Archive of SID

مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

ارزیابی فعالیت شیمیایی و اثر ضدقارچی اسانس پنج انگشت بر *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* و *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* عامل کپک‌زدگی میوه پرتقال

مصطفی رحمتی جنیدآباد[*1]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۱۰/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۷

کلمات کلیدی:

پرتقال، کپک‌زدگی،

اسانس،

گیاه پنج انگشت،

فعالیت ضد اکسایشی،

اثر ضدقارچی.

DOI: 10.29252/fsct.18.05.07

* مسئول مکاتبات:

Rahmati@asnrukh.ac.ir

چکیده

اسانس‌های گیاهی بطور گسترده‌ای بعنوان نگهدارنده طبیعی جهت کاهش سمیت قارچ‌کش‌های شیمیایی و آلودگی زیست‌محیطی بکار می‌روند. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت بر کپک‌های *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* و *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* عامل کپک‌زدگی میوه پرتقال انجام گرفت. اسانس گیاه پنج انگشت با کمک روش تقطیر با آب استخراج گردید و راندمان استخراج اسانس ۰/۹۵ درصد وزنی/وزنی بود. محتوای فنول و فلاوونوئید کل اسانس نیز بررسی شد و نتایج نشان داد که اسانس غنی از ترکیبات فنولی (۹۱/۷٤ mg GAE/g) و فلاوونوئیدی (۵۲/۳۲ mg QE/g) می‌باشد. بررسی فعالیت ضد اکسایشی اسانس پنج انگشت نشان داد که این ترکیب زیست فعال بطور مؤثری قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (IC_{50} = ٤۸/٦۲ µg/mL) و ABTS (IC_{50} = ٤۰/۵۰ µg/mL) می‌باشد. فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت در برابر کپک‌های *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* و *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، انتشار چاهک در آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی/کشندگی بررسی شد و *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* نسبت به اسانس حساس‌تر بود و غلظت پایین‌تری از این ترکیب زیست فعال قادر به جلوگیری از رشد و یا از بین بردن این کپک بود. بطور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه پنج انگشت غنی از ترکیبات زیست فعال با قابلیت ضد اکسایشی و ضدقارچ قابل‌توجهی می‌باشد و می‌توان این ترکیب را بعنوان نگهدارنده طبیعی جهت افزایش عمر انبارمانی محصولات غذایی بکار برد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

۱- مقدمه

ایران بعنوان یکی از مهم‌ترین تولیدکنندگان مرکبات در جهان شناخته می‌شود؛ بطوریکه با سطح زیر کشت حدود ۲٤۰ هزار هکتار و ٤ میلیون تن در سال، جایگاه نهم از نظر سطح زیر کشت و جایگاه هفتم از نظر تولید در بین کشورهای جهان را دارد [۱]. در کشور ایران، مرکبات رتبه دوم تولید را پس از میوه سیب دارا می‌باشند و در بین مرکبات تولید شده، میوه پرتقال مقام اول را دارا است [۲]. با اینحال، فساد در اثر رشد قارچ‌های پاتوژن و کاهش کیفیت ظاهری و وزن در اثر تعرق و تبخیر آب، از مسائل عمده در انبارداری مرکبات بشمار می‌روند. بنابراین، روش‌هایی که قادر به کنترل و کاهش عوامل فوق باشند، بطور مؤثری بعنوان جایگزین روش‌های شیمیایی جهت افزایش عمر انبارمانی مرکبات بکار برده می‌شوند. بیماری‌های پس از برداشت مرکبات طی برداشت، جابجایی، بسته‌بندی و نگهداری این محصولات رخ می‌دهند و گزارش شده است که کپک‌های سبز[1] (*پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم*) و آبی[2] (*پنی‌سیلیوم ایتالیکوم*) مسئول اصلی فساد پس از برداشت و ضایعات اقتصادی مرکبات می‌باشند و ۹۰ درصد ضایعات مربوط به کپک سبز است [۲].

در حال حاضر، استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی و سنتزی مانند ایمازالیل و تیابندازول بعنوان آسان‌ترین و ارزان‌ترین روش مدیریت و کنترل بیماری‌های پس از برداشت مرکبات، بویژه کپک‌های سبز و آبی، در نظر گرفته می‌شود. با اینحال، لازم به ذکر است که نگرانی در مورد اثر این قارچ‌کش‌های شیمیایی بر محیط‌زیست، ایجاد مسمومیت در انسان و ظهور گونه‌های قارچی مقاوم، سبب افزایش تقاضا برای جستجوی محصولات ارگانیک و سبز با میزان کمتر آفتکش‌ها شده است [۳]. بنابراین ضروری است که روش‌های جایگزین مواد شیمیایی مانند استفاده از ترکیبات طبیعی با فعالیت ضدقارچی بالقوه که آلودگی زیست‌محیطی به‌مراتب کمتری دارند و سبب حفظ و بهبود سلامت جامعه می‌شوند، بیشتر موردتوجه قرار گیرند. اسانس‌های گیاهی از جمله عوامل زیست فعالی بشمار می‌روند که قابلیت استفاده بعنوان روش‌های غیرشیمیایی جهت کاهش ضایعات مرکبات و بهبود زمان انبارداری این محصولات باغی و سایر محصولات غذایی را دارا می‌باشند [۷-٤]. بطور مثال، در مطالعه‌ی گلشن تفتی و برادران (۱۳۹۸) مشخص گردید که اسانس زیره سبز (غلظت ۵ درصد) و آویشن شیرازی (غلظت‌های ۱-۵ درصد) در کنترل کپک‌های سبز و آبی میوه پرتقال (نگهداری شده در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ماه) مؤثر بودند و اختلاف معنی‌داری با قارچ‌کش تیابندازول (غلظت ۲ در هزار) نشان ندادند [۲].

گیاه پنج انگشت، با نام علمی *Vitex agnus-castus*، گیاهی تزئینی با برگ‌های پنجه‌ای و پنج‌تایی است که در بسیاری از مناطق ایران رشد کرده و به اسم فلفل بیابانی نیز شناخته می‌شود. این گیاه دارای ترکیبات زیست فعال متعددی از قبیل ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی می‌باشد. از مهم‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه پنج انگشت می‌توان به لیمونن، سینئول، سابینن، آلفا/بتا پینن، میرسن، کاستین، سیمن، لینالول، ایندول، سیترونلول، کامفن، کادینن و فارنزن اشاره نمود. کاستی سین، اورینتین و ایزوویتکسین از جمله ترکیبات فلاوونوئیدی گیاه پنج انگشت بشمار می‌روند [۸]. این گیاه دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی مانند اثرات ضد سرطانی، ضدمیکروبی و ضد اکسایشی می‌باشد [۹]. در این راستا، ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد اکسایشی اسانس و عصاره میوه گیاه پنج انگشت توسط ساریکورکسو[3] و همکاران (۲۰۰۹) بررسی شده است. نتایج این محققین نشان داد که اسانس گیاه شامل سینوئل (۲٤/۹۸ درصد)، سابینن (۱۳/٤۵ درصد)، آلفا-پینن (۱۰/٦۰ درصد)، آلفا-ترپینیل استات (٦/٦٦ درصد) و فارنسن (۵/٤۰ درصد) بود و عصاره آبی بیشترین ویژگی ضد اکسایشی و ترکیبات فنولی را دارا بود. علاوه بر این، همبستگی مثبتی بین میزان ترکیبات فنولی/فلاوونوئیدی و ظرفیت ضد اکسایشی عصاره مشاهده گردید [۱۰]. در مطالعه‌ای دیگر، مشخص گردید که اسانس گیاه پنج انگشت فعالیت ضدقارچی بالایی در برابر گونه‌های مختلف قارچ کاندیدا نشان داد و حداقل غلظت بازدارندگی اسانس در محدوده ۰/۱۳ تا ۲/۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود [۱۱].

با توجه به ویژگی ضدقارچی قابل‌توجه اسانس گیاه پنج انگشت، این مطالعه با هدف استخراج اسانس این گیاه و بررسی کارایی آن بعنوان عامل ضدقارچ طبیعی جهت جلوگیری از رشد کپک‌های سبز و آبی میوه پرتقال صورت

1. *Penicillium digitatum*
2. *Penicillium italicum*
3. Sarikurkcu

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

گرفت. همچنین، محتوای فنول و فلاوونوئید کل و فعالیت ضد اکسایشی این اسانس نیز بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد مصرفی

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی استفاده شده در این مطالعه شامل اتانول ۹٦ درصد، DPPH[1]، ABTS[2]، کلرید آلومینیوم، معرف فولین سیوکالتو، مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار، نوترینت براث، پوتیتو دکستروز آگار، پوتیتو دکستروز براث و معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید بودند و شرکت مرک آلمان یا سیگما آمریکا خریداری شدند.

۲-۲- استخراج اسانس

از دستگاه کلونجر جهت استخراج اسانس گیاه استفاده شد. برای این منظور، ۵۰ گرم گیاه به مخزن دستگاه حاوی ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل شد و عملیات استخراج ۳ ساعت به طول انجامید. سپس آبگیری اسانس توسط سولفات سدیم انجام شد و اسانس به شیشه‌های تیره‌رنگ استریل منتقل و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [٤].

۲-۳- اندازه‌گیری محتوای فنول کل

در این آزمون، ۲۰ میکرولیتر اسانس (۱۰ گرم در لیتر) با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط گردید. بعد از نگهداری محلول به مدت ۳ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات اضافه و همزنی به مدت ۲ ساعت انجام گردید. در نهایت جذب محلول در طول‌موج ۷٦۵ نانومتر ثبت و محتوای فنول کل با کمک منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد و بصورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم اسانس (mg GAE/g) گزارش شد [۷].

۲-٤- اندازه‌گیری محتوای فلاوونوئید کل

محتوای فلاوونوئید کل اسانس گیاه پنج انگشت مطابق روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید تعیین شد. برای این منظور، اسانس پنج انگشت (۰/۵ میلی‌لیتر) با آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد (۰/۱ ملی لیتر)، پتاسیم استات ۱ مولار (۰/۱ میلی‌لیتر) و آب مقطر (٤/۳ میلی‌لیتر) مخلوط و به مدت ۳ دقیقه در دمای محیط نگهداری گردید. سپس جذب محلول در ٤۱۵ نانومتر اندازه‌گیری و محتوای فلاوونوئید کل برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم اسانس (mg QE/g) گزارش شد [۳].

۲-۵- بررسی فعالیت ضد اکسایشی

۲-۵-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH اسانس پنج انگشت مطابق روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۸) بررسی شد. در این آزمون، ۱ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH با ۱ میلی‌لیتر اسانس مخلوط گردید و محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک نگهداری شد. سپس جذب محلول در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر ثبت و فعالیت ضد اکسایشی اسانس نسبت به نمونه کنترل (آب مقطر بجای اسانس) و مطابق فرمول زیر محاسبه گردید[۱۲]:

$$\text{DPPH-radical scavenging activity (\%)} = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100$$

در این فرمول، As و Ac به ترتیب جذب نمونه و کنترل می‌باشند.

۲-۵-۲- مهار رادیکال آزاد ABTS

جهت انجام این آزمون، ۱۰۰ میکرولیتر اسانس با ۳۹۰۰ میکرولیتر محلول رقیق شده رادیکالی ABTS مخلوط و محلول حاصل به مدت ٦ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. لازم به ذکر است که ابتدا محلول ۷ میلی مولار ABTS به نسبت ۱:۱ با محلول پرسولفات سدیم ۲/٤۵ میلی مولار و به‌منظور تولید محلول رادیکال کاتیون ABTS مخلوط شدند و محلول به مدت ۱٦ ساعت در دمای اتاق و محیط تاریک نگهداری شد. جذب محلول اسانس- رادیکال آزاد در طول‌موج ۷۳٤ نانومتر ثبت شد و فعالیت مهارکنندگی رادیکال اسانس بصورت زیر محاسبه شد [۱۳]:

$$\text{ABTS-radical scavenging activity (\%)} = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100$$

در این فرمول، As و Ac به ترتیب جذب نمونه و کنترل می‌باشند.

۲-٦- بررسی فعالیت ضدقارچی

فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت در برابر کپک‌های *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* (ATCC 48113) و *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* (ATCC 48814) مطابق روش‌های ضدمیکروبی زیر بررسی گردید.

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

۲-۶-۱-دیسک دیفیوژن آگار[1]

در این آزمون ضدمیکروبی، اسانس گیاه پنج انگشت (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) توسط فیلتر غشایی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر استریل و سپس جهت آغشته کردن دیسک‌های استریل استفاده شد. دیسک‌های آغشته شده به اسانس سپس روی محیط کشت سابروز دکستروز آگار حاوی کپک (۱۰۰ میکرولیتر) قرار داده شدند و محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. در نهایت قطر هاله‌های عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری و به‌عنوان فعالیت ضدقارچی اسانس گزارش گردید [۳].

۲-۶-۲- انتشار چاهک در آگار[2]

برای انجام این آزمون ضدمیکروبی، ابتدا چاهک‌هایی در پلیت‌های حاوی سابروز دکستروز آگار ایجاد شد و سپس با قارچ‌های موردنظر بارگذاری شدند. در ادامه، اسانس گیاه پنج انگشت (۲۰ میکرولیتر) به هر چاهک اضافه شد و محیط کشت مطابق شرایط ذکر شده در روش ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار گرمخانه گذاری شد. سپس قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و بعنوان فعالیت ضد کپکی اسانس گیاه پنج انگشت گزارش شد [۳].

۲-۶-۳- حداقل غلظت مهارکنندگی[3]

حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه پنج انگشت در برابر کپک‌های مورد مطالعه بصورت زیر تعیین شد. ابتدا اسانس استریل (با غلظت‌های متوالی ۴۰۰ تا ۰/۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون کپکی اضافه شد. سپس لوله‌های آزمایش در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند و رشد کپک توسط کدورتی که در محیط کشت ایجاد شده بود با چشم مشاهده گردید. لازم به ذکر است که لوله آزمایش حاوی محیط کشت و باکتری بعنوان کنترل مثبت و لوله آزمایش حاوی اسانس و محیط کشت بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند [۳].

۲-۶-۴- حداقل غلظت کشندگی[4]

جهت اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی اسانس در برابر کپک‌های سبز و آبی میوه پرتقال، از لوله‌های آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی که در آن‌ها کدورتی مشاهده نشده بود، ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشته شد و بر سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت داده شد. گرمخانه گذاری مطابق شرایط فوق‌الذکر انجام گردید و حداقل غلظتی از اسانس که سبب جلوگیری از رشد کپک شده بود، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی آن گزارش شد [۳].

۲-۷- آنالیز آماری

نتایج این پژوهش با کمک نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p<0/05$) جهت مقایسه میانگین نتایج استفاده شد. نتایج بصورت "میانگین ± انحراف معیار" گزارش شدند و تمامی آزمون‌ها در ۳ مرتبه تکرار شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-راندمان استخراج و محتوای فنول و فلاوونوئید کل

راندمان استخراج اسانس گیاه پنج انگشت توسط روش استخراج تقطیر با آب به کمک دستگاه کلونجر برابر با ۰/۹۵ درصد وزنی/وزنی بود. محتوای فنول کل و فلاوونوئید کل اسانس نیز به ترتیب برابر با ۹۱/۷۴ mg GAE/g و ۵۲/۳۲ mg QE/g بود (شکل ۱).

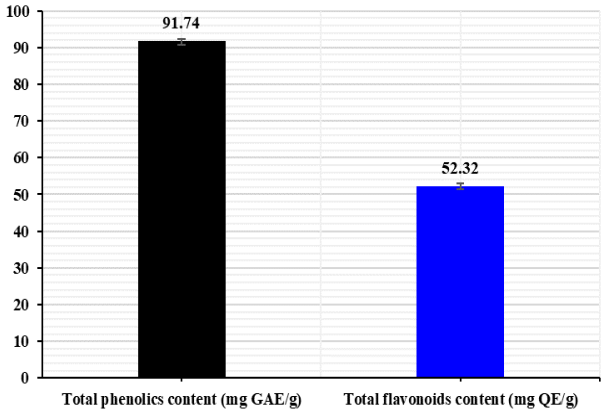

Fig 1 Total phenolics and flavonoids content of *Vitex agnus-castus* essential oil.

گیاه پنج انگشت دارای حداکثر ۲ درصد وزنی/وزنی اسانس می‌باشد که بورنیل استات، سینئول (۱، ۸- سینئول)، لیمونن، آلفا/بتا-پینن بعنوان عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گزارش شده‌اند. فلاوونوئیدها، ایریدوئیدها و دی ترپنها اصلی‌ترین ترکیبات ثانویه شناسایی شده در گیاه پنج انگشت

1. Disk diffusion agar (DDA)
2. Well diffusion agar (WDA)
3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
4. Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

می‌باشند و کاستیسین فراوان‌ترین فلاوونوئید این گیاه است. سایر ترکیبات فلاوونوئیدی از قبیل کریسوسپلنتین، کریسوسپلون D، سیناروزید، ۵-هیدروکسی تترامتوکسی فلاون، ٦-هیدروکسی کمپفرول، ایزورامنتین، لوتئولین و لوتئولین ٦-C-گلیکوزید نیز شناسایی شده‌اند. علاوه بر این، محتوای پلی‌فنول و *O*-دی فنول موجود در برگ‌های این گیاه بیشتر از ریشه آن است و بخش زیادی از این ترکیبات فنولی از گروه فلاوونوئیدها می‌باشند [١٤].

راندمان استخراج اسانس ۰/۱ و ۰/۲ درصد وزنی/وزنی از گیاه پنج انگشت در مطالعات مختلف گزارش شده است [١۵ و ١٦]. در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که راندمان استخراج اسانس گیاه پنج انگشت از ۰/۲۸ تا ۰/٦٦ درصد وزنی/وزنی متغیر است و این حالت به شرایط کشت این گیاه وابسته می‌باشد [١٧]. با بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی اسانس گیاه پنج انگشت، کتیرایی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش نمودند که محتوای فنول کل اسانس برابر با ۸۲/۲٦ mg GAE/g می‌باشد [١٨]. همچنین، محتوای فنول کل برابر با ۱۲۳/۹ و ۱۱٤/۵ mg GAE/g به ترتیب در اسانس استخراج شده از برگ و میوه گیاه پنج انگشت توسط گوکبولوت و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است [١٩]. در مطالعه‌ی ساریکورکسو و همکاران (۲۰۰۹) مشخص گردید که عصاره آبی و دی کلرومتان گیاه پنج انگشت به ترتیب دارای بالاترین محتوای فنول کل (۱۱۲/٤٦ µg GAE/mg) و فلاوونوئید کل (٤۳/۵۰ µg QE/mg) می‌باشند [۱۰]. اختلاف بین نتایج بازده استخراج و محتوای فنول و فلاوونوئید کل در این مطالعه در مقایسه با یافته‌های سایر محققین عمدتاً ناشی از تفاوت‌های اکولوژیکی گیاه مانند ارتفاع، رطوبت، دما، طول و عرض جغرافیایی، اقلیم و خاک، شرایط استخراج اسانس از قبیل دما، نوع حلال، زمان استخراج و نسبت حلال به ماده و شیوه‌های مختلف بیان نتایج می‌باشد [۳].

۳-۲- فعالیت ضد اکسایشی

فعالیت ضد اکسایشی اسانس گیاه پنج انگشت توسط دو روش ضد اکسایشی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بررسی شد و نتایج در شکل ۲ گزارش شده است. ترکیبات ضد اکسایشی با رادیکال‌های آزاد مانند DPPH (رنگ ارغوانی تیره) واکنش داده و آنها را به ترکیبات بی‌رنگ و خنثی تبدیل می‌کنند. بنابراین، درجه زوال رنگ بیانگر قابلیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ترکیبات ضد اکسایش مانند اسانس‌ها می‌باشد. علاوه بر این، ترکیبات با فعالیت اهداء هیدروژن قادر به احیاء رادیکال مونوکاتیونی ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) و کاهش جذب محلول در طول‌موج ۷۳٤ نانومتر می‌باشند [۲۰ و ۲۱].

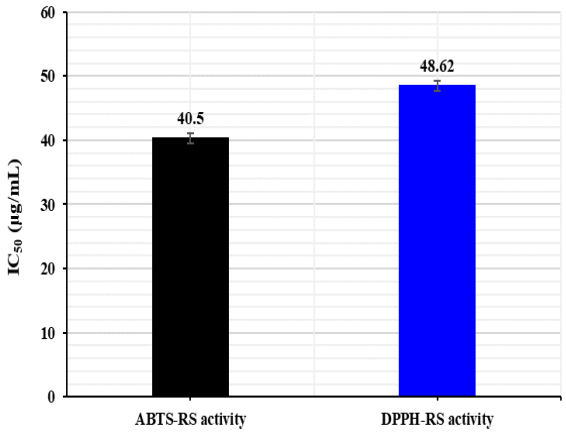

Fig 2 Free radical scavenging activity of *Vitex agnus-castus* essential oil.

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، اسانس گیاه پنج انگشت بطور مؤثری سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS شد که ناشی از حضور ترکیبات فنولی زیست فعال در اسانس می‌باشد. ترکیبات فنولی بعنوان یکی از گروه‌های اصلی ضد اکسایشی طبیعی شناخته می‌شوند که سبب خاتمه واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی می‌گردند. در این راستا، حضور گروه‌های آلدئیدی، کتونی و هیدروکسیل در ترکیبات تشکیل دهنده اسانس که قابلیت اهداء الکترون و هیدروژن را دارا می‌باشند، سبب افزایش استفاده از این ترکیبات طبیعی بعنوان جایگزین ضداکسیدان‌های شیمیایی و سنتزی جهت جلوگیری از اکسایش چربی‌ها در مواد غذایی غنی از اسیدهای چرب غیراشباع شده است [۲۲]. فعالیت ضد اکسایشی اسانس پنج انگشت در مطالعات مختلف گزارش شده است [۱۰ و ۱۸]. آسدادی و همکاران گزارش نمودند که اگرچه اسانس گیاه پنج انگشت فعالیت ضد اکسایشی کمتری نسبت به BHT و ویتامین E دارد، اما قابلیت استفاده بعنوان مهارکننده رادیکال آزاد در مواد غذایی را دارا می‌باشد و این اثر به حضور آلفا-پینن، سابینن و بتا-سیتوسترول در اسانس گیاه پنج انگشت نسبت داده شد [۱۱]. علاوه بر این، لازم به ذکر است که همبستگی مثبت و قوی بین محتوای فنول کل و فعالیت ضد اکسایشی اسانس و عصاره‌های گیاهی مشاهده شده است [۱۲ و ۲۳].

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

۳-۳- فعالیت ضدقارچی

گیاهان معطر و اسانس‌های استخراج شده از آنها بعنوان عوامل ضد باکتریایی، ضدقارچ، ضدویروس و حشره‌کش استفاده شده‌اند و بسیاری از اسانس‌های گیاهی بصورت تجاری در دسترس بوده و در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی بکار می‌روند [۲٤].

نتایج اثر ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت در برابر کپک‌های *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* و *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم*، مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و انتشار چاهک در آگار، در شکل ۳ گزارش شده است. اسانس گیاه پنج انگشت اثر ضدقارچی معنی‌داری در برابر کپک‌ها نشان داد و قطر هاله عدم رشد از ۱۱/٦ میلی‌متر تا ۱٤/۵ میلی‌متر متغیر بود.

بطور کلی، کپک *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* بیشترین حساسیت (بالاترین قطر هاله عدم رشد) را نسبت به اسانس نشان داد. علاوه بر این لازم به ذکر است که قطر هاله عدم رشد در روش انتشار چاهک در آگار بالاتر از روش دیسک دیفیوژن آگار بود که این حالت ممکن است ناشی از تماس مستقیم اسانس با قارچ در روش انتشار چاهک در آگار باشد؛ درحالیکه در روش دیسک دیفیوژن آگار، اسانس گیاهی بایستی از سطح دیسک‌های بلانک به محیط کشت انتشار یابد تا اثر ضدقارچی خود را نشان دهد و این حالت ممکن است به قطر هاله عدم رشد کوچک‌تر منجر گردد [۲۵].

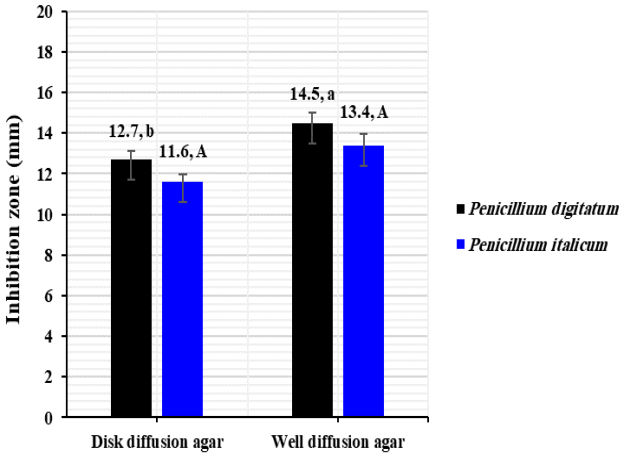

Fig 3 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*.

Table 1 The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*.

Concentration (mg/mL) / Microorganism	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	Contro l (+)	Control (-)
Penicillium digitatum	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Penicillium italicum	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

+, grow; -, not grow; n = 3.

نتایج ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت به روش حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. مطابق نتایج، غلظت کمتری از اسانس جهت جلوگیری از رشد و از بین بردن کپک *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* در مقایسه با کپک *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* موردنیاز است؛ به ترتیب حداقل غلظت ۲۵ در برابر ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روش حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت ۱۰۰ در برابر ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روش حداقل غلظت کشندگی. بنابراین، حساسیت کپک *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* نسبت به اسانس گیاه پنج انگشت بیشتر از کپک *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* می‌باشد.

Table 2 The minimum fungicidal concentration (MFC) of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*.

Concentration (mg/mL) / Microorganism	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
Penicillium digitatum	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Penicillium italicum	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+, grow; -, not grow; n = 3.

فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۲٦]. اثر ضدقارچی این اسانس ممکن است ناشی از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده آن باشد. بطوریکه ترکیب سینئول (۱، ۸ – سینئول) که عمده‌ترین جزء

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

اسانس گیاه پنج انگشت می‌باشد، اثر ضدقارچی آن در مطالعه‌ی پیناواز و همکاران (۲۰۰٤) گزارش شده است [۲۷]. با اینحال، لازم به ذکر است که اسانس مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف است و نسبت دادن اثر ضدقارچی آن به یک نوع ترکیب ویژه، مشکل است. اما ضدقارچی اسانس‌های گیاهی معمولاً ناشی از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده آنها می‌باشد. در این راستا، بنظر می‌رسد که اثر ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت ناشی از حضور ترکیبات اصلی آن از قبیل سینئول، آلفا–پینن، بتا–کاریوفیلن و کاریوفیلن اکساید باشد. علاوه بر این، بتا–سیتوسترول دارای فعالیت ضدقارچی می‌باشد و بنابراین بخشی از اثر ضدقارچی اسانس گیاه پنج انگشت را می‌توان به این ترکیب زیست فعال نسبت داد [۱۱]. بطور کلی، فعالیت ضدمیکروبی اسانس گیاهی ممکن است ناشی از حضور هسته آروماتیک و گروه هیدروکسیل فنولی واکنشگر در ساختار ترکیبات تشکیل دهنده اسانس باشد که قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی با گروه‌های SH– مکان فعال آنزیم‌های هدف و در نتیجه غیرفعال کردن آنزیم‌های قارچی می‌باشند. همچنین، اسانس گیاهی دارای ماهیت آبگریز بوده و در نتیجه جذب میسلیوم آبگریز قارچ شده و از رشد میسلیوم آن جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، با توجه به حضور ترکیبات متعدد در اسانس گیاهان دارویی، مکانیسم‌های متعددی از قبیل افزایش نفوذپذیری غشاء، تخریب غشای خارجی، کاهش اندازه قارچ و اصلاح مورفولوژی سلول در فعالیت ضدقارچی آن‌ها نقش دارند [۳].

٤- نتیجه گیری

در این مطالعه، اسانس گیاه پنج انگشت توسط روش تقطیر با آب استخراج شد و نتایج نشان داد که اسانس غنی از ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی است. اسانس فعالیت ضد اکسایشی قابل‌توجهی نشان داد و بطور مؤثری سبب مهار رادیکال‌های آزاد در شرایط برون‌تنی گردید که این اثر عمدتاً ناشی از حضور ترکیبات با قابلیت اهداء هیدروژن و الکترون در اسانس می‌باشد. علاوه بر این، نتایج فعالیت ضدقارچی اسانس در برابر کپک‌های سبز و آبی میوه پرتقال نشان داد که کپک *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* نسبت به اسانس حساسیت بالایی دارد و غلظت کمتری از اسانس جهت جلوگیری از رشد و یا از بین بردن آن موردنیاز است. بنابراین، اسانس گیاه پنج انگشت قابلیت استفاده بعنوان عامل نگهدارنده طبیعی جهت کنترل پوسیدگی پس از برداشت میوه پرتقال و یا سایر میوه‌جات و سبزیجات، بویژه به شکل پوشش و یا فیلم خوراکی، را دارا می‌باشد.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Khoshtaghaza, M. H., & Taghinezhad, E. (2017). Investigation effect of particle Nano coating on storage quality properties of Thomson orange. *Food Science and Technology*, *61*(13), 121-133.

[2] Golshan Tafti, A., & Baradaran, G. (2018). Study of the effect of essential oils in controlling of blue and green molds rot in orange fruit. *Journal of Food Microbiology*, *6*(3), 12-21.

[3] Rahmati-Joneidabad, M., & Alizadeh-Behbahani, B. (2021). Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil against spoilage fungi causing apple rot. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 10.22067/IFSTRJ.V18I1.87595.

[4] Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh-Behbahani, B., & Noshad, M. (2019). In vitro Determination of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of Lavandula Essential oil against some Pathogenic Microorganisms. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *27*(4), 77-89.

[5] Alizadeh-Behbahani, B., Noshad, M., & Sahraiyan, B. (2021). Investigation of the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of Eucalyptus globulus essential oil on a number of pathogenic bacteria and the cause of food spoilage. *Food Science and Technology*, *18*(110), 49-57.

[6] Alizadeh-Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Investigation of antimicrobial activity of Fennel essential oil on some pathogenic microorganisms causing

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

infection and food poisoning and its interaction with kanamycin antibiotic. *Food Science and Technology*, *16*(91), 233-241.

[7] Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). The impact of Qodume Shirazi seed mucilage‐based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. *Food Science & Nutrition*, *8*(12), 6497-6512.

[8] Hosseinzadeh Sahafi, H., Talebzadeh, S. A., & Naji, T. (2018). The roleconcentration of Vitex agnus-castus on control of ripeness of gonad of Carassius auratus. *Journal of Aquaculture Development*, *12*(3), 63-74.

[9] Nasri, S., & Ebrahimi Vostakolaei, S. (2007). Therapeutic effects of *Vitex agnus-castus* L. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, *8*(7), 49-53.

[10] Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(10), 2479-2483.

[11] Asdadi, A., Hamdouch, A., Oukacha, A., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., ... & Hassani, L. I. (2015). Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of Candida responsible for nosocomial infections. *Journal de mycologie medicale*, *25*(4), e118-e127.

[12] Alizadeh-Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaei Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2019). Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some food-borne pathogens and its determination of chemical compounds, total phenol content, total flavonoids content and antioxidant potential. *Food Science and Technology*, *16*(87), 275-288.

[13] Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). *Mentha pulegium* essential oil: chemical composition, total phenolic and its cytotoxicity on cell line HT29. *Iranian Journal Food Science and Technology Research*, *16*(5), 643-653.

[14] Zahid, H., Rizwani, G. H., & Ishaqe, S. (2016). Phytopharmacological review on Vitex agnus-castus: a potential medicinal plant. *Chinese Herbal Medicines*, *8*(1), 24-29.

[15] Ulukanli, Z., Çenet, M., Öztürk, B., Bozok, F., Karabörklü, S., & Demirci, S. C. (2015). Chemical characterization, phytotoxic, antimicrobial and insecticidal activities of *Vitex agnus-castus*' essential oil from East Mediterranean Region. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *18*(6), 1500-1507.

[16] Ricarte, L. P., Bezerra, G. P., Romero, N. R., Da Silva, H. C., Lemos, T. L. G., Arriaga, A. M. C. et al. (2020). Chemical composition and biological activities of the essential oils from Vitex-agnus castus, Ocimum campechianum and Ocimum carnosum. *An Acad Bras Cienc*, 92(1), e20180569.

[17] Rezaei, M., Razmjoo, J., Ehtemam, M. H., Karimmojeni, H., & Zahedi, M. (2019). The interaction between shade and drought affects essential oil quantity and quality of *Vitex agnus-castus* L. leaves and seeds. *Industrial Crops and Products*, *137*, 460-467.

[18] Katiraee, F., Mahmoudi, R., Tahapour, K., Hamidian, G., & Emami, S. J. (2015). Biological properties of *Vitex agnus-castus* essential oil (Phytochemical component, antioxidant and antifungal activity). Biotechnology and Health Sciences, 2(2), e26797.

[19] Gökbulut, A., Özhan, O., Karacaoğlu, M., & Şarer, E. (2010). Radical Scavenging Activity and Vitexin Content of *Vitex agnus-castus* Leaves and Fruits. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, *35*, 85–91.

[20] Pinto, P. C., Saraiva, M. L. M., Reis, S., & Lima, J. L. (2005). Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2, 2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. *Analytica chimica acta*, 531(1), 25-32.

[21] Bai, W., Wang, Q., Zeng, X., Fu, J., Liu, Y., & Dong, H. (2017). Antioxidant activities of chicken peptide‐Maillard reaction products (CP‐MRPS) derived from chicken peptides and d‐glucose system.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Processing and Preservation, 41(2), e13041.

[22] Noshad, M., Alizadeh-Behbahani, B., & Dehghani, S. (2020). Improving oxidative and microbial stability of beef by using a bioactive edible coating obtained from Barhang-e-Sagheer seed mucilage and loaded with Avishan-e-Baghi. *Food Science and Technology*, *101*(17), 1-13.

[23] Hojjati, M., & Alizadeh-Behbahani, B. (2021). Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: *in vitro* study. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *17*(1), 83-91.

[24] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities of Cinnamomum zeylanicum Bark Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2020*.

[25] Behbahani, B. A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, *136*, 103716.

[26] Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Džamić, A., Ćirić, A., Ristić, M., & Grubišić, D. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of Vitex agnus-castus L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry*, *128*(4), 1017-1022.

[27] Pina‐Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa‐de‐Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., ... & Martinez‐de‐Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *18*(1), 73-78.

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:58 IRDT on Sunday June 20th 2021

Evaluation of chemical activity and antifungal effect of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causing orange rot

Rahmati-Joneidabad, M. [1]*, **Alizadeh Behbahani, B.** [2]

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 01/ 16
Accepted 2021/ 03/ 07

Keywords:

Orange, Rotting, Essential oil, *Vitex agnus-castus*, Antioxidant activity, Antifungal effect.

DOI: 10.29252/fsct.18.05.07

*Corresponding Author E-Mail: Rahmati@asnrukh.ac.ir

ABSTRACT

Plant essential oils are frequently used as natural preservatives to decrease the toxicity of synthetic fungicides and environmental pollution. This study was aimed to investigate the antifungal effect of *Vitex agnus-castus* essential oil on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causing orange rot. The essential oil of *V. agnus-castus* was extracted by the hydrodistillation method and the extraction yield was 0.95% w/w. The total phenol and flavonoids content of the essential oil were also measured and the results showed that the essential oil is rich in phenolics (91.74 mg GAE/g) and flavonoids (52.32 mg QE/g). The evaluation of antioxidant activity of the *V. agnus-castus* essential oil showed that the bioactive compound is able to effectively scavenge DPPH (IC_{50} = 48.62 µg/mL) and ABTS (IC_{50} = 40.50 µg/mL) free radicals. The antifungal activity of the *V. agnus-castus* essential oil was evaluated against *P. digitatum* and *P. italicum*, based on disk diffusion agar, well diffusion agar, and minimum inhibitory/fungicidal concentration methods. And *P. digitatum* was more sensitive to the essential oil and lower concentration of the bioactive compound was able to inhibit the growth of or kill the species. In general, the results of this study showed that the *V. agnus-castus* essential oil is rich in bioactive compounds with remarkable antioxidant and antifungal activities, and it could be applied as a natural preservative to increase the shelf-life of food products.

www.SID.ir