



## تعیین میزان ترکیبات فنلی و اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی مغز گردو

رضا شرافتی چالشتی<sup>۱</sup>، فرهاد شرافتی چالشتی<sup>۲</sup>، محمود رفیعان کوپایی<sup>۳\*</sup>، کورش اشرفی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
- ۲- مربی گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- ۳- استاد گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- ۴- کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۷

### چکیده

مقدمه: باکتری‌های پاتوژن منتقله از مواد غذایی از عوامل مسمومیت‌ها و عفونت‌های گوارشی می‌باشند. در سال‌های اخیر به استفاده از مواد طبیعی نظیر اسانس‌ها و عصاره‌ها به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت غذا تاکید شده است. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی مغز گردو بر روی باکتری‌های پاتوژن منتقله از مواد غذایی و همچنین تعیین میزان ترکیبات فنلی آن انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری مغز گردو، عصاره اتانولی تهیه و اثر ضد میکروبی آن بصورت حداقل غلظت معانت کننده از رشد باکتری (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) با استفاده از روش میکروداپلوشن علیه باکتری‌های سالمونلا تایفی موریوم، شیگلا دیزانتتری و لیستریا مونوسیتوزنز انجام شد، کلرامفنیکل (30µg) به عنوان ماده ضد میکروبی مرجع بکار رفت. میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فلاونولی کل به روش Colorimetry اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که مغز گردو دارای اثر ضد میکروبی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش بوده که میزان MIC بین ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ و MBC بین ۱/۲ mg/ml و ۲/۵ mg/ml بود. همچنین میزان فنول کل  $365 \pm 14/17$  mg/g معادل اسید گالیک، فلاونوئید کل  $285 \pm 1/2$  و فلاونول کل  $132 \pm 1/63$  mg/g معادل روتین بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره مغز گردو دارای اثر ضد میکروبی بر روی سه باکتری مذکور بوده و می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده مواد غذایی مطرح شود. علی‌رغم این مطلب، انجام تحقیقات بیشتر در مدل‌های غذایی، اثرات ضد باکتریایی آن را روشن‌تر خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، اثر ضد میکروبی، مغز گردو، پاتوژن‌های غذایی

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۳۳۴۶۶۹۲ ۰۳۸۱، پست الکترونیکی: rafieian@yahoo.com

## مقدمه

باکتری‌ها از مهمترین عوامل میکروبی عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از غذا و همچنین از عوامل فساد مواد غذایی می‌باشند که به طور مستقیم در سلامت جامعه نقش دارند (۱). در طول دهه گذشته وقوع بیماری‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استانداردهای بالای بهداشتی نیز روبه افزایش بوده و این در حالی است که وقوع عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی اغلب گزارش نشده باقی می‌ماند، به طوری که از نظر اهمیت در آمریکا بعد از بیماری‌های ریوی در مقام دوم قرار دارند (۲). از دیدگاه اقتصادی نیز مسمومیت‌های مواد غذایی به دو طریق مستقیم (معالجات پزشکی و پرداخت خسارات) و غیرمستقیم (کاهش صادرات مواد غذایی و هزینه‌های تحقیقاتی جهت پیشگیری) در اقتصاد ملی تاثیرگذار می‌باشند (۲). استفاده از مواد شیمیایی به منظور پیشگیری و به تعویق انداختن فساد مواد غذایی امروزه در تکنولوژی صنایع غذایی کاربرد وسیعی دارد. در ارتباط با ایمنی مواد شیمیایی صنعتی در خصوص سرطان‌زایی و سمیت آنها برای انسان هنوز جای سوال وجود دارد. به این علت و همچنین به دلیل بالا رفتن سطح آگاهی مصرف کنندگان در سطح جامعه جهانی علاقه روز افزونی به استفاده از مواد نگهدارنده نظیر اسانس‌ها، عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی وجود دارد (۱،۳).

گردو (*Juglans regia*) گیاهی از خانواده Juglandaceae و دارای ۲۱ گونه می‌باشد که همگی خزان دار و دارای میوه خوراکی هستند. مغز گردو از نظر طب قدیم ایران گرم و خشک، خون ساز و تصفیه کننده خون، درمان کننده بیماری‌های ریوی، مسکن دل پیچه است و از تشکیل سنگ کلیه و سنگ کیسه صفرا جلوگیری می‌کند. تحقیقات اخیر نشان داده که به دلیل غنی بودن مغز گردو از اسیدهای چرب امگا-۳ میزان کلسترول خون را پایین آورده و به حفاظت بدن در برابر امراض قلبی و سرطان کمک می‌کند (۴،۵). با توجه به اشارات متعدد مبنی بر اثرات ضد میکروبی گیاهان

دارویی بومی ایران (۶)، از جمله گردو بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سرئوس (۷)، اشیریشیا کلی (۸)، همچنین به طور اختصاصی خواص ضدباکتریایی پلی‌ساکاریدهای غشاء نازک روی مغز گردو بر روی باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی موریوم نشان داده شده است (۹) که در مطالعات گذشته این اثرات ضد باکتریایی را مربوط به محتوای فنولیک موجود در گیاهان دانسته‌اند (۱۰،۱۱). با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در اثر مصرف داروهای ضد میکروبی جهت پیشگیری، درمان عفونت‌ها، عوارض جانبی و اثرات سوء متفاوت آنها، بررسی و تحقیق بر روی گیاهان دارویی به منظور کشف منابع جدید دارویی علیه عفونت‌های باکتریایی مورد نیاز می‌باشد (۱۲) همچنین به منظور کاهش و یا حذف آنتی‌باکتریال‌ها و نگهدارنده‌های سنتتیک و جایگزینی با ترکیبات نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی، مطالعه این اثرات در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های غذایی ضروری است (۱) لذا هدف از این مطالعه شناسایی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی مغز گردو بر روی باکتری‌های پاتوژن منتقله از مواد غذایی و تعیین میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فلاونولی آن بود.

## روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. جهت انجام این مطالعه از سویه‌های استاندارد باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم (PTCC:۱۶۰۹)، شیگلا دیزانتری (PTCC:۱۱۸۸) و لیستریا مونوسیتوزنز (PTCC:۱۱۶۳) تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط بلاد آگار، سوسپانسونی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند در نرمال سالین تهیه شد. در این شرایط تعداد باکتری‌ها حدود  $1 \times 10^8$  CFU/ml می‌باشد. از این سوسپانسیون در مراحل بعدی آزمایش‌ها استفاده گردید (۱۳). مغز گردو از درختان گردوی ناحیه سامان (حاشیه شهر شهرکرد)

کننده از رشد باکتری (MIC) تعیین گردید. سپس از نمونه‌های چاهک‌های بدون کدورت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار پاساژ داده و با روش رقت‌های متوالی عمل شمارش کلنی صورت گرفت. اولین لوله‌ای که مقدار کاهش رشد تعداد باکتری‌ها نسبت به زمان صفر لوله شاهد، بیشتر از یک هزارم بود، به عنوان MBC تعیین گردید (۱۴).

#### تعیین میزان فنول کل

میزان ترکیبات فنولی کل براساس روش رنگ سنجی-Folin-Ciocalteu و بر حسب اسید گالیک اندازه‌گیری شد (۱۵). محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۲/۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ppm از اسید گالیک در محلول ۶۰٪ متانول تهیه شد. آنگاه از هر یک ۱ml/۰ به لوله آزمایش منتقل گردید و به آنها ۵ml/۰ از محلول ۱۰٪ واکنشگر فولین-سیوکالتیو اضافه و پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۴ml/۰ از محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه گردید، آنگاه لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و پس از آن میزان جذب نوری به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵nm اندازه‌گیری شد و بر این اساس نمودار استاندارد رسم گردید. سپس ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ گرم از نمونه خشک شده عصاره را در متانول ۶۰٪ حل کرده و به حجم ۱۰ml رسانده و بر اساس روش فولین-سیوکالتیو میزان فنول کل تعیین گردید با این تفاوت که به جای محلول استاندارد، ۱ml/۰ از محلول عصاره اضافه شد. سپس میزان جذب قرائت شده را در نمودار استاندارد قرار داده و به این ترتیب مقدار فنول کل عصاره برحسب mg/g معادل اسید گالیک بدست آمد.

#### تعیین میزان فلاونوئید و فلاونول کل

میزان فلاونوئید و فلاونول کل به روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم و بر حسب استاندارد Rutin اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ppm از روتین در متانول ۶۰٪ تهیه و ۱ml از این محلول‌ها به لوله‌های آزمایش منتقل و آنگاه ۱ml از محلول کلرید آلومینیوم ۲٪ به آن اضافه گردید. سپس ۶ml از محلول ۵٪ استات پتاسیم به آن افزوده و میزان جذب نوری پس از ۴۰

در بهار سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری و نمونه‌ای از آن در واحد هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ضبط گردید. مغز گردو پس از تمیز کردن، در سایه خشکانده شد و توسط آسیاب پودرگردید. برای تهیه عصاره اتانولی، ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده با ۵۰۰ سی‌سی اتانول ۸۰٪، مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (حدود ۲۲ درجه سانتیگراد) نگهداری شد. سپس عصاره بدست آمده، توسط کاغذ صافی فیلتر شده و وارد دستگاه روتاری (برای حذف اتانول) گردید. عصاره الکلی بدست آمده در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور خشک شد. پس از آن مقدار ۱ گرم از عصاره الکلی خشک حاصله را به ۵ سی‌سی از حلال دی متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه نموده و به وسیله سرنگ میلی پور با فیلترهای به قطر ۰/۲۲ میکرون فیلتره و استریل گردید (۶).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum Baeterial Concentration) میزان MIC و MBC با استفاده از روش میکروداپلوشن اندازه‌گیری گردید به این صورت که در هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا، ابتدا ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند اضافه و سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی (Serial two-fold dilutions) عصاره (۵-۰/۱۵۶ mg/ml) اضافه نمودیم. نمونه کنترل منفی صرفاً شامل ۱۹۵ میکرولیتر محیط کشت بدون عصاره و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی، همچنین غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل به اضافه محیط کشت مولر هینتون برات و تلقیح میکروبی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها توسط شیکر (۲۰ ثانیه با دور ۳۰۰ rpm) آنها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده و سپس میزان جذب نوری (OD) آنها را در طول موج ۴۵۰nm با استفاده از الایزا ریدر، (Made in USA: State fax 2100) قرائت و ثبت نموده و در صورت عدم ایجاد کدورت میزان حداقل غلظت ممانعت

### بحث

در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره مغز گردو بر روی باکتری‌های سالمونلا تایفی موریوم، شیگلا دیزانتری و لیستریا مونوسیتوزنز مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر MIC و MBC عصاره اتانولی مغز گردو در جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر مهاری عصاره بر روی سالمونلا تایفی موریوم در غلظت بالاتری از دو باکتری دیگر می‌باشد. همچنین در این مطالعه میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فلاونولی کل به روش رنگ سنجی برای مغز گردو بدست آمد.

در مطالعه‌ای توسط Ajaiyeoba و همکاران پتانسیل ضد میکروبی انواع عصاره‌های گردو (کلروفورم، هگزان، اتیل استات و متانولی) را بر روی سودوموناس آئروژینوزا، اش‌ریشیاکلی، استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس سوبتیلیس مورد بررسی قرار داده و نشان داده‌اند که همه انواع عصاره‌های برگ گردو بر روی چهار میکروارگانیسم موثر است ولی هیچ کدام از عصاره‌های مغز گردو فعالیت ضد باکتریایی نداشته‌اند (۱۸). در تحقیق حاضر عصاره اتانولی مغز گردو بر خلاف نتایج ذکر شده بر روی سه باکتری آزمایش شده در این مطالعه اثر مهار کنندگی داشته است که این تفاوت احتمالاً ناشی از عوامل متعددی همچون میزان اسانس گیاه، روش عصاره‌گیری، نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن و غلظت عصاره، در اثرات ضد میکروبی یک گیاه می‌باشد (۲۰، ۱۹).

اغلب ترکیبات فنلی شناخته شده در مغز گردو اسیدهای فنولیک هستند که تانین که یک ملکول فنلی با وزن پائین است به طور متراکم در آن وجود دارد و این ترکیبات به ویژه در پوست اطراف مغز قرار گرفته‌اند که خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند (۲۱). اثرات ضد میکروبی ترکیبات فنلی بخصوص فلاونوئیدها که در بسیاری از مطالعات به آنها اشاره شده (۲۲، ۲۳) بستگی به محل و تعداد گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه فنلی (همانند هیدروکربن‌های ترپن‌ها) دارد که با اثر بر روی غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها سبب افزایش نفوذپذیری و تورم سلولی می‌شود (۲۳). همچنین با اثر بر روی آنزیم‌های

دقیقه در طول موج ۴۱۵nm برای استاندارد فلاونوئید و پس از ۲/۵ ساعت در طول موج ۴۴۰nm برای استاندارد فلاونول قرائت و بر این اساس نمودار استاندارد رسم گردید. سپس ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ گرم از نمونه خشک شده عصاره را در متانول ۶۰٪ حل کرده و به حجم ۱۰ml رسانیده و براساس روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم میزان فلاونوئید و فلاونول کل تعیین گردید با این تفاوت که به جای محلول استاندارد، ۱ml از محلول عصاره اضافه شد. میزان جذب قرائت شده را در نمودار استاندارد قرار داده و مقدار فلاونوئید و فلاونول کل برحسب mg/g عصاره محاسبه گردید (۱۷، ۱۶). تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و مقادیر متوسط حاصل از ۳ تکرار با استفاده از میانگین و انحراف معیار گزارش شدند.

### نتایج

بر اساس نتایج حاصله، مقدار MIC و MBC عصاره اتانولی مغز گردو بر روی سه باکتری سالمونلا تایفی موریوم، شیگلا دیزانتری و لیستریا مونوسیتوزنز در جدول ۱ بیان شده است. همچنین میزان فنول کل بر حسب میلی‌گرم در گرم معادل اسید گالیک، فلاونوئید و فلاونول کل بر حسب میلی‌گرم در گرم معادل روتین در جدول ۲ بود.

جدول ۱: مقادیر MIC و MBC عصاره اتانولی مغز گردو بر باکتری‌های سالمونلا تایفی موریوم، شیگلا دیزانتری و لیستریا مونوسیتوزنز

عصاره اتانولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		
MBC	MIC	
۲/۵	۱/۲۵	سالمونلا تایفی موریوم
۱/۲۵	۰/۶۲۵	شیگلا دیزانتری
۱/۲۵	۰/۶۲۵	لیستریا مونوسیتوزنز

جدول ۲: میزان فنول، فلاونوئید و فلاونول کل عصاره اتانولی مغز گردو بر حسب میلی‌گرم در گرم

ترکیبات		
فنول کل	فلاونوئید کل	فلاونول کل
۳۶۵±۱۴/۷۱	۲۸۵±۱۲/۲۵	۱۳۲±۱/۶۳

عصاره اتانولی مغز گردو

بر اساس نتایج این تحقیق و مطالعات گذشته، مغز گردو دارای ترکیبات فنولی، همچنین ویژگی‌های ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. لذا نیاز به تحقیقات بیشتری در مدل‌های غذایی می‌باشد تا بتوان آن را به عنوان یک ماده نگهدارنده و ضدباکتریایی (عوامل فساد باکتریایی و پاتوژنی مواد غذایی) در صنایع غذایی معرفی نمود.

#### سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تامین هزینه و امکانات و کارکنان مرکز تحقیقات گیاهان دارویی به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تنفسی، واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا واکنش‌های غیراختصاصی با پروتئین‌های میکروبی، ایجاد تغییرات در شیب اسیدیته (pH) و پتانسیل الکتریکی سبب تخریب در سیستم انرژی میکروارگانیسم می‌شود (۲۴،۲۳).

در مطالعه‌ای ترکیبات پیروگالول، وانیلیک اسید، پروتوکاتنوجیک اسید و اتیل گالات از مشتقات فنلی موجود در مغز گردو دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بودند (۱۰)، ترکیبات فنلی با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، جمع‌آوری اکسیژن منفرد، شلاته نمودن یون‌ها، از اکسیداسیون لیپیدی و تولید محصولات اکسیداسیون مانند مالون دی‌آلدئید که باعث تغییر بو، رنگ، کاهش ارزش تغذیه‌ای و فساد مواد غذایی می‌شود، جلوگیری می‌نماید (۲۵،۱۱).

#### منابع:

- 1- Rahnema M, Razavi Rouhani SM, Tajik H, Khalighi Sigaroudi F, Rezazadeh Bari M. *Effects of zataria multiflora bioss. Essential oil and nisin, alone and in combination against listeria monocytogen in bhi broth*. J Med Plants 2009; 8(32): 120-31.
- 2- Razavilar V. *Pathogenic microorganisms in foods and epidemiology of food poisoning*. 2nd ed. Tehran: Tehran University; 2002.p.84-90. [Persian]
- 3- Kargiotou C, Katsanidis E, Rhoades J, Kontominas M, Koutsoumanis K. *Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef*. Food Microbiol 2011; 28(1): 158-63.
- 4- Sattar A, Jar M, Ahmed A, Durrari SK. *Peroxidation and heavy metals of dry nut oils*. Acta-Alimentaria 1990; 19(3): 225-28.
- 5- Valnet J. *Phytotherapy, treatment of disease by plants*. Trans. Emami A, Shams-Ardekani MR, Nekoeinaeini N. Tehran: Rahe-kamal; 2002. p. 358-61.
- 6- Sharafati Chaleshtori F, Sharafati Chaleshtori R, Momeni M. *Comparison of the antimicrobial effects of the ethanolic and aqueous extracts of scrophularia striata on Escherishia coli O157:H7 in vitro*. Shahrekord Unive Med Sci J 2009; 10(4): 32-8.
- 7- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC, et al. *Juglans regia leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars*. Food Chem Toxicol 2007; 45(11): 2287-95.

- 8- Kokal D. *Viability of esherichia coli on english juglans regia*. J food Sci 1965; 30(2): 325-32.
- 9- An-jun L, Yue-wie W, Zen-zyan Z, Yan W, Ying C. *Extraction and antimicrobial activities of poly saccharide from walnut kernel pellicle*. Modern Food Science and Technology 2010; 26(4): 160-5.
- 10-Zhang Z, Liao L, Moored J, Wu T, Wang Z. *Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels(Juglans regia L.)*. Food Chem 2009; 113(1): 160-165.
- 11-Ayoughi F, Barzegar M, Sahari MA, Naghdibadi H. *Chemical compositions of essential oils of artemisia dracunculus l. and endemic matricaria chamomilla l. and an evaluation of their antioxidative effects*. J Agr Sci Tech 2011; 13: 79-88.
- 12-Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T. *Anti-helcobacter pylori activities of six Iranian plants*. Helicobacter 2004; 9(2): 146-51.
- 13-Baron EJ, Finegold SM. *Diagnostic microbiology*. 8nd ed. New York: Mosby; 1990.p. 171-86.
- 14-Adiguzel A, Ozer H, Kilic H, Cetin B. *Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of satureja hortensis on foodborne bacteria and fungi*. Czech J Food Sci 2007; 25(2): 81-9.
- 15-Singleton VL, Rossi JR. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent*. Am J Enol Vitic 1965; 16(3): 144-58.
- 16-Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. *Antioxidant activity phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants*. Afr J Biotechnol 2006; 5(11): 1142-45.
- 17-Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. *Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts*. Food Chemistry 2004; 85(2): 231-7.
- 18-Ajaiyeoba EO, Fadare DA. *Antimicrobial potential of extracts and fractions of the African walnut-Tetracarpidium conophorum*. African Journal of Biotechnology 2006; 5 (22): 2322-5.
- 19-Tassou CC, Drosinos EH, Nychas GJ. *Effects of essential oil from mint(Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C*. J Appl Bacteriol 1995; 78(6): 593-600.
- 20-Nostro A, Germano MP, Angelo VA, Marino A, Connatelli MA. *Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity*. Lett Appl Microbiol 2000; 30(5): 389-94.
- 21-Labuckas DO, Maestri DM, Perello´ M, Marti´nez ML, Lamarque AL. *Phenolics from walnut (Juglans regia L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins*. Food Chemistry 2008; 107(2): 607-12.
- 22-Seo KS, Jeong HJ, Yun KW. *Antimicrobial activity and chemical components of two plants, Artemisia capillaris and Artemisia iwayomogi, used as Korean herbal Injin*. J Ecol Field Biol 2010; 33(2): 141-7.
- 23-Policegoudra RS, Rehna K, Rao LJ, Aradhya SM. *Antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity and platelet*

- aggregation inhibitory activity of a novel molecule isolated and characterized from mango ginger (Curcuma amada Roxb.) Rhizome* J Biosci 2010; 35(2): 231-40.
- 24-Mason TL, Wasserman BP. *Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds*. Phytochemistry 1987; 26(8): 2197-202.
- 25-Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi AH, Mohammadian M. *Study of antioxidant function of the water, methanol and ethanol endemic cuminum cuminum L. and cordaria draba L. in the In vitro systems*. Ofogh-e-Danesh J 2010; 16(2): 37-44.[Persian]

## ***Ethanollic Walnut Kernel Phenolic Compounds and its Antimicrobial Effect***

Sharafati-chaleshtori R(PhD)<sup>\*1</sup>, Sharafati-chaleshtori F(MSc)<sup>2</sup>, Rafieian-kopaei M(PhD)<sup>3</sup>, Ashrafi K(MSc)<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Hygiene, Research and Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2,3,4</sup>Medical Plants Research Center, Shahre-kord University of Medical Sciences, Shahre-kord, Iran

**Received:** 17 Jan 2011

**Accepted:** 9 Jun 2011

### **Abstract**

**Introduction:** Food-borne pathogens are causes of poisoning and gastrointestinal infections. In recent years, it is recommended to use natural materials like plant extracts and essences instead of chemical preservatives in food industry. Therefore, the aim of this study was to identify the phenolic compounds of ethanolic walnut kernel and its antimicrobial effect on some food-borne pathogens.

**Methods:** In this experimental study, after collection of walnut kernel, its ethanolic extract was prepared. Then its antimicrobial activity on salmonella typhimurium, shigella disenteriae, listeria monocytogenes was examined as Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) using microdilution method. Chloramphenicol (30µg) was used as the reference antimicrobial agent. Total phenols, flavonoids and flavonols were also determined by colorimetric method.

**Results:** The results showed that MIC was between 0.625 and 1.25 mg/ml and MBC was between 1.25 and 2.5mg/ml for ethanolic extract. Total phenols were 365±14.71mg/g gallic acid equivalent, and total flavonoids and flavonols were 285±12.25 and 132± 1.63mg/g rutin equivalent, respectively.

**Conclusion:** These findings showed that walnut kernel has antibacterial effects on three aforementioned bacteria and can substitute for chemical preservatives. More studies, such as examinations in food models are needed to unravel the antimicrobial effects of this plant.

**Keywords:** Antioxidants/analysis; Anti-Infective Agents/analysis; Nutritive Value; Nuts/chemistry; Phenols/isolation & purification

**This paper should be cited as:**

Sharafati-chaleshtori R, Sharafati-chaleshtori F, Rafieian-kopaei M, Ashrafi K. *Ethanollic walnut kernel phenolic compounds and its antimicrobial effect*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(4): 525-32.

**\*Corresponding author: Tel:+98 381 3346692, Email: rafieian@yahoo.com**