

## بررسی اثر امواج مایکروویو بر ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضداکسایشی و ضدقارچی اسانس مورتلخ

نسترن خواجهئی<sup>۱</sup>، محمدتقی گلماکانی<sup>۲\*</sup>، مرضیه ابلاغی<sup>۳</sup>، محمد هادی اسکندری<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

۲- دانشیار، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

\* نویسنده مسئول (golmakani@shirazu.ac.ir)

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

۴- دانشیار، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

### چکیده

هدف از این تحقیق، استخراج اسانس گیاه مورتلخ به روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو و تقطیر آبی ساده و سپس، مقایسه بازده و سینتیک استخراج، ترکیبات شیمیایی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، فعالیت ضداکسایشی و ضدقارچی اسانس به دست آمده از دو روش مذکور بود. بازده نهایی اسانس در روش تقطیر آبی ساده (۱۵۰ دقیقه)، ۱/۷۴ درصد و در روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو (۴۵ دقیقه)، ۱/۷۱ درصد بود. تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین دو روش از نظر بازده استخراج اسانس دیده نشد، اما زمان روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو بسیار کوتاه‌تر بود. عدد  $IC_{50}$  برای روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو و تقطیر آبی ساده به ترتیب ۳/۷۰ و ۳/۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. ترکیبات مؤثره اسانس به دست آمده از هر دو روش مشابه بودند. اثر ضدقارچی روی قارچ‌های مورد آزمون (آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس اوریزا، تریکودرما هاریزانوم، بیساکلامیس اسپکتابیلیس، پیسیلومایسز واریوتی و پنسیلیوم کرایوزنوم)، متفاوت بود و MIC بین ۲۵۰۰-۷۸/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. تریکودرما هاریزانوم مقاوم‌ترین و بیساکلامیس اسپکتابیلیس حساس‌ترین قارچ‌ها به اسانس بودند. بنابراین، تقطیر آبی به کمک مایکروویو هیچ‌گونه اثر نامطلوبی بر ویژگی‌های کمی و کیفی ترکیبات اسانس، فعالیت ضداکسایشی و ضدقارچی اسانس مورتلخ نداشت.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۳

### واژه‌های کلیدی

استخراج اسانس  
فعالیت ضداکسایشی  
فعالیت ضدقارچی  
مایکروویو  
مورتلخ

### مقدمه

خونریزی و سل اشاره کرد (Khajeh & Ghanbari, 2011; Bahadori et al., 2016).

از فعالیت‌های زیستی این گیاه می‌توان ضداکسایشی، ضد میکروبی و ضد ویروسی را نام برد. این گیاه می‌تواند در به تعویق انداختن فساد میکروبی در بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Yamini et al., 2008; Javidnia et al., 2009; Khajeh & Ghanbari, 2011). فعالیت ضداکسایشی عصاره اتیل استاتی مورتلخ و عصاره‌های به دست آمده از استخراج مایع-مایع را بررسی و گزارش شد که عصاره

گیاه گل‌دار وحشی مورتلخ<sup>۱</sup> یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده لامیاسه<sup>۲</sup> است. این خانواده ۲۳۶ جنس و بیش از ۷۰۰۰ گونه دارد (Zarshenas & Krenn, 2015). این گونه، بومی ایران است و بیشتر در جنوب کشور یافت می‌شود. خواص دارویی بسیار زیادی برای آن گزارش شده است که می‌توان به درمان عفونت، تصلب شرائین، درد، اسپاسم، سرماخوردگی، صرع، برونشیت،

<sup>1</sup> *Salvia mirzayanii*

<sup>2</sup> Lamiaceae

و از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی بررسی شدند. نتایج شناسایی با توالی‌یابی 16S rRNA تأیید شدند و پس از مقایسه با بانک اطلاعات ژنتیکی NCBI، *آسپرژیلوس نایجر*<sup>۵</sup>، *آسپرژیلوس اوریزا*<sup>۶</sup>، *تریکودرما هاریزانوم*<sup>۷</sup>، *بیساکلامیس اسپکتابیلیس*<sup>۸</sup>، *پیسیلومایسز وارپوتی*<sup>۹</sup> و *پنیسیلیوم کرایزوتوم*<sup>۱۰</sup> شناسایی شدند (Jafarpour, 2012). از کشت‌های خالص، روی محیط MEA (درون لوله به صورت اسلنت) کشت داده شد. پس از اطمینان از خلوص کشت، لوله‌ها با پارافیلیم پوشیده و در ۴ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

#### گیاه

گیاه خشک مورتلخ، بومی منطقه لارستان، استان فارس، از بازار محلی خریداری شد. نمونه گیاه، توسط دکتر خسروی، متخصص گیاه‌شناس هرباریوم بخش زیست‌شناسی دانشگاه شیراز، شناسایی و تأیید شد. رطوبت گیاه با ۳ بار تکرار طبق روش AACC 44-19 (۱۹۸۳) تعیین و رطوبت گیاه ۵ درصد گزارش شد.

#### استخراج اسانس

##### تقطیر آبی ساده

برای استخراج اسانس به روش تقطیر آبی، از یک گرم کن الکترومنتل<sup>۱۱</sup> استفاده شد (شکل ۱-الف). ۷۵ گرم از گیاه خشک با ۳۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر (نسبت گیاه به آب، ۱ به ۵) مخلوط شد و با دستگاه کلونجر، استخراج اسانس به مدت ۱۵۰ دقیقه انجام شد. زمان شروع استخراج یادداشت و میزان اسانس استخراج‌شده، هر ۳۰ دقیقه بررسی شد.

##### تقطیر آبی به کمک میکروویو

از یک دستگاه میکروویو با قدرت ۱۰۰۰ وات (باتوجه به نتایج آزمون‌های اولیه) و فرکانس ۲/۴۵ گیگاهرتز (ME3410W; Samsung Electronics Co.)

اتیل‌استاتی بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال را داشته است (Moein *et al.*, 2008). در یک مطالعه در سال ۲۰۰۹، خاصیت ضد میکروبی عصارهٔ مورتلخ و چند گونهٔ دیگر این گیاه علیه ۸ باکتری و یک قارچ بررسی شد و مشخص شد که در غلظت‌های پایین ۰/۵ تا ۴ میلی‌گرم عصاره به ازای هر دیسک، فعالیت ضد میکروبی بالایی داشت (Javidnia *et al.*, 2009). در تحقیقی دیگر نیز فعالیت ضد اکسایشی و ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس مورتلخ را بررسی کردند (Sadeghi & Alizadeh, 2013).

اسانس‌ها به روش‌های متفاوتی از جمله تقطیر آبی، استخراج با حلال آلی و تقطیر با بخار استخراج می‌شوند که به این روش‌ها به‌طور کلی روش‌های سنتی گفته می‌شود (Golmakani & Rezaei, 2008a; Kim *et al.*, 2010). یکی از روش‌های نوین استخراج اسانس که امروزه مورد توجه قرار گرفته، تقطیر آبی به کمک مایکروویو است که نسبت به روش‌های سنتی دارای مزایایی از جمله زمان بسیار کوتاه‌تر استخراج، حفظ انرژی، هزینهٔ عملیاتی کمتر و حفظ ترکیبات مؤثرهٔ اسانس می‌باشد (Seidi Damye *et al.*, 2015a).

هدف اصلی این تحقیق، مقایسهٔ استخراج اسانس مورتلخ به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو است. بازده استخراج، ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضد اکسایشی و ضدقارچی اسانس مورتلخ نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد شیمیایی

رادیکال ۲ و ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل<sup>۱</sup> و بوتیل‌اند هیدروکسی‌تولوئن<sup>۲</sup> از سیگما آلدریج و محیط‌های کشت میکروبی، مالت اکسترکت آگار<sup>۳</sup> و مالت اکسترکت برات<sup>۴</sup> و سایر مواد آزمایشگاهی مورد استفاده دیگر، از مرک آلمان خریداری شدند.

##### میکروارگانیسم‌ها

۶ گونه قارچ عامل فساد از پنیر فتای ایرانی جداسازی

<sup>5</sup> *Aspergillus niger*

<sup>6</sup> *Aspergillus oryzae*

<sup>7</sup> *Trichoderma harzianum*

<sup>8</sup> *Byssoschlamys spectabilis*

<sup>9</sup> *Paecilomyces variotii*

<sup>10</sup> *Penicillium chrysogenum*

<sup>11</sup> Electromantle heater

<sup>1</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH<sup>•</sup>)

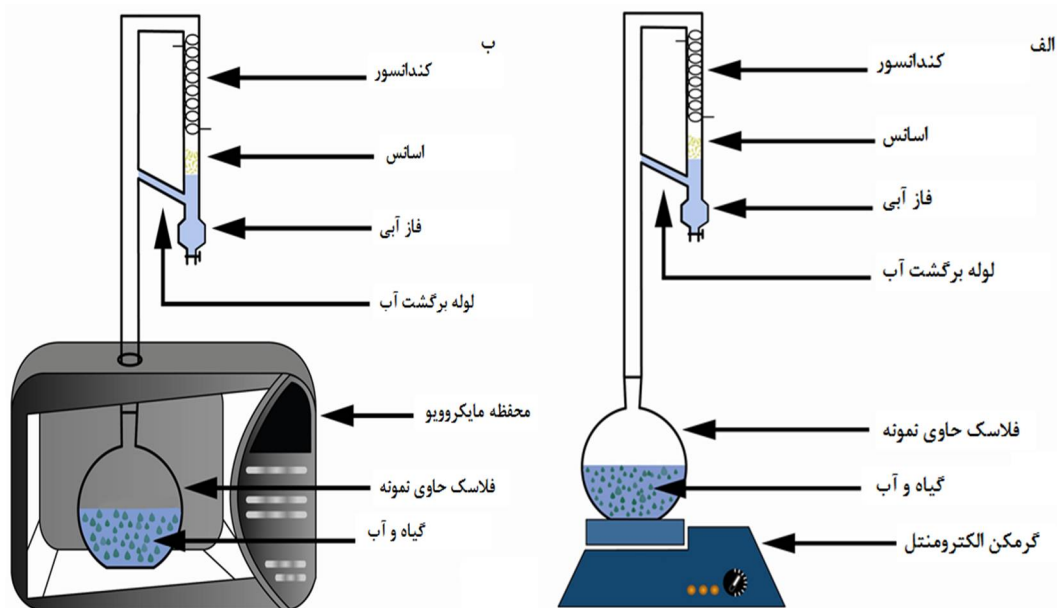
<sup>2</sup> Butylated hydroxytoluene (BHT)

<sup>3</sup> Malt extract agar (MEA)

<sup>4</sup> Malt extract broth (MEB)

مدت زمان اسانس‌گیری ۴۵ دقیقه بود. در هر دو روش استخراج تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، شاخص‌های فرایند (دما و مصرف انرژی) اندازه‌گیری شدند. اسانس استخراج‌شده با سدیم سولفات، آب‌گیری و در یک ویال شیشه‌ای نفوذناپذیر به هوا، درون فویل آلومینیومی در دمای  $18 \pm 1$  درجه سلسیوس تا انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

به‌عنوان قسمت حرارت‌دهنده استفاده شد. فلاسک دستگاه کلونجر درون اتاقک مایکروویو قرار گرفت و به‌وسیله یک حفره، به سایر قسمت‌های کلونجر، خارج از اتاقک مایکروویو متصل شد (شکل ۱-ب). ۷۵ گرم از گیاه خشک با ۳۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر (نسبت گیاه به آب، ۱ به ۵) مخلوط شد. زمان شروع استخراج ثبت و میزان اسانس استخراج‌شده هر ۹ دقیقه یک‌بار یادداشت شد. کل



شکل ۱- تجهیزات (الف) تقطیر آبی ساده و (ب) تقطیر آبی به کمک مایکروویو

ویژگی‌های فیزیکی برای اسانس‌های استخراج‌شده به روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، وزن مخصوص (در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) و ضریب شکست (در دمای ۲۰ درجه سلسیوس) به‌وسیله رفرکتومتر و ویژگی‌های ظاهری طبق روش Food Chemical Codex (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شدند. شاخص‌های رنگ اسانس،  $L^*a^*b^*$  (روشنایی،  $a^*$ : قرمز-سبزی و  $b^*$ : زردی-آبی) نیز مشخص شد (Yam & Papadakis, 2004; Golmakani & Rezaei, 2008b).

کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس مورتلخ با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (Agilent Technologies, 7890A-5975C, USA) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت و محدوده جرمی ۳۵-۴۰۰ انجام شد. ستون دستگاه HP 5MS (۳۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت فیلم) بود. دمای محل تزریق و آشکارساز ۲۸۰ درجه سلسیوس بود. دمای آون دستگاه از ۶۰ درجه سلسیوس شروع شد و به تدریج با نرخ ۳ درجه سلسیوس بر دقیقه تا ۲۱۰ درجه سلسیوس بالا رفت. سپس، نرخ افزایش دما به ۲۰ درجه سلسیوس بر دقیقه رسید تا زمانی که دما به ۲۴۰ درجه سلسیوس برسد و سپس، به مدت ۸/۵ دقیقه در این دما ثابت باقی ماند. بعد از آن، ۱ میکرولیتر از اسانس به دستگاه تزریق شد. گاز حامل هلیوم با شدت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. با استفاده از برنامه‌ریزی کامپیوتری

ویژگی‌های فیزیکی برای اسانس‌های استخراج‌شده به روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، وزن مخصوص (در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) و ضریب شکست (در دمای ۲۰ درجه سلسیوس) به‌وسیله رفرکتومتر و ویژگی‌های ظاهری طبق روش Food Chemical Codex (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شدند. شاخص‌های رنگ اسانس،  $L^*a^*b^*$  (روشنایی،  $a^*$ : قرمز-سبزی و  $b^*$ : زردی-آبی) نیز مشخص شد (Yam & Papadakis, 2004; Golmakani & Rezaei, 2008b).

کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس مورتلخ با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (Agilent Technologies, 7890A-5975C, USA) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت و محدوده جرمی ۳۵-۴۰۰ انجام شد. ستون دستگاه HP 5MS (۳۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت فیلم) بود. دمای محل تزریق و آشکارساز ۲۸۰ درجه سلسیوس بود. دمای آون دستگاه از ۶۰ درجه سلسیوس شروع شد و به تدریج با نرخ ۳ درجه سلسیوس بر دقیقه تا ۲۱۰ درجه سلسیوس بالا رفت. سپس، نرخ افزایش دما به ۲۰ درجه سلسیوس بر دقیقه رسید تا زمانی که دما به ۲۴۰ درجه سلسیوس برسد و سپس، به مدت ۸/۵ دقیقه در این دما ثابت باقی ماند. بعد از آن، ۱ میکرولیتر از اسانس به دستگاه تزریق شد. گاز حامل هلیوم با شدت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. با استفاده از برنامه‌ریزی کامپیوتری

### فعالیت ضدقارچی

آماده‌سازی سوسپانسیون اسپور قارچی

۶ گونه قارچ به‌طور جداگانه روی محیط اسلنت MEA کشت داده شدند و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل درون لوله‌های حاوی اسپور قارچ ریخته و به شدت هم‌زده شد تا سوسپانسیون همگنی از اسپور به‌دست آید. غلظت سوسپانسیون اسپور به کمک لام هموسایتومتر مشخص و غلظت نهایی  $1 \times 10^6$  اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شد (Strober, 2001; Yang & Clausen, 2007).

### بررسی فعالیت ضدقارچی

برای تهیهٔ محلول ذخیره<sup>۱</sup> (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، اسانس مورتلخ در دی‌متیل سولفوکسید<sup>۲</sup> (غلظت کمتر از ۲ درصد) حل شد. مقادیر معینی (۴ میکرولیتر) از محلول ذخیرهٔ اسانس مورتلخ به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MEA استریل که تا دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس سرد شده بود، افزوده شد و در پلیت ریخته شد. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور  $10^6$  اسپور در هر میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد تا غلظت نهایی اسانس ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شود. برای هر قارچ، یک پلیت حاوی دی‌متیل سولفوکسید ۲ درصد فاقد اسانس قرار داده شد تا به‌عنوان کنترل مورد مقایسه قرار گیرد و خاصیت ضدقارچی احتمالی این ترکیب در این غلظت مشخص شود. تمام پلیت‌ها به مدت ۵ روز در ۳۰ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. در طول مدت انکوباسیون، هر ۲۴ ساعت یک‌بار، با دوربین ۱۶ مگاپیکسل دیجیتال لومیکس (DMC- Model TZ55, Panasonic, UK & Ireland) از پلیت‌ها عکس تهیه شد. درصد رشد قارچ‌ها در مقایسه با پلیت کنترل، با نرم‌افزار شناسایی ImageJ (Ver. 1.45-jdk6, London, UK) مشخص شد تا توان بازدارندگی از رشد اسانس هر یک از قارچ‌ها طبق رابطه (۲) محاسبه گردد:

رابطه (۲)

$$GI\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Statgraph معادلهٔ درجه‌سوم براساس زمان بازداری به‌دست آمد. از نرم‌افزار ChemStation (G1701EA, E.02.01.1177, USA) برای آنالیز طیف جرمی و کروماتوگرام استفاده شد. ترکیبات از طریق مقایسهٔ الگوی طیف جرمی با اطلاعات موجود در بانک Wiley/NBS شناسایی شدند (Javidnia *et al.*, 2002; Asadipour *et al.*, 2004; Golmakani & Rezaei, 2008a).

### فعالیت ضداکسایشی

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط اسانس با استفاده از روش ساده و سریع DPPH انجام و با شاخص  $IC_{50}$  نشان داده شد (Mazidi *et al.*, 2012; Gai *et al.*, 2013). به میزان غلظت اسانسی که موجب ۵۰ درصد فعالیت ضداکسایشی می‌شود،  $IC_{50}$  می‌گویند. با مخلوط کردن DPPH و یک سوبسترای هیدروژن‌دهنده مثل اسانس، این ترکیب رادیکالی به DPPH غیررادیکالی احیاء می‌شود و رنگ آن از بنفش به زرد کم‌رنگ تغییر می‌یابد (Djouahri *et al.*, 2013). طبق روش Brand-Williams و همکاران (۱۹۹۵)، خاصیت ضداکسایشی اسانس مورتلخ در کنار BHT به‌عنوان کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. ابتدا یک آزمون اولیه انجام شد تا میزان اسانسی که باید به محلول DPPH افزوده شود، به‌دست آید. مشخص شد که مقادیر ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۲ مولار افزوده شود. محلول BHT نیز در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محلول DPPH با غلظت ۰/۲ مولار تهیه شد. مخلوط نهایی به شدت هم‌زده شد و سریعاً در یک مکان تاریک به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، میزان جذب محلول در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد فعالیت ضداکسایشی DPPH ( $I/\cdot$ ) طبق رابطه (۱) محاسبه می‌شود:

رابطه (۱)

$$I\% = (A_{control} - A_{sample}) \times 100$$

در رابطه (۱)  $A_{control}$  جذب محلول شاهد DPPH و  $A_{sample}$  جذب محلول‌های حاوی مقادیر مختلف اسانس و BHT بود.

<sup>1</sup> Stock solution

<sup>2</sup> Dimethyl sulfoxide

## نتایج و بحث

### مقایسه سینتیک و بازده استخراج

اثر روش استخراج بر زمان شروع استخراج اسانس و نرخ افزایش دما در جدول (۱) آورده شده است. در هر دو روش، استخراج در دمای جوش آب (۱۰۰ درجه سانتیگراد) شروع شد. نرخ افزایش دما در روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو، ۳۱/۳ درجه سانتیگراد بر دقیقه و تقریباً ۵ برابر سریع‌تر از روش تقطیر آبی با نرخ ۶/۳ درجه سانتیگراد بر دقیقه بود. مدت زمان لازم برای جوش آمدن ۳۷۵ میلی‌لیتر آب و شروع استخراج اسانس در روش تقطیر آبی، ۱۲ دقیقه و در روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو، ۲/۴ دقیقه بود که سرعت بیشتر در روش دوم به دلیل مناسب‌تر بودن انتقال حرارت از طریق مایکروویو است (Golmakani & Rezaei, 2008a). کل زمان استخراج، ۱۵۰ دقیقه با روش تقطیر آبی و ۴۵ دقیقه با روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو است. در روش تقطیر آبی روش‌های انتقال حرارت هدایت و جابجایی وجود دارد اما در روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو انتقال حرارت به ۳ روش تابش، هدایت و جابجایی انجام می‌شود که از این میان، انتقال حرارت به روش تابش، یکنواخت‌ترین و کارآمدترین روش انتقال حرارت است. در نتیجه، تقطیر آبی به کمک مایکروویو موجب افزایش دمای سریع در ساختار سلول‌های گیاهی می‌شود و در ادامه، سلول‌ها متورم می‌شوند، حجم آنها افزایش می‌یابد تا آنجا که دیواره سلولی آسیب می‌بیند و این سبب می‌شود اسانس با سرعت بیشتری از درون سلول‌ها خارج شود.

شکل (۲) سینتیک استخراج اسانس مورتلخ با دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو را مقایسه می‌کند. زمانی که استخراج با روش تقطیر آبی آغاز می‌شود، ۳۱ درصد از اسانس مورتلخ با روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو استخراج شده است؛ بنابراین، مایکروویو می‌تواند به‌طور قابل توجهی موجب صرفه‌جویی در زمان شود. در مدت زمان ۴۵ دقیقه که کل اسانس مورتلخ به روش مایکروویو استخراج شده، در روش تقطیر آبی، ۵۷/۵ درصد از اسانس گیاه استخراج شده است.

در رابطه (۲)  $A$  میزان رشد قارچ در پلیت کنترل و  $B$  میزان رشد قارچ در پلیت حاوی اسانس است.

### تعیین میزان کمترین غلظت بازدارنده رشد<sup>۱</sup> و کمترین غلظت کشنده میکروارگانیسم<sup>۲</sup>

MIC در واقع کمترین غلظت اسانس است که می‌تواند از رشد قارچ جلوگیری کند. در این تحقیق، از روش رقیق‌سازی ۲ برابر اسانس در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی استفاده شد. باتوجه به نتایج آزمون‌های اولیه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت MEB به هر چاهک پلیت افزوده شد و ۸۰ میکرولیتر از اسانس مورتلخ با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک اول افزوده شد. سپس، رقیق‌سازی ۲ برابر انجام شد، به‌غیر از چاهک آخر که فقط حاوی محیط کشت MEB و سوسپانسیون قارچ بود. هدف از این کار اطمینان از رشد قارچ و مشخص شدن رشد اولیه آن بود. در نهایت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ به هر چاهک افزوده شد تا به ترتیب غلظت‌های ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵، ۷۸/۱۲۵ و صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس مورتلخ به دست آید. آموختریسین B به‌عنوان کنترل مثبت انتخاب شد. پلیت‌ها به مدت ۵ روز در ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. از چاهک‌هایی که در آنها اثری از رشد مشاهده نشد (۳ چاهک متوالی)، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و روی محیط MEA کشت داده شد تا نتایج MFC به دست آید. پلیت‌ها در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. MFC، در حقیقت، کمترین غلظت اسانس است که می‌تواند با از بین بردن قارچ‌ها از رشد آنها روی محیط کشت جامد جلوگیری کند.

### آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار انجام شدند و به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد، بیان شدند. از مدل خطی عمومی<sup>۳</sup> نرم‌افزار SAS<sup>۴</sup> (version 9.1, SAS Institute) برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. (Inc., Cary, NC)

<sup>1</sup> Minimum inhibitory concentration (MIC)

<sup>2</sup> Minimum fungicidal concentration (MFC)

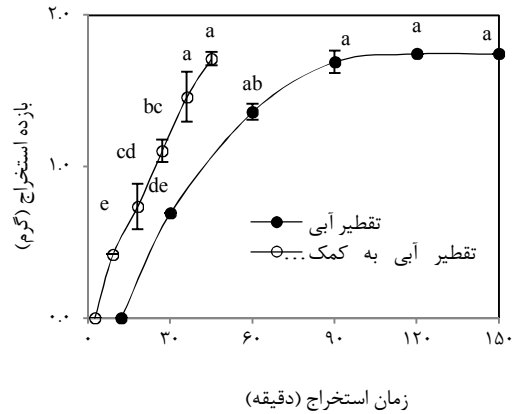
<sup>3</sup> General Linear Model (GLM)

<sup>4</sup> Statistical Analysis System Software

نهایی استخراج اسانس در هر سه روش یکسان بود و هیچ‌یک از روش‌های نوین استخراج تأثیر نامطلوبی بر میزان اسانس استخراج‌شده نداشتند. تنها تفاوت تیمارها از لحاظ مدت زمان استخراج اسانس بود.

#### مصرف انرژی

طبق جدول (۱)، مقدار انرژی لازم برای استخراج به روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، به ترتیب ۱/۲۵ و ۰/۷۵ کیلووات ساعت است که نشان‌دهنده مصرف کمتر انرژی و در نتیجه هزینه کمتر استخراج در روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو است. مقدار انرژی مورد نیاز برای استخراج ۱ گرم اسانس مورتلخ با روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو به ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۴۴ کیلووات ساعت بر گرم اسانس است. در تأیید یافته‌های این مطالعه، Moayyedi و Golmakani (۲۰۱۶)، به سه روش تقطیر آبی، تقطیر آبی به کمک مایکروویو و استخراج با مایکروویو بدون حلال، اسانس پوست لیمو را استخراج کردند و به این نتیجه دست یافتند که مصرف انرژی برای بازده یکسان از اسانس برای روش تقطیر آبی بیش از ۲ برابر دو روش دیگر است. بنابراین، تقطیر آبی به کمک مایکروویو یک روش نوین بسیار کم‌هزینه و سریع برای استخراج اسانس است.



شکل ۲ - سینتیک استخراج اسانس مورتلخ با روش‌های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو. میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ ).

همان‌طور که در جدول (۱) آورده شده است، بازده نهایی استخراج در روش تقطیر آبی، ۱/۷۴ درصد و در روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو، ۱/۷۱ درصد بود که تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میانگین نرخ انباشتگی اسانس به روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو تقریباً ۳ برابر روش تقطیر آبی است (۰/۳۸ در مقابل ۰/۱۲ گرم بر دقیقه). مشابه آنچه ما در این تحقیق دست یافتیم، Seidi Damyeh و همکاران (۲۰۱۵)، اسانس گیاه گونه‌ای از مرزه را به سه روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو و تقطیر آبی به کمک امیک<sup>۱</sup> استخراج کردند. بازده

جدول ۱- شاخص‌های استخراج اسانس مورتلخ با روش‌های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو

روش استخراج		شاخص استخراج
تقطیر آبی به کمک مایکروویو	تقطیر آبی	
۶/۳	۳۱/۳	نرخ افزایش دما (درجه سلسیوس بر دقیقه)
۱۲	۲/۴	زمان آغاز استخراج اسانس (دقیقه)
۱۳۸	۴۲/۶	طول دوره استخراج اسانس (دقیقه)
۱۵۰	۴۵	کل زمان استخراج اسانس (دقیقه)
۱/۷۴ <sup>a</sup>	۱/۷۱ <sup>a</sup>	بازده نهایی (درصد، وزنی/وزنی)
۰/۰۱۲ <sup>a</sup>	۰/۰۳۸ <sup>b</sup>	نرخ میانگین استخراج اسانس (گرم بر دقیقه)
۱/۲۵ <sup>a</sup>	۰/۷۵ <sup>b</sup>	الکتريسيته مصرفی (کیلووات ساعت)
۰/۷۲ <sup>a</sup>	۰/۴۴ <sup>b</sup>	الکتريسيته مصرفی نسبی (کیلووات ساعت بر گرم اسانس)
۱۰۰۰ <sup>a</sup>	۶۰۰ <sup>b</sup>	دی‌اکسیدکربن آزادشده (گرم)
۵۷۳/۷۲ <sup>a</sup>	۳۵۲/۹۲ <sup>b</sup>	دی‌اکسیدکربن آزادشده نسبی (گرم بر گرم اسانس)

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Ohmic-assisted hydrodistillation

۹/۰۳) <sup>۳</sup> سینئول و ۱ و ۸-سینئول (۱۰/۱۱-۱۰/۱۶ درصد)، ۱ و ۸-سینئول (۹/۰۳-۸/۹۹ درصد)، لینالول (۸/۲۹-۸/۳۰ درصد)، ۵-نئوسدرانول (۸/۰۰-۸/۰۵ درصد)، اسپاتولنول (۴/۵۹-۴/۵۶) <sup>۶</sup> آلفا ترپینئول (۴/۶۷-۵/۶۴ درصد)، کارواکرول (۴/۰۹-۴/۱۵) <sup>۸</sup> و تیمول (۴/۰۲-۴/۰۵ درصد) بیشترین ترکیبات اسانس استخراج شده با تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو را تشکیل دادند.

شناسایی کروماتوگرافی گازی/طیفسنجی جرمی ترکیبات شیمیایی اسانس مورتلخ استخراج شده با دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو در جدول (۲) آورده شده است. در کل ۵۸ ترکیب در اسانس مورتلخ تشخیص داده شد. به ترتیب، برای تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، ۹ تا از این ترکیبات ۶۸/۳۲-۶۸/۳۰ درصد از کل ترکیبات شناسایی شده را تشکیل دادند. لینالیل استات <sup>۱</sup> (۱۴/۴۴-۱۴/۴۷ درصد)، آلفا ترپینیل استات <sup>۲</sup>

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس مورتلخ استخراج شده با روش های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	شاخص بازداری	سطح زیر پیک (درصد)	
				تقطیر آبی	تقطیر آبی به کمک مایکروویو
۱	Tricyclene	۵/۲۱۱	۹۱۹	۰/۰۲	۰/۰۳
۲	$\alpha$ -Thujene	۵/۳۷۴	۹۲۶	۰/۱۴	۰/۱۵
۳	$\alpha$ -Pinene	۵/۵۶۲	۹۳۳	۰/۵۷	۰/۶۰
۴	Camphene	۵/۹۵۳	۹۴۸	۰/۰۲	۰/۰۱
۵	Sabinene	۶/۶۰۸	۹۷۲	۰/۳۰	۰/۲۸
۶	$\beta$ -Pinene	۶/۷۱۵	۹۷۷	۰/۹۰	۰/۹۶
۷	6-methyl-5-Hepten-2-one	۶/۹۵۹	۹۸۶	۰/۰۵	۰/۰۴
۸	Myrcene	۷/۰۸۶	۹۹۱	۱/۸۵	۱/۸۱
۹	cis-dehydroxy-Linalool oxide	۷/۶۱۰	۱۰۰۸	۰/۱۷	۰/۱۹
۱۰	$\alpha$ -Terpinene	۷/۹۰۹	۱۰۱۶	۰/۱۱	۰/۱۰
۱۱	p-Cymene	۸/۱۷۹	۱۰۲۴	۰/۴۱	۰/۳۹
۱۲	Limonene	۸/۳۲۶	۱۰۲۸	۰/۷۶	۰/۷۸
۱۳	1,8-Cineole	۸/۴۴۸	۱۰۳۲	۹/۰۳	۸/۹۹
۱۴	(Z)- $\beta$ -Ocimene	۸/۵۹۵	۱۰۳۶	۰/۳۳	۰/۳۱
۱۵	(E)- $\beta$ -Ocimene	۸/۹۶۱	۱۰۴۶	۰/۶۸	۰/۶۵
۱۶	$\gamma$ -Terpinene	۹/۳۵۳	۱۰۵۷	۰/۱۸	۰/۱۹
۱۷	cis-Sabinene hydrate	۹/۶۵۷	۱۰۶۶	۰/۰۷	۰/۰۹
۱۸	trans-Linalool oxide	۹/۸۵۶	۱۰۷۲	۰/۸۶	۰/۸۸
۱۹	Terpinolene	۱۰/۴۴۵	۱۰۸۹	۰/۷۷	۰/۷۸
۲۰	Linalool	۱۰/۸۴۷	۱۱۰۰	۸/۳۰	۸/۲۹
۲۱	Hotrienol	۱۰/۰۷۰	۱۱۰۵	۰/۵۱	۰/۴۶
۲۲	trans-Pinocarveol	۱۲/۴۰۲	۱۱۳۸	۰/۲۰	۰/۲۳
۲۳	Nerol oxide	۱۳/۰۳۷	۱۱۵۴	۰/۳۸	۰/۳۲
۲۴	$\delta$ -Terpineol	۱۳/۵۵۰	۱۱۶۷	۰/۸۰	۰/۷۸
۲۵	Terpinene-4-ol	۱۳/۹۷۲	۱۱۷۷	۰/۳۳	۰/۳۸

<sup>۳</sup> 1,8-Cineole

<sup>۴</sup> Linalool

<sup>۵</sup> 5-neo-Cedranol

<sup>۶</sup> Spathulenol

<sup>۷</sup>  $\alpha$ -Terpineol

<sup>۸</sup> Carvacrol

<sup>۹</sup> Thymol

<sup>۱</sup> Linalyl acetate

<sup>۲</sup>  $\alpha$ -Terpinyl acetate

ادامه جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس مورتلخ استخراج شده با روش‌های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	شاخص بازداری	سطح زیر پیک (درصد)	
				تقطیر آبی	تقطیر آبی به کمک مایکروویو
۲۶	p-Cymen-8-ol	۱۴/۳۲۲	۱۱۸۶	۰/۲۸	۰/۳۰
۲۷	$\alpha$ -Terpineol	۱۴/۵۸۲	۱۱۹۲	۴/۵۶	۴/۵۹
۲۸	Myrtenol	۱۴/۷۸۵	۱۱۹۷	۰/۲۱	۰/۱۸
۲۹	trans-Carveol	۱۵/۷۱۰	۱۲۱۹	۰/۱۸	۰/۲۱
۳۰	Nerol	۱۶/۱۱۱	۱۲۱۹	۰/۶۰	۰/۵۸
۳۱	Linalyl acetate	۱۷/۴۰۲	۱۲۵۹	۱۴/۴۴	۱۴/۴۷
۳۲	n-Decanol	۱۷/۹۵۶	۱۲۷۲	۰/۴۶	۰/۴۵
۳۳	Thymol	۱۸/۶۱۱	۱۲۸۸	۴/۰۲	۴/۰۵
۳۴	Carvacrol	۱۸/۸۸۱	۱۲۹۴	۴/۱۵	۴/۰۹
۳۵	$\delta$ -Elemene	۲۰/۶۶۹	۱۳۳۷	۰/۳۱	۰/۳۲
۳۶	$\alpha$ -Terpinyl acetate	۲۱/۲۹۵	۱۳۵۲	۱۰/۱۱	۱۰/۱۶
۳۷	Neryl acetate	۲۱/۸۶۴	۱۳۶۶	۰/۸۴	۰/۸۷
۳۸	Geranyl acetate	۲۲/۶۷۷	۱۳۸۵	۱/۵۸	۱/۶۴
۳۹	$\beta$ -Elemene	۲۲/۹۶۶	۱۳۹۲	۰/۵۶	۰/۵۶
۴۰	$\alpha$ -Gurjunene	۲۳/۶۶۸	۱۴۰۹	۰/۴۷	۰/۴۸
۴۱	(E)-Caryophyllene	۲۴/۰۷۴	۱۴۱۹	۰/۴۸	۰/۴۷
۴۲	$\alpha$ -Guaiene	۲۴/۹۳۳	۱۴۴۱	۰/۹۷	۰/۹۸
۴۳	allo-Aromadendrene	۲۵/۶۹۰	۱۴۵۹	۰/۲۹	۰/۲۸
۴۴	$\gamma$ -Muurolene	۲۶/۳۷۱	۱۴۷۶	۰/۳۰	۰/۲۸
۴۵	Germacrene D	۲۶/۵۴۹	۱۴۸۱	۰/۲۵	۰/۲۹
۴۶	$\beta$ -Selinene	۲۶/۷۴۷	۱۴۸۵	۰/۴۶	۰/۴۷
۴۷	$\alpha$ -Selinene	۲۷/۱۲۳	۱۴۹۵	۰/۳۷	۰/۳۵
۴۸	Bicyclogermacrene	۲۷/۱۷۹	۱۴۹۶	۱/۴۶	۱/۵۰
۴۹	$\alpha$ -Muurolene	۲۷/۳۳۲	۱۵۰۰	۰/۴۲	۰/۴۰
۵۰	$\gamma$ -Cadinene	۲۷/۸۷۰	۱۵۱۴	۰/۷۲	۰/۷۱
۵۱	$\delta$ -Cadinene	۲۸/۲۸۲	۱۵۲۵	۲/۶۹	۲/۶۷
۵۲	Germacrene D-4-ol	۳۰/۲۹۹	۱۵۷۷	۱/۴۱	۱/۳۹
۵۳	Spathulenol	۳۰/۳۵۰	۱۵۷۸	۵/۶۴	۵/۶۷
۵۴	Viridiflorol	۳۰/۸۵۳	۱۵۹۱	۰/۲۶	۰/۲۵
۵۵	epi- $\alpha$ -Cadinol	۳۲/۷۳۹	۱۶۴۲	۱/۸۵	۱/۷۹
۵۶	$\beta$ -Eudesmol	۳۳/۰۴۳	۱۶۵۰	۱/۸۰	۱/۷۹
۵۷	$\alpha$ -Cadinol	۳۳/۲۲۶	۱۶۵۵	۲/۰۹	۲/۰۵
۵۸	5-neo-Cedranol	۳۴/۴۶۱	۱۶۸۹	۸/۰۵	۸/۰۰
۵۹	Monoterpene hydrocarbons			۱۶/۰۷	۱۶/۰۴
۶۰	Sesquiterpene hydrocarbons			۹/۷۵	۹/۷۷
۶۱	Oxygenated terpenes			۷۴/۱۸	۷۴/۱۹

نئوسدرانول (۱۷/۴۳ درصد) و آلفا ترپینیل استات (۱۰/۸۱ درصد) تشکیل می‌دهد. در تأیید این نتایج، اسانس مورتلخ منطقه کرمان بررسی و مشخص شد که بیشترین ترکیبات اسانس را لینالیل استات (۱۱/۸)

در تحقیقی که Rafat Haghghi و همکاران (۲۰۱۲) بر مورتلخ انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که بیشترین ترکیبات اسانس مورتلخ ناحیه لارستان را به ترتیب لینالیل استات (۱۸/۶۴ درصد)، ۵-



اسانس پوست لیمو را به سه روش تقطیر آبی، تقطیر آبی به کمک مایکروویو و استخراج با مایکروویو بدون حلال استخراج کردند و دریافتند که اسانس استخراج شده با تقطیر آبی به کمک مایکروویو شاخص  $L^*$  بیشتری نسبت به تقطیر آبی دارد ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند اما اسانس استخراج شده با مایکروویو بدون حلال از اسانس استخراج شده به روش تقطیر آبی روشن تر بود.

جدول ۳- شاخص‌های فیزیکی اسانس مورتلخ استخراج شده با روش‌های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو

روش استخراج		شاخص فیزیکی
تقطیر آبی	تقطیر آبی به کمک مایکروویو	
۰/۰۱۴۱±۰/۹۵	۰/۰۱۴۱±۰/۹۳	وزن مخصوص
۰/۰۰۴۹±۱/۴۸	۰/۰۰۲۱±۱/۴۸	ضریب شکست
۱/۰۰±۴۶/۰۰	۱/۱۵±۴۸/۳۳	$L^*$
۰/۵۸±۰/۳۳	۰/۵۸±۰/۳۳	$a^*$
۰/۵۸±۵۱/۶۷	۰/۵۸±۵۱/۳۳	$b^*$
زرد	زرد	رنگ ظاهر

### فعالیت ضد اکسایشی

فعالیت ضد اکسایشی اسانس‌های استخراج شده به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو اندازه‌گیری شد. کمترین  $IC_{50}$  بیانگر بالاتر بودن فعالیت ضد اکسایشی است.  $IC_{50}$  اسانس‌های استخراج شده به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو به ترتیب ۳/۴۱ و ۳/۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. خاصیت ضد اکسایشی قوی اسانس مورتلخ مربوط به ترکیبات فنولی اسانس است. نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد که بین دو روش استخراج، اختلاف آماری معنی داری برای خاصیت ضد اکسایشی وجود ندارد.

در تحقیقی دیگر، اسانس گیاه گونه‌ای از مرزه به سه روش تقطیر آبی ساده، تقطیر آبی به کمک مایکروویو و تقطیر آبی به کمک همیک، استخراج و فعالیت ضد اکسایشی آنها مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که اسانس استخراج شده به کمک همیک فعالیت ضد اکسایشی بالاتری نسبت به دو روش دیگر دارد ولی اختلاف معنی داری ندارند و نتایج دو روش

درصد، لینالول (۱۱/۸ درصد)، آلفا ترپینیل استات (۱۱ درصد)، ۱ و ۸-سینئول (۸/۷ درصد) و آلفا ترپینئول (۶/۳ درصد) تشکیل می‌دهد (Asadipour *et al.*, 2004). همان‌طور که در جدول (۲) آمده است، اسانس مورتلخ استخراج شده با تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، مقادیر بالایی از ترکیبات اکسیژن-دار (۷۴/۱۹-۷۴/۱۸ درصد) دارد و مقدار مونوتیرین هیدروکربن‌ها<sup>۱</sup> (۱۶/۰۴-۱۶/۰۷ درصد) و سسکوئیرین‌ها<sup>۲</sup> (۹/۷۷-۹/۷۵ درصد) کم است.

ترکیبات اسانس هر دو روش مشابه بودند و امواج مایکروویو اثر نامطلوبی بر ویژگی‌های کمی و کیفی ترکیبات اسانس نداشت. مشابه نتایج این تحقیق، اسانس آویشن‌باغی و آویشن‌شیرازی به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو استخراج شد و مشخص شد که ترکیبات اسانس استخراج شده با هر دو روش تفاوت قابل توجهی نداشتند (Golmakani & Rezaei, 2008a,b).

### خصوصیات فیزیکی

وزن مخصوص، ضریب شکست، رنگ و ویژگی‌های ظاهری اسانس‌های استخراج شده با دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو در جدول (۳) آورده شده است. تفاوت معنی داری بین خصوصیات فیزیکی نبود که به دلیل یکسان بودن ترکیبات اسانس استخراج شده است. در تأیید یافته‌های این بررسی، اسانس گیاه گونه‌ای از مرزه به سه روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو و تقطیر آبی به کمک همیک استخراج و مشاهده شد که در هر سه روش، وزن مخصوص و ضریب شکست اسانس استخراج شده یکسان بود (Seidi Damyeh *et al.*, 2015a).

اسانس استخراج شده با روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو شاخص  $L^*$  بیشتری نسبت به اسانس استخراج شده با تقطیر آبی داشت اما تفاوت آماری معنی داری نداشت. فاکتورهای  $a^*$  و  $b^*$  اسانس‌های به دست آمده از دو روش استخراج یکسان بودند. در تأیید این نتایج، Golmakani و Moayyedi (۲۰۱۵)،

<sup>1</sup> Monoterpene hydrocarbons

<sup>2</sup> Sesquiterpene hydrocarbons

مبنی بر خاصیت بازدارندگی اسانس‌ها بودند. باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌ترین بودند. بر دو قارچ بیساکلامیس اسپکتابیلیس و پیسیلومایسز واریوتی<sup>۸</sup> گزارش شده است و همگی اثر بازدارندگی اندکی داشته‌اند. بنابراین، به کمک اسانس می‌توان تا حد زیادی این دو قارچ را کنترل و از رشد و تولید سم آنها جلوگیری کرد. در مطالعه‌ای، فعالیت ضدقارچی اسانس میخک علیه بیساکلامیس اسپکتابیلیس و پیسیلومایسز واریوتی (عوامل فساد پسته) بررسی شد. غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت مؤثر گزارش شد ( Yazdanpanah & Mohamadi, 2014).

باتوجه به نتایجی که در جدول (۴) آورده شده است، تریکودرما هاریزانوم مقاوم‌ترین قارچ نسبت به اسانس مورتلخ است. مقادیر MIC و MFC اسانس مورتلخ برای قارچ بیساکلامیس اسپکتابیلیس، ۷۸/۱ و ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای اسانس استخراج‌شده با روش‌های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو است. آسپرژیلوس اوریزا<sup>۴</sup> هم به این اسانس حساس است و هر دو مقدار MIC و MFC برای اسانس استخراج‌شده با روش‌های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو، ۳۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. بهادری و همکاران (۲۰۱۶)، برای قارچ آسپرژیلوس نایجر عدد ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را گزارش کردند که نشان می‌دهد اسانس این گونه نسبت به گونه مورد بررسی ما اثر بازدارندگی بیشتری داشته است.

تقطیر آبی ساده و تقطیر آبی به کمک مایکروویو یکسان بود (Seidi Damyeh et al., 2015b). در گزارشی دیگر، اسانس زیره سیاه<sup>۱</sup> به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو استخراج شد. فعالیت ضداکسایشی اسانس‌های استخراج‌شده با دو روش تفاوتی نداشتند و مایکروویو اثر قابل توجهی بر ترکیبات اسانس نداشته است (Mazidi et al., 2012).

### فعالیت ضدقارچی

قارچ‌ها در بسیاری از مواد غذایی به واسطه رشد و تولید توکسین‌ها موجب فساد می‌شوند. انتخاب ترکیباتی طبیعی مثل اسانس‌ها برای بازدارندگی رشد و یا از بین بردن آنها راهی مفید برای حفظ سلامت مواد غذایی و در نتیجه مصرف‌کننده است. فعالیت ضدقارچی اسانس مورتلخ استخراج‌شده به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو در برابر ۶ گونه قارچ در جدول (۴) آورده شده است. تریکودرما هاریزانوم<sup>۲</sup> کاملاً به اسانس مورتلخ مقاوم بود و بیساکلامیس اسپکتابیلیس<sup>۳</sup> و آسپرژیلوس اوریزا<sup>۴</sup> بسیار حساس بودند و این خاصیت ضدقارچی قوی را می‌توان به مقدار بالای ترکیبات اکسیژن‌دار مثل لینالیل آلفا استات، ترپینیل استات و لینالول نسبت داد. تفاوت اثر اسانس بر قارچ‌های مختلف وابسته به ساختار دیواره سلولی و ترکیبات سازنده آن و در نتیجه میزان نفوذ اسانس و تأثیر آن بر دیواره سلولی و اندامک‌های درون سلولی می‌باشد. تقطیر آبی به کمک مایکروویو به‌عنوان یک روش سریع، اثر نامطلوبی بر ترکیبات مؤثره بر فعالیت ضدقارچی ندارد. Bahadori و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت ضد میکروبی سالویا سانتولینیفولیا<sup>۵</sup> بر دو باکتری گرم مثبت، دو باکتری گرم منفی و دو قارچ (مخمر کاندیدا<sup>۶</sup> و قارچ آسپرژیلوس نایجر<sup>۷</sup>) بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های گرم مثبت حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی و قارچ‌ها گزارش‌های اندکی

<sup>1</sup> Black zira (*Bunium persicum* Boiss.)

<sup>2</sup> *Trichoderma harzianum*

<sup>3</sup> *Byssoschlamys spectabilis*

<sup>4</sup> *Aspergillus oryzae*

<sup>5</sup> *S. santolinifolia*

<sup>6</sup> *Candida*

<sup>7</sup> *Aspergillus niger*

<sup>8</sup> *Paecilomyces variotii*

جدول ۴- فعالیت ضدقارچی اسانس مورتلخ استخراج شده با روش های تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو

B آمفوتریسین		تقطیر آبی به کمک مایکروویو			تقطیر آبی			گونه قارچ
GI	MIC	GI	MFC	MIC	GI***	MFC**	MIC*	
۱۰۰	>۵۰۰	۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	تریکودرما هاریزانوم
۱۰۰	<۰/۰۷۸	۹۸/۰۰	۱۵۶/۲۵	۷۸/۱	۹۸/۹۶	۱۵۶/۲۵	۷۸/۱	بیساکلامیس اسپکتا بلیس
۱۰۰	<۰/۰۷۸	۷۲/۹۱	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۷۶/۵۹	۱۲۵۰	۱۲۵۰	پیسیلومایسز واریوتی
۱۰۰	<۰/۰۷۸	۵۳/۹۴	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۵۷/۵۹	۱۲۵۰	۱۲۵۰	پنیسیلیوم کراپروژنوم
۱۰۰	<۰/۰۷۸	۹۴/۷۹	۳۱۲/۵	۳۱۲/۵	۹۶/۸۰	۳۱۲/۵	۳۱۲/۵	آسپریلوس اوریزا
۱۰۰	<۰/۰۷۸	۷۰/۲۲	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۷۴/۱۲	۱۲۵۰	۱۲۵۰	آسپریلوس نایجر

\* کمترین غلظت بازدارنده از رشد (میلی گرم بر میلی لیتر)

\*\* کمترین غلظت کشنده میکروارگانیسم (میلی گرم بر میلی لیتر)

\*\*\* بازدارندگی رشد در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (درصد)

### نتیجه گیری

اسانس آن با روش تقطیر آبی یکسان است. به همین ترتیب، خاصیت ضدکسایشی و ضدقارچی اسانس استخراج شده با هر دو روش مشابه بود. استخراج به روش تقطیر آبی به کمک مایکروویو اثر نامطلوبی بر کیفیت ترکیبات مؤثره ندارد و همچنین، یک روش سریع تر و کم هزینه تر برای استخراج اسانس است.

اسانس مورتلخ به دو روش تقطیر آبی و تقطیر آبی به کمک مایکروویو استخراج شد. اثر امواج مایکروویو بر سینتیک استخراج، ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضدکسایشی و ضدقارچی اسانس های استخراج شده بررسی شد. تقطیر آبی به کمک مایکروویو به زمان کوتاه تری احتیاج دارد و درعین حال، بازده استخراج

### منابع

- ۱- جعفرپور، د. ۱۳۹۰. جداسازی و شناسایی لاکتیک اسید باکتری های دارای خاصیت ضدقارچی از منابع طبیعی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شیراز.
- 2- AACC. 1983. Approved methods of the american association of cereal chemists, 8<sup>th</sup> ed. Library of Congress. Salem, M.A.
- 3- Asadipour, A., Mehrabani, M., Moghaddasian, M., Ramazani, M., Amanzadeh, Y., & Saber-Amoli S. 2004. Composition of the volatile oil of *salvia mirzayanii* rech. & esfand from iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 7(2):182-185.
- 4- Bahadori, M.B., Valizadeh, H., & Moridi Farimani, M. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *salvia santolinifolia* boiss. from southeast of iran. Pharmaceutical Sciences, 22(1): 42-48.
- 5- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology, 28(1): 25-30.
- 6- Djouahri, A., Boudarene, L., & Youcef-Meklati, B. 2013. Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of algerian *tetraclinis articulata* (vahl) masters. Industrial Crops and Products, 44:32-36.
- 7- FCC. 1996. Food Chemical Codex. 4th ed., pp. 413. National Academic Press, Washington DC.
- 8- Gai, Q.Y., Jiao, J., Wei, F.Y., Luo, M., Wang, W., Zu, Y.G., & Fu, Y.J. 2013. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil from *Forsythia suspense* seed and its physicochemical property and antioxidant activity. Industrial Crops and Products, 51:274-278.

- 9- Golmakani, M.T., & Moayyedi, M. 2016. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and solvent-less microwave extraction of essential oil from dry and fresh *citrus limon* (eureka variety) peel. *Journal of Essential Oil Research*, 28(4):272-282.
- 10-Golmakani, M.T., & Moayyedi, M. 2015. Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from *citrus limon* (lisbon variety) peel. *Food Science and Nutrition*, 3(6):506-518.
- 11-Golmakani, M.T. & Rezaei, K. 2008a. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4):925-930.
- 12-Golmakani, M.T., & Rezaei, K. 2008b. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *zataria multiflora* boiss. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5): 448-454.
- 13-Javidnia, K., Miri, R., Assadollahi, M., Gholami, M., & Ghaderi, M. 2009. Screening of selected plants growing in Iran for antimicrobial activity. *Iranian Journal of Science and Technology*, 33(4):329-333.
- 14-Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., & Nasiri, A. 2002. Composition of the essential oil of *salvia mirzayanii* rech. f. & esfand from iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(6):465-467.
- 15-Khajeh, M., & Ghanbari, A. 2011. Application of factorial design and Box-Behnken matrix in the optimization of a microwave-assisted extraction of essential oils from *Salvia mirzayanii*. *Natural Product Research*, 25(8): 1766-1770.
- 16-Kim, W.K., Chae, H.J., & Kim, J.H. 2010. Microwave-assisted extraction of homoharringtonine from *Cephalotaxus koreana*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(3):481-487.
- 17-Mazidi, S., Rezaei, K., Golmakani, M.T., Sharifan, A., & Rezazadeh, Sh. 2012. Antioxidant activity of essential oil from Black zira (*Bunium persicum* Boiss.) obtained by microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(5):1013-1022.
- 18-Moein, M.R., Moein, S., & Ahmadizadeh, S. 2008. Radical scavenging and reducing power of *Salvia mirzayanii* subfractions. *Molecules*, 13(11):2804-2813.
- 19-Rafat Haghighi, A., Borjian, A., Rezaeian, A., & Shirzadi, M.H. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of *salvia mirzayanii* and *haplophyllum canaliculatum* medical plants on *shigella dysenteriae*. *Journal of Microbes Word*, 14:73-80.
- 20-Sadeghi, F., & Alizadeh A. 2013. Phytochemical composition of the essential oil, total phenolic content and antioxidant activity in *salvia mirzayanii* rech. & esfand. grown wild and cultivated in iran. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 6:977-982.
- 21-Seidi Damyeh, M., Niakousari, M., Golmakani, M.T., & Saharkhiz, M.J. 2015a. Microwave and ohmic heating impact on the *In Situ* hydrodistillation and selective extraction of *Satureja macrosiphonia* essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4):647-656.
- 22-Seidi Damyeh, M., Niakousari, M., Saharkhiz, M.J., & Golmakani, M.T. 2015b. Evaluating the effect of essential oil extraction method from *Satureja macrosiphonia* on its biological activities: ohmic- and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4):697-706.
- 23-Strober, W. 2001. Monitoring cell growth. In Coligan J.E., Bierer B.E., Margulies D.H., Sherach E.M. & Strober W. *Current Protocols in Immunology*. 5. USA: John Wiley&Sons. A.2A.1.
- 24-Yam, K.L., & Papadakis, S.E. 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61(1):137-142.
- 25-Yamini, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M., & Javidnia, K. 2008. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 108(1): 341-346.

- 26-Yang, V.W., & Clausen, C.A. 2007. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(4):302-306.
- 27-Yazdanpanah, L., & Mohamadi, N. 2014. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Paecilomyces variotii* agent of pistachio dieback. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 4(6):42-45.
- 28-Zarshenas, M.M., & Krenn, L. 2015. Phytochemical and pharmacological aspects of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & Esfand. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20(1): 65-72.

## Investigating the Effect of Microwaves on Chemical Composition and Antioxidant and Antifungal Activities of *Salvia mirzayanii* Essential Oil

Nastaran Khajehie<sup>1</sup>, Mohammad-Taghi Golmakani<sup>2\*</sup>, Marzieh Eblaghi<sup>3</sup>,  
Mohammad Hadi Eskandari<sup>4</sup>

- 1- PhD student of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
- 2- Associate Professor of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
- \* Corresponding author (golmakani@shirazu.ac.ir)
- 3- MSc, Graduate Student of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
- 4- Associate Professor of Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Iran

### Abstract

The aim of this study was extracting *Salvia mirzayanii* essential oil (EO) with microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and hydrodistillation (HD) methods, comparison of extraction yield and kinetic parameters, chemical composition, physicochemical properties, and antioxidant and antifungal activities of extracted EOs. The final EOs yields obtained using HD after 150 min and MAHD after 45 min were 1.74% and 1.71%, respectively. Although there was no significant difference between the final EO yields extracted with HD and MAHD, but MAHD was performed in shorter time. IC<sub>50</sub> values for MAHD and HD EOs were 3.70 and 3.41 mg/mL, respectively. Chemical composition of HD and MAHD EOs were similar. Antifungal activity against 6 fungi species (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma harzianum*, *Byssoschlamys spectabilis*, *Paecilomyces variotii* and *Penicillium chrysogenum*) was different and the MIC values were variable between 78.1-2500 mg/mL. *T. harzianum* was the most resistant fungi and *B. spectabilis* was the most susceptible fungi against EO. Therefore, MAHD did not have any adverse effects on quantitative and qualitative characteristics of EO composition and antioxidant and antifungal activities of *S. mirzayanii* EOs.

**Keywords:** Antifungal activity, Antioxidant activity, Essential oil extraction, Microwave, *Salvia mirzayanii*