مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی فعالیت ضدقارچی و قطرهاله عدم رشد عصاره جَفت بلوط ایرانی برکپک‌های پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم (شاخص فساد کپک‌زدگی پس از برداشت میوه مرکبات)

طیبه شکوهی[۱]،علیرضا شهاب لواسانی[۱]، فرناز دستمالچی[۲]، حامد زارعی[۴]، کبری حاجی زاده[۴]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین -پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- پژوهشکده صنایع غذایی و فراورده های کشاورزی. پژوهشگاه استاندارد.

۳- گروه بیولوژی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران

۴- گروه فیزیک ، دانشکده علوم پایه واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ،ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۵

کلمات کلیدی:

جَفت،

پنی‌سیلیوم ایتالیکوم،

پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم،

عصاره آبی،

اثر ضدقارچی

DOI: 10.22034/FSCT.20.141.143

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.141.10.8

* مسئول مکاتبات:

shahabam20@yahoo.com

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدقارچی عصاره جفت بلوط ایرانی بر روی دو گونه کپک آبی (پنی‌سیلیوم ایتالیکوم۱) و کپک سبز (پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم۲) به عنوان شاخص فساد کپکی میوه مرکبات انجام‌شد. برای به‌دست آوردن تانن‌ها و فلاونوئیدها از جفت بلوط از روش‌های مختلف استخراج استفاده شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل حداقل غلظت مهارکنندگی[۳] (MIC میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، حداقل غلظت کشندگی[۴] (MFC، میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و قطر هاله عدم رشد۵(میلی‌متر) با روش‌های رقت لوله‌ای، کشت سطحی[۶] و انتشار در چاهک آگار (WD[۷]) تعیین شد. بررسی نتایج نشان داد، قطر هاله عدم رشد کپک‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره آبی اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) دارند. اثر ضدقارچی در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی به طور معنی‌داری($p<۰/۰۵$) افزایش‌یافت. در مقایسه، قطر هاله عدم رشد کپک‌ها در گروه شاهد که از سم فلودیوکسونیل[۸] ۲۵ درصد، استفاده شد، تفاوت معنی‌داری($p<۰/۰۵$) داشت. بنابراین می‌توان از عصاره جفت بلوط ایرانی به عنوان جایگزینی برای کنترل فساد قارچی مرکبات استفاده‌نمود.

1 -Penicillium Italicum

2- Penicillium Dijitatum

3 -Minimal Inhibition Concentration(MIC)

4- Minimal Fungicidal Concentration (MFC)

5- Non-growth Diameter

6- Surface Culture

7- Well Diffusion (WD)

8 -Flodioxonil

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر آگاهی عمومی از عوارض مصرف قارچ‌کش‌های شیمیایی، ارتقاء استانداردهای ایمنی و کیفیت و همچنین ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی و تکثیر ایزوله‌های مقاوم میکروبی ناشی از استفاده بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، تمایل برای مصرف محصولات طبیعی را افزایش داده است و تلاش می‌شود با کشف عوامل طبیعی ضد میکروبی سازگار با محیط زیست و جانداران، همانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم شیمیایی به دست‌آید [۱]، در این راستا برای افزایش دامنه داروهای گیاهی بومی جدید تحقیقات گسترده‌ای درحال انجام است که از اهمیت و ارزش استراتژیک، بهره‌وری و اقتصادی خاصی در جهان برخوردارند. از آن‌جا که کشور ایران به لحاظ اکوسیستم زیستی، دارای تنوع گیاهی مفید و با ارزش بسیاری است، شناسایی و بررسی فعالیت فیزیکوشیمیایی مواد گیاهی بومی (روغن‌ها، اسانس‌ها، تانن‌ها و ...)، نقش مهمی در استفاده بهینه از ثروت‌های ملی دارد. عصاره بلوط ایرانی از دیر باز در طب سنتی ایران برای درمان بیماری‌های مختلف توصیه شده است. مطالعه منابع علمی نشان می‌دهد در سال‌های اخیر تحقیقات آزمایشگاهی مختلفی در زمینه بررسی تاثیر این عصاره گیاهی بر روی آفات نباتی، قارچ‌ها و باکتری‌ها انجام شده است که کشف اثر مهاری مشابه عصاره جَفت میوه بلوط بر روی باکتری *شیگلا فلکسنری*[1] در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکسازین[2] و تریمتوپریم سولفومتوکسازول[3] [۲]، تأثیرتانن موجود در عصاره بلوط بردرمان آسیب‌های گوارشی و جذب آب و رسوب پروتئین‌ها در روده [۳]، اثرکشندگی عصاره هیدروالکلی جفت بلوط بر قارچ ساپرولگنیا[4][۴] و جلوگیری از رشد آن در مقایسه با داروی ضد قارچی مالاشیت گرین[5] [۵]، اثر مهاری عصاره الکلی جفت گیاه بلوط بر مخمر کاندیدا به دلیل تولید متابولیت ثانویه‌ای به نام لاوانوئیدز[6] در آن [۶]، مقایسه فعالیت‌های ضدباکتریایی آویشن، جفت بلوط و عصاره هیدروالکلی پوسته سبز پسته بر لیسریا مونوسیتوژنز[7] و بالاترین اثر ضد باکتریایی جفت بر این باکتری [۷]، اثر مهاری عصاره الکلی جفت بر روی آسینوتوباکتر[8] [۸]، اثر مشابه عصاره هیدروالکلی میوه بلوط با جنتامایسین[9]، اثر پایین‌تر از کانامایسین[10] و اثر بالاتر از توبرامایسین[11] بر استافیلوکوکوس اورئوس[12] و همچنین اثر کمتر آن در مقایسه با جنتامایسین و کانامایسین بر اشرشیاکولی اما اثر بیشتر از توبرامایسین بر آن [۶]، تولید دهانشویه‌های گیاهی با فعالیت ضد میکروبی حاوی عصاره پوسته بلوط و آویشن شیرازی [۹]، ازجمله دستاوردهای این تحقیقات می‌باشند. بلوط از گیاهان مناطق کوهستانی دنیـا، با تنوع گونه‌ای بسیار می‌باشد. بلوط ایرانی با نام علمی کـوئروس برانتـی[13] و نام لاتین برنتیس اک[14]، از خانواده فاگاسه[15]، از گونه های

1- Shigella Flexneri

2 -Ciprofloxacin

3- Trimethoprim

4- Saprolegnia

5- Malachite green

6- Flavonoids

7- listeria monocytogenes

8- Acinetobacter

9- Gentamicin

10- kanamycin

11- Tobramycin

12- Staphylococcus Oreos

13- Quercus brantii

14- Brantii Oak

15- Fagaceae

غالب مناطق شمال، جنوب شرقی رشته کوه‌های زاگرس و مناطق مرکزی، کشور ایران اسـت [۱۰]. با توجه به مطالعات انجام شده ارتفاع این گیاه درختی تقریباً ۲۰ متر است. برگ‌های آن معمولاً یکنواخت و به شکل تخم مرغ با حاشیه رزوه‌دار هستند و از پایه رشد می‌کنند. این برگ‌ها براق و به رنگ سبز تیره بوده و سطح آن‌ها کمی خشن است. میوه بلوط به نام آکرون[1] در کاسه‌ای به نام گلند[2] قرار دارد. این میوه‌ها دارای مقادیر مختلفی از مواد روغنی، قندهای مختلف، آمیدون، مقدار کمی کوئرسیتین[3]، پنتوزان و تانین هستند. شکل میوه بلوط ایرانی صاف و بیضی و از دو جز پیاله و کپسول تشکیل شده و کپسول نیز دارای سه قسمت است. پوسته خارجی که دور کپسول را فرا گرفته است و حدود ۷ درصد وزن میوه (حدود ۱۵ تا ۲۰ گرم) را به خود اختصاص می‌دهد [۱۱]. جَفت پوسته نازکی است که به‌دور مغز پیچیده است. پوست و میوه بلوط غنی از ترکیبات پلی‌فنلیک بوده و علاوه بر خواص ضدمیکروبی آن، در درمان بیماری‌های پوستی مزمن، اگزما، واریس، خونریزی، زخم معده، بواسیر، رفع التهاب لوزه، رفع ورم و مسمومیت ناشی از الکالوئیدها بکار می‌رود [۱۲]. گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین، فلاونوئیدها، رزین‌ها، ترپن‌ها، استروئیدها، اسیدهای فنلی، پروتئین، فیبر، مواد معدنی و ویتامین‌های A،B و C ترکیبات موجود در قطعات مختلف میوه بلوط هستند[۱۳].

پنی‌سیلیوم جنسی از رده هیفومایست‌ها[4](گروهی از قارچ‌های ناقص) است. پنی‌سیلیوم‌ها بزرگترین گروه قارچ‌های موجود در خاک هستند که بیش از ۱۵۰ گونه دارند. این قارچ‌ها یکی از مهمترین عوامل فاسد کننده مواد غذایی به شمار می‌روند. بهینه دمای رشد این قارچ‌ها در بازه ۲۲ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد است. دو گونه مهم این جنس، شامل پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم، به ترتیب تحت عنوان کپک‌های سبز و آبی نقش عمده‌ای در فساد و پوسیدگی پس از برداشت میوه مرکبات در انبار دارند [۱۴]. این تحقیق آزمایشگاهی تلاشی برای ارزیابی فعالیت یک فرآورده قابل استحصال و در دسترس حاصل از منابع گیاهی و طبیعی کشور است، که بتواند زمینه کاهش مصرف سموم قارچ‌کش شیمیایی درحین نگهداری میوه‌های تازه مرکبات را فراهم نماید. در این مطالعه اثر ضدقارچی عصاره جَفت بلوط بر سویه‌های کپک پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم (کپک سبز و کپک آبی میوه مرکبات) به روش‌های کمی و کیفی مورد بررسی قرارگرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد اولیه و آماده سازی

در این پژوهش جَفت بلوط ایرانی ازیک عطاری در شهرستان خرم آباد خریداری شد. بعد از تایید اسم علمی گیاه بلوط و پاک‌کردن و زدودن گرد و غبار آن با عمل باددهی، با استفاده از دستگاه آسیاب‌برقی، آسیاب، و پودر آن تهیه‌شد. به منظور تهیه عصاره گیاه چند روش مورد استفاده قرارگرفت؛

۲-۱-۱-عصاره گیری به روش خیساندن (ماسراسیون[5])

برای عصاره‌گیری از حلال‌های قطبی و غیرقطبی استفاده شد. در روش اول، ابتدا ۱۰۰ گرم پودر جفت بلوط را با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و الکل اتیلیک ۹۶ درصد به نسبت مساوی در داخل ارلن خیسانده و به مدت سه روز در تاریکی نگهداری شد. در طول مدت نگهداری هر روز به مدت ۲۰ دقیقه محتویات ارلن با دستگاه شیکر به‌هم زده‌شد.

1 -Acorn

2- Gland

3- Quercetin

4- Hyphomycete

5- Maceration

بعد از ۷۲ ساعت محتویات درون ارلن با گاز استریل چندلایه صاف و عصاره استخراجی توسط دستگاه سانتریفیوژ (مدل 3-16PK سیگما، آلمان) با سرعت۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره شفاف (فاز بالایی) حاصل از سانتریفوژ به ارلن ته گرد دستگاه روتاری اواپراتور منتقل و با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلا عصاره‌گیری شد. برای تبخیر کامل آب عصاره غلیظ موجود در دستگاه، در حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد داخل آون قرار داده‌شد و خشک گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد [۴].

در روش دوم از دی اتیل اتر همراه با آب مقطر برای خیساندن پودر جفت بلوط استفاده شد، این عمل جهت جداسازی چربی‌ها، رنگدانه گیاهی و رزین‌ها صورت گرفت. مطابق روش ذکر شده در روش اول، محتویات داخل ارلن به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری و پس از صاف کردن، مایع به‌دست آمده در دستگاه روتاری اواپراتور و آون خشک گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد [۱۵].

۲-۱-۲- عصاره‌گیری به روش جوشاندن

در این روش پودر جفت در حجم مخصوصی از آب جوشانده شد. در این روش که برای استخراج مواد موثره محلول در آب و پایدار حرارتی مناسب است، نسبت گیاه به آب ثابت (۱:۴) در نظر گرفته شد و عمل جوشاندن آب و استخراج عصاره، تا زمانی که حجم حلال به یک چهارم اولیه برسد ادامه یافت. پس از سرد شدن، عصاره غلیظ با گاز استریل چند لایه صاف و به ارلن ته گرد دستگاه روتاری اواپراتور منتقل و با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلا عصاره‌گیری‌شد. عصاره غلیظ موجود در دستگاه عصاره‌گیر برای تبخیر کامل آب، داخل آون با حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

۲-۲- تهیه سویه‌های قارچی

۲-۲-۱-سویه‌های کپک سبز (ATTC 481130) و کپک آبی (ATTC 488140) از مرکز تحقیقات مرکبات استان گیلان، شهر رشت تهیه و استفاده‌شد. این کپک‌ها غیر بیماری‌زا و قابل کشت بر روی محیط‌های کشت نوترینت آگار هستند. برای تهیه سوسپانسیون قارچی، با روش ذکر شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۲۵، هاگ قارچ‌ها به وسیله یک حلقه کشت سترون از روی محیط کشت برداشته و به لوله حاوی محلول نمکی دارای پلی سوربات منتقل‌شد. سوسپانسیون حاصل را با استفاده از یک صافی غشایی غیرجاذب سترون صاف نموده و تعداد هاگ‌های آن با استفاده از لام شمارش سلولهای خونی(نئوبار) شمرده شد. تعداد هاگ‌ها $۳/۵\times۱۰^{۷}$ هاگ در میلی‌لیتر تنظیم و داخل فریزر در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در میکروتیوب‌ها نگهداری شدند [۱۶].

۲-۲-۲-تعیین تعداد میکروارگانیسم‌های قابل رویش در سوسپانسیون

با استفاده از محلول رینگر لاکتات از سوسپانسیون‌های تهیه شده هر دو کپک، رقت‌های متوالی ده‌دهی تهیه‌شد. سپس از رقت‌هایی که احتمال داده می‌شد پس از کشت تعداد قابل شمارش کلنی روی پلیت داشته باشند، روی محیط کشت سابرودکستروز آگار به روش کشت سطحی کشت داده و پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بمدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی با استفاده از فرمول زیر تعیین شد[۱۶].

$$N' = \frac{\sum C}{V \times n \times d} \qquad (۱)$$

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش شده بر روی دو پلیت، که یکی از آنها حداقل حاوی ۱۰ کلنی باشد؛

V حجم مایه تلقیح مورد استفاده در هر پلیت برحسب میلی‌متر؛

n تعداد پلیت‌های انتخاب شده، در این مورد n

۲-۳- ارزیابی فعالیت ضدقارچی عصاره‌گیاهی جَفت بلوط در شرایط آزمایشگاهی

برای تعیین فعالیت ضد قارچی عصاره گیاهی جفت بلوط از روش رقت لوله‌ای برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و روش کشت سطحی برای تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) ا روش‌های ذکر شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۵۸۷۵ و روش انتشار در چاهک (WD) استفاده شد[۱۷].

۲-۳-۱-تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC)

در ابتدا رقت‌های عصاره گیاهی تهیه شد. برای تهیه اولین رقت میزان ۸ میلی‌گرم از عصاره استخراج شده را با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط نموده و با هم‌زن هم‌زده‌شد. به دلیل اینکه در ادامه آزمون، به هر لوله ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی مورد نظر اضافه می‌شد و در نتیجه رقت تهیه شده نصف می‌گردید، لذا از ابتدا هرلوله مربوط به هر رقت، حاوی دو برابر غلظت مورد نظر، در نظر گرفته‌شد. برای تهیه رقت‌های متوالی ۱ به۲، یک میلی‌لیتر از اولین رقت تهیه شده ازعصاره گیاهی به لوله بعدی که حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت سابرو دکستروز براث بود اضافه‌شد. یک میلی‌لیتر از این لوله را به لوله بعدی حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه کرده و به‌همین‌ترتیب ادامه داده‌شد تا به کمترین رقت قابل قبول برسد. سپس۱ میلی‌لیتر از آخرین لوله را برداشته و دور ریخته‌شد. به این ترتیب هر لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر عصاره گیاهی رقیق‌شده در محیط کشت بود [۱۷]. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد سویه‌های کپک پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم، برای هر اسپور ۸ لوله آزمایش استریل به صورت جداگانه قرار داده شد. ۶ لوله آزمایش شامل غلظت‌های مختلف عصاره به‌ترتیب ۸ ٪، ۴ ٪، ۳ ٪، ۲ ٪، ۱/۵ ٪، ۱ ٪، ۰/۷۵ ٪ و ۰/۵ ٪ بود. دو لوله آزمایش نیز به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی درنظر گرفته شد. از سوسپانسیون اولیه با غلظت $۳/۵\times ۱۰^{۷}$ CFU/ml سوسپانسیون هر دو اسپور کپک آبی و سبز با غلظت $۳/۵\times ۱۰^{۴}$CFU/ml تهیه شد. به لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر محیط سوبرا دکستروز براث و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ اضافه و بعد از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های عصاره‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و بعد از مدت یاد شده کدورت ایجاد شده درون لوله‌ها مشاهده و رقتی از عصاره که درآن کدورت ایجاد نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد.

۲-۳-۲- تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC)

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره جفت بلوط از لوله‌های آزمایشی که در آن کدورت مشاهده نشد (لوله حداقل غلظت مهارکنندگی و غلظت‌های بالاتر) بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت سوبرا دکستروز آگار کشت داده شد و بعد ازگرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس بعد از مدت ۷۲ ساعت، پلیت‌های حاوی میکروارگانیسم مورد بررسی قرارگرفت. اولین پلیت حاوی کمترین غلظتی از عصاره‌ها که کپک در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی در نظرگرفته‌شد. آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام‌شد [۱۷] (جدول شماره ۱).

Table 1 Minimal Inhibition Concentration(MIC) of oak's jaft extract on molds

	Aqueous extract	Hydroethric and Hydroalcoholic extract
Mold	MIC (mg/ml)	MIC(mg/ml)
Penicillium digitatum	15	-*
Penicillium italicum	10	-

(-) Antifungal activity

۲-۳-۳-تعیین قطر هاله عدم رشد

در روش انتشار در چاهک برای تعیین قطر هاله عدم رشد، دستورالعمل‌های استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی(CLSI[1]) استفاده شد. در این روش در هر پتری‌دیش ۹ سانتی‌متری مخلوطی از یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی، با غلظت معادل $۳/۵ \times ۱۰^{۴}$CFU/ml با بیست میلی‌لیتر، محیط کشت سابرو دکستروز آگار به روش کشت سطحی ۲برای هریک از سویه‌ها گسترده شد و با حفر چاهک در اطراف و روی محیط کشت توسط پیپت استریل (پیپت شماره ۵ و عمق ۴ میلی‌متر)، ۳۰ میکرولیتر از عصاره‌ها در غلظتی که در روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) باعث مهار رشد قارچ‌های مورد نظر گردیده بود توسط سمپلر در چاهک‌ها ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. برای مقایسه قدرت مهارکنندگی رشد از آب مقطر استریل (حلال عصاره گیاهی) به عنوان کنترل منفی بدون عصاره و ppm ۰/۲۵ سم فلودیووکسونیل۲۵٪ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بعد از سه روز محیط‌های کشت در زیر هود آزمایشگاهی بررسی و قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم با استفاده از خط‌کش اندازه گیری و نتایج آن برحسب میلی‌متر گزارش گردید. همه آزمون‌ها با سه بارتکرار انجام شد (جدول شماره ۲و۳)

1- Clinical and Laboratory Standards Institute

2- Pour Plate

Table 2 Results of MIC, MFC (mg/ml) measurement and average of non-growth diameter (mm) of Aqueous oak's jaft extract on *Penicillium Italicum*

Mold	Dilution of the Extract mg/ml	Extract concentration%	Average of non-growth diameter/mm	MIC* mg/ml	MFC mg/ml
Penicillium Italicum	80	8	24	-*	-
	40	4	22	-	-
	30	3	18.9	-	-
	20	2	18.5	-	-
	15	1.5	11.5	-	-
	10	1	19.5	-	+
	7.5	0.75	15.6	+	+
	_5	0.5	14	+	+

* Minimal Inhibition Concentration, *Minimal fungicidal Concentration., +,grow; -, not grow; n = 3.

Table 3 Results of MIC , MFC (mg/ml) measurements and average of nongrowth diameter(mm) for aqueous oak Jaft extract on *Penicillium Digitatum*

Mold	Dilution of the Extract mg/ml	Extract concentration%	Average of nongrowth diameter/mm	MIC* mg/ml	MFC* mg/ml
Penicillium Digitatum	80	8	21	+*	-
	40	4	21	+	-
	30	3	18	+	-
	20	2	18.33	+	-
	15	1.5	17	+	-
	10	1	13.77	-	-
	7.5	0.75	13.33	-	-
	_5	0.5	13.67	-	-

* Minimal Inhibition Concentration, *Minimal fungicidal Concentration; +, grow; -, not grow; n = 3.

۲-۳-۴-تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. اثر غلظت عصاره آبی بر قطر هاله عدم رشد هر دو کپک با استفاده از جدول ANOVA بررسی و میانگین داده‌های به‌دست‌آمده با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنادار مقایسه شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC)

جدول ۱ نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های جفت بلوط استخراج شده بر کپک‌های پنی‌سیلیوم آبی و سبز را در حداکثر غلظت مورد آزمون (۸٪) را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از آنست که عصاره هیدروالکلی و هیدرواتری برروی هر دو کپک اثر ضدقارچی ندارند، ولی عصاره آبی جفت بلوط بر رشد هر

دو کپک مورد آزمایش موثر است. کمترین غلظت عصاره آبی در MIC معادل ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر روی کپک پنی‌سیلیوم ایتالیکوم با قطر هاله عدم رشد ۲۴ میلی‌متر و بر روی کپک پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم درMIC معادل ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با حداکثر قطر هاله عدم رشد ۲۱ میلی‌متر به‌دست آمد (جداول ۲ و ۳).

۳-۲-قطر هاله عدم رشد

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد یکی دیگر از روش‌های تعیین میزان حساسیت و فعالیت میکروارگانیسم‌ها (کپک‌ها) در مواجه با عصاره‌گیاهی است. همانطور که در جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود کمترین غلظت عصاره آبی(۵ mg/ml)، بر روی کپک پنی‌سیلیوم ایتالیکوم قطر هاله ۱۴ میلی‌متری و بیشترین غلظت عصاره آبی(۸۰ mg/ml)، قطر هاله عدم رشد ۲۴ میلی‌متر را ایجاد نموده است. همچنین با افزایش غلظت عصاره آبی، قطر هاله عدم رشد کپک پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم نیز از ۱۳/۶۷ میلی‌متر به ۲۱ میلی‌متر افزایش یافته است و این میزان در مقایسه با قطر هاله عدم رشد کپک ایتالیکوم کاهش یافته است. نتایج نشان داد که اثر ضد قارچی عصاره جفت بلوط ایرانی وابسته به غلظت بوده و اثر معناداری بر قطر هاله عدم رشد کپک‌های پنی‌سیلیوم سبز و آبی دارد. همچنین مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال($p<۰/۰۵$) مشخص نمود که تغییرات غلظت بر قطرهاله عدم رشد کپک‌ها اثر دارند و اختلافشان معنی‌دار است. بیشترین اختلاف در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره با سایر غلظت‌های عصاره وجود دارد. در مقایسه، قطر هاله عدم رشد کپک‌ها در گروه شاهد که از سم فلودیوکسونیل ۲۵ درصد، استفاده شد، تفاوت معنی‌داری($p<۰/۰۵$) داشت (جدول ۴ و ۵).

Table 4 Mean inhibition zone diameter (mm) of oak Jaft aqueous extract on Penicillium digitatum

Mean± SD	extraction groups mg/ml
45.0000[a]	Control +
22.8333±5.7 [b]	80
21.4583±6.2 [bc]	40
18.4583±3.6 [bcd]	30
16.0833±3.6 [cd]	15
15.4167±4.0 [d]	20
14.5000±1.1 [d]	7.5
14.0833±3.4 [d]	5
12.9583[d]±1.9	10

Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3; different letters (a, b, c and d) in each column show significant difference at $p < 0.05$

Table 5 Mean inhibition zone diameter (mm) of oak's Jaft aqueous extract on Penicillium italicum

Mean± SD	extraction groups mg/ml
45.0000[a]	Control +
22.8333±1.7 [b]	80
21.4583±4.3 [bc]	40
18.4583±2.1 [bcd]	30
16.0833±4.0 [cd]	15
15.4167±5.0 [d]	20
14.5000±3.7 [d]	7.5
14.0833±3.6 [d]	5
12.9583±2.2 [d]	10

Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3; different letters (a, b, c and d) in each column show significant difference at $p< 0.05$.

۳-۳-ارتباط بین قطر هاله ممانعت از رشد و میزان غلظت عصاره

بررسی تاثیر متقابل غلظت‌های مختلف عصاره جفت بلوط و دو سویه کپک پنی‌سیلیوم سبز و آبی بر قطر هاله عدم رشد کپک، با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA و روش آزمون آماری دانکن، نشان داد که غلظت عصاره و نوع کپک اثر متقابل معنی‌داری بر قطر هاله عدم رشد $P > ۰/۰۵$ ندارند (شکل ۱ و ۲).

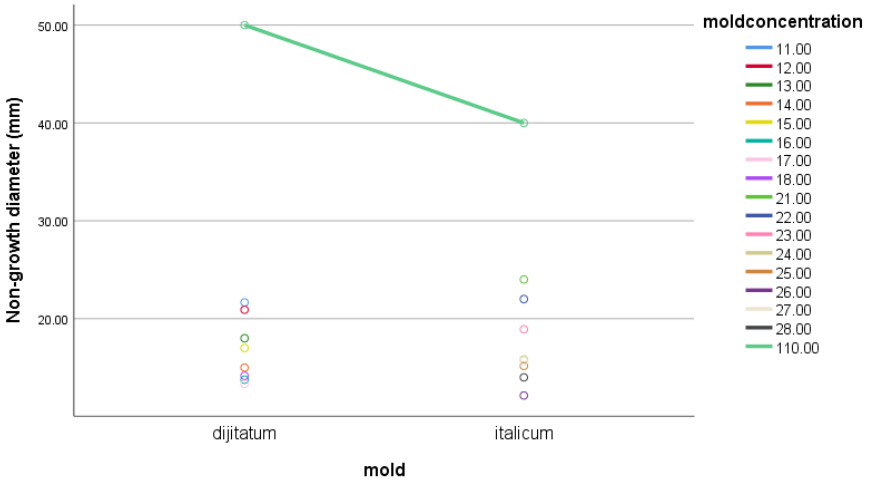

Fig 1 Concentration (mg/mm) versus molds & Estimated Marginal means of non-growth diameter in *penicillium digitatum and Penicillium italicum*.

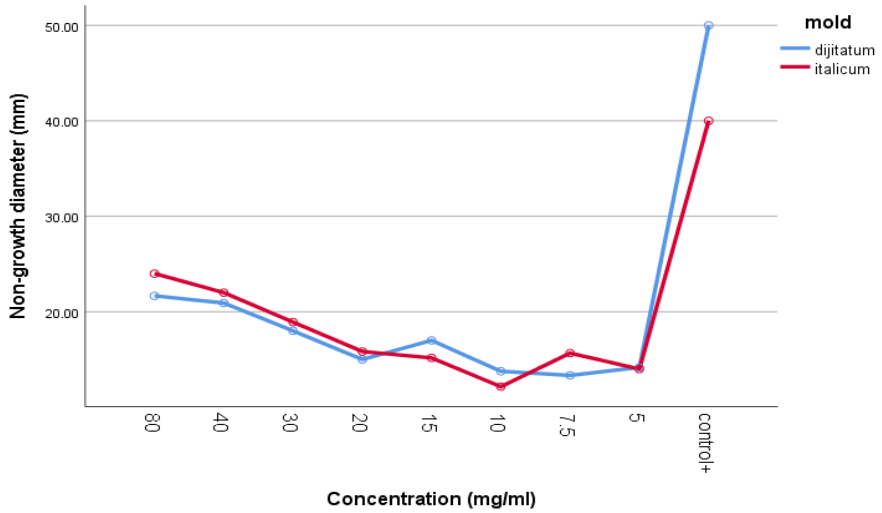

Fig 2 Estimated Marginal means of non-growth diameter with different concentrations of oak's jaft extract on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*.

سازوکار اثر عصاره گیاهی جفت بلوط را می‌توان به خاصیت ضد اکسیدانی ذاتی مواد تشکیل دهنده عصاره‌های گیاهی که نقش مهمی در سیستم دفاع شیمیایی گیاهان در مقابل بیماری‌ها ایفا می‌کنند نسبت داد. مهمترین ترکیبات فنلی شامل اسیدهای فنلی، تانن‌ها، فلاونوئیدها هستند [۱۸].

براساس طرح استخراج ترکیبات مختلف فنولی از پوست گیاهان کالبرگ و کورث، می‌توان گفت که مواد موجود در عصاره هیدروالکی و هیدرواتری استخراج شده در این تحقیق شامل فلاونوئیدها و فلوباتانن‌ها هستند [۱۹]. ترکیبات فنولی را می‌توان به فنول‌های ساده و ترکیبات پلی‌فنولی تقسیم نمود. ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که با داشتن یک حلقه آروماتیک حاوی گروه هیدروکسیل آزاد، شناخته می‌شوند این مولکول‌ها تقریبا در تمام بخش‌های گیاهان وجود دارند و در بسیاری از روندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، تشکیل ریشه، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات به آن‌ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد. در یافته‌های علمی ثابت شده است که متابولیت‌های فنولی موجود در گیاهان توانایی این را دارند که باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و دیگر بیومولکول‌های غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها شده و آنها را تخریب نمایند [۲۰]. به عنوان مثال تانن‌ها که جزئی از مواد تشکیل‌دهنده عصاره جفت بلوط می‌باشند می‌توانند برای باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای و حتی ویروس‌ها سمی باشند. تانن‌ها با رسوب پروتئین‌های میکروبی مانع از رشد آن‌ها می‌شوند و می‌توانند مواد غذایی و پروتئین‌ها را ازدسترس میکروب‌ها خارج و یا از طریق سازوکار به‌دام‌انداختن آهن، پیوند با هیدروژن و پراکنش اختصاصی با پروتئین‌های حیاتی مانند آنزیم‌ها ایفای نقش نمایند [۲۱]. تانن‌ها قادرند با مهار آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در ویروس‌های انسانی مانع از تکثیر آنزیم آنها شوند [۴]. این نتیجه با نتایج پناهی و همکاران [۷] و شریفی و همکاران که اثر عصاره هیدروالکلی جفت بلوط را بر روی مخمر کاندیدا آلبیکس و کپک ساپرولگنیا [۴] مطالعه نموده‌اند منطبق نمی‌باشد، ولی به لحاظ اثبات خاصیت ضدقارچی عصاره آبی آن، نتایج همه تحقیقات صورت گرفته تاکنون مبنی بر اثر ضدمیکروبی عصاره جفت بلوط را تائید می‌نماید(شکل ۱ و۲). براساس طرح کالبرگ و کورث، در عصاره آبی استخراج شده، برخی از ترکیبات محلول در حلال‌های قطبی و غیرقطبی (الکلی و اتری) وجود ندارند و باوجود عدم حضور آن‌ها، عصاره آبی استخراج شده، برخلاف عصاره‌های الکی و اتری، قادر به مهار رشد و فعالیت کپک‌های پنی‌سیلیوم و دیجیتاتوم شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در فرایند استخراج با الکل و اتر، برخی از مواد فعال عصاره، نظیر ترکیبات فنلی و تانن‌ها، با الکل و اتر موجود در محیط واکنش داده و غیرفعال شده‌اند. درصورتی‌که در عصاره آبی، این ترکیبات دست‌نخورده باقی‌مانده و نقش بیولوژیک خود را ایفا می‌نمایند.

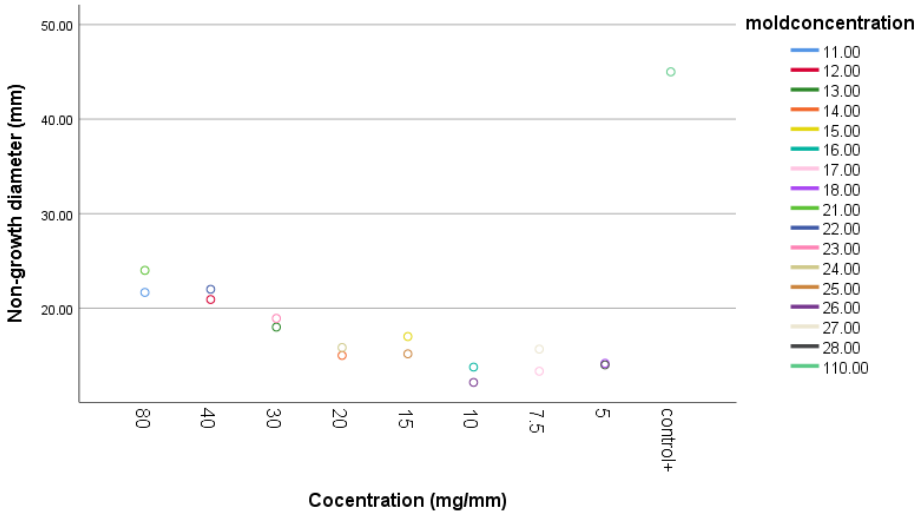

Fig3 Concentration (mg/mm) versus mold & Estimated Marginal means of non-growth diameter in *penicillium italicum.*

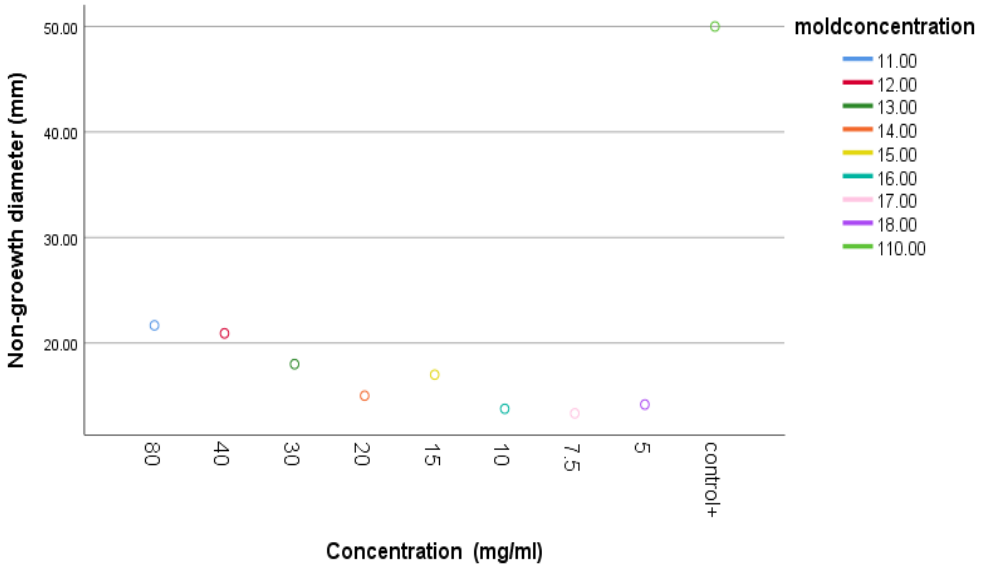

Fig 4 Concentration (mg/mm) versus mold & Estimated Marginal means of non-growth diameter in *penicillium digitatum*

۴-نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی جفت بلوط اثر ضدقارچی بر روی کپک‌های پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم دارد. گرایش دانش بشری به سمت استفاده از داروهای گیاهی، راهی برای رشد اقتصادی بیشتر کشورها با تولید گیاهان دارویی بومی و استخراج مواد موثره آن‌ها به منظور به‌کارگیری مواد ارگانیک در صنعت می‌باشد. تولید و استخراج این ترکیبات با هزینه‌های کمتر و بهینه سازی آن‌ها، نیل به اهداف مورد نظر را آسان‌تر می‌نماید. استفاده از عصاره آبی جفت بلوط به عنوان ماده‌ای موثر و ارزان در مقابل کپک‌هایی که شاخص فساد مرکبات هستند

می‌تواند افقی روشن برای کاهش ضایعات تولیدات کشاورزی و افزایش زمان انبارداری آنها را تصویر نماید

پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده عصاره آبی جفت بلوط طی روش‌های کروماتوگرافی بررسی و مواد موثر اصلی با خاصیت مهارکنندگی رشد قارچ و یا کشندگی آن بررسی و به طور دقیق مشخص شود..

۵- منابع

[1] Azadedel, S., Hanachi, P. and Saboora O. 2016. Investigation of soluble and insoluble tannins and anthocyanins assay in two Cultivar pistachio (Pistacia vera L). Journal of food science and technology(Iran) FSCT; 14 (63) :179-186.

[2] An'aam, M., Riyahi Zaniani, F. and Shirmardi Dezaki, F. 2021, Antimicrobial Effect of Hydroalcoholic Extracts of Oak Jaft (Quercus Persica) and Echium Amoenum on Shigella Flexneri. Qom Univ Med Sci J; 15(5): 352-357.

[3] Khosravi, A., Behzadi, A. 2002, Comparison of the Antibacterial Activity of the Seed Hull of Quercus Brantii on Some Gram Negative Enteric Bacilli With Some in-Use Antibiotics. J Arak Uni Med Sci; 5(1) :1-6

[4] Sharifi, A., Gorjipour, R., Gorjipour A., sardsiri M., Mohammadi R. and Jabarnejad A. 2012, Antifungal Effect of Quercus Infect Oria Gall (Oak) on Saprolegnia Fungi. Armaghane Danesh; 17(1) :78-84

[5] Alizadeh behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F. and Mohebbi M. 2015, Antifungal Effect of Aqueous and Methanolic Avicennia Marina Leaves Extracts on Alternaria citri and Penicillium digitatum . Zahedan Journal of Research in Medical Sciences;15 (10):29-33.

[6] Ebrahimi, A., Khayami M. and Nejati, V. 2010, Evaluation of the Antimicrobial Activity of Quercus Percica Jaub & Spach Frut's Hydroalcoholic Extract in Disc Diffusion Method. Journal of medicinal plant ; 9(33): 26-34.

[7] Panahi, J., Havasian, M. R. and Pakzad, I. 2014, Studying the inhibitory effect of alcoholic extract of inner stratum of oak fruit (jaft) and hydroalcoholic extract of summer bulb on acinetobacter in vitro. Iranian Journal of Public Health; 43(2): 36-37.

[8] Zarei, M., Fadaei, V. and Mirzaei, M. 2022, In Vitro Antimicrobial Activity of the Alcoholic Extract of Quercus brantii subsp. persica. Journal of Human Environment and Health Promotion; 8(1): 22-26.

[9] Alipour, S., Dehshahri, S. and Afsari A. 2018, Preparation and Evaluation of a Herbal Mouthwash Containing Oak Husk of Quercus brantii and Zataria multiflora. Jundishapur J Nat Pharm Prod;13(3):e13420.

[10] Ebrahimi, A., Khiabani, M. Vahidi, N. 2022, Comparition of Antimicrobial effect Of Different Part OF Quercus Persica Againt Eshershiacoli. Ofogh-E-Danesh; 17(454):11–17.

[11] Babadi, E., Bamzadeh, Z. and Babadi, F. 2017, Comparison of the antibacterial effects of chlorhexidine mouth washes with Jaftex mouth wash on some common oral microorganisms: An in vitro study. Middle East J Fam Med; 15(9): 3-20.

[12] Kakoie,A., Karimi,K., Toghiani, s. 2019, The Effect of Hydroalcoholic Extract Internal Layer of Iranian Oak (Quercus persica) on the Process of Wound Healing and Collagen Synthesis in Wistar Rats, Journal of Animal Biology; 12(1): 49-56.

[13] Mirzaei, A., Mirzaei, N., Mirzaei, M., Delaviz, H. J 2011, Hepatoprotectives effect of Iranian grape seed and Jaft (a part of oak fruit) extracts against CCL4 induced-liver toxicity in rats. Iran South Med; 14 (4) :230-239.

[14] Ghaemmaghami, S. S., Balali, G, R. 2013, Using pectic zymogram technique to identify interspecies variation of some Penicillium species.

[15] Mojtaba, T., Azizi, E., Sharifi, M. 2010, Antibacterial and antifungal activity of hydroalcoholic and etheric extracts of Quercus brantii; 2(4): 7.

[16] Iranian National Standard, Namber 2325, Microbiology of food and animal feed - General requirements and guidelines for microbiology tests.

[17] Iranian National Standard, Namber 5875, Preservatives-Determining the Minimum Inhibitory Concentration(MIC) Microbiological Test Method.

[17] Barani Biranvand, Z., Jafari, F., Shahram, A., Karmi, M. 2019, Investigating the effect of Gall on Biochemistry compounds Quercus persica trees (Case

Study: Blouran Area Lorestan Province). Journal of Plants Research(Iranian Journal of Biology); 31(4): 918-932

[19] Browing, B. 1967. Methods of wood chemistry, United state of America .interscience publisher; pp: 389 – 90

[20] Montaha Dargah, S., Ebrahimzadeh , M.,Morady, p. 2015 . Investigation of three extraction methods on total phenol and flavonoid activity and nitric oxide release in common vetch plant (Vicia hirsuta) grown in Mazandara. National conference on new topics in agriculture;3

[21] Jahandideh A., Akbarzadeh A., Vakili Moghadam N., Ziabakhsh Tabari P., Erfani, N S. 2019 .Effect of F. parviflora Extract on Wound Healing in Diabetic Rats . J Mazandaran Univ Med Sci; 29 (175):25-36

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of antifungal effect and non-growth diameter of Persian oak's Jaft extract on *Penicillium Digitatum* and *Penicillium Italicum* molds (indicator of mold spoilage after citrus fruits harvest

Tayebeh Shokohi[1], Alireza Shahab Lavasani[1*], Farnaz Dastmalchi[2], Hamed Zarei[3], Kobra Hajizadeh[4]

1- Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Varamin –Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2- Food Technology and Agricultural Products Research Center - Standard Research Institute
3- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Department of Physics, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antifungal effect of Iranian oak Jaft extract on *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*, as an indicator of mold spoilage after citrus fruits harvest. Different extraction methods were used to obtain tannins and flavonoids from the Oak Jaft. The study investigated the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC), and non-growth diameter of the molds using three different methods: tube dilution, surface culture, and diffusion in agar well. The results showed that different concentrations of aqueous extract had varying effects on the non-growth diameter of the molds. The antifungal effect was significantly increased with a concentration of 40 and 80 mg/ml of aqueous extract. In comparison, the control group, which used Fludioxonil 25% poison, showed a significant difference in mold growth. Therefore, the extract of Iranian oak Jaft can be used as an alternative to control fungal spoilage of citrus fruits.

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2023/3/1
Accepted: 2023/5/15

Keywords:

Jaft,
Penicillium italicum,
Penicillium digitatum,
Aqueous extract,
Fungicidal

DOI: 10.22034/FSCT.20.141.143
DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.141.10.8

*Corresponding Author E-Mail:
shahabam20@yahoo.com