Horizon of Medical Sciences
Volume 25, Issue 2, Spring 2019
pages: 71-76
Type: Originial Research

Evaluation of Inhibitory Effect of Three Phenolic Compounds; Linalool, Menthol and Eugenol on the Yeasts as Food Spoiling Agents

Abbaszadeh S[1]. *PhD*, Sharifzadeh A[2]. *PhD*, Mahmoodzadeh Hosseini H*. *PhD*

[*]Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[1]Health Research Center, Life style institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Aims: Although the use of yeasts as starters is common in the food industry, it can lead to product corruption and poor quality of food in some cases. Current study was assessed the anti-yeast impacts of three phenolic compounds; linalool, menthol and eugenol against 7 yeast species contaminating food products (*Candida albicans, Candida kefir, Candida famata, Rhodotorula glutnis, Kluyveromyces fragilis, Debaryomyces hansenii, Saccharomyces cerevisiea*).

Materials & Methods: The anti-yeast impacts of three mentioned compounds and the minimum inhibitory concentration (MIC) were investigated using disk diffusion method and micro-dilution method, respectively.

Findings: The findings showed that all three compounds had anti-yeast effects on the tested isolates. Eugenol had the anti-yeast properties at the lower concentration (50µg/ml) in comparison with the other two compounds. Furthermore, the MIC of linalool, menthol and eugenol were *Rhodotorula glutnis* (58.3µg/ml), *Saccharomyces cerevisiea* (58.3µg/ml) and *Candida albicans* (50µg/ml), respectively.

Conclusion: In conclusion, it could be stated that the natural phenolic compounds; menthol, linalool and eugenol, have toxic and anti-yeast effects and are able to prevent the growth of tested yeast contaminating foods at the lower concentrations.

Keywords:
Linalool: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67018584];
Menthol: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68008610];
Eugenol: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/6800505];
Food Products
Yeast: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68015003];

*Correponding Auther
Tel: +98 21 82482592
Fax: +98 21 82482592
Address: Applied Microbiology Research Center, systems biology and poisonings institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, , Tehran. Iran. P.O. Box 19395-54872.
Received: 2018/Oct/08 Accepted: 2019/ Mar /16 ePublished: 2019/ May /16

بررسی اثر مهاری سه ترکیب فنلی لینالول، منتول و اوژنول بر مخمرهای عامل فساد در مواد غذایی

سپیده عباس زاده PhD
مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
عقیل شریف زاده PhD
گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
* **حمیده محمودزاده حسینی** PhD
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: اگرچه استفاده از مخمرها به عنوان آغازگر در صنایع غذائی متداول است اما در بعضی موارد می توانند باعث فساد محصول و کاهش کیفیت غذا شوند. مطالعه حاضر، به بررسی اثرات ضد مخمری سه ترکیب فنلی لینالول، منتول و اوژنول بر علیه ۷ گونه مخمری آلوده کننده محصولات غذائی (کاندیدا آلبیکانس، کاندیدیا کفیر، کاندیدیا فاماتا، رودوتورولا گلوتینیس، کلایورومایسز فراجیلیس، دباریومایسزهانسنی و ساکارومایسز سرویزیه) پرداخته است.

مواد و روش‌ها: اثرات ضد مخمری سه ترکیب مذکور و تعیین حداقل غلظت مهاری و کشندگی به ترتیب توسط روش‌های انتشار دیسک و میکرودایلوشن انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که هر سه ترکیب مورد مطالعه دارای اثرات ضد مخمری موثر بر روی ایزوله‌های مورد آزمایش بودند. اوژنول در غلظت کمتری (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با دو ترکیب مورد مطالعه دیگر دارای خاصیت ضد مخمری هستند. به علاوه، حداقل غلظت مهار کنندگی برای لینالول، منتول و اوژنول به ترتیب در سویه‌های رودوتورولا گلوتینیس (۵۸/۳ میکروگرم بر میلی لیتر)، ساکارومایسز سرویزیه (۵۸/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و کاندیدیا آلبیکنس (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بود.

نتیجه گیری: در مجموع، می توان عنوان کرد ترکیبات فنولی طبیعی منتول، لینالول و اوژنول دارای تاثیرات سمی و ضد مخمری هستند که قادرند در غلظت‌های کم مانع رشد تمامی مخمرهای آلوده کننده مواد غذائی مورد مطالعه شوند.

واژگان کلیدی: لینالول، منتول، اوژنول، محصولات غذائی، مخمر.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
*نویسنده مسئول: hosseini361@yahoo.com

مقدمه

در صنایع غذائی از برخی گونه‌های مخمرها به عنوان آغازگر استفاده می گردد. اگرچه مخمرها به ندرت می توانند باعث شیوع عفونت و مسمومیت غذائی شوند، اما برخی از گونه‌های مخمری در فساد محصول نقش دارند و کیفیت ماده غذایی را کاهش می‌دهند[1]. به علاوه، برخی از گونه‌ها در ایجاد آلرژی به خصوص آسم مهم بوده و سموم قارچی تولید می کنند که سرطانزا می‌باشد. از طرفی استفاده این محصولات توسط افراد با نقص سیستم ایمنی می‌تواند بیماری ایجاد کند از این رو توجه به آلودگی‌های محصولات غذائی و به حداقل رساندن آن حائز اهمیت است[2]. فرآیند نامناسب در مراحل جمع آوری، ذخیره، انتقال و فروش محصول عامل خطر برای رشد عوامل مخمری و تولید سموم قارچی در محصولات غذائی می‌باشد[3]. استفاده از مواد شیمیائی در محصولات غذائی به منظور تقلیل یا حذف خطر آلودگی‌های مخمری و قارچی در صنعت به صورت معمول انجام می‌شود. افزودنی‌های شیمیائی مرسوم همچون نمک، نیتریت‌ها، سولفیت‌ها و اسید بنزوئیک و بنزوات در تولید نوشیدنی‌ها، فرآورده‌های میوه‌ای و مارگارین جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و مخمرها استفاده می‌شود[4]. اسیدهای آلی همچون اسید پروپیونیک، پروپیونات، اسید سوربیک، سوربات، اسید استیک و استات جهت محصولات نانوائی و شیرینی پزی، چاشنی‌ها و فرآورده‌های لبنی به طور معمول مور استفاده قرار می‌گیرند[2]. با این وجود، مصرف این مواد به علل اقتصادی و مسائل ایمنی غذائی و محیط زیستی مورد بحث می‌باشد[3]. کاربرد مواد شیمیائی سنتتیک جهت کنترل فساد مواد غذائی به علت عوارض سمی آنها برای مصارف غذای انسان محدود می‌باشد، از این رو یافتن مواد جایگزین ضروری است. محافظت کننده‌های زیستی با قابلیت مهار رشد قارچ‌ها و مخمرها می توانند جایگزین‌های مناسبی برای مواد شیمیائی ضد قارچی باشند. اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی روغن‌های آروماتیکی هستند که می‌توانند به عنوان یک محافظت کننده زیست سازگار در صنایع غذائی استفاده شوند. امروزه خواص ضد باکتریائی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد سموم و آفت کشی بسیاری از این اسانس‌های روغنی تائید شده است که این خواص به حضور و عملکرد مواد موثره این اسانس‌ها مرتبط می‌باشد. ترکیبات فنولی موجود در اسانس‌های روغنی مهمترین ترکیبات با خاصیت ضد میکروبی می‌باشند که از آن جمله می توان به تیمول، منتول، اوژنول، کارواکرول و لینالول اشاره نمود[5]. لینالول یک الکل ترپنی با خاصیت آنتی باکتریال وسیع الطیف می‌باشد[6,7]. اوژنول ترکیب فنولی دیگری است که در روغن گل میخک، برگ خلیج و برگ دارچین وجود داشته و می‌تواند به عنوان یک داروی ضد قارچ مطرح باشد[8] اوژنول در ابتدا به عنوان ماده معطر در مواد غذائی و آرایشی استفاده می‌شد. لینالول و اوژنول دارای ویژگی‌های بیولوژیک متعددی همچون خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرماخوردگی، ضد اسپاسم و ضد انگل می‌باشند. همچنین در دندانپزشکی به عنوان عوامل ضدعفونی کننده موثر استفاده می‌شوند[9-12]. منتول و مشتقات اتری و استری آن ترکیبات منوترپنوئیدی طبیعی هستند که خواص ضد قارچی آنها بر علیه آسپرژیلوس نایجر(*Aspergillus niger*)، آسپرژیلوس اوریزائی (*Aspergillus oryzae*)، کاندیدا کروزوئی (*Candida krusei*) و فوزاریوم اکسیزپروم (*Fusarium oxysporum*) گزارش شده است[13,14]. مطالعات انجام شده بر مکانیسم عمل اوژنول و آنالوگ‌های آن تاثیر ضد کاندیدائی این ترکیب فنولی را از طریق تخریب پوشش سلول‌های قارچی نشان دادند[15].

مطالعه حاضر، به بررسی اثرات ضد مخمری سه ترکیب فنلی لینالول، منتول و اوژنول بر علیه ۷ گونه مخمری آلوده کننده محصولات غذائی کاندیدا آلبیکانس (*Candida albicans*)، کاندیدیا کفیر (*Candida kefir*)، کاندیدیا فاماتا (*Candida famata*)، رودوتورولا گلوتینیس (*Rhodotorula*

glutnis)، کلایوورومایسز فراجیلیس (*Kluyveromyces fragilis*)، دباریومایسزهانسنی (*Debaryomyces hansenii*) و ساکارومایسز سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiea*) پرداخته است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مخمر

سویه‌های مخمر بررسی شده در این مطالعه شامل کاندیدا آلبیکانس ATCC ۹۰۰۲۹، کاندیدیا کفیر ATCC۴۲۲۶۵، کاندیدیا فاماتا ATCC ۳۶۲۳۹، رودوتورولا گلوتینیس ATCC ۹۰۷۸۱، کلایوورومایسز فراجیلیس ATCC ۲۸۲۴۴، دباریومایسزهانسنی ATCC ۲۰۱۸۴۹ و ساکارومایسز سرویزیه ATCC ۹۷۶۳بودند که از کلکسیون قارچ مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشگاه تهران تهیه گردید.

آنالیز اثرات ضد مخمری

به منظور بررسی اثرات ضد مخمری سه ترکیب لینالول (Sigma-Aldrich Crop., St. Louis, MO, USA, L۲۶۰۲)، منتول (Sigma-Aldrich Crop., St. Louis, MO, USA W۲۶۶۵۹۰) و اوژنول (Sigma-Aldrich Crop., St. Louis, MO, USA E۵۱۷۹۱) از روش‌های انتشار دیسک، تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) استفاده شد.

در روش انتشار دیسک، ابتدا سوسپانسیون مخمری از مخمرهای مورد مطالعه با جذب نوری ۰/۱تهیه شده و سپس با استفاده از سوآب، در سطح پلیتهای حاوی محیط مولر هینتون (مرک، آلمان) تلقیح شد. بعد از خشک شدن سطح پلیت، دیسکهای کاغذی ۶ میلیمتری حاوی ۲۰ میکرولیتر از لینالول، منتول و اوژنول به پلیت منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید و بعد از گرمخانه گذاری قطرهاله مهار رشد مخمرها اندازه گیری شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده و حداقل غلظت کشندگی از روش میکرودایلوشن استفاده شد. محلول ذخیره لینالول، منتول و اوژنول حاوی ۱ میلی گرم در دی متیل سولفوکساید ۵٪ تهیه شد و سپس با استفاده از محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI حاوی ال- گلوتامین فاقد بیکربنات سدیم (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) رقیق شد. PH محیط کشت مذکور توسط ۰/۱۶۵ mol/l بافر MOPS در ۷ تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های رقیق شده به هر خانه از پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه منتقل گردید. غلظت‌های نهایی مورد مطالعه برای هر سه ترکیب موثره ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. نمونه‌های کنترل مثبت حاوی محیط کشت RPMI و سوسپانسیون مخمری و نمونه‌های کنترل منفی حاوی محیط کشت مایع و محلول لینالول، منتول و اوژنول همراه با نمونه‌های آزمایش مورد بررسی قرارگرفت. کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده شد و اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت مهاری ثبت گردید. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، ۱۰۰ میکرولیتر از هر خانه ای که رشد قابل مشاهده ای نداشت بر روی پلیت آگار سابرو دکستروز آگار (مرک،آلمان) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. کمترین غلظتی که اجازه رشد مخمر را نمی‌دهد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

نتایج بدست آمده از آزمایشات با آزمون One- Way ANOVA توسط نرم افزار SPSS ۱۴ مورد بررسی قرار گرفت. *P value* کمتر از ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر اثر مهاری سه ترکیب فنولی لینالول، منتول و اوژنول بر ۷ مخمر آلوده کننده مواد غذائی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، قطرهاله عدم رشد پس از استفاده از لینالول در بازه ۶/۳۳ تا ۷/۳۳ میلی متر بود. کمترین قطرهاله عدم رشد برای دباریومایسزهانسنی و بیشترین قطرهاله عدم رشد برای رودوتورولا گلوتینیس مشاهده شد. اختلاف قطرهاله عدم رشد در دو مخمر مذکور از نظر آماری معنادار بود (p= ۰/۰۲۸) (جدول ۱). در آزمایش انجام شده با استفاده از منتول قطرهاله عدم رشد در بازه ۶/۸۳ تا ۷/۳۳ میلیمتر بود که تفاوت معناداری در بین مخمرهای مورد مطالعه دیده نشد. در آزمایش انتشار دیسک با استفاده از اوژنول بیشترین قطرهاله عدم رشد مربوط به رودوتورولا گلوتینیس (۸/۵۰ میلیمتر) بود که در مقایسه با کاندیدیا کفیر (۷/۱۷ میلیمتر)، کلایوورومایسز فراجیلیس (۷ میلیمتر) و دباریومایسزهانسنی (۷/۱۷ میلیمتر) تفاوت معناداری را نشان داد ($p\geq$۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱) قطرهاله عدم رشد چند مخمر آلوده کننده مواد غذائی در مجاورت سه ترکیب لینالول، منتول و اوژنول به روش انتشار در دیسک

ترکیب مخمر	لینالول قطر هاله (میلی متر)	منتول قطر هاله (میلی متر)	اوژنول قطر هاله (میلی متر)
کاندیدیا آلبیکنس	۶/۸۳±۰/۲۹	۷/۳۳±۰/۲۹	**۷/۶۷±۰/۲۹**
کاندیدیا کفیر	۶/۶۷±۰/۲۹	۷/۰۰±۰/۵۰	**۷/۱۷±۰/۲۹**
کاندیدیا فاماتا	۷/۱۷±۰/۲۹	۶/۸۳±۰/۷۶	**۷/۸۳±۰/۷۶**
رودوتورولا گلوتینیس	۷/۳۳±۰/۲۹	۷/۶۷±۰/۲۹	**۸/۵۰±۰/۵۰**
کلایوورومایسز فراجیلیس	۶/۵۰±۰/۵۰	۷/۰۰±۰/۵۰	**۷/۰۰±۰/۰۰**
دباریومایسز هانسنی	۶/۳۳±۰/۲۹	۶/۸۳±۰/۲۹	**۷/۱۷±۰/۲۹**
ساکارومایسز سرویزیه	۷/۱۷±۰/۲۹	۷/۰۰±۰/۵۰	**۷/۸۳±۰/۵۸**

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، حداقل غلظت مهار کننده برای لینالول در بازه ۵۸/۳ تا ۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود. رودوتورولا گلوتینیس حساسترین مخمر و کلایوورومایسز فراجیلیس مقاومترین مخمر به لینالول در این مطالعه بودند. یافته‌ها نشان دادند که لینالول در غلظت‌های بالاتری باعث مهار رشد کلایوورومایسز فراجیلیس (۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با کاندیدیا فاماتا (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) ، رودوتورولا گلوتینیس (۵۸/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و ساکارومایسز

سرویزیه (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) می‌شود($p<۰/۰۵$) .

جدول ۲) اثرات ضد مخمری لینالول، منتول و اوژنول بر ضد چند مخمر مهم آلوده کننده مواد غذائی

ترکیب مخمر	لینالول		منتول		اوژنول	
	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
کاندیدیا آلبیکنس	۱۱۶/۷±۲۸/۹	۹۱/۷±۱۴/۴	۱۰۰/۰±۰/۰	۷۵/۰±۰/۰	۷۵/۰±۰/۰	۵۰/۰±۰/۰
کاندیدیا کفیر	۱۰۰/۰±۰/۰	۹۱/۷±۱۴/۴	۱۰۰/۰±۰/۰	۱۰۰/۰±۰/۰	۱۰۰/۰±۰/۰	۱۰۰/۰±۰/۰
کاندیدیا فاماتا	۷۵/۰±۰/۰	۶۶/۷±۱۴/۴	۷۵/۰±۰/۰	۶۶/۷±۱۴/۴	۵۸/۳±۱۴/۴	۵۸/۳±۱۴/۴
رودوتورولا گلوتینیس	۶۶/۷±۱۴/۴	۵۸/۳±۱۴/۴	۷۵/۰±۰/۰	۶۶/۷±۱۴/۴	۱۱۶/۷±۲۸/۹	۱۰۰/۰±۰/۰
کلایورومایسز فراجیلیس	۱۳۳/۳±۲۸/۹	۱۱۶/۷±۲۸/۹	۱۰۰/۰±۰/۰	۹۱/۷±۱۴/۴	۱۰۰/۰±۰/۰	۹۱/۷±۱۴/۴
دباریومایسز هانسنی	۱۰۰/۰±۰/۰	۱۰۰/۰±۰/۰	۱۳۳/۳±۲۸/۹	۱۱۶/۷±۲۸/۹	۱۰۰/۰±۰/۰	۱۰۰/۰±۰/۰
ساکارومایسز سرویزیه	۷۵/۰±۰/۰	۶۶/۷±۱۴/۴	۶۶/۷±۱۴/۴	۵۸/۳±۱۴/۴	۶۶/۷±۱۴/۴	۵۸/۳±۱۴/۴

به علاوه، حداقل غلظت مهار کننده برای منتول در بازه ۵۸/۳ تا ۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. ساکارومایسز سرویزیه حساسترین مخمر و دباریومایسزهانسنی مقاومترین مخمر به منتول در این مطالعه بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که منتول در غلظت‌های بالاتری باعث مهار رشد و دباریومایسزهانسنی (۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با کاندیدیا فاماتا (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر)، رودوتورولا گلوتینیس (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) و ساکارومایسز سرویزیه (۵۸/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) می‌شود ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

یافته‌های حاصل از آزمایشات نشان دادند که ترکیب فنولی اوژنول در غلظت‌های کمتری در مقایسه با دو ترکیب مورد مطالعه دیگر دارای خاصیت ضد مخمری هستند به طوریکه حداقل غلظت مهار کننده برای اوژنول ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد که از آزمایش بر روی کاندیدا آلبیکانس بدست آمد. مقاومترین مخمرها به این ترکیب عبارتند از کاندیدیا کفیر، رودوتورولا گلوتینیس و دباریومایسزهانسنی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. حداقل غلظت مهار کننده اوژنول بر روی کاندیدا آلبیکانس، ساکارومایسز سرویزیه و کاندیدیا فاماتا به طور معناداری کمتر از کاندیدیا کفیر، رودوتورولا گلوتینیس، کلایورومایسز فراجیلیس و دباریومایسزهانسنی تعیین شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

حداقل غلظت کشندگی سه ترکیب فنولی لینالول، منتول و اوژنول به ترتیب در بازه ۶۶/۷ تا ۱۳۳/۳، ۶۶/۷ تا ۱۳۳/۳ و ۵۸/۳ تا ۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. حداقل غلظت کشندگی لینالول برای رودوتورولا گلوتینیس (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) ، ساکارومایسز سرویزیه (۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و کاندیدیا فاماتا (۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) کمتر از کلایورومایسز فراجیلیس (۱۳۳/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) می‌باشد ($p<۰/۰۵$) . به علاوه حداقل غلظت کشندگی لینالول برای رودوتورولا گلوتینیس کمتر از کاندیدا آلبیکانس (۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) بود ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

به علاوه، حداقل غلظت کشندگی منتول برای دباریومایسزهانسنی (۱۳۳/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) به طور معناداری بیشتر از ساکارومایسز سرویزیه (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر)، رودوتورولا گلوتینیس (۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و کاندیدیا فاماتا (۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) تعیین شد ($p<۰/۰۵$).

حداقل غلظت کشندگی اوژنول برای کاندیدیا فاماتا (۵۸/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) به طور معناداری کمتر از از کاندیدیا کفیر (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، رودوتورولا گلوتینیس (۱۱۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر)، کلایورومایسز فراجیلیس (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و دباریومایسزهانسنی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تعیین شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲). به علاوه، حداقل غلظت کشندگی اوژنول برای رودوتورولا گلوتینیس به طور معناداری بیشتر از ساکارومایسز سرویزیه (۶۶/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) و کاندیدیا آلبیکنس (۵۸/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) بود ($p<۰/۰۵$).

بحث

امروزه، روغن‌ها و اسانس‌های گیاهی متعددی جهت مصارف ضد قارچی و مخمری در صنایع داروئی و غذائی به کار می رود. این روغن‌ها و عصاره‌ها حاوی متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات با پایه ساختارهای ایزوپرنی هستند که تحت عنوان ترپن‌ها شناخته می‌شوند. مشتقات ایزوپرن‌ها که در ترکیبات گیاهی وجود دارد شامل دی ترپن‌ها، تری ترپن‌ها و تتراترپن‌ها هستند که به صورت همی ترپن‌ها و سسکوئی ترپن‌ها وجود دارند[16]. ساختار مولکولی ترپن‌ها دارای ویژگی هیدروفوب بوده و این مولکول‌ها قادرند بر روی ساختار چربی دوست غشاء پلاسمائی میکرو ارگانیسم‌ها رسوب کنند. این امر باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و متعاقب آن از دست دادن الکترولیت‌های ضروری برای حیات سلول می‌گردد[17]. مکانیسم عمل دیگر ضد میکروبی ترکیبات ترپنی، مانعت از جوانه زدن اسپور، تکثیر قارچ و تنفس سلولی می‌باشد[18]. در این مطالعه، اثر ضد مخمری سه ترکیب اوژنول، منتول، لینالول بر روی مهار رشد چند مخمر مهم آلوده کننده مواد غذائی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

اوژنول یک ترکیب فنیل پروپن بوده و اثرات ضد میکروبی این ترکیب به علت حضور گروه‌های هیدروکسیل آزاد، پیوند دوگانه در موقعیت‌های آلفا و بتا زنجیره جانبی و گروه متیل واقع در موقعیت گاما آن می‌باشد[19]. در مطالعه انجام شده توسط *El-Baky* و همکاران، حداقل غلظت مهاری رشد و اوژنول و لینالول برای کاندیدا آلبیکنس برابر با ۲۵ میلی مولار و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب برابر با ۲۵ و ۵۰ میلی مولار گزارش شد[20]. به علاوه، مطالعات متعددی در گذشته فعالیت و اثرات ضد قارچی اوژنول را بر ضد مخمرها و قارچ‌های رشته ای همچون گونه‌های قارچی آلوده کننده مواد غذائی و قارچ‌های بیماری‌زای انسانی گزارش کرده‌اند[21,22]. در مطالعه حاضر، یافته‌ها نشان داد که ترکیب فنولی اوژنول در غلظت‌های کمتری در مقایسه با دو ترکیب مورد مطالعه، منتول و لینالول، دارای خاصیت ضد مخمری هستند و در با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر باعث مهار رشد مخمرهای آلوده کننده مواد غذائی بوده و در همین بازه غلظت اثر کشندگی بر روی سویه‌های مورد مطالعه داشت.

لینالول یکی از متداولترین ترپنوئیدها است که دارای یک مولکول اکسیژن اضافه است که یک گروه متیل به واسطه آنزیم اختصاصی از آن حذف شده است[23]. خصوصیات ضد قارچی و ضد بیوفیلمی لینالول بر روی کاندیدا تروپیکالیس (*Candida tropicalis*) توسط *سوزا* و همکاران مشاهده شد[24]. به علاوه، گزارشاتی مبنی بر اثرا ضد باکتریائی و ضد قارچی لینالول بر روی استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، اشرشیا کلی (*Escherichia coli*)، آسپرژیلوس نیجر[25] و ایزوله‌های بالینی و غیر بالینی کاندیدا آلبیکنس وجود دارد[26]. یافته‌های حاصل از مطالعه ما نیز موید خاصیت ضد مخمری ترکیب لینالول در بازه ۶۶/۷ تا ۱۳۳/۳میکروگرم بر میلی لیتر بود.

منتول ترپنوئیدی است که در گیاهان خانواده نعناع همچون نعناع فلفلی و نعناع کوهی دیده می‌شود. در مطالعه انجام شده توسط *عباس زاده* و همکاران، اثرات ضد قارچی این ترکیب بر گونه‌های کلادوسپوریوم (*Cladosporium*)، گونه‌های آسپرژیلوس، فوزاریوم اکسیزپوروم، گونه‌های پنیسیلیوم (*Penicillium*) ، ریزوپوس اوریزائی (*Rhizopus oryzae*)، بوتریتیس سینره آ (*Botrytis cinerea*) و آلترناریا آلترناتا (*Alternaria alternat*) گزارش شده است[27]. به علاوه، فعالیت ضد قارچی قوی منتول بر ضد قارچ‌های بیماریزای آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) آسپرژیلوس فومیگاوس، آسپرژیلوس نیجر و فوزاریوم اکسیزپوروم وسط تیم تحقیقاتی کاظمی و همکاران مشاهده شد[28]. همچنین دیده شده است که این ترکیب در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای خواص کشندگی برای اسپور قارچ‌های آسپرژیلوس نیجر و ریزوپوس استولونیفر (*Rhizopu stolonifers*) می‌باشد[29]. اگرچه خواص ضد قارچی منتول به وضوح مشخص نشده است اما به نظر می رسد این فعالیت را از طریق اختلال در لیپید غشاء پلاسمائی و در نتیجه آن تغییر در نفوذپذیری و نشت مواد و یون‌های داخل سلولی انجام می دهد[30]. در مطالعه حاضر، رفتار و فعالیت منتول شبیه ترکیب لینالول بود و با غلظت مشابه اثرات مهاری و کشندگی بر روی سویه‌های مخمر مورد مطالعه داشت.

نتیجه گیری

در مجموع، بر اساس یافته‌های این مطالعه می توان عنوان کرد ترکیبات فنولی طبیعی منتول، لینالول و اوژنول دارای تاثیرات سمی و ضد مخمری هستند که قادرند در غلظت‌های کم مانع رشد تمامی مخمرهای آلوده کننده مواد غذائی مورد مطالعه شوند. از آنجائیکه تحقیق حاضر ارائه کننده نتایج آزمایشگاهی می‌باشد، مطالعات بیشتر در سطح مدل‌های حیوانی و انسانی ضروری است.

تشکر و قدردانی: از کلیه عزیزانی که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می نماییم.

تاییدیه اخلاقی: پژوهشگران کلیه قوانین اخلاقی مرتبط با تحقیقات بر روی میکروارگانیسم‌ها را رعایت نمودند.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع مالی: هزینه‌های این مطالعه به صورت شخصی تامین شده است.

سهم نویسندگان: سپیده عباس زاده (نویسنده اول، ۳۵٪)، عقیل شریف زاده(نویسنده دوم، ۳۵٪) و حمیده محمودزاده حسینی (نویسنده مسئول، ۳۰٪).

منابع

1- Boekhout T, Robert, V. Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects. Hamburg, Germany.: B.Behr's Verlag GmbH & Co.; 2003.

2- Ho PH, Luo JB, Adams MC. Lactobacilli and dairy propionibacterium with potential as biopreservatives against food fungi and yeast contamination. Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia. 2009;45(4):460-4.

3- Wagacha JM, Muthomi JW. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. International journal of food microbiology. 2008;124(1):1-12.

4- Davidson PMaB, A.L. Antimicrobials in Food. In: Davidson PM, Sofos, J.N., and Branen, A.L., editor. London: Boca Raton: CRC Press/Taylor Francis; 2005.

5- Lopez-Malo A, Alzamora SM, Palou E. Aspergillus flavus dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. Int J Food Microbiol. 2002;73(2-3):213-8.

6- Alviano WS, Mendonca-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padron T, Rodrigues ML, et al. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiol Immunol. 2005;20(2):101-5.

7- Kunduhoglu B. Anti-Yeast Activity of Cinnamaldehyde, Eugenol and Linalool. World Journal of Research and Review 2017;5(5):32-4.

8- Carrasco H, Raimondi M, Svetaz L, Di Liberto M, Rodriguez MV, Espinoza L, et al. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. Molecules. 2012;17(1):1002-24.

9- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53.

10- Oussalah M CS, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coliO157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. 2007;18(5):414-20.

11- Hassan HA, Geniady MM, Abdelwahab SF, Abd-Elghany MI, Sarhan HA, Abdelghany AA ,et al. Topical Eugenol Successfully Treats Experimental

Candida albicans-Induced Keratitis. Ophthalmic Res. 2018;60(2):69-79.

12- Guedes da Silva I, de Pontes Santos H, Cavalcanti Y, Weege Nonaka C, Alves de Sousa S, Dias de Castro R. Antifungal Activity of Eugenol and its Association with Nystatin on Candida albicans. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clinica Integrada 2017;17(1):e3235.

13- Dewang PM, Nikumbh VP, Tare VS, Mahulikar PP. Eco-friendly Pest Management Using Monoterpenoids II—Antifungal Efficacy of Menthol Derivatives. Journal of Scientific& Industrial Research 2003;62:990-5.

14- Sharifzadeh A, Khosravi AR, Shokri H, Tari PS. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical Candida glabrata and Candida krusei isolates. Microb Pathog. 2017;107:390-6.

15- Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. Oral microbiology and immunology. 2005;20(2):106-11.

16- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4.82-564:(

17- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. Food Chem Toxicol. 2008;46(2):446-75.

18- de Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Costa EM, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against Candida species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. BMC Complement Altern Med. 2015;15:417.

19- Jung HG, GC F. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: A review. Journal of Animal Science.1983;56:(1);206-19.

20- El-Baky RMA, Hashem ZS. Eugenol and linalool: Comparison of their antibacterial and antifungal activities. African Journal of Microbiology Research. 2016;10(44):1860-72.

21- Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. J Agric Food Chem. 2005;53(17):6939-46.

22- Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C, et al. Antioxidant properties of the essential oil of Eugenia caryophyllata and its antifungal activity against a large number of clinical Candida species. Mycoses. 2007;50(5):403-6.

23- Caballero B, Trugo LC, PM F. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. ed n, editor. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press; 2003.

24- Souza CM, Pereira Junior SA, Moraes Tda S, Damasceno JL, Amorim Mendes S, Dias HJ, et al. Antifungal activity of plant-derived essential oils on Candida tropicalis planktonic and biofilms cells. Med Mycol. 2016;54(5):515-23.

25- Hussain AI, Anwar F, Hussain Sherazi ST, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. Food Chem. 2008;108(3):986-95.

26- Hsu CC, Lai WL, Chuang KC ,Lee MH, Tsai YC. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in Candida albicans. Med Mycol. 2013;51(5):473-82.

27- Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. J Mycol Med. 2014;24(2):e51-6.

28- Kazemi M, Rostami H, Shafiei S. Antibacterial and Antifungal Activity of some Medicinal Plants from Iran. Journal of Plant Sciences. 2012;7(2):55-66.

29- Mathur A, Prasad GBKS, Rao N, Babu P, Dua VK. Isolation And Identification Of Antimicrobial Compound From Mentha Piperita L. Rasayan Journal of Chemistry. 2011;4(1): 36-42.

30- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(6):2474-8.