

## بررسی ترکیب های شیمیایی و اثرات ضد میکروبی عصاره ی متانولی دانه ی سویا

حشمت اله علی نژاد، سمیه قهاری، قربانعلی نعمت زاده، محمود تاجبخش و ربابه بهارفر

### چکیده

باکتری های گرم مثبت و گرم منفی طیف بسیار وسیعی از میکروارگانیسم ها را تشکیل می دهند. برخی از آنها برای حیات انسان مفید و ضروری بوده، در حالیکه برخی هم ممکن است عامل بیماری های گیاهی، جانوری و یا انسانی باشند. بیماری بلاست برنج یکی از شایع ترین بیماری های فارچی در اکثر نقاط برنج کاری دنیا است و هر ساله خسارات هنگفتی به محصول برنج وارد نموده و برای مهار این بیماری به ناچار حجم عظیمی از سموم ضد قارچ مصرف می گردد. گیاهان با دارا بودن طیف وسیعی از بایومولکول-ها، قادر به مهار برخی از پاتوژن های فارچی و باکتریایی هستند. سویا گیاهی صنعتی است که از دانه ی آن روغن خوراکی و از کنجاله ی آن غذای دام و طیور تهیه می شود. در این تحقیق علاوه بر آنالیز عصاره ی متانولی دانه های سویا بوسیله ی دستگاه GC/MS، اثرات ضد باکتریایی و ضد فارچی آن نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از GC/MS، تعداد ۴۷ ترکیب را با اولویت حجمی؛ Z، Z-۹-۱۲-اکتادکانوئیک اسید (۴۴/۸۹ درصد)، ۹-اکتادکانوئیک اسید متیل استر (۱۳/۵۸ درصد)، هگزادکانوئیک اسید متیل استر (۱۱/۳۴ درصد)، متیل لینونات (۶/۸۱ درصد)، اکتادکانوئیک اسید متیل استر (۳/۶۹ درصد) و n-هگزادکانوئیک اسید (۲/۶۱ درصد) نشان داده است. عصاره ی متانولی این گیاه با غلظت ۰/۵ گرم بر میلی لیتر دی متیل سولفوکسید اثرات بازدارندگی بسیار خوبی بر علیه باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس ائورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، رتای باکتر توکسیکوس و باکتری گرم منفی سودوموناس سیرینجی نشان داده و علاوه بر این در مهار قارچ پریکولاریا اریزا، عامل بیماری بلاست برنج نیز اثرات مثبت خوبی نشان داده است.

**کلید واژه:** آنالیز GC/MS؛ اثرات ضد باکتریایی؛ اثرات ضد فارچی؛ عصاره ی متانولی دانه ی سویا؛

### مقدمه

ارزانی از پروتئین با کیفیت بالا بوده و روغن موجود در دانه ی آن در مواد غذایی، خوراک و صنعت مورد استفاده قرار می گیرد (Sharma et al., 2014). دی و آگاروالا فعالیت ضد باکتریایی روغن سویا را علیه دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس و اشیشیاکلی مورد بررسی قرار دادند (De and Agarwala, 2014). آرورا و همکاران دو نمونه از دانه ی سویا را انتخاب و بعد از عصاره گیری، فعالیت های ضد میکروبی و غربالگری فیتوشیمیایی آن را مورد سنجش قرار دادند (Arora et al., 2013). پونوشا و همکاران فعالیت های ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی سویا را تایید نمودند (Ponnusha et al., 2011). کیم و همکاران فعالیت ضد فارچی گلیسولین (Glyceollins) استخراج شده از دانه ی سویا را علیه قارچ های *Botrytis*، *Fusarium oxysporum*، *Phytophthora capsici* و *Sclerotinia sclerotiorum cinerea* مورد بررسی قرار دادند (Kim et al., 2010). دهارشینی و همکاران ترکیبات فعال زیستی عصاره اتانولی سویا را با دستگاه GC/MS مورد بررسی قرار دادند (Dharshini et al., 2013). پلونجارین و همکاران ترکیبات معطر را از عصاره ی اسیدی سویا جدا و با دستگاه GC/MS شناسایی نمودند (Plonjarean et al., 2007). کامکار و همکاران (۱۳۸۸) تأثیر بقایای سویا بر آزادسازی نیتروآمونوآمونومدرخاک و ارتباط آن با پویایی تغییرات جمعیت های میکروبی را مورد بررسی قرار دادند. خطیری و همکاران (۱۳۹۲) نقش باکتری های اندوفیتیک جدا شده از گیاه سویا را در کنترل برخی قارچ های بیماری زای گیاهی تایید نمودند. بنابراین گیاهان نه تنها می توانند بعنوان منبع غذایی

علاوه بر خسارات قابل توجهی که آفات و بیماری های گیاهی به محصولات کشاورزی وارد می نمایند، تأثیر بسیار نامطلوبی هم بر کیفیت آن ها خواهند داشت. حفظ و نگهداری محصولات کشاورزی در برابر آفات و بیماری های گیاهی، از اهداف مهم و ضروری کشاورزی مدرن محسوب می شود (Zanini Martins et al., 2012). بنابراین باید به گونه ای منطقی و درست در جهت مهار آفات و بیماری های گیاهی حرکت نمود تا خسارات ایجاد شده را کم و تحت کنترل در آورده و از این طریق زمینه ی افزایش محصولات کشاورزی با کیفیت بهتر را فراهم ساخت (Zanini Martins et al., 2012). محصولات طبیعی گیاهی مشتقات آن هامنبع مهمیاز مواد شیمیایی جدید در حوزه یک کشاورزی هستند که برای کنترل بیماری های گیاهی و آفات کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرند (Amadioha, 2000). اخیراً محققان نشان دادند که مواد شیمیایی طبیعی می توانند به عنوان منبع غیر سمی، سیستمیک و تجزیه پذیر، جایگزین آفت کش های سنتزی موجود در بازار شوند (Amadioha, 2000). علاوه بر این، آفت کش های حاصل از منابع گیاهی ارزان بوده، به راحتی قابل دسترس می باشند و هزینه ی مصرف این سموم در کشورهای در حال توسعه که در آن قارچ کش های سنتزی برای کشاورزان، کمیاب و گران قیمت هستند بسیار کمتری باشد.

سویا [*Glycine max* (L.) Merrill]، گیاهی از خانواده ی حبوبات و بومی شرق آسیا است و به طور گسترده در سراسر جهان کشت می شود. سویا منبع نسبتاً

از عصاره تهیه و دیسک های بلانک استریل (قطر ۶ میلی متر) را با ۲۵ میکرولیتر از غلظت های مختلف تهیه شده از عصاره ی گیاهی آغشته بر روی سطح محیط کشت آغشته با سوسپانسیون میکروبی قرار گرفتند. پلیت ها برای سویه های استاندارد در حرارت ۳۷ درجه ی سانتی گراد و برای باکتری های گیاهی در حرارت ۲۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مورد نظر قطر هاله های عدم رشد با استفاده از کولیس بر حسب میلی متر اندازه گیری گردیدند.

از آنتی بیوتیک های شناخته شده ی جنتامایسین (۱۰ µg/disc) و کلرامفنیکل (۳۰ µg/disc) (نیز به عنوان کنترل مثبت و دی متیل سولفوکسید ۳۰ µL/disc) (به عنوان کنترل منفی استفاده گردید).

فعالیت های ضد باکتریایی در چهار تکرار، با اندازه گیری قطر هاله ی عدم رشد (بر حسب میلی متر) در سطح پلیت ها و با نرم افزار SPSS و به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SD) مورد بررسی قرار گرفتند.

### - سنجش فعالیت ضد قارچی

سویه قارچ *Pyricularia oryzae* از مرکز تحقیقات برنج آمل تهیه و فعالیت ضد قارچی آن نیز با استفاده از روش انتشار از دیسک مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر این قارچ از محیط پوتتو دکستروز آگار (PDA) استفاده گردید.

دیسک های کاغذی به قطر ۶ میلی متر تهیه و استریل شدند. دیسک ها را با ۲۵ میکرولیتر از غلظت های مختلف (۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵۰) گرم در یک میلی لیتر دی متیل سولفوکسید) تهیه شده از عصاره ی دانه ی سویا آغشته و با پنس بر سطح آگار پتری دیش قرار داده و به آرامی به سمت پایین فشار داده تا دیسک کاملاً با سطح آگار تماس داشته باشد. هیف قارچ بلاست را به اندازه های یکسان برش داده و برش ها را با لوپ برداشته و به صورت برعکس در وسط پتری دیش ها قرار داده و سپس پتری دیش ها را در انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه ی سانتیگراد قرار داده تا وضعیت رشد قارچ بلاست بعد از گذشت ۱۲-۱۴ روز مشخص گردد. از دی متیل سولفوکسید به عنوان کنترل منفی و از پتری دیش حاوی قارچ و فاقد عصاره به عنوان شاهد استفاده گردید. فعالیت های ضد قارچی در چهار تکرار با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) در سطح پلیت ها و با نرم افزار SPSS و به صورت نتایج ± انحراف معیار (mean ± SD) مورد بررسی قرار گرفتند.

### -۳ نتایج و بحث

#### -۳-۱ ترکیبات شناسایی شده

۴۷ ترکیب مختلف به شرح زیر از عصاره ی متانولی دانه ی روغنی سویا شناسایی شدند (جدول ۱).

علاوه بر شناسایی ترکیبات دانه سویا در عصاره متانولی به کمک دستگاه GC/MS، فعالیت زیستی برخی از ترکیبات اصلی شناخته شده که در منابع آمده نیز، در جدول ۲ نشان داده شده است. همانگونه که ملاحظه می شود ترکیب Octadecadienoic acid (Z,Z-۹,۱۲) - با طیف گسترده فعالیت بیولوژیکی در عصاره متانولی سویا دارای بیشترین غلظت (۴۴/۸۹ درصد) می باشد و در مقابل Hexadecanoic acid - با غلظت ۲/۶۱ نیز دارای طیف گسترده ای از فعالیت بیولوژیکی است.

مقایسه ی تطبیقی نتایج بدست آمده از عصاره ی متانولی دانه ی سویا (لینولیک اسید، اولئیک اسید، پالمیتیک اسید و غیره) با ترکیبات شناخته شده ی گیاهی و نقش فعالیت بیولوژیکی آنها نشان می دهد که از دانه ی سویا می توان به عنوان یک منبع غنی گیاهی برای برخی از فعالیت های ضد باکتریایی و ضد قارچی استفاده نمود.

مورد استفاده قرار گیرند بلکه می توانند به عنوان یک منبع مهم دارای ترکیبات فعال زیستی برای کنترل بیماری های گیاهی و انسانی به عنوان عوامل ضد ویروس، ضد باکتری و ضد قارچ نیز استفاده شوند (Mahesh and Satish, 2008; Erdogru, 2002; Zgoda and Porter, 2001).

هدف از این تحقیق علاوه بر شناسایی ترکیبات عصاره ی گیاه سویا از طریق دستگاه GC/MS، بررسی ظرفیت عصاره ی متانولی آن در مهار و یا کشندگی برخی از باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ پریکولاریا اریزا، عامل بیماری بلاست برنج بوده است.

## -۲ موادوروش ها

### -۲-۱ تهیه عصاره ی گیاهی

این تحقیق تجربی و آزمایشگاهی طی تابستان ۱۳۹۳ در آزمایشگاه پژوهشگاه ی ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام پذیرفت. عصاره ی متانولی گیاه به روش ماسراسیون تهیه گردید. دانه های روغنی سویا از مزرعه ی دانشگاه تهیه و به دور از نور خورشید خشک، توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمده، سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در حلال متانول توسط شیکر با هم مخلوط تا عصاره گیری انجام شود. مخلوط حاصل با استفاده از قیفشیشه ای، صاف و با دستگاه تبخیر کن در خلأ با حرارت ۴۰ درجه ی سانتیگراد خشک گردید. عصاره ی نهایی با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (ساخت شرکت ساتریوس آلمان) استریل گردید. ترکیبات موجود در عصاره خشک با استفاده از دستگاه گازکروماتوگراف متصل به طیفسنج جرمی (GC/MS) آنالیز و در ادامه فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی آن نیز طبق روش انتشار از دیسک Kirby-Bauer - Chia and Yap 2011 مورد بررسی قرار گرفت.

### -۲-۲ آنالیز GC/MS

آنالیز GC/MS با استفاده از کروماتوگراف گازی (۷۸۹۰A) متصل شده به طیف سنج جرمی (EI/CI MSD ۵۹۷۰C-inert XL) با ستون (DB-5 J&W Scientific) و با سرعت ۵۰°C/min، با سرعت ۵°C/min و با استفاده از دمای ۲۵۰°C و با استفاده از زمان بازداری ترکیب ها (TR)، شاخص بازداری (RI)، طیف جرمی و مقایسه ی این پارامترها با ترکیب ها یا استاندارد و یا با اطلاعات موجود در کتابخانه انجام گردید. درصد کمی این ترکیب ها نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرامها برآورد شده است.

### - سنجش فعالیت ضد باکتریایی

فعالیت های ضد باکتریایی عصاره ی متانولی دانه ی روغنی سویا در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش انتشار از دیسک Kirby-Bauer (Chia and Yap, 2011) و ۰/۰۱ و ۰/۰۳ گرم در یک میلی لیتر دی متیل سولفوکسید از دانه های خشک تهیه و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (ساخت شرکت ساتریوس آلمان) استریل شدند. فعالیت ضد باکتریایی عصاره در برابر سه باکتری گرم مثبت *Rathayibacter Bacillus* ۱۴۳۱، *Staphylococcus aureus* PTCC ۹۵۲۵، *Pseudomonas campestris* pv. *subtilis* PTCC ۱۰۲۳ و پنج باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* PTCC ۱۰۷۴، *Pseudomonas viridiflava* ICMP ۵۰۸۹، *syringae subsp. syringae* ICMP ۲۸۴۸ و *Escherichia coli* PTCC ۱۳۳۰ مورد بررسی قرار گرفت (Ghahari et al., 2015).

سویه های باکتریایی لیوفیلیزه از گروه میکروبیولوژی دانشگاه مازندران تهیه و از سوسپانسیون میکروبی کشت شده و جوان، چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل تا، کدورت حاصله مشابه کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند (۱/۵ × ۱۰۸) باکتری در هر میلی لیتر) گردد. برای این کار، ابتدا غلظت های ۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵۰ گرم دریکمیلی لیتر دی متیل سولفوکسید

جدول (۱): ترکیبات شناسایی شده از عصاره‌ی متانولیدانه‌ی یروغنی سویا با استفاده از دستگاه GC/MS.

پیک	زمان بازداری	نام ترکیب	جرم مولکولی	فرمول مولکولی	درصد زیر پیک
۱	۵/۷۴۴ min	Dimethyldimethoxysilane	۱۲۰/۲۲	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> Si	+۰/۶۸
۲	۷/۱۶۲ min	Thiocyanic acid, methyl ester	۷۳/۱۲	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NS	+۰/۰۷
۳	۷/۸۷۰ min	Dimethylaminoacetonitrile	۸۴/۱۲	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	+۰/۱۱
۴	۸/۴۰۰ min	Methallyl cyanide	۸۱/۱۲	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N	+۰/۰۳
۵	۹/۱۵۴ min	2,4-Pentadien-1-ol, 3-methyl-, (Z)-	۹۸/۱۴	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	+۰/۱۱
۶	۹/۴۶۷ min	Hexamethylcyclotrisiloxane	۲۲۲/۴۶	C <sub>6</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>3</sub>	+۰/۰۴
۷	۱۰/۸۱۰ min	m-Xylene	۱۰۶/۱۷	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	+۰/۰۷
۸	۱۱/۴۰۷ min	p-Xylene	۱۰۶/۱۷	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	+۰/۱۰
۹	۱۵/۹۶۵ min	Phenol, 2-methoxy-	۱۲۴/۱۴	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۱۱
۱۰	۱۶/۰۴۷ min	Benzoic acid, methyl ester	۱۳۶/۱۵	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۰۴
۱۱	۱۶/۴۴۲ min	Maltol	۱۲۶/۱۱	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	+۰/۲۰
۱۲	۱۶/۹۲۷ min	Decamethylcyclopentasiloxane	۳۷۰/۷۷	C <sub>10</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>5</sub>	+۰/۰۴
۱۳	۱۷/۹۷۹ min	Dodecane	۱۷۰/۳۳	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	+۰/۰۳
۱۴	۱۹/۱۲۱ min	Dodecamethylcyclohexasiloxane	۴۴۴/۹۲	C <sub>12</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> Si <sub>6</sub>	+۰/۸۲
۱۵	۲۰/۲۴۰ min	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	۱۸۰/۲۹	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O	+۰/۰۲
۱۶	۲۰/۳۲۹ min	2-Methoxy-4-vinylphenol	۱۵۰/۱۷	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۱۱
۱۷	۲۰/۹۴۹ min	2,6-Dimethoxyphenol	۱۵۴/۱۶	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	+۰/۲۳
۱۸	۲۱/۶۳۵ min	Tetradecane+	۱۹۸/۳۹	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	+۰/۰۲
۱۹	۲۳/۰۹۷ min	Tetradecamethylcycloheptasiloxane	۵۱۹/۰۸	C <sub>14</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> Si <sub>7</sub>	۱/۵۴
۲۰	۲۳/۷۴۶ min	1,4-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester	۱۹۴/۱۸	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	+۰/۰۵
۲۱	۲۳/۸۵۸ min	D-Allose	۱۸۰/۱۶	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	+۰/۰۱
۲۲	۲۴/۹۵۵ min	2,6 - dimethyl - 3 - (methoxymethyl) - p - benzoquinone	۱۸۰/۲۰	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	+۰/۰۸
۲۳	۲۷/۷۱۵ min	Methyl Myristate (or Methyl tetradecanoate)	۲۴۲/۴۰	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۱۱
۲۴	۲۸/۴۱۷ min	Tetradecanoic acid	۲۲۸/۳۷	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۰۳
۲۵	۲۹/۶۱۰ min	Pentadecanoic acid, methyl ester	۲۵۶/۴۲	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۰۳
۲۶	۳۰/۶۲۵ min	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (Diisobutyl phthalate)	۲۷۸/۳۴	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	+۰/۰۷
۲۷	۳۱/۰۸۰ min	9-Hexadecenoic acid, methyl ester (or Methyl palmitoleate)	۲۶۸/۴۳	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۱۷
۲۸	۳۱/۵۵۰ min	Hexadecanoic acid, methyl ester	۲۷۰/۴۵	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	۱۱/۳۴
۲۹	۳۲/۰۰۵ min	n-Hexadecanoic acid	۲۵۶/۴۲	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۲/۶۱
۳۰	۳۲/۳۹۳ min	Eicosamethylcyclodecasiloxane	۷۴۱/۵۴	C <sub>20</sub> H <sub>60</sub> O <sub>10</sub> Si <sub>10</sub>	+۰/۲۸
۳۱	۳۲/۷۲۹ min	Hexadecanoic acid, ethyl ester	۲۸۴/۴۸	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۰۶
۳۲	۳۲/۸۲۶ min	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	۲۸۰/۴۴	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۴۴/۸۹
۳۳	۳۳/۳۳۳ min	Heptadecanoic acid, methyl ester	۲۸۴/۴۸	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۱۰
۳۴	۳۵/۰۰۴ min	9-Octadecenoic acid, methyl ester	۲۹۶/۴۹	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	۱۳/۵۸
۳۵	۳۵/۰۵۶ min	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)- (or methyl linolenate)	۲۹۲/۴۶	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۶/۸۱
۳۶	۳۵/۲۰۶ min	cis-13-Octadecenoic acid, methyl ester	۲۹۶/۴۹	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	+۰/۱۱
۳۷	۳۵/۳۸۵ min	Octadecanoic acid, methyl ester (or Methyl stearate)	۲۹۸/۵۰	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	۳/۶۹

۳۸	۳۵/۷۸۸ min	9-Octadecenoic acid, (E)-	۲۸۲/۵۲	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	۱/۸۹
۳۹	۳۵/۸۵۵ min	9,17-Octadecadienal, (Z)-	۲۶۴/۴۵	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	۱/۸۹
۴۰	۳۶/۲۰۵ min	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester (or Ethyl linoleate)	۳۰۸/۴۹	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	۰/۷۷
۴۱	۳۸/۲۶۴ min	7-Pentadecyne	۲۰۸/۳۸	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub>	۰/۰۵
۴۲	۳۸/۴۸۱ min	Cyclododecyne	۱۶۴/۲۹	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub>	۰/۲۴
۴۳	۳۹/۳۰۹ min	1,4-Cyclononadiene	۱۲۲/۲۱	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub>	۰/۴۱
۴۴	۳۹/۴۴۳ min	Methyl 8,11,14-heptadecatrienoate	۲۷۸/۴۳	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	۰/۱۱
۴۵	۳۹/۸۹۱ min	cis-13-Eicosenoic acid, methyl ester	۳۲۴/۵۴	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	۰/۶۱
۴۶	۴۰/۶۲۲ min	Eicosanoic acid, methyl ester	۳۲۶/۵۶	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	۰/۳۴
۴۷	۴۲/۰۱۷ min	9-Octadecenamide, (Z)- (or Oleamide)	۲۸۱/۴۸	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	۰/۱۰

جدول (۲): فعالیت زیستی ترکیبات اصلی شناخته شده در عصاره‌ی متانولی دانه‌ی سویا، بر اساس منابع مختلف

نام ترکیب	مخامواده ترکیب	فعالیت‌های بیولوژیکی	منابع
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (Linoleic Acid)	Linoleic acid	Antioxidant, Pesticide, Anti-inflammatory, Hypocholesterolemic, Cancer preventive Hepatoprotective, Nematicide, Insectifuge, Antihistaminic, Antieczemic Antiacne, 5-Alpha reductase inhibitor, Antiandrogenic, Antiarthritic, Anticoronary expression of cyclooxygenase-2 inhibition of NF- κB11, Antioxidant, Antifungal, hypocholesterolemic, Flavor, Pesticide, 5-Alpha reductase inhibitor, Lubricant, Antiandrogenic, nematicide, pesticide, haemolytic, potent antimicrobial activity	(Sethi et al., 2013; Jegadeeswari et al. 2012)
Hexadecanoic acid, methyl ester (palmitic acid)	Fatty acid ester	Antifungal, Anti-inflammatory, Antioxidant, Pesticide, Hypocholesterolemic, Nematicide, Lubricant, Anti-androgenic, Flavor, Hemolytic, 5-Alpha reductase inhibitor, potent antimicrobial agent, antimalarial and antifungal	(Sethi et al., 2013; Omotoso Abayomi et al., 2014)
n-Hexadecanoic acid	Palmitic acid (Fatty Acid)	Anti-inflammatory, Anti-androgenic, Cancer preventive, Dermatitigenic, Anemiagenic, Hypocholesterolemic, Flavor, 5-Alpha reductase inhibitor, Insectifuge, Anti-carcinogenic	(Sethi et al., 2013; Thampy et al., 2014; Omotoso Abayomi et al., 2014)
9-Octadecenoic acid, methyl ester	Oleic acid	Anti-inflammatory, Hypocholesterolemic, Cancer preventive, Hepatoprotective, Nematicide, Insectifuge, Antihistaminic, Antieczemic, Antiacne, 5-Alpha reductase inhibitor Antiandrogenic, Antiarthritic, Anticoronary, Insectifuge	(Asghar et al. 2011)
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)- (or methyl linolenate)	Linolenic acid ester		(Banu and Nagarajan, 2013)

در غلظت های مختلف مورد سنجش قرار دادند و اثرات نسبتاً خوبی را بر علیه باکتری های مورد آزمایش مشاهده نمودند. پونوشا و همکاران فعالیت های آنتی اکسیدانی سویا را تایید نمودند و نشان دادند که آنتو سیانین های موجود در سویا خواص آنتی اکسیدانی بسیار خوبی را نشان می دهند. کیم و همکاران فعالیت ضد قارچی گلیسولین (Glyceollins) استخراج شده از دانه ی سویا را علیه قارچ های Botrytis, Fusarium oxysporum, Phytophthora sclerotinia sclerotiorum cinerea و capsici مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که دانه ی سویا در غلظت های مشخص، خواص ضد قارچی بسیار خوبی را نشان می دهد. دهارشینی و همکاران ترکیبات فعال زیستی عصاره اتانولی سویا را با دستگاه GC/MS مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ۱۵، ۱۲، ۹، Z، Z، ۹، octadecatrienoic acid)- با فراوانی ۸۰/۲۰ درصد بیشترین سطح زیر پیک را دارد. پلونجارین و همکاران ترکیبات معطر را از عصاره ی اسیدی سویا جدا و با دستگاه GC/MS شناسایی نمودند. کامکار و همکاران تأثیر بقایای سویا بر آزادسازی نیترات و آمونیوم در خاک و رابطه آن با پویایی تغییرات جمعیت های میکروبی را مورد بررسی قرار دادند. خطیری و همکاران نقش باکتری های اندوفیتیک جدا شده از گیاه سویا را در کنترل برخی قارچ های بیماری زای گیاهی تایید نمودند. در ادامه و در تایید تحقیقات محققان درباره ی خواص ضد میکروبی سویا، در پژوهش حاضر، خواص ضد باکتریایی عصاره ی متانولی دانه ی روغنی سویا بر علیه تعدادی از باکتری های استاندارد و باکتری های گیاهی و همچنین برای اولین بار بر روی قارچ پریکولاریا اریزا، عامل بیماری بلاست برنج مورد بررسی قرار گرفت. این کار کمک خواهد کرد تا ترکیباتی که ممکن است دارای ارزش دارویی و درمانی باشند شناسایی شوند.

### ۳-۲- نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی دانه ی روغنی سویا

نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی دانه ی روغنی سویا در جداول ۳، ۴ و نیز شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جداول مشاهده می شود، عصاره ی متانولی دانه ی روغنی سویا بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان باکتری استاندارد نشان داده است. در میان باکتری های گیاهی نیز بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را در غلظت ۰/۵ گرم بر میلی لیتر علیه باکتری گرم منفی سودوموناس سیرینجاینشان می دهد. نتایج حاصل از عصاره ی متانولی برای سویه های استاندارد نشان می دهد که در غلظت ۰/۵ گرم بر میلی لیتر با کنترل های مثبت از جمله کلرامفنیکل و جنتامایسین قابل رقابت می باشد. در مقابل، منطقه بازدارندگی دی متیل سولفوکسید به عنوان کنترل منفی نیز صفر بود. یعنی هیچ اثری بر روی همه ی میکروارگانیسم های تست شده نداشته است.

### ۳-۳- نتایج فعالیت ضد قارچی

نتایج اثرات ضد قارچی عصاره ی متانولی دانه ی روغنی سویا در جدول ۵ و شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می-دهند که در غلظت ۰/۵ گرم بر میلی لیتر اثرات ضد قارچی بسیار خوبی بر روی قارچ Pyricularia oryzae داشته است.

دی و آگاروالا فعالیت ضد باکتریایی روغن سویا را علیه دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس و اشیشیاکلی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که روغن سویا می تواند بر روی این دو باکتری در سبزیجات مختلف اثرات ضد باکتریایی نسبتاً خوبی داشته باشد. آرورا و همکاران دو نمونه از دانه ی سویا را انتخاب و بعد از عصاره گیری، غربالگری فیتوشیمیایی و فعالیت های ضد میکروبی را

جدول (۳): فعالیت ضد باکتریایی عصاره ی متانولی دانه ی روغنی سویا علیه باکتری های استاندارد

قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی متر	گرم مثبت		گرم منفی		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
	(g/ml) غلظت				
	۰/۵۰	۱۸/۵ ± ۰/۵۰	۲۵/۰ ± ۰/۱۰۰	۹/۶ ± ۰/۱۵	-
	۰/۲۵	۱۸/۰ ± ۰/۱۰۰	۲۳/۹ ± ۰/۱۰	۹/۵ ± ۰/۱۰۰	-
	۰/۱۲	۱۷/۸ ± ۰/۲۰	۲۱/۸ ± ۰/۲۰	۹/۳ ± ۰/۲۰	-
	۰/۰۶	۱۴/۳ ± ۰/۱۵	۲۰/۶ ± ۰/۳۵	۹/۲ ± ۰/۱۰	-
	۰/۰۳	۱۲/۵ ± ۰/۱۰۵	-	-	-
	۰/۰۱	۱۰/۴ ± ۰/۱۵	-	-	-
	دی متیل سولفوکسید	-	-	-	-
	جنتامایسین (10 µg/disk)	۲۶/۰ ± ۱/۷۰	۲۰/۳ ± ۱/۵۰	۱۹/۶ ± ۱/۱۰	۱۵/۶ ± ۰/۵۰
	کلرامفنیکل (30 µg/disk)	۲۲/۳ ± ۱/۲۰	۲۱/۷ ± ۰/۶۰	۲۰/۷ ± ۱/۵۰	-

مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر غلظت و دی متیل سولفوکسید بر روی دیسک ریخته شد

جدول (۴): فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی دانه‌ی روغنی سویا علیه باکتری‌های گیاهی

قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر				
	گرم مثبت	گرم منفی		
غلظت (g/ml)	<i>R. toxicus</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>X. C. campestris</i>
۰/۵۰	۳۶/۰ ± ۰/۵۰	۳۶/۴ ± ۰/۱۰	-	-
۰/۲۵	۳۵/۹ ± ۰/۱۰	۳۲/۹ ± ۰/۱۵	-	-
۰/۱۲	۳۵/۳ ± ۰/۱۵	۳۲/۴ ± ۰/۱۰	-	-
۰/۰۶	۹/۵ ± ۰/۵۰	۲۶/۳ ± ۰/۱۵	-	-
۰/۰۳	۹/۳ ± ۰/۲۰	۱۰/۰ ± ۰/۰۰	-	-
۰/۰۱	۹/۰ ± ۰/۰۰	۹/۶ ± ۰/۱۵	-	-
دی متیل سولفوکسید	-	-	-	-

مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر غلظت و دی متیل سولفوکسید بر روی دیسک ریخته شد

جدول (۵): اثر ضد قارچی عصاره‌ی متانولی دانه‌ی روغنی سویا علیه قارچ *Pyriculariaoryzae*. عامل بیماری بلاست

برنج	
غلظت (g/ml)	اثر بر روی قارچ <i>P. oryzae</i>
۰/۵۰	۳۵/۸ ± ۰/۱۵
۰/۲۵	-
۰/۱۲	-
۰/۰۶	-
۰/۰۳	-
۰/۰۱	-
دی متیل سولفوکسید	-

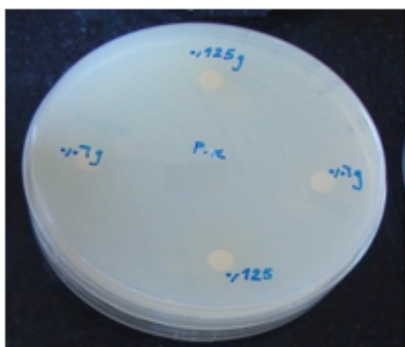
۳۰ میکرولیتر از هر غلظت و دی متیل سولفوکسید بر روی دیسک ریخته شد

در پایان قابل ذکر است که فعالیت ضد میکروبی گیاه شده می-تواند با مطالعات جدیدی همچون به کار بردن حلال-های مختلف دیگر برای استخراج، باکتری-ها و قارچ-های دیگر و استفاده از بخش-های دیگر گیاه مورد ارزیابی قرار گیرد.

### سپاسگزاری

از مجموعه مدیریتی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و همکاران انهدلیامکاناتی که در اختیار ما قرار دادند صمیمانه تشکر می-نمایم. همچنین از کلیه همکاران از دانشگاه مازندران و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند، تشکر ویژه به عمل می-آید.

همچنین با مشاهده نتایج حاصل از GC/MS مشخص شد که، نزدیک به ۴۵ درصد از سطوحی که-ها متعلق به ترکیب (Z,Z)-۹-۱۲-اکتادکانوئیک اسید می-باشد که قابلیت بسیار گسترده- بعنوان آنتی اکسیدان، ضد آفات و امراض و مهارکننده التهاب و سرطان نشان می-دهد که با خالص سازی این ترکیب می-توان اقدام به تجاری سازی متابولیت-های ثانویه گیاه سویا پرداخت. لذا می-توان چنین استنباط نمود که عصاره-های گیاهی می-توانند به صورت بالقوه به عنوان عوامل مهار رشد پاتوژن-ها در حوزه-ی کشاورزی مورد استفاده قرار گیرند. بدیهی است که می-توان از ترکیبات فعال زیستی موجود در گیاه و عصاره-ی گیاهی به عنوان منابع سودمند جدیدی که تأثیرات منفی بسیار کمتری بر سلامت انسان و محیط زیست دارند، استفاده نمود.



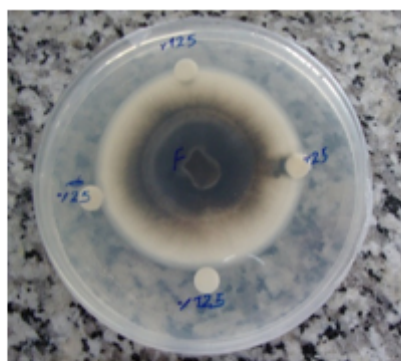
شکل ۱ ب: فعالیت ضد باکتریایی عصاره سویا بر علیه

باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا در غلظت های مختلف



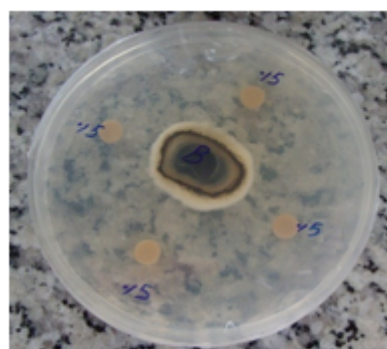
شکل ۱ الف: فعالیت ضد باکتریایی عصاره سویا

بر علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت های مختلف بعد از چهار تکرار و اندازه گیری محدوده ی بازدارندگی



شکل ۲ ب: فعالیت ضد قارچی عصاره ی متاتولی دانه ی روغنی

سویا علیه قارچ *P.oryzae*، عامل بیماری بلاست برنج در غلظت های ۰/۱۲۵ و ۰/۱۲ گرم بر میلی لیتر



شکل ۲ الف: فعالیت ضد قارچی عصاره ی متاتولی دانه ی روغنی

سویا علیه قارچ *P.oryzae*، عامل بیماری بلاست برنج در غلظت های ۰/۵ گرم بر میلی لیتر و اندازه گیری محدوده ی بازدارندگی

- Sharma, S., Kaur, M., Goyal, R. and Gill, B. S. (2014). Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes, *J. Food Sci. Technol.*, 51: 551-557
- Sethi, A., Prakash, R., Amandeep, S.D., Bhatia, A. and Singh, R.P. (2013). Identification of phytochemical constituents from biologically active pet ether and chloroform extracts of the flowers of *Allamanda violacea* A.DC (Apocynaceae), *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3(4): 95-108
- Thampy, S.V., Ramesh, V. and Vijayakumar, R. (2014). Study on ethanolic extract of Pitchavari: a native medicinal rice from southern peninsular India. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 25(2): 95-99
- Kim, H. J., Suh, H. J., Lee, C. H., Kim, J. H., Kang, S. C., Park, S. and Kim, J. S. (2010). Antifungal Activity of Glyceollins Isolated from Soybean Elicited with *Aspergillus sojae*. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 9483-9487
- Mahesh, B. and Satish, S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens, *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(S): 839-843
- Omotoso Abayomi, E., Kenneth, E. and Mkpuru, K. I. (2014). Chemometric profiling of methanolic leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae) using UV-VIS, FTIR and GC-MS techniques. *Peak Journal of Medicinal Plant Research*, 2 (1): 6-12
- Ponnusha, B. S., Subramaniyam, S., Pasupathi, P., subramaniyam, B. and Virumandy, R. (2011). Antioxidant and Antimicrobial properties of Glycine Max-A review, *Int J Cur Bio Med Sci.*, 1(2): 49 - 62
- Plonjarean, S., Phutdhawong, W., Siripin, S., Suvannachai, N. and Sengpracha, W. (2007). Flavour compounds of the Japanese vegetable soybean "Chakaori" growing in Thailand, *Maejo International Journal of Science and Technology*, 01: 1-9
- Zanini Martins, C. H., Machado Freire, M. G., Postali Parra, J. R. and Rodrigues Macedo, M. L. (2012). Physiological and biochemical effects of an aqueous extract of *Koeleria paniculata* (Laxm.) seeds on *Anticarsia gemmatalis* (Huebner) (Lepidoptera: Noctuidae), *SOAJ of Entomological Studies*, 1: 81-93
- Zgoda J. R. and Porter J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi., *Pharmaceutical Biology*, 39(3): 221-225
- Investigation of chemical compositions and antimicrobial activity of methanolic extract of soybean (*Glycine max* L.) seeds
- منابع  
کامکار، ب.، قربانینصرآبادی، ر.، عالی‌مقام، س.م.، و ابراهیمی، ط.، (۱۳۸۸). تأثیر بقایای پنبه‌سویا بر آزداسازینیترا تان و آمونیوم در خاک و رابطه آن با پویا بیتی تغییرات جمعیت های میکروبی، *علوم محیطی*، ۱: ۱۴۹-۱۶۰.
- خطیری، ی.، بهادر، ن.، و پردلی، ج. ر.، (۱۳۹۲). مطالعه باکتری های اندوفیتیک جدا شده از گیاه سویا و نقش آن ها در کنترل برخی قارچ های بیماری زای گیاهی، فصلنامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها، ۵: ۵۱-۶۰.
- Amadioha, A. C. (2000). Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*., *Crop Protection*, 19: 287-290
- Arora, M., Singh, S. and Kaur, R. (2013). Phytochemical analysis, protein content & antimicrobial activities of selected samples of *Glycine Max* Linn., *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 02 (11): 570-574
- Asghar, S.F., ur-Rehman, H., Choudahry, M.I. and ur-Rahman, A. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of petroleum ether extract (oil) and bio-assays of crude extract of *Iris germanica*. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3(7): 95 -100.
- Banu, H.R. and Nagarajan, N. (2013). GC-MS determination of bioactive components of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(4): 279-285
- Chia, Y.Y. and Yap, W. (2011). In vitro antimicrobial activity of hexane: petroleum ether extracts from fruits of *Momordica charantia* L., *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*, 2(3): 868-873
- De, B. and Agarwala, S. (2014). Antimicrobial activity of Soybean and Sunflower oil post frying vegetables from *Allium* and *Brassica* family, *International Journal of Nutrition and Agriculture Research*, 1(1): 72 - 82
- Dharshini Thirunalasundari, T. and Sumayaa, S. (2013). GC-MS determination of bioactive compounds of *Glycine Max*. (Soybean). *International Journal of Medicinal Chemistry & Analysis*, 3(2): 79-82
- Erdogrul, Ö. T. (2002). Antibacterial activities of some plant extracts .used in folk medicine, *Pharmaceutical Biology*, 40(4): 269-273
- Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G. A. and Ghahari, S. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activities of the constituents isolated from *Koeleria paniculata* leaves, *natural product research*, 29(19): 1865-1869
- Jegadeeswari, P., Nishanthini, A., Muthukumarasamy, S. and Mohan, V.R. (2012). GC-MS analysis of bioactive components of *Aristolochia Krysagathra* (Aristolochiaceae), *Journal of Current Chemical & Pharmaceutical Sciences*, 2(4): 226-232



## Investigation of chemical compositions and antimicrobial activity of methanolic extract of soybean (*Glycine max* L.) seeds

### Abstract

Gram positive and negative bacteria comprise a wide range of microorganisms. Most of them are useful and necessary for human life, and some may cause plant, animal or human diseases. Rice blast is one of the most common diseases in most places that rice is cultivated and enters enormous damage to rice crops each year. For disease inhibition, a large amount of fungicides should be consumed. In other hand, plants contain a wide range of biomolecules able to control the growth and expansion of pathogens. Soybean (*Glycine max* L.) is an industrial plant, and its seeds are widely used to produce edible oil and meal for livestock feed. In this research, in addition to the analysis of methanol extracts of Soybean seeds by the GC/MS, antibacterial and antifungal activities were investigated. The results of GC/MS indicated 47 compounds that the most important were: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-(44.89%), 9-Octadecenoic acid, methyl ester (13.58%), Hexadecanoic acid, methyl ester (11.34%), methyl linolenate (6.81%), Octadecanoic acid, methyl ester (3.69%) and n-Hexadecanoic acid (2.61%). The methanolic extract of soybean at 0.5 g/ml dimethyl sulfoxide concentration has shown an excellent inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (gram-positive), *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* (gram-negative) bacteria and *Pyricularia oryzae*.

**Keyword:** Antibacterial; Antifungal activity; GC/MS analysis; Methanol extract;