Identification of Chemical Compounds of *Ocimum basilicum* Essential Oil and Its Effect on Inhibiting the Growth of Fungi Causing Postharvest Rots in Apple

Pages 5-20

M. Rahmati-Joneidabad

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

*Corresponding author**: Rahmati@asnrukh.ac.ir**

Received date: 2023.08.16 **Accepted date: 2023.11.15**

Abstract

In this study, *Ocimum basilicum* essential oil was extracted using the hydrodistillation method, and its antifungal activity (based on disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration) against fungi causing postharvest rots in apple was investigated. Additionally, its constituents were determined using gas chromatography -mass spectrometer (GC-MS), along with total phenol content, total flavonoids, and antioxidant activity based on DPPH and ABTS free radical scavenging methods. Estragole was the major constituent of *Ocimum basilicum* essential oil with 65.43%. The essential oil contained 38.14 mg GAE/g total phenol and 11.17 mg QE/g total flavonoids. The results of antioxidant activity test showed that the free radical scavenging activity based on DPPH and ABTS methods were 66.85% and 73.70%, respectively. According to the results of disk diffusion agar and well diffusion agar methods, *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*, were the most sensitive and resistant fungal strains to the essential oils with the highest and lowest diameter of growth inhibition zones, respectively. The results of minimum inhibitory and fungicidal concentration tests of essential oil showed a similar trend. In general, *Ocimum basilicum* essential oil contains many bioactive compounds with significant antioxidant and antifungal activities, demonstrating its potential as a natural preservative to improve the shelf life of horticultural products.

Keywords: Bioactive essential oil, Botrytis cinerea, Minimum inhibitory concentration and Antioxidant activity.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ریحان بنفش و اثر آن بر مهار رشد قارچ‌های عامل فساد و کپک‌زدگی پس از برداشت میوه سیب

شماره صفحات
۲۰-۵

مصطفی رحمتی جنیدآباد
استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
* نویسنده مسئول: **Rahmati@asnrukh.ac.ir**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴

چکیده

در این پژوهش، اسانس ریحان بنفش مطابق روش تقطیر با آب استخراج و فعالیت ضد قارچی آن (بر اساس روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی) در برابر قارچ‌های عامل فساد و کپک‌زدگی پس از برداشت میوه سیب بررسی گردید. علاوه بر این، ترکیبات تشکیل دهنده آن با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی، محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بر پایه روش‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS تعیین گردید. استراگول با ۶۵/۴۳ ٪ ترکیب عمده اسانس ریحان بنفش بود. اسانس حاوی ۳۸/۱۴ mg GAE/g فنول کل و ۱۱/۱۷ mg QE/g فلاونوئید کل بود. نتایج آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که فعالیت مهار رادیکال آزاد اسانس بر پایه روش DPPH و ABTS به ترتیب ۶۶/۸۵ و ۷۳/۷۰ ٪ می‌باشد. مطابق یافته‌های آزمون دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب با بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به اسانس بودند. نتایج آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس نیز روند مشابهی نشان داد. بطور کلی، اسانس ریحان بنفش حاوی ترکیبات زیست فعال متعدد با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی قابل‌توجهی می‌باشد که قابلیت آن را بعنوان نگهدارنده طبیعی جهت بهبود عمر نگهداری محصولات باغبانی را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اسانس زیست فعال، بوتریتیس سینه‌را، حداقل غلظت مهارکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

قارچ‌ها، عامل اصلی بیماری سیب (*Malus domestica* Borkh) در باغ و در زمان نگهداری هستند. شدت بیماری‌های پس از برداشت در طول ذخیره‌سازی می‌تواند افت قابل‌توجهی را در عملکرد و کیفیت میوه تعیین کند و تدابیر مختلفی برای کنترل آن‌ها بررسی شده است. بروز و اثرات بیماری‌های قارچی بر کیفیت سیب هم برای مصرف و هم برای فرآوری میوه مرتبط است. عفونت می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی خواص میوه و عصاره آن را تغییر دهد (Simonato *et al*., 2021). پاتوژن‌های قارچی سیب عمدتاً شامل *بوتریتیس سینه‌را* (*Botrytis cinerea*)، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* (*Penicillium expansum*)، *آلترناریا آلترناتا* (*Alternaria alternata*)، *موکور* (*Mucor*) و *مونیلیا* (*Monilinia*) هستند (Vikram *et al*., 2004). در حال حاضر مدیریت این بیماری عمدتاً متکی بر استفاده از قارچ‌کش‌های خاص است. وابستگی زیاد به یک قارچ‌کش می‌تواند منجر به مشکلاتی از جمله ایجاد مقاومت، بقایای آفت‌کش‌ها، استفاده بیش از حد از قارچ‌کش و عدم کنترل مؤثر بیماری شود (El Khetabi *et al*., 2022; Rahmati-Joneidabad & Alizadeh Behbahani, 2021). بنابراین، نیاز به شناسایی جایگزین‌هایی طبیعی مانند عصاره و اسانس گیاهی برای استفاده یکپارچه در صورت شیوع همه‌گیر این بیماری وجود دارد (Persaud *et al*., 2019). اسانس‌ها ترکیبات فرار، طبیعی و پیچیده‌ای هستند که با بوی قوی مشخص می‌شوند و توسط گیاهان معطر به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه تشکیل می‌شوند. آن‌ها معمولاً با بخار آب یا تقطیر با آب برای اولین بار در قرون وسطی توسط اعراب استخراج می‌شدند. به دلیل خاصیت ضد عفونی کنندگی، یعنی باکتری کشی، ویروس کشی و قارچ‌کشی، و خواص دارویی و رایحه آن‌ها در مومیایی کردن، نگهداری غذاها و به‌عنوان داروهای ضد میکروبی، ضد درد، آرام بخش، ضد التهاب، ضد اسپاسم و داروهای بی حس کننده موضعی استفاده می‌شوند. تا به امروز، این ویژگی‌ها تغییر چندانی نکرده‌اند، جز اینکه در حال حاضر اطلاعات بیشتری در مورد برخی از مکانیسم‌های اثر آن‌ها، به‌ویژه در سطح ضد میکروبی، شناخته شده است (Alizadeh Behbahani *et al*., 2021; Alizadeh Behbahani & Shahidi, 2019; Bakkali *et al*., 2008). جنس ریحان (*Ocimum*) متعلق به *Lamiaceae* شامل گیاهان و درختچه‌های گیاهی یکساله و چند ساله بومی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی است. طبقه‌بندی ریحان به دلیل هیبریداسیون بین گونه‌ای و پلی‌پلوئیدی گونه در جنس پیچیده است. در میان گونه‌های این جنس، ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.) عمده‌ترین گونه جهت تولید اسانس در سراسر جهان است و در بسیاری از کشورها به صورت تجاری کشت می‌شود. ریحان به‌عنوان یک گیاه دارویی در درمان سردرد، سرفه، اسهال و اختلالات کلیه استفاده می‌شود. اسانس ریحان به‌طور گسترده در صنایع غذایی به‌عنوان یک طعم‌دهنده و در صنایع عطرسازی و پزشکی استفاده شده است (Simon *et al*., 1999). همچنین به‌عنوان منبع ترکیبات معطر در نظر گرفته می‌شود و دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند ضد باکتری، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی است (Telci *et al*., 2006). بااین‌حال، گزارش‌های محدودی در مورد فعالیت ضد قارچی اسانس ریحان بنفش در برابر قارهای عامل فساد میوه

سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* ، *آلترناریا آلترناتا* و *بوتریتیس سینه‌را*) در منابع علمی وجود دارد. بنابراین، در این پژوهش آزمایشگاهی ابتدا ترکیبات شیمیایی اسانس ریحان بنفش توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی گردید و قدرت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی و فلاونوئید نیز تعیین شد. در ادامه اثر ضدقارچی اسانس ریحان بنفش در برابر قارچ‌های عامل فساد و کپک‌زدگی پس از برداشت میوه سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *آلترناریا آلترناتا* و *بوتریتیس سینه‌را*) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل گالیک اسید، کوئرستین، DPPH[1] و ABTS[2] از شرکت سیگما (آمریکا) و محیط‌های کشت سابورود دکستروز آگار و سابورود دکستروز براث از شرکت مرک (آلمان) بودند.

استخراج اسانس

اسانس ریحان بنفش مطابق روش Almida *et al* (2007) استخراج گردید. برای این منظور، برگ‌های ریحان در دمای °C ۴۰ خشک و سپس پودر شدند و اسانس توسط روش تقطیر با آب در دستگاه کلونجر به دست آمد. پودر گیاه در دستگاه قرار داده شد و استخراج تا زمانی که دیگر روغن کندانس شده مشاهده نشد، ادامه یافت (۴ hr) در ادامه، اسانس توسط Na_2SO_4 خشک، به یک فلاسک شیشه‌ای کهربایی منتقل و تا زمان استفاده در دمای °C ۱۰- نگهداری شد (de Almeida *et al*., 2007).

ترکیبات شیمیایی

ترکیب شیمیایی اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (Finnigant Trace MS-Thermo، آمریکا) شناسایی شد. اسانس (۰/۲ µl) به کروماتوگرافی گازی تزریق و جداسازی بر اساس شرایط زیر انجام شد: هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت ml/min ۱/۱، انرژی یونیزاسیون eV ۷۰ و نرخ گرمایش °C/min ۵. ترکیبات شیمیایی اسانس از طریق طیف نرمال آلکان‌ها، محاسبه شاخص‌های بازداری و مراجعه به کتابخانه ترکیبات طبیعی شناسایی گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019a).

میزان فنول کل

روش فولین سیوکالتو برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل اسانس استفاده شد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019a). برای این منظور، µl ۲۰ اسانس (g/l ۱۰) با µl ۱۰۰ معرف فولین سیوکالتو و ml ۲ آب مقطر مخلوط شد. محلول به‌دست‌آمده

[1] 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
[2] 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)

به مدت ۳ min نگهداری شد و ۳۰۰ µl محلول Na_2CO_3 به آن اضافه گردید. پس از همزدن محلول به مدت ۲ hr، جذب آن در طول‌موج ۷۶۵ nm ثبت گردید. اسید گالیک (mg/l صفر - ۱۰۰۰) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج به‌عنوان میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم اسانس خشک شده (mg GAE/g) بیان شد.

میزان فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل اسانس بر اساس روش نوشاد و همکاران (۲۰۲۱) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، نمونه (۰/۵ ml) با ۳۰۰ µl محلول $NaNO_2$ ترکیب و مخلوط به مدت ۱۰ s ورتکس گردید و به مدت ۵ min در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله بعد، ۳۰۰ µl $AlCl_3$، ۲ ml NaOH یک مولار و ۱/۹ ml آب مقطر اضافه و به مدت ۱۰ s مخلوط شد. جذب مخلوط در ۵۱۰ nm قرائت و محتوای فلاونوئید کل به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم از اسانس (mg QE/g) بیان شد (Noshad *et al.*, 2021).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مهار رادیکال DPPH

در این آزمون، ۳۷/۵ µl از اسانس یا متانول (نمونه شاهد) با ۲ ml محلول متانولی DPPH مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ min در تاریکی نگهداری شدند و سپس جذب آنها در طول‌موج ۵۱۷ nm در برابر متانول اندازه‌گیری شد. در نهایت از رابطه ۱ برای محاسبه فعالیت مهار رادیکال DPPH اسانس استفاده شد:

رابطه ۱: $$Inhibition\ (\%) = \frac{(Ac-As)}{Ac} \times 100$$

در این رابطه، Ac و As به ترتیب جذب کنترل و نمونه می‌باشند.

مهار رادیکال ABTS

روش Noshad *et al* (2021) برای تعیین فعالیت مهار رادیکال ABTS اسانس استفاده شد. به‌طور خلاصه، حجم یکسانی از محلول ABTS ۷ mM و $K_2S_2O_8$ ۲/۴۵ mM با هم مخلوط شده و در دمای ۲۵ °C به مدت ۱۶ hr 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 nm برسد. پس از آن، ۰/۱ ml اسانس با ۳/۹ ml محلول رادیکال ABTS مخلوط شد و محلول به‌دست‌آمده به مدت ۶ min در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۷۳۴ nm در برابر نمونه شاهد اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار رادیکال ABTS اسانس طبق فرمول زیر محاسبه شد:

رابطه ۲: $$Inhibition\ (\%) = \frac{(Ac-As)}{Ac} \times 100$$

در این رابطه، Ac و As به ترتیب جذب کنترل و نمونه می‌باشند.

اثر ضد قارچی

دیسک دیفیوژن آگار

برای انجام این آزمون، اسانس ریحان بنفش توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ µm استریل شد. سپس دیسک‌های بلانک به مدت ۲۰ min در اسانس غوطه‌ور شدند. مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی معادل $1/5 \times 10^8$ CFU/ml (۰/۵ استاندارد مک فارلند) تهیه شد. دیسک‌های بلانک سپس بر روی محیط کشت سابورود دکستروز آگار قرار داده شدند. پس از آن، محیط‌های کشت حاوی سویه‌های قارچی در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ hr گرمخانه گذاری شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها توسط خط کش اندازه‌گیری و بعنوان فعالیت ضد قارچی اسانس ارائه گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2018).

چاهک آگار

در این روش، سوسپانسیون میکروبی با استفاده از اسپریدر L شکل بر روی محیط سابورود دکستروز آگار در ظروف پتری دیش پخش گردید. پس از آن، چندین چاهک با قطر ۶ mm روی سطح محیط کشت ایجاد شد و با ۲۰ µl اسانس پر گردید. ظروف پتری دیش در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ hr نگهداری و سپس قطر مناطق بازدارنده در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر بیان شد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2013).

حداقل غلظت مهارکنندگی

روش رقیق‌سازی در محیط کشت براث جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس استفاده گردید. برای این منظور، در لوله-های ۱۰ ml آزمایشگاهی ابتدا غلظتی معادل ۵۱۲ mg/ml از اسانس ریحان بنفش استریل شده با فیلترهای ۰/۲۲ µm تهیه و سپس غلظت‌های متوالی از آن تهیه گردید. در ادامه، هر یک از غلظت‌های اسانس به لوله آزمایشگاهی حاوی ۱۰۰ µl از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. گرمخانه-گذاری در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ hr انجام شد و رشد سویه‌های قارچی توسط کدورت ایجاد شده با چشم مشاهده شد و لوله بدون کدورت به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گزارش گردید (Rahmati-Joneidabad *et al*., 2021).

حداقل غلظت کشندگی

از لوله‌های آزمایش فاقد کدورت در آزمون قبلی، ۱۰۰ میکرولیتر از دیسپرسیون بر سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت سابورود دکستروز آگار کشت داده شد. سپس، گرمخانه گذاری محیط در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ hr انجام شد و حداقل غلظتی از اسانس که در آن تعداد کپک‌ها ۹۹/۹ درصد کاهش پیدا کرده بودند، به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Rahmati-Joneidabad *et al*., 2021).

آنالیز آماری

تمامی داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS پردازش شدند. نتایج به صورت انحراف استاندارد ± میانگین گزارش شد و آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس

ترکیبات شیمیایی اسانس ریحان بنفش در جدول ۱ ارائه شده است. مطابق نتایج، ۱۹ ترکیب در اسانس شناسایی شد که در این میان، Estragole، 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol، n-Tricosane، Eucalyptol، (E)-α-Bisabolene و n-Tetracosane به ترتیب با ۶۵/۴۳، ۲۰/۲۲، ۴/۸۳، ۱/۵۷، ۱/۵۰ و ۱/۳۳ ٪ به ترتیب اصلی‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس ریحان بنفش بودند. علاوه بر این، ترکیبات لینانول اکسید، ترپینئول، ژرانیال، برگاموتن، آلفا/بتا پینن، سابینن، میرسن و لیمونن در اسانس شناسایی شدند.

جدول ۱: شناسایی ترکیبات اسانس ریحان بنفش با کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

Table 1: Identification of *Ocimum basilicum* essential oil compounds by gas chromatography coupled to a mass spectrometer

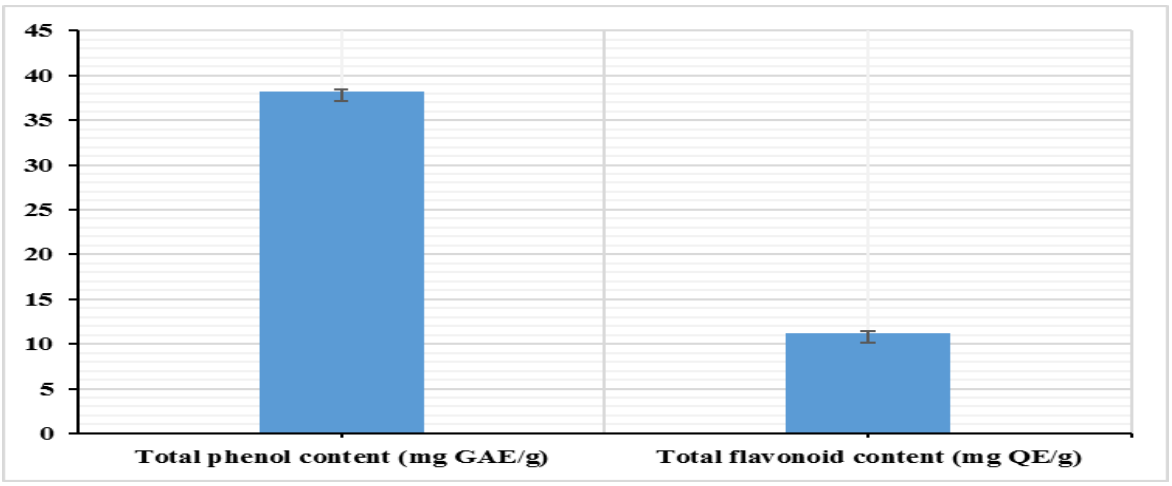
شماره	ترکیب	زمان بازداری (min)	درصد (٪)
1	α-Pinene	4.00	0.1
2	Sabinene	4.73	0.05
3	β-Pinene	4.80	0.1
4	β-Myrcene	5.00	0.02
5	Limonene	5.80	0.07
6	Eucalyptol	5.90	1.57
7	cis-Linalool oxide	6.80	0.08
8	trans-Linalool oxide	7.15	0.07
9	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	7.50	20.22
10	Terpineol	9.70	0.15
11	**Estragole**	**10.00**	**65.43**
12	Geranial	11.74	0.50
13	Bergamotene	15.92	0.63
14	trans-β-Farnesene	16.37	0.33
15	(E)-α-Bisabolene	18.47	1.50
16	n-Octadecane	24.07	0.10
17	n-Nonadecane	26.00	0.35
18	n-Tricosane	33.45	4.83
19	n-Tetracosane	35.01	1.33

متیل کاویکول (استراگول) معمولاً در انواع ریحان یافت می‌شود (Juliani & Simon, 2002). علاوه بر لینالول، متیل کاویکول، متیل سینامات، متیل اوژنول و مخلوطی از این ترکیبات معمولاً اجزای اصلی در گونه‌ها و واریته‌های ریحان هستند (Telci *et al*., 2006). در مطالعه‌ی Ismail (2008)، تجزیه‌وتحلیل اسانس گیاه ریحان بنفش توسط کروماتوگرافی گازی

متصل به طیف‌سنج جرمی نشان داد که ترپن‌ها فراوان‌ترین اجزای اسانس هستند و ترپن‌های اصلی موجود در اسانس عبارت بودند از لینالول (۴۴/۱۸ ٪)، سینئول (۱۳/۶۵ ٪)، اوژنول (۸/۵۹ ٪)، ایزوکاریوفیلن (۳/۱۰ ٪)، متیل سینامات (۴/۲۶ ٪) و آلفا-کوبه‌بن (۴/۹۷ ٪) (Ismail, 2006). علاوه بر این، نشان داده شده است که اسانس ریحان بنفش عمدتاً حاوی لینالول (۵۶/۷-۶۰/۶ ٪) و پس از آن اپی-آلفا-کادینول، آلفا-برگاموتن، گاما-کاردینن، ژرماسن و کامفور می‌باشد (Hussain *et al*., 2008). تفاوت بین نوع و غلظت ترکیبات شیمیایی در این مطالعه با سایر پژوهش‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که کیفیت و کمیت اسانس عمدتاً به واریته، مرحله رشد، آب و هوا، محل رشد و زمان جمع‌آوری گیاه زیست فعال و شرایط استخراج بستگی دارد (Kiarsi *et al*., 2020).

ترکیبات فنولی/فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اسانس ریحان بنفش حاوی ۳۸/۱۴ ± ۰/۳۰ mg GAE/g فنول کل و ۱۱/۱۷ ± ۰/۲۳ mg QE/g فلاونوئید کل بود (شکل ۱). محتوای فنول کل ۱۵ رقم ریحان در مطالعه‌ی وی و نیمیر (۲۰۱۱) اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که میزان فنول از ۳/۴۷ mg GAE/g تا ۱۷/۵۸ متغیر می‌باشد (Kwee & Niemeyer, 2011). علاوه بر این، محتوای فنول معادل ۷ mg GAE/g، ۲۶ و ۳۶ در مطالعات مختلف گزارش شده است (Proestos *et al*., 2005; Shan *et al*., 2005; Surveswaran *et al*., 2007). همچنین، Javanmard *et al* (2003) نشان داد که میزان فنول کل ریحان‌های ایرانی از ۲۲/۹ mg GAE/g تا ۶۵/۵ متغیر می‌باشد و ارتباط خطی بین میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ریحان وجود دارد (Javanmardi *et al*., 2003).

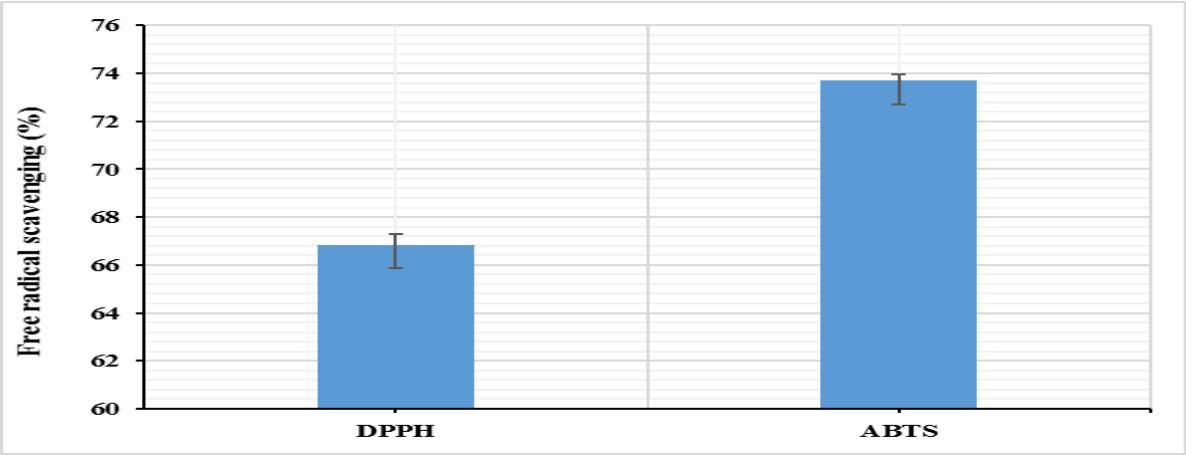


شکل ۱: میزان فنول و فلاونوئید کل اسانس ریحان بنفش.

Figure 1: Total phenol and flavonoid contents of *Ocimum basilicum* essential oil.

از آنجایی که ترکیب شیمیایی یک اسانس ممکن است به‌طور بالقوه بر فعالیت‌های بیولوژیکی آن تأثیر بگذارد، خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس ریحان بنفش ثبت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با آزمون‌های مختلف آزمایشگاهی مهار رادیکال

DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در شکل ۲ آورده شده است. در سنجش DPPH، توانایی آنتی‌اکسیدان برای عمل به‌عنوان دهنده اتم‌های هیدروژن یا الکترون‌ها در تبدیل رادیکال DPPH به شکل احیاء شده آن (DPPH-H) مورد بررسی قرار می‌گیرد (Nooshkam *et al*., 2019). اسانس ریحان بنفش مورد بررسی با قدرت مهار ۰/۴۳ ± ۶۶/۸۵ ٪، قادر به احیاء رادیکال پایدار و بنفش رنگ DPPH به DPPH-H زرد رنگ بود. در آزمون مهار رادیکال ABTS، قدرت اسانس ریحان بنفش در این مورد، برابر با ۰/۲۶ ± ۷۳/۷۰ ٪ بود.



شکل ۲: فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ریحان بنفش.

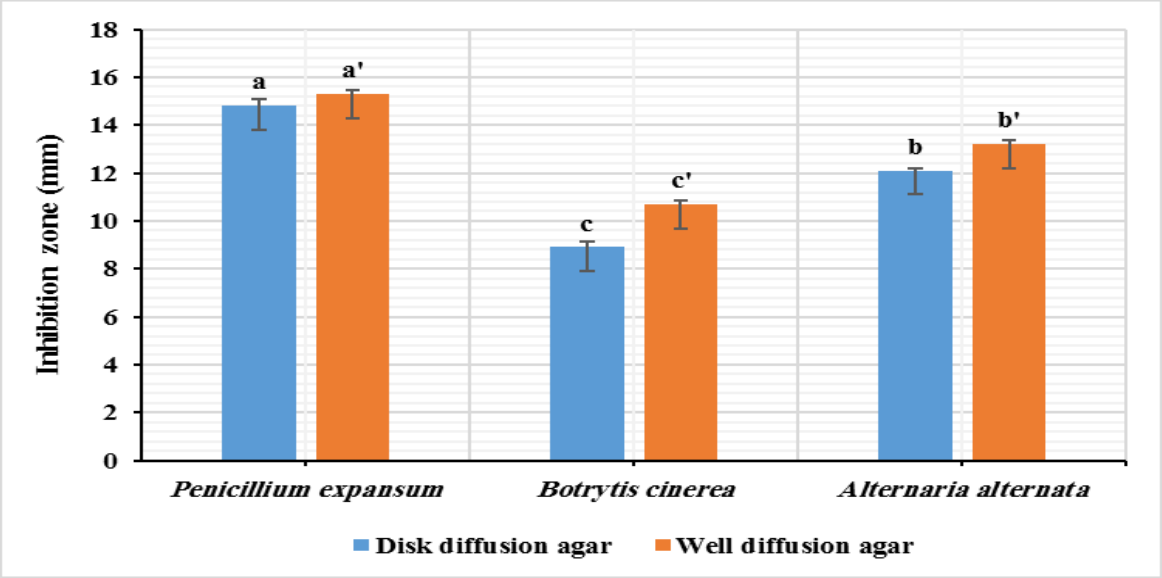
Figure 2: Antioxidant activity of *Ocimum basilicum* essential oil.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه اسانس ریحان در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (Ahmed *et al*., 2019; Javanmardi *et al*., 2003; Skrypnik *et al*., 2019). Mahmood (2013) دریافت که جزء اصلی متیل کاویکول فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی را نشان می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که جزء اصلی متیل کاویکول، خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان نمی‌دهد (Dawidowicz & Olszowy, 2014). بنابراین، همواره جزء اصلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس مورد بررسی را تعیین نمی‌کند و این امکان وجود دارد که اجزای موجود در غلظت‌های پایین‌تر ممکن است در نوعی هم‌افزایی با سایر ترکیبات فعال دخیل باشند. ترکیبات فنولی به دلیل توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، از اجزای بسیار مهم گیاهی هستند. بنابراین، محتوای فنولی گیاهان ممکن است به‌طور مستقیم به عملکرد آنتی‌اکسیدانی آنها کمک کند (Tosun *et al*., 2009). تحقیقات متعددی در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی همبستگی بین محتوای فنولی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تائید کرده است (Alizadeh Behbahani & Shahidi, 2019; Barzegar *et al*., 2020; Rahmati-Joneidabad & Alizadeh Behbahani, 2021).

فعالیت ضد قارچی

نتایج اثر ضد قارچی اسانس ریحان بنفش در برابر پاتوژن‌های قارچی مطابق روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۳ گزارش شده است. میانگین قطر هاله عدم رشد برای سویه‌های قارچی *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *بوتریتیس سینه‌را* و *آلترناریا آلترناتا* به

ترتیب mm ۰/۲۹ ± ۱۴/۸۰، mm ۰/۲۴ ± ۸/۹۰ و mm ۰/۱۱ ± ۱۲/۱۰ بود ($p<0.05$). همانطور که مشاهده می‌شود، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب با بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به اسانس ریحان بنفش بودند.



شکل ۳: فعالیت ضد قارچی اسانس ریحان بنفش بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار.

Figure 3: Antifungal activity of *Ocimum basilicum* essential oil, based on disk diffusion agar and well diffusion agar methods.

نتایج آزمون چاهک آگار در راستای یافته‌های آزمون دیسک دیفیوژن آگار بود (شکل ۳). بطوریکه *بوتریتیس سینه‌را* با کمترین قطر هاله عدم رشد (mm ۰/۱۷ ± ۱۰/۷۰) و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* با بالاترین قطر هاله عدم رشد (mm ۰/۱۵ ± ۱۵/۳۰)، به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه‌های قارچی در برابر اسانس ریحان بنفش بودند ($p<0.05$). علاوه بر این، مشاهده گردید که نتایج قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار بزرگ‌تر از نتایج آزمون دیسک دیفیوژن آگار می‌باشند. این اثر به دلیل تماس مستقیم اسانس با میکروارگانیسم‌ها در این روش است. درحالی‌که، در آزمون ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار، اسانس باید از سطوح دیسک به داخل محیط انتشار یابد تا اثر بازدارندگی خود را نشان دهد (Alizadeh Behbahani & Fooladi, 2018; Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b; Kiarsi *et al*., 2020).

مطابق نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، غلظت‌های mg/ml ۴ و ۸ اسانس بر رشد سویه‌های قارچی تأثیرگذار نبودند (جدول ۲). افزایش غلظت اسانس به mg/ml ۱۶ سبب جلوگیری از رشد *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* گردید، اما تأثیری بر رشد سایر سویه‌های قارچی نداشت. به استثنای *بوتریتیس سینه‌را*، سایر سویه‌های قارچی در حضور غلظت mg/ml ۳۲ اسانس قادر به رشد نبودند. غلظت‌های بالاتر اسانس سبب مهار رشد تمامی سویه‌های قارچی گردید. بنابراین، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌ها نسبت به اسانس بودند که در راستای نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار می‌باشد.

جدول ۲: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس ریحان بنفش بر قارچ‌های عامل فساد و کپک‌زدگی پس از برداشت میوه سیب
Table 2: The results of minimum inhibitory concentration of *Ocimum basilicum* essential oil on fungi species causing postharvest rot in apple fruit

میکروارگانیسم	غلظت اسانس ریحان بنفش (mg/ml)								
	4	8	16	32	64	128	256	512	کنترل
پنی‌سیلیوم اکسپانسیوم	+	+	-	-	-	-	-	-	-
بوتریتیس سینه‌را	+	+	+	+	-	-	-	-	-
آلترناریا آلترناتا	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: رشد -: عدم رشد

نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی اسانس در جدول ۳ گزارش شده است. حداقل غلظت کشندگی برای سویه‌های *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *بوتریتیس سینه‌را* و *آلترناریا آلترناتا* به ترتیب ۱۲۸ mg/ml، ۵۱۲ و ۵۱۲ بود.

جدول ۳: نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس ریحان بنفش بر قارچ‌های عامل فساد و کپک‌زدگی پس از برداشت میوه سیب
Table 3: The results of minimum fungicidal concentration of *Ocimum basilicum* essential oil on fungi species causing postharvest rot in apple fruit

میکروارگانیسم	غلظت اسانس ریحان بنفش (mg/ml)								
	4	8	16	32	64	128	256	512	کنترل
پنی‌سیلیوم اکسپانسیوم	+	+	+	+	+	-	-	-	-
بوتریتیس سینه‌را	+	+	+	+	+	-	+	-	-
آلترناریا آلترناتا	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+: رشد -: عدم رشد

خواص ضد قارچی اسانس ریحان در برابر رشد میسلیوم *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) و تولید آفلاتوکسین B1 توسط محققان بررسی گردید و اسانس آزمایش شده فعالیت ضد قارچی قابل‌توجهی را نشان داد که وابسته به غلظت اسانس استفاده شده بود. مهار کامل رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت ppm ۱۰۰۰ اسانس مشاهده شد، درحالی‌که مهار تولید آفلاتوکسین B1 در تمام غلظت‌های اسانس مورد آزمایش (ppm ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰) مشاهده شد (Abou El-Soud *et al.*, 2015). مطالعه دیگری بر روی *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) و *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داد که اسانس ریحان با استفاده از روش میکرودیلوشن براث، رشد این سویه‌های قارچی را در غلظت ppm ۵۰۰۰ در طی ۷ روز گرمخانه گذاری کاملاً مهار کرد (Zollo *et al.*, 1998). علاوه بر این، سلیمان و باده (۲۰۰۲) دریافتند که اسانس ریحان به‌عنوان مهارکننده رشد در برابر *فوزاریوم ورتیسیلیودس* (*Fusarium verticillioides*) در غلظت ppm ۲۰۰۰ و به‌عنوان یک عامل قارچ‌کش در غلظت ppm ۳۰۰۰ عمل می‌کند (Soliman & Badeaa, 2002). فعالیت بیولوژیکی اسانس به حضور ترکیبات فنولی زیست فعال در آن نسبت داده می‌شود. فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات فنولی را می‌توان به وجود یک هسته آروماتیک و یک گروه OH فنولی نسبت داد که به‌عنوان واکنشگر شناخته شده هستند و می‌توانند پیوندهای هیدروژنی را با گروه‌های SH- در مکان‌های

فعال آنزیم‌های هدف تشکیل دهند و در نتیجه آنزیم‌های قارچی را غیرفعال سازند (Ultee et al., 2002). فعالیت ضد میکروبی یک اسانس عمدتاً به ترکیبات اصلی آن نسبت داده می‌شود. بااین‌حال، اثر هم‌افزایی یا آنتاگونیستی یک ترکیب در درصد جزئی در مخلوط باید در نظر گرفته شود (Alizadeh Behbahani *et al*., 2021; Alizadeh Behbahani *et al*., 2019a). تحقیقات اولیه، لینالول، استراگول، اوژنول و متیل سینامات را به‌عنوان اجزای اصلی ضد میکروبی و ضد قارچی عصاره و اسانس ریحان مورد بررسی قرار دادند (Reuveni & Putievsky, 1984). برخی به اثر ضد قارچی قوی اسانس حاوی استراگول به‌عنوان ترکیب اصلی بر رشد *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*)، *آسپرژیلوس اکراسئوس* (*A. ochraceus*) و *فوزاریوم کولموروم* (*Fusarium culmorum*) با درصد بازداری رشد ۷۱- ۹۴/۷۶ ٪ اشاره کرده‌اند (Özcan & Erkmen, 2001). علاوه بر این، مطالعات دیگر نشان داد که لینالول و استراگول در برابر *ریزوپوس نیگریکانس* (*Rhizopus nigricans*) در مقایسه با اوژنول مؤثرتر می‌باشند (Alpsoy, 2010). با اینحال، در ارتباط قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* (*Fusarium oxysporum*)، اوژنول در مقایسه با لینالول و استراگول اثر مهارکنندگی بالاتری نشان داده است (Kocić-Tanackov *et al*., 2011). یافته‌های ما نشان می‌دهد که اسانس ریحان می‌تواند رشد پاتوژن‌های قارچی را سرکوب کند و این اثر ممکن است به محتوای غنی آن ترکیبات فنولی نسبت داده شود.

نتیجه‌گیری کلی

روش استخراج مبتنی بر تقطیر با آب منجر به تولید اسانس ریحان بنفش با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی قابل‌توجه شد. آنالیز اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی نشان داد که ترکیب اصلی اسانس ریحان بنفش، استراگول می‌باشد. قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد اسانس قابل‌توجه بود. علاوه بر این، اسانس ریحان بنفش بطور قابل‌توجهی سبب مهار رشد سویه‌های قارچی پاتوژن میوه سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* ، *آلترناریا آلترناتا* و *بوتریتیس سینه‌را*) گردید. می‌توان نتیجه گرفت که اسانس ریحان بنفش می‌تواند به‌عنوان منبع طبیعی عوامل ضد میکروبی برای جلوگیری از زیان‌های اقتصادی، مخاطرات بهداشتی ناشی از پاتوژن های قارچی و قارچ‌های مقاوم به قارچ‌کش‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از اسانس ریحان بنفش جهت جلوگیری از رشد قارچ‌های پاتوژن روی میوه سیب در مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۱/۰۴ 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.

منابع

Abou El-Soud, N. H., Deabes, M., Abou El-Kassem, L., & Khalil, M. (2015). Chemical composition and antifungal activity of Ocimum basilicum L. essential oil. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, *3*(3), 374-379.

Ahmed, A. F., Attia, F. A., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (Ocimum basilicum L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, *8*(3), 299-305.

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 [https://doi.org/10.1002/fsn3.2186]. *Food Science & Nutrition*, *9*(5), 2458-2467. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.2186

Alizadeh Behbahani, B., & Fooladi, A. A. I. (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, *114*, 299-303.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019a). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, *136*, 103716.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019b). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens," *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, *13*(1), 875-883.

Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2019). Melissa officinalis essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, *6*(1), 17-25.

Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, *4*(7), 1652-1658.

Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2018). Oliveria decumbens essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial pathogenesis*, *114*, 449-452.

Alpsoy, L. (2010). Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. *African Journal of Biotechnology*, *9*(17), 2474-2481.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils–a review. *Food and chemical toxicology*, *46*(2), 446-475.

Barzegar, H., Behbahani, B. A., & 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.

Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2014). Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural product research*, *28*(22), 1952-1963.

de Almeida, I., Alviano, D. S., Vieira, D. P., Alves, P. B., Blank, A. F., Lopes, A. H., Alviano, C. S., & Rosa, M. d. S. S. (2007). Antigiardial activity of Ocimum basilicum essential oil. *Parasitology Research*, *101*(2), 443-452.

El Khetabi, A., Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Lyousfi, N., Banani, H., Askarne, L., Tahiri, A., El Ghadraoui, L., Belmalha, S., & Barka, E. A. (2022). Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *120*, 402-417. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.009

Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, *108*(3), 986-995.

Ismail, M. (2006). Central properties and chemical composition of Ocimum basilicum. essential oil. *Pharmaceutical Biology*, *44*(8), 619-626.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food chemistry*, *83*(4), 547-550.

Juliani, H., & Simon, J. (2002). Antioxidant activity of basil. *Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA*, *575*(9), 575-579.

Kiarsi, Z., Hojjati, M., Behbahani, B. A., & Noshad, M. (2020). 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*, *40*(3), e12782.

Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Lević, J., Tanackov, I., & Tuco, D. (2011). Antifungal activities of basil (Ocimum basilicum L.) extract on Fusarium species. *African Journal of Biotechnology*, *10*(50), 10188-10195.

Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (Ocimum basilicum L.) cultivars. *Food chemistry*, *128*(4), 1044-1050.

Mahmoud, G. I. (2013). Biological effects, antioxidant and anticancer activities of marigold and basil essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, *7*(10), 561-572.

Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food chemistry*, *275*, 644-660.

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.

Özcan, M., & Erkmen, O. (2001). Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*, *212*(6), 658-660.

Persaud, R., Khan, A., Isaac, W.-A., Ganpat, W., & Saravanakumar, D. (2019). Plant extracts, bioagents and new generation fungicides in the control of rice sheath blight in Guyana. *Crop Protection*, *119*, 30-37.

Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J., & Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(4), 1190-1195.

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.

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*, *17*(5), 691-700. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v18i1.87595

Reuveni, A. F., R, & Putievsky, E. (1984). Fungistatic activity of essential oils from Ocimum basilicum chemotypes. *Journal of Phytopathology*, *110*(1), 20-22.

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(20), 7749-7759.

Simonato, B., Lorenzini, M., & Zapparoli, G. (2021). Effects of post-harvest fungal infection of apples on chemical characteristics of cider. *LWT*, *138*, 110620.

Skrypnik, L., Novikova, A., & Tokupova, E. (2019). Improvement of phenolic compounds, essential oil content and antioxidant properties of sweet basil (Ocimum basilicum L.) depending on type and concentration of selenium application. *Plants*, *8*(11), 458.

Soliman, K. M., & Badeaa, R. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and chemical toxicology*, *40*(11), 1669-1675.

Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food chemistry*, *102*(3), 938-953.

Telci, I., Bayram, E., Yılmaz, G., & Avcı, B. (2006). Variability in essential oil composition of Turkish basils (Ocimum basilicum L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, *34*(6), 489-497.

Tosun, M., Ercisli, S., Sengul, M., Ozer, H., Polat, T., & Ozturk, E. (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight Salvia species from Turkey. *Biological Research*, *42*(2), 175-181.

Ultee, A., Bennik, M., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and environmental microbiology*, *68*(4), 1561-1568.

Vikram, A., Prithiviraj, B., Hamzehzarghani, H., & Kushalappa, A. (2004). Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculated with fungal pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(11), 1333-1340.

Zollo, P. A., Biyiti, L., Tchoumbougnang, F., Menut, C., Lamaty, G., & Bouchet, P. (1998). Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and fragrance journal*, *13*(2), 107-114.