بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های اتانولی میوه دو واریته بلوط بر باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذائی با روش میکرودایلوشن

مریم قادری قهفرخی[a*]، علیرضا صادقی ماهونک[b]، مهران اعلمی[b]، مرتضی خمیری[c]، سمانه ممشلو[d]

[a] دانشجوی دکتری تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
[b] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[c] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[d] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Archive of SID

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۰

چکیده

مقدمه: درخت بلوط (کوئرکوس) جنس گیاهی غالب در مناطق مرکزی و شمالی ایران است. میوه این گیاه غنی از ترکیبات فنولی به ویژه گالیک اسید و تانن می‌باشد. هدف از این تحقیق شناسائی ترکیبات فنولی و ارزیابی خواص ضد میکروبی و ضد رادیکالی عصاره اتانولی میوه دو واریته بلوط به نام‌های *Quercus branti var. persica* و *Quercus castaneifolia* var. *castaneifolia* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از جدا کردن پوسته داخلی و پودر کردن میوه‌ها، عصاره با استفاده از اتانول (۷۰٪) تهیه شد. مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با اسپکتروفتومتر تعیین گردید. جهت ارزیابی فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌ها از رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. شناسائی ترکیبات فنولی عصاره‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا مجهز به دتکتور دیود اری صورت گرفت. به منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها بر روی ۳ باکتری گرم مثبت و ۵ باکتری گرم منفی از روش میکرو براث دایلوشن استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی در عصاره واریته کاستانیفولیا بیشتر از پرسیکا بود. هر دو عصاره فعالیت ضدرادیکالی بالائی داشته و با BHA و BHT قابل رقابت بودند. گالیک، کلروژنیک و کافئیک اسید در هر دو عصاره وجود داشتند اما وانیلین تنها در عصاره واریته کاستانیفولیا تشخیص داده شد. هر دو عصاره در مقابل تمامی باکتری‌های مورد بررسی اثر مهار کنندگی و کشندگی قابل‌قبولی داشتند. میزان MBC عصاره واریته کاستانیفولیا و پرسیکا به ترتیب در محدوده غلظت ۵-۰/۶۲۵ و ۵- ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی میوه بلوط غنی از ترکیبات فنولی بوده و دارای ویژگی‌های ضدرادیکالی و ضدمیکروبی قابل‌توجهی می‌باشد.

واژه های کلیدی: *اثر ضد میکروبی، ترکیبات فنولی، خواص ضد رادیکالی، میوه بلوط*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mghaderi_gh@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر عصاره‌های گیاهی به عنوان منابع با ارزشی از ترکیبات طبیعی به شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند و حجم عمده تحقیقات صورت گرفته در زمینه صنایع غذائی بر پایه ترکیبات سلامتی زا و نیز نگهدارنده‌های طبیعی متمرکز است. این ترکیبات جهت استفاده گسترده در درمان بسیاری از بیماری‌ها و نیز محافظت از مواد غذایی در مقابل فرآیندهای اکسیداسیون استخراج می‌گردند. امروزه با افزایش جمعیت و محدودیت منابع غذایی تهیه غذای کامل و سالم یکی از مشکلات اساسی به ویژه در کشورهای در حال توسعه قلمداد می‌شود. تامین سلامت و افزایش کیفیت مواد غذایی علاوه بر کاهش ضایعات، سلامت مصرف‌کننده را نیز به دنبال خواهد داشت. در این میان باکتری‌ها علاوه بر اینکه به عنوان عوامل فساد مواد غذایی مطرح می‌باشند، عامل بسیاری از بیماری‌ها و مسمومیت‌های غذایی نیز به شمار می‌آیند. از جمله راه‌های مبارزه با این میکروارگانیسم‌ها استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و مواد ممانعت کننده از رشد آنها می‌باشد. استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی با عوارض جانبی، تولید متابولیت های ثانویه مضر و افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها همراه خواهد بود. با این تفاسیر لزوم توجه به روش‌های جدید نگهداری بیش از پیش روشن می‌گردد (مهدی زاده و رضوی روحانی، ۱۳۸۷). آنتی اکسیدان‌ها نیز نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد و شکستن واکنش‌های زنجیری اکسیداسیون دارند. مهار واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذایی، داروئی، آرایشی و بهداشتی و جلوگیری از بروز بیماری‌های مرتبط به استرس‌های اکسیداتیو، برخی از عملکردهای مفید آنتی اکسیدان‌ها به شمار می‌آیند (Moure *et al.*, 2001). کاربرد آنتی اکسیدان‌های سنتزی نظیر بوتیلات هیدروکسی آنیزول(BHA)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) و پروپیل گالات در حین فرآوری مواد غذائی منجر به بروز آثار جانبی نامطلوبی می‌گردد که از آن جمله می‌توان به سرطان زائی و بزرگ شدن کبد اشاره کرد. در نتیجه این محدودیت‌ها امروزه یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که قادر به مهار واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد، کند کردن روند تند شدن اکسیداتیو روغن‌ها و محافظت از بدن انسان در مقابل بیماری‌ها می‌گردند، از اهمیت زیادی برخوردار است (Ebrahimabadi *et al.*, 2010). عصاره های گیاهی حاوی ترکیبات آلی مختلفی هستند که می توانند در تولید محصولات غذایی و دارویی مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از این ترکیبات، ترکیبات فنولی می‌باشند. ترکیبات فنولی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه بوده و از مسیر شیکیمات[1] و متابولیسم فنیل‌پروپانوئید مشتق شده‌اند. فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به اثبات رسیده است (Rayan & Robards, 1998). این ترکیبات با چندین مکانیسم مختلف، از اکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری می‌کنند. مهم‌ترین عملکردهای این ترکیبات در ارتباط با اکسیداسیون، غیر فعال‌کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی می‌باشند. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند. رادیکال‌های فنوکسیل تشکیل شده ترکیبات نسبتاً پایداری می‌باشند، بنابراین واکنش‌های زنجیره‌ای جدید به راحتی آغاز نمی‌شوند. هم‌چنین این رادیکال‌ها از طریق واکنش با سایر رادیکال‌ها، می‌توانند سرعت مرحله انتشار را کاهش دهند (Manach *et al.*, 2004).

یکی از جنس‌های گیاهی عمده در مناطق شمالی و مرکزی ایران جنس *Quercus* (بلوط) می‌باشد که از ۴۵ گونه مختلف تشکیل شده است. گونه غالب جنگل‌های بلوط در مناطق غربی و مرکزی گونه برانتی (*Q.branti*) و در مناطق شمالی گونه کاستانیفولیا (*Q.castaneifolia*) می‌باشد. میوه گونه برانتی از قدیم الایام توسط مردم مناطق روستائی جهت پخت نان مورد استفاده قرار می‌گرفته است (مسعودی نژاد و رضازاده آذری، ۱۳۸۲). این میوه (Acorn) غنی از کربوهیدرات، چربی و استرول‌های مختلف می‌باشد. علاوه بر ترکیبات تغذیه ای، این میوه سرشار از ترکیبات فعال بیولوژیکی است. حضوراین ترکیبات نظیر اسید گالیک، تانن، اسید الاجیک و مشتقات آنها باعث شده است که به این میوه جهت تهیه غذاهای فرا سودمند، توجه ویژه‌ای مبذول گردد (Rakic *et al.*, 2007).

در منابع علمی خواص درمانی بسیاری برای قسمت‌های مختلف درخت بلوط نظیر برگ، پوست ساقه‌های جوان، پوست تنه و گل‌های آن اشاره شده است که از آن جمله

[1] - shikimate

Archive of SID

www.SID.ir

می‌توان به خواص ضدعفونی کنندگی میوه بلوط و خاصیت ضد اسهالی پوسته میوه اشاره کرد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸). علی رغم پوشش انبوه جنگل‌های بلوط در مناطق مختلف کشور، مطالعات اندکی در زمینه فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف میوه این درخت به ویژه علیه باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی صورت گرفته است. لذا هدف از این تحقیق، بررسی خواص ضد رادیکالی، ضد میکروبی و تعیین ترکیبات فنولی عصاره اتانولی میوه دو واریته بلوط ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- آماده سازی نمونه‌ها و تهیه عصاره

در این تحقیق از میوه دو واریته بلوط استفاده شد. واریته *Q. branti var. persica* از جنگل‌های بلوط استان چهارمحال و بختیاری و واریته *Q var. castaneifolia* از جنگل قرق واقع در شرق شهرستان گرگان جمع آوری گردیدند. *castaneifolia*. پس از خشک کردن میوه ها در دمای محیط و جدا کردن پوست‌های چوبی و داخلی، توسط آسیاب چکشی (ایران خودساز) به صورت آرد (تا مش ۶۰) در آمدند. جهت تهیه عصاره فنولی از حلال اتانول ۷۰٪ (حجمی: حجمی) استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰ گرم پودر افزوده و مخلوط حاصله به مدت ۴ ساعت در دمای محیط با همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از این مرحله، بخش جامد به وسیله کاغذ صافی معمولی جدا گردید و عمل استخراج با حلال تازه مانند قبل تکرار گردید. عصاره‌های حاصل از دو مرحله با یکدیگر ادغام گردیدند و به وسیله تبخیر کننده چرخان (مدل Laborata 4000، ساخت کمپانی هایدولف) در دمای ۴۰°C تغلیظ و در نهایت عصاره‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (Operun- FDB550 ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰°C- به پودر تبدیل شدند و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸°C- قرار گرفتند (Liu & Yao, 2007). جهت سهولت در بیان نتایج، عصاره متانولی واریته کاستانیفولیا و پرسیکا به ترتیب با علائم Q.c و Q.b بیان می‌شوند. تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش با درجه خلوص بالا و از شرکت های مرک و سیگما تهیه شدند.

- اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو (Slinkard & Singelton, 1977) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین میزان ترکیبات فلاونوئیدی نیز از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد (Chung *et al.*, 2002).

- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH [1]

برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت‌های مختلف (۱۲/۵-۲۰۰ µg/ml) از عصاره‌ها و نیز آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHT و BHA در حلال متانول آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۱ میلی مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول (۱) محاسبه گردید.

فرمول (۱)

$$\text{به دام اندازی رادیکال آزاد (٪)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند. EC_{50} به غلظتی از عصاره گفته می‌شود که در آن، ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط مهار شوند (Yildirim *et al.*, 2001).

- تعیین نوع ترکیبات فنولی عصاره‌ها با روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا [2]

به منظور تعیین نوع ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا استفاده شد. مشخصات دستگاه به شرح زیر بود:

مدل دستگاه: مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰، دتکتور: دیود اری (Diode array) هیتاچی ال- ۲۴۵۰، آون ستون : هیتاچی ال- ۲۳۰۰ و نوع ستون: آر پی- ۱۸ [3] با ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر و اندازه‌ی ذرات ۵ میکرومتر فاز متحرک مورد استفاده در این بررسی شامل آب دیونیزه :

[1] - 2, 2`- diphenyl 1-2- picryl hydrazyl [2] - High Performance Liquid Chromatography [3] - Reverse Phase – 18

Archive of SID
www.SID.ir

استو نیتریل: اسید استیک با نسبت ۸۹ : ۱۰ : ۱ (حجمی: حجمی)، سرعت جریان فاز متحرک در ستون ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه، سیستم مورد استفاده ایزو کراتیک[1] و دمای ستون ۲۵°C بود. جهت شناسائی نوع ترکیبات فنولی از استانداردهای گالیک اسید، فرولیک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، سیرینجیک اسید و *p*- کوماریک اسید استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰ میلی گرم از هر عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰٪ حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت. سپس محلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. جهت جلوگیری از ورود ناخالصی‌های احتمالی موجود در عصاره‌ها به ستون، محلول‌های عصاره با فیلترهای سرنگی با اندازه‌ی منافذ ۰/۲ میکرومتر صاف و در نهایت از محلول خروجی از صافی ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید (Arabshahi, 2006).

- تهیه سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم مثبت شامل *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1015)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 1885)، *میکروکوکوس لوتئوس* (ATCC 7984) و باکتری‌های گرم منفی شامل *اشرشیاکلی* (+Esbl)، *سالمونلا تیفی موریوم* (PTCC 1639)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188)، *یرسینیا انتروکولیتیکا* (PTCC 1151) و *سیترو باکتر فروندی* (ATCC 24580) بودند. سوش‌های خالص این باکتری‌ها از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهران خریداری شد.

- تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC)[2]

حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره‌های متانولی دو واریته با استفاده از روش رقت سازی در چاهک (میکروبراث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. محلول استوک عصاره در دی متیل سولفوکساید تهیه گردید و غلظت‌های مختلف عصاره (از ۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی لیتر) با رقیق سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. باکتری‌ها به مدت یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش، در دمای ۳۷°C روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی (10^6 cfu/ml) از رقت ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. بعد از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد و بعد از طی این دوره میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترومنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. اولین خانه‌ای که در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. آزمایشات در ۳ تکرار و ۳ زمان مختلف انجام شد (NCCLS, 2000).

- حداقل غلظت کشندگی (MBC)[3]

از خانه‌هائی که در آنها کدورتی مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر به محیط کشت جامد (مولر هینتون آگار) منتقل و یک شب در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) می باشد (Oroojalian *et al.*, 2010).

- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش تیمارها در سه تکرار انجام شده و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<0/05$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. همبستگی میان مقدار ترکیبات فنولی کل و ترکیبات فلاونوئیدی با نرم افزار Excel محاسبه گردید.

یافته‌ها

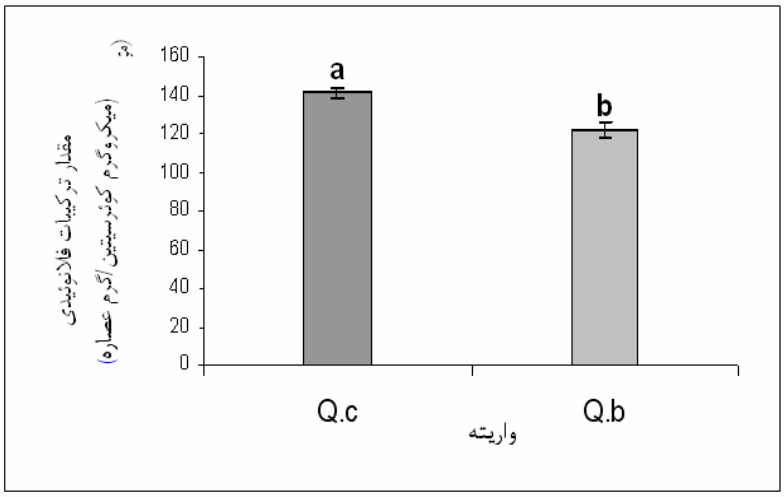
- مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ها

مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌های اتانولی دو واریته بلوط به ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی داری ($P< 0/05$) بین عصاره‌ها از نظر این دو ویژگی وجود دارد. مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره اتانولی Q.c به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از واریته دیگر بود.

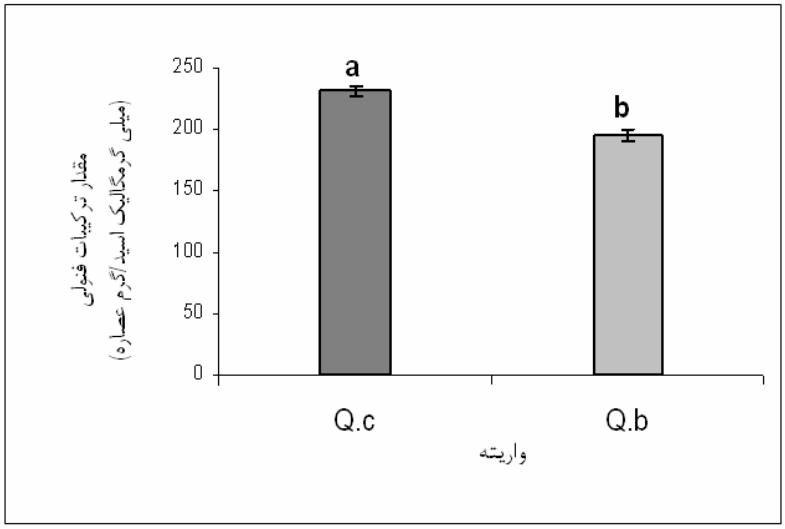
[1] – Isocratic
[2] - Minimum Inhibitory Concentration
[3] - Minimum Bactericidal Concentration

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱- مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های اتانولی دو واریته بلوط



نمودار ۲- مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های اتانولی دو واریته بلوط

نمودار ۳-مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی میوه دو واریته بلوط و آنتی اکسیدان‌های سنتزی

حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

www.SID.ir

- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH

نمودار ۳ میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی دو واریته و آنتی اکسیدان‌های سنتزی را نشان می‌دهد. در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، آنتی اکسیدان سنتری BHT قدرت مهار کنندگی بیشتری نسبت به عصاره‌های اتانولی و BHA داشت اما اختلاف معنی‌داری بین عصاره Q.c و BHA مشاهده نشد. علاوه بر این BHA در تمامی غلظت‌ها از نظر توانائی مهار رادیکال‌های آزاد نسبت به BHT و عصاره‌ها ضعیف‌تر بود ($P<۰/۰۵$). در غلظت‌های بالاتر از ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتانولی Q.c بیشترین فعالیت ضد رادیکالی را نشان داد، هرچند در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اختلاف معنی‌داری با BHT نداشت ($P<۰/۰۵$).

اگرچه در غلظت‌های پائین (۷۵-۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) توانائی عصاره Q.b در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH کمتر از BHT بود اما در غلظت‌های بالاتر اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). به استثنای BHA اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ضد رادیکالی هر آنتی اکسیدان در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر وجود نداشت. این نتایج نشان داد که یک غلظت بحرانی از ترکیبات فنولی برای مهار رادیکال‌های آزاد کافی است. احتمالاً در غلظت‌های بالاتر به دلیل پیدایش نوعی حالت اشباع شدگی، افزایش غلظت تاثیر معنی‌داری روی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ندارد. معمولاً برای مقایسه فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50}[1] استفاده می‌شود. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضد رادیکالی بیشتری دارد. در این بررسی نیز مقادیر EC_{50} برای تمامی عصاره‌های تعیین و با آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT مقایسه گردید (جدول ۱).

همانطور که در جدول ۱ نشان داده می‌شود، کمترین و بیشترین مقدار EC_{50} متعلق به عصاره اتانولی واریته Q.c و آنتی اکسیدان سنتزی BHA می‌باشد ($P<۰/۰۵$) و اختلاف معنی‌داری از این نظر بین عصاره Q.b و BHT وجود نداشت ($P<۰/۰۵$).

- تعیین نوع ترکیبات فنولی عصاره‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا

ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها با مقایسه زمان بازداری پیک‌های نمونه با زمان بازداری پیک‌های مربوط به استانداردهای اسیدهای فنولی تعیین گردید. نمودار ۴ کروماتوگرام مربوط به استانداردهای ترکیبات فنولی و جدول ۲ نوع ترکیبات فنولی هر عصاره را نشان می‌دهد.

همانطور که در جدول ۲ دیده می‌شود، اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید کافئیک در عصاره هر دو واریته وجود داشتند. گالیک اسید از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدهای فنولی بوده و در ساختار خود دارای ۳ گروه هیدروکسیل می‌باشد و به دلیل قطبیت بالا زودتر از سایر ترکیبات از ستون خارج می‌شود.

علاوه بر اسید گالیک، اسید سیرینجیک نیز از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسیدهای فنولی محسوب می‌شود که در ساختار خود دارای ۲ گروه متوکسیل و یک گروه هیدروکسیل می‌باشد. وانیلین یا ۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدهید تنها در عصاره‌های اتانولی واریته‌ی کاستانیفولیا به صورت یک پیک کوچک تشخیص داده شد و عصاره واریته برانتی فاقد این ترکیب بود.

مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید دسته دیگری از اسیدهای فنولی موجود در گیاهان می‌باشند که تفاوت آنها با مشتقات بنزوئیک اسید حضور یک گروه کربوکسیل در ساختار آنها است. اسید p- کوماریک ، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و اسید فرولیک در این گروه قرار دارند. اسید کافئیک در ساختار خود دارای دو گروه هیدروکسیل است و از استری شدن آن با کوئینیک اسید، کلروژنیک اسید حاصل می‌گردد (Stalikas, 2007). حضور اسید کلروژنیک و اسید کافئیک در عصاره‌های مورد بررسی تشخیص داده شد.

[1] - Effective concentration

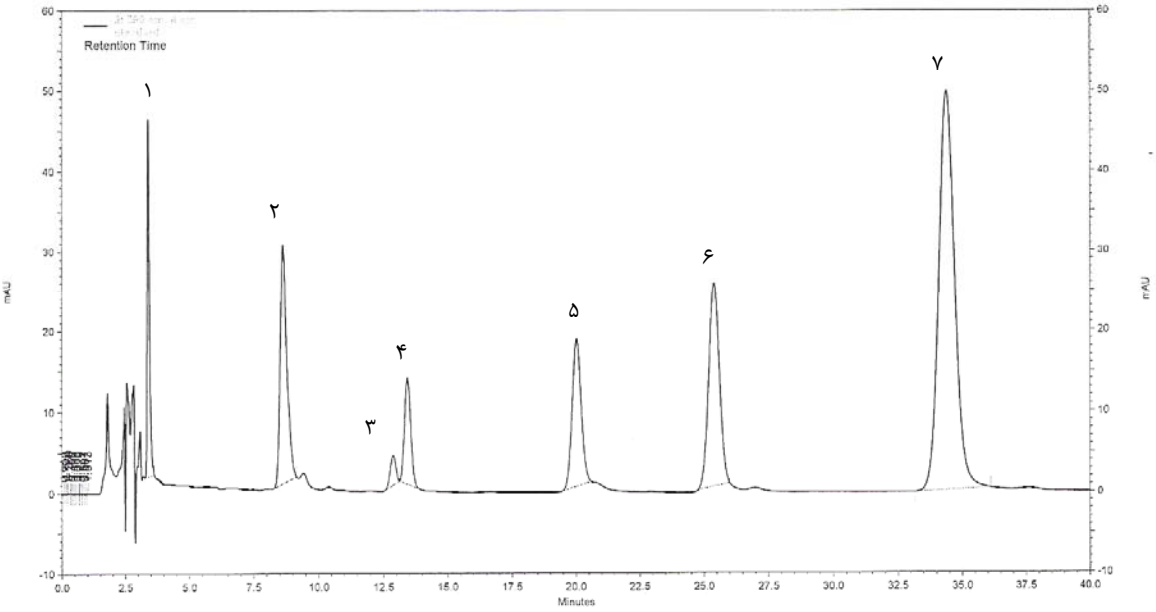
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه میانگین مقادیر EC50 (میکروگرم عصاره در میلی‌لیتر) برای عصاره‌های اتانولی دو واریته بلوط، BHA و BHT

عصاره	واریته		آنتی اکسیدان سنتزی	
	کاستانیفولیا	برانتی	BHA	BHT
EC_{50}	۲۵/۰۸ c	۴۵/۵۸ b	۸۹/۴۶ a	۴۱/۷۳ b

حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.



نمودار ۴- کروماتوگرام مربوط به استانداردهای ترکیبات فنولی

۱ : گالیک اسید، ۲: کلروژنیک اسید، ۳: کافئیک اسید، ۴: فرولیک اسید، ۵: وانیلین، ۶: سیرینجیک اسید، ۷: p- کوماریک اسید.

جدول ۲- نوع ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های متانولی دو واریته بلوط

نوع ترکیب فنولی	زمان بازداری استانداردها (دقیقه)	واریته	
		Q.c	Q.b
گالیک اسید	۳/۴۰۷	+ (۳/۳۱۳)	+ (۳/۲۷۳)
کلروژنیک اسید	۸/۶۲۰	+ (۸/۹۲۰)	+ (۸/۸۵۳)
کافئیک اسید	۱۲/۸۸۰	+ (۱۲/۷۲۷)	+ (۱۲/۶۷)
فرولیک اسید	۱۳/۱۷۳	–	–
وانیلین	۲۰/۰۲۰	+ (۲۰/۰۴۰)	–
سیرینجیک اسید	۲۵/۳۸۷	–	–
P- کوماریک اسید	۳۴/۳۸۷	–	–

علامت + و – به ترتیب نشان دهنده حضور و عدم حضور ترکیبات فنولی در عصاره‌ها می‌باشد.
اعداد درون پرانتز بیانگر زمان بازداری پیک‌های موجود در کروماتوگرام عصاره‌ها می‌باشد.

Archive
www.SID.ir

- فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی دو واریته بر تعدادی از باکتری‌های عامل فساد مواد غذائی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دو شکل MIC و MBC در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. میزان MIC و MBC عصاره‌های Q.c و Q.b به ترتیب در محدوده غلظت ۵- ۰/۶۲۵ و ۵- ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر متغیر بود. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، از بین باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* حساس‌ترین باکتری مورد بررسی بوده و پس از آن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* قرار گرفتند. همچنین عصاره Q.c در غلظت‌های پائین‌تری نسبت به Q.b اثر بازدارندگی بر باکتری‌های گرم مثبت اعمال نمود ($P<0/05$). حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های Q.c و Q.b برای *یرسینیا انتروکولیتیکا* ۲/۵ و ۱/۲۵ بود. هر دو عصاره تنها در غلظت‌های بالا (۵ میلی گرم در میلی‌لیتر) توانستند باکتری‌های گرم منفی *شیگلا دیسانتری* و *اشرشیا کلی* را مهار نمایند. *سالمونلا تیفی* و *سیتروباکتر فروندی* فر نیز در حضور عصاره Q.c حساسیت بیشتری از خود نشان دادند ($P<0/05$).

بین مقادیر حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره Q.b برای باکتری‌های گرم مثبت تفاوتی دیده نشد. به عنوان مثال غلظت ۱/۲۵ این عصاره بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم اثر مهارکنندگی و هم اثر کشندگی داشت. این حالت در مورد اثر کشندگی عصاره Q.c بر باکتری‌های *میکروکوکوس لوتئوس* و *باسیلوس سرئوس* نیز مشاهده گردید اما جهت اعمال اثر باکتریوسیدی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به غلظت‌های بالاتری از این عصاره نیاز بود (۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر). حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های Q.c و Q.b برای باکتری‌های گرم منفی سیتروباکتر *فروندی*، *شیگلا دیسانتری*، *سالمونلا تیفی* و *اشرشیا کلی*، ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بود. در مورد *یرسینیا انتروکولیتیکا*، عصاره Q.b در غلظت پائین‌تر اثر کشندگی بیشتری نسبت به Q.c داشت ($P<0/05$). احتمالاً این باکتری به ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره Q.b حساسیت بیشتری داشته است.

بحث

عوامل‌متعددی‌مقدار ترکیبات فنولی‌موجود در بافت های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی و آب و هوائی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد (Faller & Fialho, 2009).

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) (میلی گرم/میلی لیتر) عصاره‌های اتانولی میوه دو واریته بلوط

باکتری	شماره باکتری	نوع باکتری (+/-)	واریته	
			Q.c	Q.b
باسیلوس سرئوس	PTCC 1015	+	۰/۶۲۵	۱/۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	ATCC 1885	+	۱/۲۵	۲/۵
میکروکوکوس لوتئوس	ATCC 79840	+	۲/۵	۵
اشرشیا کلی	Esbl+	-	۵	۵
سالمونلا تیفی	PTCC 1639	-	۵	۲/۵
یرسینیا انتروکولیتیکا	PTCC 1151	-	۲/۵	۱/۲۵
شیگلا دیسانتری	PTCC 1188	-	۵	۵
سیتروباکتر فروندی	ATCC 24580	-	۵	۲/۵

Archive of SID

www.SID.ir

مقدار ترکیبات فنولی کل و تانن عصاره متانولی میوه بلوط گونه *کوئرکوس روبور* به ترتیب ۰/۲۲۳ و ۰/۲۰۴ و برای گونه *کوئرکوس سوبور* ۰/۲۲۹ و ۰/۲۱۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در میلی‌گرم عصاره بود (Racik *et al.*, 2007).

مقدار ترکیبات فنولی کل برای عصاره آبی واریته‌های Q.c و Q.b به ترتیب ۱۴۲/۱۸ و ۷۹/۲۸ و برای عصاره متانولی (۸۰٪) ۲۱۷/۶۵ و ۱۸۳/۹۶ میلی‌گرم تانیک اسید در گرم عصاره پودر شده گزارش شد (قادری قهفرخی، ۱۳۸۸). تفاوت‌های مشاهده شده بین مقادیر ترکیبات فنولی به دست آمده در این پژوهش با تحقیق فوق را می‌توان به تفاوت در نوع حلال، درجه قطبیت آن، روش استخراج و نحوه آماده سازی نمونه‌ها نسبت داد. در بررسی دیگری ترکیبات فنولی ۴ واریته مختلف سیب زمینی به وسیله حلال متانول استخراج و مقدار ترکیبات فنولی در واریته‌های بنگوتا، ایگورتا، گانزا و ۱۲۵۴۱۱,۲۲ به ترتیب ۵۰، ۴۷/۴، ۳۹/۱ و ۳۴/۴٪ گزارش شد. تفاوت‌های مشاهده شده بین واریته‌های مختلف سیب زمینی را به تفاوت در فاکتورهای ژنتیکی و شرایط محیطی نظیر دسترسی به آب، نور و دما نسبت داده شد (Rumbaoa *et al.*, 2009). بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره اتانولی (۵۰٪) برگ ۵ گونه مختلف دارچین نیز اختلاف قابل ملاحظه‌ای مشاهده گردید و این میزان از ۶۹۴/۴ تا ۲۷۰۸/۷ میکروگرم گالیک اسید در گرم عصاره متغیر بود. تفاوت‌های مشاهده شده بین گونه‌های مختلف به فاکتورهای ژنتیکی و شرایط محل برداشت نسبت داده شد چرا که هر دو عامل می‌توانند میزان و نوع ترکیبات فنولی را تحت تاثیر قرار دهند (Nagendra Prasad *et al.*, 2009). در کل برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از بافت‌های گیاهی می‌توان از حلال‌های مختلف و روش‌های متعددی استفاده کرد. حلالیت ترکیبات فنولی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و بر هم کنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. در کل حلال‌های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (۸۰-۴۰٪) توانائی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنولی از بافت‌های گیاهی دارند (Suzuki *et al.*, 2002).

فلاونوئیدها یکی از گسترده ترین و متنوع ترین گروه از ترکیبات فیتوشیمیائی گیاهی می‌باشند. این ترکیبات از طیف وسیعی از فعالیت‌های فیتوشیمیائی و بیولوژیکی برخوردارند که از آن جمله می توان به ویژگی‌های مهار رادیکال‌های آزاد اشاره کرد (Nagendra-Prasad *et al.*, 2009). با در نظر گرفتن معادله خط استاندارد کوئرسیتین (R^2=۰/۹۹۸)، مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره اتانولی دو واریته بلوط از ۱۴۱/۰۷ برای Q.c تا ۱۲۱/۷۶ میکروگرم معادل کوئرسیتین در هر گرم عصاره اتانولی متغیر بود. هم چنین هم بستگی بالائی بین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ها مشاهده شد (R^2 = ۰/۹۳ ، P<۰/۰۱). مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره آبی بخش‌های مختلف گیاه شاه بلوط (گل، برگ، پوسته خارجی، پوسته داخلی و میوه) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، میوه شاه بلوط حاوی کمترین مقدار (۲/۳ میلی گرم کاتکین/گرم عصاره) و پوسته بیرونی آن حاوی بیشترین میزان (۵۰۳ میلی‌گرم کاتکین/گرم عصاره) این ترکیبات بود.

جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی (MBC) (میلی گرم/میلی لیتر) عصاره‌های اتانولی میوه دو واریته بلوط

باکتری	شماره باکتری	نوع باکتری (+/-)	واریته	
			Q.c	Q.b
باسیلوس سرئوس	PTCC 1015	+	۰/۶۲۵	۱۲/۵
استافیلوکوکوس اورئوس	ATCC 1885	+	۲/۵	۲/۵
میکروکوکوس لوتئوس	ATCC 79840	+	۲/۵	۵
اشرشیا کلی	Esbl+	-	۵	۵
سالمونلا تیفی	PTCC 1639	-	۵	۵
یرسینیا انتروکولیتیکا	PTCC 1151	-	۵	۲/۵
شیگلا دیسانتری	PTCC 1188	-	۵	۵
سیتروباکتر فروندی	ATCC 24580	-	۵	۵

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های است که به طور وسیعی در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب قادر است با ترکیبات اهدا کننده هیدروژن به راحتی واکنش دهد (Singh & Singh, 2008). مهار رادیکال‌های آزاد یکی از شناخته شده ترین مکانیسم‌هائی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار نمایند. در کل افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانائی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999). هم بستگی بالائی بین توانائی به دام اندازی رادیکال‌های آزاد با میزان ترکیبات فنولی میوه‌ها، غلات، سیزیجات و نوشیدنی‌ها گزارش شده است (Arabshahi & Urooj, 2007) تفاوت‌های مشاهده شده بین EC_{50} عصاره‌های مختلف در این تحقیق را می‌توان به تفاوت در مقادیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آنها نسبت داد. در بررسی انجام شده روی گونه‌های کریس و روبور مقادیر EC_{50} برای دو واریته به ترتیب ۸/۸۸ و ۸/۰۴ میکرو گرم در میلی‌لیتر بود. هم چنین قدرت رادیکال زدائی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت (Rakic *et al.*, 2007). در بررسی انجام شده روی تعدادی از میوه‌های مناطق گرمسیری نیز ارتباط بین مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی تائید شد (Alothman *et al.*, 2009). در بررسی انجام شده روی گیاه رازیانه مقدار ترکیبات فنولی عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی بود و از نظر توانائی مهار رادیکال‌ها آزاد، مقدار EC_{50} مربوط به BHA< آلفاتوکوفرول< BHT < عصاره اتانولی< عصاره آبی بود (Oktay *et al.*, 2003). در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف جلبک دریائی دوتی[1] (*Kappaphycus alvarezii*) مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های اتانولی و متانولی به ترتیب ۳/۰۳ و ۴/۷۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد که از مقادیر به دست آمده برای آنتی اکسیدان سنتزی BHT (۲/۸۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیشتر بود. از آن جا که میزان ترکیبات فنولی نیز در عصاره اتانولی بیشتر از متانولی بود، محققین گزارش کردند ارتباط مثبتی بین میزان مهار رادیکال‌های آزاد با مقدار ترکیبات فنولی کل وجود دارد (Suresh-Kumar *et al.*, 2008).

هر دو عصاره مورد بررسی در اکثر غلظت‌های توانستند روی پاتوژنها اثرات ضد میکروبی داشتند و در این بین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود. باکتری‌های گرم منفی علاوه بر پپتیدوگلیکان، یک لایه دیگر به نام غشای خارجی در دیواره سلولی خود دارند. سطح هیدروفیلی این غشا که غنی از مولکول های لیپوپلی ساکاریدی می باشد به عنوان مانع در برابر آنتی بیوتیک ها عمل می‌کند. همچنین آنزیم های موجود در فضای پری‌پلاسمایی، قادرند مولکول‌های ورودی از بیرون را بشکنند. در مورد باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضدمیکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و در نتیجه انعقاد آن می‌شوند (Duffy & Power, 2001). با توجه به موارد گفته شده علت MBC بالاتر در مورد باکتری‌های گرم منفی نسبت به انواع مثبت توجیه می‌شود.

در زمینه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های میوه بلوط با روش الایزا هیچ بررسی در منابع علمی یافت نشد و بیشتر بررسی‌های انجام شده با روش دیسک دیفوزیون و بر روی قسمت‌های دیگری از درخت بلوط صورت گرفته بود. فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی (۵۰٪) میوه بلوط با روش انتشار دیسک ارزیابی و با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج مقایسه شد. نتایج نشان داد که اثر عصاره‌ها بر روی باکتری‌ها وابسته به غلظت بوده است. در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها نیز غلظت mg/ml ۷۵ عصاره‌ها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مشابه جنتامایسین بوده است. این اثر بر روی باکتری اشرشیاکلی کمتر از جنتامایسین و کانامایسین و بیشتر از توبرامایسین بوده است (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸). فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی پوسته خارجی میوه بلوط (*Q.branti*) بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی با روش دیسک دیفوزیون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، تاثیر عصاره روی

[1]- Doty

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *سودوموناس میرابیلیس* قابل ملاحظه و وابسته به غلظت بوده، اما تاثیر چندانی روی باکتری *شیگلا فلکسنری* نداشته است. فعالیت ضدمیکروبی پوسته بلوط را به حضور ترکیبات تاننی در آن نسبت داده شد (Khosravi & Behzadi, 2008). فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و استونی پوست *Q.infectoria* بر روی تعدادی از باکتری‌هامورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین یاکتری بود در حال‌که عصاره‌ها هیچ گونه اثری روی *اشرشیاکلی* نداشتند. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها در مقابل *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* ضعیف بود (Basri & Fan, 2004). به هر حال مقایسه نتایج حاصل از مطالعات مختلف پیچیده به نظر می رسد چرا که نتایج با فاکتورهائی نظیر دما، زمان انکوباسیون، pH محیط و نوع محیط کشت، فاز رشد میکروارگانیسم و حجم محیط کشت مورد استفاده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. همچنین، ترکیب شیمیایی، نوع و مکانیسم عمل ترکیبات فنولی هر یک از عصاره‌ها از عوامل مؤثر در ایجاد اختلاف نتایج در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها می‌باشند (Wen *et al.*, 2003).

یکی از فاکتورهای مهم و تعیین کننده فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی، ساختار شیمیائی آنها می‌باشد. توانائی اهداء الکترون یا هیدروژن، تشکیل کمپلکس با فلزات و فعالیت ضد رادیکالی این ترکیبات با تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک و موقعیت قرار گرفتن آنها مرتبط است. علاوه بر این حضور سایر گروه‌ها نظیر استیل و متوکسیل و موقعیت آنها نسبت به گروه‌های هیدروکسیل نیز عامل مهمی است که در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی است باید به آن توجه نمود (Sroka & Cisowski, 2003). اسید گالیک با دارا بودن ۳ گروه هیدروکسیل فعالیت آنتی اکسیدانی بالائی از خود نشان می‌دهد. در کل، فعالیت آنتی اکسیدانی هیدروکسی سینامیک اسیدها نسبت به هیدروکسی بنزوئیک‌ها بیشتر است. استری شدن کافئیک اسید با کوئینیک اسید از قدرت آنتی اکسیدانی و توانائی مهار رادیکال‌های آزاد هیدروپراکسید و DPPH آن می‌کاهد. قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر کافئیک اسید با حضور دو گروه هیدروکسیل در ساختار آن مرتبط است (Anderasen *et al.*, 2001). نتایج به دست آمده در آنالیز ترکیبات فنولی عصاره‌ها، فعالیت ضد رادیکالی بالای عصاره‌ها را تائید می‌نماید. اکثر تحقیقات در این زمینه بیشتر به اندازه‌گیری و تعیین درصد تانن این میوه محدود شده‌اند. در بررسی انجام شده توسط مسعودی نژاد و رضازاده آذری (۱۳۸۲) میزان تانن ده گونه‌ی بلوط ایران را اندازه گیری شد که از ۳/۲ تا ۷/۵٪ متغیر بود.

در زمینه شناسائی ترکیبات فنولی میوه بلوط، ۳۲ ترکیب مختلف در میوه بلوط گونه‌های سوبور، روتوندیفولیا و آیلکس شناسائی شد. ترکیبات فنولی میوه‌های آیلکس و روتوندیفولیا بیشتر از نوع مشتقات گالیک اسید بودند اما در میوه گونه سوبور این ترکیبات عمدتاً به صورت مخلوط پیچیده‌ای از استرهای الاجیک اسید حضور داشتند (Cantos *et al.*, 2003).

فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به اثبات رسیده است. مکانیسم‌هائی که به واسطه آن ترکیبات فنولی برای میکروارگانیسم‌ها سمیت ایجاد می‌کنند شامل جذب سطحی و شکستن غشای سلول، واکنش با آنزیم‌ها و کاهش یون‌های فلزی مورد نیاز باکتری‌ها می‌باشد (Majhenic *et al.*, 2007). تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل فاکتور کلیدی در فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی به شمار می‌آید. با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل، فعالیت میکروبی افزایش می‌یابد. فعالیت‌های ضد میکروبی فلاونوئیدها در نتیجه توانائی تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد و بنابراین از این طریق از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کنند. ترکیبات فنولی از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا بر هم کنش‌های غیر اختصاصی با پروتئین‌ها، از فعالیت آنزیمی جلوگیری به عمل آورده و بدین ترتیب فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند (Cowan, 1999).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و نیز توانائی به دام اندازی رادیکال‌های آزاد برای عصاره اتانولی Q.c بیشتر از Q.b بود. در بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌ها نیز، عصاره اتانولی Q.c در غلظت‌های پائین‌تر اثر مهارکنندگی و باکتریوسیدی

Archive of SID
www.SID.ir

بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت اعمال نمود اما در مورد باکتری‌های گرم منفی تاثیر عصاره Q.b چشمگیرتر بود. از آنجائی که امروزه عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به شدت مورد توجه قرار گرفته اند، لذا عصاره‌های میوه بلوط می‌توانند به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های متداول مورد توجه قرار بگیرند. به هر حال مطالعات بیشتری در زمینه شناسائی ترکیبات موثره میوه بلوط و نیز کاربرد عصاره‌های مختلف آن در سامانه‌های غذائی باید صورت گیرد.

با توجه به توزیع گسترده جنگل‌های بلوط در مناطق مختلف کشور و تولید سالانه هزاران تن از این میوه با ارزش در این مناطق، اثیات ویژگی‌های مفید این میوه علاوه بر اینکه از هدر رفتن آن جلوگیری می‌نماید، بلکه اهمیت حفظ و حراست از این منابع گیاهی با ارزش را بیش از پیش روشن می‌گرداند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گرگان که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

ابراهیمی، ا.، خیامی، م. و نجاتی، و. (۱۳۸۸). ارزیابی فعالیت ضد باکتریائی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط ایرانی در روش انتشار دیسک، فصلنامه گیاهان داروئی، شماره ۳۳، صفحات ۳۴-۲۶.

قادری، م. (۱۳۸۸). بررسی ویژگی‌های شیمیائی، آنتی اکسیدانی و تاثیر فرآیندهای مختلف بر میزان ترکیبات فنولی دو گونه بلوط ایرانی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم و صنایع غذائی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۶۰ ص.

مسعودی‌نژاد، م. ر. و رضازاده آذری، م. (۱۳۸۲). مقایسه چهار روش استخراج تانن از میوه‌های گونه‌های مختلف بلوط ایران. مجله پژوهشی حکیم، دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۹۱-۸۱.

مهدی زاده، ت. و رضوی روحانی، س، م. (۱۳۸۷). بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره روغن های اسانسی سه نوع پیاز مختلف بر روی باکتری های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشیرشیاکلی*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۵ (۲).

Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry, 115, 785–788.

Andreasen, M. F., Landbo, A. K., Christensen, L. P., Hansen, A. & Meyer, A. S. (2001). Antioxidant effects of phenolic rye (Secale cereale L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4090-4096.

Arabshahi, D. S. (2006). Studies on selected plant extracts with reference to their nutritional and pharmacological characteristics. PhD Thesis of Food Science and Nutrition, Department of Studies in Food Science and Nutrition, University of Mysore, Mysore India.

Arabshahi, D. S. & Urooj, A. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. Food Chemistry, 102, 1233-1240.

Basri, D. F. & Fan, S. H. (2004). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. Indian Journal of Pharmacology, 73, 26-29.

Cantos, E., Espn, J. C., Lpez-Bote, C., Hoz, H., Ordez, J. A. & Toms-Barbern, F. A. (2003). Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (*Quercus spp*.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 51, 6248-6255.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food & Drug Analaysis, *10*, 178-182.

Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Review, 12, 564-582.

Duffy, C. F. & Power, R. F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of

Archive of SID

www.SID.ir

some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents, 17, 527-529.

Ebrahimabadi, A. H., Ebrahimabadi, E. H., Jafari-Bidgoli, Z., Jookar Kashi, F., Mazoochi, A., Faller, A. L. K. & Fialho, E. (2009). The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Research nternational, 42, 210-215.

Khosravi, A. D. & Behzadi, A. (2006). Evaluation of The Antibacterial Activity of The Seed Hull of *Quercus Branti* on some Gram Negative Bacteria. Pakistanian Journal of Medicine Science, 22, 429 - 32.

Liu, Q. & Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry, 102, 732-737.

Majhenic, L., Skerget, M. & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, 104, 1258–1268.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. American Journal of clinical nutrition, 79, 727-747.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J. & Dominguez, H. (2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72, 145–171.

Nagendra-Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H. & Jiang, Y. (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 627-632.

National committee for clinical laboratory standards. (2000). Methods for dilution antimicrobia susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard Pennsylvania, Wayne, M7-A5, 5 th ed.

Oroojalian, F., Kermanshahi., K., Azizi, M. & 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, 765–770.

Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D. & Siler-Marinkovic, S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemistry, 104, 830-834.

Rumbaoa, R. G. O., Cornago, D. F. & Geronimo, I. M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Journal of Food Composition and Analysis, 22, 546-550.

Ryan, D. & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. Journal of Analyst, 123, 1-14.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32, 407–412.

Singh, S. & Singh, R. P. (2008). In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. Food Reviews International, 24, 392-415.

Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology & Viticulture, 28, 49-55.

Sroka, Z. & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food & Chemical Toxicology, 41, 753-758.

Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science, 30, 3268-3295.

Suresh-Kumar, K., Ganesan, K. & Subba-Rao, P. V. (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty- An edible seaweed P.V. Food Chemistry, 107, 289-295.

Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y. & Tsuji, K.

Archive of SID

www.SID.ir

(2002). An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 49, 507-511.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. & Toivonen, P. (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids. Food Microbiology, 56, 305–311.

Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4083-4089.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Antimicrobial Activity of the Ethanolic Extracts from Q.branti and Q.castaneifolia Fruit Against Some Food-borne Pathogens by Microdilution Method

M. Ghaderi Ghahfarokhi [a*], A. Sadeghi Mahoonak [b], M. Alami [b], M. Khomeiri [c], S. Mamashloo [d]

[a] Ph. D Student of Food Technology, Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

[b] Assistant Professor of the Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

[c] Associate Professor of the Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

[d] M. Sc. Student of Food Science & Technology, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received :26 December 2010 Accepted: 30 January 2011

Archive of SID

Abstract

Introduction: Oak tree (Quercus) is a predominant plant genus in northern and central regions of Iran. Acorn fruit is a good source of phenolic compounds especially gallic acid and tannin. This study was designed to determine the phenolic compounds and evaluate the antiradical and antibacterial activities of ethanolic extracts from *Q.branti* var. persica and *Q.castaneifolia var.castaneifolia* fruit.

Materials and Methods: After removal of internal husk and grounding the fruit, the ethanolic (70%) extracts were prepared according to re-extraction method. Polyphenol and flavonoid contents were measured spectrophotometrically. Antiradical activity was evaluated against DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals. Phenolic compounds were determind by the application of HPLC system equipped with a diode array detector. The antibacterial effects of the extracts were assessed on three gram positive and five gram negative bacteria by micro broth dilution technique using ELISA reader.

Results: Total phenolic and flavonoid contents of ethanolic extract of castaneifolia variety were significantly higher than that of the extract of persica variety. The two extracts showed good antiradical activities that were comparable to BHA and BHT. Gallic, caffeic and cholorogenic acids were found in the two extracts while vanillin was detected only in extract of *castaneifolia* variety. The extracts showed good inhibitory and bactericidal effects against all investigated bacteria. The ranges of minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were 0.615-5 and 1.25-5 mg/ml for *castaneifolia* and *persica* respectively.

Conclusion: This study suggested that ethanolic extract of acorn fruit can be used potentially as a source of natural antioxidants and antimicrobial.

Keywords: *Acorn Fruit, Antimicrobial Effect, Antiradical Activity, Phenolic Compound.*

* Corresponding Author: mghaderi_gh@yahoo.com

www.SID.ir