تعیین فعالیت ضد میکروبی رنگ طبیعی بیکسین بصورت*in vitro* و بررسی کاربرد آن در سیستم مدل غذایی اسنک حجیم

الناز میلانی[۱]، فرشته حسینی[۲*]، سمانه رضائی بروجردی[۳]، شادی بلوریان[۲]

۱- استادیار گروه پژوهشی فرآوری مواد غذایی- پژوهشکده علوم وفناوری مواد غذایی-جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
۲- استادیار گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی- پژوهشکده علوم وفناوری مواد غذایی-جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد - گروه علوم و صنایع غذایی- دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰٦/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۱)

چکیده

امروزه آگاهی مصرفکنندگان از خطرات ناشی از مصرف رنگ‌های سنتزی، منجر به افزایش روزافزون تقاضا برای رنگهای طبیعی در صنایع مختلف غذایی شده است. هدف این پژوهش بررسی تاثیرات ضدمیکروبی بیکسین در برابر میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکولی* و *لیستریا اینوکوا* به روش تعیین قطر هاله بازدارنده و اندازه‌گیری میزان MIC و MBCآن بود.سپس سطوح مختلف بیکسین (۰/۱٤، ۰/۲۸ و ۰/٤۲ درصد) به عنوان یک ترکیب رنگی طبیعی و سلامتی زا در فرمولاسیون دراژه اسنک حجیم استفاده شده وتاثیر آن بر ویژگی‌های رنگیشامل L*,a*,b* به روش هانترلب، حسی شامل رنگ، بو و طعم ، بافت و احساس دهانی، شکل ظاهری و پذیرش کلی به روش هدونیک ۵ نقطه و میکروبی شامل شمارش کلی، کپک و مخمر، انتروباکتریاسه، *اشرشیاکلی* فراورده در مقایسه با نمونه شاهد مطابق با روش های استاندارد ملی ایران ارزیابی گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، بیکسین در برابر هر سه میکروارگانیسم مورد آزمون اثرات بازدارندگی چشمگیری نشان داد. تاثیر بازدارنده بیکسین تا غلظت mg/ml ۱/۲ بر *استافیلوکوکوس* بیش از دو باکتری دیگر بود. در نمونه های اسنک،با افزایش غلظت بیکسین، مقادیر *a بالاتر (قرمزی بیشتر) و مقادیر *L و *b کمتر (زردی و روشنایی کمتر) مشاهده شد.در مجموع ویژگی های حسی، داوران نمونه های حاوی ۰/٤۲٪ بیکسین را در مقایسه با سایر نمونه ها مطلوب تر ارزیابی نمودند. کاربرد بیکسین در اسنک حجیم سبب کاهش معنی دار بار میکروبی کل در نمونه ها گردید. همچنین رشد کپک و مخمر در نمونه های حاوی بیکسین مشاهده نشد.

کلید واژگان: فعالیت ضد میکروبی،MIC، بیکسین، اسنک، رنگ طبیعی

* مسئول مکاتبات: fereshtehosseini@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

امروزه سطح آگاهی مصرف کنندگان و تولیدکنندگان در ارتباط با مشکلات ناشی از مصرف غذاهای ناسالم رو به افزایش است، بنابراین تقاضا برای مواد طبیعی بهبود دهنده سلامت روز به روز افزوده می گردد. تاثیرات مثبت و سلامتی زای رنگ های طبیعی در پژوهش های محققان مختلف به اثبات رسیده است و ویژگی های آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد بیماری های قلبی-عروقی، ضد التهابی .... این ترکیبات مورد تاکید قرار گرفته است[۱]. لذا استفاده از این رنگ ها در تولید فراورده های غذایی ضمن ایجاد ظاهر مطلوب و بازارپسند، محصولات غذایی را تبدیل به غذاهای عملگر و به عبارت دیگر نوعی غذا- دارو می نماید.

رنگ آناتو (E_{160b}) از پریکارپ دانه های گیاه گرمسیری *بیکسا اورلانا* (*Bixa orellana*) به دست آمده و کاربردهای گسترده ای در صنایع غذایی، داروسازی و تولید مواد آرایشی و بهداشتی دارد. در دانه های آناتو کاروتنوئیدهای مختلفی شناسایی شده اند، اما رنگدانه اصلی آن بیکسین است که بیش از ۸۰ درصد کل محتوی کاروتنوئیدهای آناتو را تشکیل داده و یک مونو متیل استر محلول در روغن می باشد [۱].

طبق تخمین ، تولید جهانی سالانه دانه آناتو ۱٤۵۰۰ تن است. پرو و برزیل کشورهای اصلی تولید کننده آن هستند و سالانه ۷۵۰۰ تن دانه کشت می دهند که فقط ۲ ٪ آن که معادل ۱۵۰ تن بیکسین است، جهت استخراج رنگ به کار می رود و باقیمانده در بازار محلی به صورت ادویه به فروش می رسد. بازار اصلی مصرف آناتو امریکا ، اروپای غربی و ژاپن است [۱].

آناتو در محصولات مختلف غذایی مانند فراورده های لبنی، مارگارین، روغن سالاد، بستنی، فراورده های غلات، محصولات اکسترود شده، سوسیس، برنج، انواع سوپ، انواع سس ها، انواع نوشیدنی ها، فراورده های ماهی، محصولات گوشتی، شیرینها، کیک ها و تنقلات کاربرد دارد. در اسپانیا، مکزیک و فیلیپین و سایر کشورهای امریکای مرکزی و جنوبی دانه آناتو به عنوان چاشنی مصرف می شود [۲و۳].

مطالعات سم شناسی نشان داده اند که مصرف مقادیر مجاز آناتو ایمن است. متوسط رژیم ۰٫۱٪ (نوربیکسین) به میزان mg/kg ٦۹ وزن بدن در مردان و ۷٦mg/kg وزن بدن در زنان اثر مغایری نشان نداده است. بیکسین نسبت به سایر کاروتنوئیدها سریعا جذب خون شده ، بعد از ۸ ساعت در مورد بیکسین و ۲٤ ساعت در مورد نوربیکسین پلاسما شفاف می شود [٤]. طبق مطالعات علمی انجام شده بیکسین و نوربیکسین اثرات درمانی موثری در موشهای دیابتی مبتلا به قند و چربی خون بالا داشته اند. کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی موجود در دانه آناتو نظیر بیکسین و نوربیکسین، ترکیبات بیواکتیوی هستند که در درمان بسیاری از بیماریهای التهابی، قلبی عروقی، آب مروارید و تخریب ماکولار مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. همچنین دانه آناتو به دلیل داشتن ترکیبات توکوفرول، توکوتری انول و نیز گرانیل گرانیول (که ترکیب اصلی ترپنی دانه است) پتانسیل درمانی موثری در سل و تومورها نشان داده است [۵]. بررسیهای دیگر اثرات ضد دیابتی، ضد تشنج، ضد تب، ضد اسهال، ضد گونوره و نیز اثرات درمانی در بیماریهای کبد، کلیه و ریه آناتو را تایید کرده اند [٦].

در پژوهش های مختلف اثرات ضد میکروبی بخش های مختلف آناتو مورد بررسی قرار گرفته است از جمله گالیندوکاسپیرنا (۲۰۰۳)،تمیل‌سلوی و همکاران (۲۰۱۱)، ونوگوپالان و همکاران (۲۰۱۲)، هاجوری و همکاران (۲۰۱۳) و ...[۷،۸،۹،۱۰].

در حال حاضر اسنک های حجیم شده برپایه ذرت به عنوان یکی از مقبول ترین میان وعده ها در دنیا و کشور ما مصرف می شوند و جایگاه این محصول در سبد غذایی خانواده های ایرانی نیز تا حدود زیادی تثبیت شده است. افزودنی های رنگی مختلف به منظور ایجاد ظاهر جذاب و بازارپسندی این محصول مورد استفاده قرار می گیرند که در حال حاضر اغلب آنها از نوع سنتزی نظیر سان ست یلو بوده و آثار سوء آنها برسلامت مصرف کنندگان به خصوص اقشار آسیب پذیر از نظر سلامت (کودکان و نوجوانان) به اثبات رسیده است. تحقیقات مختلف نشان دادند که رنگ‌های مصنوعی عوارضی نظیر آسم، کهیر، بیش فعالی در کودکان، تضعیف سیستم ایمنی و یا حتی سرطان ایجاد می‌کنند.

در این پژوهش تاثیرات ضدمیکروبی بیکسین در برابر میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکولی* و *لیستریا اینوکوا* به روش تعیین قطر هاله بازدارنده و اندازه‌گیری میزان MIC و MBC مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از آنجا که اطلاعاتی پیرامون کاربرد بیکسین در سیستم های غذایی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مختلف نظیر اسنک حجیم و نحوه اثر آن بر بار میکروبی در این محصولات در دست نیست و نیز با توجه به اثرات سلامتی زایی چشمگیر بیکسین و مصرف بالای اسنک‌ها در سبد غذایی خانوارهای ایرانی و علاقمندی کودکان به مصرف این محصولات، در این پژوهش با رویکرد بهبود ارزش تغذیه ای و افزایش سطح سلامت فراورده های غذایی، تاثیر افزودن سطوح مختلف رنگ آناتو (بیکسین) بر ویژگیهای رنگی، حسی و میزان بار میکروبی اسنک نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد

ماده ی اولیه بلغور ذرت از کارخانه ذرت طلایی تامین گردید.رنگ طبیعی آناتو از مرکز تحقیقاتی و تولی نیمه صنعتی افزودنی های غذایی جهاد دانشگاهی، حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO)، اتانول و هگزان از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. باکتری‌های مورد استفاده در آزمون شامل *لیستریا اینوکوا* (ATCC33090)،*استافیلوکوکوس اورئوس*(ATCC25923) و *اشرشیاکولی*(ATCC25922)تولید کلکسیون محیط کشت امریکا (ATCC)تکثیر شده در گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، تهیه شدند. محیط کشت‌های مولر هینتون براث و مولرهینتون آگار ساخت شرکت مرک آلمان مورد استفاده قرار گرفتند. دیسک استاندارد جنتامایسین ۱۰µg بر دیسک، از شرکت پادتن طب تهیه شد.

۲-۲- بررسی اثرات ضدمیکروبی بیکسین به روش انتشار دیسک

به منظور تعیین وجود یا عدم وجود فعالیت ضد میکروبی بیکسین در ابتدا روش دیسک و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور غلظت‌های ٤/۸mg/ml، ۲/٤، ۱/۲، ۰/٦ از بیکسین در حلال مناسب تهیه شد. محلول‌های حاصل با استفاده از میکروفیلتر سرنگی ۰/٤٥ µm استریل شدند. سپس دیسک‌های بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در محلول‌ها غوطه‌ور شدند تا کاملا به محلول آغشته گردند. تلقیح با استفاده از سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی تهیه شده معادل cfu/ml 10^8 بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد. در انتها با استفاده از پنس استریل، دیسک‌های آغشته شده به محلول ضدمیکروب در سطح محیط کشت قرار داده شده و با کمی فشار ثابت گردیدند. پتری‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شده و طی این مدت از نظر تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین (µg ۱۰بر دیسک) به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد دیسک به عنوان کنترل منفی در آزمون مورد استفاده قرار گرفت. آزمون در سه تکرار انجام شده و قطر هاله‌ها با استفاده از کولیس و برحسب میلی متر اندازه‌گیری شد.

۲-۳-تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

به دلیل رنگی بودن بیکسین و به منظور اطمینان از صحت کار، تعیین حداقل غلظت بازدارنده به دو روش میکرودایلوشن[1] و رقت در آگار[2] انجام شد.

۲-۳-۱-تعیین MIC به روش ریزرقت [1]

در روش میکرودایلوشن ابتدا کشت ٢٤ ساعت از میکروارگانیسم-های موردنظر بر محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد. سپس سوسپانسیون میکروبی 5×10^6 از میکروارگانیسم‌ها تهیه شد. به هر چاهک از پلیت ۹٦ خانه مقدار ۱۲,۵µL از این سوسپانسیون افزوده شد. محلول استوک با غلظت mg/ml ۱ در حلال DMSO از بیکسین تهیه شده و سپس با استفاده از محیط کشت استریل مولر هینتون براث رقت‌های متوالی از این محلول تهیه شد. به هر چاهک مقدار µL ۱۲۵ از ماده ضدمیکروب افزوده شده و پلیت‌ها در۳۷°C به مدت۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی مدت گرمخانه‌گذاری محلول تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید با غلظت mg/ml ۵ تهیه شده و به هر چاهک ۲۵µL از این معرف افزوده شد. در چاهک‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد ظرف کمتر از نیم ساعت، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود. غلظت مربوط به اولین چاهک که در آن رشد میکروب روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد، به عنوان MIC ترکیب ضدمیکروب درنظر گرفته شد.

۲-۳-۲- تعیین MIC به روش رقت در آگار

1. Microdilution
2. Agar dilution method

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

از آن‌جا که نتایج آزمون‌های میکروبی به‌طور گسترده تحت تاثیر شرایط آزمون می‌توانند متفاوت باشند، روش انجام آن‌ها باید استاندارد شوند. روش توضیح داده شده در این بخش بر اساس دستورالعمل سازمان و کمیته‌های CLSI[3] و EUCAST[4] برای روش رقت در آگار می‌باشد که توسط ویگاند و همکاران (۲۰۰۸) ارائه شده است. در روش رقت در آگار محلول‌های با تعداد مشخص سلول باکتری، مستقیما داخل پلیت‌های حاوی محیط کشت که دارای غلظت‌های مختلف ماده ضدمیکروب می‌باشند، تلقیح می‌شوند. پس از طی دوره گرمخانه‌گذاری، حضور پرگنه-های باکتری بر روی پلیت، دلالت بر رشد میکروارگانیسم‌ها خواهد داشت. در این روش، رقت‌های متوالی بیکسین به‌صورت mg/L ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰ و ۶۰۰از محلول اولیه۱۰۰۰۰mg/L ماده ضدمیکروب، در محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شد. با توجه به آن که جمعیت میکروبی توصیه شده در روش رقت در آگار 10^4 می باشد، سوسپانسیون میکروبی با استفاده از محلول رینگر استریل ٤ بار و هر بار به میزان ۰/۱ رقیق شد. سپس مقدارμL ۱۰۰ از سوسپانسیون میکروبی cfu/ml 10^4 از هر میکروب به پلیت‌ها تلقیح شده و به‌طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخش شد. پلیت‌های تلقیح شده فاقد بیکسین به عنوان کنترل منفی و پلیت-های حاوی بیکسین و بدون تلقیح به عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند و پس از طی این مدت از نظر رشد پرگنه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. رقت مربوط به اولین پلیت که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان MIC گزارش شد.[۱۱].

۲-۳-۳-تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC)

به منظور تعیین حداقل غلظت کشنده از چاهک‌هایی که از نظر رشد میکروارگانیسم‌ها منفی بودند، با استفاده از سوآپ استریل نمونه برداشته و بر روی پلیت حاوی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه-گذاری در دمای°C ۳۷، پلیت‌ها از نظر رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. اولین رقت در پلیت‌های فاقد رشد میکروارگانیسم ، به عنوان MBC گزارش شد.

3. Clinical and Laboratory Standards Institute
4. EuropeanCommittee for Antimicrobial Susceptibility Testing

۲-٤- تهیه نمونه ها

فرمولاسیون پایه اسنک با استفاده از دستگاه اکسترودر دومارپیچ موجود در پایلوت پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد (مدلDS56شرکت JinanSaxin) تولید شد. نمونه های اکسترود شده تولیدی بلافاصله در آون هوای داغ برای مدت ۲ ساعت در٤۰ درجه سانتیگراد خشک شده و درون کیسه‌های پلاستیکی پلی اتیلنی تا انجام آزمایشات تکمیلی دور از نور و در دمای اتاق نگهداری شد.

دراژه (پوشش طعم دار روی اسنک) با استفاده از روغن نباتی (برند لادن)، رنگ طبیعی آناتو (تهیه شده در مرکز تحقیقاتی و تولی نیمه صنعتی افزودنی های غذایی جهاد دانشگاهی)، طعم دهنده (شرکت صنایع غذایی گلشاد مشهد) و نمک خوراکی (بازار محلی) تولید شد. در فرمولاسیون دراژه به میزان ٪٦۰ کل دراژه روغن نباتی و ٪٤۰ مواد پودری به کار گرفته شد که شامل رنگ در سه سطح ۰/۱٤، ۰/۲۸ و ۰/٤۲ درصد و مابقی پودر آب پنیر فرموله شده بود. در هر فرمولاسیون به میزان ٪۱/۵ دراژه طعم دهنده و نیز به میزان ٪ ۰/۲ کل وزن محصول (اسنک+دراژه) نمک افزوده شد. در نهایت محصول نهایی به صورت شامل٪۵۰ دراژه و ٪۵۰ پایه (ذرت اکسترود شده) تهیه گردید.

۲-۵-آنالیز رنگ نمونه ها

به منظور ارزیابی قدرت رنگی بیکسین در اسنک حجیم در مقایسه با نمونه های شاهد، رنگ نمونه ها با استفاده از دستگاه هانترلب مدل colorflex ساخت امریکا اندازه گیری شد. تفاوت های رنگی بصورت ارزش های CIELAB شامل L (روشنی)، a (قرمزی-سبزی) و b (زردی-آبی) ثبت گردید. رنگ سنج با استفاده از صفحه سیاه و سفید(x=77.25, y=82.09, z=87.27) استاندارد شد. برای هر نمونه فنجانک با چرخش °۹۰ از چهار جهت مختلف قرار گرفته و در هر جهت ارزش های فوق قرائت گردید.

۲-٦-ارزیابی ویژگی های حسی

آزمون حسی نمونه های تولید شده به روش هدونیک ۵ نقطه ای مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این کار ۸ نفر از پرسنل نیمه آموزش دیده پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

دانشگاهی مشهد انتخاب شدند. آزمون پنل در شرایط استاندارد در آزمایشگاه کنترل کیفی انجام پذیرفت. به نمونه ها کدهای تصادفی داده شد و برای جلوگیری از تداخل نمونه ها بعد از ارزیابی هر نمونه از آب استفاده شد. نور و دمای آزمایشگاه در هنگام آزمون به طورمناسب (دما حدود °c ۲۵و نور مخلوط سفید وزرد)تنظیم گردید. نمونه ها از نظر رنگ، بو و طعم ، بافت(نرمی و سفتی) و احساس دهانی، شکل ظاهری و پذیرش کلی به صورت ۵= بسیار خوب؛ ٤= خوب؛ ۳= نه خوب نه بد؛ ۲ = بد و ۱= بسیار بد مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۷-آزمون های تعیین بار میکروبی اسنک حجیم

آزمونهای میکروبی شامل شمارش کلی بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱-۵۲۷۲ ؛ تعیین میزان کپک و مخمر بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۰۸۹۹؛ جستجو، شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲-۲٤٦۱ و جستجو و شمارش *اشرشیاکلی* بر اساس استاندارد شماره ۲۹٤٦ با روش بیشترین تعداد احتمالی صورت گرفت[۱۲].

محیط های کشت مورد استفاده جهت شمارش کلی (PCA) plate count agarمارکScharlauاسپانیا؛ برای کپک و مخمر yeast glucose chloramphenicol (YGC) مارک Liofilchem ایتالیا؛ جهت *اشریشیاکلی* محیط کشت مایع غنی کننده انتخابی laurylsulfate broth مارک Merk KGaA آلمان و برای انتروباکتریاسه از محیط کشت violet red bile glucose agar (VRBGA)مارکLiofilchem ایتالیا استفاده گردید.

برای انجام آزمایشات، طبق روش استاندارد ملی ایران، ۱۰ گرم از هر نمونه (اسنک حاوی ۰/٤۲٪ بیکسین و نمونه شاهد فاقد بیکسین) که کاملا خرد و مخلوط شده بود، زیر هود در شرایط کاملا استریل و کنار شعله، توسط ترازوی ۲ صفر مارکKernآلمان توزین گردید و با استاده از یک اسپاتول استریل به درون ارلن حاوی ۹۰cc محلول رینگر استریل منتقل شد. نمونه به خوبی و به مدت چند دقیقه کاملا همزده شد تا مخلوطی یکنواخت و هموژن به دست آید. سپس رقت های سریالی از نمونه در محلول رینگر تهیه شد. سپس cc ۱ از هر رقت به داخل پلیتهای استریلPCA، YGCوVRBGAمنتقل گردید. جهت آزمون شناسایی اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی ۱۰ccاز رقت 10^{-1} به داخل لوله آزمایشی که حاوی cc ۱۰محیط کشت انتخابی و لوله دورهام است تلقیح شد. تمامی کشتها به صورت پورپلیت و در دو تکرار انجام گردید. پلیتهایPCAدر شرایط هوازی در داخل انکوباتور °c ۳۰ به مدت۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شده و سپس جهت شمارش تعداد کلنی ها بررسی گردید. پلیتهایYGCنیز در شرایط هوازی داخل انکوباتور °c۲۵ برای مدت ۷-۵ روز گرمخانه گذاری شد. همچنین پلیتهایVRBGAدر دمای °c۳۷ به مدت ۲٤ ساعت نگهداری گردید. لوله های دورهام دار حاوی محیط lauryl sulfate broth نیز به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری و از نظر تولید گاز بررسی شدند. به منظور آزمون تاییدی۱ سی سی از لوله های اولیه به داخل لوله های حاوی محیط کشت مایع انتخابی EC یا EC-Boullionتلقیح شده، مجددا به مدت٤۸ ساعتداخل بن ماری °c ٤٤گرمخانه گذاری و سپس از نظر تولید گاز بررسی گردید.

۲-۹-تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شدند. به منظور آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Mstatc و آزمون فاکتوریل استفاده گردید. بررسی اثرات متقابل تیمارها توسط آزمونLSD در سطح معنی داری $\alpha<0/05$ انجام شد.

۳- تجزیه و تحلیل داده ها

۳-۱- نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی بیکسین در سیستم *invitro*

۳-۱-۱- نتایج آزمون هاله عدم رشد

همان‌گونه که در شکل۱مشاهده می‌شود، بیکسین در برابر هر سه میکروارگانیسم مورد آزمون اثرات بازدارندگی چشمگیری نشان داد. تاثیر بازدارنده بیکسین تا غلظت mg/ml ۱/۲ بر *استافیلوکوکوس* بیش از دو باکتری دیگر بود. همچنین در غلظت mg/ml ۲/٤، هاله بازدارنده بزرگتری در برابر *لیستریا اینوکوا* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین تشکیل شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

غلظت ٤/٨mg/ml بیکسین در برابر *اشرشیاکلی* کاملا بازدارنده بود، به‌طوری‌که هیچ پرگنه‌ای در پلیت مربوطه رشد نکرد.

نتایج دیگر محققان، نتایج فوق را تایید می‌کند از جمله فلیشر و همکاران(۲۰۰۳) گزارش کردند که عصاره استخراج شده اتانولی از دانه آناتو (بیکسین)، فعالیت بازدارندگی چشمگیری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مختلف از جمله *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشرشیاکولی* و قارچ شبه‌مخمر *کاندیدیا آلبیکانس* دارد. آن‌ها قطر هاله بازدارنده این عصاره با غلظت ۱۰mg/ml را برای *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل ۲۰ میلی‌متر و برای *اشرشیاکولی* معادل ۲۲/۵ میلی‌متر گزارش نمودند[۱۳].

در پژوهش هاجوری و همکاران (۲۰۱۳) نیز عصاره اتانولی آناتو دارای اثر ضدمیکروبی معنی‌داری معرفی شده است. این محققان قطر هاله بازدارنده این عصاره در غلظت ۱۰mg/ml را در برابر *اشرشیاکولی*، معادل ۱۱ میلی‌متر گزارش کردند[۱۰].

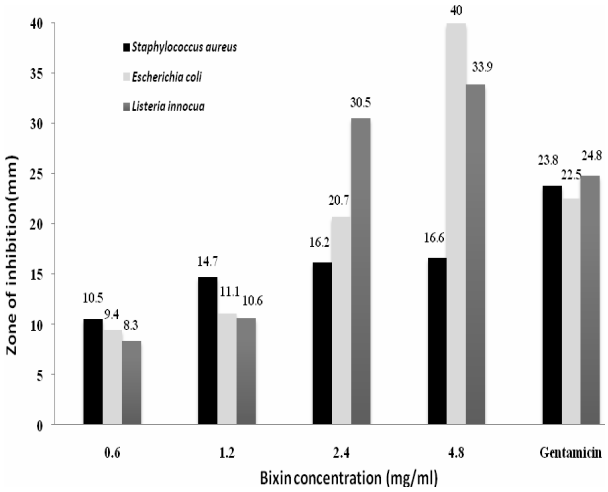

Fig 1 Diameter of inhibition zones of different concentration of bixin against*S. aureus, Ecoli, L.inocoa*.

در تحقیقات دیگر مقدار میکروارگانیسم تلقیح شده و غلظت ماده ضدمیکروب در نتایج آزمون بازدارندگی موثر دانسته شده است [١٤]. همچنین اختلافاتی که در نتایج مشاهده می‌شود، می‌تواند ناشی از تفاوت غلظت‌های ترکیبات دارای خاصیت ضدمیکروبی در گیاه اولیه و به تبع آن عصاره‌های استحصالی باشد که وابسته به تفاوت‌های ژنتیکی گونه گیاه و یا شرایط محیطی است که گیاه در آن رشد نموده است. همچنین اختلافات زیرگونه‌های میکروارگانیسم‌ها نیز می‌تواند منشاء دیگر تفاوت‌های جزئی موجود در نتایج باشد [۱۵].

گالیندوکاسپیرنا (۲۰۰۳) گزارش کرد که آناتو اثر ضدمیکروبی قوی روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* دارد، اما بر روی اسیدلاکتیک باکتری‌ها تاثیر ضعیفی نشان می‌دهد. همچنین روی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس بیفیدوم* و مخمرها اثر معنی‌داری ندارد [۷].

تمیل‌سلوی و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر ضدمیکروبی عصاره متانولی دانه و برگ آناتو را بر روی باکتری‌های بیماریزای مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که عصاره حاصل از برگ‌ها در اغلب موارد تاثیر بازدارندگی بیشتری نسبت به عصاره دانه دارد. آن‌ها وجود ترکیباتی نظیر فلاوونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها و ساپونین‌ها را در عصاره گزارش کردند [۸].

ونوگوپالان و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضدمیکروبی عصاره دانه و برگ آناتو را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مختلف مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که فعالیت ضد یکروبی این عصاره‌ها چشمگیر بوده و بر این اساس می‌توانند کاربردهای غذایی و دارویی مختلفی داشته باشند[۹].

۳-۱-۲- نتایج تعیین میزان MIC

مطابق جدول۱، MIC در روش رقت در آگار برای بیکسین در مورد *اشرشیاکولی* بزرگتر از ٤٠٠، *استافیلوکوکوس اورئوس* بزرگتر از ۱۰۰ و *لیستریا اینوکوا* بزرگتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید.

MIC تعیین شده برای بیکسین در برابر میکروارگانیسم‌های منتخب در روش ریزرقت در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، دامنه اعداد بدست آمده در دو روش با یکدیگر مطابقت داشتند.

۳-۱-۳- نتایج تعیین میزان (MBC)

نتایج تعیین میزان حداقل غلظت کشنده (MBC) در جدول ۳ قابل مشاهده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of bixin against selected bacterial strains in agar dilution method

Anti-microbial agent concectration (mg/L)	*Listeria inocoa*	*Staphilococcus aureus*	*Escherichia Coli*
50	+	+	+
100	+	+	+
150	+	−	+
200	+	−	+
250	+	−	+
300	−	−	+
350	−	−	+
400	−	−	+
450	−	−	−
500	−	−	−
550	−	−	−
600	−	−	−

(+) indicates microbial growth and (-) is a sign of non- microbial growth.

Table 2 MIC of bixin against selected bacterial strains in microdilution method

	bixin		
	Listeria inocoa	*Staphilococcus aureus*	*Escherichia Coli*
MIC (mg/mL)	0.5	0.125	0.5

Table 3 MBC of bixin against selected bacterial strains

	bixin		
	Listeria inocoa	*Staphilococcus aureus*	*Escherichia Coli*
MBC (mg/mL)	1	0.25	2

در مجموع نتایج آزمون میکروبی حاکی از تاثیر بازدارندگی قوی‌بیکسین در برابر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* نسبت به باکتری گرم منفی *اشرشیاکولی* بود. تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت در برابر ترکیبات موثره یا اسانس‌های مختلف حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان می‌دهند [۱٦-۱۹].

مقاومت عمومی باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس‌ها، به وجود غشای فسفولیپیدی بیرونی آن‌ها نسبت داده می‌شود که تقریبا در برابر ترکیبات لیپوفیلیک غیرقابل نفوذ می‌باشد. عدم وجود این مانع در باکتری‌های گرم مثبت این امکان را به وجود می‌آورد که اجزاء هیدورفوب عصاره‌های استخراج شده در تماس مستقیم با غشاء سلولی قرار گرفته و با تاثیر بر میزان نفوذپذیری

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

غشاء در برابر یون‌های مختلف، نشت ترکیبات سلولی حیاتی و یا از کار انداختن سیستم‌های آنزیمی، سبب بازدارندگی و یا مرگ باکتری‌ها شوند [۲۰].

همچنین محققان گزارش کردند که بین ساختار شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و ترکیبات طبیعی رابطه برقرار است [۱٤]. برخی ترکیبات فعال دارای حلقه فنلی برای میکروارگانیسم‌ها سمی محسوب می‌شوند. این سمیت ناشی از تاثیر حلقه فنلی در اکسیده نمودن ترکیبات مانند واکنش با گروه‌های سولفیدریل و یا انجام واکنش‌های غیراختصاصی با پروتئین‌ها می‌باشد [۲۰]. همچنین گزارش شده است که ترکیبات آلکالوئیدی بر روی پروتئین‌های خارج سلولی[5] تاثیر گذاشته و سبب بازدارندگی از فعالیت میکروارگانیسم‌ها می‌شوند [۱۵].

فلیشر و همکاران (۲۰۰۳) در عصاره اتانولی استخراج شده از دانه آناتو، وجود ترکیبات فلاوونوئیدی، ساپونین‌ها، ترکیبات فنولیک و قندهای احیاکننده را گزارش نمودند[۱۳]. هاجوری و همکاران (۲۰۱۳) نیز حضور آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها و ترپنوئیدها را در عصاره اتانولی استخراج شده از آناتو شناسایی نمودند. این ترکیبات می‌توانند عامل ایجاد اثرات ضدباکتریایی عصاره اتانولی آناتو باشند[۱۰].

در مطالعه مکانیسم تاثیر بیکسین بر باکتری‌ها، تمیل سلوی و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از SEM سلول‌های تیمار شده باکتری‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* را با بیکسین مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده نمودند که این سلول‌ها دچار تجزیه، توده‌ای شدن[6] و از هم پاشیدگی شده‌اند[۸].

۳-۲- نتایج تعیین ویژگی های رنگی

جدول ٤ نتایج تاثیر غلظت های مختلف بیکسین را بر ویژگی های اسنک حجیم نشان می دهد. آنالیز واریانس داده ها نشان داد که تاثیر غلظت های مختلف بیکسین بر میزان روشنی نمونه ها معنی دار است به طوری که با افزایش غلظت بیکسین از روشنی نمونه ها کاسته شده و رنگ نمونه های اسنک تیره تر شده است. همچنین در غلظت های بالای بیکسین میزان ارزش*a یا قرمزی نمونه ها نیز افزایش معنی دار نشان داده است ($p \leq ۰/۰۵$) که با توجه به قرمز بودن رنگ طبیعی بیکسین، این امر مورد انتظار است. در خصوص میزان زردی (ارزش *b)، تفاوت مشاهده شده بین نمونه ها معنی دار نبود ($p \geq ۰/۰۵$).

با استناد به رنگ نمونه های اسنک موجود در بازار، مقادیر*a بالاتر (قرمزی بیشتر) و مقادیر*Lو*bکمتر (زردی و روشنایی کمتر) مطلوب می باشد. بنابراین بر اساس ویژگی های رنگی غلظت ۰/٤۲٪ بیکسین مطلوب می باشد.

۳-۳- نتایج آزمون های حسی

جدول ۵ نتایج تاثیر غلظت های مختلف بیکسین بر ویژگی های حسی نمونه های اسنک حجیم شده را نشان می دهد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس انجام شده تفاوت رنگ نمونه های حاوی بیکسین از نظر داوران حسی در مقایسه با نمونه شاهد معنی دار بود($p \leq ۰/۰۵$) . در مورد سایر ویژگی های حسی شامل بافت و شکل ظاهری و پذیرش کلی داوران تفاوتی بین نمونه های حاوی غلظت های مختلف بیکسین قائل نشدند اما این نمونه ها با شاهد تفاوت معنی دار داشتند. لازم به ذکر است که تفاوت بو و طعم نمونه های حاوی ۰/۱٤بیکسین و نمونه شاهد نیز معنی دار تشخیص داده نشد، اما نمونه ۰/٤۲ بیکسین بالاترین امتیاز طعم را به خود اختصاص داد.در مجموع ویژگی های حسی، داوران نمونه های حاوی ۰/٤۲٪ بیکسین را در مقایسه با سایر نمونه ها مطلوب تر ارزیابی نمودند.

5. Extra-cellular proteins
6. Aggregation

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Table 4 Effect of different Bixin concentrations on the color properties of snack

Bixin concentration	L*	a*	b*
0.14%	57.525±0.04[a]	10..65±0.13[c]	29.55±0.54[a]
0.28%	54.52±1.29[b]	14.830±0.41[b]	30.28±1.24[a]
0.42%	51.23±1.24[c]	16±1.2[a]	28.815±0.62[a]

∗ Values within the same column with the different superscript meant significant difference (P≤ 0.05).

Table 5 Effect of different Bixin concentrations on the sensory properties of snack samples

Snack sample	Taste	Texture	Appearance	Color	Overall acceptability
0.14% Bixin	3.375±0.74[c]	3.125±0.83[b]	3.75±0.89[a]	4.125±0.83[a]	3.75±0.71[a]
0.28% Bixin	3. 5±0.53[b]	3.5±0.53[a]	3.75±0.89[a]	3.625±1.06[c]	3.875±0.83[a]
0.42% Bixin	3.875±0.64[a]	3.75±0.71[a]	4±0.76[a]	4.125±0.64[a]	3.875±0.64[a]
control	3.375±0.74[c]	2.375±0.74[c]	3 ±1.2[b]	3.875±0.99[b]	3.00±0.93[b]

∗ Values within the same column with the different superscript meant significant difference (P≤ 0.05).

۳-٤- نتایج آزمون های میکروبی نمونه ها

بر اساس نتایج به دست آمده در آزمون های میکروبی انجام شده بر روی نمونه ها (جدول٦)، کاربرد بیکسین در اسنک حجیم سبب کاهش معنی دار بار میکروبی کل در نمونه ها شده است. همچنین رشد کپک و مخمر در نمونه های حاوی بیکسین نیز مشاهده نشده است، در حالی که در نمونه شاهد پلیت های ارزیابی میزان کپک و مخمر حاوی کلنی های قابل شمارش بودند. میزان *اشرشیاکلی* و انتروباکتریاسه در هر دو نمونه شاهد و نمونه اسنک حاوی بیکسین منفی بود.

گالیندوکاسپیرنا (۲۰۰۳) اثر ضدمیکروبی عصاره آناتو را در برابر ۷ گونه میکروارگانیسم پاتوژن، ۵ گونه اسیدلاکتیک باکتری، ٤ گونه باکتری مولد فساد و ۵ گونه مخمر مولد فساد مورد بررسی قرار داد و گزارش کرد که آناتو اثر ضدمیکروبی قوی روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* دارد، اما بر روی اسیدلاکتیک باکتری‌ها تاثیر ضعیفی نشان می‌دهد. همچنین روی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس بیفیدوم* و مخمرها اثر معنی‌داری ندارد[۷].

Table 6 Effects of Bixin on the microbial properties of snack samples

	Microbial properties	Colony (cfu/g)	Limit according to National Standards of Iran
Snacks Containing Bixin	Total counts	232	1000
	Mold & yeast	0	100
	Escherichia Coli	0	0
	Enterobacteriaceae	0	100
control	Total counts	400	1000
	Mold & yeast	10	100
	Escherichia Coli	0	0
	Enterobacteriaceae	0	100

٤- نتیجه گیری کلی

نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان دادرنگدانه طبیعی بیکسین دارای اثرات ضدمیکروبی چشمگیر و قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین می‌باشد. همچنین کاربرد بیکسین در فرمولاسیون دراژه اسنک حجیم سبب بهبود ظاهر و ویژگی های رنگی اسنک شده و همزمان جمعیت میکروبی و میزان کپک و مخمر نمونه ها را در مقایسه با نمونه شاهد فاقد بیکسین کاهش می دهد. در میان غلظت های مورد آزمون، غلظت ۰/٤۲٪ بیکسین

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

از نظر ویژگی های رنگی و حسی مطلوبتر تشخیص داده شد. کاربرد بیکسین سبب بهبود رنگ و بازارپسندی این محصول گردید.

۵- منابع

[1] Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P. G., Rao, D. G., 2003, Chemistry, processing and toxicology of annatto *(Bixa orellana L.).Journal of Food Science and Technology,*40:2:131-141.

[2] Scotter, M.,2009,The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review.*Food Additives and Contaminants,* 26:8: 1123–1145.

[3] Giridhar, P., Venugopalan, A., Parimalan, R., 2014, A Review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing – A Food Technology Perspective.*Journal of Scientific Research & Reports,*3:2:327-348.

[4] Smith, J., 2006, Annatto extracts, CAT, FAO,21:1-21.

[5] Somacal, S., Figueiredo, G.C., Quatrin, A., 2015, Ruviaro, R.A.,et al., The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. *Mol Cell Biochem,*403(1-2):243-53.

[6] Ezuruike, F.U., Prieto, M.J., 2014, The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations, *Journal of Ethnopharmacology,*155(2):857-924.

[7] Galindo-Cuspinera, V. 2003. Volatile composition and antimicrobial properties of commercial Annato (Bixa Orellana L.) extracts, a natural food colorant. dissertation submittion to the faculty of the graduate school of The university of Maryland, College park in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of philosophy, 31-32.

[8] Tamil Selvi A., Dinesh M. G., Satyan R. S., Chandrasekaran B., Rose C. 2011, Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana L.* exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,*1(9):116-120.

[9] Venugopalan A., Giridhar P. 2012, Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1879-1882.

[10] Hajoori m., Naik K., Naik M., Dasgupta S. 2013. Evaluation of antimicrobial activity of seeds and leaves of *bixa orellana L. Universal journal of pharmacy,* 2(3): 112-117.

[11] Wiegand, I.I, Hilpert, K.I.& Hancock, R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methode to determine the minimal inhibitor y concentration of antimicrobial substances. *Nature protocols,* 3(2):163-175.

[12] Iranian National Standardization Organization (INSO), Numbers of 5272-1, 2461-2, 10899-2, 2946. Available atWeb site http://isiri.org.

[13] Fleischer T.C., Ameade E.P.K., Mensah M.L.K., Sawer I.K. 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of Bixa orellana. *Fitoterapia,* 74: 136–138.

[14] Bachir Raho G., Benali M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,*739-742.

[15] Siripatrawan,U., Bruce R.Harte. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with greentea extract. Food Hydrocolloids,24: 770-775.

[16] Chaudhry N.M.A., Tariq P. 2008. In vitro antibacterial activities of Kalonji, Cumin and Poppy seed. *Pakistan Journal of Botany,* 40: 461-467.

[17] Johnson M., Wesely E.G., Kavitha M.S., Uma V. 2011. Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of Mentha arvensis L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,* 4(3): 196-200.

[18] Peixoto J.R.O., Silva G.C., Costa R.A., Josei res Lira de Sousa Fontenelle, Vieira G.H., Filho A.A.F, .2011. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3): 201-204.

[19] Ravikumar S., Gokulakrishnan R., Boomi P. 2012. In vitro antibacterial activity of the metal oxide nanoparticles against urinary tract infections bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease,* 2(2): 85-89.

[20] Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews,*12: 564–582.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Invitro evaluation of antimicrobial activities of Bixin natural color and investigation its application in food model of snack

Milani, E. [1], Hosseini, F. [2*], RezaeiBoroujerdi, S. [3], Bolourian, Sh. [4],

1. Assistant Professor, Food Processing Research Department, ACECR, KhorasanRazavi, Iran
2. Assistant Professor , Food additives Research Department, ACECR, KhorasanRazavi, Iran
3. MSc Student of Food Science and Technology, Ferdowsi University Of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2017/08/30 Accepted:2018/07/23)

Nowadays, consumers' awareness about the dangers of using synthetic colors has been led to increasing demand for natural colors in various food industries. In this research, in order to study the antibacterial efficacy of bixin against *S.aureus, E.coli* and *L. Innocoa*, its inhibition zones, MIC and MBC were determined against selected bacteria. After that bixin as a natural color additives in different concentration (0.14, 0.28, 0.42%) were added in the formulation of snacks.Color properties including L*,a*,b* were determined by hunter lab andorganoleptic propertiesas aroma, color, texture, shape and overall acceptance in 5-point hedonic scale and microbial features of samples including total count, yeast and mold, Enterobacteriaceae, *Ecoli* were investigated with standard methods. According to the results,bixin showed significant inhibitory effects on all three microorganisms and its inhibitory effects up to 1.2 mg / ml on S.aureus were more pronounced than two other bacteria.Increasing the concentration of bixin caused higher value of a* (redness) and lower values of L* and b* (yellowness and brightness) in samples. The differences between samples containing various concentrations of bixin in organoleptic characteristics such as aroma, texture, appearance and overall acceptability were not significant . Overall, panelists gave more scores for all organoleptic properties to the samples containing 0.42% bixin. Also, in samples containing bixin significant decrease in total count as well as mold and yeast growth were observed.

Keywords: Antimicrobial activity, MIC, Bixin, Snack, Natural color

* Corresponding Author E-Mail Address: fereshtehosseini@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]