

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 Mikaeili¹, Hossein Tajik², Toraj Mehdizadeh^{*3} 

¹Department 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



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*}

^۱کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۳دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

(*نویسنده مسئول: T.mehdizadeh@urmia.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۰

چکیده

مقدمه: به دلیل مقاومت باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا به داروهای رایج و از طرفی تمایل به نگهدارنده‌های غذایی با منشأ طبیعی محققین در پی یافتن عوامل ضد میکروبی با منشأ 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-حلال‌های یوتکتیک عمیق استخراج شد. خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی با شاخص‌های اندازه قطر هاله مهار 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-حلال‌های یوتکتیک عمیق بود که نشان از کارایی این روش، نسبت به سایر روش‌های مرسوم است ($p \leq 0.05$). *S. aureus* و *L. monocytogenes* از باکتری‌ها و *Cladosporium* از قارچ‌ها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بطور معنی داری دارای کمترین میزان غلظت مهارکنندگی و غلظت کشندگی بودند ($p \leq 0.05$).

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

مقدمه

میکروارگانسیم‌های 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 سوبیه‌های مقاوم، عوارض جانبی کمتر و تهیه سریع تر و ارزان تر می‌تواند گزینه مناسبی جهت استفاده در صنعت غذا باشد. بدین منظور مطالعات زیادی بروی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضدقارچی 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 می‌باشد. بطوریکه عصاره‌های گیاهی ممکن است ابزاری موثر و سودمند برای از بین بردن برخی از بیماری‌ها و تقویت سیستم دفاعی بدن در برابر میکروارگانسیم‌ها 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 بیماری‌های کلیه و کبد تجویز می‌شود. نتایج تحقیقات نشان داده است که ترکیبات استخراج شده از هسته انگور دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی 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 میکروارگانسیم‌های مختلف می‌شود [3]. انگور رقم قزل اوزوم (*Vitis vinifera* L. cv. Ghizil Uzun) در استان آذربایجان غربی بدلیل رنگ جذاب، حبه‌های درشت و دانه دار با پوست ضخیم و قدرت انبارمانی بسیار خوب و از همه مهمتر قیمت بالای محصول در بازار مورد توجه باغداران است. با توجه به ماندگاری بالای این محصول فرضیه وجود ترکیبات ضد میکروبی 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 ضد میکروبی و در نهایت توانایی بیشتر این عصاره در ارتباط با میکروارگانسیم‌های 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 [4]. یکی از روش‌های 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 حلال‌های 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 تخریب پذیر 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 سمیت کم، پایداری حرارتی عالی، دامنه مایع گسترده و غیر فرار، غیر قابل اشتعال و زیست تخریب پذیر 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 میکروویو 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 برده است.

به استناد مطالب فوق و اهمیت خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی 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 روش‌های معمول ماسیراسیون، حلال‌های یوتکتیک عمیق و اولتراسوند انجام پذیرفته 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 کاملاً رسیده انجام شد. پوست و هسته در سایه و در دمای محیط خشک شد. سپس نمونه‌ها توسط آسیاب پودر و از الک (۶۰ مش) عبور داده شد. از نمونه‌های 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 تغییر یافته 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 شفاف 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 شیشه‌ای 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 منظوره 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 روئی برداشته و با دستگاه لیوفیلیزاتور (زیست فرآیند 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 عصاره‌های 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 فالكون استریل انتقال داده شد.

تهیه و آماده‌سازی 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 برات آگار (Quelab, Canada) انتقال داده شد. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت، غلظتی از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) 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 10^6 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 (MIC) (Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) (Minimum bactericidal concentration) و حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) (Minimum fungicidal concentration) از روش برات 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 میلی گرم، 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 و ۳ 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 میکونازول ۱۰ میکروگرم استفاده شد [9]، [10].

تجزیه و تحلیل آماری

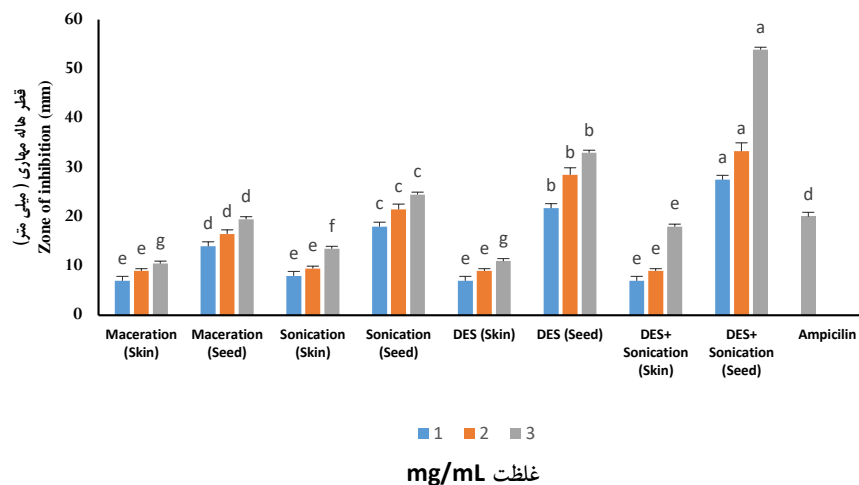
کلیه آزمایش‌ها بصورت سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ (IBM, USA, SPSS Statistics 27.0) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۹ (Excel Office 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 مهارت رشد (۵۳/۹ میلی متر) در عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطر هاله مهارت رشد (۱۴ میلی متر) را در عصاره استخراج شده به روش ماسیراسیون نشان داد ($p \leq 0.05$). همچنین این باکتری، بیشترین قطر هاله مهارت رشد (۱۸ میلی متر) را در مجاورت با عصاره‌های استخراج شده از پوست انگور به روش سونیکاسیون و کمترین قطر هاله مهارت رشد (۷ میلی متر) را در عصاره‌های استخراج شده به روش ماسیراسیون و DES داشت ($p \leq 0.05$). با افزایش غلظت عصاره‌ها از یک به ۳ میلی گرم نیز قطر هاله ممانعت از رشد، افزایش یافت (شکل ۱).

بیشترین قطر هاله مهاري 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 مهاري رشد (۹/۱ میلی متر) مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون است. همچنین بیشترین قطر هاله مهاري 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 مهاري رشد (۹ میلی متر) مربوط به عصاره‌های استخراج شده به روش ماسیراسیون است ($p \leq 0.05$) (شکل ۲).

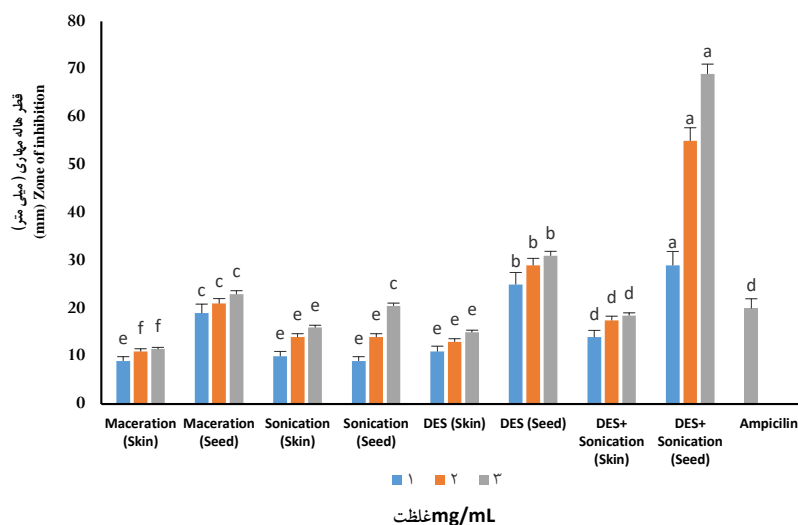


شکل ۱- قطر هاله مهاري رشد باکتری *S. aureus* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

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، ($p \leq 0.05$)

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

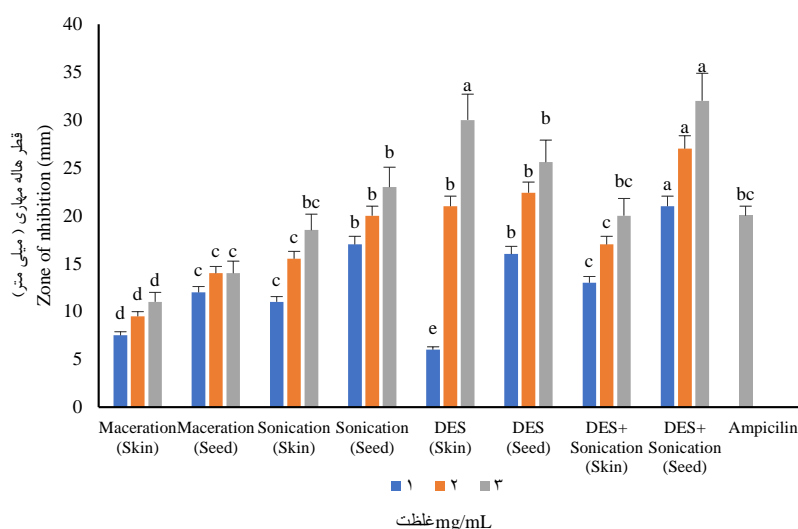
Figure 2- Inhibitory growth diameter of *E. coli* in agar well diffusion method

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

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

بیشترین قطر هاله مهاري رشد باکتری *L. monocytogenes* (۳۲ میلی متر) در مجاورت با عصاره های استخراج شده از هسته انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطر هاله مهاري رشد (۱۲ میلی متر) مربوط به عصاره استخراج شده به روش ماسیراسیون است. همچنین بیشترین قطر هاله مهاري رشد (۳۰ میلی متر) باکتری *L. monocytogenes* در مجاورت با عصاره های استخراج شده از پوست انگور، مربوط به عصاره استخراج شده به روش DES و کمترین قطر هاله مهاري رشد (۷/۵ میلی متر) مربوط به عصاره های استخراج شده به روش ماسیراسیون است ($p \leq 0.05$) (شکل ۳).

همچنین بیشترین قطر هاله مهاري رشد (۳۶ میلی متر) باکتری *S. typhimurium* در مجاورت با عصاره های 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 عصاره های استخراج شده از پوست انگور بیشترین (۳۲ میلی متر) قطر هاله مهاري رشد باکتری *S. typhimurium*، مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون-DES و کمترین قطر هاله مهاري رشد (بدون هاله) مربوط به عصاره استخراج شده به روش سونیکاسیون و ماسیراسیون بود. همچنین طبق نتایج بین غلظت های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p \leq 0.05$) (شکل ۴).



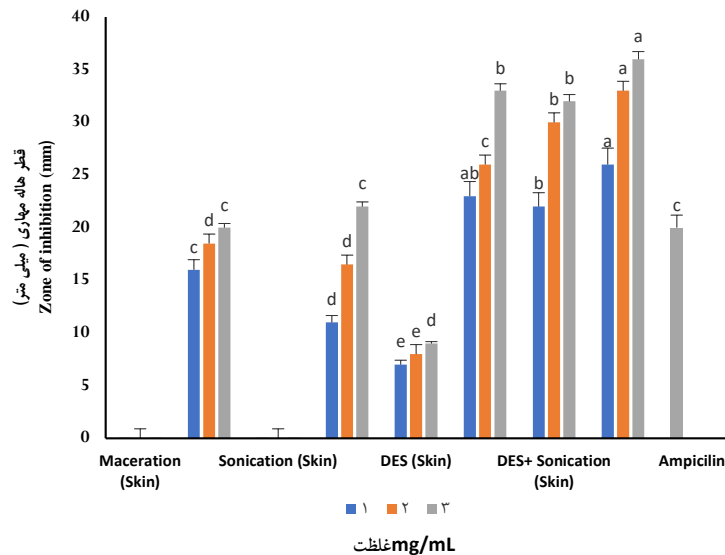
شکل ۳- قطر هاله مهاري رشد باکتری *L. monocytogenes* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

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 معنی 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 ای استخراج شده پوست و هسته انگور، غنی از پلی فنول ها و پروآنتوسیانیدین ها است که میزان و کیفیت آنها در گونه ها و رقم های مختلف انگور متفاوت است. پلی فنول ها و متابولیت های آن بسته به ساختار شیمیایی و غلظتشان، می تواند به عنوان فعال کننده یا بازدارنده رشد میکروبی عمل کند. این متابولیت ها به طور انتخابی از رشد پاتوژن های مواد غذایی جلوگیری می کنند و رشد باکتری های همزیست شامل تعدادی از پروبیوتیک ها را تحریک می کنند، بنابراین فلور میکروبی را تحت تأثیر قرار می دهند. علاوه بر این، دارای خواص آنتی اکسیدانی 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 عصاره های استخراج شده از پوست و هسته انگور قزل اوزوم را می توان به عنوان یک جایگزین طبیعی مؤثر برای کنترل مسمومیت غذایی ناشی از پاتوژن های مواد غذایی به ویژه *S. aureus* با ایمنی مناسب به کار برد.



شکل ۴- قطر هاله مهارى 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<0.05)

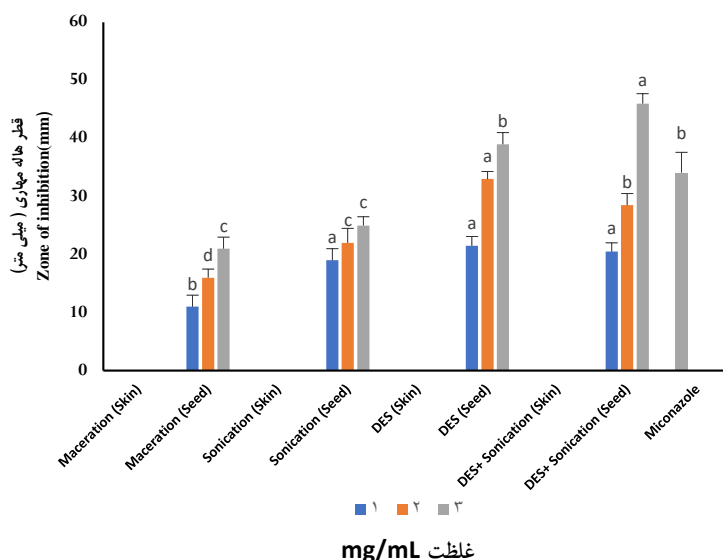
The negative control containing DMSO had no ZOI, non-identical lowercase letters in each concentration for each treatment indicate a significant difference (p<0.05)

Pavić و همکاران (۲۰۱۹) [8] همچنین نشان دادند افزودن عصاره هسته انگور به محیط کشت حاوی میکروارگانیسم‌های *E. coli* و *Aeromonas hydrophila* و *S. aureus* که در بهداشت مواد غذایی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا محسوب می‌شود، اثرات ضد میکروبی 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 سایر باکتری‌ها 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 حلال‌های یوتکتیک عمیق مبتنی بر اسید مانند کلین کلراید حساس تر است [2] که با تحقیق ما همخوانی ندارد. طبق موارد اثبات شده قبلی، باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های 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* سویه O157: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 باکتری کشی 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 میکروارگانیسم‌ها بویژه *E. coli* شده است [2]. در مطالعه‌ای Pavić 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 سویه‌های 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 به دست آمده، بین قطر هاله مهاري 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 مهاري رشد افزایش یافت. از طرف دیگر روش استخراج در عملکرد ترکیبات ضدقارچ عصاره نیز نقش داشت ($p \leq 0.05$).

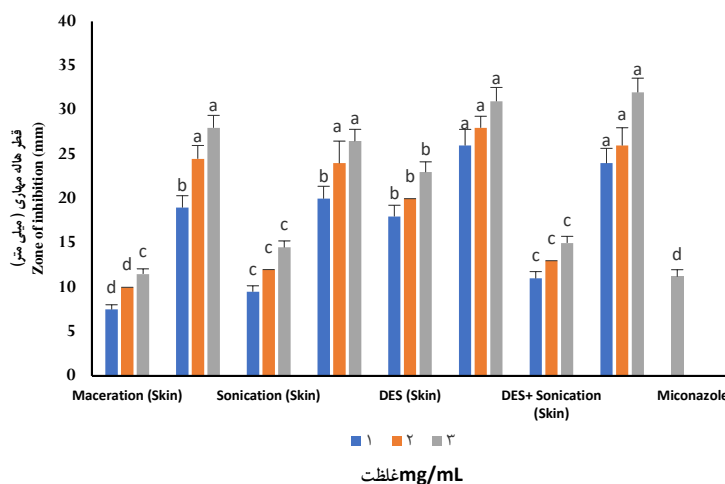


شکل ۵- قطر هاله مهاري رشد قارچ *Cladosporium* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

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 ($p \leq 0.05$)



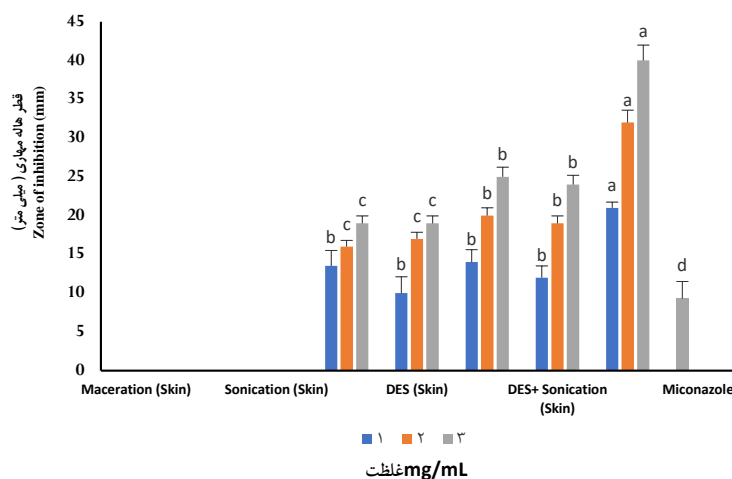
شکل ۶- قطر هاله مهاري رشد قارچ *P. citrinum* تشکیل شده در روش انتشار در آگار

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 ($p \leq 0.05$)

بر اساس 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 *Cladosporium*، *A. flavus* 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 قارچ‌های مورد تحقیق به غیر از *P. citrinum* را داشته است ($p \leq 0.05$).

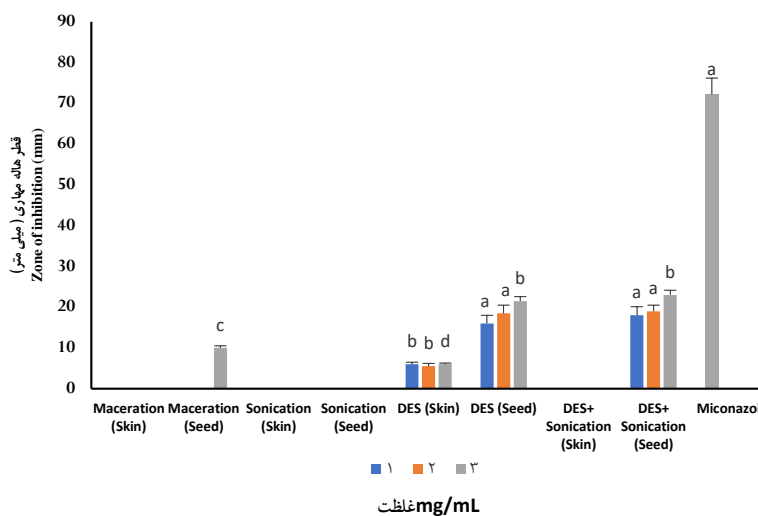


شکل ۷- قطر هاله مهاري رشد قارچ *F. solani* تشكيل شده در روش انتشار در آگار

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 مهاري رشد قارچ *A. flavus* تشكيل 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 می تواند به عنوان جایگزینی برای قارچ کش ها به شمار رود. ترکیبات فعال از منشأ گیاهی در محیط پایداری کمتری داشته و روی پستانداران و ارگانیزم های 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 آن ها می شود. علاوه بر این برخی از گونه ها 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 فنولی 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 کنده ها و رشد میسیلیوم می شود [15]، [16].

در پژوهش Jung و همکاران (۲۰۰۵) [17] نه تنها فعالیت ضد کاندیدیایی رسوراترول در غلظت ۱۰-۲۰ میلی گرم در میلی لیتر نشان داده شد بلکه اثر قارچ کشی رسوراترول بر روی *Candida albicans* با میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز تایید شد [17]. Chan و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۰۲ اثر مهارری 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر را گزارش کردند [19]. در مطالعه ای دیگر Filip و همکاران (۲۰۰۳) فعالیت ضد قارچی رسوراترول را در غلظت ۱۱ میکروگرم در میلی لیتر در برابر *A. niger* با مهار رشد ۳۶/۴ درصد را نشان دادند [20]. در مطالعه ای دیگر عصاره متانولی برگ انگور در برابر قارچ *A. niger* ارزیابی شد. نتایج MIC نشان داد که مقادیر ۷۵/۴ میکروگرم در میلی لیتر در برابر *A. niger* دارای اثر مهارری می باشد [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 ضد میکروبی عصاره هسته و پوست انگور قزل اوزوم بر علیه چهار باکتری *S. typhimurium*، *E. coli* و *S. aureus*، *L. monocytogenes* با استفاده از روش میکروداپلوشن 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	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	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 ^c	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<0.05).

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

در جدول ۲ نیز نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی عصاره هسته و پوست انگور قزل اوزوم بر علیه چهار قارچ *Cladosporium*، *P. citrinum*، *F. solani* و *A. flavus* با استفاده از روش میکروداپلوشن 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. Flavis	
	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≤0.05).

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≤0.05) 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≤0.05). 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≤0.05).

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 ویژه‌ای برخوردار بود بررسی مقایسه‌ای 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 برخوردارند، 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 پوست 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 منافی 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. & Sağdıç, 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., Kopic, 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.