره برگ گیاه حرا و کاهش قطبیت حلال بوده است. میزان تابع مطلوبیت ۰/۹۴ محاسبه شد که نشانگر صحت عملیات بهبه‌سازی می‌باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود. با توجه به شکل ۷ و ۸ می‌توان چنین نتیجه گرفت که با نزدیک شدن به مرکز هندسه مخلوط، فضای از نسبت‌های مختلف سه حلال متانول، آب، و اتانول با شرط کمینه بودن قطبیت، ایجاد خواهد شد که میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از فرمولاسیون بهینه حلال بیانگر افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) میزان بازدهی عصاره برگ گیاه حرا نسبت به بالاترین بازدهی مشاهده شده در تیمار ۱۳ (جدول ۱) بود. جهت حصول اطمینان از اثر ضد میکروبی عصاره حاصل از فرمولاسیون بهینه از سه روش (انتشار در آگار به کمک دیسک، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی) استفاده گردید. نتایج حاصل از انتشار در آگار به کمک دیسک در غلظت ۴۰ میلی‌گرم برلیتر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) افزایش هاله بازدارندگی بر سه میکروارگانیسم مورد آزمایش بود، همچنین نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی در جداول (۷ و ۸) آورده شده است.

بر اساس نتایج بدست آمده از تیمار حلال‌های مختلف، بیشترین اثر بازدارندگی بر میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش مربوط به تیمار سیزده (جدول ۱) می‌باشد. علت این امر را می‌توان درصد استحصال بیشتر عصاره برگ گیاه حرا و در نتیجه استخراج بیشتر مواد موثر در توسط تیمار سیزده ذکر نمود. علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا را بر دو گونه قارچ بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا نسبت به عصاره آبی دارای اثر بازدارندگی و کشندگی بیشتری بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه داشت، این محققان علت این امر را استخراج بیشتر عصاره برگ گیاه حرا توسط حلال اتانول ذکر کردند.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثر ضد میکروبی عصاره‌های برگ گیاه حرا به روش انتشار در آگار (به کمک دیسک) در جدول‌های ۴، ۵ و ۶ آورده شده است. این نتایج موید این مطلب می‌باشد که تیمارهای نوع حلال، غلظت عصاره و همچنین برهمکنش آن‌ها به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) موجب تغییر قطر هاله بازدارندگی عدم رشد (شاخص اثر ضد میکروبی عصاره) در سه باکتری مورد آزمایش می‌شود. از نظر تئوری قطر هاله عدم رشد عکس‌العملی از غلظت ماده موثر موجود در عصاره برگ گیاه حرا می‌باشد. در این پژوهش اثر ضد میکروبی عصاره‌های بدست آمده از تیمارهای مختلف (جدول ۱) در هشت سطح (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر باکتری‌های *E. coli*، *E. faecium*، *L. innocua* بررسی قرار گرفت (شکل ۵). با توجه به نتایج می‌توان چنین بیان نمود که با افزایش غلظت عصاره میزان قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش پیدا کرده است، که این نتیجه موید تئوری ذکر شده در قسمت قبل می‌باشد. به‌طور کلی اثر ضد میکروبی هر عصاره بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود بطوری که باکترهای گرم مثبت *E. faecium* و *L. innocua* در مقایسه با باکتری گرم منفی *E. coli* حساسیت بیشتری داشتند (شکل ۶) و در غلظت کمتری از عصاره برگ گیاه حرا اثر بازدارندگی ایجاد کردند.



شکل ۵- اثر غلظت عصاره برگ گیاه حرا به روی میزان قطر هاله عدم رشد در سه باکتری *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*.



شکل ۶- اثر تیمارهای مختلف حلال به روی میزان قطر هاله عدم رشد در سه باکتری *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

جدول ۴- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Listeria innocua*

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	اندیس p^c
C_1^a	۱۸	۶۸۲۲/۵۱	۳۷۹/۰۳	۰/۰۰۰
C_2^b	۷	۷۳۷۲/۰۸	۱۰۳۸/۸۷	۰/۰۰۰
C_1C_2	۱۲۶	۸۱۹/۷۶	۶/۵۱	۰/۰۰۰
Error	۳۰۴	۹۵/۶۷		
Total	۴۴۵	۱۵۰۱۰/۳۲		

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c- سطح معنی‌داری ($p < 0.05$)

جدول ۵- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Enterococcus faecium*

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	اندیس p^c
C_1^a	۱۸	۶۵۵۰/۹۲	۳۶۳/۹۴	۰/۰۰۰
C_2^b	۷	۷۰۲۷/۴۷	۱۰۰۳/۹۲	۰/۰۰۰
C_1C_2	۱۲۶	۸۵۱/۲۷	۶/۷۶	۰/۰۰۰
Error	۳۰۴	۲۰۲/۶۵	۰/۶۷	
Total	۴۴۵	۱۴۶۳۲/۳۱		

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c- سطح معنی‌داری ($p < 0.05$)

جدول ۶- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به اثر بازدارندگی عصاره برگ گیاه حرا در باکتری *Escherichia coli*

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	اندیس p^c
C_1^a	۱۸	۵۳۳۰/۸۹	۲۹۶/۱۶	۰/۰۰۰
C_2^b	۷	۶۸۱۹/۹۹	۹۷۳/۸۶	۰/۰۰۰
C_1C_2	۱۲۶	۱۳۰۱/۳۳	۹/۵۳	۰/۰۰۰
Error	۳۰۴	۲۹۲/۰۳	۰/۹۶	
Total	۴۴۵	۱۳۶۴۱/۲۴		

a- نوع حلال
b- غلظت حلال
c- سطح معنی‌داری ($p < 0.05$)

جدول ۷- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره بهینه برگ گیاه حرا بر *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
بهبینه	<i>Listeria innocua</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
بهبینه	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
بهبینه	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-

± عدم رشد -: رشد

جدول ۸- نتایج حداقل غلظت کشندگی رشد (MBC) عصاره بهینه برگ گیاه حرا بر *Enterococcus faecium*، *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ گیاه حرا (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
بهبینه	<i>Listeria innocua</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
بهبینه	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-
بهبینه	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-

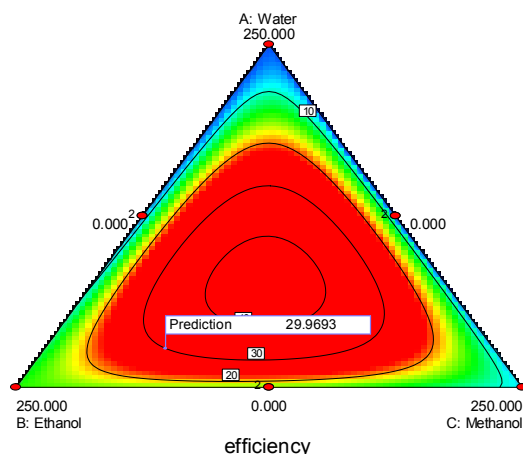
± عدم رشد -: رشد

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ گیاه حرا در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر سویه‌های مورد مطالعه داشت. در ادامه لازم است تحقیقات وسیع‌تر و دامنه‌داری در شرایط "in vivo" انجام شود تا دوز مناسب این عصاره مشخص گشته و در نهایت اقدام ارزنده‌ای جهت بهبود بیمارهای عفونی ناشی از سوش‌های مختلف میکروبی انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

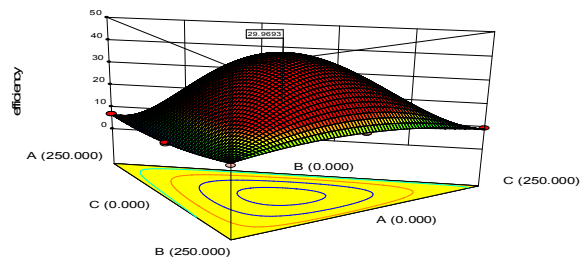
نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که چند جمله‌ای شف و روش بهینه‌سازی عددی با استفاده از روش مخلوط، به ترتیب برای برازش داده‌های حاصل از بازدهی استخراج عصاره برگ گیاه حرا و بهینه‌سازی فرمولاسیون حلال مناسب می‌باشد. بر این اساس فرمولاسیون بهینه دارای گلیسرین (صفر میلی‌لیتر)، آب (۲۸/۲۲ میلی‌لیتر)، متانول (۵۹/۸۳ میلی‌لیتر) و اتانول (۱۶۱/۹۵ میلی‌لیتر) بود.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
● Design Points
22.2
5
X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = C: Methanol
Actual Component
D: Glycerin = 0.000



شکل ۷- تراز ترکیب حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا در شرایط بهینه

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
efficiency
● Design points above predicted value
● Design points below predicted value
22.2
0
X1 = A: Water
X2 = B: Ethanol
X3 = C: Methanol
Actual Component
D: Glycerin = 0.000



شکل ۸- سطح پاسخ ترکیب حلال‌های مختلف برای استخراج عصاره برگ گیاه حرا در شرایط بهینه

قدردانی

و مریم حیدری سورشجانی که در جمع آوری نمونه‌ها و انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند قدردانی می‌شود.

بدین وسیله از خانم مهندس نجمه خادمی پور، آزاده ظهوری

منابع

- علیزاده بهبهانی، ب. ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) در شرایط "in vitro" و پرتقال روکش شده با کربوکسی متیل سلولز در شرایط "in situ" پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
- Ali, B., & Bashir, A., 1998, Toxicological studies on the leaves of *Avicennia marina* (mangrove) in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 18(2), 111-116.
- Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M., 2013, Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M. M., & Vasiee, A., 2013, Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(3), 89-99.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M., 2012, Antimicrobial activity of *Avicennia marina* extracts ethanolic, methanol & glycerin against *Penicillium digitatum* (citrus green mold). *Scientific Journal of Microbiology*, 1(7), 147-151.
- Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J., & Ijah, U., 2004, The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri*, 16(2), 106-111.
- Banada, P. P., Guo, S., Bayraktar, B., Bae, E., Rajwa, B., Robinson, J. P., Bhunia, A. K., 2007, Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1664-1671.
- Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Kim, J. F., 2009, Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 461(7268), 1243-1247.
- Benger, S., Townsend, P., Ashford, R. L., & Lambert, P., 2004, An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *The Foot*, 14(2), 86-91.
- Dorman, H., & Deans, S., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M., & Walsh, T., 2002, Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3204-3208.
- Garcia, E., & Totosaus, A., 2008, Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and κ -carrageenan by a mixture design approach. *Meat science*, 78(4), 406-413.
- Gonzales, R. D., Schreckenberger, P. C., Graham, M. B., Kelkar, S., DenBesten, K., & Quinn, J. P., 2001, Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *The Lancet*, 357(9263), 1179-1184.

- Heidari Sureshjani, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial effect of *Satureja bachtiarica* extracts aqueous, ethanol, methanol and glycerin on *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(2), 53-60.
- Holt, S. D., Resurreccion, A., & McWatters, K., 2006, Formulation, Evaluation and Optimization of Tortillas Containing Wheat, Cowpea and Peanut Flours Using Mixture Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 121-127.
- Kathiresan, K., & Bingham, B. L., 2001, Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in marine biology*, 40, 81-251.
- Lop, S., Silva, R., & Beleia, A., 1999, Formulation and evaluation of dry dessert mix containing sweetener combinations using mixture response methodology. *Food chemistry*, 66(2), 167-171.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M., 2006, Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International journal of food microbiology*, 107(2), 180-185.
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H., & Sedaghat, N., 2012, Coffee silverskin as a source of dietary fiber in breadmaking: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 50(2), 599-606.
- Razavi, M. A., Mortazavi, A., & Mousavi, M., 2003, Dynamic modelling of milk ultrafiltration by artificial neural network. *Journal of Membrane Science*, 220(1), 47-58.
- Ruguo, Hu., 1999, Food product design: a computer-aided statistical approach: CRC Press. 35-174.
- Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*, 4(4), 55- 61.
- Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S., & Alizadeh Behbahani, B., 2013, Antimicrobial properties of plant extracts of *Thymus vulgaris* L., *Ziziphora tenuior* L. and *Mentha Spicata* L., against important foodborne pathogens in vitro. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(2), 23-30.
- Valero, M., & Salmeron, M., 2003, Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*, 85(1), 73-81.
- Xie, L., Hall, D., Eiteman, M., & Altman, E., 2003, Optimization of recombinant aminolevulinate synthase production in *Escherichia coli* using factorial design. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 267-273.
- Zhou, J. z., Liu, X. L., Huang, K. h., Dong, M. s., & Jiang, H. h., 2007, Application of the mixture design to design the formulation of pure cultures in Tibetan kefir. *Agricultural Sciences in China*, 6(11), 1383-1389.
- Zhu, F., Chen, X., Yuan, Y., Huang, M., Sun, H., & Xiang, W., 2009, The chemical investigations of the mangrove plant *Avicennia marina* and its endophytes. *Open Natural Products Journal*, 2, 24-32.

Optimization of mangrove leaf extraction by mixture design and investigation of its antimicrobial effect on *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli*

B. Alizadeh Behbahani¹, A. Alghooneh¹, F. Tabatabaei Yazdi^{*2}, F. Shahidi², M. Mohebbi²

Received: 2013.11.16

Accepted: 2014.02.25

Introduction: *Avicennia marina*, commonly known as gray or white mangrove, is a specie of mangrove tree classified in the plant family *Acanthaceae*. It is distributed along Africa's east coast, south-west, south and south-east Asia, and southern Iran along the Persian Gulf coast. It grows as a shrub or tree to a height of three to ten meters. Mixture design is one of the most popular smart systems which is based on simulation of linear and non-linear systems using mathematical and statistical techniques, and a useful tool for dealing with completely unknown systems. Chemical preservatives are commonly used for inhibition of pathogens in foods, people are concerned about the side effects of preservatives on their health. Replacement of chemical preservatives with natural substances have a great importance in food preservation. Natural preservatives, as well as, essential oils and plant extracts are suitable alternatives for chemical preservatives. The main purposes of this study are the evaluation of the effects of different combinations of four solvents (water, ethanol, methanol and glycerin) on the efficiency of mangrove leaf extraction using response surface method with mixture optimal design, the optimization of solvent formulation for mangrove leaf extraction, and, finally, the evaluation of the in vitro inhibitory and bactericidal effects of mangrove leaf extract on *Listeria innocua* ATTC33090, *Enterococcus faecium* ATTC 51559 and *Escherichia coli* ATTC 25992.

Materials and method: Fresh mangrove leaves were prepared from Qeshm Island, Persian Gulf, Iran, in August 2012. Water, ethanol, methanol and glycerin extracts were prepared by adding 50 g of powdered mangrove leaf to 250 mL of the solvent. Extraction was carried out for 48h, in ambient temperature. The mixture of extract and leaf powder was separated by Watman filter paper, then the filtrate was centrifuged in 3000g for 10 minutes and filtered using a 0.45 μm Millipore filter. Finally, in order to separate the solvent and concentrated extract, the solutions were evaporated using a rotary vacuum evaporator. The concentrated extract was stored in dark aluminum containers at 4°C. In this study, the effects of water, ethanol, methanol and glycerin at five levels (0, 31.25, 83.33, 125 and 250 ml) on efficiency of mangrove leaf extraction by mixture optimal design has been investigated. Modeling and optimization has been carried out by Scheffe polynomial. The antimicrobial activity of mangrove leaf extract was evaluated using disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of mangrove leaf extract was determined using serial dilution tubes. For each extraction method (based on solvent, Water, Ethanol, Methanol and Glycerin), 8 serial concentrations (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 mg/mL) and 1 control tube of mangrove leaf extract were prepared in Mueller-Hinton broth. The minimum bactericidal concentration (MBC) of mangrove leaf extract was determined using serial dilution tubes.

Results and Discussion: The Results indicated that Scheffe polynomial model was highly significant for prediction of efficiency of mangrove leaf extraction (R^2 and R^2_{adj} values equal to 0.940 and 0.8447, respectively and The lack-of-fit tests did not result in a significant, also F-value (14.62) indicated that the model is sufficiently accurate). The optimum formulation was found as following: glycerin (0 ml), water (28.22 ml), methanol (59.83ml) and ethanol (161.95 ml) respectively. Maximum of antimicrobial effect on *Listeria innocua* and highest resistance against mangrove leaf extract on *Escherichia coli* were observed. Increasing concentration of mangrove extracts had a significant effect ($p < .05$) on inhibition zone diameter. This may have been resulted from the increment of the solvent polarity associated with glycerin increase. In order to study the mentioned hypothesis, Pearson Square statistical test was used to determine the correlation between the extraction rate and

1- Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

2- Professors, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

(*-Corresponding Author Email: tabatabai@um.ac.ir)

polarity. The results showed that a significant ($P \leq 0.05$) and inverse relationship between the extraction rate and polarity of the solvent. Moreover, in order to check the accuracy of the model fitted on the data obtained from mangrove leaf extraction rate the goodness of fit was investigated using both coefficient of determination (R^2) and lack of fit test. A 94% coefficient of determination and lack of significance ($P \leq 0.05$) for lack of fit test suggested that Scheff model could accurately fit the data and predict it. The results of this study showed that Scheff polynomial and numerical optimization using mixture design method were suitable to fit efficiency of mangrove leaf extraction and solvent formulation optimization data, respectively. According to the results, the optimized solvent formulation was glycerin (0 mL), water (28.22 mL) and ethanol (161.95 mL).

Conclusion: Finally, the results showed that mangrove leaf extract had a notable antimicrobial effect on the studied strains "*in vitro*". More "*in vivo*" studies seem to be required in order to determine the best extract dosage which leads to inhibition of microbial infection.

Keywords: Mangrove Plant, Optimization, Mixture Design, Inhibition Zone Diameter.