E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/
Vol. 37, No.1. (2024) Spring, 117-129
https://doi.org/10.22051/jab.2023.43790.1571

Paper Type: Original Article

Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Different Extracts of *Vitis vinifera* L. cv. Ghizil Uzumskin and Seeds extracted by Deep Eutectic Solvents and Ultrasonic

Hossein Mikaeili[1], Hossein Tajik[2], Toraj Mehdizadeh[*3]

[1]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran;*(Associate Professor: Corresponding author: t.mehdizadeh@urmia.ac.ir).*

Citation:

Mikaeili, H., Tajik, H. & Mehdizadeh, T. (2024). Evaluation of antibacterial and antifungal effects of different extracts of *Vitis vinifera* L. cv. Ghizil Uzumskin and seeds extracted by deep eutectic solvents and ultrasonic. *The quarterly scientific journal of applied biology, Volume* 37 (Issue No. 1), PP. 117-129

Received: 2023.06.10 Accepted: 2024.03.10

Abstract

Introduction: Due to the resistance of pathogenic bacteria and fungi to common drugs and the inclination towards natural food preservatives, researchers are exploring antimicrobial agents of plant with organic origin as alternative compounds. This study aims to investigate the antibacterial and antifungal properties of various extracts of *Vitis vinifera* L. cv. Ghizil Uzum grape skin and seeds extracted through different methods.

Methods: Grape seed and skin extracts were obtained by using maceration, sonication, deep eutectic solvent (DES), and a combination of sonication-DES methods. The antibacterial and antifungal properties of the extracts were determined by using the agar well diffusion method, as well as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) or minimum fungicidal concentration (MFC) against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* as well as on *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Cladosporium* and *Penicillium citrinum*.

Results: The results showed that the combined sonication-DES method had the lowest MIC (0.78 mg/ml) and MBC (1.56 mg/ml) for the skin and seed extracts, indicating the effectiveness of this method in extracting phenolic compounds compared to other conventional methods ($p \leq 0.05$). Additionally, *L. monocytogenes* and *S. aureus* exhibited the lowest MIC and MBC values among the tested bacteria, while *Cladosporium* showed the lowest MIC and MFC among the fungi.

Conclusion: Furthermore, grape seed extract obtained through the sonication-DES method demonstrated higher capability in controlling and inhibiting the growth of pathogenic bacteria, fungi and spoilage microorganisms compared to other extraction methods, making it a promising extraction method for herbal compounds.

Keywords: Antimicrobial, Deep eutectic solvents, Ghizil Uzum, Ultrasonic

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۷، شماره ۱، پیاپی ۷۹، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۱۲۹-۱۱۷
https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2023.43790.1571

نوع مقاله: پژوهشی

بررسی خصوصیات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های مختلف پوست و بذر انگور قزل اوزوم (*Vitis vinifera* L. cv. Ghizil Uzum) استخراج شده به روش‌های حلال اوتکتیک عمیق و اولتراسونیک

حسین میکائیلی[۱]، حسین تاجیک[۲]، تورج مهدی زاده[۳*]

[۱]کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
[۲]استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
[۳]دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
(*نویسنده مسئول: *T.mehdizadeh@urmia.ac.ir*)

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

چکیده

مقدمه: به دلیل مقاومت باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا به داروهای رایج و از طرفی تمایل به نگهدارنده‌های غذایی با منشاء طبیعی محققین در پی یافتن عوامل ضد میکروبی با منشاء گیاهی و ارگانیک به عنوان ترکیبات جایگزین هستند. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های ضد قارچی عصاره‌های مختلف استخراج شده به روش‌های حلال اوتکتیک عمیق و اولتراسونیک بود.

روش‌ها: عصاره هسته و پوست انگور به روش‌های ماسیراسیون (Maceration extraction)، سونیکاسیون (Sonication)، حلال‌های یوتکتیک عمیق (Deep eutectic solvents) و روش ترکیبی سونیکاسیون- حلال های یوتکتیک عمیق استخراج شد. خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی با شاخص‌های اندازه قطر هاله مهاری و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhimurium*، *Escherichia coli* و *Listeria monocytogenes* و همچنین بر روی قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Fusarium solani*، *Cladosporium* و *Penicillium citrinum* ارزیابی و تعیین شد.

یافته‌ها: کمترین مقدار مهارکنندگی (۰/۷۸) و کمترین مقدار کشندگی (۱/۵۶) میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به عصاره‌های پوست و هسته استخراج شده به روش ترکیبی سونیکاسیون- حلال های یوتکتیک عمیق بود که نشان از کارایی این روش، نسبت به سایر روش‌های مرسوم است ($p\leq0.05$). *L. monocytogenes* و *S. aureus* از باکتری‌ها و *Cladosporium* از قارچ‌ها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بطور معنی داری دارای کمترین میزان غلظت مهار کنندگی و غلظت کشندگی بودند ($p\leq0.05$).

نتیجه‌گیری: عصاره هسته و پوست انگور استخراج شده به روش سونیکاسیون-حلال های یوتکتیک عمیق، از قابلیت بالاتری در کنترل و مهار رشد باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزا و عامل فساد برخوردار است و می تواند به عنوان یک روش استخراج کارا برای ترکیبات گیاهی استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: استخراج با یوتکتیک عمیق، انگور قزل اوزوم، سونیکاسیون، ضد میکروبی

مقدمه

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بویژه باکتری‌ها و قارچ‌ها، به عنوان اصلی‌ترین عامل بیماری‌زای عفونی و آلودگی مواد غذایی مطرح اند. با وجود استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها و ضدقارچ‌های سنتزی و نیمه سنتزی به عنوان عامل درمانی و یا نگهدارنده در مواد غذایی؛ استفاده از ترکیبات گیاهی همچون عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با قدرت کنترل سویه‌های مقاوم، عوارض جانبی کمتر و تهیه سریع تر و ارزان‌تر می‌تواند گزینه مناسبی جهت استفاده در صنعت غذا باشد. بدین منظور مطالعات زیادی بروی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضد قارچی انواع گیاهان، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است که حاکی از قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیزم‌های عامل فساد مواد غذایی است. از آنجا که این ترکیبات طبیعی و در بسیاری از موارد حاوی ترکیبات موثر دیگری است، لذا به منظور حفظ سلامت بسیار مورد تاکید می باشد. بطوریکه عصاره‌های گیاهی ممکن است ابزاری موثر و سودمند برای از بین بردن برخی از بیماری‌ها و تقویت سیستم دفاعی بدن در برابر میکروارگانیسم‌ها و رادیکال‌های آزاد باشد [1].

ارزش غذایی و درمانی انگور بیش از هزاران سال است که شناخته شده است. امروزه انگور تازه برای درمان بسیاری از امراض نظیر سرطان، عفونت چشم، پوست و بیماری های کلیه و کبد تجویز می‌شود. نتایج تحقیقات نشان داده است که ترکیبات استخراج شده از هسته انگور دارای خواص ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی است [2]. تحقیقات بسیاری نیز در این مورد صورت پذیرفته است که نقطه مشترک همه آن‌ها اثبات وجود ترکیبات فراوان فنولیک در ساختار ترکیبات جدا شده از هسته انگور است [1]. همچنین ثابت شده است استفاده از ترکیبات روغن هسته انگور باعث ممانعت از رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های مختلف می‌شود [3]. انگور رقم قزل اوزوم (*Vitis vinifera* L.cv. Ghizil Uzum) در استان آذربایجان غربی بدلیل رنگ جذاب، حبه های درشت و دانه دار با پوست ضخیم و قدرت انبارمانی بسیارخوب و از همه مهمتر قیمت بالای محصول در بازار مورد توجه باغداران است. با توجه به ماندگاری بالای این محصول فرضیه وجود ترکیبات ضدمیکروبی و نیز آنتی‌اکسیدان در مقادیر بالا در محتوی آن محتمل است.

نحوه استخراج و نوع حلال یکی از مهمترین عواملی است که می‌تواند بر استخراج ترکیبات ضدمیکروبی و در نهایت توانایی بیشتر این عصاره در ارتباط با میکروارگانیسم‌های مختلف، تاثیر داشته باشد. به طور کلی، این فرآیند یک روش جداسازی است که در آن توزیع آنالیت بین دو مرحله غیر قابل اختلاط به منظور ضریب توزیع مناسب انجام می‌شود. هدف اصلی فرایند استخراج، جداسازی انتخابی اجزای هدف از نمونه در حداکثر مقدار و یا حذف تداخل‌هاست. استخراج ترکیبات فعال گیاهی از بافت‌ها با استفاده از فرآیندهای سنتی و با کمک حلال‌هایی مانند متانول، اتانول، استون و همچنین از طریق تقطیر بخار انجام می‌شود [۴] . یکی از روش های استخراج، اولتراسونیک (Ultrasonic) است که انجام آن با تجهیزات آزمایشگاهی رایج به عنوان مثال حمام اولتراسونیک انجام می‌شود [5]. در این میان در سال‌های اخیر نسل جدیدی از حلال‌های سبز با نام حلال های یوتکتیک ژرف (Deep eutectic solvents) معرفی شده‌اند که ضمن زیست سازگار بودن، به آسانی سنتز شده و ارزان قیمت نیز هستند. در این ترکیبات با مخلوط کردن دو یا چند ماده سازنده ارزان و زیست تخریب‌پذیر که مستعد ارتباط بین خود هستند، یک مخلوط یوتکتیک تشکیل می‌شود که این فرآیند بیشتر از طریق تجزیه در پیوندهای هیدروژن رخ می‌دهد. نقطه ذوب این ترکیب بسیار کمتر از ترکیبات تکی است. این مواد معمولاً سمیّت کم، پایداری حرارتی عالی، دامنه مایع گسترده و غیر فرار، غیر قابل اشتعال و زیست تخریب‌پذیر هستند. علاوه بر آن‌ها در تجزیه، فرآوری فلز، الکتروشیمی و برای استخراج طیف وسیعی از ترکیبات فعال غیرقطبی و قطبی از مواد گیاهی در ترکیب با استخراج گرمایشی، استخراج با کمک سونوگرافی و مایکروویو نیز کاربرد گسترده‌ای دارند [6]. در این میان پایداری عالی ترکیبات فنولیک مبتنی بر قندها احتمال کاربرد نوین از این حلال در صنایع غذایی و دارویی را بالا برده‌است.

به استناد مطالب فوق و اهمیت خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی انگور و همچنین با توجه به بررسی‌های صورت گرفته تاکنون تحقیق جامعی در ارتباط با بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره هسته و پوست این نوع از انگور به روش های معمول ماسیراسیون، حلال‌های یوتکتیک عمیق و اولتراسوند انجام نپذیرفته است. لذا هدف از این مطالعه مقایسه خصوصیات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌های مختلف پوست و هسته انگور قزل اوزوم استخراج شده به روش‌های حلال یوتکتیک عمیق و اولتراسونیک است.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

پس از تهیه انگور از تاکستان‌های شهرستان ارومیه و تایید علمی آن توسط متخصص کشاورزی دانشگاه ارومیه، جداسازی پوست و هسته انگور کاملا رسیده انجام شد. پوست و هسته در سایه و در دمای محیط خشک شد. سپس نمونه ها توسط آسیاب پودر و از الک (۶۰ مش) عبور داده شد. از نمونه های پودر شده پوست و هسته، جهت تهیه عصاره استفاده شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی پوست و هسته انگور

برای تهیه عصاره هیدروالکلی به روش ماسیراسیون ۲۰۰ گرم از پودر گیاه با یک لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس از کاغذ صافی عبور داده شده و در نهایت به منظور حذف حلال، نمونه‌ها در دستگاه روتاری تحت خلاء (Heidolph, Schwabach, Germany) قرار گرفت. در نهایت جهت تغلیظ نهایی، در آون ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد [7].

تهیه عصاره به روش حلال یوتکتیک عمیق

برای این منظور از روش تغییریافته Hsieh و همکاران (۲۰۲۰) [6] استفاده شد. بدین منظور ابتدا کولین کلراید و گلیسرول (Sigma-Aldrich, Germany) به نسبت ۱ به ۲ مخلوط و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بر روی هات پلیت شیکر به مدت ۶۰ دقیقه هم زده شد تا محلول شفافی بدست آید. سپس به یک گرم از پودر انگور (پوست و دانه) ۱۵ سی سی از حلال آماده شده، اضافه شد. محلول در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بر روی هات پلیت شیکر به مدت ۴۰ دقیقه هم زده و در مرحله بعدی از فیلتر کاغذی عبور داده شد و در پلیت‌های شیشه ای ریخته شد و سپس با دستگاه لیوفیلیزاتور (زیست فرآیند تجهیز سهند) خشک شد. عصاره‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند [6].

تهیه عصاره به روش حلال یوتکتیک عمیق همراه با سونیکاسیون

برای این منظوربه یک گرم از پودر انگور (پوست و دانه) به ۱۵ سی سی از حلال آماده شده، اضافه شد. محلول در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بر روی هات پلیت شیکر به مدت ۴۰ دقیقه هم زده شد و سپس در حمام اولتراسونیک با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه با قدرت ۱۴۰ وات و فرکانس ۳۷ کیلو هرتز قرار داده شد و در نهایت به مدت ۱۱ دقیقه و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی برداشته و با دستگاه لیوفیلیزاتور (زیست فرایند تجهیز سهند) خشک شد. عصاره تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد [6].

تهیه غلظت‌ها از پوسته و هسته انگور

ابتدا مقادیر مورد نظر از عصار ه‌های پوسته و هسته بطور جداگانه وزن شد و به سه لوله آزمایش انتقال داه شد. جهت تهیه رقت‌ها از محلول DMSO (Sigma-Aldrich, Germany) ۵ درصد استفاده شد. پس از ورتکس نمودن، محتویات از فیلتر سرنگی پلی‌تترافلوئورواتیلن (۰/۴۵ میکرومتر) استریل عبور داده و به لوله‌های فالکون استریل انتقال داده شد.

تهیه و آماده سازی سوش‌های باکتریایی و قارچی

باکتری‌های *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115)، *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)، *Staphylococcus* aureus (PTCC 1112)، *Escherichia* coli (ATCC 25922) و قارچ های *Aspergillus flavus* (PTCC 5006)، *Penicillium* citrinum (PTCC 5304)، Cladosporium (PTCC 5202) و *Fusarium solani* (PTCC 5284) از سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه شدند. برای تهیه کشت تازه میکروبی، یک کلنی از باکتری مورد نظر بر روی محیط جامد آگار (Quelab, Canada) منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. سپس یک کلنی از باکتری به محیط نوترینت براث آگار (Quelab, Canada) انتقال داده شد. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت، غلظتی از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی لیتر) تهیه شد. برای قارچ ها نیز یک کلونی از کپک های تازه فعال شده در محیط کشت سابرو دکستروز آگار (Quelab, Canada) به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد، پس از آن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به محیط کشت اضافه و سوسپانسیون قارچی تهیه شد. سپس مقداری از سوسپانسیون اسپور را روی لام نئوبار ریخته و با میکروسکوپ نوری شمارش شد و غلظتی معادل $۱۰^{۶}$ اسپور در هر میلی لیتر از سوسپانسیون قارچی جهت انجام آزمایشات ضد قارچی تهیه شد [8].

بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌ها

برای این منظور از دو روش استفاده شد. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration)(MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) (Minimum bactericidal concentration) و حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) (Minimum fungicidal concentration) از روش براث میکرودایلوشن (Broth microdilution) استفاده شد. در این روش ۹ رقت متوالی از عصاره‌های مورد نظر شامل: ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸، ۰/۳۹، ۰/۱۹ میلی‌گرم، تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق تعریف MBC به طور موثر حداقل غلظت ضد میکروبی است که قادر به غیرفعال کردن بیش از ۹۹.۹۹٪ از میکروب‌های موجود باشد. برای تعیین این مقادیر از مشاهده رشد میکروارگانیسم بصورت ایجاد کدورت در محیط کشت مایع و برای تایید نیز از کشت و شمارش بروی محیط کشت جامد استفاده شد. در روشی دیگر برای بررسی قدرت ضد میکروبی عصارهها از روش انتشار در چاهک استفاده شد. برای این منظور نیز میزان‌های مورد نظر برای تهیه عصاره در غلظت‌های ۲،۱ و۳ میلی گرم از عصاره‌های پوسته و هسته بطور جداگانه استفاده شد. برای کنترل منفی از دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۵ درصد، برای کنترل مثبت در تست‌های ضد باکتریایی از دیسک آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم و برای تست‌های ضد قارچی از مایکونازول ۱۰ میکروگرم استفاده شد [9]، [10].

تجزیه و تحلیل آماری

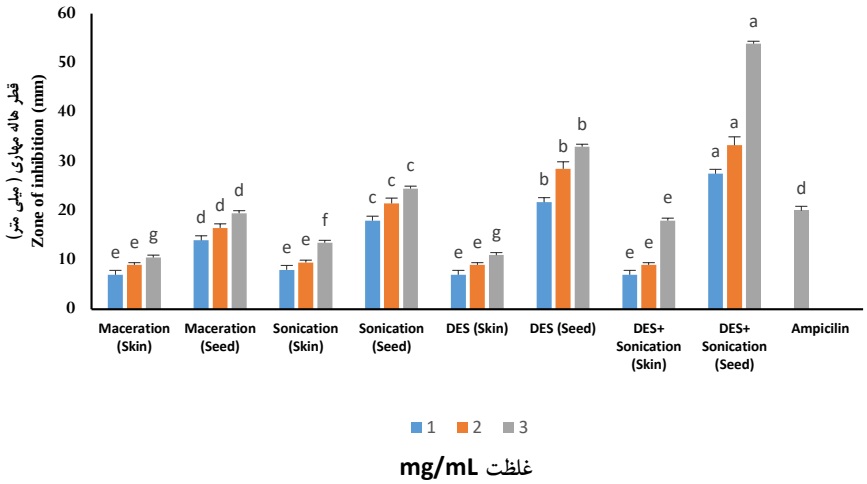
کلیه آزمایش‌ها بصورت سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه ۲۷ (IBM , USA, SPSS Statistics 27.0) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۹ (Excel Office Microsoft, USA) ترسیم شدند.

نتایج و بحث

نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی عصارهها به روش انتشار در چاهک

بر اساس نتایج ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف، همانطور که در **شکل‌های ۱** الی **۴** نشان داده شده است. باکتری *S. aureus* در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از هسته انگور، بیشترین قطر هاله مهاری رشد (۵۳/۹ میلی متر) در عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطرهاله مهاری رشد (۱۴ میلی متر) را در عصاره استخراج شده به روش ماسیراسیون نشان داد ($p\leq0.05$). همچنین این باکتری، بیشترین قطرهاله مهاری رشد (۱۸ میلی متر) را در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از پوست انگور به روش سونیکاسیون و کمترین قطر هاله مهاری رشد (۷ میلی متر) را در عصاره‌های استخراج شده به روش ماسیراسیون و DES داشت ($p\leq0.05$). با افزایش غلظت عصاره‌ها از یک به ۳ میلی‌گرم نیز قطر هاله ممانعت از رشد، افزایش یافت (**شکل ۱**).

بیشترین قطر هاله مهاری رشد باکتری *E.* coli (۶۹/۱ میلی متر) در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از هسته انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطر هاله مهاری رشد (۹/۱ میلی متر) مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون است. همچنین بیشترین قطر هاله مهاری رشد (۱۸/۵ میلی متر) باکتری *E. coli* در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از پوست انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطر هاله مهاری رشد (۹ میلی متر) مربوط به عصاره‌های استخراج شده به روش ماسیراسیون است ($p\leq0.05$) (**شکل ۲**).

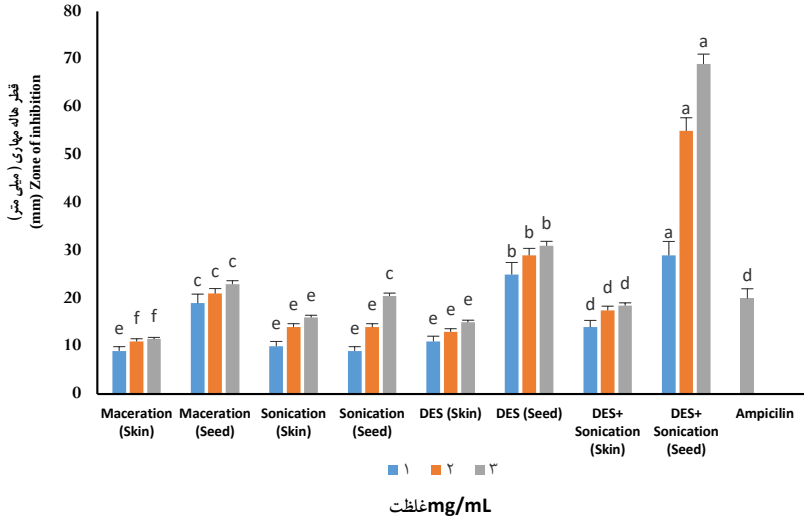


شکل ۱- قطر هاله مهاری رشد باکتری *S. aureus* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 1- Inhibitory growth diameter of S. aureus in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p\leq0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p\leq0.05$)



شکل ۲- قطر هاله مهاری رشد باکتری *E. coli* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

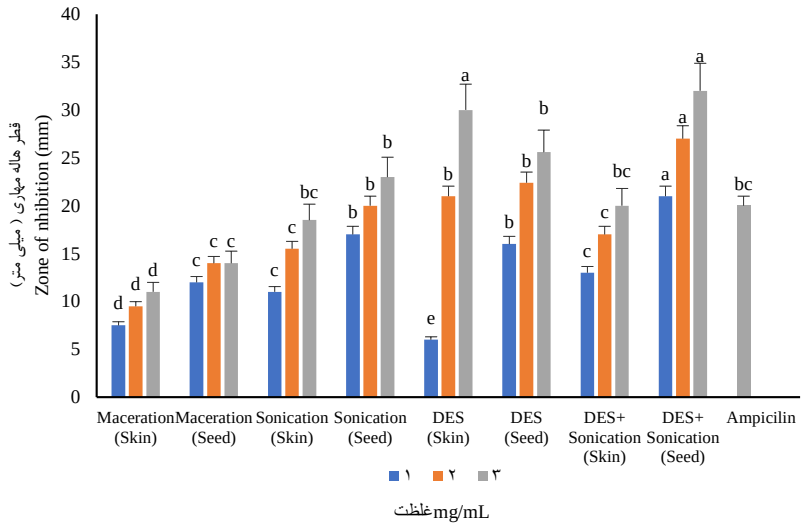
Figure 2- Inhibitory growth diameter of *E. coli* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p\leq0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p\leq0.05$)

بیشترین قطر هاله مهاری رشد باکتری *L. monocytogenes* (۳۲ میلی متر) در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از هسته انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES وکمترین قطر هاله مهاری رشد (۱۲ میلی متر) مربوط به عصاره استخراج شده به روش ماسیراسیون است. همچنین بیشترین قطر هاله مهاری رشد (۳۰ میلی متر) باکتری *L. monocytogenes* در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از پوست انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش DES و کمترین قطر هاله مهاری رشد (۷/۵میلی متر) مربوط به عصاره‌های استخراج شده به روش ماسیراسیون است ($p\leq0.05$) (**شکل ۳**).

همچنین بیشترین قطر هاله مهاری رشد (۳۶ میلی متر) باکتری *S.typhimurium* در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از هسته انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین آن (۱۱ میلی متر) مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون بود. در این میان در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از پوست انگور بیشترین (۳۲ میلی متر) قطر هاله مهاری رشد باکتری *S.typhimurium*، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطر هاله مهاری رشد (بدون هاله) مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون و ماسیراسیون بود. همچنین طبق نتایج بین غلظت‌های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p\leq0.05$) (**شکل ۴**).



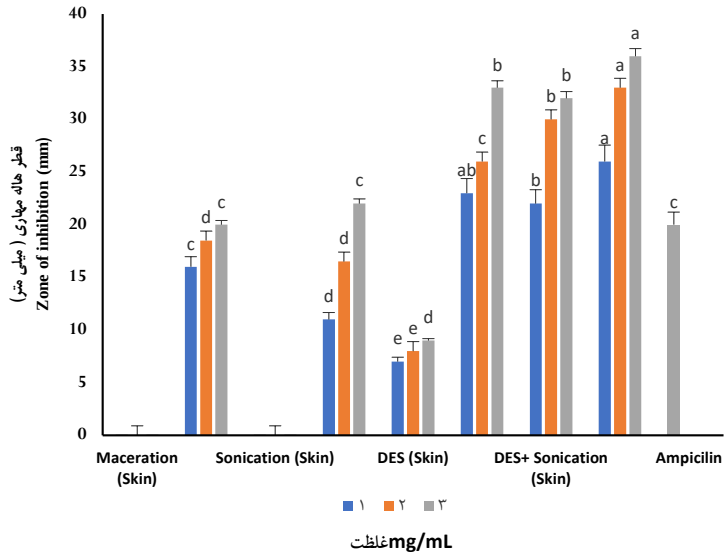
شکل ۳- قطر هاله مهاری رشد باکتری *L. monocytogenes* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 3- Inhibitory growth diameter of *L. monocytogenes* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p\leq0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p\leq0.05$)

عصاره‌ی استخراج شده پوست و هسته انگور، غنی از پلی‌فنول‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها است که میزان و کیفیت آنها در گونه ها و رقم‌های مختلف انگور متفاوت است. پلی‌فنول‌ها و متابولیت‌های آن بسته به ساختار شیمیایی و غلظتشان، می‌تواند به عنوان فعال کننده یا بازدارنده رشد میکروبی عمل کند. این متابولیت‌ها به طور انتخابی از رشد پاتوژن‌های مواد غذایی جلوگیری می‌کنند و رشد باکتری‌های همزیست شامل تعدادی از پروبیوتیک‌ها را تحریک می کنند، بنابراین فلور میکروبی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. علاوه بر این، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالقوه و اثر سینرژیستی در فعالیت‌های ضد میکروبی در ترکیب با اسیدهای آلی (اسید مالیک، اسید تارتاریک، اسید بنزوئیک و غیره) است. طبق نتایج به دست آمده عصاره‌های استخراج شده از پوست و هسته انگور قزل اوزوم را می‌توان به عنوان یک جایگزین طبیعی مؤثر برای کنترل مسمومیت غذایی ناشی از پاتوژن‌های مواد غذایی به ویژه *S. aureus* با ایمنی مناسب به‌کار برد.



شکل ۴- قطر هاله مهاری رشد باکتری *S. typhimurium* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 4- Inhibitory growth diameter of *S. typhimurium* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p \leq 0.05$)

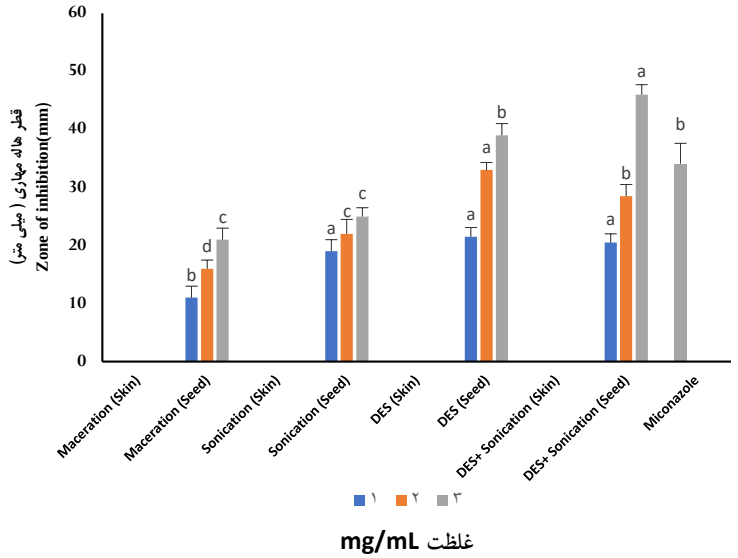
The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p \leq 0.05$)

Pavić و همکاران (۲۰۱۹) [8] همچنین نشان دادند افزودن عصاره هسته انگور به محیط کشت حاوی میکروارگانیسم‌های *E. coli*، *Aeromonas hydrophila* و *S. aureus* که در بهداشت مواد غذایی از مهمترین باکتری‌های بیماریزا محسوب می‌شود، اثرات ضدمیکروبی در آن ایجاد می‌کند [8]. بر اساس تحقیقی دیگر نشان داده شده است که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره دانه انگور بیشتر از گرم منفی‌ها است که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت دارد [11]. در تحقیقی مشابه اثر ضد میکروبی عصاره هسته انگور بر روی *S. aureus*، *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* جداسازی شده از عفونت مجاری ادراری بررسی شد و باکتری *S. aureus* به میزان بیشتری نسبت به سایرباکتری‌ها مهار شد که نشان از خاصیت باکتری کشی این عصاره است، و با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد [2]. در تحقیقی دیگر ترکیبات تشکیل دهنده عصاره هسته انگور مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از بالا بودن پروسیانیدین‌های مونومری در عصاره حاصل بود و نشان داده شد که این عصاره دارای خاصیت ضد باکتریایی است [12]. محققین نشان داده‌اند که باکتری گرم منفی *E. coli* نسبت به باکتری گرم مثبت *S. aureus* به عصاره استخراج شده با حلال های یوتکتیک عمیق مبتنی بر اسید مانند کلین کلراید حساس تر است [2] که با تحقیق ما همخوانی ندارد. طبق موارد اثبات شده قبلی، باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت مقاومت بیشتری دارند زیرا دیواره سلولی آنها حاوی لیپوپلی ساکارید محافظ است.

در پژوهش انجام گرفته توسط Baydar و همکاران (۲۰۰۴) [2] نشان داده شد که با افزایش میزان عصاره هسته انگور به محیط کشت حاوی میکروارگانیسم‌های مهم نظیر *Aeromonas hydrophila*، *E. coli* سویهO157:H7 و *S. aureus* با افزودن ۰/۵ و ۱ درصد عصاره هسته انگور به محیط کشت حاوی این میکروارگانیسم‌ها خاصیت مهارکنندگی در برابر رشد میکروارگانیسم‌ها داشته و در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد به خاصیت باکتری‌کشی آن افزوده شد به گونه ای که در غلظت ۲/۵ و ۵ درصد و در مدت زمان ۹۶ ساعت بطور کامل مانع از رشد این میکرو ارگانیسم‌ها بویژه *E. coli* شده است [2]. در مطالعه‌ایی Pavic و همکاران (۲۰۱۹) [8] از روش DES برای استخراج عصاره از گیاه سداب استفاده کرده و اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن را بررسی کردند. در این مطالعه عصاره، بهترین کارایی ضد باکتریایی را در برابر تمامی سویه های گرم منفی مورد آزمایش به ویژه *P. aeruginosa* نشان داد [13].

نتایج خصوصیات ضد قارچی عصاره‌ها به روش انتشار در چاهک

نتایج اثرات ضد قارچی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در **شکل‌های ۵** الی **۸** نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بین قطر هاله مهاری رشد توسط انواع عصاره‌های پوست و هسته انگور مورد مطالعه و غلظت‌های مختلف آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در مجموع با افزایش غلظت، میزان قطر هاله مهاری رشد افزایش یافت. از طرف دیگر روش استخراج در عملکرد ترکیبات ضدقارچ عصاره نیز نقش داشت ($p \leq 0.05$).

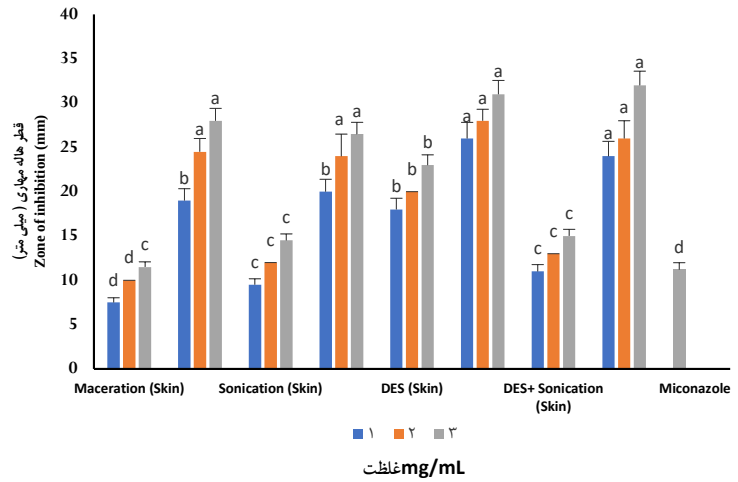


شکل ۵- قطر هاله مهاری رشد قارچ *Cladosporium* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 5- Inhibitory growth diameter of *Cladosporium* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p \leq 0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p \leq 0.05$)



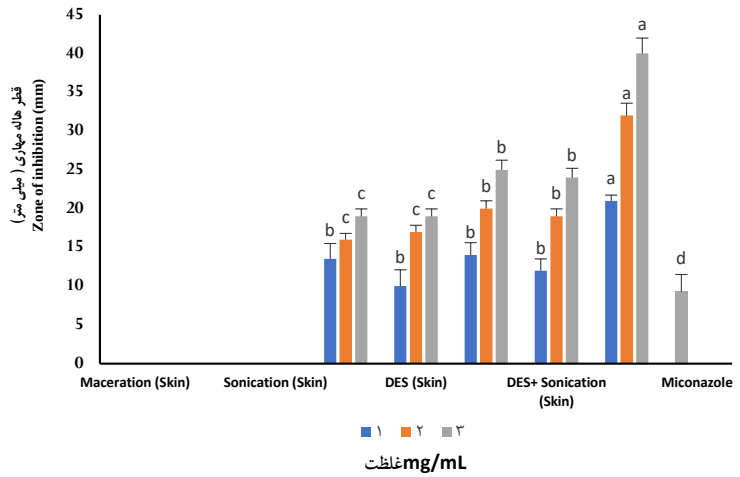
شکل ۶- قطر هاله مهاری رشد قارچ *P. citrinum* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 6- Inhibitory growth diameter of *P. citrinum* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p \leq 0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p \leq 0.05$)

براساس نتایج به دست آمده، از بین روش‌های مورد استفاده بر روی هسته انگور، عصاره‌های استخراج شده با روش ترکیبی سونیکاسیون DES-بیشترین اثر (۴۶ میلی متر) بر روی قارچ *Cladosporium* و عصاره‌های استخراج شده با روش‌های ماسیراسیون و سونیکاسیون کمترین اثر (بدون هاله) را بر روی قارچ‌های *A. flavus*، *Cladosporium* و *F. solani* داشته است. این در حالی است که در عصاره‌های استخراج شده از پوست انگور، عصاره استخراج شده با روش ماسیراسیون DES به ترتیب بیشترین (۲۴ میلی متر) بر روی *F. solani* و کمترین اثر (بدون هاله) بر روی سایر قارچ های مورد تحقیق به غیر از *P. citrinum* را داشته است ($p \leq 0.05$).

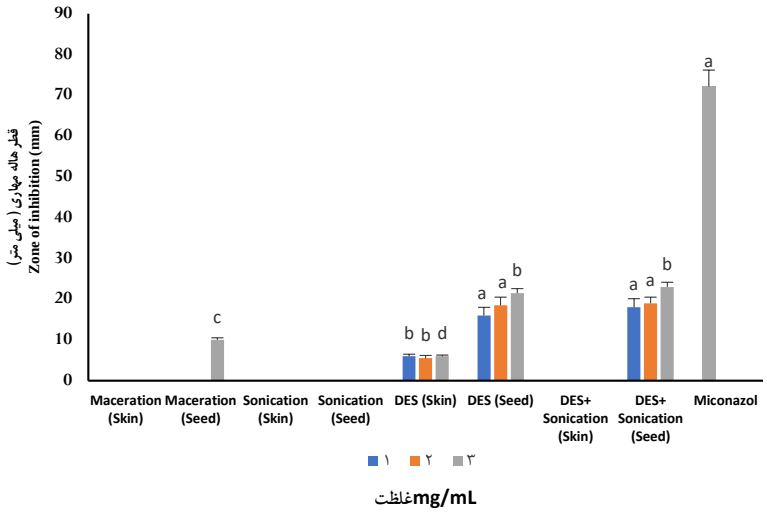


شکل ۷- قطر هاله مهاری رشد قارچ *F. solani* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 7- Inhibitory growth diameter of *F. solani* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p \leq 0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p \leq 0.05$)



شکل ۸- قطر هاله مهاری رشد قارچ *A. flavus* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

Figure 8- Inhibitory growth diameter of *A. flavus* in agar well diffusion method

کنترل منفی حاوی DMSO فاقد هاله بود، حروف کوچک غیر همسان در هر غلظت برای هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنا دار است، ($p \leq 0.05$)

The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference ($p \leq 0.05$)

عصاره هسته و پوست دانه انگور منبع غنی از ترکیبات شیمیایی فعال با اثرات ضد قارچی بوده و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای قارچ کش‌ها به شمار رود. ترکیبات فعال از منشأ گیاهی در محیط پایداری کمتری داشته و روی پستانداران و ارگانیزم‌های غیرهدف اثر ندارد. انسان و همچنین محصولات زراعی و دامی مستعد آلودگی توسط قارچ های بیماری زا بوده و همچنین یکی از مشکلات اصلی مرتبط با فساد مواد غذایی هستند زیرا رشد قارچ در غذاهای خام و فرآوری شده باعث افت خصوصیات ارگانولپتیکی آن‌ها می شود. علاوه بر این برخی از گونه‌ها قادر به تولید مایکوتوکسین ها هستند که سالانه تقریباً ۲۵ درصد کل مواد غذایی جهان را آلوده می کند [14]. یکی از مهم ترین ترکیبات طبیعی در انگورها بخصوص انواع رنگی رسوراترول (Resveratrol) است. رسوراترول یک ترکیب پلی فنولیکی با وزن مولکولی کم است که به گروهی از فیتوالکسین ها (Phytoalexins) به نام استیلبن ها (Stilbenes) تعلق دارد. این ماده توسط برخی از گیاهان در پاسخ به اشعه ماورا بنفش تولید شده و از رشد عوامل بیماریزای قارچی، مانند *Botrytis cinerea* جلوگیری کرده و منجر به کاهش جوانه زنی کندی‌ها و رشد میسیلیوم می‌شود [15]، [16].

در پژوهش Jung و همکاران (۲۰۰۵) [17] نه تنها فعالیت ضد کاندیدایی رسوراترول در غلظت ۱۰-۲۰ میلی گرم در میلی‌لیتر نشان داده شد بلکه اثر قارچ‌کشی رسوراترول بر روی *Candida albicans* با میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز تایید شد [17]. Chan و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲ اثر مهاری رسوراترول بر روی درماتوفیت ها را با حداکثر مهار رشد ۸۰ درصدی به ویژه در برابر *Trichophyton mentagrophytes*، *Trichophyton tonsurans*، *Trichophyton rubrum*، Epidermophyton floccosum و *Microsporum gypseum* در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند [18]. در پژوهش هایی اثر رسوراترول، در برابر گونه های مختلف بررسی شده است. Manimaran و همکاران (۲۰۱۷) هاله ممانعت از رشد ۲ میلی متری برای *A.fumigatus* و ۱/۶ میلی متری برای *A.niger* در غلظت رسوراترول ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را گزارش کردند [19]. در مطالعه‌ای دیگر Filip و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت ضد قارچی رسوراترول را در غلظت ۱۱ میکرو گرم در میلی‌لیتر در برابر A.niger با مهار رشد ۳۶/۴ درصد را نشان دادند [20]. در مطالعه‌ای دیگر عصاره متانولی برگ انگور در برابر قارچ *A.niger* ارزیابی شد. نتایج MIC نشان داد که مقادیر ۷۵/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر در برابر *A.niger* دارای اثر مهاری می‌باشد [13].

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی و قارچ کشی (MBC, MFC)

در **جدول ۱** نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی ضدمیکروبی عصاره هسته و پوست انگور قزل اوزوم بر علیه چهار باکتری *S.typhimurium* ، *L. monocytogenes*، *S. aureus* و *E. coli* با استفاده از روش میکرودایلوشن آمده است.

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی برای تیمارهای مختلف بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر
Table 1- Results of MIC and MBC for different treatments (mg/mL)

Extract preparation method	*L. monocytogenes*		*S. typhimurium*		*S. aureus*		*E. coli*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Maceration (Skin)	12.5[a]	-		-	6.25[a]	-	-	-
Maceration (Seed)	3.12[c]	6.25[b]	6.25[a]	-	1.56[c]	12.5[a]	12.5[a]	-
Sonication (Skin)	6.25[b]	12.5[a]	6.25[a]	12.5[a]	3.12[b]	-	-	-
Sonication (Seed)	1.56[d]	3.12[c]	1.56[b]	6.25[b]	0.78[d]	3.12[c]	6.25[b]	-
DES (Skin)	6.25[b]	12.5[a]	6.25[a]	12.5[a]	-	-	-	-
DES (Seed)	6.25[b]	12.5[a]	1.56[b]	6.25[b]	1.56[c]	6.25[b]	6.25[b]	12.5[a]
DES+ Sonication (Skin)	1.56[d]	6.25[b]	1.56[b]	6.25[b]	6.25[a]	12.5[a]	6.25[b]	12.5[a]
DES+ Sonication (Seed)	0.78[e]	1.56[d]	1.56[b]	6.25[b]	0.78[d]	3.12[c]	6.25[b]	12.5[a]

حروف کوچک غیر همسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنا دار بین تیمارهای مختلف است، ($p \leq 0.05$).

بر اساس نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر کمترین غلظت مهارکنندگی (۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی باکتری‌های *S. aureus* و *L. monocytogenes* و کمترین غلظت کشندگی (۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر) نیز برای باکتری *L. monocytogenes* مربوط به عصاره‌های هسته استخراج شده به روش ترکیبی سونیکاسیون-DES می‌باشد که نشان از کارایی این روش، در استخراج ترکیبات فنلی نسبت به سایر روش‌های مرسوم می‌باشد ($p \leq 0.05$) همچنین در این روش *L. monocytogenes* و *S. aureus* در مقایسه با سایر باکتری‌های مورد مطالعه دارای کمترین میزان MIC و MBC بود که نشان از حساسیت بالای این باکتری‌ها نسبت به ترکیبات فنلی موجود در عصاره هسته و پوست انگور است ($p \leq 0.05$).

در **جدول ۲** نیز نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی عصاره هسته و پوست انگور قزل اوزوم بر علیه چهار قارچ *Cladosporium*، *P. citrinum*، *F. solani* و *A. flavus* با استفاده از روش میکرودایلوشن آمده است.

جدول ۲- نتایج حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی برای تیمارهای مختلف بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر
Table 2- Results of MIC and MFC for different treatments (mg/mL)

Extract preparation method	Cladosporium		*P. Citrinum*		*F. Solani,*		*A. Flavus*	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
Maceration (Skin)	-	-	6.25^{a}	12.5^{a}	-	-	-	-
Maceration (Seed)	6.25^{a}	-	6.25^{a}	12.5^{a}	-	-	6.25^{b}	12.5^{a}
Sonication (Skin)	-	-	3.12^{b}	6.25^{b}	-	-	-	-
Sonication (Seed)	0.78^{c}	3.12^{b}	3.12^{b}	6.25^{b}	3.12^{a}	6.25^{a}	-	-
DES (Skin)	-	-	1.56^{c}	6.25^{b}	1.56^{b}	6.25^{a}	-	-
DES (Seed)	1.56^{b}	6.25^{a}	1.56^{c}	6.25^{b}	1.56^{b}	6.25^{a}	1.56^{a}	6.25^{b}
DES+ Sonication (Skin)	-	-	-	-	1.56^{b}	6.25^{a}	-	-
DES+ Sonication (Seed)	1.56^{b}	6.25^{a}	1.56^{c}	6.25^{b}	1.56^{b}	6.25^{a}	1.56^{a}	6.25^{b}

حروف کوچک غیر همسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنا دار بین تیمارهای مختلف است، ($p\leq0.05$).

بر اساس نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر کمترین (۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر) غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت کشندگی (۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) برای قارچ‌های *A. flavus*، *F. solani* و *P. citrinum* مربوط به عصاره‌های پوست و هسته استخراج شده به روش ترکیبی سونیکاسیون-DES است که نشان از کارایی این روش در استخراج عصاره نسبت به سایر روشهای مرسوم می‌باشد ($p\leq0.05$) در حالیکه کمترین غلظت مهارکنندگی (۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر) و کمترین غلظت کشندگی (۳/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر) برای قارچ *Cladosporium* مربوط به عصاره هسته استخراج شده به روش سونیکاسیون است ($p\leq0.05$). همچنین در این روش، *Cladosporium* در مقایسه با سایر قارچ‌های مورد مطالعه دارای کمترین میزان MIC و MFC بوده که نشان از حساسیت بالای این قارچ نسبت به ترکیبات فنلی موجود در عصاره هسته و پوست انگور است ($p\leq0.05$).

نتیجه‌گیری

انگور قزل اوزوم در استان آذربایجان غربی، از ذخایر ژنتیکی با ارزشی از لحاظ قابلیت تولید و انباشت ترکیبات فنلی و ضد میکروبی برخوردار است. لذا تجاری سازی و استفاده از خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی آن در صنعت غذا و داروسازی، بسیار حائز اهمیت است. آنچه در این مطالعه از اهمیت ویژه ای برخوردار بود بررسی مقایسه ای انواع تکنیک‌های استخراج عصاره نظیر ماسیراسیون، حلال یوتکتیک عمیق و اولتراسونیک بود. از نتایج حاصل از این مطالعه چنین برآورد شد که تمامی تکنیک‌های استخراج عصاره از پوسته و هسته انگور، اعم از ماسیراسیون، اولتراسونیک و حلال یوتکتیک عمیق هر کدام به تنهایی از قابلیت مناسبی در استخراج عصاره، از هسته و پوست انگور برخورداراند، با این حال ترکیب روش‌های اولتراسونیک و حلال یوتکتیک عمیق در استخراج ترکیبات فنلی، از قابلیت بسیار بالاتری نسبت سایر روش‌ها برخوردار است، بطوریکه در تمامی تست‌های صورت گرفته تفاوت معنی داری در میزان خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های تهیه شده از هسته و پوسته انگور نسبت به سایر روش‌ها مشاهده شد که نشان از توانایی بالای این روش است. لذا روش مورد تحقیق می‌تواند به طور کاربردی جهت استخراج ترکیبات فعال با کارایی بالا مورد استفاده قرار گیرد.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ نوع تعارض منافعی وجود ندارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه همکاران دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، بویژه همکاران آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی که در انجام امور تحقیق کمال همکاری را داشتند کمال تشکر را داریم.

منابع

[1] Jayaprakasha, G., Selvi, T. & Sakariah, K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international, 36* (2),117-122.

[2] Baydar, N. G., Özkan, G. & Sağdiç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control, 15* (5), 335-339.

[3] Memar, M. Y., Adibkia, K., Farajnia, S., Kafil, H. S., Yekani, M., Alizadeh, N. & Ghotaslou, R. (2019). The grape seed extract: a natural antimicrobial agent against different pathogens. *Reviews and Research in Medical Microbiology, 30* (3), 173-182.

[4] Li, J., Huang, S.-Y., Deng, Q., Li, G., Su, G., Liu, J. & David Wang, H.-M. (2020). Extraction and characterization of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities from pickled radish. *Food and Chemical Toxicology, 136*, 111050.

[5] Ali, M.C., Chen, J., Zhang, H., Li, Z., Zhao, L. and Qiu, H. (2019). Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. *Talanta, 203*, 16-22.

[6] Hsieh, Y.-H., Li, Y., Pan, Z., Chen, Z., Lu, J., Yuan, J., Zhu, Z. & Zhang, J. (2020). Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry, 63*,104915.

[7] Mayeli, M., Mehdizadeh, T., Tajik, H., Esmaeli, F., & Langroodi, A. M. (2019). Combined impacts of zein coating enriched with methanolic and ethanolic extracts of sour orange peel and vacuum packing on the shelf life of refrigerated rainbow trout. *Flavour and fragrance journal, 34* (6), 460-470.

[8] Pavić, V., Kujundžić, T., Kopić, M., Jukić, V., Braun, U., Schwander, F. & Drenjančević, M. (2019). Effects of Defoliation on Phenolic Concentrations, Antioxidant and Antibacterial Activity of Grape Skin Extracts of the Varieties Blaufränkisch and Merlot (Vitis vinifera L.). *Molecules, 24* (13).

[9] Delgado Adámez, J., Gamero Samino, E., Valdés Sánchez, E. & González-Gómez, D. (2012). In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control, 24* (1), 136-141.

[10] Radulescu, C., Buruleanu, L. C., Nicolescu, C. M., Olteanu, R. L., Bumbac, M., Holban, G. C. & Simal-Gandara, J. (2020). Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera* L.) Seeds and Skin from Organic and Conventional Vineyards. *Plants (Basel, Switzerland), 9* (11), 1470.

[11] Rhodes, P., Mitchell, J., Wilson, M. & Melton, L. (2006). Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International journal of food microbiology, 107* (3), 281-286.

[12] Amankwaah, C., Li, J., Lee, J. & Pascall, M. A. (2020). Development of antiviral and bacteriostatic chitosan-based food packaging material with grape seed extract for murine norovirus, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* control. *Food Sci Nutr, 8* (11), 6174-6181.

[13] Sharifi-Rad, J., Miri, A., Sharifi-Rad, M., Sharifi-Rad, M., Hoseini-Alfatemi, S. M. & Yazdanpanah, E. (2014). Antifungal and antibacterial properties of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves methanolic extract from Iran-in vitro study. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 14* (11), 1312-1316.

[14] Arroyo-Esquivel, J., Sanchez, F., & Barboza, L. A. (2019). Infection model for analyzing biological control of coffee rust using bacterial anti-fungal compounds. *Mathematical biosciences, 307*, 13-24.

[15] Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P. & Barat, J. M. (2018). Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: a review. *Critical reviews in food science and nutrition, 58* (12), 2002-2016.

[16] Favaron, F., Lucchetta, M., Odorizzi, S., da Cunha, A. P. & Sella, L. (2009). The role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape PR proteins. *Journal of Plant Pathology*, 579-588.

[17] Jung, H. J., Hwang, I. A., Sung, W. S., Kang, H., Kang, B. S., Seu, Y. B. & Lee, D. G. (2005). Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of pharmacal research, 28* (5), 557-560.

[18] Chan, M. M. Y. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical pharmacology, 63* (2), 99-104.

[19] Manimaran, M., Sivakumari, K., Ashok, K. & Rajesh, S. (2017). Evaluation of the in vitro antimicrobial effect of resveratrol on human pathogens. Evaluation, 2 (5).

[20] Filip, V., Plockova, M., Šmidrkal, J., Špičková, Z., Melzoch, K. & Schmidt, Š., (2003). Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry, 83* (4), 585-593.