

بهینه‌سازی اثرات ضد قارچی اسانس‌های دارچین، آویشن شیرازی، و مرزۀ خوزستانی با RSM

مه‌اسادات رضوی^۱، عبدالله گل‌محمدی^{۲*}، علی نعمت اله زاده^۳، علیرضا قنبری^۴ و مهدی داوری^۵

^۱ و ^۲ به ترتیب، دانشجوی دکتری و دانشیار گروه مهندسی بیوسستم، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۳ دانشیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

^۴ دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

^۵ دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۲۹)

چکیده

استفاده از اسانس‌ها به‌عنوان عوامل ضد قارچی طبیعی و جایگزین‌هایی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این پژوهش، ترکیبات شیمیایی و خواص ضد قارچی سه اسانس دارچین، آویشن شیرازی و مرزۀ خوزستانی با هدف بررسی اثر غلظت اسانس و زمان تماس در کنترل قارچ عامل کپک آبی (*Penicillium expansum*) و مدل‌سازی و بهینه‌یابی خواص ضد قارچی اسانس‌های موردنظر با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شده است. بر اساس نتایج حاصل از GC-MS، ترکیبات اصلی برای اسانس دارچین، سینامالدهاید (۸۰/۸۲ درصد)، برای آویشن شیرازی ترکیبات تیمول (۳۲/۶۸ درصد)، کارواکرول (۳۰/۵۷ درصد) و پاراسیمین (۸/۹۴ درصد) و برای مرزۀ خوزستانی، کارواکرول (۳۸/۴۳ درصد)، گاماترپینن (۲۱/۸۹ درصد)، پاراسیمین (۱۶/۵۵ درصد) و آلفاترپینن (۵/۷۶ درصد) تعیین شدند. نتایج به‌دست‌آمده از کشت برون‌تنی قارچ در محیط‌های حاوی اسانس نشان داد که در هر سه اسانس با افزایش غلظت، شاخص خاصیت ضد قارچی نیز افزایش می‌یابد و اثر زمان در هر سه اسانس مشابه بوده و با گذشت زمان، این شاخص کاهش می‌یابد. به‌علاوه، از نتایج بهینه‌یابی مشخص شد که اسانس دارچین و مرزۀ خوزستانی به ترتیب در غلظت‌های ۲۸۸/۶۳۳ و ۵۹۰/۸۴۱ میکرولیتر بر لیتر و زمان‌های ۱۰۸/۶۰۷ و ۲۳۸/۵۴۹ ساعت، بیش‌ترین کم‌ترین خاصیت مهارکنندگی رشد قارچ *P. expansum* را دارند. علاوه بر این، نتایج این پژوهش نشان دادند که روش سطح پاسخ می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب و دقیق برای مدل‌سازی و بهینه‌یابی فعالیت ضد قارچی این اسانس‌ها به کار رود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بازدارندگی، بهینه‌یابی، روش سطح پاسخ، *Penicillium expansum*

Optimizing the antifungal effects of *Cinnamomum zeylanicum*, *Zataria multiflora*, and *Satureja khuzestanica* essential oils against the blue mold fungus (*Penicillium expansum*) using Response Surface Methodology

Mahsa Sadat Razavi¹, Abdullah Golmohammadi^{2*}, Ali Nematollahzadeh³, Alireza Ghanbari⁴ and Mehdi Davari⁵

1 and 2, respectively, PhD student and Associate Professor, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

3. Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Mohaghegh Ardabili University, Iran

4. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Iran

5. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Iran

(Received: November 4, 2019 - Accepted: March 19, 2020)

ABSTRACT

Utilizing essential oils (EOs) as natural antifungal agents and alternatives for chemical fungicides has increased attention. In this study, chemical components and antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* (CEO), *Zataria multiflora* (ZEO), and *Satureja khuzestanica* (SEO) plant essential oils (EOs) were identified to assess their effect in terms of concentration and exposure time on controlling *Penicillium expansum*. Also, modeling and optimizing antifungal properties of these EOs via response surface methodology (RSM). The main components of three EOs detected by GC-MS analysis were *Cinnamaldehyde* (80.82%) for CEO, *Thymol* (32.68%), *Carvacrol* (30.57%), *p-Cymene* (8.94), and γ -*Terpinene* (5.96%) for ZEO and *Carvacrol* (38.43%), γ -*Terpinene* (21.89%), *p-Cymene* (16.55%), and α -*Terpinene* (5.76%) for SEO. Antifungal index (AI) in all EOs increased against the increment of concentration, but the effect of time was vice versa and over time, the AI decreased in all EOs. Moreover, based on the optimization results, it was determined that CEO and SEO had the highest and lowest inhibitory effects on growth of *Penicillium expansum* at the concentrations of 288.633 and 590.841 $\mu\text{L.L}^{-1}$ and time of 108.607 and 238.549 h, respectively. Furthermore, results of this study showed that the response surface method can be applied to modeling and optimizing the antifungal activity of these EOs as a suitable and accurate method.

Keywords: Essential oil, inhibition, optimization, response surface methodology, *Penicillium expansum*.

* Corresponding author E-mail: golmohammadi1342@gmail.com

مقدمه

در قرن حاضر، حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن در دوره ماندگاری امری است که نه تنها توجه متخصصین صنعت غذا و مسؤلین سلامت کشورها را به خود جلب کرده، بلکه بی‌توجهی به آن می‌تواند صدمات جبران‌ناپذیری را به جامعه وارد کند. غذاهای فاسدشده علاوه بر آسیب به سلامت مصرف‌کننده، به تولیدکننده نیز از لحاظ اقتصادی ضرر می‌رسانند. بیماری‌های پس از برداشت در طول دوره نگهداری، درجه‌بندی، بسته‌بندی، انبارداری و حمل‌ونقل رخ می‌دهند و این بیماری‌ها حتی تحت دمای اتاق یا انبارداری سرد نیز ادامه می‌یابند. بیماری‌های قارچی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در طول دوره پس از برداشت هستند (Arras & Usai, 2001). رشد این پوسیدگی در سطح محصولات به صورت دسته‌های سبز-آبی پودری شکل است که روی سطح ماده غذایی گسترش می‌یابد، تعداد بی‌شماری اسپور تولید می‌کند که هر اسپور، قابلیت تولید پوسیدگی جدیدی را دارد (Brooks et al., 1920). کپک آبی ناشی از قارچ *Penicillium expansum* است (Goepfert, 1980). این قارچ، زهرابه قارچی به نام "پاتولین" تولید می‌کند که یک ژنوتوکسیک بالقوه با توانایی تحریک آسیب اکسیداتیو DNA در سلول‌های انسان است که در ایجاد جهش در ژن و شروع سرطان نقش دارد (Laidou et al., 2001). تاکنون تلاش‌های زیادی به منظور بررسی اثر قارچ‌کش‌های موجود بر حذف و مهار عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است. سم‌پاشی محصولات با بنومیل و تیابندازول از جمله رایج‌ترین روش‌ها برای کنترل بیماری‌های قارچی پس از برداشت هستند، اما استفاده مداوم از این قارچ‌کش‌ها، مقاومت عوامل بیماری‌زا و نیز خطرات سلامت و محیط‌زیست را به همراه دارد (Bertetti et al., 2008; Bus et al., 1991; Morales et al., 2008; Spadaro & Gullino, 2004; Wisniewski & Wilson, 1992). از آنجایی که مصرف‌کنندگان به امنیت مواد غذایی حاوی نگه‌دارنده‌های شیمیایی اطمینان ندارند، در

سال‌های اخیر به مصرف مواد غذایی طبیعی که از محصولات طبیعی به‌عنوان نگه‌دارنده استفاده می‌کنند، گرایش پیدا کرده‌اند (Burt, 2004). اخیراً، پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که متابولیت‌های ثانویه گیاهان یا اسانس‌ها دارای خاصیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد اکسایشی و ضد سرطانی بوده و در کنترل رشد بیمارگرها و تولید توکسین توسط ریزسازواره‌ها مؤثرند و بنابراین به‌عنوان جایگزین‌های مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی در نظر گرفته می‌شوند (Arras & Usai, 2001; Tajkarimi et al., 2010). همچنین این ترکیبات، زیست‌تجزیه‌پذیر و زیست‌سازگار هستند. از ویژگی‌های مهم اسانس‌ها و اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها (ترکیبات فنولی) خاصیت آب‌گریزی آن‌ها است که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول‌های بیمارگرها و میتوکندری‌ها می‌شود و سبب اختلال در ساختمان آن‌ها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود. خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد (Burt, 2004). عمده این ترکیبات فنولی شامل کارواکرول، اوژنول، تیمول و سینامالدهید هستند. احتمالاً سازوکار اثر این ترکیبات هم مانند سایر ترکیبات فنولی شامل اختلال در غشاء سیتوپلاسمایی، برهم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی است (Burt, 2004; Tajkarimi et al., 2010). تاکنون اثر بسیاری از اسانس‌ها از جمله آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) (Etemadi et al., 2012; Mohammadi et al., 2015)، دارچین (*Cinnamomum sp.*) (Behdani et al., 2012; Fathi et al., 2012; Mohammadi et al., 2015; Nikkhal et al., 2017; Satureja) (Xing et al., 2010)، مرزۀ خوزستانی (*Farzaneh et al., 2015; Safari et al., 2014*)، مورخوش (*Zhumeria majdae*)، گلپر ایرانی (*Heracleum persicum*)، اکالیپتوس (*Eucalyptus sp.*) (Davari & Ezazi, 2017) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*. L.) (Ebadollahi et al., 2018) بر بازدارندگی یا کشندگی قارچ‌های دوره

مرسوم از دقت بالاتری برخوردار بوده و نسبت به روش‌های محاسباتی نرم (شبکه‌های عصبی مصنوعی^۳، انفیس^۴ و غیره) برای مدل‌سازی نیازمند تعداد داده‌های بسیار کم‌تری است (Razavi et al., 2018; Kashani Nezhad & Kashani Nezhad, 2015). لذا هدف اصلی این پژوهش استفاده از روش سطح پاسخ به‌منظور مدل‌سازی و بهینه‌یابی خواص ضد قارچی اسانس‌ها علیه قارچ *Penicillium expansum* است. همچنین، ترکیبات شیمیایی سه اسانس دارچین (CEO^۵)، آویشن شیرازی (ZEO^۶) و مرزۀ خوزستانی (SEO^۷) و نیز اثر غلظت اسانس و زمان در تماس بودن بر کنترل قارچ *P. expansum* بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس گیاهان و جدایه قارچی

اسانس آویشن شیرازی توسط شرکت طبیب دارو (اصفهان)، به‌دست‌آمده به روش تقطیر با آب و از اندام‌های هوایی گیاه کشت‌شده در مزرعه تحقیقاتی شرکت مذکور، در اختیار ما قرار گرفت. اسانس دارچین از پوست درخت دارچین واردشده از کشور هند و مرزۀ خوزستانی از اندام هوایی گل‌دار کشت‌شده در استان لرستان به‌دست‌آمده به روش تقطیر با آب نیز از شرکت زرد بند (تهران) خریداری شد. در روش تقطیر با آب، از دستگاه کلونجر استفاده می‌شود. برای این منظور، ابتدا بخش‌های موردنظر گیاه خشک شده و سپس با آسیاب خرد می‌شود. وزن مشخصی از آن را درون بالن دستگاه ریخته و به محتویات بالن آب مقطر اضافه می‌گردد تا سطح گیاه را به‌طور کامل بپوشاند. سپس با تنظیم درجه حرارت و سرعت عبور آب سرد از مبرد، تقطیر شروع می‌شود.

قارچ *Penicillium expansum* (IRAN 3009C) از مؤسسه تحقیقات دارویی و گیاهان پزشکی دانشگاه شهید بهشتی تهیه و محیط کشت قارچ PDA^۸ از

نگهداری، بررسی‌شده، باین‌وجود، از پایه مدلی مناسب برای مدل‌سازی و پیش‌بینی شرایط بهینه استفاده از اسانس در کنترل عوامل بیماری‌زا برای محصولات از نظر غلظت و زمان نیازمند بررسی‌های بیشتری است. روش سطح پاسخ (RSM^۲) مجموعه‌ای از طرح‌های آزمایشی و فن‌های بهینه‌سازی است که این امکان را به محقق می‌دهد تا رابطه بین پاسخ و متغیرهای مستقل را تعیین کنند. این روش به‌منظور رسیدن به ویژگی‌های هدف یا نیازمندی‌های مصرف‌کننده برای رسم یک منحنی پاسخ در محدوده موردنظر و بهینه‌سازی پاسخ برای انتخاب متغیرهای مناسب آزمایش به کار می‌رود. همچنین، برای مدل‌سازی و بهبود بهینه‌سازی شرایط آزمایش در انواع مختلف فرآیندهای زیستی مناسب است (Eren & Kaymak-Ertekin, 2007).

در پژوهش انجام‌شده توسط Ebadollahi et al. (2018) با استفاده از روش RSM، فعالیت بازدارندگی رشد میسیلیومی و سمیت تدخینی اسانس آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) به ترتیب روی دو قارچ *Botrytis cinerea* و *Fusarium graminearum* سطوح مختلفی از غلظت اسانس و زمان بررسی شد. آن‌ها شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین بازدارندگی از رشد در قارچ *F. graminearum* (۸۸/۶۷ درصد) و *B. cinerea* (۹۴/۴۳) را به ترتیب در زمان‌های ۸۸/۵۹ و ۷۴/۰۱ ساعت و غلظت‌های ۴۸۶/۶۷ و ۵۵۲/۹۶ میکرولیتر بر لیتر گزارش کردند. در پژوهش انجام‌شده توسط Naybandi Atashi et al. (2012)، اثر سینرژیستی (هم‌افزایی) اسانس‌های آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع (*Mentha spp.*)، و کاکوتی (*Ziziphora tenuir*) در جلوگیری از رشد باکتری اشرشیاکلی O157:H7 در زمان‌های ۲۴ ساعت و ۱۴ روز با استفاده از روش RSM بررسی شد. در این پژوهش، فرمول بهینه برای کاهش باکتری به ترتیب با غلظت ۰/۱۵، ۰، و ۰/۱۵ درصد از اسانس‌های آویشن، نعناع، و کاکوتی به دست آمد.

روش RSM در مقایسه با روش‌های رگرسیونی

3 ANN

4 ANFIS

5 Cinnamon Essential oil

6 Zataria multiflora Essential oil

7 Satureja khuzestanica Essential oil

8 Potato Dextrose Agar

2 Response Surface Methodology (RSM)

شرکت مرک آلمان خریداری شد.

تجزیه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) اسانس‌ها

ترکیبات سازنده اسانس‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890B series GC, Agilent Technologies, CA, USA) مجهز به سیستم آشکارساز طیف‌سنج جرمی مدل ۵۹۷۷۸ انجام شد. جداسازی کروماتوگرافی دارای ستون کپیلاری^۹ HP-5MS به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود و گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹ درصد با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس و حجم اسانس تزریق‌شده ۱ میکرولیتر بود. دمای ستون به مدت ۳ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس ثابت نگه‌داشته شد، سپس دما تا ۱۸۰ درجه سلسیوس افزایش یافته و برای ۲ دقیقه ثابت نگه‌داشته شد. شناسایی ترکیبات بر اساس مطالعه طیف‌های ترکیبات و مقایسه آن‌ها با طیف‌های استاندارد موجود در کتابخانه دستگاه انجام شد (Adams 2007).

بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها

خواص ضد قارچی اسانس‌ها مشابه روش به کار گرفته‌شده توسط (Jalili Marandi et al. 2011) از اختلاط با محیط کشت PDA بررسی شد. برای این منظور، از توئین ۸۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد برای همگن‌سازی محیط کشت با اسانس استفاده شد. بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت و رسیدن دمای تقریبی آن به ۴۰ درجه سلسیوس، اسانس‌ها به‌منظور رسیدن به غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر به محیط کشت اضافه شدند و درون تشتک‌های پتری با قطر ۹ سانتی‌متر (هر تیمار ۳ تکرار) ریخته شدند.

بعد از سرد و سفت شدن محیط‌های درون تشتک‌های پتری، دیسک‌هایی به اندازه ۵ mm

میلی‌متر از قارچ *P. expansum* جدا شدند و در وسط تشتک‌های پتری قرار داده شدند. برای تیمار شاهد، محیط کشت با توئین و بدون اسانس در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری با پارافیلیم^{۱۰} عایق‌بندی شدند و در انکوباتور با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

بعد از ۷۲ ساعت، رشد شعاعی پرگنه هر دو روز یکبار با اندازه‌گیری قطر پرگنه‌ها تعیین شد. فرآیند اندازه‌گیری رشد قارچ در تیمارهای مختلف تا زمان پر شدن تشتک‌های پتری شاهد ادامه یافت. شاخص ضد قارچی (AI^{۱۱}) اسانس‌ها در غلظت‌های مختلف با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Abbott, 1925; Jiang et al., 2014)

$$AI = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (1)$$

که در این معادله، C میانگین قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد و T میانگین قطر پرگنه قارچ در تیمارهای حاوی اسانس است. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتور غلظت اسانس در پنج سطح و زمان در هفت سطح، مجموعاً ۳۵ تیمار برای هر اسانس، با سه تکرار انجام شد.

مدل‌سازی فعالیت قارچ‌کشی اسانس

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از فن‌های ریاضی و آماری برای مدل کردن و تجزیه و تحلیل مسائلی است که پاسخ موردنظر تحت تأثیر متغیرهای مختلفی است و هدف، رسیدن به پاسخی بهینه است (Rasool et al., 2018) با کمک این روش آماری، کلیه ضرایب مدل رگرسیونی و اثر متقابل متغیرها، قابل برآورد هستند. در این پژوهش برای به دست آوردن پاسخ بهینه (E_p) از معادله کلی زیر استفاده شد (Oguaghamba & Onyia, 2019):

10 Parafilm
11 Antifungal Index

9 Capillary

$$E_y = \beta_0 + \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum_{i < j} \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i < j} \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j (X_i - X_j) + \sum_{i < j < k} \sum_{i < j < k} \beta_{ijk} X_i X_j X_k + \varepsilon \quad (2)$$

پیش‌بینی در ارتباط میان متغیرها را نشان می‌دهد.

نتایج و بحث

ترکیبات اصلی اسانس‌ها

ترکیبات اصلی اسانس‌ها به‌وسیله آنالیز GC-MS تعیین شدند. ترکیبات شناسایی شده و مقادیر آن‌ها به‌صورت درصد در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. برای اسانس دارچین، *Cinnamaldehyde* (۸۰/۸۲ درصد) ترکیب اصلی بود و دیگر ترکیبات شناسایی شده کم‌تر از ۵ درصد بودند. این نتایج مطابق با پژوهش‌های انجام‌شده توسط *Xing et al.* (2010)؛ *Fathi et al.* (2012)؛ *Kordsardouei et al.* (2013)؛ *Nikkhah et al.* (2017) بود که نشان دادند *Cinnamaldehyde* ترکیب اصلی اسانس دارچین بوده است. برای اسانس آویشن شیرازی، *Thymol* (۳۲/۶۸ درصد)، *Carvacrol* (۳۰/۵۷ درصد)، *p-Cymene* (۸/۹۴ درصد)، و γ -*Terpinene* (۵/۷۶ درصد) ترکیبات اصلی بودند و مقادیر دیگر ترکیبات شناسایی شده کم‌تر از ۵ درصد بودند. این نتایج مشابه نتایج گزارش‌شده توسط *Alizadeh-Salteh et al.* (2009)؛ *Gandomi et al.* (2010)؛ *Saei-Dehkordi et al.* (2010)؛ *Zomorodian et al.* (2013)؛ *Kordsardouei et al.* (2015) و *Mahmoudvand et al.* (2017) است که *Thymol* و *Carvacrol* را ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی بیان کردند. برای اسانس مرزۀ خوزستانی، *Carvacrol* (۳۸/۴۳ درصد)، γ -*Terpinene* (۲۱/۸۹ درصد)، *p-Cymene* (۱۶/۵۵ درصد)، و α -*Terpinene* (۵/۷۶ درصد) به‌عنوان ترکیبات عمده به دست آمدند. این نتایج با یافته‌های پژوهش‌گران قبلی، *Safari et al.* (2013)؛ *Pirbalouti & Moalem* (2014)؛ *Farzaneh et al.* (2014)؛ *Yousefzadi et al.* (2015) و *Zomorodian et al.* (2015) مطابقت داشت.

که در آن، β_{ijk} ضرایب ثابت رگرسیون، β_i ، β_{ij} و β_0 ، X_i ، X_j و X_k به ترتیب مؤلفه‌های نام، زام و k نام متغیرهای مستقل آزمایش و ε خطای تصادفی هستند. مدل‌های ریاضی برای هر پاسخ با تجزیه رگرسیون خطی چندگانه ارزیابی شدند. در پژوهش حاضر، به‌منظور تخمین اثر متغیرهای مستقل غلظت اسانس و زمان‌های در معرض بودن بر میزان بازدارندگی رشد قارچ بیمارگر، از روش سطح پاسخ و طرح داده‌های واقعی استفاده شد. معنی‌داری آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0/05$) بررسی و مقادیر IC_{50} و IC_{100} (به ترتیب غلظت‌هایی که باعث ۵۰ و ۱۰۰ درصد بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ می‌شوند) به‌عنوان پاسخ‌های مطلوب و بر اساس مدل‌های به‌دست‌آمده محاسبه شدند. نرم‌افزارهای *Design Expert 10* و *Excel 2016* برای برازش داده‌ها و رسم نمودارها استفاده شدند.

ارزیابی نکویی برازش مدل‌ها

لازم است مدل‌های به‌کاررفته در این پژوهش از لحاظ آماری ارزیابی شوند تا دقت آن‌ها مشخص شود. برای این منظور، از شاخص‌های آماری ضریب تبیین (R^2) و میانگین درصد خطای مطلق ($MAPE^{12}$) استفاده شد که به‌صورت زیر محاسبه می‌شوند:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - Z_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n t_i^2}} \quad (3)$$

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{|(t_i - Z_i)|}{Z_i} \right) \times 100 \quad (4)$$

که در این معادله‌ها، t_i و Z_i به ترتیب مؤلفه نام مقادیر شبیه‌سازی شده و واقعی، و n تعداد اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی (داده‌ها) هستند (*Nabavi-Pelesaraei et al.*, 2018). بالا بودن مقدار R^2 و کم بودن مقدار $MAPE$ ، دقیق بودن مدل

12 Mean absolute percentage error

تأثیر تنش‌ها هستند که از نظر شیمیایی همگن نبوده و به صورت‌های مختلف اغلب با منشأ تریپنی مشاهده می‌شوند (Tajkarimi *et al.*, 2010). از این رو، نوع تنش و شدت تنش وارده به گیاه در طول دوره رشد بر میزان متابولیت‌های ثانویه آن اثرگذار بوده و می‌تواند دلیل بر اختلاف درصد ترکیبات اسانس یک گیاه با گیاه مشابه خود اما در ناحیه یا شرایط محیطی متفاوت باشد.

اختلاف اندک بین درصد ترکیبات اصلی اسانس‌ها در پژوهش حاضر نسبت به پژوهش‌های پیشین می‌تواند ناشی از شرایط جغرافیایی، سن گیاه و روش‌های به‌کاررفته برای استخراج اسانس‌ها باشد (Bagamboula *et al.*, 2004; Valero & Salmeron, 2003) همچنین، اسانس‌های گیاهی ناشی از فرآیندهای اصلی سوخت‌وساز گیاهان به‌ویژه تحت

جدول ۱. ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس‌ها

Table 1. Chemical composition of Essential Oils

Components	CEO (%)	ZEO (%)	SEO (%)	Retention index
<i>α-Thujene</i>	1.53	3.63	2.32	933
<i>α-pinene</i>	-	0.43	2.64	938
<i>Benzaldehyde</i>	0.37	-	-	944
<i>Camphene</i>	-	0.15	-	946
<i>3-Octanone</i>	-	0.14	-	966
<i>β-pinene</i>	-	0.39	1.83	973
<i>β-Myrcene</i>	-	0.71	2.47	981
<i>α-Phellandrene</i>	-	0.13	-	990
<i>3-Carene</i>	0.65	-	-	998
<i>α-Terpinene</i>	-	0.52	5.76	1008
<i>p-Cymene</i>	1.54	8.94	16.55	1009
<i>Limonene</i>	-	0.56	1.45	1018
<i>β-Phellandrene</i>	0.37	-	-	1024
<i>Eucalyptol</i>	1.15	0.43	-	1034
<i>γ-Terpinene</i>	0.08	5.96	21.89	1048
<i>Linalool</i>	-	1.13	-	1098
<i>β-Terpineol, cis-</i>	-	0.1	-	1135
<i>α-Terpineol</i>	0.08	1.54	-	1189
<i>Thymol methyl ether</i>	-	0.67	-	1216
<i>Carvacrol methyl ether</i>	-	0.98	-	1225
<i>Carvone</i>	-	-	1.21	1243
<i>Linalool acetate</i>	2.65	-	-	1248
<i>Cinnamaldehyde</i>	80.82	-	-	1263
<i>Thymol</i>	-	32.68	1.94	1281
<i>Carvacrol</i>	-	30.57	38.43	1294
<i>Thymol acetate</i>	-	1.45	-	1332
<i>Carvacrol acetate</i>	-	1.78	-	1348
<i>Caryophyllene, (Z)-</i>	-	2.38	-	1404
<i>Aromadendrene</i>	-	1.21	-	1441
<i>Caryophyllene</i>	3.57	-	-	1456
<i>(Z)-Cinnamic acid</i>	0.12	-	-	1471
<i>γ-Bisabolene, (E)-</i>	-	0.8	2.32	1523
<i>Spathulenol</i>	-	0.83	-	1563
<i>2H-1-Benzopyran-2-one</i>	0.1	-	-	1581
<i>Cinnamyl acetate</i>	0.14	-	-	1635
<i>Caryophyllene oxide</i>	0.03	0.78	-	1961
Total	97.66	98.46	98.81	

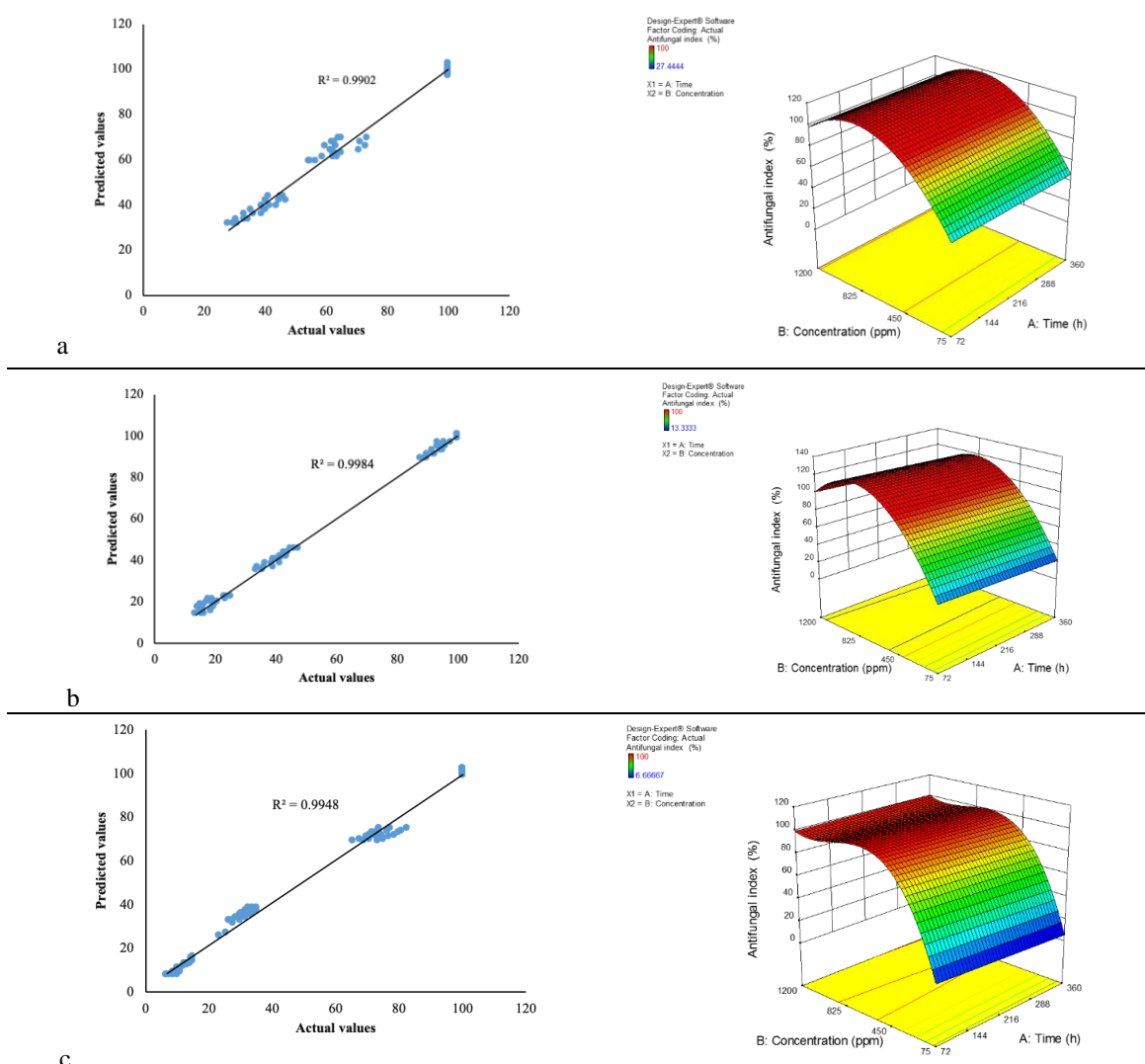
اثر توان سوم غلظت (B^3) برای اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزۀ خوزستانی و اثر متقابل زمان و توان دوم غلظت ($A \times B^2$) برای اسانس آویشن شیرازی بر بازدارندگی رشد قارچ از لحاظ آماری معنی‌دار بود. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با مشاهدات حاصل از پژوهش‌های پیشین توسط (Xing *et al.* (2010)؛ (Fathi *et al.* (2012) و (Behdani *et al.* (2012)

خاصیت ضد قارچی اسانس‌ها و مدل‌سازی به روش سطح پاسخ

بر اساس نتایج تجزیه واریانس حاصل از مدل‌سازی مبتنی بر داده‌های به‌دست‌آمده از اثر بازدارندگی اسانس‌ها بر رشد قارچ *P. expansum*، اثر فاکتورهای زمان (A)، غلظت (B)، توان دوم غلظت (B^2) و اثر متقابل زمان و غلظت ($A \times B$) برای هر سه اسانس و

می‌شود که افزایش زمان در هر سه اسانس موجب کاهش شاخص بازدارندگی شده است. با توجه به شکل سطح پاسخ، معنی‌دار بودن اثر متقابل زمان و غلظت بر شاخص بازدارندگی رشد قارچ را می‌توان مشاهده کرد. همبستگی بین مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل و مقادیر واقعی میزان خاصیت ضد قارچی در شکل ۱ (سمت چپ) و بهترین مدل تخمین زده‌شده اثر غلظت اسانس‌ها و زمان تماس برای پاسخ خاصیت ضد قارچی در جدول ۲ نشان داده شده است.

Farzaneh *et al.* (2015) برای اثر افزایش غلظت اسانس‌ها بر کاهش رشد قارچ مطابقت دارد. سطوح پاسخ برای اثر زمان در تماس بودن و غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر میزان بازدارندگی رشد قارچ *P. expansum* در شکل ۱ (سمت راست) نشان داده شده‌اند. افزایش غلظت برای هر سه اسانس موجب افزایش شاخص بازدارندگی شد. در میان این سه اسانس، دارچین بالاترین فعالیت ضد قارچی و مرزۀ خوزستانی کم‌ترین خاصیت ضد قارچی را با توجه به شاخص بازدارندگی (AI) نشان داد. همچنین، مشاهده



شکل ۱. اثر زمان در تماس بودن و غلظت اسانس‌ها (سمت راست) و همبستگی بین مقادیر پیش‌بینی‌شده و واقعی میزان خاصیت ضد قارچی (سمت چپ) برای اسانس‌های دارچین (a)، آویشن شیرازی (b) و مرزۀ خوزستانی (c) بر میزان بازدارندگی رشد قارچ

P. expansum

Figure 1. Effect of time and concentration (right side) and correlation between predicted and actual values of antifungal property (left side) for CEO (a), ZEO (b), and SEO (c) on inhibition of *P. expansum* growth

نسبت به دو اسانس دیگر داشته است. در کل به دلیل اختلاف جزئی بین مقادیر MAPE و R^2 مدل‌ها برای هر سه اسانس، می‌توان نتیجه گرفت که مدل‌های تخمینی اثر غلظت و زمان برای پاسخ خاصیت ضد قارچی در هر سه اسانس دقت بالایی را داشته‌اند. در مدل‌های ارائه شده، علامت مثبت ضرایب نشان‌دهنده اثر افزایشنده و علامت منفی بیانگر اثر کاهشنده آن متغیر بر شاخص بازدارندگی اسانس علیه قارچ است. اثر زمان در هر سه اسانس با ضریب منفی و اثر غلظت با ضریب مثبت آورده شده که بیانگر اثر معکوس زمان تماس بر شاخص بازدارندگی و اثر مستقیم غلظت بر فعالیت ضد قارچی اسانس‌ها است.

از مقادیر R^2 و MAPE مشخص می‌شود که مدل‌های به‌دست‌آمده برای هر سه اسانس، قابلیت پیش‌بینی خاصیت ضد قارچی با دقت بالا را دارا هستند. با مقایسه مقادیر R^2 برای مدل‌های به‌دست‌آمده هر سه اسانس، مشاهده می‌شود عملکرد مدل پیشنهادی برای آویشن شیرازی به مراتب بهتر از مرزۀ خوزستانی و دارچین بوده و مدل پیشنهادی اسانس دارچین کم‌ترین دقت را در مقایسه با سایر اسانس‌ها داشته است؛ اما در مقایسه مدل‌ها بر اساس مقادیر MAPE، با ثابت بودن بهترین عملکرد برای مدل اسانس آویشن شیرازی که کم‌ترین MAPE را داشته است، مدل پیشنهادی برای اسانس مرزۀ خوزستانی با بالاترین MAPE، پایین‌ترین دقت را

جدول ۲. بهترین مدل پیش‌بینی شده اثر غلظت اسانس‌های دارچین، آویشن شیرازی و مرزۀ خوزستانی و زمان برای پاسخ خاصیت ضد قارچی علیه *P. expansum*

Table 2. Best estimated model of the effects of ZEO, CEO, and SEO concentrations and time for response of antifungal activity against *P. expansum*

EOs	Model	R^2	MAPE
CEO	$AI = 104.81 - 2.35A + 31.23B + 3.59AB - 35.99B^2$	0.990	3.48
ZEO	$AI = 113.46 - 1.75A + 87.35B + 2.3AB - 54.41B^2 - 46.43B^3$	0.998	3.62
SEO	$AI = 107 - 5.67A + 78.64B + 2.04AB - 47.83B^2 + 6.68AB^2 - 37.81B^3$	0.995	4.91

۰/۰۸۷ و ۰/۰۹۸ درصد (معادل به ترتیب ۸۷۰ و ۹۸۰ میکرولیتر بر لیتر) حاصل می‌شود. همچنین برای رسیدن به بازدارندگی ۱۰۰ درصدی (IC_{100}) برای اسانس‌های دارچین، آویشن شیرازی و مرزۀ خوزستانی، مقدار غلظت تخمینی به ترتیب برابر با ۲۸۸/۶۶۳، ۶۰۰ و ۵۹۰/۸۴۱ میکرولیتر بر لیتر و میزان زمان تخمین زده شده برابر با ۱۰۸/۶۰۷، ۲۱۶/۴۵۰ و ۲۳۸/۵۴۹ ساعت به دست آمد. برای بازدارندگی کامل رشد قارچ، برخلاف بازدارندگی ۵۰ درصدی، عملکرد اسانس مرزۀ خوزستانی با اختلاف کمی، بهتر از آویشن شیرازی پیش‌بینی شده، اما برای اسانس دارچین همچنان بالاترین خاصیت بازدارندگی در مقایسه با دو اسانس دیگر تخمین زده شده است. در پژوهش انجام شده توسط Nikkiah et al. (2017) کم‌ترین غلظت لازم برای رسیدن به بازدارندگی از رشد قارچ برابر با ۱۲۵۰ میکرولیتر بر لیتر برای

نتایج بهینه‌یابی اثر بازدارندگی اسانس‌ها بر رشد قارچ *P. expansum* در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. برای داشتن ۵۰ درصد بازدارندگی (IC_{50}) بر رشد قارچ بیمارگر به ترتیب غلظت‌های ۱۱۷/۱۰۴، ۱۸۴/۹۲۳ و ۲۰۳/۵۹۷ میکرولیتر بر لیتر و زمان‌های ۳۰۲/۲۱۵، ۲۸۱/۵۱۳ و ۲۲۳/۶۲۱ ساعت برای اسانس‌های دارچین، آویشن شیرازی و مرزۀ خوزستانی لازم است. با توجه به این نتایج و با در نظر گرفتن متغیر غلظت به‌عنوان عامل اصلی مشاهده می‌شود که دارچین، بیش‌ترین خاصیت بازدارندگی و مرزۀ خوزستانی کم‌ترین قابلیت بازدارندگی رشد قارچ تا سطح ۵۰ درصدی را دارد. این نتایج برای دارچین و آویشن شیرازی بسیار کم‌تر از نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش Mohammadi et al. (2015) است. آن‌ها نشان دادند که بازدارندگی ۵۰ درصدی از رشد قارچ برای اسانس دارچین و آویشن شیرازی به ترتیب در غلظت‌های

۰/۱۶ درصد (معادل ۱۶۰۰ میکرولیتر بر لیتر) به دست آمد که بسیار بالاتر از مقدار غلظت تخمینی برای بازدارندگی ۱۰۰ درصدی در مدل حاضر است. دلیل آن می‌تواند ناشی از اختلاف مقدار ترکیب فنولی *cinnamaldehyde* باشد که آن‌ها ۷۶/۳۵ درصد گزارش کردند. (Fathi *et al.* (2012) به کم‌ترین غلظت بازدارندگی ۴۰۰ میکرولیتر بر لیتر برای اسانس دارچین رسیدند که بیشتر از مقدار تخمین‌زده‌شده برای بازدارندگی کامل در مدل حاضر است.

اسانس دارچین گزارش‌شده است که بسیار بالاتر از مقدار IC_{100} تخمین‌زده‌شده در پژوهش حاضر است. این اختلاف می‌تواند ناشی از مقادیر مختلف ترکیبات شیمیایی درون اسانس دارچین به‌ویژه ترکیب اصلی آن یعنی *cinnamaldehyde* باشد که در پژوهش انجام‌شده توسط (Nikkhah *et al.* (2017) مقدار آن ۴۴/۲۵ درصد گزارش‌شده؛ اما این ترکیب در پژوهش حاضر برابر با ۸۸/۸۲ درصد یعنی تقریباً دو برابر به دست آمد. در پژوهش دیگری توسط (Xing *et al.* (2010) کم‌ترین غلظت بازدارنده برای اسانس دارچین

جدول ۳. نتایج بهینه‌یابی اثر بازدارندگی رشد اسانس‌ها در رشد میسلیمی قارچ *P. expansum*

Table 3. Optimization result of the mycelial growth inhibitory effect of essential oils on mycelial growth of *P. expansum*

EOs	Response	Time (h)	Concentration ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	Desirability
CEO	IC=50	302.215	117.104	100
	IC=100	108.607	288.633	100
ZEO	IC=50	281.513	184.923	100
	IC=100	216.450	600	100
SEO	IC=50	223.621	203.597	100
	IC=100	238.549	590.841	100

نمی‌توان سازوکار واحدی برای اثر آن‌ها علیه بیمارگرها در نظر گرفت، بلکه آن‌ها هدف‌های متعددی را در سلول خواهند داشت. این سازوکارها جداگانه عمل نمی‌کنند، بلکه بعضی از آن‌ها توسط سایر ترکیبات تحت تأثیر قرار می‌گیرند. از این جهت، باید اثر سینرژیسم (هم‌افزایی) و آنتاگونیسم (ضدیت اثر) بین اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس‌ها نیز در میزان خاصیت ضد قارچی آن‌ها لحاظ شود. همچنین ساختار شیمیایی ترکیبات یک اسانس بر سازوکار آن اثرگذار است. برای مثال، حضور گروه هیدروکسیل در ترکیبات فنولی مانند *carvacrol* و *thymol* و موقعیت نسبی آن در حلقه فنولیک و نیز وجود گروه کربونیل در *cinnamaldehyde* بر خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های حاوی این ترکیبات اثرگذار است (Burt, 2004).

نتیجه‌گیری کلی

طبق نتایج GC-MS، ترکیبات اصلی اسانس‌های دارچین، آویشن شیرازی و مرزۀ خوزستانی به ترتیب

از دلایل دیگر اختلاف میان نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر با پژوهش‌های پیشین می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: هرچه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خاصیت آن‌ها علیه عوامل بیماری‌زای مواد غذایی بیشتر خواهد بود (Burt, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010). از این رو می‌توان اختلاف کم یا زیاد بین مقادیر ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس‌ها را دلیلی بر مغایرت یا اختلاف در نتایج به‌دست‌آمده دانست. همچنین، تفاوت در ترکیب اسانس به‌دست‌آمده به‌وسیله اسانس‌گیری با روش‌های مختلف می‌تواند خواص ضد میکروبی آن را نیز تحت تأثیر قرار دهد. برای مثال، پژوهش‌ها نشان داده است که اسانس‌های استخراج‌شده به‌وسیله دی‌اکسید کربن فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به اسانس‌های به‌دست‌آمده از روش تقطیر دارند (Burt, 2004). بر اساس این امر، باید روش استفاده‌شده برای استخراج اسانس در پژوهش‌های مختلف را هم به‌عنوان پارامتری مؤثر بر خاصیت ضد قارچی آن‌ها در نظر گرفت. از سوی دیگر، با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی در اسانس گیاهان،

به حساب می‌آیند و منجر به مقاومت میزبان علیه بیمارگرها می‌شوند، مطرح باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه محقق اردبیلی که حمایت مالی این پژوهش را به عهده داشته است نهایت تشکر را دارند. همچنین، قدردانی خود را از شرکت طبیب دارو (اصفهان) برای در اختیار گذاشتن اسانس آویشن شیرازی و دانشگاه شهید بهشتی برای فراهم نمودن قارچ *P. expansum* ابراز می‌نمایند. به علاوه، از جناب آقای مهندس محمد طهماسبی به پاس کمک‌های بی‌شائبه‌شان در طول فرآیند آزمایش‌ها نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

thymol، *cinnamaldehyde* و *carvacrol* بودند. بر اساس این پژوهش، پتانسیل این اسانس‌ها به‌عنوان عامل ضد میکروبی علیه قارچ *P. expansum* تأیید شد. نتایج مدل‌سازی و بهینه‌یابی با استفاده از سطح پاسخ نشان داد که اسانس دارچین با غلظتی کم‌تر از غلظت موردنیاز از دو اسانس دیگر، بهترین عملکرد را در بازدارندگی رشد قارچ داشته است. همچنین، نتایج به‌دست‌آمده با این روش، مقادیر کم‌تری را به‌عنوان غلظت‌های بهینه نسبت به گزارش‌های قبلی برای بازدارندگی ۵۰ و ۱۰۰ درصدی فعالیت قارچ موردبررسی تخمین زد. از این‌رو، در صورت آزمایش‌های تکمیلی می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی که سمی هستند و تهدیدی جدی برای سلامت بشر و زیست‌بوم

REFERENCES

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). (pp.54-788). Allured publishing corporation Carol Stream, IL.
- Alizadeh-Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R., & Safaie, N. (2010). Essential oils inhibit mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*. *European Journal of Horticultural Science*, 75(6), 278-282.
- Arras, G., & Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1025-1029.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21(1), 33-42.
- Behdani, M., Pooyan, M., & Abbasi, S. (2012). Evaluation of antifungal activity of some medicinal plants essential oils against *Botrytis cinerea*, causal agent of postharvest apple rot, in vitro. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(14), 1012-1016.
- Bertetti, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. (2008). Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides in Italian vineyards. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 73(2), 273-282.
- Brooks, C., Cooley, J. S., & Fisher, D. (1920). *Diseases of apples in storage*. (pp. 15-16). US Department of Agriculture.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Bus, V., Bongers, A., & Risse, L. (1991). Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Disease*, 75(11), 1098-1100.
- Davari, M., & Ezazi, R. (2017). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. *Journal de mycologie medicale*, 27(4), 463-468.
- Ebadollahi, A., Taghinezhad, E., & Davari, M. (2018). Optimization of antifungal and insecticidal effects of garden thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil through Response Surface Methodology. *Journal of biological control of pests and plant diseases*, 7(1), 9-19. (In Farsi)
- Eren, İ., & Kaymak-Ertekin, F. (2007). Optimization of osmotic dehydration of potato using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 344-352.

14. Etemadi, N. A., Behdad, M., & Zeinali, H. (2012). Antifungal effects of three plant essential oils against *Botrytis cinerea*: the cause of gray mold on strawberry. *Journal of Research in Agricultural Science*, 8(2), 165-170.
15. Farzaneh, M., Kiani, H., Sharifi, R., Reisi, M., & Hadian, J. (2015). Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest biology and technology*, 109, 145-151.
16. Fathi, Z., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., & Meshkatsadat, M. H. (2012). The potential of thyme, clove, cinnamon and ajowan essential oils in inhibiting the growth of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(1), 38-47.
17. Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A. A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A., & Javan, A. J. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2397-2400.
18. Goepfert, J. (1980). Vegetables, fruits, nuts, and their products. *Microbial ecology of foods*, 2, 606-642.
19. Jalili Marandi, R., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A., & Sefidkon, F. (2011). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4), 626-634.
20. Kashani Nezhad, M., & Kashani Nezhad, M. (2015). Design and analysis of tests in food industry using Design Expert 9. Publication of Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran. 1st edition. ISBN: 9789648926873- 9648926875. (In Farsi).
21. Jiang, C., Shi, J., Liu, Y., & Zhu, C. (2014). Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control*, 35(1), 41-48.
22. Kordsardouei, H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2013). Application of *Zataria multiflora* Boiss. and *Cinnamon zeylanicum* essential oils as two natural preservatives in cake. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(3), 238-255.
23. Laidou, I., Thanassouloupoulos, C., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2001). Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. *Journal of Phytopathology*, 149(7-8), 457-461.
24. Mahmoudvand, H., Mahmoudvand, H., Oliae, R. T., Kareshk, A. T., Mirbadie, S. R., & Aflatoonian, M. R. (2017). In vitro protoscolicidal effects of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and its toxicity in mice. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 3), S652.
25. Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S. (2015). The control of *Botrytis* fruit rot in strawberry using combined treatments of Chitosan with *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7441-7448.
26. Morales, H., Marín, S., Obea, L., Patiño, B., Doménech, M., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2008). Ecophysiological characterization of *Penicillium expansum* population in Lleida (Spain). *International journal of food microbiology*, 122(3), 243-252.
27. Nabavi-Pelesaraei, A., Rafiee, S., Mohtasebi, S. S., Hosseinzadeh-Bandbafha, H., & Chau, K.-w. (2018). Integration of artificial intelligence methods and life cycle assessment to predict energy output and environmental impacts of paddy production. *Science of the Total Environment*, 631, 1279-1294.
28. Naybandi Atashi, S., Mortazavi, S. A., Tabatabaei Yazdi, F., & Kouchaki, A. (2012). Investigation of synergistic effects of essential oils, *Thymus vulgaris*, *Mentha spp.*, and *Ziziphora tenuifolia* in inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 as in vitro assay using Response Surface Methodology (RSM). *Innovation in Food Science and Technology*. 6(4), 19-30. (In Farsi).
29. Nikkhah, M., Hashemi, M., Najafi, M. B. H., & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International journal of food microbiology*, 257, 285-294.
30. Oguaghamba, O., & Onyia, M. (2019). Modified and generalized full cubic polynomial response surface methodology in engineering mixture design. *Nigerian Journal of Technology*, 38(1), 52-59.
31. Pirbalouti, A. G., & Moalem, E. (2013). Variation in antibacterial activity of different ecotypes of *Satureja khuzestanica* Jamzad, as an Iranian endemic plant. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 12(4), 623-629.
32. Rasool, M., Malik, A., Alam, M. Z., Afzal, M., Alam, R., Arsalan, H. M., . . . Haque, A. (2018). Optimization of antibacterial activity of ethanolic extracts of *Eucalyptus tereticornis* and *Nigella sativa*: Response surface Methodology. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 31(4), 623-629.
33. Razavi, M. S., Asghari, A., Azadbakht, M., & Shamsabadi, H. (2018). Analyzing the pear bruised volume after static loading by Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Scientia Horticulturae*. 229. 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.01>.

34. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M., & Khalighi-Sigaroodi, F. (2010). Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1562-1567.
35. Safari, N., Hemmati, R., Farzane, M., & Chegini, S. (2014). Study on three essential oils from *Mentha piperita*, *Thymus daenensis* and *Satureja khuzistanica* for controlling *Penicillium expansum* against of Apple Blue Mould. *Applied Researches in Plant Protection*, 3(1), 19-33. (In Farsi)
36. Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International journal of food microbiology*, 91(2), 185-194.
37. Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
38. Valero, M., & Salmeron, M. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 73-81.
39. Wisniewski, M. E., & Wilson, C. L. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*, 27(2), 94-98.
40. Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., & Lu, Y. (2010). Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International journal of food science & technology*, 45(9), 1837-1842.
41. Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R., & Biniaz, M. (2014). Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. *Journal of immunotoxicology*, 11(1), 50-55.
42. Zomorodian, K., Ghadiri, P., Saharkhiz, M. J., Moein, M. R., Mehriar, P., Bahrani, F., . . . Fani, M. M. (2015). Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2), 1-6.