مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تعیین فنول و فلاونوئید کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی پنیرباد بر قارچ‌های عامل فساد پس از برداشت میوه سیب و توت فرنگی

مصطفی رحمتی جنیدآباد*[۱]، فاطمه برنا[۱]، مختار حیدری[۲]

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

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۳۱

کلمات کلیدی:

پنیرباد؛

فعالیت ضدقارچی؛

اثر آنتی‌اکسیدانی؛

عصاره زیست فعال.

DOI: 10.22034/FSCT.20.142. 171

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.142.11.1

* مسئول مکاتبات:

Rahmati@asnrukh.ac.ir

چکیده

در پژوهش حاضر، عصاره هیدروالکلی پنیرباد استخراج گردید و سپس محتوای فنول کل (به روش معرف فولین-سیوکالتو)، فلاونوئید کل (به روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر پایه روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) و اثر ضدقارچی آن بر *ریزوپوس استولونیفر*، *بوتریتیس سینرا*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا آلترناتا* (قارچ‌های عامل فساد پس از برداشت میوه سیب و توت فرنگی) بر اساس روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره پنیرباد به ترتیب برابر با ۵۳/۱۶ mg GAE/g و ۲۸/۲۰ mg QE/g بدست آمد. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی بر حسب درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب برابر با ۶۹/۸۰ µg/ml و ۵۷/۱۵ بود. نتایج فعالیت ضدقارچی بر اساس روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار نشان داد که افزایش غلظت عصاره سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد گردید. *بوتریتیس سینرا* و *آلترناریا آلترناتا* به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه‌های قارچی در برابر عصاره بودند. بطور کلی *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا آلترناتا* نسبت به *ریزوپوس استولونیفر* و *بوتریتیس سینرا* حساس‌تر بودند، بطوریکه حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای این گروه به ترتیب ۱۶ mg/ml و ۱۲۸ مشاهده گردید.

۱- مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که در میوه‌ها، چای، سبزی‌ها، غلات و گیاهان دارویی وجود دارند، نه تنها برای پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف ناشی از آسیب اکسیداتیو، بلکه برای بهبود ماندگاری محصولات باغبانی نیز به کار می‌روند، توجه زیادی را به خود جلب کردند زیرا با اهداء هیدروژن به رادیکال‌های بسیار واکنش‌پذیر، از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند [۱, ۲].

متابولیت‌های ثانویه گیاهی یا "مواد شیمیایی گیاهی" توسط گیاهان برای عملکردهای بی‌شماری تولید می‌شوند، از محافظت در برابر اشعه ماوراء بنفش، محافظت در برابر عوامل بیماری‌زا و گیاه‌خواران، رنگدانه‌سازی برای بهبود شانس گرده‌افشانی، و سایر ابزارهای بهبود بقا و سلامت گیاه، بدون اینکه مستقیماً مورد استفاده قرار گیرند، در عملکردهای حیاتی مانند رشد و تولیدمثل نقش دارند. در چند دهه گذشته، علاقه علمی زیادی به این ترکیبات و فواید آنها برای سلامتی انسان افزایش یافته است، زیرا بسیاری از آنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی قابل‌توجهی از خود نشان می‌دهند [۳-۶].

از آنجایی که مصرف‌کنندگان نگران تأثیر منفی مواد شیمیایی مصنوعی در مواد غذایی هستند، نیاز به یافتن محصولات طبیعی و بدون نگهدارنده شیمیایی وجود دارد. بنابراین، علاقه فزاینده‌ای به استفاده از عصاره‌های طبیعی به عنوان جایگزین برای افزودنی‌های مصنوعی وجود دارد، زیرا این ترکیبات با سایر روش‌های نگهداری هم‌افزایی نشان می‌دهند، آنها ایمن در نظر گرفته می‌شوند و خواص ویژه‌ای از قبیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد جهش‌زایی و ضد باکتریایی بروز می‌دهند [۷-۹].

پنیرباد (*Withania somnifera*) حاوی طیفی از مواد شیمیایی گیاهی متنوع است که آن را قادر می‌سازد طیف وسیعی از پیامدهای بیولوژیکی داشته باشد. در مطالعات پیش بالینی، خواص ضد میکروبی، ضدالتهابی، ضد تومور، ضد استرس، محافظت کننده عصبی، محافظت از قلب و ضد دیابت را نشان داده است. علاوه بر این، توانایی کاهش گونه‌های فعال اکسیژن، تعدیل عملکرد میتوکندری، تنظیم آپوپتوز و کاهش التهاب و افزایش عملکرد اندوتلیال را نشان داده است. با توجه به این خواص دارویی، پنیرباد یک داروی بالقوه برای درمان شرایط بالینی مختلف، به ویژه مربوط به سیستم عصبی است [۱۰]. عصاره پنیرباد مخلوط پیچیده‌ای از تعداد زیادی فیتوکمیکال از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها است. با این حال، اثر فارماکولوژیک ریشه پنیرباد به ویتانولیدها[1] نسبت داده می‌شود [۱۱]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره پنیرباد در مطالعات مختلفی نشان داده شده است [۱۲, ۱۳]. بنابراین، این مطالعه با هدف استخراج عصاره هیدروالکلی پنیرباد و بررسی میزان فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدقارچی آن بر *ریزوپوس استولونیفر*، *بوتریتیس سینرا*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا آلترناتا* (قارچ‌های عامل فساد پس از برداشت میوه سیب و توت فرنگی) می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲- ۱- مواد

معرف‌های فولین-سیوکالتو، DPPH[2]، ABTS[3]، گالیک اسید و کوئرستین از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. محیط کشت‌های سابرو دکستروز آگار و سابرو دکستروز براث از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

1- Withanolides
2- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
3- 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

۲- ۲- استخراج عصاره

عصاره هیدروالکلی پنیرباد با استفاده از روش دانانی و همکاران (۲۰۱۷) با تغییرات مورد نیاز استخراج گردید. پس از جمع آوری و خشک شدن آن در سایه، گیاه خشک شده با استفاده از آسیاب برقی به خوبی پودر شدند. در ادامه، ۵ گرم از مواد گیاهی پودر شده با ۵۰ میلی‌لیتر حلال (آب:اتانول؛ ۵۰:۵۰ درصد حجمی/حجمی) در یک ظرف شیشه‌ای ته گرد مخلوط شد و حدود ۵ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رفلاکس شد. عصاره مایع به دست آمده توسط فیلتراسیون تحت خلأ از باقیمانده جامد جدا شده و با استفاده از یک اواپراتور چرخشی تغلیظ گردید [۱۲].

۲- ۳- اندازه‌گیری میزان فنول کل

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فنول فولین-سیوکالتو (رقت ۱۰ برابر) مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر محلول Na_2CO_3 اشباع اضافه و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد. در ادامه، جذب مخلوط واکنش در ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید و محتوای فنول کل عصاره به صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر گرم عصاره (mg GAE/g) بیان شد [۱۴].

۲- ۴- تعیین محتوای فلاونوئید کل

برای تعیین میزان فلاونوئید کل، ۱ میلی‌لیتر عصاره گیاهی رقیق شده با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی ۲ درصد $AlCl_3$ مخلوط شد. پس از گرمخانه گذاری در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه، جذب مخلوط واکنش در ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد انتخاب شد و منحنی استاندارد (۰-۵۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه گردید. محتوای فلاونوئید کل به عنوان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره (mg QE/g) بیان شد [۱۵].

۲- ۵- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲- ۵- ۱- مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH عصاره مطابق روش ارائه شده توسط یگانگی و همکاران (۲۰۱۸) اندازه‌گیری شد [۱۶]. به طور خلاصه، محلول استوک عصاره گیاه در متانول تهیه شد تا غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آید. سپس رقت‌ها در محدوده غلظت ۷/۸۱ تا ۵۰۰ تا میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. ۱ میلی‌لیتر از هر محلول رقیق شده با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی حاوی رادیکال DPPH (۰/۲ میلی‌مولار) مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و در مکان تاریک، جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد حاوی تمام معرف‌ها به جز عصاره بود. توانایی مهار رادیکال با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$I\% = ((A\ \text{blank} - A\ \text{sample})/A\ \text{blank}) \times 100$$

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب IC_{50} نشان داده شد (غلظت مؤثر عصاره برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های DPPH).

۲- ۵- ۲- مهار رادیکال آزاد ABTS

روش نوشاد و همکاران (۲۰۲۱) با تغییرات جزئی برای تعیین فعالیت مهار رادیکال ABTS عصاره استفاده شد [۱۷]. به طور خلاصه، حجم یکسانی از محلول ۷ میلی‌مولار ABTS و ۲/۴۵ میلی‌مولار $K_2S_2O_8$ با هم مخلوط شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت در شرایط تاریک نگهداری شد. محلول کاتیونی رادیکال ABTS به دست آمده سپس با متانول رقیق شد تا به جذب ۰/۲ ± ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد. پس از آن، عصاره (۰/۱ میلی‌لیتر) با محلول رادیکال ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) مخلوط شد و محلول به‌دست‌آمده به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر (As) در برابر نمونه شاهد (متانول؛ Ac). فعالیت مهار رادیکال ABTS عصاره طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$I\% = ((A\ c - A\ s)/A\ c) \times 100$$

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب IC_{50} نشان داده شد (غلظت مؤثر عصاره برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های ABTS).

۲- ۶- فعالیت ضدقارچی

اثر ضدقارچی عصاره هیدروالکلی پنیرباد در برابر *ریزوپوس استولونیفر*، *بوتریتیس سینرا*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا آلترناتا* بررسی گردید. کشت‌های قارچی لیوفیلیزه در شرایط استریل باز شده و در محیط کشت سابرو دکستروز براث، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

۲- ۶- ۱- دیسک دیفیوژن آگار[1]

برای این منظور، دیسک‌های کاغذی استریل (با قطر ۶ mm) در محلول‌های عصاره (۲۰، ۶۰، ۱۰۰ و ۱۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) غوطه‌ور شدند. سپس دیسک در مرکز سطح محیط قرار داده شد و پلیت‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه‌گیری و بعنوان فعالیت ضدقارچی عصاره گزارش گردید [۱۸].

۲- ۶- ۲- چاهک آگار[2]

در این روش، سوسپانسیون قارچی با استفاده از اسپریدر L شکل بر محیط سابرو دکستروز آگار در ظروف پتری‌دیش پخش شد. سپس چندین چاهک با قطر ۶ mm روی سطح محیط ایجاد و با ۶۰ میکرولیتر عصاره پر گردید. ظروف پتری‌دیش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و قطر مناطق بازدارنده اطراف چاهک‌ها تعیین شد [۱۹].

۲- ۶- ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی[3] رشد

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره با روش ماکرودایلوشن براث در ۱۲ عدد لوله آزمایشگاهی ۱۰ میلی‌لیتری استریل تعیین شد. ابتدا رقت‌های متوالی عصاره پنیرباد (۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در محیط سابرو دکستروز براث تهیه شد. سپس عصاره و سوسپانسیون قارچی به چاهک‌ها اضافه گردید. در ادامه، پلیت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. حداقل غلظت مهارکنندگی به عنوان کمترین غلظتی که از رشد قابل مشاهده (چشمی) جلوگیری می‌کرد تعیین گردید [۹].

۲- ۶- ۴- حداقل غلظت قارچ کشی[4]

در این روش، ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت از هر لوله آزمایشگاهی که در آن کدورت مشاهده نشد، روی سابرو دکستروز آگار کشت داده شد. پلیت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید و کمترین رقت که باعث مهار کامل رشد شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد [۲۰].

۲- ۷- آنالیز آماری

آزمون‌های این پژوهش در سه نوبت تکرار شدند. داده‌ها سپس با کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) و آزمون واریانس یک‌طرفه[5] آنالیز شدند. از آزمون دانکن ($p<0.05$) جهت تعیین اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

نتایج میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره هیدروالکلی پنیرباد در شکل ۱ گزارش شده است. عصاره حاوی ۵۳/۱۹ ± ۰/۷۸ mg GAE/g فنول کل و ۲۸/۲۰ ± ۰/۸۰ mg QE/g فلاونوئید کل بود.

1- Disk diffusion agar (DDA)
2-Well diffusion agar (WDA)
3- Minimum inhibitory concentration (MIC)
4- Minimum fungicidal concentration (MFC)
5- One-way ANOVA

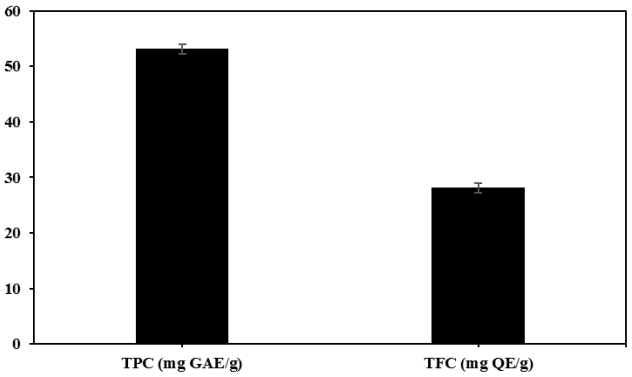

Figure 1. Total phenols (TPC) and flavonoids (TFC) contents of *Withania somnifera* hydroalcoholic extract.

مطابق شکل ۲، عصاره هیدروالکلی پنیرباد دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی بود. بطوریکه قابلیت آن در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب برابر با ۰/۵۸ ± ۶۹/۸۰ µg/ml و ۰/۶۷ ± ۵۷/۱۵ µg/ml بود.

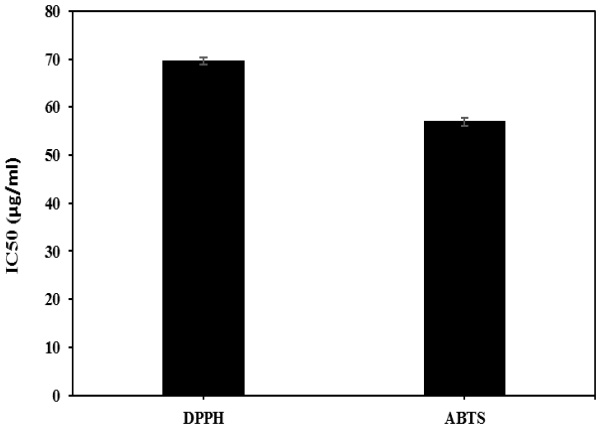

Figure 2. Antioxidant activity of *Withania somnifera* hydroalcoholic extract.

در مطالعه دانانی و همکاران (۲۰۱۷)، بازده عصاره، ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فنول کل و محتوای ویتانولید عصاره‌های آبی و عصاره‌های آبی–الکلی تهیه شده با استفاده از دو روش متداول و سبز (اولتراسوند و مایکروویو) مقایسه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز با استفاده از روش‌های سنجش آنتی‌اکسیدانی DPPH و ABTS تعیین شد. عملکرد عصاره، ترکیب شیمیایی عصاره‌ها (محتوای فنول کل و ویتانولید) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها وابسته به فرآیند استخراج و همچنین ترکیب حلال بود. محتوای فنول کل در عصاره تهیه شده با اتانول (۳۵/۹۳ mg GAE/g) و سپس آب–اتانول (۲۱/۱۵ mg GAE/g) و آب (۱۷/۶۳ mg GAE/g) حداکثر بود. در هر دو روش DPPH و ABTS، عصاره‌های اتانولی کمترین مقدار IC_{50} را داشتند و به ترتیب زیر متفاوت بودند: اتانول <آب–اتانول <آب [۱۲].

نتایج ضدقارچی عصاره هیدروالکلی پنیرباد بر اساس آزمون دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که افزایش غلظت عصاره منجر به افزایش معنی‌دار اثر ضدقارچی (قطر هاله عدم رشد) آن می‌گردد (شکل ۳). غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره فاقد هرگونه اثر ضدقارچی در برابر *ریزوپوس استولونیفر* و *بوتریتیس سینرا* بود. علاوه بر این، غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره قادر به جلوگیری از رشد *بوتریتیس سینرا* نبود. با اینحال، تمامی غلظت‌های مورد مطالعه دارای تأثیر ضدقارچی معنی‌داری بر *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا آلترناتا* بودند. در غلظت ۱۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره، کمترین قطر هاله عدم رشد (۹/۷۰ mm) مربوط به *بوتریتیس سینرا* و بیشترین قطر هاله عدم رشد (۱۲/۰۰ mm) به *آلترناریا آلترناتا* اختصاص یافت که به ترتیب بیانگر مقاومت و حساسیت این سویه‌های قارچی نسبت به عصاره هیدروالکلی پنیرباد می‌باشد.

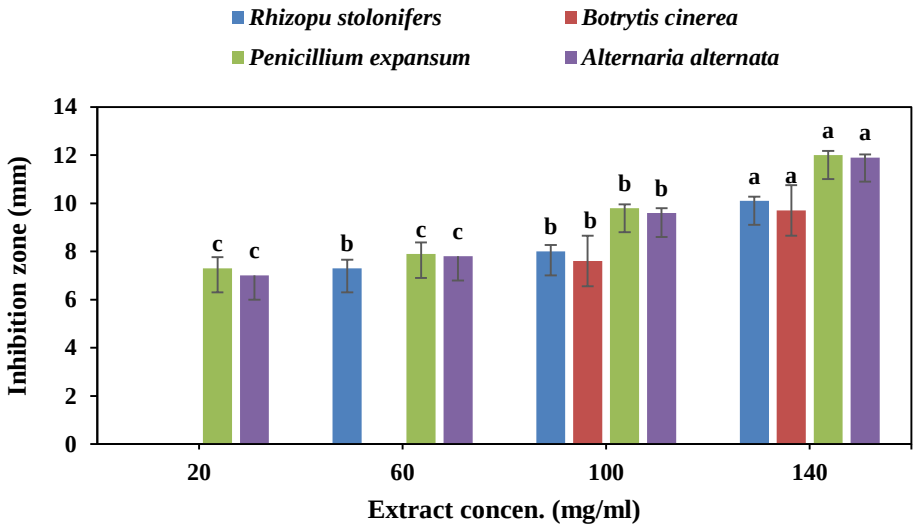

Figure 3. Antifungal activity of *Withania somnifera* hydroalcoholic extract, based on disk diffusion agar (DDA) method.

نتایج ضدقارچی مشابهی در آزمون چاهک آگار مشاهده گردید (شکل ۴)؛ قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره از ۲۰ به ۱۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بطور معنی‌داری افزایش یافت. علاوه بر این، *بوتریتیس سینرا* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* به ترتیب با کمترین (۱۰/۰۰ mm) و بالاترین (۱۲/۸۰ mm) قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه‌های قارچی در برابر عصاره بودند. همچنین، لازم به ذکر است که قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار بزرگ‌تر از روش دیسک دیفیوژن آگار بود. این حالت به دلیل تماس مستقیم عصاره با میکروارگانیسم‌ها در این روش است. درحالی‌که، در آزمایش ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار، عصاره بایستی از سطوح دیسک به داخل محیط پخش شود تا اثر بازدارندگی خود را نشان دهد [۲۱, ۲۲].

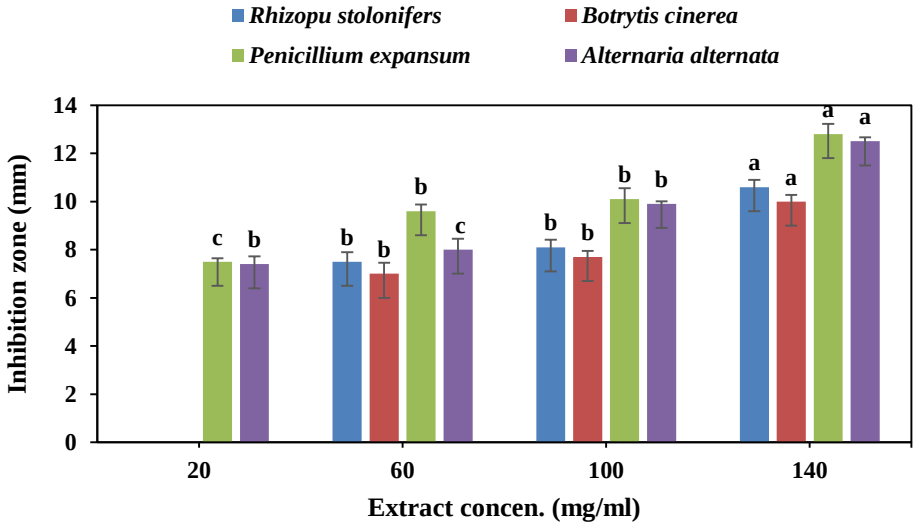

Figure 4. Antifungal activity of *Withania somnifera* hydroalcoholic extract, based on well diffusion agar (WDA) method.

نتایج آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی پنیرباد برای *ریزوپوس استولونیفر*، *بوتریتیس سینرا*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا* به ترتیب ۶۴، ۶۴، ۱۶ و ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی نیز برای سویه‌های مذکور به ترتیب ۵۱۲، ۵۱۲، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (شکل‌های ۵ و ۶). گزارش شده است که به دلیل ماهیت آبگریز، اسانس‌ها و عصاره‌ها به آسانی جذب میسلیوم قارچی می‌شود و از این طریق از رشد آن ممانعت به عمل می‌آورد [۲۳–۲۵].

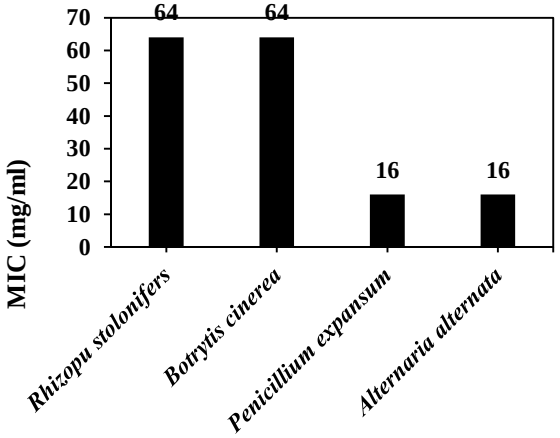

Figure 5. Antifungal activity of *Withania somnifera* hydroalcoholic extract, based on minimum inhibitory concentration (MIC) method.

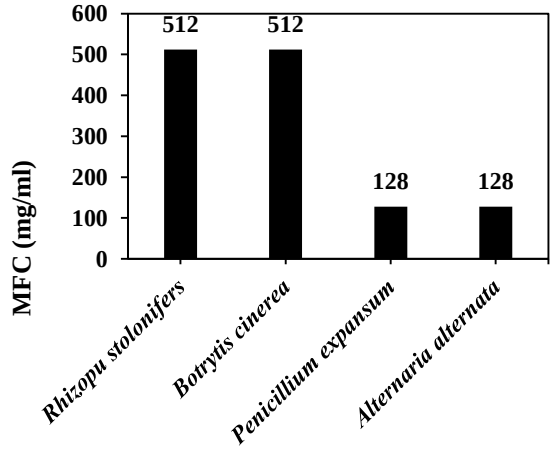

Figure 6. Antifungal activity of *Withania somnifera* hydroalcoholic extract, based on minimum fungicidal concentration (MFC) method.

در مطالعه‌ی آرورا و همکاران (۲۰۰۴) عصاره‌های متانولی، هگزانی و دی اتیل اتری از هر دو برگ و ریشه پنیرباد برای فعالیت ضدمیکروبی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار بررسی شد. از میان عصاره‌های مورد آزمایش، تنها عصاره متانولی و هگزانی هر دو برگ و ریشه مشخص شد که دارای فعالیت ضدمیکروبی قوی هستند. اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها را می‌توان به وجود ویتافرین[1] A و با ویتانولید D نسبت داد. [۱۳]. علاوه بر این، آلام و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره متانولی (۸۰:۲۰؛ متانول:آب) ریشه، میوه و برگ پنیرباد را بررسی نمودند. خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه با استفاده از آزمون‌های مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاء آهن، فعالیت شلاته کنندگی آهن و مهار رنگبری بتاکاروتن انجام شد. مقادیر DPPH، قدرت احیاء آهن، فعالیت شلاته کنندگی آهن و مهار رنگبری بتاکاروتن برای سه نوع عصاره به ترتیب µg/ml ۱۰۱/۷۳– ۸۰۱/۹۳، ۳/۲۹ –۲/۲۶ mM Fe/kg، ۰/۲۲ mg/ml – ۰/۶۵ و ۶۹/۸۷ – ۷۹/۶۷ درصد بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره حاصل از برگ پنیرباد را نشان می‌دهد. فعالیت ضدباکتریایی با استفاده از روش انتشار چاهک آگار و در برابر پنج باکتری گرم منفی بیماری‌زا (*اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی*، *سیتروباکتر فروندی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه*) اندازه‌گیری شد. عصاره برگ بالاترین فعالیت را در برابر *سالمونلا تیفی* نشان داد (قطر هاله عدم رشد: ۳۲ mm)، درحالی‌که کمترین فعالیت در برابر *کلبسیلا پنومونیه* (قطر هاله عدم رشد: ۱۹ mm) بود. کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی ۶/۲۵ mg/ml بود که در برابر *سالمونلا تیفی* و پس از آن ۱۲/۵ mg/ml در برابر باکتری *اشرشیا کلی* بود [۲۶]. این نتایج نشان می‌دهد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هر عصاره ممکن است با غلظت اسید اسکوربیک، آنتوسیانین و پلی‌فنول‌ها مرتبط باشد. علاوه بر این، فنولیک‌ها، اسید

1- Withaferin

اسکوربیک و آنتوسیانین‌ها با کارایی ضدمیکروبی گیاه مرتبط هستند زیرا باعث اسیدی شدن بیش از حد در سطح مشترک غشاء پلاسمایی پاتوژن می‌شوند که به طور بالقوه منجر به اختلال در H^+-ATPase مورد نیاز برای سنتز ATP می‌شود [۲۷]. جین و وارشنی (۲۰۱۱) قطر هاله عدم رشد در مورد فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی گیاه پنیرباد در برابر *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنز* را به ترتیب ۳۸ mm، ۳۶، ۱۵، ۳۸ و ۳۲ گزارش کردند. این محققین داشتند که عصاره آبی پنیرباد در مقایسه با عصاره متانولی، فعالیت ضد میکروبی بالاتری دارد [۲۸]. بنابراین، اسید آسکوربیک، آنتوسیانین و پلی‌فنول‌ها ممکن است مسئول فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه عصاره هیدروالکلی پنیرباد باشند. پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها اهمیت دارویی قابل‌توجهی دارند و ممکن است به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و تعدیل‌کننده ایمنی عمل کنند [۲۹].

۴- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، عصاره هیدروالکلی پنیرباد غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد که نقش بسیار مهمی در بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب ایفا می‌کنند. همچنین، فعالیت ضدقارچی عصاره وابسته به غلظت بود و این ترکیب اثر ضد میکروبی قابل‌توجهی در برابر سویه‌های *ریزوپوس استولونیفر*، *بوتریتیس سینرا*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *آلترناریا آلترناتا* نشان داد. بطور کلی، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی پنیرباد، ترکیبی زیست فعال با فعالیت ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه می‌باشد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۲/۲۰ می‌باشد، لذا از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

۶- منابع

[1] D. Patel, R. Kumar, S. Prasad, and S. Hemalatha, "Pedalium murex Linn (Pedaliaceae) fruits: a comparative antioxidant activity of its different fractions," *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, vol. 1, no. 5, pp. 395-400, 2011.

[2] A. Moure *et al.*, "Natural antioxidants from residual sources," *Food chemistry*, vol. 72, no. 2, pp. 145-171, 2001.

[3] J. W.-F. Law, N.-S. Ab Mutalib, K.-G. Chan, and L.-H. Lee, "Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations," *Frontiers in microbiology*, vol. 5, p. 770, 2015.

[4] J. B. L. Tan and Y. Y. Lim, "Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts," *Food Chemistry*, vol. 172, pp. 814-822, 2015.

[5] B. Alizadeh Behbahani, F. Falah, A.Vasiee, & 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.

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

[7] H. Tanavar, H. Barzegar, B. Alizadeh Behbahani, & M. A. Mehrnia, (2021).

Investigation of the chemical properties of Mentha pulegium essential oil and its application in Ocimum basilicum seed mucilage edible coating for extending the quality and shelf life of veal stored in refrigerator (4° C). *Food Science & Nutrition, 9*(10), 5600-5615.

[8] A. Alghooneh, B. A. 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.

[9] B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad, and F. Falah, "Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and m echanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens," *Potravinarstvo,* vol. 13, no. 1, pp. 875-883, 2019.

[10] N. J. Dar, A. Hamid, and M. Ahmad, "Pharmacologic overview of Withania somnifera, the Indian Ginseng," *Cellular and molecular life sciences,* vol. 72, no. 23, pp. 4445-4460, 2015.

[11] R. Udayakumar *et al.*, "Antioxidant effect of dietary supplement Withania somnifera L. reduce blood glucose levels in alloxan-induced diabetic rats," *Plant foods for human nutrition,* vol. 65, no. 2, pp. 91-98, 2010.

[12] T. Dhanani, S. Shah, N. Gajbhiye, and S. Kumar, "Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of Withania somnifera," *Arabian Journal of Chemistry,* vol. 10, pp. S1193-S1199, 2017.

[13] S. Arora, S. Dhillon, G. Rani, and A. Nagpal, "The in vitro antibacterial/synergistic activities of Withania somnifera extracts," *Fitoterapia,* vol. 75, no. 3-4, pp. 385-388, 2004.

[14] S. P. Wong, L. P. Leong, and J. H. W. Koh, "Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants," *Food chemistry,* vol. 99, no. 4, pp. 775-783, 2006.

[15] A. Gedikoğlu, M. Sökmen, and A. Çivit, "Evaluation of Thymus vulgaris and Thymbra spicata essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties," *Food science & nutrition,* vol. 7, no. 5, pp. 1704-1714, 2019.

[16] M. Yeganegi, F. T. Yazdi, S. A. Mortazavi, J. Asili, B. A. Behbahani, and A. Beigbabaei, "Equisetum telmateia extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection," *Microbial pathogenesis,* vol. 116, pp. 62-67, 2018.

[17] 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.

[18] F. T. Yazdi and B. A. Behbahani, "Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic Teucrium polium L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”," *Archives of Advances in Biosciences,* vol. 4, no. 4, pp. 56-62, 2013.

[19] B. A. Behbahani, F. T. Yazdi, F. Shahidi, H. Noorbakhsh, A. Vasiee, and A. Alghooneh, "Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria," *Microbial pathogenesis,* vol. 114, pp. 225-232, 2018.

[20] F. Falah, K. Shirani, A. Vasiee, F. T. Yazdi, and B. A. Behbahani, "In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of Echinops setifer extract," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* vol. 35, p. 102102, 2021.

[21] H. Tanavar, H. Barzegar, B. Alizadeh Behbahani, and M. A. Mehrnia, "Mentha pulegium essential oil:

chemical composition, total phenolic and its cytotoxicity on cell line HT29," *Iranian Food Science and Technology Research Journal,* vol. 16, no. 5, pp. 643-653, 2020.

[22] F. Shahidi, F. Tabatabaei Yazdi, S. Roshanak, B. Alizadeh Behbahani, A. Vasiee, and N. Norouzi, "Antimicrobial activity of Taraxacum pseudocalocephalum leaves extract on pathogenic microorganisms and comparison with common therapeutic antibiotics in vitro," *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine,* vol. 23, no. 83, pp. 37-46, 2019.

[23] B. Alizadeh Behbahani, F. Shahidi, F. T. Yazdi, and M. Mohebbi, "Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro"," *International Journal of Agronomy and Plant Production,* vol. 4, no. 7, pp. 1652-1658, 2013.

[24] Rahmati-Joneidabad, M., Alizade Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Antifungal effect of Satureja khuzestanica essential oil on Aspergillus niger, Botrytis cinerea, and Rhizopus stolonifer causing strawberry's rot and mold. *Food Science and Technology*, *18*(115), 171-180 .

[25] Rahmati-Joneidabad, M., and Alizadeh Behbahani, B. 2021. Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil against spoilage fungi causing apple rot. *Iranian Food Science and Technology Research 17*(5): 691-700.

[26] N. Alam, M. Hossain, M. A. Mottalib, S. A. Sulaiman, S. H. Gan, and M. I. Khalil, "Methanolic extracts of Withania somnifera leaves, fruits and roots possess antioxidant properties and antibacterial activities," *BMC complementary and alternative medicine,* vol. 12, no. 1, pp. 1-8, 2012.

[27] D. Vattem, Y.-T. Lin, R. Labbe, and K. Shetty, "Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus Rhizopus oligosporus," *Process Biochemistry,* vol. 39, no. 12, pp. 1939-1946, 2004.

[28] P. Jain and R. Varshney, "Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of Withania somnifera (Ashwagandha)," *J Chem Pharm Res*, vol. 3, no. 3, pp. 260-263, 2011.

[29] F. Garavand, N. Eghbal, M. Nooshkam, I. Miraballes, and S. M. Jafari, "Salt, spices, and seasonings formulated with nano/microencapsulated ingredients," in *Application of Nano/Microencapsulated Ingredients in Food Products*: Elsevier, 2021, pp. 435-467.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Determination of total phenols and flavonoids, antioxidant potential and antimicrobial activity of hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* against fungi cause spoilage postharvest apple and strawberry fruits

Mostafa Rahmati-Joneidabad*[1], Fatemeh Borna[1], Mokhtar Heidari [2]

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

2- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ABSTRACT

In the present study, the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* was extracted and then the content of total phenol (by Folin-Ciocalteu reagent), total flavonoid (by aluminum chloride method), antioxidant activity (based on DPPH and ABTS free radical scavenging methods) and its antifungal effect against *Rhizopu stolonifers*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Alternaria alternata* (fungi cause spoilage postharvest apple and strawberry fruits) were determined based on disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration. The amount of phenol and flavonoids in the extract was 53.16 mg GAE/g and 28.20 mg QE/g, respectively. The antioxidant power of the hydroalcoholic extract was 69.80 and 57.15 µg/ml in terms of DPPH and ABTS free radical scavenging, respectively. The results of antimicrobial activity based on disk diffusion agar and well diffusion agar showed that increasing the concentration of the extract caused a significant increase in the diameter of the growth inhibition zone and *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* were the most resistant and sensitive strains to the extract, respectively. In general, *Penicillium expansum* and *Alternaria alternata* were more sensitive than *Rhizopus stolonifer* and *Botrytis cinerea* with minimum inhibitory and fungicidal concentrations of 16 and 128 mg/ml, respectively.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/7/16
Accepted: 2023/8/22

Keywords:

Withania somnifera;
Antifungal activity;
Antioxidant effect;
Bioactive extract.

DOI: 10.22034/FSCT.20.142.171
DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.142.11.1

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