



عصاره اتانولی کور (*Capparis spinosa*): فنل، فلاونوئید، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی آن بر انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیوتوژنز محمد نوشاد^{۱*}، بهروز عزیزاده بهبهانی^۲، مصطفی رحمتی جنیدآباد^۳

۱- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

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

۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳

کلمات کلیدی:

عصاره،

گیاه کور،

ترکیبات فنولی،

اثر ضد میکروبی،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

DOI: 10.52547/fsct.19.124.207

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.7.2

* مسئول مکاتبات:

Noshad@asnrukh.ac.ir

گیاهان همیشه منبع اصلی غذا و دارو برای انسان بوده‌اند. عصاره‌های گیاهی به عنوان ضد میکروب، تقویت کننده طعم، عوامل نگهدارنده و مواد مغذی در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. عصاره‌های گیاهی کاندیدای فوق‌العاده‌ای برای جایگزینی ترکیبات سنتزی هستند که اثرات سمی و سرطان‌زا دارند. در این پژوهش، عصاره اتانولی میوه گیاه کور (*Capparis spinosa*) با روش ماسراسیون استخراج گردید و میزان فنول تام (به روش فولین سیوکالچو)، فلاونوئید تام (به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) و اثر ضد میکروبی آن (به روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی) در برابر باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیوتوژنز بررسی گردید. میزان فنول تام و فلاونوئید تام عصاره به ترتیب برابر با ۴۰/۲۸ mg GAE/g و ۵/۲۰ mg QE/g بدست آمد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی میوه گیاه کور بر پایه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۵۲/۷۳ و ۵۸/۶۲ درصد بود. اثر ضد میکروبی عصاره وابسته به غلظت آن و نوع باکتری بود؛ بطوریکه افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد در آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار گردید. علاوه بر این، باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیوتوژنز) حساسیت بالاتری نسبت به انواع گرم منفی (انتروباکتر آئروژنز و اشرشیا کلی) در برابر عصاره نشان دادند. همچنین، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره اتانولی میوه گیاه کور بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره اتانولی میوه گیاه کور قابلیت استفاده بعنوان افزودنی طبیعی در انواع محصولات غذایی را دارا می‌باشد.

۱- مقدمه

نگهداری مواد غذایی کیفیت و ایمنی آن‌ها را افزایش می‌دهد. کیفیت و ایمنی مواد غذایی به دلیل خواص ذاتیماده غذایی یا به دلیل آلودگی میکروبیو شیمیایی کاهش می‌یابد. بطور کلی، فساد مواد غذایی ناشی از میکروارگانیسم‌ها هنوز هم به طور گسترده بر انواع مواد غذایی تأثیر می‌گذارد و حتی در کشورهای توسعه‌یافته باعث هدر رفتن و از بین رفتن مواد غذایی می‌شود. تخمین زده شده است که هدر رفت سالانه مواد غذایی به دلیل عوامل مختلفی از جمله فساد توسط میکروارگانیسم‌ها به ۴۰ درصد می‌رسد. باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها انواع رایج میکروارگانیسم‌ها هستند که مسئول فساد بسیاری از مواد غذایی و محصولات غذایی هستند [۱]. بیماری‌های ناشی از مواد غذایی دیگری از مشکلات ایمنی غذایی فراگیر ناشی از مصرف محصولات غذایی آلوده است که بعنوان نگرانی ایمنی قابل توجه برای سلامت عموم شناخته می‌شود [۲، ۳]. رویکردهای مختلفی برای غلبه بر این مشکلات به کار گرفته شده است. استفاده از مواد نگهدارنده یکی از این روش‌هاست. به دلیل نگرانی‌های ایمنی و سم‌شناسی در مورد نگهدارنده هایستری و آگاهی مصرف‌کنندگان، تقاضا برای مواد طبیعی و نگهدارنده‌هایی درجه غذایی افزایش یافته است. گیاهان دارویی گزینه بسیار مناسبی در این زمینه می‌باشند؛ زیرا به وفور وجود دارند و منابع غنی از ترکیبات زیست فعال هستند که به عنوان نگهدارنده طبیعی در محصولات غذایی مختلف عمل می‌کنند [۳-۵].

اخیراً، بسیاری از محققین امکان استفاده از برخی عصاره‌های گیاهی را به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مؤثر بررسی کرده‌اند [۳، ۶-۸]. به طور سنتی، عصاره بخش‌های مختلف گیاهان دارویی، از جمله ریشه، ساقه، گل، میوه و شاخه‌ها به طور گسترده برای درمان برخی بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار می‌گرفت [۹]. گیاهان دارویی چندین ماده شیمیایی زیست فعال مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و ترپنوئیدها هستند که دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند [۲، ۱۰]. فعالیت‌های ضد میکروبی برخی از گونه‌های گیاهی به طور گسترده‌ای مورد تحقیق قرار گرفته است. به عنوان مثال، عصاره‌های دارچین، سیر، ریحان، کاری،

زنجبیل، مریم‌گلی، خردل و سایر گیاهان دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند [۱۱-۱۴]. گیاه کور (*Capparis spinosa*) از خانواده *Capparaceae* است. این گیاه مصارف سنتی و پزشکی زیادی دارد. از گیاه برای درمان روماتیسم، از ریشه به عنوان مدر، قابض و مقوی، از پوست ریشه که طعم تلخی دارد به عنوان اشتهاآور، قابض، مقوی و برای درمان بواسیر و بیماری طحال، از دم کرده ساقه و پوست ریشه به عنوان ضد اسهال و تب بر، از میوه‌های تازه در درمان سیاتیک و آبریزش و از میوه خشک و پودر شده همراه با عسل در درمان سرماخوردگی، روماتیسم، نقرس، سیاتیک و کمردرد استفاده شده است [۱۵]. ترکیبات شیمیایی قسمت‌های مختلف گیاه شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، گلوکوزینولات‌ها، اسیدهای فنولیک، ترپنوئیدها و غیره است. بخش‌های مختلف گیاه کور از نظر اثرات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفته است. بطور مثال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی دانه [۱۶]، عصاره متانولی جوانه [۱۷]، عصاره آبی جوانه [۱۸]، و عصاره اتانولی میوه [۱۹] این گیاه در مطالعات مختلف گزارش شده است. علاوه بر این، یافته‌های جرمانو همکاران (۲۰۰۲) در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی جوانه گیاه کور نشان داد که (الف) کارایی آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی ممکن است به محتوای فنولی آن نسبت داده شود و (ب) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی پس از حذف گلوکوزینولات‌ها حفظ شد و تأیید می‌کند که این ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره تداخلی ندارند [۲۰]. همچنین، فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی جوانه گیاه روی باکتری‌های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و بر سویه‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *سیتروباکتر*، *سراتیا مارسسنس* در مطالعه بوریچ و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است [۱۷]. با توجه به فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع بخش‌های مختلف گیاه کور، این مطالعه با هدف استخراج عصاره اتانولی میوه این گیاه و بررسی میزان فنول تام، فلاونوئید تام، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد میکروبی آن علیه باکتری‌های پاتوژن و عامل مسمومیت انجام گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

معرف^۱ ABTS، کوئرستین، اسید گالیک و DPPH^۲ از شرکت سیگما خریداری شد. محیط کشت مولر هیتون براث و آگار از شرکت مرک تهیه شدند. سایر مواد مورد استفاده در این پژوهش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- استخراج عصاره

میوه گیاه کور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. استخراج عصاره مطابق روش کائو همکاران (۲۰۱۰) انجام گردید. برای این منظور، میوه‌ها (۱۰۰ گرم) به قطعات کوچک آسیاب شده و سپس دو بار با اتانول ۹۵ درصد (۸۰۰ میلی‌لیتر) در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت استخراج و دو محلول با همدیگر ادغام شدند. محلول سپس فیلتر گردید و در نهایت تحت خلأ تا رسیدن به ۱۰/۲۶ گرم عصاره خشک شد. عصاره بدست آمده در ظروف تیره در دمای یخچال نگهداری گردید [۱۹].

۲-۳- اندازه‌گیری میزان فنول تام

روش فولین-سیوکالچو برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل عصاره استفاده شد. برای این منظور، ۲۰ میکرولیتر عصاره (۱۰ گرم در لیتر) با ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالچو و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. محلول به دست آمده به مدت ۳ دقیقه نگهداری شد و محلول Na₂CO₃ (۳۰۰ میکرولیتر) به آن اضافه شد. پس از همزدن محلول به مدت ۲ ساعت، جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر از طریق اسپکتروفتومتر قرائت شد. اسید گالیک (صفر-۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج به صورت میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره خشک (mg GAE/g) بیان گردید [۲۱].

۲-۴- اندازه‌گیری میزان فلاونوئید تام

محتوای فلاونوئید کل عصاره بر اساس روش نوشاد و همکاران (۲۰۲۱) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، نمونه (۰/۵ میلی‌لیتر) با ۳۰۰ میکرولیتر محلول NaNO₂ شارژ شد و مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۵ دقیقه در

دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله بعد، AlCl₃ (۳۰۰ میکرولیتر)، NaOH (۱ مولار) و آب مقطر (۱/۹ میلی‌لیتر) اضافه شد و محلول به مدت ۱۰ ثانیه همزده شد. سپس جذب محلول در ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید و میزان فلاونوئید تام عصاره به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم از عصاره (mg QE/g) بیان شد [۲۲].

۲-۵- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲-۵-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

برای این منظور، ۳۷/۵ میکرولیتر از عصاره ی اتانول (نمونه کنترل) با ۲ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH (۱۰ میلی‌مولار) مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند و سپس جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر اتانول اندازه‌گیری شد. برای محاسبه فعالیت مهار رادیکال DPPH عصاره از رابطه زیر استفاده شد [۲۳]:

$$DPPH (\%) = \frac{A \text{ control} - A \text{ sample}}{A \text{ control}} \times 100$$

۲-۵-۲- مهار رادیکال آزاد ABTS

در این روش، حجم مساوی از پرسولفات پتاسیم ۲/۴۵ میلی‌مولار و ۷ ABTS میلی‌مولار مخلوط شدند و محلول حاصل در دمای اتاق به مدت ۱۶ ساعت در مکانی تاریک نگهداری شد تا کاتیون‌های رادیکال ABTS تولید شود. پس از آن، متانول به محلول رادیکال ABTS اضافه شد تا به جذب ۰/۷±۰/۲ در ۷۳۴ نانومتر برسد. محلول رادیکال ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) سپس به طور کامل با ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره یا متانول (کنترل) مخلوط شد و پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۶ دقیقه، جذب آن در ۷۳۴ نانومتر در برابر متانول به عنوان شاهد خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نهایت به صورت زیر تعیین شد [۲۴]:

$$ABTS (\%) = \frac{A \text{ control} - A \text{ sample}}{A \text{ control}} \times 100$$

۲-۶- فعالیت ضد میکروبی

روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹) به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره در برابر باکتری‌های انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز، مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد استفاده قرار گرفت [۲۱]. ابتدا باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط

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

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول موجود در چاهک‌های بدون رشد میکروبی (در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی) روی محیط مولر هیتون آگار در پلیت کشت داده شد. پلیتها متعاقباً در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و کمترین غلظت عصاره که سویه‌های باکتریایی را از بین برد، که با عدم وجود کلنی‌های قابل مشاهده در سطح محیط تائید گردید، به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره در نظر گرفته شد.

۲-۷- آنالیز آماری

تمامی داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار SPSS و با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) آنالیز شدند. نتایج به صورت "انحراف معیار±میانگین" گزارش گردید و آزمون‌ها در سه مرتبه تکرار شدند.

۳- نتایج و بحث

میزان فنول تام و فلاونوئید تام عصاره اتانولی میوه گیاه کور در شکل ۱ گزارش شده است. عصاره حاوی 40.1 ± 0.35 mg GAE/g فنول کل و $4.0/28 \pm 0.35$ mg QE/g (۱۰/۵ ± ۵/۲۰) فلاونوئید کل بود. علاوه بر این، نتایج درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS عصاره در شکل ۲ ارائه شده است. عصاره اتانولی میوه گیاه کور بطور مؤثری قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ($52/73 \pm 0/48$ درصد) و ABTS ($58/62 \pm 0/44$ درصد) بود. مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و الکلی بخش‌های مختلف گیاه کور انجام شده است.

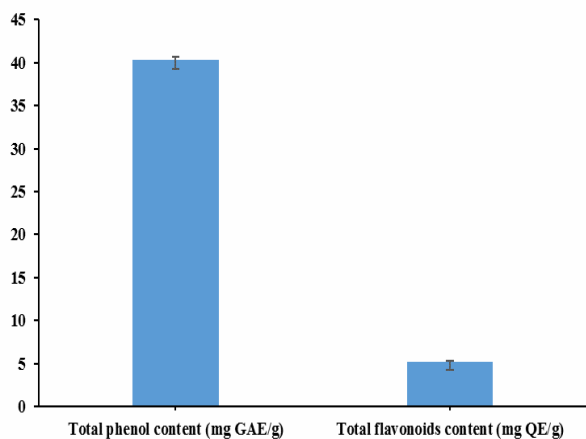


Fig 1 Total phenols and flavonoids content of *Capparis spinosa* ethanolic extract.

کشت مولر هیتون برات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط استریل کشت داده شدند. سپس محیط استوک بدست آمده در نوترینت آگار کشت داده شد و چندین بار با محلول رینگر استریل شسته شد تا سوسپانسیون میکروبی تازه تهیه شود. در نهایت با اندازه‌گیری کدورت سوسپانسیون در ۶۲۵ نانومتر، سوسپانسیون میکروبی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند یا $10^6 \text{ Colony forming unit/mL} \times 1/5$ بدست آمد.

۲-۶-۱- دیسک دیفیوژن آگار

سوسپانسیون میکروبی روی ظروف پتری‌دیش حاوی مولر هیتون آگار کشت سطحی داده شد. عصاره (۲۰ میکرولیتر) روی دیسک‌های بلانک با قطر ۶ میلی‌متر ریخته شد و سپس دیسک‌ها روی محیط کشت تلقیح شده قرار گرفتند. در ادامه، ظروف پتری دیش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت قطر ناحیه بازدارندگی اطراف دیسک‌های کاغذی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید.

۲-۶-۲- چاهک آگار

در این روش، سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط مولر هیتون آگار در پتری دیش پخش شد. سپس چندین چاهک (به قطر ۶ میلی‌متر) روی سطح محیط ایجاد و با عصاره (۲۰ میکرولیتر) پر شدند. ظروف پتری دیش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و قطر نواحی بازدارنده اطراف چاهک اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر بیان شد.

۲-۶-۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی

ابتدا غلظت‌های متوالی عصاره (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در محیط مولر هیتون برات تهیه و با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۴۵ میکرونی استریل شد. هر غلظت (۱۰۰ میکرولیتر) از عصاره به چاهک‌هایی که از قبل با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی پر شده بودند، اضافه شد. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، ۱۰ میکرولیتر محلول ۵ درصد تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید به چاهک اضافه شد و پلیت مجدداً گرمخانه‌گذاری گردید. کمترین غلظت عصاره که سبب مهار رشد میکروبی گردید (عدم وجود رنگ قرمز تیره یا ارغوانی در چاهک‌ها) به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره در نظر گرفته شد.

گزارش دادند که این فعالیت ممکن است به ترکیبات زیست فعال مانند روتین، کامپفرول ۳-O-روتینوزید، ایزورامتین ۳-O-روتینوزید و مشتقات سیناموئیلکینیک اسید مربوط باشد [۲۹]. در مطالعه‌های دیگر، عصاره متانولی دانه‌های جمع‌آوری شده در مناطق مختلف کشور تونس استخراج و قدرت آنتی‌اکسیدانی آنها از طریق آزمون‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، DPPH و ABTS مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که محتوای پلی‌فنول‌ها در عصاره‌ها بر اساس منشأ جغرافیایی و شرایط اقلیمی متفاوت است. ترکیبات شناسایی شده در همه نمونه‌ها عبارت بودند از اسید گالیک، نارینجین، مورین، متیل-۴-هیدروکسی بنزوات، جنیستین، فلاونوز و چالکون. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره حاصل از دانه‌های گیاه کور در مقایسه با کوئرستین استاندارد قابل توجه بود. علاوه بر این، فعالیت مهار رادیکال، تعیین شده با روش‌های DPPH و ABTS، در برخی موارد قابل توجه بود و مقادیر IC₅₀ (به ترتیب ۳/۵ و ۲/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره کمتر از کنترل‌های مثبت مانند BHT و Trolox (۱۷/۳ و ۳/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ترتیب) بود [۱۶]. همچنین، گزارش شده است که عصاره متانولی میوه گیاه کور با محتوای فنول کل ۱۲۰ mg GAE/100 g قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS می‌باشد [۳۲]. بعلاوه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی میوه گیاه کور ممکن است به دلیل فلاونوئیدهایی مانند مشتقات کوئرستین و کامپفرول و اسیدهای هیدروکسی سینامیک در آن باشد [۳۳].

نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره بر اساس آزمون دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۳ ارائه شده است. اثر ضد میکروبی عصاره وابسته به غلظت بود و افزایش غلظت آن سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد اطراف کلنی باکتری‌ها گردید. علاوه بر این، رفتار باکتری‌ها در برابر عصاره متفاوت بود؛ در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره، استافیلوکوکوس اورئوس با بالاترین قطر هاله عدم رشد (۱۶/۲۰ میلی‌متر) و انتروباکتر آئروژنز با کمترین قطر هاله عدم رشد (۱۳ میلی‌متر) به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های باکتریایی نسبت به عصاره بودند. همچنین، حساسیت باکتری‌های گرم مثبت در برابر عصاره اتانولی میوه گیاه کور در مقایسه با سویه‌های گرم منفی بالاتر بود.

کائو همکاران (۲۰۱۰) میزان فلاونوئید کل عصاره اتانولی میوه گیاه کور را معادل ۵/۴۳۹ درصد وزنی/وزنی برحسب روتین گزارش نمودند [۱۹]. در مطالعه‌های دیگر، محتوای فنول کل و فلاونوئید کل عصاره اتانولی برگ گیاه کور به ترتیب ۵۷/۹۳ mg QE/g و ۴۲۷/۲۷ GAE/g گزارش شده است [۲۵]. فتاحی و رحیمی (۲۰۱۶) با بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی از برگ گیاه کور گزارش دادند که تحت شرایط بهینه (۴۹ درصد اتانول؛ دمای ۵۱/۸ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به مواد ۵۰)، میزان فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به ترتیب ۲۷/۴۴ mg GAE/g، ۲۶/۰۷ mg QE/g و ۸۵/۷۴ درصد می‌باشد [۲۶].

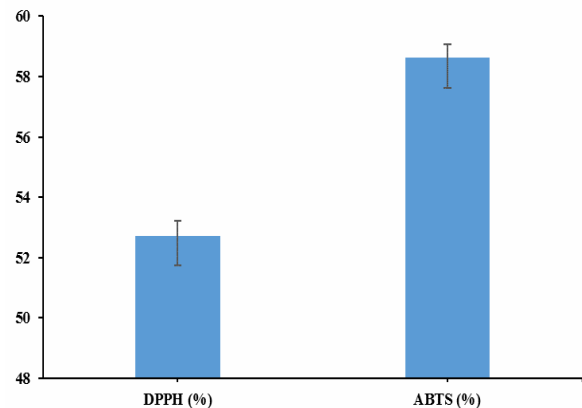


Fig 2 DPPH and ABTS free radical scavenging activity of *Capparis spinosa* ethanolic extract.

انواع مختلفی از فلاونوئیدها در گیاه کور شناسایی شده‌اند. کوئرستیناز جوانه‌های گیاه جداسازی شده است [۲۷]. در حالی که مشتقات مختلفی از گلیکوزیدهای آن در میوه‌ها و سایر بخش‌های گیاه شناسایی شده‌اند [۲۸]. به نظر می‌رسد فراوان‌ترین فلاونوئید، هم در جوانه‌ها و هم در میوه‌ها، روتین باشد [۲۷، ۲۸]. مشتق آگلیکون کوئرستین، ایزورامتین و گلیکوزید روتینوزید آن نیز توسط محققین مختلف جداسازی شده است [۲۹]. از فلاونوئیدهای دیگر جداسازی شده از میوه‌ها و جوانه‌های گیاه می‌توان به کامپفرول و گلیکوزیدهای آن اشاره نمود [۳۰، ۳۱].

سیراکوزا و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالا و وابسته به غلظت جوشانده گل‌های گیاه کور را از طریق روش‌های آنتی‌اکسیدانی DPPH، رنگبری بتاکاروتن و اکسیداسیون لیپوپروتئین با دانسیته پایین نشان دادند و

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره اتانولی میوه گیاه کور در جدول ۱ قابل مشاهده است. مطابق نتایج، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با حداقل غلظت مهارکنندگی ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حساس‌ترین سویه باکتریایی نسبت به عصاره اتانولی گیاه می‌باشد که با نتایج آزمون‌های ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار همخوانی دارد.

Table 1 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Capparis spinosa* extract on some pathogenic bacteria

Microorganism	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16	> 512
<i>Escherichia coli</i>	16	> 512
<i>Listeria monocytogenes</i>	16	> 512
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	512

مطابق نتایج این پژوهش، باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، نسبت به غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی میوه گیاه کور حساسیت بیشتری نشان دادند که عمدتاً به دلیل وجود یک لایه موکوپتید در غشای سلولی آنها است که آنها را نسبت به عوامل ضد میکروبی حساس‌تر می‌کند. در مقابل، غشای سلولی باکتری‌های گرم منفی حاوی یک لایه لیپولی ساکارید و فسفولیپیدی پیچیده‌تری می‌باشد که سبب کاهش سرعت انتشار ترکیبات ضد میکروبی در داخل سلول باکتریایی می‌شود [۳، ۶، ۷، ۱۰، ۲۳، ۳۴].

فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی جوانه گیاه کور بر روی باکتری‌های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و بر روی سویه‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *سیتروباکتر*، *سراتیا مارسسنس* در مطالعه بوریچ و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است [۱۷]. فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های پترولیوم اتر، آب، بوتانول، متانول و هگزان خام به دست آمده از اندام‌های هوایی گیاه کور با روش انتشار چاهک آگار مورد بررسی قرار گرفته است. فراکسیون‌های مختلف فعالیت ضد میکروبی خوب تا متوسط را در برابر بیشتر باکتری‌های آزمایش شده نشان دادند و عصاره‌ها در برابر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استرپتوکوکوس فکالیس* بیشتر

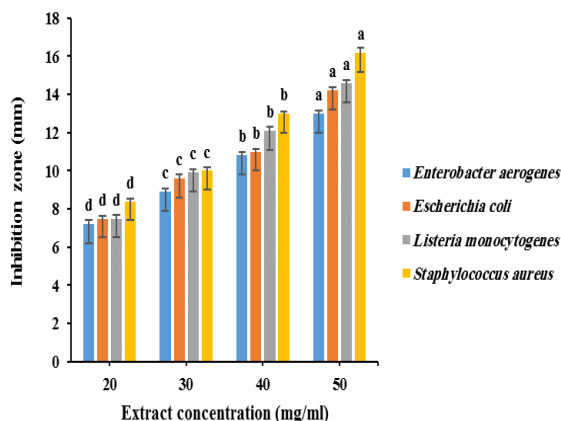


Fig 3 Antimicrobial activity of *Capparis spinosa* ethanolic extract, based on disk diffusion agar.

شکل ۴، نتایج اثر ضد میکروبی عصاره در برابر باکتری‌های پاتوژن و عامل مسمومیت به روش چاهک آگار را نشان می‌دهد. نتایج هماهنگ با یافته‌های آزمون دیسک دیفیوژن آگار بود؛ بطوریکه افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد گردید و باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر آئروژنز* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی در برابر عصاره اتانولی میوه گیاه کور بودند. با اینحال، لازم به ذکر است که قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار بزرگ‌تر از آزمون دیسک دیفیوژن آگار بود که این حالت ممکن است ناشی از این حقیقت باشد که گونه‌های باکتریایی در روش چاهک آگار در تماس مستقیم با عصاره هستند، اما سرعت انتشار عامل ضد میکروبی از سطوح دیسک به محیط، اثر بازدارندگی آن را در آزمایش دیسک دیفیوژن آگار تعیین می‌کند [۲۳].

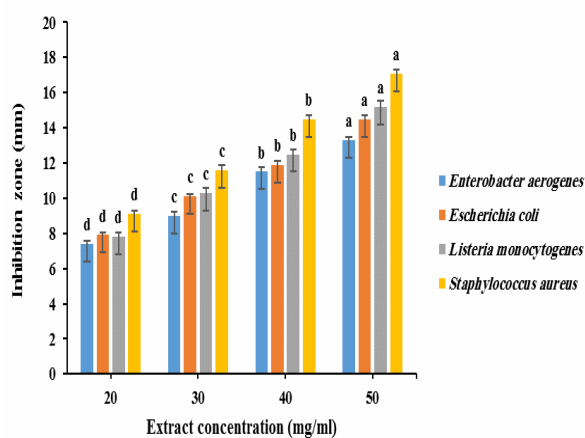


Fig 4 Antimicrobial activity of *Capparis spinosa* ethanolic extract, based on well diffusion agar.

- and Spoilage Microorganisms," (in English), *Frontiers in Microbiology*, Original Research vol. 9, 2018-July-24 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01639.
- [2] B. Alizadeh Behbahani, F. Falah, A. Vasiee, and F. Tabatabaee Yazdi, "Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil," *Food Science & Nutrition*, vol. 9, no. 5, pp. 2458-2467, 2021.
- [3] B. Alizadeh Behbahani, F. Tabatabaee Yazdi, S. Fakhri, and F. Riazi, "Antifungal Effect Of The Aqueous And Ethanolic Avicennia Marina Extracts On Alternaria Citri And Penicillium Digitatum," *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, vol. 18, no. 2, p. e5992, 2016.
- [4] M. A. Shah and S. A. Mir, "Chapter 6 - Plant extracts as food preservatives," in *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, S. A. Mir, A. Manickavasagan, and M. A. Shah Eds.: Academic Press, 2022, pp. 127-141.
- [5] S. Heydari, H. Jooyandeh, B. Alizadeh Behbahani, and M. Noshad, "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*, vol. 8, no. 12, pp. 6497-6512, 2020.
- [6] B. Alizadeh Behbahani, F. Tabatabaee Yazdi, H. Noorbakhsh, F. Riazi, A. Jajarmi, and F. Tabatabaee Yazdi, "Study Of The Antibacterial Activity Of Methanolic And Aqueous Extracts Of Myrtus Communis On Pathogenic Strains Causing Infection," *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, vol. 18, no. 2, 2016.
- [7] M. Hojjati and B. Alizadeh Behbahani, "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*, vol. 17, no. 1, pp. 83-91, 2021.
- [8] Z. Sosani Gharibvand, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and H. Jooyandeh, "Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of *Callistemon Citrinus*

فعال بودند [۳۵]. در مطالعه‌ای دیگر، مشخص گردید که عصاره‌های پترولیوم اتر، متانول، هگزان، بوتانول و آبی قسمت‌های هوایی گیاه کور درجات مختلفی از فعالیت ضد میکروبی را نشان دادند. عصاره‌ها دارای فعالیت کم تا متوسط در برابر چهار گونه باکتری *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا تیفی* موریم بودند [۳۶]. بطور کلی، مقایسه نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر محققین نشان می‌دهد که اختلاف میان اعداد گزارش شده برای میزان فنول، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره ممکن است ناشی از شرایط کشت گیاه، زمان جمع‌آوری گیاه، شرایط آب و هوایی و همچنین نوع حلال و شرایط استخراج و روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات باشد [۵، ۸، ۱۳، ۳۷-۴۰].

۴- نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی میوه گیاه کور دارای میزان بالایی از ترکیبات فنولی می‌باشد؛ بطوریکه عصاره فعالیت مهارکنندگی بالایی در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS نشان داد. علاوه بر این، عصاره اتانولی میوه گیاه کور اثر ضد میکروبی بالایی در برابر باکتری‌های پاتوژن *اتروبوکتر آئروژنز*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیژنوز* نشان داد و اثر ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر مشهود بود. بطور کلی، عصاره اتانولی میوه گیاه کور را می‌توان جهت افزایش پایداری اکسایشی و میکروبی محصولات غذایی مختلف استفاده نمود. اگرچه مطالعات گسترده‌تری به منظور بررسی سمیت بالقوه عصاره اتانولی میوه گیاه کور نیاز است.

۵- 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.

۶- منابع

- [1] F. D. Gonelimali *et al.*, "Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens

- "Free radical, metal-chelating and antibacterial activities of methonolic extract of *Capparis spinosa* buds," *Adv. Environ. Biol.*, vol. 5, no. 2, pp. 281-287, 2011.
- [18] A. Goel, A. Garg, and A. Kumar, "Effect of *Capparis spinosa* Linn. extract on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats," *NISCAIR-CSIR*, vol. 54, pp. 126-132, 2016.
- [19] Y.-l. Cao, X. Li, and M. Zheng, "*Capparis spinosa* protects against oxidative stress in systemic sclerosis dermal fibroblasts," *Archives of dermatological research*, vol. 302, no. 5, pp. 349-355, 2010.
- [20] M. P. Germanò, R. De Pasquale, V. D'Angelo, S. Catania, V. Silvani, and C. Costa, "Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant Source," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 5, pp. 1168-1171, 2002/02/01 2002, doi: 10.1021/jf010678d.
- [21] B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and F. Falah, "Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy," *Microbial pathogenesis*, vol. 136, p. 103716, 2019.
- [22] M. Noshad, B. Alizadeh Behbahani, H. Jooyandeh, M. Rahmati - Joneidabad, M. E. Hemmati Kaykha, and M. Ghodsi Sheikhjan, "Utilization of Plantago major seed mucilage containing Citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf - life of buffalo meat under refrigeration conditions," *Food Science & Nutrition*, vol. 9, no. 3, pp. 1625-1639, 2021.
- [23] B. Alizadeh Behbahani, F. Falah, F. Lavi Arab, M. Vasiee, and F. Tabatabaee Yazdi, "Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil," *Evidence-based complementary and alternative medicine*, vol. 2020, 2020.
- [24] H. Barzegar, B. Alizadeh Behbahani, and M. A. Mehrnia, "Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study," *Food Science and Biotechnology*, vol. 29, no. 5, pp. 717-728, 2020.
- Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study," *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, vol. 19, no. 5, pp. 463-484, 2020.
- [9] U. A. Khan *et al.*, "Antibacterial activity of some medicinal plants against selected human pathogenic bacteria," *European Journal of Microbiology and Immunology*, vol. 3, no. 4, pp. 272-274, 2013.
- [10] A. Alghooneh, B. Alizadeh Behbahani, H. Noorbakhsh, and F. T. Yazdi, "Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing *Satureja bachtiarica* extracts," *Microbial pathogenesis*, vol. 85, pp. 58-65, 2015.
- [11] N. Alzoreky and K. Nakahara, "Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia," *International journal of food microbiology*, vol. 80, no. 3, pp. 223-230, 2003.
- [12] S. Castro, C. Leal, F. Freire, D. Carvalho, D. Oliveira, and H. Figueiredo, "Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, pp. 756-760, 2008.
- [13] B. Alizadeh Behbahani, and F. Shahidi, "Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity," *Nutr. Food Sci Res*, vol. 6, pp. 17-25, 2019.
- [14] F. Shahidi, F. Tabatabaee Yazdi, B. Alizadeh Behbahani, S. Roshanak, N. Norouzi, and A. Vasiee, "Antibacterial Effect of *Tragopogon graminifolius* Extract on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* "in vitro"," *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, vol. 24, no. 84, pp. 1-10, 2019.
- [15] R. Rahnavard and N. Razavi, "A review on the medical effects of *Capparis spinosa* L," *Future Natural Products*, vol. 3, no. 1, pp. 44-53, 2017. [Online]. Available: http://futurenatprod.skums.ac.ir/article_20857_5e080671f14fac89dd3ffd9fe45f1adb.pdf.
- [16] N. Tlili, H. Mejri, F. Anouer, E. Saadaoui, A. Khaldi, and N. Nasri, "Phenolic profile and antioxidant activity of *Capparis spinosa* seeds harvested from different wild habitats," *Industrial Crops and Products*, vol. 76, pp. 930-935, 2015.
- [17] H. Bouriche, N. Karnouf, H. Belhadj, S. Dahamna, D. Harzalah, and A. Senator,

- [34] B. Alizadeh Behbahani, F. Tabatabaei Yazdi, S. A. Mortazavi, F. Zendeboodi, M. M. Gholian, and A. Vasiee, "Effect Of Aqueous And Ethanolic Extract Of Eucalyptus Camaldulensis L. On Food Infection And Intoxication Microorganisms "In Vitro"," *Journal of Paramedical Sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 89-99, 2013.
- [35] A. S. A. Al-Shayeb, "Chemical Composition of Essential Oil and Crude Extract Fractions and their Antibacterial Activities of" *Capparis Spinosa* L. and" *Capparis Cartilaginea*" Decne. from Jordan," Yarmouk University, 2012.
- [36] A. M. Mahasneh, J. A. Abbas, and A. A. El - Oqlah, "Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain," *Phytotherapy Research*, vol. 10, no. 3, pp. 251-253, 1996.
- [37] H. Zanganeh, S. A. Mortazavi, F. Shahidi, and B. Alizadeh Behbahani, "Evaluation of the chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in Lallelantia iberica seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 15, no. 6, pp. 5556-5571, 2021.
- [38] M. Nooshkam, M. Varidi, and F. Alkobeisi, "Bioactive food foams stabilized by licorice extract/ whey protein isolate/sodium alginate ternary complexes," *Food Hydrocolloids*, p. 107488, 2022.
- [39] B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and F. Falah, " Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 875-883, 2019.
- [40] Z. Kiarsi, M. Hojjati, B. Alizadeh Behbahani, and M. Noshad, "In vitro antimicrobial effects of Myristica fragrans essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage," *Journal of Food Safety*, vol. 40, no. 3, p. e12782, 2020.
- [25] R. B. Mansour *et al.*, "Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*," *Cytotechnology*, vol. 68, no. 1, pp. 135-142, 2016.
- [26] M. Fattahi and R. Rahimi, "Optimization of extraction parameters of phenolic antioxidants from leaves of *Capparis spinosa* using response surface methodology," *Food Analytical Methods*, vol. 9, no. 8, pp. 2321-2334, 2016.
- [27] M. Rodrigo, M. Lazaro, A. Alvarruiz, and V. Giner, "Composition of capers (*Capparis spinosa*): influence of cultivar, size and harvest date," *Journal of food Science*, vol. 57, no. 5, pp. 1152-1154, 1992.
- [28] M. Sharaf, M. El-Ansari, and N. Saleh, "Quercetin triglycoside from *Capparis spinosa*," *Fitoterapia*, vol. 71, no. 1, pp. 46-49, 2000.
- [29] L. Siracusa, T. Kulisic-Bilusic, O. Politeo, I. Krause, B. Dejanovic, and G. Ruberto, "Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 59, no. 23, pp. 12453-12459, 2011.
- [30] C. Inocencio, D. Rivera, F. Alcaraz, and F. A. Tomás-Barberán, "Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in mediterranean countries," *European Food Research and Technology*, vol. 212, no. 1, pp. 70-74, 2000.
- [31] M. Argentieri, F. Macchia, P. Papadia, F. P. Fanizzi, and P. Avato, "Bioactive compounds from *Capparis spinosa* subsp. *rupestris*," *Industrial Crops and Products*, vol. 36, no. 1, pp. 65-69, 2012.
- [32] A. A. A. Allaith, "Assessment of the antioxidant properties of the caper fruit (*Capparis spinosa* L.) from Bahrain," *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, vol. 19, pp. 1-7, 2016.
- [33] F. Bonina *et al.*, "In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds," *Journal of cosmetic science*, vol. 53, no. 6, pp. 321-336, 2002.



Capparis spinosa ethanolic extract: phenol, flavonoid, antioxidant potential and antibacterial activity on *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*

Noshad, M. ^{1*}, Alizadeh Behbahani, B. ², Rahmati-Joneidabad, M. ³

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

ABSTRACT

Plants have always been the main source of food and medicine for humans. Plant extracts have been considered in the food industry as antimicrobials, flavor enhancers, preservatives, and nutrients. Plant extracts are an excellent candidate for the replacement of synthetic compounds that have toxic and carcinogenic effects. In this study, ethanolic extract of *Capparis spinosa* was extracted by maceration method and the content of total phenols (by FolinCiocalteu method), total flavonoids (by aluminum chloride colorimetry), antioxidant activity (by DPPH and ABTS free radical scavenging methods), and its antimicrobial effect (by disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration) against *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, were evaluated. The total phenols and total flavonoids of the extract were 40.28 mg GAE/g and 5.20 mg QE/g, respectively. The antioxidant activity of ethanolic extract based on inhibition of free radicals DPPH and ABTS was 52.73 and 58.62%, respectively. The antimicrobial effect of the extract was dependent on its concentration and bacterial type; increasing the concentration of the extract caused a significant increase in the diameter of the growth inhibition halo in disk diffusion agar and well diffusion agar tests. In addition, Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) were more sensitive to the extract than Gram-negative strains (*E. aerogenes* and *E. coli*). Also, *S. aureus* with a minimum inhibitory concentration of 4 mg/ml and a minimum bactericidal concentration of 512 mg/ml was the most sensitive species to the ethanolic extract of *C. spinosa*. The results of the present research show that the ethanolic extract of *Capparis spinosa* can be used as a natural additive in various food products.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 01/ 29
Accepted 2022/ 03/ 14

Keywords:

Extract,
Capparis spinosa,
Phenolic compounds,
Antimicrobial effect,
Antioxidant activity.

DOI: 10.52547/fsct.19.124.207

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.7.2

*Corresponding Author E-Mail:
Noshad@asnrkh.ac.ir