نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۴۵-۳۸

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 1, Spring 2014, p. 38-45

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی برگ گیاه گل مغربی (*Oenothera biennis*) بر عوامل فساد در آب سیب

ویدا مردانی قهفرخی[۱]- مهران اعلمی[۲*]- سعیده عربشاهی دلویی[۳]- علیرضا صادقی ماهونک[۴]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۱۰/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۰

چکیده

در این پژوهش، ترکیبات فنولی برگ گیاه گل مغربی (*Oenothera biennis*) توسط حلال‌های استون ۷۰٪، اتانول ۷۰٪ و متانول ۷۰٪ به روش غوطه‌وری استخراج گردید. مقدار ترکیبات فنولی عصاره استونی به طور معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) بالاتر از عصاره‌های اتانولی و متانولی بود. فعالیت ضد-میکروبی عصاره‌ها بر روی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌ها فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان دادند. در میان عصاره‌ها، عصاره استونی بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را نشان داد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره استونی برای باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* به ترتیب ۰/۵ و۱ (میکروگرم/میلی‌لیتر) بود. علاوه‌بر این، فعالیت ضدمیکروبی عصاره استونی در آب سیب حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *ساکارومایسز سرویزیه* به طور مجزا طی ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیبات فنولی پایداری خوبی طی دوره نگهداری در آب سیب نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی، افزودن عصاره برگ گیاه گل مغربی تا غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تغییر معنی‌داری را در کیفیت آب سیب ایجاد نکرد.

واژه‌های کلیدی: برگ گل مغربی (*Oenothera biennis*)، فعالیت ضدمیکروبی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ساکارومایسز سرویزیه، آب سیب

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها علاوه بر اینکه به عنوان عوامل فساد مواد غذایی مطرح می‌باشند، عامل بسیاری از بیماری‌ها و مسمومیت‌های غذایی نیز به شمار می‌آیند. از جمله راه‌های مبارزه با این میکروارگانیسم‌ها استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی می‌باشد. استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی با عوارض جانبی، تولید متابولیت‌های ثانویه مضر و افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها همراه خواهد بود (مهدی زاده و رضوی روحانی، ۱۳۸۷). با توجه به عوارض ناشی از مصرف نگهدارنده‌های سنتزی و همچنین افزایش آگاهی مصرف-کنندگان در این رابطه، تا کنون تحقیقات زیادی در زمینه یافتن عوامل ضدمیکروبی طبیعی صورت گرفته است. در این راستا گیاهان و محصولات گیاهی نظیر اسانس‌ها و عصاره‌ها بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Burt, 2004). پژوهش‌ها حاکی از آن است که اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی عمدتا مربوط به حضور ترکیبات فنولی می‌باشد. این ترکیبات از طریق مکانیسم‌های مختلفی می‌توانند بر رشد و فعالیت سلول‌های میکروبی موثر باشند. به‌نظر می‌رسد اثرات ضدمیکروبی این ترکیبات مربوط به غیرفعال شدن آنزیم‌های سلولی به وسیله این ترکیبات باشد که بستگی به سرعت و نسبت نفوذ این ترکیبات به سلول دارد. برخی از محققین اظهار داشته‌اند که این ترکیبات نفوذپذیری غشاء سلولی و متابولیسم سلول‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Nazck & Shahidi, 2004) آبمیوه‌ها از جمله مواد غذایی حساس به فساد میکروبی می‌باشند. ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی، نسبت بالای کربن/ نیتروژن و حضور قندهای ساده در آبمیوه‌ها امکان رشد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها از قبیل کپک‌ها، مخمرها، باکتری‌های اسید دوست، لاکتوباسیلوس‌ها و در نهایت فساد آبمیوه‌ها را توسط آن‌ها فراهم می‌سازد (Battey *et al*., 2002). در این میان، باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* از عوامل شایع در فساد آبمیوه‌ها شناخته شده‌اند. *ساکارومایسز سرویزیه* با

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم وصنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: Mehranalami@yahoo.com)
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهر

دکربوکسیله کردن اسید سوربیک و تبدیل آن به ۳،۱- پنتا دی‌ان (Stradford *et al*., 2007) و همچنین تولید دی‌اکسید کربن و اتانول طی فرایند تخمیر باعث ایجاد عطر و طعم نامطلوبی در آبمیوه‌ها می‌گردد (Tajchakavit *et al*., 1998). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نیز تاثیر بسزایی در ایجاد طعم نامطلوب در آبمیوه‌ها دارد. به عنوان مثال، این باکتری ضمن تولید دی‌استیل به‌عنوان یک متابولیت فرار باعث تغییر طعم آب‌میوه‌ها می‌گردد. پژوهشگران تا کنون روش‌های مختلفی از جمله استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را جهت ممانعت از فعالیت این میکروارگانیسم‌ها در آبمیوه‌ها به کار گرفته‌اند.

گل مغربی (*Oenothera biennis*) گیاهی است زینتی، دو ساله، پوشیده از تار و کرک و به ارتفاع نیم تا یک و نیم متر که دارای برگ‌هایی زرد، متناوب، با کناره‌های دندانه‌دار و موجدار است. چون گل‌های درشت و زیبای آن در هنگام غروب آفتاب باز می‌شوند به آن گل مغربی می‌گویند. روغن حاصل از بذرهای این گیاه به دلیل حضور گاما لینولنیک اسید در درمان بیماری‌های مختلف نظیر رماتیسم مفصل‌ها، دیابت، اگزما و ... موثر می‌باشد (میرحیدر، ۱۳۷۵). هدف از تحقیق حاضر بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره فنولی استخراج شده از برگ گیاه گل مغربی و پتانسیل آن جهت استفاده در آب سیب به عنوان نگهدارنده طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

برگ گیاه گل مغربی مورد استفاده در این تحقیق در تیر ماه ۱۳۸۹ (در مرحله گلدهی گیاه) از مزرعه گیاهان دارویی شرکت داروسازی گیاه اسانس واقع در شهرستان گرگان جمع آوری شد. برگ‌ها پس از شستشو و خشک کردن در آون (Memert 100-800، آلمان) با دمای ۴۵ ℃ به مدت ۲۴ ساعت، با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی (ایران خودساز) تا مش ۶۰ به صورت پودر در آمدند و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- ℃ نگهداری شدند.

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC 1058) و مخمر ساکارومایسز *سرویزیه* (PTCC 5269) بودند. سویه‌های خالص این میکروارگانیسم‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد.

کنسانتره آب سیب از شرکت پوریا البرز گلستان واقع در شهرستان گرگان خریداری و تا زمان استفاده در دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش‌ها

استخراج عصاره‌های فنولی

تهیه عصاره‌های فنولی با روش غوطه‌وری در سه حلال استون ۷۰٪، اتانول ۷۰٪ و متانول ۷۰٪ (حجمی:حجمی) انجام گرفت. ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰ گرم پودر افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۱۸ ساعت و در دمای محیط با همزن مکانیکی هم زده شد. پس از این مرحله، هر یک از عصاره‌ها به وسیله کاغذ صافی معمولی از بخش جامد جدا شدند. عصاره‌های اتانولی و متانولی، ابتدا به وسیله تبخیر کننده چرخان (IKA RV05، کره جنوبی) در دمای ۴۰ ℃ و عصاره استونی به وسیله آون تحت خلا (Memert VO200، آلمان)، تغلیظ و در نهایت هر چهار عصاره توسط خشک‌کن انجمادی (Operon FDB5503، کره جنوبی) به پودر تبدیل شدند و تا زمان استفاده در ظروف غیرقابل نفوذ به هوا در فریزر با دمای ۱۸- ℃ نگهداری شدند (Kowalski *et al*., 2009)

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها و نمونه‌های آب سیب به روش فولین سیوکالته (Slinkard & Singleton., 1977) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی [1] (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های فنولی با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک [2] تعیین گردید. برای این منظور، از میکرو پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. محلول استوک عصاره‌ها در آب مقطر استریل تهیه گردید و غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با رقیق‌سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هینتون براث و YGC براث تهیه شد. باکتری و مخمر مورد استفاده به مدت یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش، به ترتیب روی محیط کشت‌های نوترینت آگار و YGC آگار در دو دمای ۳۷ ℃ و ۲۵کشت داده شدند. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی 10^6 cfu/ml از مک فارلند شماره ۰/۵ استفاده شد. پس از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت یک شبانه روز در انکوباتور قرار داده شدند و پس از آن میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترمنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. آزمایشات در ۳ تکرار و ۳ زمان مختلف انجام شد (NCCLS, 2000).

1 - Minimum Inhibitory Concentration
2 – Micro Broth Dilution

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)[1]

از خانه‌هایی که در آن کدورتی مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر به محیط کشت جامد (مولر هینتون آگار و YGC آگار) منتقل و یک شب در دمای مناسب نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد (Oroojaliant *et al.*, 2010).

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی در آب سیب

تهیه آب سیب

کنسانتره آب سیب تا رسیدن به بریکس ۱۱ رقیق‌سازی و pH آن به کمک اسید سیتریک صنعتی در نقطه ۳/۷ تنظیم شد (استاندارد ملی ایران شماره ۳۶۵، ۱۳۶۸). در هر ظرف شیشه‌ای ۱۹ میلی‌لیتر آب سیب رقیق‌سازی شده توزیع شد و در اتوکلاو در دمای ۹۰ ℃ به مدت ۲ دقیقه پاستوریزه گردید. پس از سرد شدن نمونه‌ها شش نمونه آب سیب به صورت تصادفی انتخاب گردید. سه نمونه آب سیب به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ ℃ و سه نمونه به مدت پنج روز در دمای ۲۵ ℃ گرمخانه گذاری شدند و سپس بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۳۴۱۴ آب میوه‌ها از نظر حضور باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* مورد بررسی قرار گرفتند و هیچ آلودگی به این میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های آب سیب مشاهده نشد.

افزودن عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی به آب سیب

با پذیرش نمونه آبمیوه‌هایی با غلظت مشخص از عصاره برگ گیاه گل مغربی توسط پنلیست‌ها و تطابق نتایج ارزیابی حسی با نتایج حاصل از آزمون میکروبی، عصاره استونی برگ گل مغربی در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در شرایط استریل به آبمیوه‌ها اضافه شد. جهت استریل کردن عصاره گیاهی از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ هفته در دمای محیط نگهداری شدند. در این مقاله جهت رسم بهتر نمودارها و نیز بررسی بهتر نتایج، تیمارهای حاوی ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام عصاره استونی به ترتیب Ac-۲۵۰، Ac-۵۰۰ و Ac-۱۰۰۰ نامگذاری شدند.

تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسز سرویزیه به آب سیب

در این مرحله، از کشت ذخیره باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* به صورت مجزا سوسپانسیون میکروبی با غلظت 10^6 cfu/ml در شرایط استریل تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هر میکروارگانیسم به صورت مجزا به ۱۹ میلی‌لیتر آب سیب اضافه شد تا نمونه‌هایی حاوی 10^4 cfu/ml از میکروارگانیسم مورد نظر به دست آید. تمامی نمونه‌ها به مدت ۳۵ روز در دمای محیط نگهداری شدند و نمونه برداری از آن‌ها به این صورت انجام شد: روز اول، روز سوم، روز هفتم، روز چهاردهم، روز بیست و یکم، روز بیست و هشتم و روز سی و پنجم.

بررسی زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها در آبمیوه‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها

ابتدا سطح خارجی بطری حاوی آب سیب با استفاده از الکل تمیز و گندزدایی شد. پس از خشک شدن بطری‌ها در کنار شعله، محتویات داخل هر بطری کاملا مخلوط و یکنواخت گردید.

کشت نمونه‌ها جهت بررسی لاکتوباسیلوس پلانتاروم

در این مرحله، مقدار ۲ میلی‌لیتر نمونه به دو پلیت سترون منتقل شد (به هر کدام یک میلی‌لیتر). سپس حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط مورد نظر که دمای آن حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود به هر پلیت اضافه شد. محیط و نمونه را به خوبی مخلوط کرده و پلیت‌ها تا جامد شدن محیط بر روی سطح صاف و خنک قرار داده شدند. پس از جامد شدن محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۳ روز و در دمای ۳۷ ℃ گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان تعیین شده پلیت‌ها را بررسی نموده و میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند. کشت نمونه‌ها به صورت دو تکرار (دوپلیتی) انجام شد (استاندارد ملی ایران، شماره ۳۴۱۴).

کشت نمونه‌ها جهت بررسی ساکارومایسز سرویزیه

پس از تهیه پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل، ۱ میلی‌لیتر نمونه به پلیت اضافه وسپس توسط یک میله شیشه‌ای در شرایط استریل در سطح محیط کشت پخش شد. نمونه‌ها به مدت ۵ روز و در دمای ۲۵ ℃ گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان تعیین شده پلیت‌ها را بررسی نموده و میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند (استاندارد ملی ایران، شماره ۹۹۷).

ارزیابی حسی

جهت ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر ویژگی‌های ارگانولپتیک آب سیب (شامل عطر، طعم و رنگ) آبمیوه‌های حاوی عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی در غلظت‌های مذکور همراه با یک نمونه شاهد (نمونه فاقد عصاره) در شرایط یکسان توسط ۱۰ ارزیاب مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت آزمون پانل بر روی هر

1 - Minimum Bactericidal Concentration

صفت، از سیستم ارزیابی ۵ نقطه‌ای استفاده گردید. نمونه‌ای از فرم ارزیابی در جدول ۳-۲ آورده شده است.

آنالیز آماری

در این پژوهش، تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ($P< ۰/۰۵$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

مقدار کل ترکیبات فنولی

جدول ۱، مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های برگ گیاه گل مغربی را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان داد که نوع حلال مورد استفاده تاثیر معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) بر مقدار کل ترکیبات فنولی هر یک از عصاره‌ها داشت. استون ۷۰٪ بیشترین کارایی را در استخراج ترکیبات فنولی به خود اختصاص داد. مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان اساسا به دلیل حضور ترکیبات فنولی بوده و در بسیاری موارد ارتباط مستقیمی میان محتوی ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد (Hou *et al*., 2003). ترکیبات فنولی همچنین دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله اثرات ضدمیکروبی، ضد عفونت، ضد آلرژی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی بدن می‌باشند. مصرف روزانه بیش از ۱ گرم ترکیبات فنولی می‌تواند نقش موثری در پیشگیری از ابتلا به سرطان داشته باشد (Wijngaard *et al*., 2009).

جدول ۱- مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از برگ گل مغربی

عصاره	مقدار کل ترکیبات فنولی (گرم معادل گالیک اسید/۱۰۰ گرم عصاره خشک)
استون ۷۰٪	۱۲/۹ ± ۰/۱۳ [a]
اتانول ۷۰٪	۹/۱۸ ± ۰/۱۶ [b]
متانول ۷۰٪	۹/۰۱ ± ۰/۲۴ [b]

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها

فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های فنولی استخراج شده از برگ گیاه گل مغربی توسط استون ۷۰٪، اتانول ۷۰٪ و متانول ۷۰٪ بر روی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* به روش رقت‌سازی در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دو شکل MIC و MBC به ترتیب در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. عصاره‌های برگ گیاه گل مغربی فعالیت ضدمیکروبی خوبی از خود نشان دادند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌های فنولی در مقایسه با مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* داشت. در میان عصاره‌های مورد بررسی، عصاره استونی بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را داشت. این امر می‌تواند مربوط به وجود مقادیر بالاتری از ترکیبات فنولی در عصاره استونی در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی باشد. پژوهشگران غلظت، ویژگی‌های ساختاری ترکیبات فنولی از جمله نوع، تعداد و موقعیت گروه‌های استخلافی در حلقه بنزن، نوع و مکانیسم عمل این ترکیبات در عصاره‌های گیاهی را از عوامل مؤثر در ایجاد اختلاف در فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها دانسته‌اند (Cueva *et al*., 2010). Tian و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده از گیاه *Galla Chinesis* توسط حلال‌های اتیل استات، اتانول، آب و پارابن بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (*استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلوس، اشریشیا کلای، سالمونلا تایفی موریوم و شیگلا دیسانتری*) و همچنین مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* گزارش کردند که عصاره‌ها فعالیت ضد-باکتریایی خوبی داشته‌اند. درحالیکه هیچ کدام از عصاره‌ها تاثیری بر مخمر نداشتند. در این پژوهش تانن به عنوان ترکیب ضدمیکروبی اصلی در عصاره‌ها شناخته شد. به عقیده این محققین برخی از قارچ-ها قادرند ترکیبات فنولی از جمله تانن‌ها را به مولکول‌های کوچکتری با فعالیت ضدمیکروبی کم‌تر از جمله گالیک اسید تجزیه کنند. Wong (۲۰۰۶) بیان داشته که گالیک اسید تنها در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر می‌تواند اثر ممانعت کنندگی بر قارچ‌ها داشته باشد.

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) عصاره‌های حاصل از برگ گیاه گل مغربی

میکروارگانیسم	عصاره		
	استون ۷۰٪	اتانول ۷۰٪	متانول ۷۰٪
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۰/۲۵	۱/۲۵	۱/۲۵
ساکارومایسز سرویزیه	۱	۲/۵	۲/۵

جدول ۳- حداقل غلظت کشندگی (MBC) (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) عصاره‌های حاصل از برگ گیاه گل مغربی

میکروارگانیسم	عصاره		
	استون ۷۰٪	اتانول ۷۰٪	متانول ۷۰٪
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۰/۵	۱/۲۵	۱
ساکارومایسز سرویزیه	۱	۲/۵	۱/۲۵

اثر بازدارندگی عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی بر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در آب سیب

از آن‌جایی که سیستم‌های طبیعی معمولا دارای پیچیدگی بیشتری نسبت به شرایط آزمایشگاهی هستند، لذا علاوه بر مطالعه خواص ضدمیکروبی عصاره‌های استخراج شده از برگ گیاه گل مغربی روی محیط کشت آزمایشگاهی این ویژگی در آب سیب و بر روی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* نیز مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱، زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را در نمونه‌های آب سیب حاوی مقادیر مختلف عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی و نمونه شاهد نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در آب سیب در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* پس از تلقیح در آب سیب فاقد نگهدارنده افزایش یافت و پس از گذشت ۳ روز نگهداری در دمای محیط به حداکثر مقدار خود (۵/۴×۱۰^{۴} cfu/ml) رسید. افزایش تعداد باکتری‌ها می‌تواند مربوط به ورود باکتری به فاز لگاریتمی رشد باشد. پس از آن، روند رشد باکتری تا پایان دوره نگهداری با شیب ملایمی سیر نزولی پیدا کرد. در مورد تیمار۲۵۰-Ac، جمعیت باکتری در روز اول (۲۴ ساعت پس از تلقیح) در حدود ۱۰۰۰۰ cfu/ml بود که برابر با میزان اولیه تلقیح شده به آب سیب می‌باشد، این مطلب بیان‌گر این است که در این مدت باکتری در فاز تأخیری[1] قرار داشته است. پس از آن، تعداد باکتری‌ها تا روز سوم اندکی افزایش یافت و به ۱/۵×۱۰^{۴} cfu/ml رسید. به نظر می‌رسد که حضور عصاره استونی در این غلظت در آب سیب به میزان قابل توجهی باعث جلوگیری از رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مرحله لگاریتمی رشد گردیده است. پس از آن، تعداد باکتری‌ها در آب سیب تا پایان دوره نگهداری به تدریج کاهش یافت. در تیمارهای ۵۰۰-Ac و ۱۰۰۰-Ac، تعداد باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای محیط به صورت معنی‌داری (P < ۰/۰۵) کاهش یافت. نتایج به دست آمده، اثر کشندگی عصاره استونی برگ گل مغربی را بر روی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تائید می‌کند. تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در تیمارهای ۵۰۰-Ac و ۱۰۰۰-Ac به ترتیب پس از ۲۱ و ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط به صفر رسید. در آبمیوه‌های حاوی ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره فنولی تعداد باکتری‌ها پس از سه روز نگهداری به سرعت کاهش یافت. ترکیبات فنولی با تاثیر بر پیوند میان مولکول‌های پروتئینی و لیپیدها در غشای سلول‌های میکروبی و یا ایجاد اختلال در انتقال نوترینت‌ها از غشای سیتوپلاسمی می‌توانند مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها شوند. تغییر در ساختار مولکول‌های DNA، کاهش دسترسی زیستی به یون‌های فلزی ضمن تشکیل کمپلکس با آن‌ها و کاهش ظرفیت پتانسیل اکسایش-کاهش محیط از مکانیسم‌های دیگری است که رفتار ضدمیکروبی ترکیبات فنولی را توجیه می‌کند (Wong & Kitts, 2006).

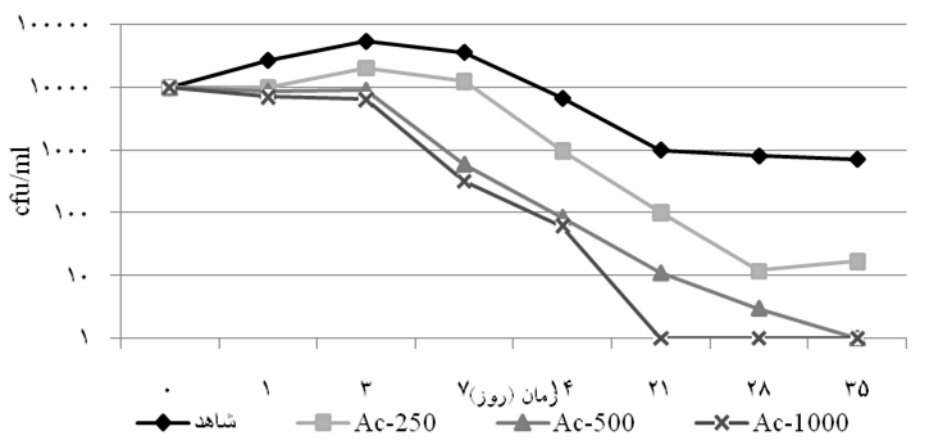
اثر بازدارندگی عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی بر *ساکارومایسز سرویزیه* در آب سیب

شکل ۲، زنده‌مانی مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* را در نمونه‌های آب سیب حاوی مقادیر مختلف عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی و نمونه شاهد نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر میزان زنده‌مانی مخمر در آب سیب در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. نتایج نشان داد که تعداد این مخمر در روز هفتم به بیشترین مقدار خود رسید و پس از آن طی ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط با شیب ملایمی کاهش یافت. چنین روندی در مورد تیمار۲۵۰-Ac نیز مشاهده شد. تعداد مخمرهای *ساکارومایسز سرویزیه* در آب سیب حاوی ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره گیاهی پس از گذشت ۳ روز نگهداری به حداکثر مقدار خود رسید و پس از آن کاهش یافت. به نظر می‌رسد که عصاره استونی برگ گیاه گل مغربی در این غلظت توانسته است مانع از رشد مخمر گردد. عصاره استونی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دلیل دارا بودن اثر کشندگی بر روی *ساکارومایسز سرویزیه* باعث کاهش تعداد مخمر پس از گذشت ۲۴ ساعت در آب سیب گردید. تعداد مخمرها در تیمارهای ۱۰۰۰- Ac، پس از ۲۸ روز نگهداری به صفر رسید. سرنادمید و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش کردند که روغن ضروری لیمو در سطح غلظت ۰/۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر در آب سیب شفاف و آب سیب کدر باعث طولانی شدن فاز تاخیر در مرحله رشد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* و همچنین کاهش سرعت رشد آن شده است. در این پژوهش، فعالیت ضدمیکروبی روغن ضروری لیمو در آب سیب کدر در مقایسه با آب سیب شفاف ضعیف‌تر ارزیابی گردید. به عقیده آن‌ها، اتصال سلول‌های مخمر به ذرات معلق در آب سیب کدر و در نهایت ته‌نشین شدن آن‌ها باعث کاهش دسترسی عوامل ضدمیکروبی به مخمر می‌گردد.

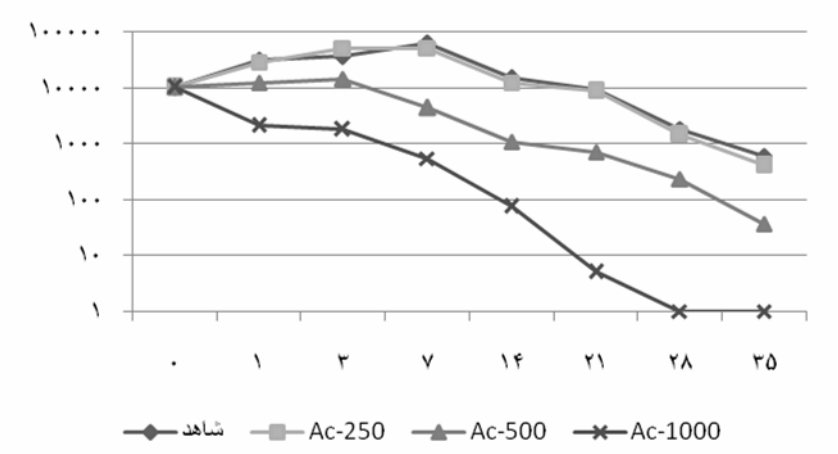
محتوی ترکیبات فنولی آب سیب تحت تیمارهای مختلف طی دوره نگهداری

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر مقدار کل ترکیبات فنولی آب سیب در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار می‌باشد. مقدار کل ترکیبات فنولی در تیمارهای مختلف به دلیل حضور ترکیبات فنولی در عصاره برگ گیاه گل مغربی متفاوت است.

1- Lag phase



شکل ۱- جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در آب سیب حاوی عصاره برگ گل مغربی و نمونه شاهد طی ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط

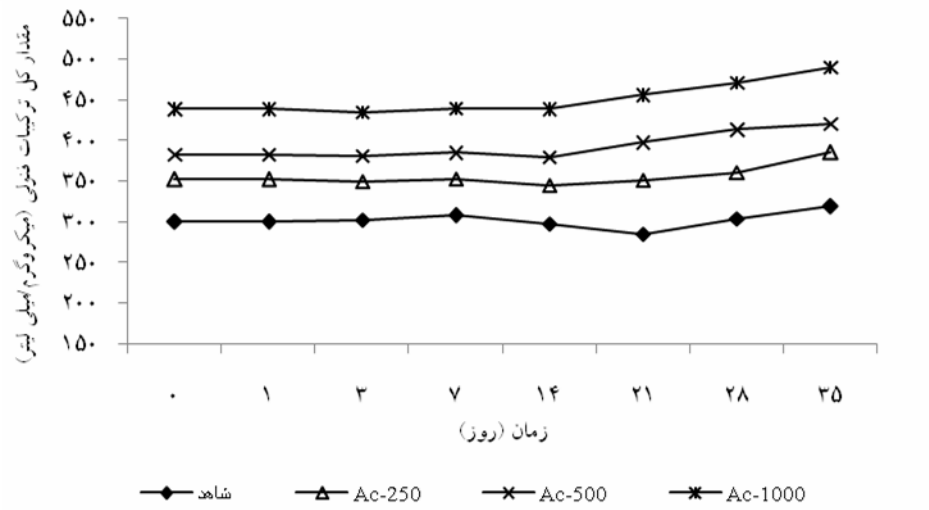


شکل ۲- جمعیت ساکارومایسز سرویزیه در آب سیب حاوی عصاره برگ گل مغربی، بنزوات و نمونه شاهد طی ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط

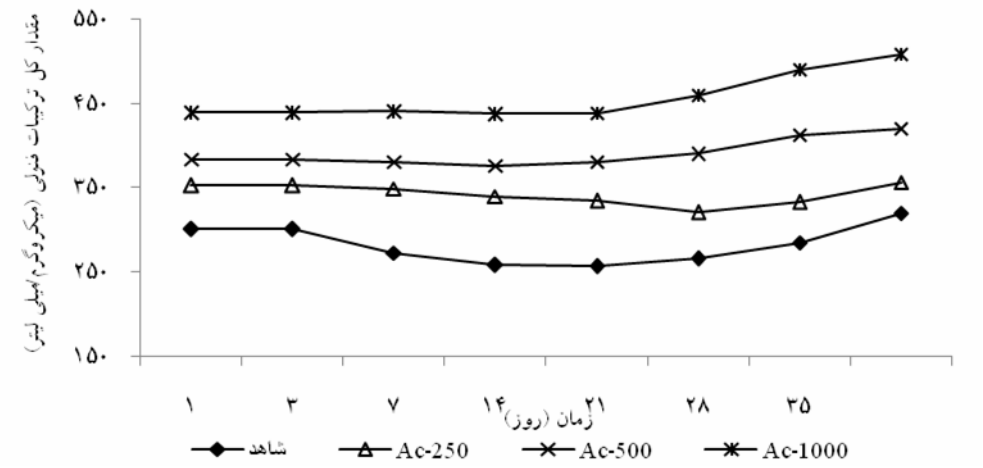
تیمارهای Ac -۱۰۰۰، Ac -۵۰۰، Ac -۲۵۰ و شاهد به ترتیب حاوی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در نقطه صفر می‌باشند. نتایج حاکی از آن است که عصاره فنولی برگ گل مغربی در pH اسیدی آب سیب پایداری خود را در طی نگهداری به مدت ۳۵ روز در دمای محیط حفظ کرده است. همان‌طور که در اشکال ۳ و ۴ مشاهده می‌گردد مقدار کل ترکیبات فنولی نمونه‌های حاوی عصاره در طول دوره نگهداری افزایش یافته است که این امر می تواند ناشی از هیدرولیز پیوندهای بین ترکیبات فنولیک با سایر ترکیبات به ویژه پروتئین‌ها باشد. شهابی (۱۳۸۷)، گزارش کرد که محتوی ترکیبات فنولی در نمونه‌های آب سیب حاوی عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی پوست انار (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) طی ۲۴ روز نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به تدریج افزایش یافت.

ارزیابی حسی آبمیوه‌ها

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی، افزودن عصاره برگ گیاه گل مغربی تا غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری را در عطر و طعم و رنگ آب سیب ایجاد نکرد. افزایش غلظت عصاره باعث کاهش کیفیت آبمیوه‌ها به لحاظ طعم و رنگ گردید. آبمیوه-های تولید شده از لحاظ عطر تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) با یکدیگر نداشتند. در هر حال با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی چشایی، می توان گفت که سطح پذیرش آبمیوه‌های حاوی عصاره برگ گیاه گل مغربی نسبتا مناسب بوده است اما ایده‌ال نمی‌باشد. به نظر می‌رسد عدم آشنایی ذائقه مردم با طعم‌های گیاهی و گیاهان دارویی و رواج بسیار کم این نوع آبمیوه‌ها دلیل عمده این مساله می‌باشد. در هر حال تبلیغات گسترده، بسته بندی شیک و ارائه این نوع محصولات در قالب فرآورده‌های فانتزی می‌تواند بر افزایش سطح پذیرش عمومی آنها تاثیر قابل توجهی داشته باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین مقدار ترکیبات فنولی نمونه‌های آب سیب حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* طی ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط



شکل ٤- مقایسه میانگین مقدار ترکیبات فنولی نمونه‌های آب سیب حاوی مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* طی ۳۵ روز نگهداری در دمای محیط

جدول ٤-مقایسه میانگین ارزیابی حسی آب سیب حاوی عصاره برگ گیاه گل مغربی، بنزوات و نمونه شاهد

تیمار	ویژگی‌ها		
	طعم	عطر	رنگ
شاهد	۴/۵ ± ۰/۴۱ ^{a}	۴ ± ۰/۷۲ ^{a}	۴/۵ ± ۰/۴۱ ^{a}
Ac -۱۰۰۰	۱/۲ ± ۰/۳۸ ^{b}	۳/۹ ± ۰/۷ ^{a}	۱/۶ ± ۰/۴^{c}
Ac-۵۰۰	۳ ± ۰/۸۱ ^{c}	۳/۴ ± ۰/۶۶ ^{a}	۳/۱ ± ۰/۲^{b}
Ac-۲۵۰	۴/۳ ± ۰/۶۸^{a}	۴ ± ۰/۸ ^{a}	۳/۴ ± ۰/۴۶ ^{a}

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

منابع

شهابی، ا.، احمدی، ع.، حجازی، م.، ۱۳۸۷، بررسی خواص آنتی باکتریال ترکیبات فنولی هسته انگور و پوست انار در آب سیب، پایان نامه، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه تبریز.

مهدی زاده، ت. و رضوی روحانی، س. م.، ۱۳۸۷، بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره روغن های اسانسی سه نوع پیاز مختلف بـر روی بـاکتری های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشیرشیاکلی*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۵ (۲).

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۶۸، استاندارد ملی ایران شماره۳۶۵: ویژگی‌های آب سیب، تجدید نظر سوم.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۸۲، استاندارد ملی ایران شماره ۹۹۷: روش شمارش کپک و مخمر.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.، ۱۳۸۲، استاندارد ملی ایران شماره ۳۴۱۴: نوشیدنی‌ها- آبمیوه و فراورده‌های آن- ویژگی‌ها و روش-های آزمون میکروبی. تجدید نظر اول.

میرحیدر، ح.، ۱۳۷۵، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها. انتشارات دفتر نشر فرهنگ اسلامی. جلد سوم.

Battey, A. S., Duffy, S., Schaffner, D. W., 2002, Modeling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverage with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology, 68, 1901-1906.

Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M., and Bartolomé, B., 2010, Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. Research in Microbiology, 161, 372-382.

Hou, W. C., Lin, R. D., Cheng, K. T., Hung, Y. T., Cho, C. H., and Chen, C. H., 2003, Free radical- scavenging activity of Taiwanese native plants, Phytomedicine, 10, 170-175.

Kowalski, R., 2009, *Silphium L*. extracts – composition and protective effect on fatty acids content in sunflower oil subjected to heating and storage. Food Chemistry, 112: 820-830.

Natonal committee for clinical laboratory standards, 2000, Methods for dilution antimicrobial suspectibility tests for bacteria that grow aerobically (5^{th} ed.). Approved standard, M7-A5. Pennsylvania: Wayne.

Naczk, M., and Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography, 1054, 95-111.

Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, Azizi, M., and Bassami, M. R., 2010, Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens, Food Chemistry, 120, 756-770.

Slinkard, K., and Singleton, V. L., 1977, Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.

Stradford, M., Plumbridge, A., Archer, D. B., 2007, Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the PAD1 gene. Applied and Environmental Microbiology, 73, 6534-6542.

Tajchakavit, S., Ramaswamy, H. S., Fustier, P. 1998. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. Food Research International. 31(10): 713-722.

Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., Luo, Y., 2009, Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinesis*: The polarity affects the bioactivities, Food Chemistry, 113(1), 173-179.

Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almassy, K., Krisch, J., 2011, Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk, International Journal of Food Microbiology, 144, 480-486.

Wang, L. P., 2006, Experimental study on antitumor effect of gallic acid. Jilin University, China: Master Thesis.

Wijngaard, H. H., Rle, C., and Brunton, N., 2009, Asurvey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants, Food Chemistry, 116(1), 202-207.

Wong, P. Y. Y., and Kitts, D. D., 2006, Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts, Food Chemistry, 97, 505-515.