Study on chemical compounds, antioxidant activity, and antifungal effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on *Rhizopus stolonifera*, *Aspergillus niger*, and *Botrytis cinerea* (fungi causing rot in strawberry fruit)

Pages 39-51

M. Rahmati-Joneidabad[1] and H. Jooyandeh[2]

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

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

Received date: 2024.06.30 **Accepted date: 2024.10.05**

Abstract

In this study, *Cinnamomum zeylanicum* essential oil was extracted using hydrodistillation method and its chemical composition was determined by a gas chromatography device coupled to a mass spectrometer, its phenol content was measured using Folin-Ciocalteu method, its flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric method, its antioxidant activity was evaluated using DPPH and ABTS free radical scavenging and beta-carotene bleaching tests, and its antifungal activity was tested against *Rhizopus stolonifera*, *Aspergillus niger*, and *Botrytis cinerea* according to disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration methods. Eugenol was the major constituent of *C. zeylanicum* essential oil (76.1%) and the essential oil contained 51.2 mg GAE/g total phenol and 20.2 mg QE/g total flavonoids. The capacity of the essential oil to inhibit DPPH and ABTS free radicals and beta-carotene bleaching was 60.85, 70.66, and 54.4%, respectively. In addition, the antifungal activity of the essential oil against the fungal strains of *R. stolonifera*, *A. niger*, and *B. cinerea* was significant, and *B. cinerea* and *A. niger* were the most susceptible and resistant fungal strains to the essential oil, respectively. In general, the essential oil could be used as natural preservative to improve the shelf-life of food products.

Keywords: *Cinnamomum zeylanicum* essential oil, Bioactive compound, Antioxidant, Antifungal and Natural preservative.

.

مطالعه ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد قارچی اسانس میخک بر *ریزوپوس استولونیفرا*، *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* (عامل پوسیدگی میوه توت فرنگی)

شماره صفحات
۳۹-۵۱

مصطفی رحمتی جنیدآباد[۱] و حسین جوینده[۲]

۱) دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

۲) استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

*. نویسنده مسئول: **Rahmati@asnrukh.ac.ir**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

چکیده

در این پژوهش، اسانس میخک با استفاده از روش تقطیر با آب استخراج گردید و ترکیب شیمیایی آن با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی، محتوای فنول آن با استفاده از روش فولین سیوکالتو، محتوای فلاونوئید آن با کمک روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و جلوگیری از زوال رنگ بتا-کاروتن و فعالیت ضد قارچی آن در برابر سویه‌های قارچی *ریزوپوس استولونیفرا*، *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت. اوژنول ترکیب عمده اسانس میخک بود (۷۶/۱ ٪) و اسانس حاوی ۵۱/۲ mg GAE/g فنول کل و ۲۰/۲ mg QE/g فلاونوئید کل بود. ظرفیت اسانس در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و زوال رنگ بتا-کاروتن به ترتیب برابر با ۶۰/۸۵، ۷۰/۶۶ و ۵۴/۴ ٪ بود. علاوه بر این، فعالیت ضد قارچی اسانس در برابر سویه‌های قارچی *ریزوپوس استولونیفرا*، *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* قابل‌توجه بود و *بوتریتیس سینه‌را* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی در برابر اسانس میخک بودند. بطور کلی، اسانس میخک می‌تواند بعنوان عامل نگهدارنده طبیعی جهت افزایش عمر نگهداری محصولات باغبانی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: اسانس میخک، ترکیب زیست فعال، آنتی‌اکسیدان، ضد قارچ و نگهدارنده طبیعی.

مقدمه

کیفیت پس از برداشت محصولات باغی تازه به طور قابل‌توجهی تحت تأثیر عوامل بیولوژیکی متعددی از جمله تنفس، تعرق، اتیلن و پاتوژن‌های گیاهی قرار می‌گیرد و این عوامل را می‌توان توسط عوامل محیطی متعددی مانند دما، رطوبت نسبی، ترکیب هوا، نور، گرما، اتیلن و مواد زیستی مدیریت کرد. زوال پس از برداشت شامل تغییرات فیزیولوژیکی، صدمات فیزیکی، تغییرات بیوشیمیایی و زوال پاتولوژیک است (Yahia *et al*., 2011; Rahmati-Joneidabad *et al*., 2021). پوسیدگی پس از برداشت ناشی از *بوتریتیس سینه‌را* (کپک خاکستری) یکی از دلایل اصلی ضایعات پس از برداشت است و به بیش از ۲۰۰ محصول، عمدتاً شامل میوه‌های دانه‌دار، هسته‌دار، انگور و توت‌ها حمله می‌کند. این عفونت‌ها به قابلیت نگهداری میوه‌ها آسیب می‌رساند و بر بازارپسندی میوه‌ها تأثیر منفی می‌گذارد. علاوه بر این، متابولیت‌های ثانویه کپک (مایکوتوکسین‌ها) اثرات نامطلوب مستقیمی بر سلامت انسان دارند (Kahramanoğlu *et al*., 2022). در واقع، فساد کپک خاکستری را می‌توان با برخی قارچ‌کش‌های سنتزی مهار یا حتی کنترل کرد. بااین‌وجود، استفاده از قارچ‌کش‌های سنتزی با برخی مشکلات غیرقابل حل مانند آلودگی محیطی، ایجاد گونه‌های قارچی مقاوم و حتی خطرات بالقوه برای سلامت انسان همراه است. در نتیجه، جستجو برای عوامل ضد میکروبی جایگزین به منظور بهبود کیفیت و افزایش عمر مفید محصولات غذایی یک چالش مهم است (Wang *et al*., 2022). متابولیت های ثانویه تولید شده توسط گیاهان نقش مهمی در مکانیسم دفاعی گیاه دارند. بیشتر اسانس‌های گیاهی متابولیت‌های ثانویه هستند و به عنوان آنتی‌اکسیدان، ضد قارچ یا ضد میکروب در سیستم دفاعی گیاه نقش دارند. سهم بسیار زیادی از اسانس‌های گیاهی در طب سنتی در چندین دهه گذشته گزارش شده است. اسانس‌های گیاهی به صورت تجاری در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی و نوشیدنی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اسانس‌ها به دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی یکی از اصلی‌ترین ترکیبات طبیعی و به‌طور کلی به عنوان ترکیبات ایمن در فناوری‌های نگهداری مواد غذایی شناخته می‌شوند (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019a; Kiarsi *et al*., 2020). خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی توسط ترکیبات ترپنوئیدی و فنول آنها ارائه می‌شود. این ترکیبات در صورت استفاده در داروهای غذایی و آفت‌کش‌ها برای انسان، حیوانات و محیط‌زیست بی‌خطر هستند (Yousafi *et al*., 2022). میخک (*Syzygium aromaticum* L.) به عنوان درختی همیشه سبز شناخته می‌شود و محصولات تجاری آن میخک، روغن میخک و اولئورزین است. اسانس میخک به‌طور معمول از ساقه، جوانه‌ها و برگ‌های آن استخراج می‌شود. روغن میخک در فرمولاسیون‌های دندانپزشکی، خمیر دندان، صابون‌ها، دهان‌شویه‌ها، خوشبو کننده‌ها، دافع حشرات و اقلام آرایشی و بهداشتی به دلیل خواص بیولوژیکی مختلف مانند آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد درد و فعالیت‌های ضد سرطان استفاده می‌شود (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b). اوژنول ترکیب شیمیایی اصلی اسانس میخک است که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد قارچی آن در مطالعات مختلف گزارش شده است (Gülçin, 2011; Marchese *et al*., 2017; Nagababu *et al*., 2010). در این پژوهش، ترکیب شیمیایی،

محتوای ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد قارچی اسانس میخک در برابر سویه‌های قارچی پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

معرف‌های رادیکال آزاد DPPH، رادیکال آزاد ABTS، فولین سیوکالتو و بتا-کاروتن از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. محیط‌های کشت میکروبی و معرف تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. سایر مواد مورد استفاده در این پژوهش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

استخراج اسانس

گیاه میخک از بازار محلی خریداری شد. سپس در دمای اتاق در مکانی تاریک خشک و سپس آسیاب گردید. گیاه پودر شده (۲۰ g) در آب مقطر (۷۵۰ ml) پراکنده شد و دیسپرسیون حاصل به مدت ۳ h در معرض دستگاه کلونجر مبتنی بر تقطیر با آب قرار گرفت. اسانس استخراج شده با استفاده از سولفات سدیم بی‌آب خشک شد و سپس در دمای ۴ °C در ویال‌های شیشه‌ای تا زمان آنالیز نگهداری گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b; Heydari *et al*., 2020).

شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS; GC6890A and MS5975, Agilent Technologies, Shanghai, China) برای شناسایی ترکیبات شیمیایی اصلی اسانس استفاده شد. برای این منظور ۰/۲ µl اسانس به ستون دستگاه تزریق شد و جداسازی ترکیبات شیمیایی اسانس با سرعت حرارت‌دهی ۵ $°C.min^{-1}$ و انرژی یونیزاسیون ۷۰ eV براساس برنامه دمایی ۴۰ °C تا ۲۵۰ انجام گردید که توسط گاز حامل هلیوم ایجاد شد. مقایسه طیف‌های نرمال ترکیبات شیمیایی با طیف آلکان‌ها (C8-C28)، محاسبه شاخص بازداری کواتس و ارجاع شاخص‌های حاصل به کتابخانه ترکیبات NIST05 برای شناسایی ترکیبات شیمیایی اصلی اسانس استفاده شد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b).

میزان فنول کل

غلظت فنول کل در اسانس با استفاده از اسپکتروفتومتر بر اساس معرف فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. به ۵۰۰ µl عصاره رقیق شده، ۲/۵ ml معرف فولین سیوکالتو (۱۰ بار با آب مقطر رقیق شده) و ۲ ml Na_2CO_3 (۷۵ $g.l^{-1}$) اضافه شد. نمونه به مدت ۵ min در دمای ۵۰ °C نگهداری و سپس خنک گردید. جذب نمونه در ۷۶۰ nm ثبت و محتوای فنول کل بصورت معادل

اسید گالیک در گرم اسانس (mg GAE/g) بر اساس منحنی کالیبراسیون محاسبه شد (El-Maati *et al*., 2016; Škerget *et al*., 2005).

میزان فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل، ۱/۵ ml از محلول اتانولی $AlCl_3$ (۲۰ $g.l^{-1}$) به ۰/۵ ml از اسانس اضافه شد. پس از ۶۰ min، جذب در ۴۲۰ nm ثبت گردید. محتوای فلاونوئید کل بصورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم اسانس (mg QE/g) بر اساس منحنی کالیبراسیون تعیین گردید (El-Maati *et al*., 2016; Ordonez *et al*., 2006).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر پایه فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و مهار زوال رنگ بتا-کاروتن ارزیابی گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b). در روش فعالیت مهار رادیکال DPPH، اسانس (۱۰۰ µl) با ۳/۹ ml محلول اتانولی رادیکال DPPH (۱۲ mM) مخلوط و محلول به‌دست‌آمده به مدت ۳۰ min در دمای محیط در مکانی تاریک نگهداری شد و جذب آن در طول‌موج ۵۱۷ nm قرائت شد. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس از طریق رابطه ۱ اندازه‌گیری شد.

رابطه ۱: $$\text{Antioxidant activity} = [1-(As/Ac)] \times 100$$

در این فرمول، As و Ac به ترتیب جذب نمونه و شاهد می‌باشند.

در روش فعالیت مهار رادیکال ABTS، ابتدا رادیکال‌های کاتیون ABTS با واکنش حجم یکسانی از محلول‌های ABTS (۷ mM) و پرسولفات پتاسیم (۲/۴۵ mM) و نگهداری محلول به دست آمده در دمای اتاق و در شرایط تاریک به مدت ۱۶ hr، تولید شدند. سپس محلول ABTS با متانول رقیق شد تا به جذب ۰/۷ در ۷۳۴ nm برسد. پس از آن، ۳/۹۰ ml از محلول رقیق شده رادیکال ABTS با اسانس (۰/۱ ml) یا متانول (۰/۱ ml؛ به عنوان نمونه شاهد) مخلوط شد. محلول به مدت ۶ min در دمای محیط نگهداری شد و جذب در طول‌موج ۷۳۴ nm اندازه‌گیری گردید. در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد:

رابطه ۲: $$\text{Antioxidant activity} = [1-(As/Ac)] \times 100$$

در این فرمول، As و Ac به ترتیب جذب نمونه و شاهد می‌باشند.

اثر بازدارندگی اسانس در برابر بی رنگ شدن محلول β-کاروتن-لینولئات با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بر اساس رابطه ۳ ارزیابی شد:

رابطه ۳: $$\text{Antioxidant activity} = [(AA_{120} - AC_{120})/(AC_0 - AC_{120})] \times 100$$

در این فرمول، AA_{120} جذب نمونه (در ۴۹۰ nm) پس از زمان گرمخانه گذاری ۱۲۰ min است و AC_0 و AC_{120} به ترتیب جذب نمونه شاهد در زمان صفر و پس از ۱۲۰ min زمان گرمخانه گذاری می‌باشند.

اثر ضد قارچی

اثر ضد قارچی اسانس میخک در برابر سویه‌های قارچی پاتوژن *ریزوپوس استولونیفرا* (*Rhizopus stolonifera*)، *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) و *بوتریتیس سینه‌را* (*Botrytis cinerea*) بر اساس آزمون‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی بررسی گردید (Rahmati-Joneidabad *et al*., 2021). در آزمون دیسک دیفیوژن آگار، دیسک کاغذی با قطر ۶/۲ mm با اسانس میخک (۲۰ µl) آغشته شد و سپس روی سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار که سویه‌های قارچی از قبل روی آن کشت داده شده بودند قرار داده شد. محیط کشت سپس در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ hr قرار داده شد و در نهایت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه‌گیری گردید. در روش ضد قارچی چاهک آگار، ابتدا سویه‌های قارچی روی محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت داده شدند. سپس چاهک‌هایی با قطر یکسان روی محیط کشت ایجاد و با اسانس میخک (۲۰ µl) پر شدند. گرمخانه گذاری مطابق روش قبل انجام گردید و قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه‌گیری شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، اسانس میخک توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۴۵ µm استریل، رقت‌های متوالی از آن تهیه و با سپس با سویه‌های میکروبی درون لوله‌های آزمایش مخلوط شد. نمونه‌ها در دمای ۲۷ °C به مدت ۷۲ hr نگهداری شدند و سپس از نظر رشد میکروبی بصورت بصری ارزیابی شدند. برای این منظور، چنانچه رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد، کدورت بصورت بصری قابل مشاهده است. در این حالت، اولین غلظتی که در آن کدورت مشاهده نشد، بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس میخک تلقی گردید. سپس غلظت‌های فاقد رشد میکروبی برای تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد استفاده قرار گرفتند. محتوای لوله آزمایش روی محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت داده شد و گرمخانه گذاری مطابق شرایط فوق تکرار گردید. حداقل غلظت کشندگی اسانس بعنوان اولین غلظتی که از تشکیل کلنی میکروبی در محیط جلوگیری نمود در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اختلاف بین میانگین داده‌ها با کمک آزمون دانکن ($p < 0.05$) تعیین شد. تمام آزمایش‌ها در سه مرحله تکرار شدند.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس میخک در جدول ۱ گزارش شده است. اوژنول و کاریوفیلن به ترتیب با ۷۶/۱ ٪ و ۱۳/۵ ٪ اصلی‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس میخک شناسایی شدند. نتایج با یافته‌های سایر محققین که گزارش دادند اوژنول اصلی‌ترین ترکیب اسانس میخک است، مطابقت دارد. بطوریکه مطابق یافته‌های Cortés-Rojas *et al*. (2014)، اوژنول در محدوده غلظت

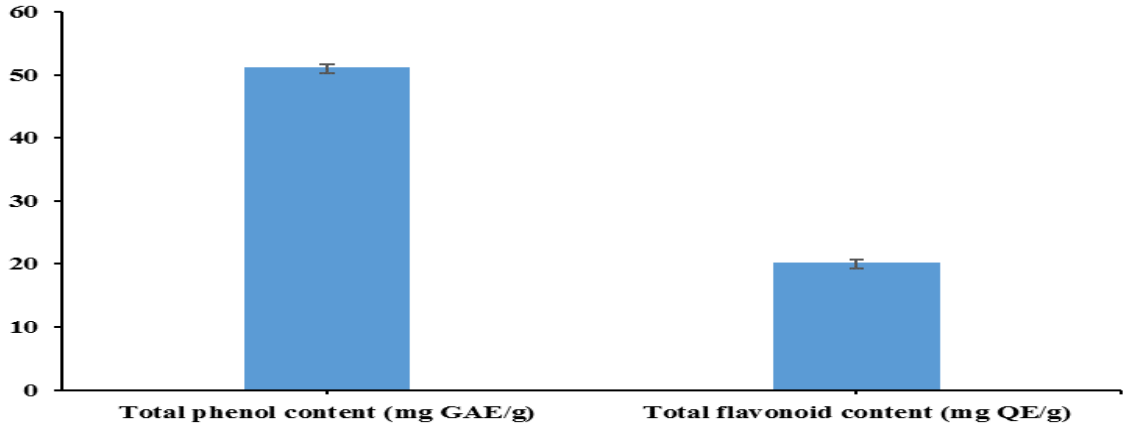
mg/100 g ۹۳۸۱/۷۰ تا ۱۴۶۵۰/۰ در ماده گیاهی تازه یافت می‌شود. علاوه بر این، Ranasinghe *et al*. (2002) گزارش نمود که اسانس میخک حاوی ۷۹/۲ ٪ اوژنول و ۷/۵ ٪ کاریوفیلن می‌باشد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس میخک.

Table 1- Chemical compounds of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil.

No.	Compounds	RT	Area%
1	α-Pinene	10.4	0.02
2	Eugenol	25.77	76.10
3	Caryophyllene	26.95	13.50
4	α-Humulene	27.74	3.5
5	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-methylene	29.44	0.8
6	phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)	29.69	5.1
7	caryophyllene oxide	30.87	0.7
Ave.			99.72

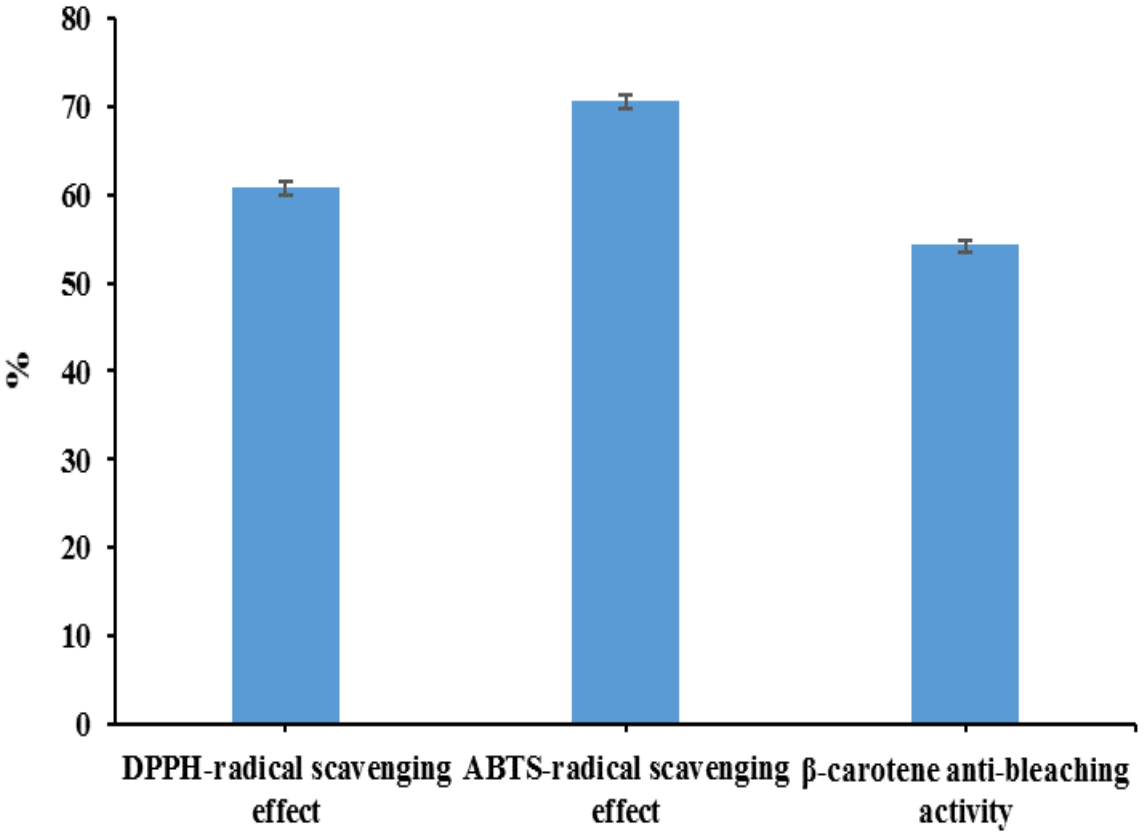
مطابق نتایج محتوای فنول و فلاونوئید کل (شکل ۱)، اسانس میخک غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بود (به ترتیب ۵۱/۲ ± ۰/۴ mg GAE/g و ۲۰/۲ ± ۰/۴۳ mg QE/g). میخک یکی از منابع گیاهی اصلی ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها، هیدروکسی فنیل پروپنس، هیدروکسی سینامیک اسید و هیدروکسی بنزوئیک اسید است. اسیدهای فنولیک مانند اسید گالیک و مشتقات آن (به عنوان مثال، تانن‌های قابل هیدرولیز) در اسانس میخک با غلظت بالایی یافت می‌شوند. ترکیبات فلاونوئیدی مانند کامپفرول، کوئرستین و مشتقات گلیکوزیله آن نیز به مقدار کمتری در میخک وجود دارند (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b). نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019b; Neaz, 2019; Wojdyło *et al*., 2007). ترکیبات فنولی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس‌های زیست فعال نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند (Alizadeh Behbahani *et al*., 2021; Alizadeh Behbahani *et al*., 2019a).



شکل ۱- محتوای فنول و فلاونوئید کل اسانس میخک.

Figure 1- Total phenol and flavonoid contents of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil.

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس میخک در شکل ۲ ارائه شده است. مطابق نتایج، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS و مهار زوال رنگ بتا-کاروتن به ترتیب برابر با ۰/۵۲ ± ۶۰/۸۵ ٪، ۰/۵۱ ± ۷۰/۶۶ ٪ و ۰/۳۸ ± ۵۴/۴ ٪ بود. این بدان معنی است که اسانس میخک حاوی ترکیبات زیست فعال با توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد از طریق اهدا هیدروژن و الکترون است (Alizadeh Behbahani & Shahidi, 2019). این فعالیت عمدتاً ناشی از حضور اوژنول در اسانس است (Cortés-Rojas *et al*., 2014). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های سایر محققین همخوانی دارد (Abdel-Wahhab & Aly, 2005; Gülçin, 2011).

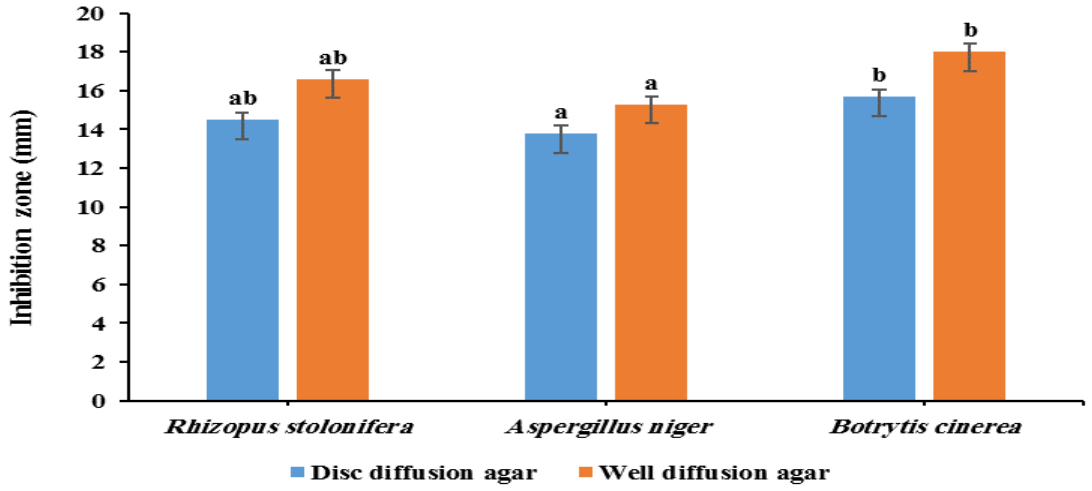


شکل ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس میخک.

Figure 2- Antioxidant activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil.

اسانس میخک فعالیت ضد قارچی قابل‌توجهی در برابر سویه‌های قارچی *ریزوپوس استولونیفرا*، *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* نشان داد (شکل ۳ و ۴). مطابق نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار، *بوتریتیس سینه‌را* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب با بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی در برابر اسانس میخک بودند. علاوه بر این، لازم به ذکر است که قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار بزرگ‌تر از آزمون دیسک دیفیوژن آگار بود و این حالت عمدتاً به دلیل تماس مستقیم اسانس و قارچ در روش چاهک آگار می‌باشد. بااین‌حال، در آزمایش ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار، اسانس باید از دیسک‌ها به محیط کشت نفوذ یابد تا اثر بازدارندگی خود را اعمال کند (Alizadeh

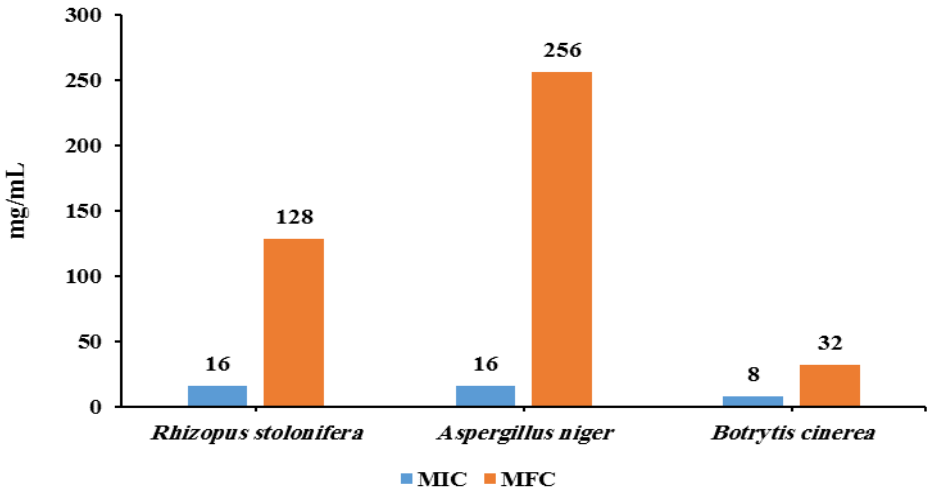
Behbahani *et al*., 2013a,b; Yeganegi *et al*., 2018; Sureshjani *et al*., 2014; Falah *et al*., 2021 ;Zanganeh *et al*., 2021).



شکل ۳- فعالیت ضد قارچی اسانس میخک بر پایه روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار.

Figure 3- Antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil based on disk diffusion agar and well diffusion agar methods.

نتایج آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و قارچ‌کشی اسانس در راستای یافته‌های روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک بود (شکل ۵). بطوریکه *بوتریتیس سینه‌را* با $mg.ml^{-1}$ ۸ حداقل غلظت مهارکنندگی و $mg.ml^{-1}$ ۳۲ حداقل غلظت قارچ‌کشی و *آسپرژیلوس نایجر* با $mg.ml^{-1}$ ۱۶ حداقل غلظت مهارکنندگی و $mg.ml^{-1}$ ۲۵۶ حداقل غلظت قارچ‌کشی به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌ها در برابر اسانس میخک بودند.



شکل ۴- فعالیت ضد قارچی اسانس میخک بر پایه روش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و قارچ‌کشی.

Figure 4- Antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil based on minimum inhibitory and fungicidal concentration (MIC and MFC) methods.

فعالیت ضد قارچی اسانس میخک در برابر سویه‌های مختلف قارچی در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (Cortés-Rojas *et al*., 2014; Rana *et al*., 2011; Ranasinghe *et al*., 2002). تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی نشان داد که اوژنول ترکیب اصلی مسئول فعالیت ضد قارچی به دلیل تخریب اسپورها و میسلیوم‌ها است. مکانیسم مشابهی از عملکرد اختلال غشاء و تغییر شکل ماکرومولکول‌های تولید شده توسط اوژنول نیز گزارش شده است (Devi *et al*., 2010). به‌طور کلی، اسانس میخک حاوی ترکیبات زیست فعال با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عالی است که باعث می‌شود از آن به عنوان یک منبع طبیعی از عوامل نگهدارنده در محصولات غذایی مختلف برای مهار رشد میکروبی و اکسیداسیون استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

اسانس میخک غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بود و اوژنول با ۷۶/۱ ٪ اصلی‌ترین ترکیب شیمیایی تشکیل دهنده اسانس بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس میخک در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و جلوگیری از زوال رنگ بتا-کاروتن قابل‌توجه بود. بعلاوه، مطابق نتایج فعالیت ضد قارچی، اسانس میخک بطور معنی‌داری از رشد سویه‌های *ریزوپوس استولونیفرا*، *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* جلوگیری نمود. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که اسانس میخک بصورت مستقل و یا در قالب پوشش خوراکی جهت جلوگیری از رشد میکروبی و کنترل اکسیداسیون محصولات غذایی مختلف استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی کاربردی با کد ۱/۴۱۱/۸۳۴ 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

Abdel-Wahhab, M., & Aly, S. (2005). Antioxidant property of Nigella sativa (black cumin) and Syzygium aromaticum (clove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, *25*(3), 218-223 .

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., 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.

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*, *13*(1), 875-883 .

Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., & Gholian, M. M.

(2013a). Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. *Archives of Advances in Biosciences*, *4*(3).

Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013b). 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.

Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *4*(2), 90-96 .

Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010).Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*, *130*(1), 107-115 .

El-Maati, M. F. A ,.Mahgoub, S. A., Labib, S. M., Al-Gaby, A. M. A., & Ramadan, M. F. (2016). Phenolic extracts of clove (Syzygium aromaticum) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine*, *8*(4), 494-504.

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.

Gülçin, İ. (2011). Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food*, *14*(9), 975-985.

Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (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.

Kahramanoğlu, İ., Panfilova, O., Kesimci, T. G., Bozhüyük, A. U., Gürbüz, R., & Alptekin, H. (2022). Control of Postharvest Gray Mold at Strawberry Fruits Caused by Botrytis cinerea and Improving Fruit Storability through Origanum onites L. and Ziziphora clinopodioides L. Volatile Essential Oils. *Agronomy*, *12*(2), 389.

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 .

Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M ,. Abdollahi, M., Nabavi, S. M., & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(6), 668-689.

Nagababu, E., Rifkind, J. M., Boindala, S., & Nakka, L. (2010). Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol In Vitro and In Vivo. In R. M. Uppu, S. N. Murthy, W. A. Pryor, & N. L. Parinandi (Eds.), *Free Radicals and Antioxidant Protocols* (pp. 165-180).

Neaz, S. (2019). *Phytochemical and biological investigation on syzygium aromaticum (Myrtaceae)*. University of Dhaka.

Ordonez, A., Gomez, J., & Vattuone, M. (2006). Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*, *97*(3), 452-458 .

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 .

Rana, I. S., Rana, A. S., & Rajak, R. C. (2011). Evaluation of antifungal activity in essential oil of the Syzygium aromaticum (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology, 42*, 1269-1277 .

Ranasinghe, L., Jayawardena, B., & Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum zeylanicum (L.) and Syzygium aromaticum (L.) Merr et LM Perry against crown

rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, *35*(3), 208-211 .

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A .R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, *89*(2), 191-198 .

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.

Wang, D., Yang, H., Lu, X., Wu, Y., & Blasi, F. (2022). The Inhibitory Effect of Chitosan Based Films, Incorporated with Essential Oil of Perilla frutescens Leaves, against Botrytis cinerea during the Storage of Strawberries. *Processes*, *10*(4), 706.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, *105*(3), 940-949 .

Yahia, E. M., Ornelas-Paz, J. D. J., & Elansari, A. (2011). Postharvest technologies to maintain the quality of tropical and subtropical fruits. In *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 142-195e). Woodhead Publishing.

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

Yousafi, Q., Bibi, S., Saleem, S., Hussain, A., Hasan, M. M., Tufail, M., ... & Kabra, A. (2022). Identification of novel and safe fungicidal molecules against fusarium oxysporum from plant essential oils: In vitro and computational approaches. *BioMed Research International*, *2022*.

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 .