مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، فروردین ۱۳۹۸، ۱۶-۳

مطالعه فعالیت ضد میکروبی و ضد آنزیمی (پلی‌فنل‌اکسیداز سیب‌زمینی) هیدروسل استخراجی گیاه دارچین (*Cinnamomum verum*): یک مطالعه آزمایشگاهی

زهره دیدار[۱]

دریافت مقاله: ۹۷/۷/۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۷/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۸/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۰/۴

چکیده

زمینه و هدف: دارچین حاوی انواع ترکیبات بیواکتیو فنولی و غیر فنولی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، تعیین خواص ضد میکروبی و ضد آنزیمی هیدروسل دارچین *(Cinnamomum verum)* است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ترکیب شیمیایی هیدروسل دارچین توسط روش کروماتوگرافی گازی-جذب-سنجی جرمی تعیین شد. خصوصیات ضد باکتریایی (در برابر *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*) و ضد کپکی (در برابر *آسپرژیلوس نایجر*، *رایزوپوس اوریزا*) غلظت‌های مختلف هیدروسل دارچین (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد) تعیین گردید. بررسی خاصیت ضد آنزیمی هیدروسل دارچین در برابر آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز سیب‌زمینی نیز انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار طراحی گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون مقایسات چندگانه Duncan تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که باسیل سرئوس حساسیت زیادی به هیدروسل دارچین دارد (میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد برابر با ۰/۲۱±۳۷/۸۳ میلی‌متر بود). در بررسی خاصیت ضدکپکی نیز *آسپرژیلوس نایجر* مقاوم به این نوع هیدروسل و *رایزوپوس اوریزا* حساس بود (میانگین و انحراف معیار درصد ممانعت از رشد به ترتیب ۲/۲±۹ و ۲/۵±۶۸/۶۶ درصد در غلظت ۵۰ درصد وزنی/حجمی هیدروسل). هیدروسل دارچین سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز گردید ($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که هیدروسل استخراجی از دارچین دارای اثر ضد باکتریایی و ضدکپکی و هم‌چنین دارای اثر ضد آنزیمی در برابر آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز سیب‌زمینی است. بنابراین هیدروسل استخراجی دارچین می‌تواند به عنوان یک ماده ضد باکتری (در برابر *باسیلوس سرئوس*)، ضدکپک (در برابر *رایزوپوس اوریزا*) و ضد آنزیم (پلی‌فنل‌اکسیداز) کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: هیدروسل، دارچین، اثر ضدمیکروبی، پلی‌فنل‌اکسیداز

[۱]- (نویسنده مسئول) **استادیار گروه آموزشی صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران**
تلفن: ۴۲۶۱۲۸۸۱-۰۵۱، دورنگار: ۴۲۶۱۵۴۷۲-۰۵۱، پست الکترونیکی: z_didar57@yahoo.com

مقدمه

هیدروسل محصول فرعی استخراج اسانس‌های روغنی از گیاهان معطر است. هیدروسل‌ها حاوی کمتر از یک گرم در لیتر اسانس روغنی هستند و ترکیباتی محلول در آب هستند [۱]. هیدروسل‌ها هم‌چنین در شرایط مناسب نگه‌داری بیش از یک سال ماندگاری دارند [۲]. تحقیقات مختلف اثرات ضدمیکروبی و ضدکپکی هیدروسل‌ها را نشان داده است از جمله اثر ضد باکتریایی هیدروسل بهار نارنج در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژنوزا*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا انتریکا*، *باسیلوس سرئوس*، *کاندیدا آلبیکانس*، *آسپرژیلوس براسیلینس* بررسی گردیده و مشخص شده است اثر بازدارندگی بر این میکروارگانیسم‌ها داشته است [۱]. هیدروسل استخراجی گیاه *Nepeta nepetella* اثر ضدمیکروبی قوی در برابر *کلبسیلا پنومونی*، *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلییس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داده است [۴-۳]. هم‌چنین گزارشاتی در خصوص اثرات ضدکپکی و ضدویروسی هیدروسل‌های گیاهی ارائه شده‌اند [۶-۵].

دارچین (*Cinnamomum verum*)، قطعات خشک شده پوست درختانی از جنس *Cinnamomum* از تیره برگ بو است که در غذاها به عنوان ادویه و در داروها استفاده می‌شود. دارچین حاوی ترکیباتی شامل *cinnamaldehyde* و نیز *gamma- eugenol camphene, terpiene* و *4-terpiene* و نیز انواع ترکیبات فنولی و غیر فنولی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند، می‌باشد. این ترکیبات به عنوان عوامل احیاءکننده و بی اثرکننده رادیکال‌های پراکسید و کیلات کننده فلزات عمل می‌کنند و از واکنش‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند [۷]. دارچین دارای خواص درمانی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌دیابت، ضدویروس و ضداسپاسم است [۹-۸].

از طرفی *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان دومین و یا گاهی سومین علت مهم بیماری‌های منتقله از راه غذا محسوب می‌شود [۱۰]. از جمله ویژگی‌های بارز این گونه باکتریایی، تولید انتروتوکسین مقاوم به حرارت است [۱۲-۱۱]. *باسیلوس سرئوس*، عامل بسیاری از بیماری‌های مرتبط با غذا است [۱۳]. این باکتری علاوه بر بیماری‌زا بودن با داشتن فعالیت پروتئولیتیک، آمیلولیتیک و لیپولیتیک یکی از عوامل مهم فساد مواد غذایی نیز به شمار می‌رود [۱۴].

مطالعات مختلفی اثرات ضدمیکروبی و ضدکپکی اسانس و عصاره دارچین را گزارش نموده‌اند، از جمله Julianti و همکاران اثر عصاره اتانولی دارچین بر روی *پروپینوباکتریوم آکنس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* را بررسی نموده‌اند. مطابق این تحقیق عصاره اتانولی دارچین اثر ضد باکتریایی بر روی گونه‌های مورد مطالعه داشته است [۱۵].

هم‌چنین، Goel و همکاران اثرات ضدکپکی اسانس دارچین بر روی گونه‌های کپکی *آلبیکانس* بررسی نموده و اثرات ضدکپکی اسانس دارچین را در برابر بسیاری از گونه‌های *آلبیکانس* گزارش نموده‌اند [۱۶].

قهوه‌ای شدن آنزیمی ناشی از فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در بافت میوه‌ها و سبزی‌جات می‌تواند باعث تغییرات کیفی نامطلوب در آن‌ها شود. از این رو، توجه به غیر فعال‌سازی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، به جهت به حداقل رساندن احتمال از بین رفتن کیفیت محصولات، ضروری بوده و اهمیت زیادی در نگه‌داری میوه‌ها و سبزی‌جات دارد.

پژوهش‌های انجام شده حاکی از آن است که خصوصیات آنتی اکسیدانی اسانس‌ها باعث کاهش قهوه‌ای شدن آنزیمی و توسعه زمان ماندگاری میوه‌ها و سبزیجات همراه با حفظ کیفیت آن‌ها می‌شوند [۱۷]. احتمال مهار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و در نتیجه افزایش ماندگاری میوه‌ها و سبزیجات، توسط گیاه دارچین وجود دارد که علت آن وجود انواع مختلف ترکیبات بیواکتیو در این گیاه است.

تاکنون بررسی در خصوص اثرات ضد میکروبی و ضد آنزیمی هیدروسل استخراجی از گیاه دارچین صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق تعیین ترکیب شیمیایی هیدروسل دارچین و بررسی خواص ضد باکتریایی در برابر باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس و نیز ضد کپکی در برابر آسپرژیلوس نایجر و رایزوپوس اوریزا هیدروسل استخراجی گیاه دارچین است. اثرات ضد آنزیمی در برابر آنزیم پلی‌فنل اکسیداز سیب‌زمینی نیز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه صنایع غذایی و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور انجام شد.

دارچین (*Cinnamomum verum*) از بازار محلی تهیه شد و پس از تأیید در بخش زیست شناسی سیستماتیک دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور مورد استفاده قرار گرفت. کد هرباریومی دارچین مورد استفاده ۰۲۴۴۹۳۴۲ است. استخراج هیدروسل بدین صورت انجام شد: ۱۰۰ گرم از دارچین آسیاب شده در فلاکس ۲ لیتری دارای ۱ لیتر آب (۱:۱۰ وزنی/ حجمی) برای مدت ۲ ساعت توسط کلونجر حرارت داده شده و عمل تقطیر با بخار انجام شد. پس از خاتمه، اسانس روغنی جداسازی گردید و هیدروسل حاصله در بطری استریل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده قرار داده شد [۱۸]. به منظور استریلیزاسیون هیدروسل از فیلتر غشایی با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر استفاده گردید، سپس هیدروسل به عنوان غلظت ۱۰ درصد در نظر گرفته شد [۱۹]. جهت اندازه‌گیری میزان pH هیدروسل دارچین از pH متر مدل METROHM (ساخت سوئیس) استفاده گردید [۲].

به منظور تعیین ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده هیدروسل دارچین از دستگاه کروماتوگرافی گازی- جذب سنجی جرمی مدل Agilent Technologies 7890A همراه با جذب سنجی 5975CVLMSD و انژکتور مدل 7683B (ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. خصوصیات ستون مورد استفاده شامل HP-5 با قطر ۳۲۰ میکرومتر و ۳۰ متر طول و ضخامت برابر با ۰/۲۵ میکرومتر بود. گاز هلیوم به عنوان حامل و سرعت ۳/۳۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. دمای انژکتور برابر با ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود [۲].

جهت آماده‌سازی سویه‌های میکروبی مورد مطالعه، ابتدا سویه‌های میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس(PTCC 1431)*، *باسیلوس سرئوس (PTCC 1665)* ، *رایزوپوس اوریزا (PTCC 5174)*، *آسپرژیلوس نایجر (PTCC 5012)* به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. ویال حاوی باکتری *باسیلوس سرئوس* (*PTCC 1665*) در شرایط استریل، شکسته شده و به محیط برین هارت براث (BHI) منتقل گردید و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه‌سانتی‌گراد، گرم‌خانه‌گذاری شد [۲۰]. سلول‌های میکروبی توسط سانتریفیوژ مدل ALC4232

(ساخت انگلستان) با دور ۴۰۰۰rpm جدا شدند. سپس توسط روش مک فارلند (McFarland) جمعیت باکتریایی تعیین شد (میزان OD در طول موج ۶۲۵ نانومتر برابر با ۰/۰۸-۰/۱۳ بود که معادل با محلول نیم مک فارلند (McFarland) و جمعیت تقریبی ۱/۵×۱۰^۸ بود) [۲۱]. سپس با رقیق‌سازی به نسبت ۰/۰۱ توسط سرم فیزیولوژی، کدورت۱/۵ ×۱۰^۶باکتری در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد [۲۲]. در مورد استافیلوکوکوس اورئوس(PTCC 1431) مراحل مشابه بود با این تفاوت که از محیط نوترینت براث (Nutrient broth) استفاده گردید [۲۳].

گونه‌های قارچی در محیط ژلوز سیب‌زمینی، به صورت شیب دار در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ روز کشت اولیه شدند. کونیدیاها پس از برداشت از محیط کشت، در آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۱ درصد توین ۸۰ قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط گردیدند و ۵ دقیقه اجازه داده شد تا قطعات سنگین ته‌نشین شوند. اسپورهای موجود در سوسپانسیون حاصل با ۳ بار تکرار توسط لام هموسیتومتر شمارش شد و در غلظت ۱۰^۶ کونیدیا در میلی‌لیتر استاندارد گردید [۲۴].

بررسی خواص ضد باکتری با استفاده از روش انتشار دیسک کاغذی استفاده شد. در این روش از کشت ۲۴ ساعته در محیط کشت بلاد آگار برای باسیلوس سرئوس و برای استافیلوکوکوس اورئوس از محیط کشت بردپارکر آگار استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی معادل با جمعیت ۱/۵× ۱۰^۶ باکتری در هر میلی‌لیتر بر روی سطح محیط کشت به صورت یکنواخت قرار گرفت. سپس دیسک بلانک آغشته به ۲۰ میکرولیتر هیدروسل با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد وزنی- حجمی) در مرکز آن قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای باکتری‌ها گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد توسط میکرومتر دیجیتال Guanglu 25-0 مدل211-701 (ساخت کشور چین) اندازه‌گیری شد و به عنوان میزان حساسیت یا مقاومت باکتری در نظر گرفته شد [۲۱]. به عنوان کنترل مثبت و منفی به ترتیب از دیسک آنتی‌بیوتیکی کلرامفنیکل و آب مقطر استریل استفاده گردید [۲۵].

به منظور بررسی فعالیت ضد کپکی هیدروسل دارچین در برابر رایزوپوس اوریزا و آسپرژیلوس نایجر، سوسپانسیون کپکی با غلظت ۱۰^۶ کونیدیا در میلی‌لیتر به پلیت حاوی پوتیتو دکستروز براث (Potato Dextrose Broth) منتقل شد و سپس غلظت‌های معینی (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد وزنی/ حجمی) از هیدروسل استخراجی دارچین به هر پلیت اضافه شد و به مدت ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید [۱۹]. جهت محاسبه میزان جلوگیری از رشد کپک از فرمول ذیل استفاده گردید.

$$\text{میزان جلوگیری از رشد کپک} = \frac{(\text{قطر کلنی رشد کپک در نمونه شاهد}) - (\text{قطر کلنی رشد کپک در نمونه حاوی هیدروسل})}{\text{قطر کلنی رشد کپک در نمونه شاهد}}$$

سنجش فعالیت ضد آنزیمی هیدروسل بدین صورت انجام شد: قبل از ارزیابی فعالیت آنزیمی نمونه‌های سیب‌زمینی، ۷۲ ساعت در محلول هیدروسل غوطه‌ور شدند و با قرارگیری در درجه حرارت اتاق خشک شدند و بعد از عصاره‌گیری از سیب‌زمینی عصاره به سل دستگاه اسپکتروفتومتر مدل ژنوی ۶۳۰۵ (ساخت کمپانی JENWAY انگلستان) اضافه شد و سپس فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ارزیابی شد [۱۷].

جهت تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، ۲/۳ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH برابر با ۷ و ۰/۶ میلی‌لیتر از پیروکتکول با غلظت ۱۰۰ میلی‌مول در حمام آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی آغاز گردید. جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر در طی مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به‌جای عصاره آنزیمی از آب مقطر استفاده شد و سپس درصد کاهش فعالیت آنزیم توسط فرمول ذیل محاسبه گردید [۲۶].

$$\text{درصد کاهش فعالیت آنزیم} = \frac{(\text{جذب شاهد}) - (\text{جذب نمونه})}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰٪$$

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت. آنالیزهای آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار STATISTICA نسخه ۲۲ انجام شد. متغیرهای مستقل در این تحقیق شامل غلظت‌های مختلف (۵۰-۱۰ درصد) هیدروسل دارچین بود. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین Duncan تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

بررسی ترکیب شیمیایی هیدروسل استخراجی گیاه دارچین توسط روش کروماتوگرافی گازی-جذب سنجی جرمی صورت گرفت و نتایج حاصله در جدول ۱ نشان داده شده است. مطابق این نتایج برخی از مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده هیدروسل دارچین شامل *Vulgarol*، *Emersol*، *Cinnamic acid methyl ester*، *Methyl palmitate* و اسید اولئیک است (جدول۱).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی هیدروسل دارچین

شماره پیک	زمان ماند (دقیقه)	ترکیب شیمیایی	درصد
۱	۲۰/۳۹۸	*Cinnamic acid, methyl ester*	۶/۳۵۳
۲	۲۷/۶۸۴	*Methyl palmitate*	۱۵/۸۶۱
۳	۲۷/۷۰۱	*Hexadecanoic acid methyl ester*	۴/۵۲۲
۴	۲۸/۶۵۷	*Corymbolone*	۳/۷۷۱
۵	۲۸/۸۱۴	*3-Cyclohexen-1-carboxaldehyde, 3,4-dimethyl*	۱۰/۷۱۱
۶	۲۸/۸۶۷	*Vulgarol*	۳/۴۷۴
۷	۲۸/۹۰۲	*Alloaromadendrene oxide*	۱/۵۱۳
۸	۳۷/۸۴۳	*9-Octadecenoic acid*	۵/۵۴۳
۹	۳۷/۸۹۵	*6-Formyl-3- methyl- 2- oxo- 4- hexenoic acid.*	۴/۵۵
۱۰	۳۹/۳۸۸	*1-Eicosene*	۳/۱۲۶
۱۱	۳۹/۴۴۰	*Cyclopropaneoctanal*	۰/۸۸۱
۱۲	۳۹/۶۴۴	*Emersol*	۸/۸۷
۱۳	۳۹/۶۶۷	*1-Nonadecene*	۱/۵۷۶

بررسی خواص ضد باکتریایی هیدروسل نیز با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد انجام شد و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق این جدول، هیدروسل استخراجی دارچین کم‌ترین اثر ممانعت‌کنندگی را بر *استافیلوکوکوس اورئوس*

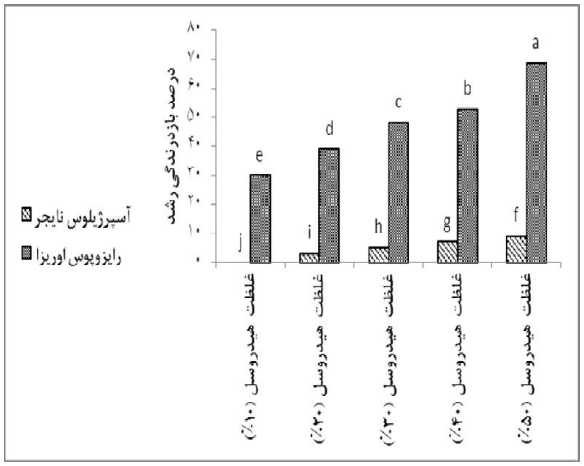
داشته است (p<۰/۰۰۱). نتایج نشان‌دهنده اثر هیدروسل استخراجی دارچین بر دو باکتری باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت‌های مختلف است. بیش‌ترین اثر ضد میکروبی مربوط به غلظت ۵۰ درصد وزنی/حجمی هیدروسل بر باکتری باسیلوس سرئوس است که سبب ایجاد بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد (میانگین و انحراف معیار۰/۲۱±۳۷/۸۳ میلی‌متر) گردیده است. استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری باسیلوس سرئوس مقاومت بیش‌تری در برابر هیدروسل دارچین نشان داد و تنها در غلظت ۵۰ درصد هیدروسل، قطر هاله عدم رشد کمی ایجاد نمود (میانگین و انحراف معیار ۰/۱۶±۶/۲۱ میلی‌متر) (جدول ۲). میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد کنترل مثبت (آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل) در مورد باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب۳/۳۶ ± ۴۰ و ۲/۲۳ ± ۱۸ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد کنترل منفی در مورد هر دو باکتری مورد مطالعه برابر با صفر میلی‌متر بود.

جدول ۲- اثر ضد باکتریایی (میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر) هیدروسل استخراجی دارچین

	غلظت برحسب درصد وزنی/ حجمی				
نام میکروارگانیسم	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
باسیلوس سرئوس	۲۰/۸۳ ±۰ /۲^{e}	۲۴/۰۶ ±۰ /۱۹^{d}	۲۹/۰۱ ±۰ /۲۱^{c}	۳۱/۸۳ ± ۰/۲۲^{b}	۳۷/۸۳ ± ۰/۲۱^{a}
استافیلوکوکوس اورئوس	.^{g}	.^{g}	.^{g}	.^{g}	۶/۲۱ ± ۰/۱۶^{f}

آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسات چندگانه Duncan
اعداد با حروف مختلف دارای تفاوت معنی‌داری در سطح p<۰/۰۰۱ هستند.

نمودار ۱ میزان ممانعت از رشد کپک‌های *رایزوپوس اوریزا* و *آسپرژیلوس نایجر* را در غلظت‌های مختلف هیدروسل استخراجی گیاه دارچین نشان می‌دهد. نتایج حاکی از اثرات ضدکپکی هیدروسل دارچین بر روی دو گونه آسپرژیلوس نایجر و رایزوپوس اوریزا است که اثر ضدکپکی در غلظت‌های مختلف هیدروسل دارچین متفاوت است (p<۰/۰۰۱). هم‌چنین میزان حساسیت دو گونه کپکی مورد مطالعه نسبت به هیدروسل دارچین متفاوت است به طوری که کپک رایزوپوس اوریزا حساسیت بیش‌تری نشان داد (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر ضدکپکی هیدروسل استخراجی دارچین بر رایزوپوس اوریزا و آسپرژیلوس نایجر
اعداد با حروف مختلف دارای تفاوت معنی‌داری در سطح p<۰/۰۰۱ هستند.

بررسی اثرات ضد آنزیمی در برابر آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج جدول ۳ نشان دادند که غوطه ورکردن سیب‌زمینی در غلظت‌های مختلف هیدروسل استخراجی از دارچین، سبب کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در این محصول می شود.

جدول ۳- اثر هیدروسل استخراجی دارچین بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز سیب‌زمینی

	غلظت بر حسب درصد وزنی/ حجمی				
متغیر	٪۱۰	٪۲۰	٪۳۰	٪۴۰	٪۵۰
میزان pH	۵/۵ ± ۰/۲^{a}	۵/۲ ± ۰/۱^{b}	۴/۸ ± ۰/۳^{c}	۴/۱ ± ۰/۲^{d}	۳/۷ ± ۰/۱^{e}
درصد کاهش فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز	۳۷ ± ۱/۵۳۰^{e}	۳۹ ± ۱/۱۲^{d}	۴۳ ± ۱/۱۱^{c}	۴۶ ± ۲/۵۱^{b}	۵۰ ±۱ /۵۱۱^{a}

آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسات چندگانه Duncan
اعداد با حروف مختلف دارای تفاوت معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۱$ هستند.

بحث

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ترکیبات مختلفی از گروه‌های شیمیایی مختلف شامل هیدروکربن‌ها، آلدئیدها و اسیدها در هیدروسل استخراجی دارچین وجود دارد. یک ترکیب شاخص در هیدروسل دارچین ترکیبی به نام سینامیک اسید متیل استر است که درصد این ترکیب برابر با ۶/۳۵ درصد است. هیدروسل دارچین شامل Vulgarol، Emersol، Cinnamic acid methyl ester، Methyl palmitate و اسید اولئیک است (جدول ۱).

ترکیب تشکیل دهنده هیدروسل گیاهان بسیار متنوع است از جمله Hamdi و همکاران انواع ترکیبات آلدهیدی و الکل‌ها را به عنوان ترکیبات غالب تشکیل دهنده هیدروسل استخراجی از گیاهHaplophyllum tuberculatum گزارش نموده‌اند [۲۷]. Inouye و همکاران ترکیبات تشکیل دهنده هیدروسل گیاهان را بر اساس گروه‌های عملگرا به آلدئیدها، الکل، فنل، کتن استر و گروه‌های اتر متیل فنل دسته‌بندی نمودند [۲۸].

در مطالعه حاضر افزایش غلظت هیدروسل اثر مستقیم بر ممانعت رشد باسیلوس سرئوس داشت به‌طوری که در غلظت‌های بالا، درصد ممانعت‌کنندگی و نیز قطر هاله عدم رشد، بیشتر بوده است (جدول ۱). از جمله دلایل احتمالی اثر ضد باکتریایی هیدروسل دارچین را می توان مربوط به وجود مشتقات سینامیک اسید در هیدروسل دارچین دانست. در تحقیقات مختلف اثر ضدمیکروبی سینامیک اسید گزارش شده است. Vasconcelos و همکاران در مطالعه مکانیسم اثرات ضد میکروبی دارچین (عصاره، اسانس یا دیگر اجزاء دارچین) گزارش نمودند که گیاه دارچین سبب صدمه به غشاء سلولی، تغییر پروفایل لیپیدها، ممانعت از فعالیت آنزیم ATPases، تقسیم سلولی سبب مرگ باکتری-های گرم منفی و مثبت می‌گردد. بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی دارچین به سینامالدهید و سینامیک اسید نسبت داده شده است [۲۹]. Sova گزارش نموده است سینامیک اسید و مشتقات این ترکیب شامل اسیدها، استرها، آمیدها، هیدرازیدها و دیگر مشتقات سینامیک اسید دارای خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی و نیز آنتی‌اکسیدانی هستند [۳۰].

در تحقیق حاضر، نتایج بررسی اثر ضد کپکی هیدروسل دارچین نشان‌دهنده اثر این ماده بر روی دو کپک رایزوپوس

اوریزا و آسپرژیلوس نایجر در مواجهه با هیدروسل استخراجی دارچین است. هیدروسل دارچین اثر ضدکپکی بیش‌تری بر روی رایزوپوس اوریزا نسبت به آسپرژیلوس نایجر نشان داد. هم‌چنین با افزایش غلظت هیدروسل، اثر ضد کپکی نیز افزایش داشت به طوری که بیش‌ترین اثر ضدکپکی در غلظت ۵۰٪ وزنی- حجمی هیدروسل مشاهده شد (نمودار ۱). با توجه به وجود سینامیک اسید هم‌چنین ترکیبی به نام ولگارون در هیدروسل دارچین، می توان اثرات ضد کپکی مشاهده شده را به وجود این دو ترکیب در هیدروسل نسبت داد. Meepgala و همکاران اثرات ضد کپکی ولگارون را نشان داده‌اند [۳۱]. Hosmat و همکاران اثرات ضد باکتریایی ترکیب ولگارون استخراج شده از برگ‌های گیاه Syzygium cumini را در برابر باکتری‌های مختلف از جمله سودوموناس آئروژنوزا را گزارش نموده‌اند [۳۲]. مطابق گزارش Tamires و همکاران سینامیک اسید اثر ضد کپکی در برابر کاندیدا آلبیکانس دارد [۳۳]. Wang و همکاران در بررسی اثرات ضدکپکی اسانس دارچین در برابر کاندیدا آلبیکانس و کاندیدا تروپیکالیس بیان نمودند که مواجهه کپک با این اسانس سبب تغییراتی در مورفولوژی سلول‌های کپک به صورت ایجاد منافذ نامنظم در روی سطح و نیز تخریب ارگانلا شده است. مطابق این گزارش اسانس دارچین یک ماده ضدکپک قوی است که در عرض ۷۲-۴۸ ساعت سبب تغییرات قابل توجه در ساختار سلول می‌گردد که منجر به مرگ سلول می‌شود [۳۴].

Li و همکاران اثرات ضدکپکی اسانس دارچین بر روی رایزوپوس نیگریکانس را ناشی از اثر این نوع اسانس بر فعالیت برخی از آنزیم‌های اصلی در سیکل تری کربوکسیلیک اسید و تغییر در ساختار غشاء سلول بیان نموده‌اند. مطابق این گزارش اسانس دارچین سبب ممانعت از رشد میسلا به صورت متورم شدن دیواره سلول و تخریب غشاء سیتوپلاسم و نشت ماتریکس سیتوپلاسم و نیز ممانعت از بیوسنتز ارگوسترول که منجر به صدمه به دیواره سلول و نشت یون‌های داخل سلولی و پروتئین‌ها می‌شود. از دیگر دلایل اثر ضدکپکی این نوع اسانس به تأثیر آن بر متابولیسم انرژی و کاهش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز و مالات دهیدروژناز در سیکل تری کربوکسیلیک‌اسید ذکر شده است [۳۵].

در مطالعه حاضر، اثر هیدروسل استخراجی دارچین بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نشان‌دهنده کاهش فعالیت این آنزیم در غلظت‌های مختلف هیدروسل دارچین است (جدول ۲). یکی از دلایل احتمالی این کاهش فعالیت مربوط به اثر pH هیدروسل است. هیدروسل استخراجی از دارچین دارای مقادیر متفاوت pH بسته به غلظت هیدروسل هستند که از مقدار ۵/۵ برای هیدروسل با غلظت ۱۰ درصد تا ۳/۷ برای هیدروسل با غلظت۵۰ درصد متفاوت است. این در حالی است که تحقیقات مختلف نشان داده است که میزان pH بهینه برای آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز سیب‌زمینی برابر با ۶/۵-۶ است [۳۶] و تغییرات pH بر میزان فعالیت آنزیم مؤثر است. Gacche و همکاران اثر ممانعت‌کنندگی سینامیک اسید در جلوگیری از فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در آب سیب را گزارش نموده است. مطابق این تحقیق اسید سینامیک سرعت فعالیت این آنزیم را کاهش می دهد [۳۷]. Neves و همکاران نیز سینامیک اسید را یک ترکیب مؤثر در کاهش

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز گیاه نعناع گزارش نموده‌اند [۳۸].

نتیجه‌گیری

بررسی‌های انجام شده طی مطالعه مذکور نشان داد هیدروسل استخراجی گیاه دارچین دارای خواص ضد باکتریایی بر باسیلوس سرئوس است. اثر هیدروسل دارچین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس چندان قابل توجه نبود. هم‌چنین هیدروسل استخراجی گیاه دارچین دارای خواص ضدکپکی در برابر رایزوپوس اوریزا و آسپرژیلوس نایجر است و درصد بازدارندگی رشد این ماده در برابر رایزوپوس اوریزا بیشتر است. بررسی خواص ضد آنزیمی هیدروسل دارچین در برابر آنزیم عامل قهوه‌ای شدن آنزیمی (پلی‌فنل اکسیداز) نیز اثرات بازدارندگی این ماده در برابر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز سیب‌زمینی را نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد هیدروسل استخراجی دارچین می‌تواند به عنوان یک ماده ضد باکتری در برابر باسیلوس سرئوس، ضدکپک در برابر رایزوپوس اوریزا و هم‌چنین جهت جلوگیری از فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز کاربرد داشته باشد و پیشنهاد می‌گردد بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد کپکی هیدروسل دارچین بر روی سایر میکروارگانیسم‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین بررسی اثر ضد آنزیمی این هیدروسل در برابر سایر آنزیم‌های مخرب کیفیت محصولات غذایی و کشاورزی نظیر آنزیم پراکسیداز و لیپاز نیز پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه زیست‌شناسی سیستماتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور جهت تشخیص گونه گیاهی و از آزمایشگاه میکروبیولوژی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور جهت فراهم نمودن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Labadie C, Cerutti C, Carlin F. Fate and control of pathogenic and spoilage micro-organisms in *orange blossom* (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa centifolia*) hydrosols. *J Appl Microbiol* 2016; 121: 1568-79.

[2] Garneau F-X, Collin G, Gagnon H. Chemical composition and stability of the hydrosols obtained during essential oil production. II. The case of *Picea glauca (Moench) Voss*., *Solidago puberula Nutt*,. and *Mentha piperita L. Am J Essent Oils Nat Prod* 2014; 2 (1): 29-35.

[3] Bellahsene C, Bendahou M, Khadir A, Zenati F, Bendelaïd F, Aissaoui N, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil and hydrosol extract of *Nepeta nepetella* subsp. *amethystina (Poir.) Briq*. From Algeria. *J Appl Pharm Sci* 2015; 5(9): 21-5.

[4] Karampoula F, Giaouris E, Deschamps J, Doulgeraki A I, Nychas G J E, Dubois-Brissonnet F. Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against biofilms of *Salmonella Typhimurium*: Real-time visualization of bacterial inactivation by CLSM. *J Appl Environ Microbiol* 2016; 82: 5309-19.

[5] Belabbes R, El Amine Dib M, Djabou N, Ilias F, Tabti B, Costa J, et al. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis L*. from western Algeria. *Chem Biodiversity 2017 May;14(5):e1600482.*

[6] Kaewprom K, Chen YH, Lin CF, Chiou MT, Lin CN. Antiviral activity of *Thymus vulgaris* and *Nepeta cataria* hydrosols against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Thai J Vet Med* 2017; 47(1): 25-33.

[7] Mirfeizi M, Mehdizadeh Tourzani Z, Zahra Mirfeizi S, Asghari Jafarabadi M, Rezvani H, Shoghi M. Effects of cinnamon on controlling blood glucose and lipids in patients with type II diabetes mellitus: A double blind, randomized clinical trial. *Med J Mashhad Uni Med Sci* 2014; 57(3): 533-41. [Farsi]

[8] Ghandehari yazdi A P, Nikooyi A, Sedaghat Broojeni L. Review of pharmaceutical and functional properties of cinnamon. *J Herb Drugs* 2014; 5(3): 127-35.

[9] Sharifzadeh S, Mohammadzadeh M. The Effects of Aqueous Extract of Cinnamon on Blood Biochemical Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Zanjan Uni Med Sci Health Serv* 2016; 23(201): 66-76. [Farsi]

[10] Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, Characterization and Antimicrobial Resistance of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* 2007; 115(3): 290-6.

[11] Paciorek ML, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyg B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal

carriers and food samples. *Int J Food Microbiol* 2007; 117(3): 319-23.

[12] Scott R, Kathleen O, Daniel M, Andrew R, Donald M, Shelley R. A Real-Time PCR Assay to Detect the Panton Valentine Leukocidin Toxin in *Staphylococci*: Screening *Staphylococcus Schleiferi Subspecies Coagulans* Strains from Companion Animals. *Vet Microbiol* 2005; 107(1-2): 139-44.

[13] Altaf, M.S., Iqbal, A., Ahmad, M., Hussain, S.A., Ahmad, R. and Willayat, M.M. Study of enterotoxigenicity of *B.cereus* emetic strain by skin vasopermeability reaction in rabbits and poultry. *Int J Pharma Bio Sci* 2012; 3(2): 166-72.

[14] Roy A, Moktan B, Sarkar PK. Characteristics of Bacillus cereus isolates from legume-based Indian fermented foods. *Food Control* 2007; 18(12): 1555-64.

[15] Julianti E, Rajah K K, Fidrianny I. Antibacterial Activity of ethanolic extract of cinnamon bark, honey and their combination effects against Acne-Causing Bacteria. *Sci Pharm* 2017; 85: 19-27.

[16] Goel N, Rohilla H, , Gajender Sing G, Punia P. Antifungal activity of cinnamon oil and olive oil against *Candida* Spp. isolated from blood stream infections. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(8): 9-11.

[17] Fasih M, Ghorbani Nohooji M, Rahimi AR. The Effect of three medicinal plants essential oils on the activity of peroxidise and polyphenoloxidase enzymes in broccoli (*Brassica oleracea L.var. Italica*). *J Med Plants* 2016; 1(10): 60-77. [Farsi]

[18] Ozturk I, Tornuk F, Sagdic O, Kisi O. Application of Non-linear Models to Predict Inhibition Effects of Various Plant hydrosols on *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh-cut apples. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9(7): 607-16.

[19] Wojcik- Stopczynska B, Jakowienko P, Wysocka G. The estimation of antifungal activity of essential oil and hydrosol obtained from *wrinkled-leaf mint* (*Mentha crispa* L.). *Herba Pol* 2012; 58(1): 6-15.

[20] Yolmeh M, Habibi-Najafi M B, Najafzadeh M. Study the effects of ultraviolet radiation on the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* isolated from raw milk and raw rice. *Iran Food Sci Technol Res J* 2015; 4: 319-24 [Farsi]

[21] Mohammadi N, Mirhosseini M, Shirzad M, Dehghan Hamdan A, Yazdani N. Synthesizing zno nanoparticles by high-energy milling and investigating their antimicrobial effect. *J Shahid*

Sadoughi Uni Med Sci 2015; 23(4): 2070-82 [Farsi]

[22] Moradian Eivari A K, Salehi M, Malek Jafarian M. Antimicrobial activity of *Rosmarinus Officinalis* on vancomycin -resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Imam Reza Hospital patients of Mashhad. *J Neyshabur Uni Med Sci* 2015; 3(3): 39-44. [Farsi]

[23] Iranian Scientific and Industrial Research Organization. Available at: *ptcc. irost.org/*

[24] Minooeian Haghighi MH, Khosravi A. The Effects of the herbal essences on the two important species of *Aspergillus*. *The Horiz Med Sci* 2010; 15(4): 5-16 [Farsi]

[25] Esbechin SA, Safari M, Soltani N, kamaliM. In vitro Antibacterial activity of methanol, ether and aqueous extracts in some species of *Cyanobacteria*. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2014; 24(117): 39-54. [Farsi]

[26] Lante A, Tinello F. Citrus hydrosols as useful by-products for tyrosinase inhibition. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2015; 27: 154–59.

[27] Hamdi A, Majouli K, Vander Heyden Y, Flamini G, Marzouk Z. Phytotoxic activities of essential oils and hydrosols of *Haplophyllumtuberculatum*. *Ind Crops Prod* 2017; 97: 440-47.

[28] Inouye S, Takahashi M, Abe S. A comparative study on the composition of forty four hydrosols and their essential oils. *Int J Essent Oil Ther* 2008; 2(3): 89-104.

[29]Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog* 2018; 120: 198-203.

[30] Sova M. Antioxidant and Antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem* 2012; 12(8):749-67

[31] Meepagala, KM., Kuhajek J, Sturtz JD, Wedge DE. Vulgarone B. The antifungal constituent in the steam-distilled faction of *artemisia douglasiana*. *J Chem Ecol* 2003; 29(8): 1771-80.

[32] Hosmat, P.B. Sonawane, K.D. Waghmare, S. Antibacterial activity of vulgarol a extracted from the leaves of *Syzygium cumini*. *Asian J Pharm Clin Res* 2013; 6(4): 100-102.

[33] Tamires C. Lima, Alana R. Ferreira, Daniele F. Silva, Edeltrudes O. Lima & Damião P. de Sousa. Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. *Nat Prod Res* 2018; 32(5): 572-75.

[34]Wang GS1, Deng JH, Ma YH, Shi M, Li B. Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of Candida. *J Tradit Chin Med* 2012; 32(1): 19-24.

[35]Li Y, Nie Y, Zhou L, Li S, Tang X, Ding Y, Li S. The possible mechanism of antifungal activity of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*. *J Chem Pharm Res* 2014; 6(5): 12-20.

[36] Yoruk R, Marshall MR. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A Review. *J Food Biochem* 2003; 27: 361-422.

[37] Gacche RN1, Warangkar SC, Ghole VS. Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of Polyphenol Oxidase in apple juice. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004; 19(2): 175-9.

[38] Neves VA, Picchi DG, da Silva MA. Some Biochemical Properties of Polyphenoloxidase from Spearmint (*Mentha arvensis*). *Braz Arch Biol Technol* 2009; 52(4): 1001-10.

The Study of Antimicrobial and Anti-Enzymatic Activity (Potato Poly Phenol Oxidase) of *Cinnamomum Verum* Hydrosol: A Laboratory Study

Z. Didar[1]

Received: 06/10/2018 Sent for Revision: 17/10/2018 Received Revised Manuscript: 17/11/2018 Accepted: 25/12/2018

Background and Objectives: Cinnamon contains phenolic and non-phenolic bioactive compounds. The aim of this research was investigating the antimicrobial and anti-enzymatic properties of cinnamon (*Cinnamomum verum*) hydrosol.

Materials and Methods: In this laboratory study, chemical composition of cinnamon hydrosol was analyzed by Gas chromatography–mass spectrometry method. Antibacterial effects of cinnamon hydrosol at different concentrations (10, 20, 30, 40 and 50 percent) against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* and antifungal effects against *Aspergillus niger* and *Rhizospus oryzae* were determined. Anti-enzymatic activity of cinnamon hydrosol against the polyphenol oxidase enzyme of potatoe was also assessed. The experiment was designed in a completely randomized design with three replications. The data were analyzed using one-way ANOVA and Duncan's mean comparison test.

Results: The results showed that *Bacillus cereus* has high susceptibility against cinnamon hydrosol (the mean and standard deviation of inhibition zone diameter equal to 37.83±0.21mm). Investigation of anti-fungal activity revealed that *Aspergillus niger* showed more stability against cinnamon hydrosol than *Rhizospus oryzae* (the mean and standard deviation of the growth inhibition percentage at hydrosol concentration of 50% w/v, were 9±2.2 and 68.66±2.5, respectively). Cinnamon hydrosol caused a significant reduction in the polyphenol oxidase activity ($p<0.001$).

Conclusion: According to this study, cinnamon hydrosol exhibited anti-bacterial and anti-fungal properties as well as, anti-enzymatic activity against polyphenol oxidase of potato, so that cinnamon hydrosol can be used as antibacterial (against *Bacillus cereus*), antifungal (against *Rhizopus oryzae*) and anti-enzymatic (poly phenol oxidase) component.

Key words: Hydrosol, Cinnamon, Antimicrobial effect, polyphenol oxidase

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University, Neyshabur Branch approved the study (Ethics number:1397.012).

How to cite this article: Didar Z. The Study of Antimicrobial and Anti-Enzymatic Activity (Potato Poly Phenol Oxidase) of *Cinnamomum Verum* Hydrosol: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (1): 3-16. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Food Sciences, Islamic Azad University, Neyshabur Branch, Neyshabur, Iran, ORCID: 0000-0001-6268-6376 (Corresponding Author) Tel: (051) 42612881, Fax: (051) 42615472, E-mail: z_didar57@yahoo.com