مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله:www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی رنگدانه نوربیکسین تجاری (*Bixa orellana* L.) بر باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی در محیط *in vitro*

احمد نصرالله زاده[۱]، محمود رضازاد باری[۲*]، هادی الماسی[۳]، مهران مرادی[٤]، سید محمد علی ابراهیم زاده موسوی[٥]

۱-دانشجوی دکترای تخصصی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ایران.

۲- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ایران.

٤- دانشیار گروه دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران.

٥- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰٤/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰٦/۱۰

کلمات کلیدی:

نوربیکسین،

تجاری،

رنگدانه،

دیسک دیفیوژن،

چاهک دیفیوژن،

ضد میکروبی.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.133

* مسئول مکاتبات:

M.rezazad@urmia.ac.ir

چکیده

نوربیکسین بخش محلول در آب رنگدانه طبیعی آناتو است که دارای خواص درمانی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی نوربیکسین تجاری ۱ درصد (که در به طور گسترده در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد) بر باکتری‌های *کلستریدیوم اسپورژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *باسیلوس لیشنی فرمیس* انجام شد. در این پژوهش برای ارزیابی اثر ضدمیکروبی و اثر بازدارندگی عصاره نوربیکسین از دو روش چاهک دیفیوژن (Well diffusion) و دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) در غلظت‌های ۲، ٤، ٦ و ۸ درصد نوربیکسین (۱ درصد) استفاده گردید. نتایج حاصل از روش چاهک نشان داد که **استافیلوکوکوس اورئوس با میزان mm ۲۲/۷٤ و باکتری کلستریدیوم اسپورژنز با میزان mm ۱٤/٤٤ بترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را از خود نشان دادند. نتایج حاصل از روش دیسک نشان داد که بیشترین میانگین قطر هاله بازدارندگی نوربیکسین در همه غلظت‌های مورد آزمون بر روی باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* با میانگین قطر mm ۱۹/۰۹ بود و بعد از آن مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ٤ درصد با قطر mm ۱۸/۲۱بود. همچنین مشاهده گردید که در روش دیسک دیفیوژن، نوربیکسین توانست در غلظت‌های ٤ و ۸ درصد از رشد باکتری *اشریشیا کلی* (mm ۹/۰۹) نیز جلوگیری نماید. بر اساس نتایج حاصله مشخص شد که نوربیکسین هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر بازدانندگی دارد و این اثر بر باکتری‌های گرم مثبت بیستر از انواع گرم منفی بود. بنابراین با توجه به مضرات نگهدارنده‌های سنتزی و با توجه به خواص منحصر بفرد رنگدانه نوربیکسین تجاری نظیر طبیعی و ایمن بودن، دارا بودن خواص ضد میکروبی و درمانی و همچنین مقاومت حرارتی خوبی که به دلیل ساختمان آپوکاروتنوئیدی طی فرآوری از خود نشان می‌دهد، می‌توان از این رنگدانه بعنوان یک نگهدارنده طبیعی ضد باکتریایی و دارای خواص سلامت بخشی در مواد غذایی مختلف استفاده نمود.**

۱- مقدمه

در طول چند دهه گذشته در صنعت غذا به منظور بهبود ویژگی‌های مختلف ظاهری و کیفی از انواع مختلف مواد افزودنی سنتزی نظیر رنگ‌ها، طعم دهنده‌ها، شیرین کننده‌ها و نگهدارنده‌ها استفاده می‌شود. نتایج تحقیقات مختلف در سال‌های اخیر نشان داده است که اکثر این مواد سنتزی مضر هستند و می‌توانند تهدیدی برای سلامت انسان باشند. رنگ‌های سنتزی و مصنوعی که به طور گسترده در انواع غلات، لبنیات، نوشابه‌های گازدار و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد جز این دسته از افزودنی‌ها می‌باشند که با هدف تشدید رنگ محصول، پوشش دادن رنگ محصول و جذب مشتری کاربرد دارند [۱]. نتایج تحقیقات صورت گرفته بر روی اثر رنگ دهنده‌های مصنوعی در انگلستان نشان داد که این رنگ‌ها باعث تشدید بی‌قراری و ناآرامی در کودکان ۳ تا ۹ ساله می‌شوند [۲]. همچنین گزارش‌های متعدد دیگری در زمینه اثرات منفی رنگ دهنده‌های سنتزی (تارترازین، زرد کوینولین، سانست یلو و کارمویسین) نظیر کاهش ضریب هوشی و کاهش تمرکز کودکان ثبت گردیده است [۲]. بر این اساس در سال‌های اخیر از طرف سازمان‌های بین‌اللملی و نهاد-های مربوطه محدودیت‌های زیادی برای مصرف این رنگ‌های سنتزی لحاظ شده است [۳]. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در سطح جهانی برای یافتن پیگمان‌های طبیعی صورت گرفته است. رنگدانه‌های طبیعی اثرات سو رنگ‌های مصنوعی را نداشته و علاوه بر آن طی تحقیقات مختلف اثرات مثبت آنها بر سلامت عمومی محرز شده است.

آناتو یک رنگ طبیعی کاروتنوئیدی است که یکی از منابع اصلی تامین کننده رنگ طبیعی در سراسر جهان به شمار می‌آید (حدود ۷۰ درصد تمام رنگ دهنده‌های طبیعی را به خود اختصاص داده است) [٤و ٥]. آناتو به دلیل قیمت ارزان و سهولت کاربرد در محصولات مختلف غذایی نظیر نوشیدنی‌ها، غلات، لبنیات و مارگارین به طور گسترده در صنعت غذا مورد استفاده قرار می-گیرد [۷-٥]. عصاره آناتو از دانه‌های درخت *بیکسا اورلانا* (*Bixa orellana* L.) که بومی جنگل‌های امریکای لاتین است و عمدتاً در آمریکای مرکزی و جنوبی و شرق آسیا کشت می شود، استخراج می‌شود. رنگ نارنجی-قرمز آناتو به دلیل وجود کاروتنوئیدهای موجود در پریکارپ دانه می‌باشد. ۹'- سیس - نوربیکسین یا نوربیکسین (محلول در آب) و ۹'- سیس – بیکسین (محلول در چربی) مهم‌ترین کاروتنوئید آناتو هستند که به ترتیب ۲۰ و ۸۰ درصد کل پیگمان‌های آن را تشکیل می‌دهند. با عصاره‌گیری دانه‌های آناتو با آب و هیدروکسید پتاسیم، بیکسین به نور بیکسین که رنگدانه محلول در آب است، تبدیل می شود.

نور بیکسین با فرمول شیمیایی $C_{24}H_{28}O_4$ فرم محلول در آب رنگدانه آناتو است که وزن مولکولی ۳۸۰/۵ گرم بر مول دارد و می‌تواند به وسیله صابونی شدن گروه استر بیکسین با یک قلیا حاصل شود (شکل۱). نور بیکسین به مقدار کمی در پریکارپ دانه یافت می‌شود (که بیشتر به فرم سیس است) اما می‌تواند چند فرم ایزومری دیگر نیز ایجاد کند. نوربیکسین جزء عمده محلول در آب عصاره آناتو است و وقتی رقیق شود مجموعه‌ای از رنگ‌های نارنجی تا زرد را ایجاد می‌کند. این رنگدانه بیشتر به دلیل اتصال آن به کازئین پنیر شناخته شده است [٦و ٨]. خواص درمانی، ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد و ضد جهش‌زایی نوربیکسین و بیکسین درطی تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است [۱۹و ۱۰]. همچنین در طب سنتی از آناتو برای درمان عفونت‌های میکروبی، اسهال‌خونی، بیماری‌های کلیوی و کبدی، مشکلات گوارشی، دیابت و یرقان استفاده می‌شود [۱۳-۱۱].

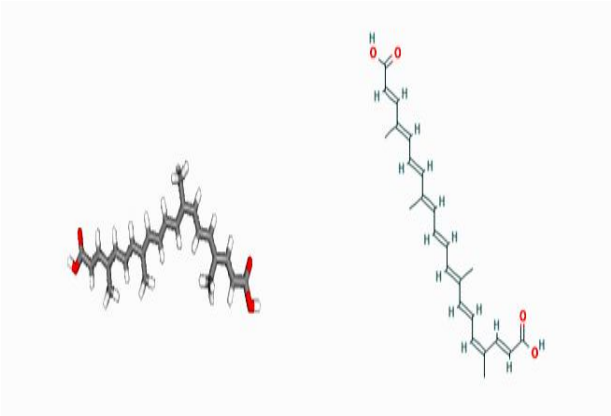

Fig 1 2D and 3D Chemical Structure of Norbixin

از نوربیکسین به عنوان یک رنگ طبیعی و سالم در پنیر، بستنی، فراورده‌های نانوایی و پخت، شیرینی‌های شکری، سوسیس‌ها، مرباها و نوشابه‌ها برای ایجاد رنگ زرد، نارنجی و قرمز استفاده

می‌شود. علاوه بر این از زمانی که به اتصال نوربیکسین به پروتئین پی برده شد از رنگ آناتو در گوشت و آرد و ماهی نیز استفاده می‌شود. نوربیکسین و بیکسین به دلیل دارا بودن ساختمان آپوکاروتنوئیدی نسبت به سایر کاروتنوئیدها مقاومت حرارتی خوبی طی فرآوری از خود نشان می‌دهند و عطر و طعم نامطلوب تولید نمی‌کنند؛ لذا امکان استفاده و کاربرد آن‌ها در فراورده‌های غذایی بسیاری وجود دارد [۱۴].

بررسی‌های گسترده سم شناسی که در زمینه ایمنی و سلامت رنگدانه آناتو صورت گرفته است، نشان می‌دهد که این رنگدانه هیچگونه اثر سوئی بر سلامت انسان نداشته و برای مصرف در صنعت غذا هیچ ممنوعیتی ندارد [۷و ۱۵]. بطوری که بر اساس مقررات ایالات متحده، آناتو به عنوان یک رنگ بدون نیاز به تاییدیه طبقه بندی می‌شود. نتایج تحقیقات مختلفی که بر روی اثر ضدمیکروبی عصاره آناتو صورت گرفته، نشان می‌دهد که این رنگدانه بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی نظیر *کلستریدیوم بوتولینوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلستریدیوم پرفریجنز* و *باسیلوس سرئوس* اثر بازدارندگی و کشندگی دارد [۱۶].

لازم به ذکر است با توجه به اینکه اکثر مطالعات صورت گرفته بر روی آناتو و قسمت‌های مختلف این گیاه نظیر ساقه، ریشه و برگ آن در مقیاس کوچک و استخراج با روش‌های آزمایشگاهی و غیر تجاری انجام گرفته است، در این مطالعه برای نزدیک شدن و استفاده نتایج تحقیق حاضر در صنعت غذا، از آناتویی که در بازار و در مقیاس تجاری تولید و مصرف می‌شود، استفاده گردیده است. لذا منظور از آناتو تجاری در این تحقیق، مقیاس تولیدی آن می‌باشد و از لحاظ منشا آناتو طبیعی می‌باشد.

بنابراین با توجه به این که تاکنون مطالعات اندکی بر روی نوربیکسین تجاری و خواص ضد میکروبی آن صورت گرفته است و همچنین نظر به استفاده گسترده از این رنگدانه در صنعت غذا، طبیعی بودن، فواید مختلف درمانی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی آن؛ هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره نوربیکسین تجاری بر باکتری‌های *کلستریدیوم اسپورژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *باسیلوس لیشنی فرمیس* (از مهم‌ترین عوامل بیماریزا و عامل فساد مواد غذایی) به‌عنوان یک کمک نگهدارنده علاوه بر کاربرد پیگمانی آن می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه‌های باکتریایی، محیط کشت و مواد مصرفی

رنگدانه تجاری نوربیکسین (۱درصد) با کد E160b از شرکت بازرگانی امید تهران تهیه شد. باکتری‌های *باسیلوس لیشنی فورمیس* (PTCC 12713)، *اشرشیا کلی* (PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 25923)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 19115)، *سالمونلا تیفی موریوم* (PTCC 14028)، *کلستریدیوم اسپورژنز* (PTCC 1651) از آزمایشگاه گروه بهداشت مواد غذایی دانشگاه ارومیه و گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان تهیه گردید. همچنین در این پژوهش برای فعال‌سازی و رشد باکتری‌های پاتوژن از محیط کشت‌های نوترینت براث، نوترینت آگار، تریپتون سوی براث، تریپتون سوی آگار و مولر هینتون آگار (محصول شرکت مرک آلمان) و برای استریل کردن رنگدانه از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون (بیوفیل، کانادا) استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتامایسین و پنی سیلین نیز از شرکت پادتن طب ایران تهیه گردید.

۲-۲-تهیه عصاره استریل نوروبیکسن تجاری

با توجه به اینکه نوربیکسین بخش محلول در آب آناتو می‌باشد؛ لذا برای تهیه عصاره آبی از غلظت‌های ۲، ٤، ٦ و ۸ درصد پودر آناتو در آب مقطر استفاده گردید. همچنین با توجه به حساسیت رنگدانه‌ها به حرارت‌های بالا محلول حاصل با عبور از فیلترهای سرنگی ۰/۴۵ میکرون استریل گردید.

۲-۳-تهیه سوسپانسیون باکتریایی

باکتری‌های پاتوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار و نوترینت آگار به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شدند تا از فعال بودن باکتری‌ها اطمینان حاصل شود. سپس سوسپانسیون باکتری‌های مختلف با کمک اسپکتوفتومتری در طول موج ٦۰۰ نانومتر تهیه شد؛ بدین ترتیب

که جذب سوسپانسیون باکتریایی در ٦٠٠ نانومتر بر روی ٠/٠٨ تا ٠/١ تنظیم گردید که این جذب معادل 10^8 باکتری در میلی لیتر می‌باشد. برای اطمینان از میزان باکتری‌های تنظیم شده، از یک رقت نیز کشت سطحی برای شمارش در پلیت صورت گرفت.

٢-٤- بررسی اثر ضد میکروبی نوربیکسین تجاری

٢-٤-١- روش Well diffusion

برای ارزیابی قدرت ضدمیکروبی عصاره نوربیکسین علیه باکتری‌های پاتوژن مورد نظر، از روش انتشار چاهک آگار که یکی از مرسوم‌ترین روش‌های سنجش اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها می‌باشد، استفاده گردید. برای این روش ابتدا از باکتری‌های فعال شده (٢٤-١٨ساعت رشد کرده)، سوسپانسیونی معادل 10^8 باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد، سپس بعد از رقت سازی میزان ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری 10^7 برداشت شده و در محیط کشت مولر هینتون آگار یا نوترینت آگار به شکل سطحی کشت داده شد. بعد از کشت سطحی باکتری‌های پاتوژن بر روی پلیت-ها، چاهک‌هایی با قطر mm ٨ در هر پلیت با استفاده از پیپت پاستور استریل در محیط‌های کشت ایجاد گردید و سپس میزان ١٠٠ ماکرو لیتر از غلظت‌های مختلف رنگدانه نوربیکسین (٢، ٤، ٦ و ٨ درصد) استریل شده با میکروفیلتر، در داخل چاهک‌ها بصورت جداگانه ریخته شد [١٩-١٧]. برای جلوگیری از انتشار عصاره در قسمت پایین پلیت، انتهای چاهک‌ها با یک قطره آگار بسته شد. در یکی از چاهک‌ها به جای عصاره از ١٠٠ میکرولیتر آب مقطر بعنوان کنترل مثبت ریخته شد و یک پلیت نیز بدون تلقیح باکتری بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها در دمای ٣٧ درجه سلسیوس به مدت ١٨ تا ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس میانگین قطر هاله بازدارندگی عصاره نوربیکسین با کولیس دیجیتال بر حسب میلی‌متر محاسبه گردید.

٢-٤-٢- روش Disk diffusion

روش انتشار دیسک آگار نیز یکی دیگر از مرسوم‌ترین روش‌ها برای اندازه گیری اثر ضد میکروبی عصاره‌ها می‌باشد. در این روش نیز از باکتری‌های فعال شده (٢٤-١٨ساعت رشد کرده)، همانند روش چاهک ابتدا سوسپانسیونی معادل 10^8 باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد و بعد از رقت سازی میزان ١٠٠ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری 10^7 در محیط کشت مولر هینتون آگار یا نوترینت آگار به شکل سطحی کشت داده شد. دیسک‌های استریل با قطر ٦ میلی‌متر در محلول رنگی نوربیکسین با غلظت-های مختلف (٢، ٤، ٦ و ٨ درصد) به مدت چند دقیقه خیسانده شدند و سپس از آن‌ها در سطح پلیت‌هایی که باکتری‌های پاتوژن تلقیح شده بود با فاصله مشخص، استفاده گردید. سپس پلیت‌هادر دمای ٣٧ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و بعد از ٢٤-١٨ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری گردید [٢٠]. جهت مقایسه قطر هاله عدم رشد آنها با قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به رنگ نوربیکسین از دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و پنی‌سیلین استفاده گردید. علاوه بر این یک پلیت با دیسک خالی و بدون رنگ آناتو به عنوان کنترل مثبت و یک پلیت فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

٢-٥- تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و روش حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال پنج درصد و به کمک نرم افزارSPSS نسخه ١٨ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل نسخه ٢٠٠٧ استفاده گردید.

٣- نتایج و بحث

٣-١-نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی نوربیکسین تجاری با روش چاهک

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره نوربیکسین تجاری با روش چاهک نشان داد که این رنگدانه بر باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی اثرگذار بوده و هاله عدم رشد در پلیت‌های مورد آزمون تشکیل گردید (شکل ٢). هرچند قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف متفاوت بود (جدول ١).

Table 1 The diameter of the bacterial growth hole in millimeters at different concentrations of commercial Norbixin by the well diffusion method (%)

Penicillin	Gentamicin	8	6	4	2	Norbixin concentration / Bacterial Strain
20.98±1.68 ^{bcA}	25.72±0 ^{Aa*}	22.74±1.32 ^{bA}	20.87±1.38 ^{bcAB}	21.20±1.03 ^{bcAB}	20.07±0.68 ^{cB}	*S.aureus*
15.64±0 ^{cB}	25.24±0.34 ^{aAB}	16.81±0.31 ^{cB}	19.05±0.72 ^{bB}	15.94±0.47 ^{cC}	14.44±1.27 ^{dD}	*C.sporogenes*
21.38±0.52 ^{bA}	25.31±0.59 ^{aAB}	21.85±0.81 ^{bA}	20.89±1.26 ^{bAB}	20.52±0.42 ^{bB}	18.1667±0.46 ^{cC}	*B. licheniformis*
19.83±0.0 ^{cA}	24.86±0 ^{aB}	21.75±1.11 ^{bA}	22.65±0.96 ^{bA}	21.83±0.11 ^{bA}	21.72±0.72 ^{bA}	*l.monocytogenes*

*Numbers with common lowercase letters in each row have a significant difference at the 5% level
*Numbers with common uppercase letters in each column have significant differences at the 5% level

بر اساس نتایج حاصله در مجموع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با میزان ۲۲/۷٤ mm بیشترین حساسیت را نسبت به نوربیکسین از خود نشان داد و باکتری *کلستریدیوم اسپورژنز* با قطر ۱٤/٤٤ کمترین حساسیت را به این رنگدانه نشان داد (جدول ۱). علاوه بر این مشخص شد که نوربیکسین در غلظت‌های ۲، ٤، ٦ درصد، بیشترین اثر بازدارندگی را بر باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* بترتیب با قطر ۲۱/۷۲، ۲۱/۸۳ و ۲۱ /۷۵ mm داشت و در غلظت ۸ درصد، بیشترین بازدارندگی نوربیکسین بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید (شکل ۲).

همچنین نتایج روش چاهک نشان داد که در پلیت‌های حاوی باکتری *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* ، بازدارندگی مشاهده نشد و یا بازدارندگی خیلی کمی مشاهده گردید. این امر بیانگر این است که رنگ نوربیکسین تجاری ۱ درصد اثر بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد. که دلیل احتمالی آن می‌تواند حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد. لیپو پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی می‌توانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی شوند [۲۱].

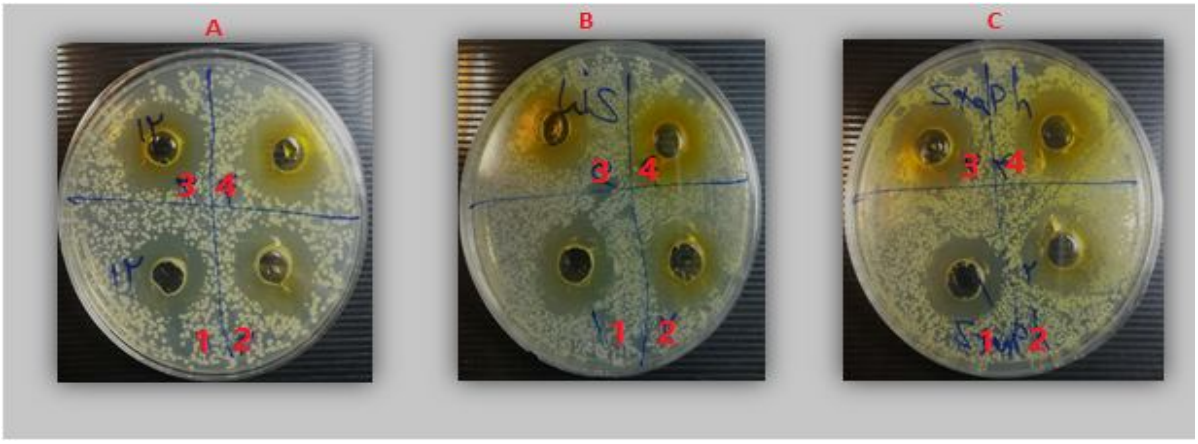

Fig 2 Antimicrobial activity of different concentrations of commercial Norbixin; A) *Bacillus licheniformis*; B) *Listeria monocytogenes* C) *Staphylococcus aureus* (numbers 1, 2, 3 and 4 are concentrations of 2, 4, 6 and 8% of Norbixin, respectively)

نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر با نتایج Galindo Cuspinera و همکاران (۲۰۰۳) که اثر ضد میکروبی نوربیکسین ۲/۸ درصد را بر گروهی از باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی قرار دادند، مطابقت دارد. Galindo Cuspinera و همکاران (۲۰۰۳) اثر بازدارندگی رنگدانه تجاری آناتو بر تعدادی از باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد را مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها نشان داد که رنگدانه تجاری آناتو بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفریجنز* دارای اثر بازدارندگی مشابهی داشت؛ اما بر روی باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی* و *سالمونلا اینتریدیس* اثر بازدارندگی نشان نداد [۱٦].

۳-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی نوربیکسین تجاری با روش دیسک دیفیوژن

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره نوربیکسین تجاری با روش دیسک دیفیوژن نیز نشان داد که این رنگدانه بر باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی موثر است و هاله عدم رشد در پلیت‌های مورد آزمون تشکیل گردید. نتایج آزمون دیسک دیفیوژن و میانگین قطر بازدارنـدگی اطراف دیسک‌ها در شکل ۳ آورده شده اسـت.

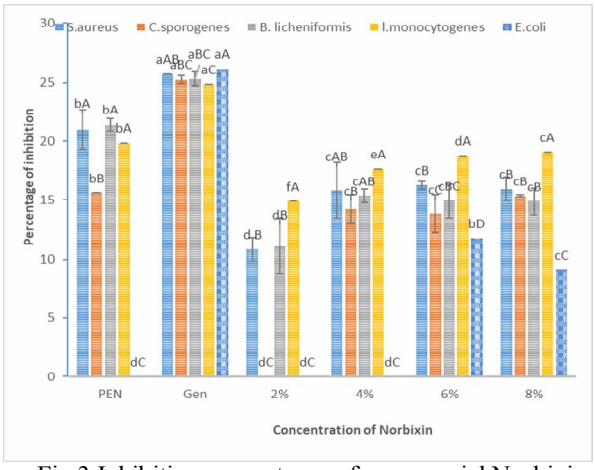

Fig 3 Inhibition percentages of commercial Norbixin against pathogen bacteria by the Disk diffusion method

طبـق نتـایج حاصـله بیشترین بازدارندگی در همه غلظت‌های مورد آزمون (۲، ٤، ٦ و ۸ درصد) بر روی باکتری *لیستریا مونو سایتوژنز* با میانگین قطر بازدارندگی ۱۹/۰۹ mm مشاهده گردید و بعد از آن بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظـت ٤ درصـد با قطر ۱۸/۲۱ mm بود. همچنین کمترین حساسیت به غلظت‌های مختلف نوربیکسین مربوط به *کلستریدیوم اسپورژنز* و *اشریشیا کلی* در غلظت ۲ درصد بود که تقریبا هیچ گونه بازدارندگی بر روی این باکتری‌ها مشاهده نشد. اما در غلظت‌های ٦ و ۸ درصد، این رنگدانه بازدارندگی متوسطی بر *روی این باکتری‌ها* از خود نشان داد (شکل ٤). علاوه بر این مشخص شد که در غلظت ٦ درصد، بیشترین بازدارندگی بـرای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس لیشنی فرمیس* و *کلستریدیوم اسپورژنز* بـه ترتیـب با میانگین قطر ۱٦/۲۸، ۱٤/۹۳ و ۱۳/۸٤ mm بود.

همچنین بر خلاف روش چاهک؛ در روش دیسک دیفیوژن مشاهده شد که نوروبیکسین در غلظت‌های ٤ و ۸ درصد توانست از رشد باکتری *اشریشیا کلی* به بترتیب با میانگین قطر ۱۱/۰٦ و ۹/۰۹ mm جلوگیری نماید. بنابراین روش دیسک برای باکتری *اشریشیا کلی* از حساسیت بهتری برخوردار می‌باشد. بطور کلی رنگدانه نوربیکسین تجاری بیشترین و کم‌ترین اثر بازدارندگی را بترتیب بر روی باکتری*لیستریا مونوسایتوژنز* (۱۹/۰۹ mm) و باکتری‌های *کلستریدیوم اسپورژنز*، *اشریشیا کلی* (بدون بازدارندگی در غلظت ۲ درصد) در روش دیسک دیفیوژن داشت.

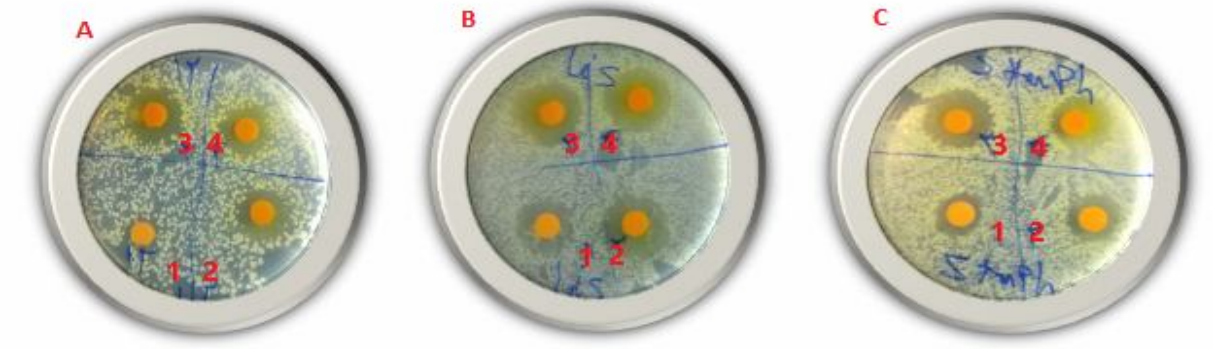

Fig 4 Antimicrobial activity of different concentrations of commercial Norbixin; A) Bacillus licheniformis; B) Listeria monocytogenes C) Staphylococcus aureus (numbers 1, 2, 3 and 4 are concentrations of 2, 4, 6 and 8% of Norbixin, respectively)

علاوه بر این در این تحقیق به منظور مقایسه قدرت ضد میکروبی رنگدانه نوربیکسین از دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتامایسین و پنی سیلین استفاده گردید و قطر هاله بازدارندگی این دیسک‌های استاندارد علیه همه باکتری‌های مورد آزمون اندازگیری شد. میانگین قطر دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین ۲۵/۷۲، ۲۵/۳۱، ۲۵/۲۴ و ۲۴/۸۶ mm به ترتیب برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس لیشنی فرمیس*، *کلستریدیوم اسپورژنز* و *لیستریا مونوسایتوژنز* به دست آمد. میانگین قطر بازدارندگی دیسک آنتی بیوتیک پنی سیلین نیز به ترتیب برای باکتری‌های *باسیلوس لیشنی فرمیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *کلستریدیوم اسپورژنز* حاصل گردید. همانطور که انتظار می‌رفت حساسیت دیسک پنی سیلین نسبت به جنتامایسین بر علیه باکتری‌های پاتوژن بیشتر بود و اثر بازدارندگی کمتری از خود نشان داد؛ به طوری که این دیسک استاندارد در برابر باکتری *اشرشیا کلای* هیچ گونه بازدارندگی از خود نشان نداد (شکل ۵).

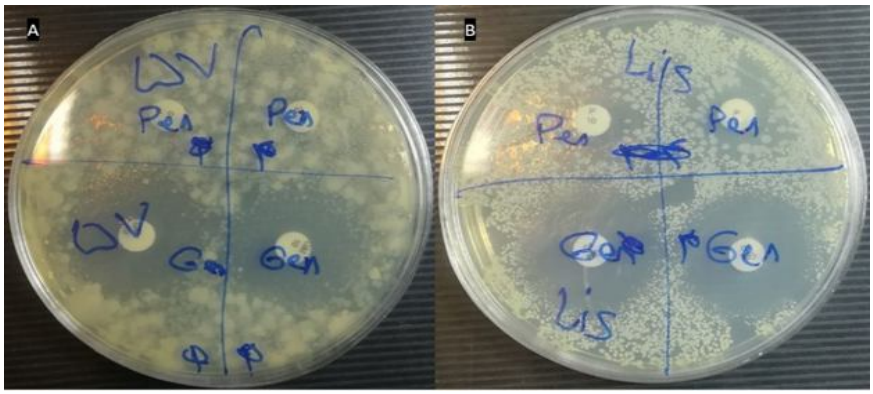

Fig 5 Inhibition measure of antibiotic discs (Penicillin and Gentamicin) against pathogenic bacteria. A: *Escherichia coli*; B: *Listeria monocytogenes*

نتایج این تحقیق نشان داد که همانند روش چاهک، نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی رنگ نوربیکسین تجاری (۱ درصد) با روش دیسک نیز نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به این رنگدانه از خود نشان می‌دهند. البته با توجه به اینکه در روش دیسک دیفیوژن، این رنگدانه در غلظت‌های ٤ و ٨ درصد توانست از رشد *اشریشیا کلی* جلوگیری نماید؛ بنابراین روش دیسک، روش مناسب‌تری برای ارزیابی میزان حساسیت این باکتری به نوربیکسین محسوب می‌شود.

با توجه به اینکه اکثر مطالعات انجام شده بر روی آناتو غیر تجاری و یا بر روی بخش‌های مختلف گیاه آناتو (ساقه، ریشه و برگ) صورت گرفته است [۲۲و ۲۳] لذا این نتایج با یافته‌های کمی که در زمینه فعالیت ضد میکروبی نوربیکسین وجود دارد، مطابقت دارد. Irobi و همکاران (۱۹۹٦) اثر غلظت ۵ mg/ml عصاره آلی برگ آناتو را بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره آناتو در این غلظت بر باکتری‌های گرم مثبت موثر ولی بر گرم منفی‌ها (هاله عدم رشد 3 mm) اثر کمی داشت [۱۱] که این نتایج با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت داشت.

نتایج تحقیقات Huhtanen و همکاران (۱۹۸۰) و Galindo-Cuspinera و همکاران (۲۰۰۳) بر روی بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آناتو (نوربیکسین) نشان داد که این رنگدانه بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت نظیر *کلستریدیوم پرفریجنز*، *کلستریدیوم بوتولینوم*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدانگی دارد ولی بر باکتری‌های گرم منفی نظیر *اشرشیا کلی* اثر بازدارندگی ندارد [۱٦و ۲٤]. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر در مورد باکتری‌های گرم مثبت همخوانی داشت اما بر خلاف نتایج این محققان، در پژوهش حاضر عصاره نوربیکسین توانست از رشد باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* جلوگیری نماید (۱۱/۰٦ mm) هرچند که بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* اثر بازدارندگی از خود نشان نداد. علاوه بر این در تحقیق حاضر مشاهده شد که میزان بازدارندگی باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون (*کلستریدیوم اسپورژنز*،

استافیلوکوکوس اورئوس، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *باسیلوس لیشنی فرمیس*) بسیار بیشتر از نتایج این پژوهشگران بود.

Sumathi و همکاران (۲۰۱۱)، Skaltsaa و همکاران (۲۰۰۳)، Lim و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقاتی جداگانه گزارش دادند که 9- ′سیس- نوربیکسین و نوربیکسین تمام ترانس عامل ایجاد خصوصیات ضدمیکروبی رنگدانه آناتو می‌باشد [٦و ٢٠و ٢٥]. بر اساس دسته‌بندی میکروارگانیسم‌ها به محدوده‌های مقاوم و حساس می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت ضد میکروبی عصاره نوربیکسین تجاری در غلظت‌های ۲ تا ۸ درصد که در پژوهش حاضر انجام شده است، بر بازدارندگی از رشد باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد کاملا موثر می‌باشد؛ لذا باکتری‌های مورد آزمون در این تحقیق نسبت به این رنگدانه حساس ارزیابی می‌شوند [۱۱]. بطور کلی و بر اساس نتایج حاصله، اثر بازدارندگی رنگدانه نوربیکسین تجاری بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از انواع گرم منفی بود و بیشترین اثر بازدارندگی در بین باکتری‌های گرم مثبت نیز بر *لیستریا مونو سایتوژنز* مشاهده شد. علاوه بر این مشخص گردید که بین نتایج میانگین قطر هاله‌های بازدارندگی در روش چاهک و دیسک‌های آنتی بیوتیک (پنی سیلین و جنتامایسین) اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P\leq0/05$) و همچنین بین روش چاهک و دیسک نیز اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P\leq0/05$).

٤- نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از روش چاهک، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری *کلستریدیوم اسپورژنز* بترتیب با میزان قطر ۲۲/۷٤mm و ١٤/٤٤ mm بیشترین و کمترین حساسیت را نسبت به نوربیکسین تجاری از خود نشان دادند. اما در روش دیسک دیفیوژن، بیشترین بازدارندگی بر باکتری *لیستریا مونو سایتوژنز* با میانگین قطر بازدارندگی ۱۹/۰۹ mm مشاهده گردید. همچنین در روش دیسک دیفیوژن، بر خلاف روش چاهک مشاهده شد که نوروبیکسین در غلظت‌های ٤ و ۸ درصد می‌تواند از رشد باکتری *اشریشیا کلی* جلوگیری نماید و لذا روش دیسک روش مناسب‌تری برای ارزیابی میزان حساسیت این باکتری به نوربیکسین محسوب می‌شود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که رنگدانه تجاری نوربیکسین ۱ درصد اثر بازدارندگی خوبی بر باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی دارد و این اثر بازدارندگی بر باکترهای گرم مثبت بیشتر از انواع گرم منفی بود. بنابراین با توجه به این که این رنگدانه یک رنگ طبیعی و ایمن بوده و به عنوان یک رنگ بدون نیاز به تاییدیه طبقه بندی می‌شود و با توجه به اینکه خواص ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و درمانی آن به اثبات رسیده است؛ لذا می‌توان از این رنگدانه علاوه بر استفاده به عنوان پیگمنت در مواد غذایی، به عنوان یک نگهدارنده طبیعی و یا کمک نگهدارنده در مواد غذایی نیز استفاده نمود.

٥- منابع

[1] Henry BS. Natural food colors, in Natural Food Colorants.G.A.F. Hendry and J.D. Houghton, Eds. Chapman & Hall, New York.1996. 40-79.

[2] McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. The lancet. 2007 Nov 3; 370(9598):1560-7.

[3] Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2006 Mar 1; 46 (2):161-83.

[4] De Marco R, Vieira AM, Monteiro A, Bergamasco R. Microencapsulation of annatto seed extract: stability and application. Chemical Engineering Transactions. 2013 Jun 20; 32: 1777-82.

[5] Boschetto DL, Aranha EM, de Souza AA, Souza SM, Ferreira SR, Priamo WL, Oliveira JV. Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. Industrial Crops and Products. 2014 Sep 1; 60: 22-9.

[6] Lim TK. Edible medicinal and non-medicinal plants. Dordrecht, the Netherlands: Springer; 2012.

[7] Satyanarayana A, Prabhakara Rao PG, Rao DG. Chemistry, processing and toxicology of annatto (Bixa orellana L.). Journal of Food Science and Technology. 2003 Mar 1; 40 (2):131-41.

[8] Barnicoat CR. 151. The reactions and properties of annatto as a cheese colour, with particular reference to the chemistry of cheese discoloration. Journal of Dairy Research. 1937 Jan; 8(1):61-73.

[9] Tibodeau JD, Isham CR, Bible KC. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. Antioxidants & Redox Signaling. 2010 Oct 1; 13(7):987-97.

[10] Kurniawati PT, Soetjipto H, Limantara L. Antioxidant and antibacterial activities of Bixin pigment from Annatto (Bixa orellana L.) seeds. Indonesian Journal of Chemistry. 2007; 7 (1):88-92.

[11] Irobi ON, Moo-Young M, Anderson WA. Antimicrobial activity of Annatto (Bixa orellana) extract. International Journal of Pharmacognosy. 1996 Jan 1; 34 (2):87-90.

[12] Rao PP, Satyanarayana A, Rao DG. Effect of storage on the stability of water soluble annatto dye formulation in a simulated orange-RTS beverage model system. LWT-Food Science and Technology. 2002 Nov 1; 35 (7):617-21.

[13] Duke JA, editor. CRC handbook of medicinal spices. CRC press; 2002 Sep 27.

[14] Giridhar P, Venugopalan A, Parimalan R. A review on annatto dye extraction, analysis and processing–A Food Technology Perspective. Journal of Scientific Research and Reports. 2014:327-48.

[15] de Lima RA, Azevedo L, Ribeiro LR, Salvadori DM. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. Food and Chemical Toxicology. 2003 Feb 1; 41(2):189-92.

[16] Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. Journal of Food Protection. 2003 Jun; 66 (6):1074-8.

[17] Abere TA, Onyekweli AO, Ukoh GC. In vitro antimicrobial activity of the extract of Mitracarpus scaber leaves formulated as syrup. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2007 Jul 31; 6 (1):679-82.

[18] Igbinosa OO, Igbinosa EO, Aiyegoro OA. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from Jatropha curcas (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2009 Feb 28; 3 (2):058-62.

[19] Sethubathi GV, Prabu VA. Antibacterial activity of cyanobacterial species from adirampattinam coast, southeast coast of palk bay. Current Research Journal of Biological Sciences. 2010 Jan 5; 2 (1):24-6.

[20] Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. Phytochemistry. 2003 Oct 1; 64(3):743-52.

[21] McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. Trends in Microbiology. 2002 Oct 1; 10(10):s8-14.

[22] Silva RB, Almeida CR, Chavasco JM, Chavasco JK. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilizated hydroalcoholic extracts of Bixa orellana L., Bixaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2010; 20:171-4.

[23] Garcıa VN, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, Rojas MG. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. Journal of ethnopharmacology. 2003 Jul 1; 87 (1):85-8.

[24] Huhtanen CN. Inhibition of Clostridium botulinum by spice extracts and aliphatic alcohols. Journal of Food Protection. 1980 Mar; 43 (3):195-6.

[25] Sumathi P, Parvathi A. Antibacterial potential of the aqueous and organic extracts of Bixa orellana L. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011; 2 (2).

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of antimicrobial effect of Commercial Norbixin pigment (*Bixa orellana L.*) against pathogenic bacteria and food spoilage *in vitro*

Nasrollahzadeh, A.[1], Rezazad Bari, M*.[2], Almasi, H[3], Moradi, M[4], Ebrahimzadeh Mousavi, M[5]

1. PhD student, Department of Food Industry Science and Engineering, Urmia University, Iran.
2. Professor, Department of Food Industry Science and Engineering, Urmia University, Iran.
3. Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, Urmia University, Iran.
4. Associate Professor, Department of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran.
5. Professor, University of Tehran, Department of Food Industry Science and Engineering, University of Tehran, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 06/ 26
Accepted 2021/ 09/ 01

Keywords:

Norbixin,
Commercial,
Disc Diffusion,
Well Diffusion,
Antimicrobial.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.133

*Corresponding Author E-Mail:
M.rezazad@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Norbixin is the water-soluble part of anatto natural pigment which has healing, anti-cancer and antioxidant properties. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of commercial Norbixin 1% (widely used in the food industry) on Clostridium sporogenes, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella typhimurium and Bacillus licheniformis. In this study, two methods of Well diffusion and Disk diffusion were used to evaluate the antimicrobial effect of Norbixin (1%) at concentrations of 2, 4, 6 and 8%. The results of the Well method showed that Staphylococcus aureus with 22.74 mm and Clostridium sporogenes with 14.44 mm have revealed the highest and lowest sensitivity, respectively. The results of Disk method showed that the highest mean diameter of Norbixin inhibitory in all tested concentrations is attributed to Listeria monocytogenes with mean diameter of 19.09 mm and then is related Staphylococcus aureus at a concentration of 4% with a diameter of 18.21 mm. It was also observed that in the Disk diffusion method, Norbixin was able to prevent the growth of Escherichia coli (9.09 mm) at concentrations of 4 and 8%. Accordingly, it was found that Norbixin has an inhibitory effect on both gram-positive and gram-negative bacteria, and this effect on gram-positive bacteria was more than gram-negative. Therefore, due to the disadvantages of synthetic preservatives and the unique properties of commercial Norbixin pigments such as natural and safe, having antimicrobial and therapeutic properties as well as good thermal resistance (because of apocarotenoid structure during processing), this pigment can be used as a natural antibacterial preservative and health-giving properties in various foods.