Research Article

DOI: 10.22034/ijche.2021.280661.1102

DOR: 20.1001.1.17355400.1400.20.119.3.4

This journal is an open access journal licensed under an Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International license(CC BY-NC-ND 4.0).

Preparation and Evaluation of Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of Alcoholic Extract of Propolis

A. Ezazi[1], A. Javadi[2], H. Jafarizadeh-Malmiri[3,4*], H. Mirzaei[2]

1- Ph.D Student of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University

2- Associate Professor of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University

3- Associate Professor of Chemical Engineering, Sahand University of Technology

4- Department of Food Science and Technology, Applied Scientific Training Center of Shirin Asal Food Industries Group

Email: h_jafarizadeh@sut.ac.ir

Abstract

In this study, the physico-chemical and antimicrobial properties of alcoholic extract of propolis were evaluated. Physico-chemical properties of propolis samples including moisture content, color, turbidity and antioxidant activity and chemical composition were measured. The antimicrobial properties of the extract were also investigated. The antioxidant property of propolis was 92.75%. In chemical analysis of the extract, 61 bioactive compounds were identified. Chalcone is the most abundant substance in the extract. Antimicrobial tests showed that the minimum inhibitory concentrations of propolis extract against Salmonella enteritidis, Staphylococcus aureus and Escherichia coli and Candida albicans was 40, 10, 40 and 5 (µg/ml) and the minimum bactericidal concentration of the provided extract against mentioned microorganisms was 40, 10, 80 and 5 (µg/ml), respectively. Findings indicate that propolis is an antimicrobial compound with high antioxidant properties and can be used in food and pharmaceutical industries.

Received: 11 April 2021
Accepted: 22 June 2021
Page Number: 31-40

Keywords:
Alcoholic Extract of Propolis,
Antimicrobial Properties,
Anti-Oxidant Properties,
Chromatography

Please Cite this Article Using:

Ezazi, A., Javadi, A., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mirzaei, H., "Preparation and Evaluation of Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of Alcoholic Extract of Propolis", Iranian Chemical Engineering Journal, Vol. 20, No. 119, pp. 31-40, In Persian, (2022).

مقـــالـــه پـــژوهشـــی

DOI: 10.22034/ijche.2021.280661.1102

DOR: 20.1001.1.17355400.1400.20.119.3.4

This journal is an open access journal licensed under an Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International license(CC BY-NC-ND 4.0).

مطالعه و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و ضدمیکروبی عصاره الکلی بره‌موم

اسما اعزازی‌ملکی[۱]، افشین جوادی[۲]، هدا جعفری‌زاده مالمیری[۳و۴*]، حمید میرزایی[۲]

۱- دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- دانشیار بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی

۳- دانشیار دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی سهند

۴- گروه صنایع غذایی، مرکز علمی-کاربردی شیرین‌عسل، تبریز، ایران

پیام نگار: h_jafarizadeh@sut.ac.ir

چکیده

در این مطالعه، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و ضدمیکروبی عصاره الکلی بره‌موم مطالعه شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونهٔ بره‌موم یعنی میزان رطوبت، رنگ، کدورت و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب شیمیایی اندازه‌گیری و خاصیت ضدمیکروبی عصاره نیز بررسی شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی بره‌موم، با روش DPPH به میزان ۹۲/۷۵٪ اندازه‌گیری شد. در تجزیهٔ شیمیایی عصاره، ۶۱ ترکیب فعال زیستی شناسایی شد. چالکون بیشترین ترکیب فعال عصاره را تشکیل داده است. آزمون‌های ضد میکروبی نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره بره‌موم در برابر باکتری‌های سالمونلا اینتریتیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای و مخمر کاندیدا آلبیکنس به‌ترتیب ۴۰، ۱۰، ۴۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی به‌ترتیب ۴۰، ۱۰، ۸۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. یافته‌ها حاکی از آن است که بره‌موم یک ترکیب ضدمیکروب با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاست و در صنایع غذایی و دارویی می‌توان از آن استفاده کرد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۱

شماره صفحات: ۳۱ تا ۴۰

کلیدواژه‌ها:

عصاره الکلی بره‌موم،

خاصیت ضدمیکروبی،

خاصیت آنتی اکسیدانی،

کروماتوگرافی (سوا نگاری)

* تبریز، شهر جدید سهند، دانشگاه صنعتی سهند، دانشکدهٔ مهندسی شیمی

استناد به مقاله:

اعزازی‌ملکی، ا.، جوادی، ا.، جعفری‌زاده مالمیری، ه.، میرزایی، ح.، "مطالعه و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و ضدمیکروبی افشرهٔ الکلی بره‌موم"، نشریه مهندسی شیمی ایران، سال بیستم، شماره ۱۱۹، صص. ۴۰-۳۱، (۱۴۰۰).

۱. مقدمه

بره‌موم یک مادهٔ رزینی با رنگ متغیر (سبز، قرمز، زرد و قهوه‌ای) است که به‌وسیلهٔ زنبور عسل از برگ‌ها، جوانهٔ گل‌ها، ساقه و شکاف‌های موجود در پوست برخی از گونه‌های درخت از جمله درخت صنوبر، اکالیپتوس، اقاقیا و توسکا جمع‌آوری و فراوری می‌شود. زنبور عسل مواد جمع‌آوری شده را به کندو می‌برد، با موم مخلوط و بره‌موم را تولید می‌کند که ماده‌ای بسیار چسبناک است. زنبور عسل از بره‌موم به‌دلیل خواص مکانیکی و فعالیت زیست‌شناختی آن، برای ساخت، تعمیر و حفاظت از کندو استفاده می‌کند. هم‌چنین بره‌موم دما و رطوبت درون کندو را نیز تنظیم می‌کند. ترکیب شیمیایی بره‌موم ثابت نیست و با تغییر شرایط آب و هوایی، منطقه جغرافیایی، شرایط محیطی و فصل برداشت تغییر می‌کند. بیش از ۴۲۰ نوع ترکیب شیمیایی از نمونه‌های بره‌موم جمع‌آوری شده در نقاط مختلف جهان شناسایی شده است. به‌طور کلی فلاوونوئیدها اصلی‌ترین ترکیب فعال زیستی بره‌موم به حساب می‌آیند. فعالیت زیست‌شناختی متنوعی برای فلاوونوئیدها گزارش شده است و مقدار و نوع آن به گیاهی که زنبور از آن استفاده می‌کند، بستگی دارد. بره‌موم هم‌چنین خاصیت ضدمیکروبی، ضدویروسی و آنتی‌اکسیدانی دارد که خاصیت ضدمیکروبی بالای آن را می‌توان به غلظت بالای ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدها نسبت داد. خاصیت ضدمیکروبی بره‌موم بسته‌به فصل و ناحیهٔ جغرافیایی ممکن است متفاوت باشد؛ اما فعالیت ضدمیکروبی بره‌موم جمع‌آوری‌شده از نواحی مختلف، بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی تأثیر بیشتری دارد[۲و۱].

بره‌موم خام به‌دلیل داشتن آلاینده‌های زیاد و حلالیت کم در آب، برای استفاده در صنایع غذایی مناسب نیست. بنابراین، بره‌موم باید با عصاره‌گیری تصفیه شود؛ برای این منظور می‌توان از حلال‌های مختلفی از جمله اتانول، آب و گلیسرول استفاده کرد. عصاره بره‌موم حاصل از اتانول بسیار مناسب است؛ چرا که موم بسیار کمی دارد و غنی از ترکیبات فعال زیستی است، هرچند ممکن است عصاره به‌دست‌آمده، بو و طعم الکل را داشته باشد که برای برخی از مصرف‌کنندگان مناسب نیست. عصاره بره‌موم بدون بو از راه فراوری با رزین تبادل یونی به دست می‌آید که میزان ترکیبات معطر را کاهش می‌دهد. اطلاعات کمی در مورد عصاره آبی بره‌موم در دسترس است؛ با این حال، هزینهٔ کم این روش و نبودن اتانول در ترکیب شیمیایی عصاره از برتری‌های آن به حساب می‌آید. از کاستی‌های عصاره‌گیری با آب، عطر و طعم شدید بره‌موم و ترکیبات فنلی کمتر آن در مقایسه با عصاره الکلی (حدود ۱۰ برابر کمتر) است؛ زیرا این ترکیبات حلالیت کمتری در آب دارند. یک جایگزین برای حلال‌های ذکرشده، یک مجموعه حلال غیر اتانولی بر پایهٔ پلی‌اتیلن گلایکول است که در مقایسه با عصاره آبی ترکیبات فعال بیشتری دارد[۲].

به نظر می‌رسد که بره‌موم به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی در برابر گسترهٔ وسیعی از میکروب‌ها و بدون مقاوم‌شدن میکروب‌ها به آن دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی بالایی است؛ لذا در تحقیق پیش رو، علاوه بر ویژگی‌های فیزیکی (میزان رطوبت، رنگ، کدورت و درجهٔ بریکس) و شیمیایی (خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تجزیهٔ GC-MS)، خاصیت ضدمیکروبی عصاره الکلی بره‌موم جمع‌آوری‌شده از زنبورداری‌های اطراف شهرستان ممقان، بررسی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

در مطالعهٔ حاضر بره‌موم از زنبورداری‌های اطراف شهرستان ممقان جمع‌آوری شد. باکتری *اشریشیا کولای*[1] PTCC-1162، *سالمونلا انتریتیدیس*[2] PTCC-1709، *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] PTCC-1764 و مخمر *کاندیدا آلبیکنز*[4] PTCC-5059 از بانک میکروبی ایران، تهران تهیه و برای عصاره‌گیری از اتانول ۹۶٪ (شرکت دکتر مجللی) استفاده شد.

۲-۲ روش‌ها

۲-۲-۱ تهیهٔ عصاره الکلی بره‌موم

پس از خریداری بره‌موم، قطعات بزرگ آن به قطعات کوچکتر خرد شد، سپس عصاره‌گیری انجام گرفت؛ این‌گونه که ۲۰ گرم از قطعات ریز بره‌موم با ۱۰۰میلی‌لیتر محلول اتانول ۹۶٪ مخلوط و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق در سطح افق تکان داده شد (۱۵۰ دور در دقیقه). سپس عصاره از کاغذ صافی عبور داده و ۲ بار صاف شد. در

1. Escherichia Coli
2. Salmonella Enteritidis
3. Staphylococcus Aureus
4. Candidia Albicans

آخر با استفاده از دستگاه روتاری (Stuart, RE300) الکل آن تبخیر شد و عصاره الکلی خالص به دست آمد. سپس عصاره توزین و در ظرف تیره در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگه داشته شد[۳].

۲-۲-۲ تجزیه‌های فیزیکی و شیمیایی بره‌موم

با توجه به گوناگونی بره‌موم‌های موجود در کشور ایران و ترکیب‌درصد متفاوت مواد تشکیل‌دهندهٔ آن‌ها، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن‌ها بسیار متفاوت است؛ لذا در تحقیق حاضر، ابتدا ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بره‌موم مورد استفاده ارزیابی شد تا در ادامه خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گونهٔ خاص بره‌موم با ویژگی‌های مشخص ارزیابی شود.

۲-۲-۲-۱ اندازه‌گیری میزان رطوبت نمونه

دو نمونه ابتدا توزین شد، سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در آون ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت و پس از آن دوباره وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و میزان رطوبت نمونه از رابطهٔ (۱) به دست آمد[۴و۲].

(۱) ۱۰۰×وزن اولیه/ وزن ثانویه- وزن اولیه

۲-۲-۲-۲ بررسی میزان رنگ، کدورت و درجهٔ بریکس نمونه

با استفاده از دستگاه طیف‌نورسنج (PG، T80+، کشور چین) جذب محلول در طول موج‌های ۴۰۰ و ۶۲۵ نانومتر به‌ترتیب برای رنگ و کدورت اندازه‌گیری شد. رنگ نمونه با استفاده از رابطهٔ (۲) به‌صورت واحد کمیسیون بین المللی روش‌های یکنواخت تجزیه و تحلیل قند (ICUMSA)[1] حساب شد[۵].

(۲) ICUMSA = b × c / ۱۰۰۰× جذب

که در آن b اندازهٔ طول مسیر نور به سانتی‌متر و c درجهٔ بریکس نمونه است. درجهٔ بریکس با استفاده از رفراکتومتر اندازه‌گیری شد.

۲-۲-۲-۳ بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی

۳ میلی‌لیتر از نمونه در ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولیک ۱ میلی‌مولار DPPH مخلوط و با استفاده از ورتکس تکان داده شد و در هم آمیخت. سپس در اتاق تاریک در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه، سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و با رابطهٔ ۳ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن به دست آمد[۶].

۱۰۰ × جذب محلول DPPH /(جذب نمونه)-(جذب محلول DPPH)

(۳)

۲-۲-۲-۴ تجزیهٔ GC-MS

در این مطالعه از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Varian ،Saturn 2200، کشور هلند) استفاده شد؛ ستون موئینهٔ استفاده‌شده دارای قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و طول ۳۰ متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر است. دمای اولیهٔ دستگاه ۴۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه تنظیم شد و در نهایت به ۲۵۰ درجهٔ سلسیوس رسید. هم‌چنین از گاز هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان حامل استفاده شد[۸و۷].

۲-۲-۳ تجزیه‌های میکروبی

۲-۲-۳-۱ خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی

برای تعیین خاصیت ضدباکتریایی عصاره بره‌موم به‌روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[2] برای سه باکتری *سالمونلا اینتریتیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای* و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* عمل شد. لازم به ذکر است که حلال مورد استفاده برای عصاره‌گیری یعنی اتانول ۹۶٪، به‌عنوان نمونهٔ کنترل انتخاب شد. با کنترل شرایط استریل در تمامی گوده‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به‌غیر از گودهٔ اول، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث (مرک، آلمان) ریخته شد. در گودهٔ اول و دوم ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده ریخته، سپس از گودهٔ دوم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به گودهٔ سوم ریخته، از گودهٔ سوم به گودهٔ چهارم ریخته شد و تا گودهٔ نهم ادامه یافت؛ در نهایت از گودهٔ نهم ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر از کدورت نیمه مک فارلند ($1/5\times10^8$) رقت ۱/۱۰۰ تهیه و به تمامی گوده‌ها به غیر از گودهٔ ۱۰،۱۱ و ۱۲ به‌میزان ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. از معرف رنگی رزازورین[3] به‌مقدار ۲۰ میکرولیتر به تمامی گوده‌ها اضافه شد، سپس انکوباسیون به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ

1. International Commission for Uniform Methods of Analysis

2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
3. Resazurin

سلسیوس انجام گرفت. در گودهٔ ۱۰ برای کنترل باکتری، محیط کشت، باکتری و معرف رنگی؛ در گودهٔ ۱۱ برای کنترل محیط کشت، فقط محیط کشت و معرف رنگی و در گودهٔ ۱۲ برای کنترل عصاره، محیط کشت و عصاره و معرف رنگی اضافه شد. هم‌چنین اتانول ۹۶٪ به‌عنوان شاهد حلال عصاره نیز آزمایش شد. پس از قرائت نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی، مرحلهٔ تعیین حداقل غلظت کشندگی[1] به‌روش زیر انجام می‌گیرد. از تمامی گوده‌ها به‌وسیلهٔ آنس نمونه برداشته و در سطح محیط کشت مغزی عمومی به‌صورت نقطه‌ای کشت داده می‌شود. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشد باکتری بررسی می‌شود. هر کدام از نقاط کشت که رشد باکتری منفی باشد آن رقت نتیجهٔ حداقل غلظت کشندگی است[۹و۱].

۲-۲-۴ تجزیهٔ آماری

تمامی آزمایش‌های فیزیکی، شیمیایی و ضدمیکروبی سه بار تکرار شدند و از تجزیهٔ واریانس با سطح اطمینان ۹۵٪ ($p<$ ۰/۰۵) برای مقایسهٔ میانگین داده‌های نرم‌افزار مینی‌تب استفاده شد.

۳. بحث و نتایج

۳-۱ ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بره‌موم

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بره‌موم متأثر از ترکیبات شیمیایی آن و منطقهٔ جغرافیایی است. نتایج تجزیه‌های مختلف عصاره بره‌موم در جدول (۱) آورده شده است. میزان رطوبت بره‌موم خام ۷/۹۳٪ به دست آمده است. درصد رطوبت بره‌موم به شرایط نگهداری و دستکاری آن بستگی دارد که باید مورد توجه قرار گیرد. در این مطالعه میزان رطوبت نمونهٔ بره‌موم اندازه گرفته شد و مادهٔ خشک آن ۹۲/۰۷٪ به دست آمد. در مطالعه‌ای که یو ون چن[2] و همکاران[۱] انجام دادند مادهٔ خشک بره‌موم ۹۵٪ و ۹۹/۵٪ شده است که با غلظت اتانول در طول عصاره‌گیری ارتباط خطی دارد. هم‌چنین ایلدنزی بی اس کانها[3] و همکاران[۱۰] گزارش کردند که مادهٔ خشک نمونه‌های بره‌موم از ۹۰٪ تا ۹۵٪ متغیر است.

نتایج بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بره‌موم در جدول (۱) آورده شده است. میزان جذب محلول DPPH در ۵۱۷ نانومتر،۰/۹۱۵ است. همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، خاصیت

1. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
2. Yue-Wen Chen
3. Ildenzie B. S. Cunha

جدول ۱. تجزیهٔ عصاره بره‌موم.

Table 1. Propolis extract characteristics.

Results	Variables
72.17	Color (ICUSMA)
1.316	Turbidity (a.u.)
25.3	(˚Bx) Brix
92.75	Antioxidant activity (%)

آنتی اکسیدانی عصاره الکلی بره‌موم ۹۲/۷۵٪ است. بره‌موم به‌دلیل ترکیباتی مانند فلاوونوئیدها و نرولیدول دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. نتایج حاصل از مطالعهٔ Hatami و همکاران[۱۱] نشان داد که عصاره هیدروالکلی بره‌موم تولیدشده دارای کدورت، بریکس، pH و خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ۲/۲۳۵ (درصد جذب)، ۳/۲ (˚Bx)، ۴/۱ و ۸۵/۸٪ به‌ترتیب است.

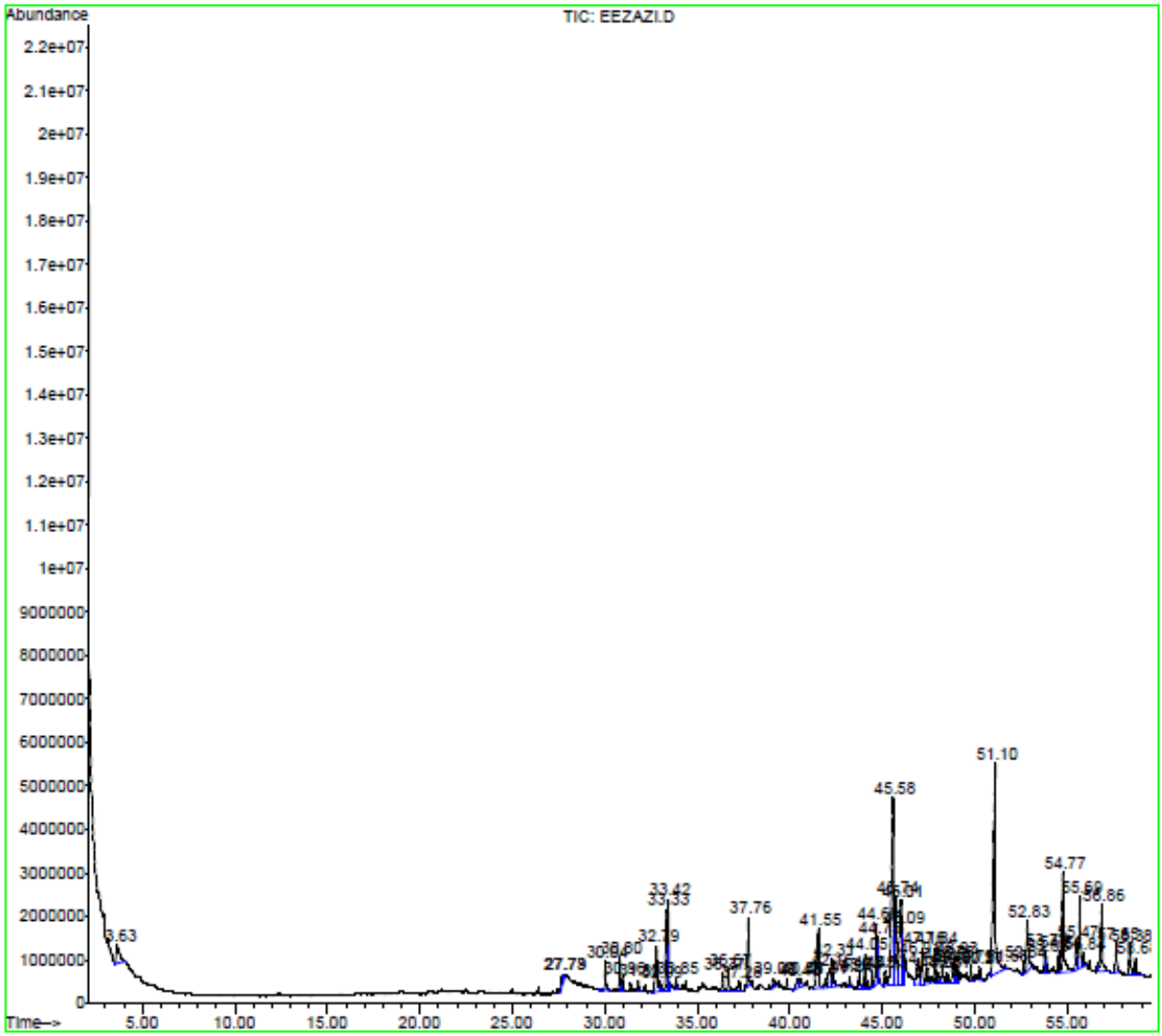
تجزیهٔ GC-MS روش مناسبی برای تجزیهٔ ترکیبات فرار بره‌موم به‌دلیل حساسیت آن است[۹]. کروماتوگرام GC-MS عصاره بره‌موم در شکل (۱) نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که ۶۱ ترکیب فعال زیستی در طول ۶۰ دقیقه زمان آزمایش وجود دارد. ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره بره‌موم شامل اسیدهای چرب (لوریک اسید، میریستیک اسید، سینامیک اسید، پامیتیک اسید، مارگاریک اسید و اولئیک اسید)، فلاوونوئیدها (چالکون، فلاوون، استول و کرومانون) نرولیدول، اودسمول، اکتادکانون و نونادسن است. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود، چالکون اصلی‌ترین ترکیب فعال موجود در عصاره بره‌موم است، که بیشترین ارتفاع پیک را در زمان ۵۱/۱۰ دقیقه داشته و دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدالتهابی است. نرولیدول دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی است. سینامیک اسید در بیوسنتز محصولات طبیعی مانند فلاوونوئیدها، ایزوفلاوونوئیدها، کومارین و کاتچین به‌عنوان یک واسطهٔ اصلی عمل می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده در راستای نتایج گزارش شدهٔ قوی‌دل[4] و همکاران[۱۲] است. ایشان گزارش دادند که چالکون‌ها که از دستهٔ فلاوونوئیدها هستند؛ مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ عصاره بره‌موم هستند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بره‌موم به‌دلیل وجود این ترکیبات است.

4. Ghavidel

جدول ۲. ترکیبات عصاره الکلی بره‌موم با استفاده از GC-MS.

Table 2. Main components of the propolis hydroalcoholic extract based on GC-MS.

Bioactive compound	Peak Number	Retention time	Area
Ethanol	1	3.6	0.01
Nerolidol	5	30.8	0.89
Lauric acid	6	30.96	0.48
Odesmol	8	32.80	2.1
Valencene	9	33.0	0.44
Beta Odesmol	10	33.32	2.92
Alpha Odesmol	11	33.42	2.56
Myristic acid	13	36.37	0.63
4-methyl,6,7,8,9 Tetrahydronaphthalene	15	37.28	0.42
2,3,4- Diphenyldimethoxysilane	17	39.08	0.46
Cinnamic acid	18	40.43	0.46
Palmitic acid	20	41.54	3.98
Margaric acid	25	43.74	0.61
Octadensol	26	44.05	0.88
2-Nonadecanon	28	44.67	2.2
Acetone	31	45.58	10.92
Oleic acid	32	45.74	4.71
2,2 Dimethyl-3,4 Di Hydro	33	46.01	5.52
Pentacosanone	35	46.91	1.45
Nonadsene	45	49.79	0.42
Alpha Chalcone	47	51.1	14.1
Chalcone	48	51.65	0.06
4-Choromanone	50	52.82	2.62
Flavones	54	54.77	5.51
3-methyl-but-2-acid enoic	58	56.85	3.23



شکل ۱. کروماتوگرام GC-MS عصاره بره‌موم.

Figure 1. GC-MS chromatogram of propolis extract

۳-۲ خاصیت ضدمیکروبی عصاره بره‌موم

طبق تعریف، حداقل غلظت مهارکنندگی، کمترین غلظتی از نمونهٔ بره‌موم است که بتواند از رشد باکتری مورد آزمایش جلوگیری کند (غلظت آخرین چاهکی که در آن هیچ کدورتی دیده نمی‌شود). حداقل غلظت کشندگی نیز حداقل غلظتی از نمونهٔ بره‌موم است که باکتری مورد نظر را از بین می‌برد و هیچ باکتری در آن غلظت نمی‌تواند رشد کند. نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در جدول (۳) آورده شده است. در مورد باکتری‌های *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره الکلی بره‌موم به‌ترتیب ۴۰، ۱۰، ۴۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی به‌ترتیب ۴۰، ۱۰، ۸۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. حداقل غلظت مهارکنندگی نمونهٔ کنترل (اتانول ۹۶٪) روی باکتری *اشریشیا کولای* ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است در حالی‌که حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی آن روی باکتری‌های *سالمونلا اینتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است. با مقایسهٔ نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ نمونهٔ بره‌موم و نمونهٔ کنترل، نتیجه گرفته می‌شود که اتانول در خاصیت ضدمیکروبی عصاره

هیچ نقشی نداشته است؛ چرا که عصاره بره‌موم در غلظت‌های پایین نیز خاصیت ضدمیکروبی دارد. هم‌چنین لازم به ذکر است که پس از انجام عصاره‌گیری، با استفاده ازدستگاه روتاری، اتانول از عصاره جداسازی شده بود. نتایج نشانگر این است که حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کولای* و *سالمونلا انتریتیدیس* نسبت به عصاره بره‌موم بیشتر است که این یافتهٔ ما با مطالعه‌ای که موتیور و همکاران دربارهٔ خاصیت ضدباکتریایی بره‌موم و عسل داشتند، مطابقت دارد. طبق گزارش Chen و همکاران[۸]، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره ارگانیک بره‌موم برای استافیلوکوکوس اورئوس به‌ترتیب (µg/ml) ۲۰-۱۰ و (µg/ml) ۲۰ است؛ در حالی‌که عصاره آبی از رشد این باکتری جلوگیری نکرده است. عصاره اتانولی، متانولی و دی اتیل اتر و عصاره آبی هیچ اثر ضدباکتریایی بر باکتری *اشریشیا کولای* ندارد. در مطالعه‌ای که خسروی و همکاران[۹] در مورد فعالیت ضدباکتریایی عصاره الکلی بره‌موم داشتند، حداقل غلظت کشندگی روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (mg/ml) ۰/۶۵۶ است.

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره الکلی بره‌موم برای باکتری‌های *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* و مخمر *کاندیدا آلبیکنز*.

Table 3. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the propolis hydroalcoholic extract against *Escherichia coli, Salmonella enterica, Staphylococcus aureus and Candida albicans.*

Material	Bacteria	Concentration of the extract (µg/mL) / Test	640	320	160	80	40	40	10	5	2.5	Bacterial control	Environmental control	Extract control
propolis extract	*Escherichia coli*	MIC	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–
		MBC	–	–	–	–	+	+	+	+	+			
	Salmonella enterica	MIC	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–
		MBC	–	–	–	–	–	–	+	+	+			
	Staphylococcus aureus	MIC	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–
		MBC	–	–	–	–	–	–	–	+	+			
	Candida albicans	MIC	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–
		MBC	–	–	–	–	–	–	–	–	+			
Ethanol 96%	*Escherichia coli*	MIC	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–
		MBC	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
	Salmonella enterica	MIC	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–
		MBC	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–
	Staphylococcus aureus	MIC	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–
		MBC	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–

۴. نتیجه‌گیری کلی

در مطالعهٔ حاضر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و ضدمیکروبی نمونهٔ بره‌موم ارزیابی شد. بر اساس نتایج می‌توان گفت که نمونهٔ بره‌موم یک ترکیب با خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی است که می‌توان در صنایع غذایی و دارویی و غیره از آن استفاده کرد. خواص بره‌موم متأثر از ترکیبات آن مانند فلاوونوئیدها (چالکون و فلاوون) است که دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند. عصاره الکلی مورد مطالعه خاصیت ضدمیکروبی بیشتری روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* در مقایسه با باکتری‌های *سالمونلا انتریتیدیس* و *اشریشیا کولای* دارد.

مراجع

[1] Chen, -Y. W., Ye, -S. R., Ting, Ch., Yu, -Y. H., "Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis", Journal of Food and Drug Analysis, 26, pp. 761-768, (2018).

[2] Pobiega, K., Kraśniewska, K., Gniewosz, M., "Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review", Trends in Food Science & Technology, 83, pp. 53-62, (2019).

[3] Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., Savoia, D., "In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes", Letters in applied microbiology, Vol. 31, No. 2, pp. 174-177, (2000).

[4] Yang, Ch., Luo, L., Zhang, H., Yang, X., Yu Lva, Y., Song, H., "Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China", Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, pp. 1268-1282, (2010).

[5] Ahmadi, O., Jafarizadeh-Malmiri, H., Jodeiri, N., "Eco-friendly microwave-enhanced green synthesis of silver nanoparticles using Aloe vera leaf extract and their physico-chemical and antibacterial studies", Green Processing and Synthesis, Vol. 7, No. 3, pp. 231-240, (2018).

[6] Abdullah, N. A., Ja'afar, F., Yasin, H. M., Taha, H., Petalcorin M. I. R., Mamit M. H., Kusrini, E., Usman, A., "Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee Heterotrigona itama found in Brunei Darussalam", Heliyon, 5, (2019).

[7] Ownagh A, Tukmechi A, Adibhesam M, "Ebrahimzadeh S. Comparative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi", Studies in Medical Sciences, 21 (3), pp. 21 (3), 206-214, In Persian (2021).

[8] Cheng, H., Qin, Z. H., Guo, X. F., Hu, X. S., Wu, J. H., "Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis", Food Research International, Vol. 51, pp. 813-822, (2013).

[9] Hosravi, N., Darvishi, S., Davari, K., Antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of Kurdistan propolis on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientifict* Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 20 (6), pp.97-106, In Persion (2016).

[10] Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, F. M., Mario T. Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., Povia, G. S., Carvalho, P. O., "Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts", Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol. 15, pp. 964-970, (2004).

[11] Hatami, R., Javadi, A., Jafarizade-Malmiri, H., "Effectiveness of six different methods in green synthesis of selenium nanoparticles using propolis extract: Screening and characterization", Green Processing and Synthesis, Vol. 9, pp. 685-692, (2020).

[12] Ghavidel, F., Javadi, A., Jafarizade-Malmiri, H., "New approach in process intensification based on subcritical water, as green solvent, in propolis oil in water nanoemulsion preparation", Green Processing and Synthesis, Vol. 10, pp. 208-218, (2021).

[13] Khodabakhshi, D., Eskandarinia, A., Kefayat, A., Rafienia, M., Navid, S., Karbasi, S., Moshtaghian, J., "In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 178, pp. 177-184, (2019).

[14] Ramón-Sierra, J., Peraza-López, E., Rodríguez-Borges, R., Yam-Puc, A., Madera-Santana, T., Ortiz-Vázquez, E., "Partial characterization of ethanolic extract of Melipona beecheii propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity", Brazilian Journal of Pharmacognosy, Vol. 29, No. 3, pp. 319-324, (2019).

[15] Hadžić, V., Jerković Mujkić, A., Husejnagić, D., Bačić, A., "Antibacterial activity of various oils and ethanol extract propolis against gram positive and gram negative bacteria", International Journal of Advanced Research, Vol, 7. No. 10, pp. 141-147, (2019).

[16] Escriche, I., Juan-Borrás, M., "Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis", Food Research International, Vol. 106, pp. 834-841, (2018).

[17] Afrouzan, H., Tahghighi, A., Zakeri, S., Es-haghi, A., "Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis", Iranian Biomedical Journal, Vol. 22, pp. 50-65, (2018).

[18] Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., Rosalen, P. L., "Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against Candida spp", Journal de Mycologie Medical, Vol. 26, pp.122-132, (2016).

[19] Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., "Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis", Food Hydrocolloids, Vol. 61, pp. 695-702, (2016).