مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

# ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید کل و فعالیت ضدمیکروبی اسانس لرگ بر باکتری های بیماری زا: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

**حسن برزگر***[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، محمد نوشاد[۱]

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

**اطلاعات مقاله**

**تاریخ های مقاله :**

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۱۲/۱

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۱/۲۱

**کلمات کلیدی:**

اسانس لرگ،

نگهدارنده طبیعی،

ضد میکروب،

آنتی‌اکسیدان،

ترکیبات زیست فعال.

**DOI:10.22034/FSCT.21.151.186.**

* مسئول مکاتبات:

hbarzegar@asnrukh.ac.ir

**چکیده**

افزودن نگهدارنده های شیمیایی باعث افزایش ماندگاری محصولات غذایی می‌شود، اما استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از نگهدارنده های شیمیایی باعث افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها و خطرات سلامتی مرتبط با جذب آنها می‌شود. گیاهان دارویی هم در دنیا و هم در ایران تنوع زیادی داشته و قابلیت استفاده بعنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی را دارا می‌باشند. در این مطالعه، اثر ضد میکروبی اسانس لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *انتروباکتر ائروژنز* و *سالمونلا تیفی* توسط دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد. محتوای فنول کل و فلاونوئید اسانس به ترتیب با استفاده از روش‌های فولین سیوکالتو و کلرید آلومینیوم تعیین گردید. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس از دو روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS استفاده شد. محتوای فنول و فلاونوئید کل اسانس ۳۸/۶۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم و محتوای فلاونوئید آن ۱۹/۲۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بود. اسانس لرگ قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (۵۸/۶۰ درصد) و ABTS (۵۹/۸۰ درصد) بود. نتایج فعالیت ضد میکروبی اسانس به روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار به خوبی نشان داد که *باسیلوس سوبتیلیس* و *انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی نسبت به اسانس می‌باشند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای این باکتری‌ها به ترتیب ۲ و ۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب ۳۲ و بزرگ‌تر از ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

## ۱-مقدمه

صنعت غذا عمدتاً از نگهدارنده های مواد غذایی سنتزی برای جلوگیری از اکسیداسیون و آلودگی میکروبی مواد غذایی بسته بندی شده استفاده می‌کند. اما امروزه به دلیل اثرات نامطلوب ترکیبات مصنوعی بر سلامت و محیط زیست و مشکل روزافزون پیدایش سویه‌های مقاوم به دارو، تمرکز صنعت غذا به سمت استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی طبیعی استخراج شده از گیاهان به عنوان نگهدارنده معطوف شده است. نگهدارنده های طبیعی مواد غذایی ایمن، سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه هستند [۱-۶].

اسانس‌ها ترکیبات فرار، طبیعی و پیچیده‌ای هستند که توسط گیاهان معطر به عنوان متابولیت‌های ثانویه تشکیل می‌شوند. آنها معمولاً با بخار آب یا تقطیر با آب برای اولین بار در قرون وسطی توسط اعراب توسعه یافتند و به دلیل خاصیت ضد عفونی کنندگی، یعنی باکتری‌کشی، ویروس کشی، قارچ‌کش، و خواص دارویی و رایحه آنها در مومیایی کردن، نگهداری غذاها و به عنوان داروهای ضد میکروبی، ضد درد، آرام بخش، ضد التهاب، ضد اسپاسم و بی حس کننده موضعی استفاده می‌شوند. تا به امروز، این ویژگی‌ها تغییر چندانی نکرده‌اند، به جز اینکه در حال حاضر اطلاعات بیشتری در مورد برخی از مکانیسم‌های اثر آنها، به ویژه در سطح ضد میکروبی، شناخته شده است [۷]. اسانس‌ها در طبیعت نقش مهمی در حفاظت از گیاهان به عنوان ضد باکتری، ضد ویروس، ضد قارچ، حشره کش و همچنین در برابر علفخواران با کاهش اشتهای آنها به این گونه گیاهان ایفا می‌کنند. اسانس‌ها از گیاهان معطر مختلفی استخراج می‌شوند و بصورت مایع، فرار، شفاف و به ندرت رنگی، محلول در چربی و محلول در حلال‌های آلی با چگالی کمتر از آب هستند. آنها می‌توانند توسط همه اندام‌های گیاهی مانند جوانه‌ها، گل‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها، شاخه‌ها، دانه‌ها، میوه‌ها، ریشه‌ها، چوب یا پوست سنتز شوند و در سلول‌های ترشحی، حفره‌ها، کانال‌ها، سلول‌های اپیدرمی یا تریکوم غددی ذخیره می‌شوند [۷].

لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) یک درخت ساحلی معمولی است که عمدتاً در مناطق پست قرار دارد و تنها نماینده درخت از جنس *Pterocarya* در خارج از شرق آسیا، با ویژگی‌های مورفولوژیکی خاص است. به طور محلی، لرگ حفاظت از منطقه ساحلی و غذا را برای مصرف کنندگان آبزی و خشکی فراهم می‌کند. لرگ برای باغبانی به اروپا معرفی شده است و در حال حاضر در جنگل‌کاری استفاده می‌شود. برای قرن‌ها، زیستگاه‌های لرگ، عمدتاً به دلیل تبدیل به زمین کشاورزی و اخیراً به دلیل حفاری شن و ساخت جاده و نیروگاه آبی کاهش یافته است [۸]. لرگ درختی با رشد سریع است که به طور طبیعی در سراسر منطقه دریای سیاه غربی ترکیه پراکنده شده و بومی قفقاز از شمال ایران تا اوکراین است [۹]. لرگ درختی است قطور، خزان کننده با پوست تنه شیاردار، خاکستری تیره به ارتفاع تا ۳۵ متر. این گونه به صورت خودرو در استان‌های گرگان، گیلان و مازندران می‌روید و در سال‌های اخیر توده‌های کوچکی از آن در استان‌های ایلام و لرستان نیز یافت شده است [۱۰]. با اینحال، اطلاعات محدودی در مورد خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره آن وجود دارد.

نبوی و همکاران (۱۳۸۷) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی لرگ را بررسی نمودند و نتایج این محققین نشان داد که عصاره لرگ قادر به مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۱۰]. بتولی و همکاران (۱۳۹۵) ترکیبات شیمیائی اسانس برگ‌های درخت لرگ در مراحل مختلف فنولوژی در منطقه گیلان را شناسایی کردند [۱۱]. با توجه به مطالب فوق، هدف از این مطالعه، استخراج اسانس درخت لرگ و تعیین محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و بررسی اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن به منظور معرفی نوع جدیدی از ترکیبات دارویی طبیعی با خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲- ۱- مواد

از مواد با درجه آزمایشگاهی تهیه شده از شرکت‌های مرک (آلمان) و سیگما (آمریکا) برای انجام آزمون‌های شیمیایی و میکروبی استفاده گردید.

**۲- ۲- استخراج اسانس**

برای تهیه اسانس، گیاه خشک شده بصورت پودر در دستگاه کلونجر قرار داده شد و استخراج اسانس مطابق با روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت انجام گردید. عملیات آبگیری اسانس توسط سولفات سدیم صورت گرفت و اسانس حاصل در ظروف تیره رنگ تمیز تا زمان انجام آزمون‌های شیمیایی و میکروبی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۳].

**۲- ۳- فنول کل**

میزان فنول کل اسانس با استفاده از معرف فولین–سیوکالتو اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر اسانس با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف ۱۰ درصد فولین ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم به مخلوط اضافه و پس از طی زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه اسانس در طول‌موج ۷٦۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار فنول کل اسانس بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم اسانس گزارش گردید [۱۲].

**۲- ٤- فلاونوئید کل**

برای تعیین محتوای فلاونوئید کل اسانس از روش طیف‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس با متانول رقیق شد و محلول حاصل با $NaNO_2$ و $AlCl_3$ ترکیب و به مدت ٦ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از ٦ دقیقه، NaOH ۱ مولار به محلول اضافه و جذب آن در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید کل اسانس بصورت میلی‌گرم کوئرستین در گرم اسانس گزارش گردید [۱۳].

**۲- ۵- فعالیت آنتی‌اکسیدانی**

**۲- ۵- ۱- مهار رادیکال DPPH**

جهت انجام این آزمون ۵۰ میکرولیتر از اسانس با ۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH ترکیب و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس فرمول زیر محاسبه و گزارش گردید [١٤].

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = [(Absb - Abss)/Absb] \times 100$$

در این معادله، Absb و Abss به ترتیب جذب شاهد و نمونه می‌باشند.

**۲- ۵- ۲- مهار رادیکال ABTS**

مونو کاتیون رادیکال از پیش ساخته شده ABTS با اکسیداسیون محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با محلول پرسولفات پتاسیم ۲/٤۵ میلی‌مولار به مقدار مساوی تولید شد. مخلوط به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده در ٦۰ میلی‌لیتر متانول رقیق شد تا جذب ۰/۷۰٦ در ۷۳٤ نانومتر به دست آید. ۱ میلی‌لیتر از محلول کاتیونی رادیکال ABTS به اسانس اضافه شد و جذب در طول‌موج ۷۳٤ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد مهار رادیکال ABTS توسط اسانس با استفاده از معادله ذکر شده در بخش مهار رادیکال آزاد DPPH محاسبه شد [۱۵].

**۲- ٦- فعالیت ضدمیکروبی**

فعالیت ضد باکتریایی اسانس در برابر باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *انتروباکتر ائروژنز* و *سالمونلا تیفی* مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی بررسی شد.

**۲- ٦- ۱- دیسک دیفیوژن آگار**

جهت بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس به روش دیسک دیفیوژن آگار، ابتدا دیسک‌های کاغذی با ۲۰ میکرولیتر اسانس آغشته شدند. بعد از کشت سوسپانسیون میکروبی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار، دیسک‌های کاغذی روی محیط کشت قرار داده شدند. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت صورت پذیرفت و قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های کاغذی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید [۱٦].

**۲- ٦- ۲- چاهک آگار**

در این روش، چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر با فاصله ۲۰ میلی‌متر توسط انتهای پیپت پاستور بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد گردید. ته چاهک‌ها به وسیله محیط کشت آگار بسته شد. ۲۰ میکرولیتر از اسانس استریل شده توسط فیلتر سرسرنگی (۰/۲۲ میکرونی) درون هر یک از چاهک‌ها به آرامی اضافه گردید. برای هر یک از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی مطابق با سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند کشت چمنی صورت پذیرفت. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از طی ۲٤ ساعت، قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر توسط خط‌کش اندازه‌گیری و گزارش شد [۱۲].

**۲- ٦- ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی**

از روش‌های ارائه شده توسط علیزاده بهبهانی و همکاران [۳] جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس استفاده گردید. روش رقیق‌سازی در پلیت ۹٦ خانه‌ای برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد استفاده شد. برای این منظور، غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس تهیه و استریل گردید و سپس غلظت‌های متوالی از آن (۱-۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر اسانس و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به هر چاهک اضافه شد و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت صورت پذیرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر معرف تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید به هر چاهک اضافه و تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی بصورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. عدم ایجاد رنگ قرمز یا ارغوانی بیانگر عدم رشد میکروبی بود و در این راستا، کمترین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس در نظر گرفته شد.

روش پور پلیت برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس استفاده شد. بطور خلاصه، محتویات چاهک‌هایی که تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی در روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی در آنها مشاهده نشد، روی محیط کشت مولر هینتون آگار بصورت پورپلیت کشت داده شد. گرمخانه گذاری مطابق شرایط بالا انجام شد و رشد کلنی مورد بررسی قرار گرفت. اولین غلظتی که سبب جلوگیری از تشکیل کلنی شده بود بعنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس گزارش گردید.

**۲- ۷- آنالیز آماری**

تمامی نتایج با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار Minitab (نسخه ۱٦) پردازش شدند. اختلاف معنی‌داری بین میانگین نتایج با کمک آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید. نتایج به عنوان انحراف معیار ± میانگین گزارش شد و آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

## ۳- نتایج و بحث

ترکیبات فنولی به عنوان یک گروه عمده از فیتوکمیکال‌ها به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. اسانس لرگ دارای ۳۸/٦۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم فنول کل و ۱۹/۲۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم فلاونوئید کل بود (شکل ۱). اخباری و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند که عصاره‌های متانولی برگ و تنه درخت لرگ به ترتیب حاوی ۱۳۷/۹٦ و ۲۵۵/۳۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم می‌باشند [۱۷]. علاوه بر این، گزارش شده است که اسانس برگ و پوست درخت لرگ به ترتیب دارای ٤۲۹/۵۱ و ۸۸/۵۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم فنول کل و ۲٤/۳۲ و ۱۱/۸۲

میلی‌گرم کوئرستین در گرم فلاونوئید کل می‌باشد [۱۸]. تفاوت در نتایج این پژوهش و سایر تحقیقات ناشی از این حقیقت است که سن و تنوع گیاه، شرایط جغرافیایی، روش‌های خشک‌کردن و روش‌های استخراج بر میزان و نوع ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها تأثیرگذار است [۱۶, ۱۹].

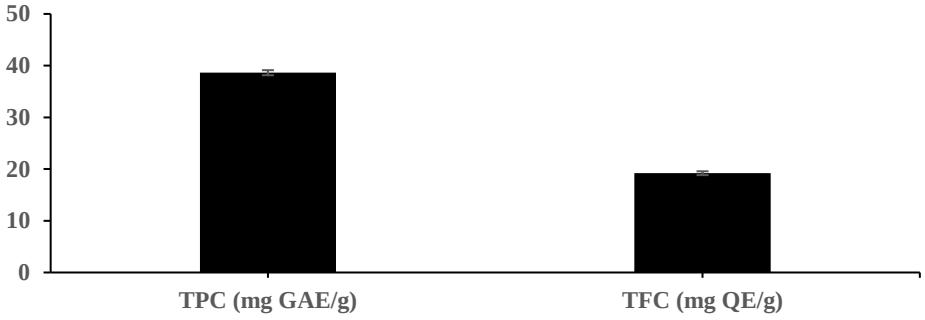


**Figure 1**. Total phenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *P. fraxinifolia* essential oil. GAE = Gallic acid equivalent; QE = quercetin equivalent.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها عمدتاً به هم‌افزایی بین ترکیبات آنها نسبت داده می‌شود و ترکیبات اصلی در درجه اول مسئول این اثر بیولوژیکی مثبت اسانس‌ها هستند [۱۶]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر پایه مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS به ترتیب ۵۸/۶۰ درصد و ۵۹/۸۰ درصد مشاهده گردید (شکل ۲) که نشان دهنده توانایی قوی اسانس در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS از طریق مکانیسم اهداء اتم هیدروژن یا الکترون می‌باشد [۲۰]. اخباری و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های برگ و تنه و عصاره‌های متانولی برگ و تنه درخت لرگ بر پایه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به ترتیب ۴۳/۴۵، ۱۹/۲۵، ۳۹/۸۰ و ۱۵/۸۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و این مقادیر در آزمون مهار لینولئیک اسید/بتا-کاروتن به ترتیب ۱۸/۶۶، ۱۴/۱۸، ۸۰/۹۹ و ۸۶/۷۴ درصد می‌باشد [۱۷]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس برگ و پوست درخت لرگ بر پایه مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت کاهندگی، مهار نیتریک اکسید و شلاته کنندگی آهن نیز در مطالعه‌ی ابراهیم زاده و همکاران گزارش شده است [۱۸]. بنابراین می‌توان استنباط کرد که اسانس لرگ دارای ویژگی مهار رادیکال قوی همراه با پتانسیل برای پایان دادن واکنش اکسیداسیون لیپید است. این روغن می‌تواند به عنوان یک جایگزین طبیعی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در فناوری‌های نگهداری مواد غذایی به منظور بهبود پایداری اکسایشی بسیاری از محصولات غذایی استفاده شود.

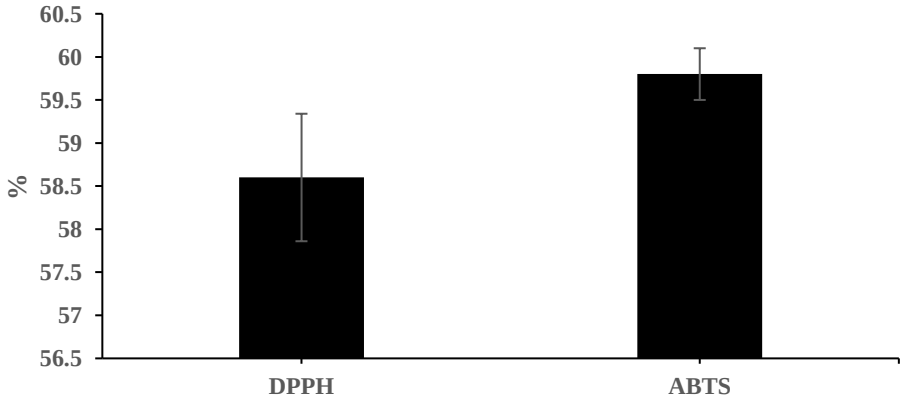

**Figure 2**. Antioxidant effect of *P. fraxinifolia* essential oil based on DPPH and ABTS radical scavenging methods.

اثر ضد میکروبی اسانس لرگ بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه گردید و نتایج در شکل‌های ۳ و ٤ و جدول ۱ ارائه شده است. اثر اسانس به دلیل انواع میکروارگانیسم‌ها متفاوت بود. شکل ۳ نتایج روش ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار را نشان می‌دهد. مطابق نتایج، بالاترین (۱٤/۳۰ میلی‌متر) و کمترین (۸/۷۰ میلی‌متر) قطر هاله عدم رشد به ترتیب مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس و انتروباکتر ائروژنز* بود ($p < 0.05$). در این راستا، *باسیلوس سوبتیلیس و انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی در برابر اسانس بودند. قطر هاله‌های عدم رشد برای باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری* و *سالمونلا تیفی* به ترتیب ۱۲/۹۰، ۱۳/۸۰، ۱۰/۸۰ و ۹/۱۰ میلی‌متر مشاهده گردید.

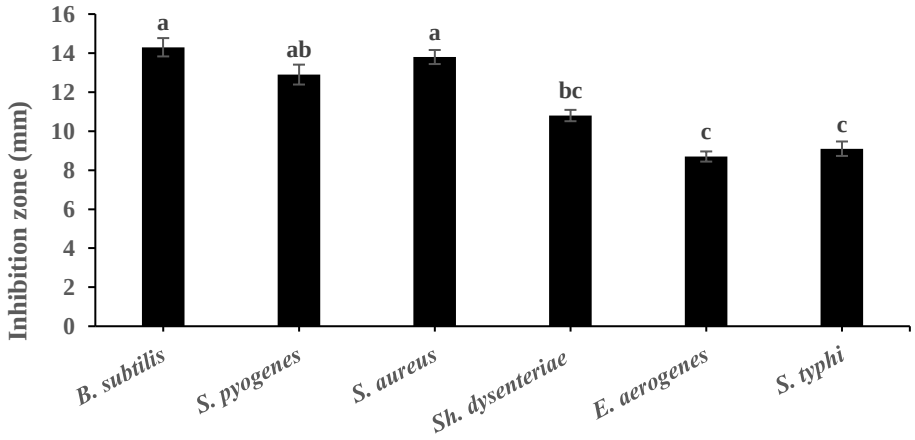


**Figure 3**. Antibacterial effect of *P. fraxinifolia* essential oil based on disc diffusion agar method.

شکل ٤، نتایج ضدمیکروبی اسانس بر پایه روش چاهک آگار را نشان می‌دهد. *باسیلوس سوبتیلیس و انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب حساس‌ترین (با قطر هاله عدم رشد ۱۵/۸۰ میلی‌متر) و مقاوم‌ترین (با قطر هاله عدم رشد ۹ میلی‌متر) سویه‌های میکروبی در برابر اسانس بودند. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری* و *سالمونلا تیفی* به ترتیب ۱۳، ۱۵/٦۰، ۱۱/٦۰ و ۱۰/٦۰ میلی‌متر به دست آمد.

شایان ذکر است که اسانس فعالیت ضد میکروبی بیشتری در روش چاهک آگار نسبت به روش دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که ممکن است ناشی از تماس مستقیم اسانس با میکروارگانیسم‌ها در این روش است. در حالی که در روش ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار، اسانس باید از سطوح دیسک به داخل محیط نفوذ یابد تا اثر بازدارندگی خود را نشان دهد [۳, ۲۱, ۲۲].

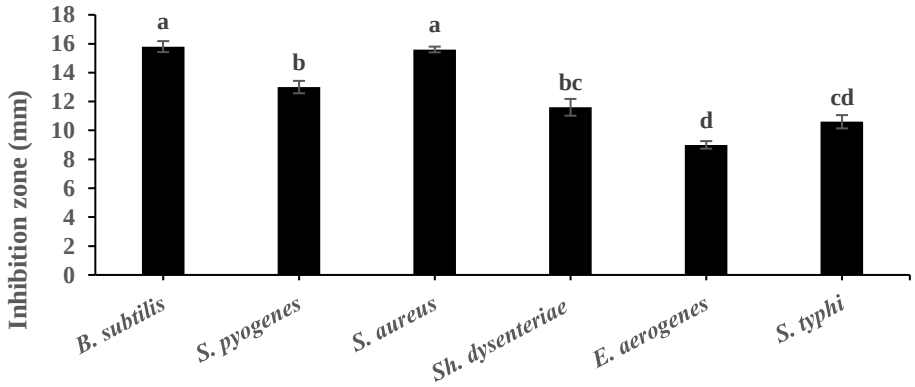


**Figure 4**. Antibacterial effect of *P. fraxinifolia* essential oil based on well diffusion agar method.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، حداقل غلظت اسانس که قادر به مهار رشد میکروبی یا کشتن میکروارگانیسم‌ها بود، برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* کمتر بود که در راستای نتایج روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار می‌باشد.

**Table 1**. Antibacterial effect of *P. fraxinifolia* essential oil based on minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration methods.

| Bacterial type | Minimum inhibitory concentration (mg/mL) | Minimum bactericidal concentration (mg/mL) |
|---|---|---|
| *B. subtilis* | 2 | 64 |
| *S. pyogenes* | 4 | 128 |
| *S. aureus* | 2 | 128 |
| *Sh. dysenteriae* | 16 | 512 |
| *E. aerogenes* | 32 | > 512 |
| *S. typhi* | 32 | 512 |

علاوه بر این، توجه به این نکته مهم است که باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، مقاومت بالاتری نسبت به اسانس نشان دادند که احتمالاً به دلیل ساختار پیچیده‌تر غشای سلولی مبتنی بر لیپوپلی ساکارید در باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با تک لایه موکوپپتیدی در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. به این ترتیب، لایه لیپوپلی ساکارید سرعت انتشار ترکیبات آبگریز اسانس را در غشای سلولی باکتری‌های گرم منفی محدود می‌کند [٤, ٥, ١٢, ١٩, ٢١, ٣٣-٢٣].

مطالعات بسیار محدودی در مورد اثر ضدمیکروبی اسانس درخت لرگ وجود دارد. در مطالعه‌ی اخباری و همکاران [۱۷]، فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی لرگ در برابر ۱۱ میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت و قدرت آنها هم از نظر کیفی و هم از نظر کمی با وجود یا عدم وجود مناطق بازدارنده، قطر ناحیه بازدارندگی و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد ارزیابی شد. اسانس، فعالیت ضد میکروبی را علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *اشرشیا کلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* آزمایش شده نشان داد. حداکثر مناطق بازدارندگی و حداقل مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد به ترتیب ۲۲ میلی‌متر و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که حساسیت بالایی را برای سویه میکروبی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به بخش اسانس برگ نشان داد. اگرچه عصاره متانولی برگ گیاه نیز فعالیت ضد میکروبی را علیه *آسپرژیلوس برازیلینسیس* و *شیگلا دیسانتری* در هر دو آزمایش انتشار دیسک و میکرودایلوشن نشان داد و عصاره ساقه طیف فعالیت ضد میکروبی قوی‌تر و گسترده‌تری را نشان داد [۱۷].

اثر ضد میکروبی اسانس به دلیل ترکیبات فنولی آن است. این اجزای فعال زیستی نقش مهارکننده رشد میکروبی را از طریق مهار آنزیمی و یا واکنش با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها از طریق حالت‌های غیر اختصاصی و اصلاح عملکرد پروتئین نشان می‌دهند [۳٤].

## ٤- نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس لرگ دارای مقادیر قابل‌توجهی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بوده و دارای اثر آنتی‌اکسیدانی معنی‌داری می‌باشد. نتایج آزمون‌های میکروبی نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای *باسیلوس سوبتیلیس* و *انتروباکتر ائروژنز* به ترتیب ۲ و ٦٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب ۳۲ و بزرگ‌تر از ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. بیشترین قطر هاله عدم رشد اسانس در آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار مربوط به گونه *باسیلوس سوبتیلیس* و کمترین قطر مربوط به گونه *انتروباکتر ائروژنز* بود. با اینحال، به منظور بهره‌مندی از پتانسیل ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس لرگ به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های بیشتری در زمینه تأثیر اسانس لرگ در کاهش رشد میکروبی و اکسیداسیون لیپیدی و در نهایت افزایش نگهداری مواد غذایی مختلف صورت پذیرد.

## ٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی شماره ۱۴۰۲/۳۳ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## ٦-منابع

[1] Noshad, M., Hojjati, M., & Behbahani, B. A. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis*, *116*, 153-157.

[2] Sharma, K., Guleria, S., Razdan, V. K., & Babu, V. (2020). Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Industrial Crops and Products*, *154*, 112569. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569

[3] Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2020). The combined effect of the combined Fennel and Clove essential oils on Staphylococcus epidermidis, Bacillus cereus, Salmonella typhi and Enterobacter aerogenes using Checkerboard assay (fractional inhibitory concentration index). *Journal of Food Science and Technology*, *17*(106), 75-83. https://doi.org/10.52547/fsct.17.106.75

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

[5] Yazdi, F. T., Falah, F., Behbahani, B. A., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2019). Identification of Chemical Compounds, Antioxidant Potential, Phenolic Content and Evaluation of Inhibitory and Bactericidal/Fungicidal Effects of Ginger Essential Oil on Some Pathogenic Microorganisms in Vitro. *Qom University of Medical Sciences Journal 13*(3), 50-62 .

[6] Yazdi, F. T., Tanhaeian, A., Azghandi, M., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Mortazavi, S. A., & Roshanak, S. (2019). Heterologous expression of Thrombocidin-1 in Pichia pastoris: Evaluation of its antibacterial and antioxidant activity. *Microbial Pathogenesis*, *127*, 91-96.

[7] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446-475. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

[8] Song, Y.-G., Walas, Ł., Pietras, M., Sâm, H. V., Yousefzadeh, H., Ok, T., Farzaliyev, V., Worobiec, G., Worobiec, E., Stachowicz-Rybka, R., Boratyński, A., Boratyńska, K., Kozlowski, G., & Jasińska, A. K. (2021). Past, present and future suitable areas for the relict tree Pterocarya fraxinifolia (Juglandaceae): Integrating fossil

records, niche modeling, and phylogeography for conservation. *European Journal of Forest Research*, *140*(6), 1323-1339. https://doi.org/10.1007/s10342-021-01397-6

[9] Muge Gungor, N., Nami Kartal, S., & Kantay, R. (2007). Technological properties of wingnut (Pterocarya fraxinifolia (LAM.) Spach.) wood and characteristics of plywood from wingnut wood. *Building and Environment*, *42*(8), 3108-3111. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2006.10.036

[10] Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., & Nabavi, S. F. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanolic extract of Pterocarya fraxinifolia (Lam.) Spach leaves and bark. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *24*(3), 374-384 .

[11] Batooli, H., Akhbari, M., Yasa, N., Khanavi, M., & Tavakoli, S. (2016). Comparison of essential oil composition of Pterocarya fraxinifolia (Poir.) Spach. leaves in different phenology stages from Gilan province .*Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, *4*(1), 83-94 .

[12] Tabatabaei Yazdi, F., Falah, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A., & Mortazavi, A. (2019). Antimicrobial effect of Citrus aurantium essential oil on some food-borne pathogens and its determination of chemical compounds, total phenol content, total flavonoids content and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, *16*(87), 291-304 .

[13] Borah, A., Paw, M., Gogoi, R., Loying, R., Sarma, N., Munda, S., Kumar Pandey, S., & Lal, M. (2019). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and in-vitro cytotoxic efficacy of essential oil of Curcuma caesia Roxb. leaves: An endangered medicinal plant of North East India. *Industrial Crops and Products*, *129*, 448-454. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.035

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

[15] Okoh, S. O., Asekun, O. T., Familoni, O. B., & Afolayan, A. J. (2014). Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Seed and Shell Essential Oils Extracted from Abrus precatorius (L). *Antioxidants*, *3*(2), 278-287 .

[16] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities of Cinnamomum zeylanicum Bark Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2020*, 5190603. https://doi.org/10.1155/2020/5190603

[17] Akhbari, M., Tavakoli, S., Ghanbari, Z., Dadgarnia, M., & Mazoochi, A. (2017). Evaluation of biological activity and analysis of volatile fraction from Pterocarya fraxinifolia in vegetative stage from Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 8(2), 119-126.

[18] Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., & Nabavi, S. (2009). Essential oil composition and antioxidant activity of Pterocarya fraxinifolia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *12*(13), 957-963 .

[19] Zanganeh, H., Mortazavi, S. A., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in Lallemantia iberica seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*(6), 5556-5571. https://doi.org/10.1007/s11694-021-01129-9

[20] Al-Reza, S. M., Rahman, A., Sattar, M. A., Rahman, M. O., & Fida, H. M. (2010). Essential oil composition and antioxidant activities of Curcuma aromatica Salisb. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(6), 1757-1760. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.008

[21] Alizadeh Behbahani, B., & Imani Fooladi, A. A. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety*, *38*(3), e12443. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfs.12443

[22] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). 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*, *29*(5), 717-728 . https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4

[23] Nooshkam, M., Falah, F., Zareie, Z., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mortazavi, S. A. (2019). Antioxidant potential and antimicrobial activity of chitosan–inulin conjugates obtained through the Maillard reaction. *Food Science and Biotechnology*, *28*(6), 1861-1869. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00635-3

[24] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). 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*, *9*(5), 2458-2467 .

[25] Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Mortazavi, A., Gholian, M. M., Zendeboodi, F., & Vasiee, A. (2014). Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic Eucalyptus camaldulensis L. leaves extract against Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Archives of Advances in Biosciences*, *5*(2), 59-69 .

[26] Jalil Sarghaleh, S., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M., Vasiee, A., & Noshad, M. (2023). Evaluation of the constituent compounds , antioxidant, anticancer, and antimicrobial potential of Prangos ferulacea plant extract and its effect on Listeria monocytogenes virulence gene expression [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1202228

[27] Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M. E., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). 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*, *9*(3), 1625-1639. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.2137

[28] Noshad, M ,.Behbahani, B. A., Nikfarjam, Z., & Zargari, F. (2023). Antimicrobial activity between Coriandrum sativum seed and Cuminum cyminum essential oils against foodborne pathogens: A multi-ligand molecular docking simulation. *LWT*, *185*, 115217. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115217

[29] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of Kelussia odoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, *5*(2), 115-120 .

[30] Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A., Mortazavi, S. A., & Yazdi, F. T. (2015). An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of Dorema aucheri (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. *Archives of Advances in Biosciences*, *6*(1), 58-64 .

[31] Tabatabaei Yazdi, F., Nooshkam, M., Shahidi, F., Asadi, F., & Alizadeh-Behbahani, B. (2018). Evaluation of antimicrobial activity and antioxidant potential of chitosan Maillard-based conjugates in vitro. *Applied Microbiology In Food Industries*, *4*(3), 1-15 .

[32] Tanavar, H., Barzegar ,H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (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. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.2522

[33] Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2013). 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*, *4*(4), 56-62 .

[34] Dholwani, K. K., Saluja, A. K., Gupta ,A. R., & Shah, D. R. (2008). A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol*, *40*(2), 49-58. https://doi.org/10.4103/0253-7613.41038

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

# Evaluation of antioxidant potential, total phenol and flavonoid and antimicrobial activity of *Pterocarya fraxinifolia* essential oil on pathogenic bacteria: "*in vitro*"

**Hassan Barzegar**[*1], Behrooz Alizadeh Behbahani[1], Mohammad Noshad[1]

[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

**ARTICLE INFO**

**Article History:**
Received:2024/2/20
Accepted:2024/4/9

**Keywords:**

*Pterocarya fraxinifolia*

essential oil,

natural preservative,

antimicrobial,

antioxidant,

bioactive compounds.

DOI: **10.22034/FSCT.21.151.186.**

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

**ABSTRACT**

Adding chemical preservatives increases the shelf life of food products, but long-term and indiscriminate use of chemical preservatives increases the resistance of microorganisms and health risks associated with their absorption. Medicinal plants have a great diversity both in the world and in Iran and have the potential to be used as alternatives to chemical compounds. In this study, the antimicrobial effect of *Pterocarya fraxinifolia* essential oil against *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Salmonella typhi* was investigated by disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration. The total phenol and flavonoid content of the essential oil was determined using Folin Ciocalteu and aluminium chloride methods, respectively. The antioxidant activity of the essential oil was evaluated using two methods of inhibiting free radicals DPPH and ABTS. The total phenol and flavonoid content of the essential oil was 38.63 mg of gallic acid/g and the flavonoid content was 19.20 mg of quercetin/g. The essential oil of *P. fraxinifolia* was able to inhibit free radicals DPPH (58.60%) and ABTS (59.80%). The results of the antimicrobial activity of the essential oil by the disk diffusion agar and well diffusion agar methods showed that *B. subtilis* and *E. aerogenes* are the most sensitive and resistant microbial strains to the essential oil, respectively. The minimum inhibitory concentration for these bacteria was 2 and 64 mg/mL, respectively, and the minimum bactericidal concentration was 32 and > 512 mg/mL, respectively.