مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*)، ریحان (*Ocimum basilicum*) و دارچین بر *ساکارومایسس سرویزیه* در دوغ

هاجر شهسوار[۱]، مرضیه بلندی[۲*]، هما بقایی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
۲- دانشیار گروه صنایع غذایی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
۳- استادیار گروه صنایع غذایی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۲۸)

چکیده

دوغ، یکی از پرمصرف‌ترین نوشیدنی‌های لبنی تخمیری ایران است که ماندگاری و طعم آن در صنعت غذا اهمیت ویژه‌ای دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی، دارچین و ریحان در ماندگاری دوغ در دمای محیط صورت گرفت. عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی، ریحان و دارچین با روش خیساندن استخراج شد. اثرات ضدمیکروبی عصاره این سه گیاه با روش میکرودایلوشن بر روی مخمر ساکارومایسس سرویزیه با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی میکروبی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) میکروبی تعیین شد و سپس pH، اسیدیته و اثرات ضدمیکروبی آنها در دوغ، طی چهار هفته نگه‌داری در دمای محیط بررسی شد. براساس نتایج حاصل از این پژوهش، حداقل غلظت بازدارندگی این عصاره‌ها بین ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. از بین عصاره‌های مورد بررسی، مریم‌گلی با غلظت ۰/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش جمعیت مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دوغ، طی چهار هفته نگه‌داری در دمای محیط شد ($p<0/05$). اما عصاره ریحان فقط اثر کنترلی داشته و عصاره دارچین فاقد اثر ضدمیکروبی در سطح مورد آزمون بود. بنابراین عصاره هیدروالکلی مریم‌گلی، ریحان و دارچین می‌توانند به دلیل خاصیت ضدقارچی و ضدمیکروبی به عنوان یک ماده نگه‌دارنده طبیعی در دوغ استفاده شده و نقش مهمی در سلامت مصرف‌کننده داشته باشند.

کلید واژگان: دوغ، عصاره مریم‌گلی، عصاره دارچین، عصاره ریحان، ساکارومایسس سرویزیه

* مسئول مکاتبات: M.Bolandi@Damghaniau.ac.ir

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

۱- مقدمه

دوغ، یکی از محبوب‌ترین نوشیدنی‌های لبنی تخمیری است که در ایران و برخی از کشورهای اروپای شرقی و خاورمیانه، مصرف فراوانی دارد [۱]. این فرآورده به روش سنتی و صنعتی از اختلاط ماست، آب، نمک و برخی گیاهان معطر نظیر نعناع و پونه یا اسانس های طبیعی حاصل می‌شود[۲]. امروزه با افزایش سطح آگاهی مردم و اهمیت نقش تغذیه و رژیم غذایی و به دنبال آن مشخص شدن اثرات زیان‌آور نوشابه‌های گازدار و پرکالری و تأثیر مستقیم آن بر شیوع بیماری‌های مزمن مانند چاقی و دیابت، گرایش مردم به مصرف نوشیدنی‌های لبنی از جمله دوغ افزایش یافته است[۳]. طبق دستورالعمل سازمان غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان، نگه‌داری این محصول داخل یخچال، بسته به کارخانه تولید کننده حداقل ۱۵ روز و حداکثر ۹۰ روز می‌باشد و در خارج یخچال ممنوع است[٤]. از مهم‌ترین عوامل آلوده کننده دوغ می توان از قارچ‌ها و مخمرها نام برد. تحقیقات نشان داده است رشد مخمرها در دوغ باعث ترش شدن، بد طعمی و گازدار شدن و در نتیجه فساد و کوتاه شدن زمان ماندگاری این محصول را بدنبال دارد[۵]. کوتاه بودن زمان ماندگاری در دوغ و امکان آلودگی‌های مختلف باعث استفاده از افزودنی‌هایی مانند بنزوات سدیم، سوربات پتاسیم، ناتامایسین و ... شده است[٦]. براساس قوانین سازمان غذا و دارو ایران استفاده از هرگونه نگه‌دارنده در دوغ ممنوع است [۷]. تحقیقات صورت گرفته در ایران بر روی مواد غذایی از جمله دوغ وجود این نگه‌دارنده‌ها را تأیید می‌نماید[۵]. متاسفانه مطالعات صورت گرفته در دنیا روی دوغ به دلیل فقدان این نوشیدنی در بین نوشیدنی‌های رایج، بسیار اندک است و در ایران نیز قابل توجه نمی باشد. تحقیقات بسیاری نشان داده است که افزودن ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی در افزایش زمان ماندگاری موادغذایی تأثیرگذار می‌باشد[۸]. از آنجا که تمایل به استفاده از مواد شیمیایی در صنایع غذایی به عنوان مواد نگه‌دارنده کاهش یافته است، کاربرد عصاره‌های گیاهی به دلیل خواص دارویی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آنها در مواد غذایی رو به افزایش است[۹]. بنابراین می‌توان با استفاده از ترکیبات طبیعی حاصل از این گیاهان سودمند، سلامت مصرف‌کننده و بازار پسندی محصولات را افزایش داد. مریم‌گلی[1] (*Salvia officinalis*) گیاهی چندساله و علفی، از تیرهٔ نعناعیان[2] است. گیاه مریم‌گلی با ارزش‌ترین نوع دارویی تیره نعناعیان است. این گیاه دارای بیش از ۹۰۰ گونه می‌باشد که در نقاط مختلف دنیا، پراکنده است. منشأ مریم‌گلی نواحی آسیا، شمال‌آفریقا، حوزه اروپایی دریای مدیترانه گزارش‌شده‌است. رویش‌گاه اصلی این گیاه ایران می‌باشد. از میان ۵۸ گونه گیاهی موجود در ایران، هفده گونه آن مختص ایران است[۱۰]. گونه‌های مختلف جنس‌سالویا دارای خواص ضد قارچی، ضدباکتری، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانتی و ضدتوموری می‌باشند[۱۱]. ترکیبات این گیاه شامل تانن‌های گروه کاتشین[3] (سالویا[4] تانن)، فلاونوئیدها[5] (اپی‌ژنین[6]، لوتئولین[7])، اسانس‌های فرار (سینئول[8]، کامفور[9]، آلفا و بتا توجون[10])، مواد گلیکوزیدی[11]، توکوفرول، اسید رزمارینیک[12] و اسیدآسکوربیک می‌باشند[۱۲]. ریحان[13] (*Ocimum basilicum*) گیاهی یک‌ساله از تیره نعناعیان است. ریحان سرشار از منیزیم، آهن و کاروتنوئید بوده و از جمله ترکیبات طبیعی آن پلی‌فنل‌هایی چون فلاونوئیدها و آنتوسیانین[14] هستند[۱۳]. ریحان دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی و ضد ویروس است[۱٤]. دارچین[15] نیز نوعی ادویه خوشبو است که بومی سری‌لانکا و جنوب هند است و پوست درختچه آن به عنوان ادویه بکار می‌رود[۱۵]. تانن‌ها، فنل‌ها، دیترپن‌ها[16]، سافرول[17]، سینامیک اسید[18]، کادینن[19] برخی ترکیبات شیمیایی دارچین هستند که از مهم‌ترین آنها سینامیک آلدهید است که دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی می‌باشد. از دیگر خواص دارچین می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی آن اشاره کرد [۱٦]. با توجه به اثرات ضدمیکروبی گیاهان مذکور و همچنین فساد مخمری دوغ در سطح گسترده بویژه در فصل تابستان، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی،

1. Salvia

2. *Lamiaceae*
3. Catechin
4. Salvia
5. Flavonoid
6. Apigenin
7. Luteolin
8. Cineol
9. Camphor
10. Thujone
11. Glycoside
12 . Rosmarinic acid
13. Basil
14. Anthocyanin
15. Cinnamon
16. Di-Terpene
17. Safrole
18. Cinnamic acid
19 . Cadinene

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

دارچین و ریحان بر مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دوغ، طی دوره نگه‌داری در دمای محیط صورت گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه دوغ

شیر خریداری شده از بازار مصرف، در آزمایشگاه جامع دانشگاه علوم پزشکی شاهرود در شرایط آسپتیک[1] تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جوشانیده شد. پس از سرد شدن و رسیدن به دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۱۵ گرم ماست مایه زنی به یک لیتر شیر اضافه شد. سپس برای مرحله تخمیر در انکوباتور به مدت سه ساعت در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد، قرار گرفت. به منظور تهیه نمونه‌های دوغ از ۵۰ درصد ماست به همراه ۵۰ درصد آب استریل شده و ۰/۸۵ درصد نمک، استفاده شد[۱۷].

۲-۲- آماده سازی گیاهان

اندام هوایی مریم‌گلی از عطاری معتبر در شاهرود خریداری شد و توسط مرکز رشد فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شاهرود مورد تأیید قرارگرفت. ریحان به‌صورت تازه پاک و شستشو شده و در شرایط استاندارد و در سایه خشک شد. دارچین نیز بصورت ناکوب خریداری شد. سپس هر سه با آسیاب (مدل feller، ساخت چین) پودر شدند[۱۸].

۲-۳- عصاره‌گیری

عصاره‌های مریم‌گلی، ریحان و دارچین به روش خیساندن[2] در مرکز رشد فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تهیه شدند. ۵۰ گرم پودر هر کدام از سه گیاه را در اتانول ۹۵ درصد به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر و به مدت ٤٨ ساعت در شرایط آزمایشگاه خیسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر الکل، دهانه ارلن با پارافیلم[3] آزمایشگاهی بسته شد. بعد از زمان ذکر شده بخش مایع عصاره با عبور از تنظیف دو لایه از بخش جامد، جدا شده و برای خالص‌سازی نهایی و حذف حلال‌های موجود توسط دستگاه تبخیرکننده دوار[4] (IKA-Rotary، ساخت آلمان) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در خلاء آبگیری شد. در ادامه عصاره تهیه شده به مدت ٢٤ ساعت، در ظروف تیره در یخچال نگه‌داری شدند تا به صورت قیرمانند درآید. با کم کردن وزن ظرف از وزن ظرف و عصاره، راندمان عصاره گیری به نسبت وزن اولیه گیاه به دست آمد [۱۹].

۲-٤- تهیه سوسپانسیون باکتریایی

سویه غذایی مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5193) به صورت آمپول لیوفیلیزه[5] از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش بیوتکنولوژی تهیه شد. جهت تعیین خاصیت ضدمیکروبی، ابتدا سوش مخمر به محیط کشت سابرو دکستروز براث (SDB)[6] انتقال داده و سپس برای خلوص کلونی، از محیط کشت سابرو دکستروز آگار(SDA)[7] استفاده شد [۲۰].

مخمر ساکارومایسس سرویزیه در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث[8] (TSB) کشت داده شد و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شد. در مرحله بعد در شرایط استریل به محیط مولر هینتون براث[9] (MHB) انتقال داده شد و مجدد در انکوباتور به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان کدورت ناشی از رشد مخمر از طریق جذب نوری با طول موج ٦٢٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Nova Biotech, England) و با استفاده از لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند[10] ($1/5\times10^8$) قرائت شد. در مرحله بعد رقیق سازی میکروب‌ها ۱ به ۱۰۰ انجام شد ($1/5\times10^6$) (CFU/ml) [۲۱].

۲-۵- تعیین MIC[11] به روش میکرودایلوشن[12]

در این مرحله عصاره مریم‌گلی، دارچین و ریحان در غلظت های ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲، ۱/٦۰، ۰/۸، ۰/٤، ۰/۲، ۰/۱، و ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی لیتر از غلظت عصاره‌ها تهیه شد. برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از روش براث میکرودایلوشن در پلیت‌های میکروتیتر ۹٦ چاهکی استریل (اکستراژن، آمریکا) استفاده شد. ابتدا در هر چاهک ۵۰

1. Aseptic
2. Maceration
3. Parafilm
4. Rotary evaporator

5. Lyophilized ampoules
6. Sabouraud Dextrose Broth
7. Sabrouraud Dextrose Agar
8. Tryptic Soy Broth
9. Mueller Hinton Broth
10.3 McFarland
11. Minimum Inhibitory Concentration
12. Microdilution
13. Brain Heart Infusion

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

میکرولیتر از محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار (BHI)[1] و ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده و در انتها ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ (cfu/ml) ریخته شد (در مجموع ۱۵۰ میکرولیتر در هر چاهک). نمونه کنترل مثبت چاهک شامل محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی و نمونه کنترل منفی محیط کشت و عصاره در نظر گرفته شد. پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰ rpm برای مخلوط شدن در شیکر قرار داده شدند. سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی زمان ذکر شده به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) ، چاهک‌ها از نظر وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که مانع رشد باکتری یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل بود، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی به‌صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید[۲۲و۲۳].

۲-٦ تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)[2]

حداقل غلظت کشندگی براساس نتایج MIC تعیین شد. مقدار۵۰ میکرولیتراز چاهک‌هایی که رشد باکتری‌ها در آن متوقف شده بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA)[3] استریل شده، کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آخرین رقتی از عصاره که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بودند به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره در نظر گرفته شد[۲۳و۲۲].

۲-۷ تعیین اثرات ضدمیکروبی

۸ سی‌سی از دوغ استریل شده داخل هر لوله آزمایش ریخته شد. سپس مقدار ۰/٦۲ میلی گرم از هر عصاره را در ۱ سی‌سی از دوغ استریل شده حل کرده و نیز ۱ سی‌سی از سوسپانسیون $۱/۵\times ۱۰^{۶}$ میکروب به لوله های دوغ مورد آزمایش اضافه شد. لوله‌های کنترل مثبت (محیط کشت حاوی مخمر بدون عصاره + دوغ) و لوله‌های کنترل منفی (عصاره + دوغ) برای سه عصاره مریم گلی، ریحان و دارچین و یک لوله هم به عنوان شاهد (دوغ تنها) در نظر گرفته شد. سپس لوله‌ها در دمای محیط قرار داده شد و در روزهای ۷، ۱٤، ۲۱ و ۳۰ از هر لوله به میزان ۲۰ میکرولیتر از مخمر بر روی محیط کشت آگار خون‌دار[4] کشت داده شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گذاشته شد و در آخر تعداد کلونی‌ها شمارش شد[۲۲و۲۳].

۲-۸- pH و اسیدیته

pH نمونه‌های دوغ مورد آزمایش، توسط دستگاه pH متر (شرکت HANNA ، مدل۲۱۱ ، ساخت ایتالیا) و اسیدیته به روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در مجاورت معرف فنل‌فتالئین تا حصول رنگ ارغوانی کم‌رنگ اندازه‌گیری شد و درصد اسیدیته برحسب اسیدلاکتیک طبق فرمول ذیل محاسبه گردید[۲٤]:

N: مقدار میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال مصرف شده; V : حجم نمونه مصرفی

$$\text{درصد اسیدیته} = N \times ۰/۰۰۹ \times ۱۰۰/V$$

۲-۹ روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

نتایج حاصل از این پژوهش، به روش اندازه‌گیری مکرر[5] با استفاده از نرم افزار SPSS Ver18 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه روند تغییرات بین تیمارها در طول زمان در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم افزار اکسل انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ نتایج حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مریم‌گلی، دارچین و ریحان بر علیه مخمر ساکارومایسس سرویزیه

نتایج میزان حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی (MIC وMBC) عصاره‌های مریم‌گلی، دارچین و ریحان در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره مریم‌گلی و ریحان بر علیه مخمر ساکارومایسس سرویزیه ٦/۲۵ و حداقل غلظت کشندگی آن ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در حالی که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره دارچین بر علیه مخمر ساکارومایسس

2 . Minimum Bactericidal Concentration
3. Mueller Hinton Agar
4. Blood agar
5. Repeated Measures

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

سرویزیه ۱۲/۵ و حداقل غلظت کشندگی آن ۲۵/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. عیسی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند عصاره پونه کمترین اثر مهارکنندگی را با حداقل غلظت مهاری ۱۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر ساکارومایسس سرویزیه از خود نشان داد. در همین پژوهش حداقل غلظت بازدارندگی اسانس بادرنجبویه در برابر ساکارومایسس سرویزیه ۱/۵۶۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر گزارش شد[۲۵]. طبق گزارشات منتشر شده گروهی از گیاهان، دارای قدرت سنتز ترکیبات آروماتیک می‌باشند و برخی از این ترکیبات مشتقات فنلی می‌باشند. فلاوونوئیدها از مهم‌ترین زیرشاخه‌های ترکیبات فنلی به شمار می‌آیند که در گیاهان به منظور مقابله با عفونت‌های میکروبی ساخته می‌شوند. تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر، مبین خاصیت مهارکنندگی فلاوونوئیدها بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. این خاصیت می‌تواند به علت اتصال به پروتئین‌های خارج سلولی، اتصال به دیواره سلولی باکتری‌ها یا به علت متلاشی کردن غشای باکتری‌ها باشد[۲۶]. لو و فو (۲۰۰۲) بیان کردند تاثیرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی، به علت وجود ترکیبات شیمیایی دی‌ترپنی در مریم‌گلی است [۲۷]. دو و ژانگ (۲۰۰٤) گزارش کردند که از عصاره ریشه مریم‌گلی اسیدهای فنولیک جدا شده است و بسیاری از فعالیت‌های زیستی مانند؛ آنتی‌اکسیدانی، ضدپلاکتی، ضدتومور و فعالیت ضدویروسی این گیاه مربوط به آنها هستند [۲۸].

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal concentrations (MBC) of salvia, cinnamon and basil extracts on *Saccharomyces cerevisiae* (mg/ml)

Hydroalcoholic extract	MBC	MIC
Salvia	12.5	6.25
Cinnamon	25.1	12.5
Basil	12.5	6.25

در مطالعه‌ای کاکماک و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضدقارچی اسانس بادرنجبویه و مریم‌گلی را در برابر پنیسیلیوم ورکوزومی[1] مولد سم اکراتوکسین جداشده از پنیر بررسی نمودند و میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس بادرنجبویه و مریم گلی را به ترتیب حدود ۱۲۵ و ٦۲ میکرولیتر بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آنها به ترتیب حدود ۲۵۰ و ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی لیتر نشان دادند[۲۹]. تفاوت در حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی گزارش شده در پژوهش‌های مختلف ممکن است ناشی از تفاوت آب و هوای کشت گیاه در مناطق مختلف، تفاوت در سوش‌های میکروبی مورد آزمون یا شرایط آزمون باشد.

۳-۲ ارزیابی جمعیت میکروبی در طول دوره نگه‌داری

روند تغییرات جمعیت میکروبی مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دوغ حاوی عصاره‌های مریم‌گلی، ریحان و دارچین در طول دوره نگه‌داری در شکل ۱ آمده است. مطابق با شکل ۱، شمارش تعداد کلونی مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دوغ، طی ٤ هفته دوره نگه‌داری، حاکی از اثر ضدمیکروبی شدید عصاره‌های مریم‌گلی، دارچین و ریحان بر علیه مخمر ساکارومایسس سرویزیه در مقایسه با شاهد بود ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که با افزایش طول دوره نگه‌داری نمونه‌ها در دمای محیط جمعیت میکروبی در نمونه شاهد افزایش یافت در حالی که در نمونه‌های حاوی عصاره‌های مورد بررسی جمعیت میکروبی به‌طور ثابت ارزیابی شد. هرچند که در بین عصاره‌های مورد بررسی، عصاره دارچین اثر ضدمیکروبی کمتری نسبت به عصاره‌های مریم‌گلی و ریحان از خود نشان داد. نتایج شمارش میکروبی مخمر در این پژوهش در محدوده مجاز تعیین شده توسط موسسه استاندارد است. بر اساس استاندارد دوغ، حد مجاز شمارش مخمر در دوغ ۱×۱۰^{۲} (cfu/ml) است [٤]. عوامل متعدی در بروز اثرات ضدمیکروبی یک گیاه موثر هستند. از جمله این عوامل می‌توان به میزان اسانس گیاه، روش عصاره‌گیری، نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت مصرفی و مواد موجود در آن، غلظت عصاره بکار برده شده و اندام‌های مختلف گیاه اشاره کرد [۳۰]. عیسی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند اسانس بادرنجبویه و عصاره پونه دارای فعالیت ضد مخمری مناسبی می‌باشند. بنابراین می‌توان از اسانس بادرنجبویه وعصاره پونه به

1 . *Penicillium verrucosum*

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

عنوان یک ترکیب نگه‌دارنده طبیعی در صنعت غذا استفاده نمود[۲۵].

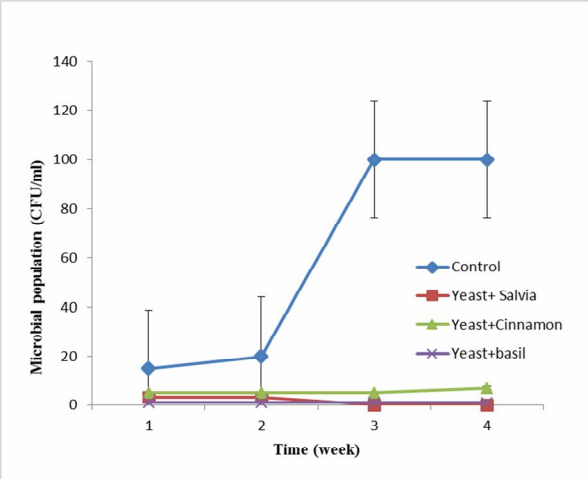

Fig 1 Changes in yeast microbial population in dough containing salvia, basil and cinnamon extract during storage

ارزش دارویی و نگه‌دارندگی گیاهان دارویی و چاشنی‌ها بستگی به ترکیبات فیتوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. بخشی از ترکیبات موثره در عصاره‌ها و اسانس‌ها از متابولیت ثانویه گیاهان دارویی هستند که فعالیت ضدمیکروبی، ضد قارچی آنها شناخته شده است. فعالیت ضدمیکروبی اسانس های گیاهی به ترکیب شیمیایی آنها بستگی دارد علاوه بر این به دلیل دارا بودن خاصیت آب‌گریزی به غشاء سلولی نفوذ نموده و سبب صدمه به نفوذپذیری و عملکرد غشای سلول و در نهایت تخریب سلول می‌شوند[۸].

در مطالعه‌ای نوری‌زاده و همکاران(۱۳۸۳) اثر ضدباکتریایی عصاره آبی و هیدروالکلی شیرین بیان، پونه، نعناع وآویشن را بر روی هلیکوباکتر بررسی کردند نعناع بیشترین اثر ضدباکتریایی را دارا بوده و بعد از آن به ترتیب شیرین بیان، پونه و آویشن دارای فعالیت ضدباکتریایی بودند[۳۱]. حساسیت میکروارگانیسم‌ها علاوه بر فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌ها با توانایی سرعت رشد آنها نیز ارتباط مستقیم دارد. علاوه بر این، تفاوت در حساسیت جنس‌های مختلف مخمر به اسانس‌ها و عصاره‌ها به ترکیب شیمیایی فرآورده گیاهی، مرحله رشد سلول و نوع مخمر وابسته است. سلول‌ها در مرحله تقسیم سلولی نسبت به اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره بسیار حساس‌تر هستند به دلیل این‌که در هنگام تقسیم سلولی نفوذ متابولیت‌های گیاهی شامل اسانس‌های روغنی و عصاره‌ها موثرتر صورت می‌گیرد [۳۲]. مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌ها[1] به عنوان ترکیبات اصلی عصاره‌ها می‌باشند که در طبیعت به صورت ترکیبات فنولیک هستند. ترکیبات مونوترپن‌های حلقوی و α-ترپنین بر روی ژن‌های بیوسنتزکننده ارگوسترول و جذب استرول در ساکارومایسس سرویزیه تاثیر می‌گذارند [۳۳]. همچنین مونوترپن‌ها، α-ترپنین و لیمونین علاوه بر این که باعث تخریب سلول از طریق صدمه به غشای سلول، اختلال در انتقال الکترون، سنتز پروتئین و در نهایت نشت مواد داخل سلولی می‌شوند دارای اثر مهارکنندگی بر روی سیستم تنفسی در میتوکندری سلول‌های مخمر نیز می‌باشند[۳٤]. طباطبائی یزدی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی و مقایسه اثرات ضدمیکروبی ترکیبات بازدارنده طبیعی گیاهان تیره نعناع در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های دوغ صنعتی پرداختند. نتایج حاصل از پژوهش فوق نشان داد که پودر آویشن، نعناع وکاکوتی به میزان بیشتری از عصاره آنها بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس دوغ تاثیر دارد [۲۱]. به دلیل خاصیت ضدمیکروبی گیاهان معطر و وجود ترکیبات فنلی در آنها سنتز اسید نوکلئیک و ATPas و انتقال الکترونی غشاء سلولی، دچار اختلال می‌شود. بنابراین می‌توان گفت کاهش جمعیت میکروبی نسبت به نمونه شاهد به دلیل ترکیبات اتانولی و متانولی موجود در گیاهان معطر است [۲۱].

۳-۳ روند تغییرات pH

روند تغییرات pH دوغ در طول دوره نگه‌داری، در شکل ۲ آمده است. مطابق با شکل ۲، روند تغییرات pH در طول زمان نشان داد که افزودن عصاره مریم‌گلی و دارچین، منجر به کاهش معنی دار pH دوغ تا هفته سوم نگه‌داری شد ($p<۰/۰۵$) اما با افزایش طول دوره نگه‌داری تا هفته چهارم، تغییرات pH دوغ در نمونه حاوی عصاره مریم‌گلی از روند ثابتی پیروی کرد در حالی که در نمونه‌های حاوی عصاره دارچین و ریحان روند نزولی با شیب ملایم تا انتهای دوره نگه‌داری ادامه یافت. علت این امر می‌تواند به pH ذاتی عصاره‌ها و همچنین ادامه فرآیند تخمیر لاکتوز توسط مخمر و تولید و تجمع اسید مرتبط باشد[۳۵]. افزودن عصاره‌های مورد بررسی، از کاهش pH نمونه‌های دوغ در طول زمان در مقایسه با نمونه شاهد جلوگیری کردند ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که

1. Sesquiterpene

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

بیشترین تغییرات pH در طول زمان، در نمونه شاهد و کمترین تغییرات pH در طول زمان، در نمونه حاوی عصاره مریم‌گلی تعیین شد به‌طوری که شیب نمودار نیز در این بازه زمانی موید این مطلب می‌باشد. ($p<۰/۰۵$). لازم به ذکر است عصاره ریحان در دوغ اثر کنترلی در تغییرات pH داشت. همچنین در بین عصاره‌های مورد بررسی، عصاره دارچین نسبت به سایر عصاره‌ها اثر کمتری در تغییرات pH از خود نشان داد. لازم به ذکر است pH تمامی نمونه‌ها در محدوده مجاز استاندارد بود[٤].

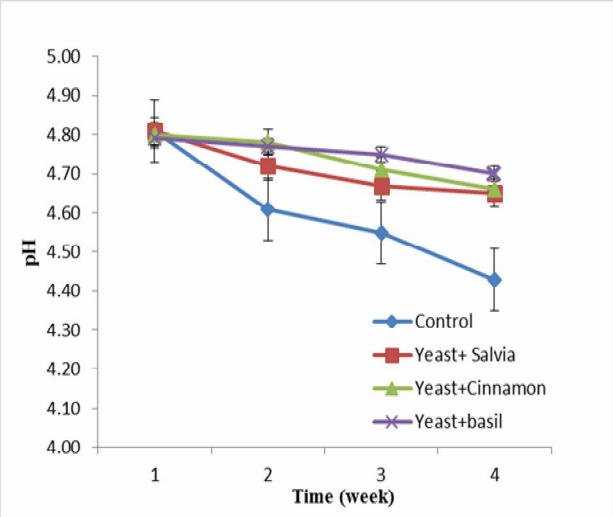

Fig 2 The effect of salvia, basil and cinnamon extracts on pH changes of dough during storage

۳-٤- روند تغییرات اسیدیته

روند تغییرات اسیدیته دوغ در طول دوره نگه‌داری، در شکل ۳ آمده است. مطابق با شکل ۳، روند تغییرات اسیدیته در طول زمان نشان داد که افزودن عصاره، منجر به افزایش اسیدیته دوغ تا هفته سوم نگهداری شد ($p<۰/۰۵$). اما با افزایش طول دوره نگه‌داری تا هفته چهارم روند تغییرات اسیدیته دوغ در نمونه‌های حاوی عصاره‌های مورد بررسی از روند ثابتی پیروی کرد. امیردیوانی و بابا (۲۰۱۱) بیان کردند که تخمیر ماست با عصاره‌های گیاهی، منجر به افزایش فعالیت متابولیک باکتریهای ماست و افزایش اسیدیته به دلیل تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌گردد [۳۵]. علاوه بر این، با گذشت زمان نگه‌داری، اسیدیته کلیه تیمارها به طور معنی‌دار افزایش یافت، علت آن است که با افزایش زمان نگه‌داری و نیز ادامه فرآیند تخمیر لاکتوز توسط مخمر اسیدیته به دلیل تجمع اسیدهایی نظیر اسیدلاکتیک، اسیدفرمیک و غیره افزایش می‌یابد [۳٦]. این در حالی است که افزودن عصاره، از افزایش اسیدیته نمونه‌های مورد بررسی در طول زمان در مقایسه با نمونه شاهد جلوگیری کرد($p<۰/۰۵$). به‌طوری که بیشترین تغییرات اسیدیته در طول زمان، در نمونه شاهد و کمترین تغییرات اسیدیته در طول زمان، در نمونه حاوی عصاره‌های مورد بررسی تعیین شد ($p<۰/۰۵$). همچنین، عصاره مریم‌گلی، حداقل تغییرات اسیدیته دوغ در طول زمان را ایجاد کرد. عصاره ریحان در دوغ نقش کنترلی در تغییرات اسیدیته داشت. همچنین در بین عصاره‌های مورد بررسی، عصاره دارچین نسبت به سایر عصاره‌ها اثر کمتری در تغییرات اسیدیته از خود نشان دارد. لازم به ذکر است از لحاظ اسیدیته، تمامی نمونه‌ها در محدوده مجاز استاندارد بودند [٤].

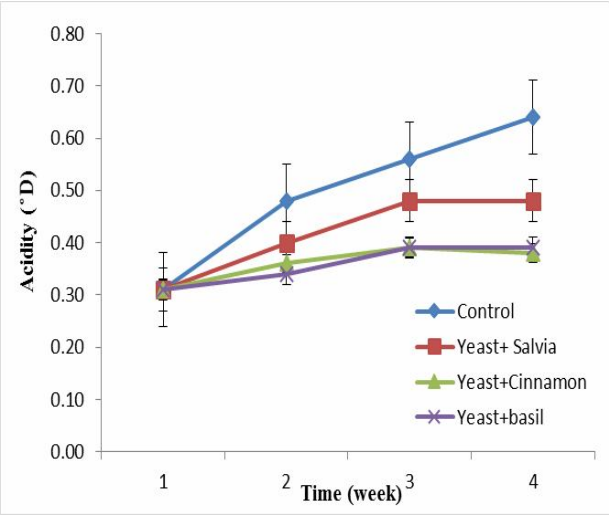

Fig 3 The effect of salvia, basil and cinnamon extracts on acidity changes of dough during storage

عصاره‌های مریم‌گلی، ریحان و دارچین به واسطه دارا بودن ترکیبات موثره متعدد، مانع افزایش اسیدیته دوغ در مقایسه با نمونه شاهد شدند که دلیل آن تأثیر این ترکیبات بر فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشد و در نتیجه باعث جلوگیری از افزایش اسیدیته می‌شود. شاید بتوان دلیل عدم تغییرزیاد عصاره براسیدیته را تولید مقادیر ناچیز اسید توسط باکتری‌های استارتر در طی دوره نگه‌داری و اثر ناچیز عصاره‌ها بر آن دانست. قلعه موسیانی و همکاران (۱۳۹٦) گزارش کردند که با افزایش زمان نگه‌داری، جمعیت باکتری پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. افزودن عصاره‌های ریحان و مرزه به ماست، در افزایش اسیدیته و کاهش pH نسبت به ماست شاهد به طور معنی‌داری

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

موثر بود. با گذشت زمان نگه‌داری، اسیدیته به طور معنی‌دار روند صعودی و pH رونـد نزولی داشت[۳۷].

٤- نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر توجه محققان و پژوهش‌گران به گیاهان دارویی در زمینه‌های مختلف از جمله مواد غذایی جلب شده است. تحقیقات نشان داده است عصاره‌های گیاهی می‌توانند به عنوان یکی از عوامل مهم ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدویروسی و در عین حال به عنوان یک طعم‌دهنده، جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی مواد غذایی باشند. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند در جهت کنترل برخی پاتوژن‌های غذایی و نیز افزایش عمر ماندگاری دوغ در دمای خارج یخچال سودمند باشد. همچنین گامی در جهت کاهش استفاده از نگه‌دارنده‌های سنتتیک و افزایش کاربرد نگه‌دارنده‌های طبیعی باشد. امید است مطالعات آینده ابعاد بیشتری ازخواص ضدمیکروبی این عصاره‌ها را روشن نماید.

٥- منابع

[1] Tamime, A. & Robinson, R. 1999. Yogurt Science and Technology. Woodhead Publ. Cambridge, England, and CRC Press, Boca Raton, FL.

[2] Kiani H., Mousavi M.E., Razavi H. and Morris E.R. 2010. Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of Doogh, a yoghurt-based Iranian drink. *Food Hydrocolloids*, 24: 744-754.

[3] Forooghi Nia, S., Abbasi, S. & Hamidi Esfahani, Z. 2007. Individual and combined effect of addition of gum tragacanth and guar gum on stabilization of Doogh. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology,* 2**,** 15-25.

[4] ISIRI. 2007. Doogh – Specifications and test method. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2453, 1th ed.Tehran.

[5] Vesal, H., Mortazavian, A., Mohammadi, A., Esmaeili, S. 2013. Potassium sorbate and sodium benzoat levels in dough samples consumed by the Tehran market measured using high performance liquid chromatography, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(2): 181-190.

[6] Anand, S.P., Sati, N. 2013. Artificial preservatives and their harmful effect: looking toward Nature for safer alternatives, *Pharmaceutical sciences and Research*, 4(7): 2496-2501.

[7] Act 16903for uSalvia of preservatives in Doogh. 2009. Vice-Chancellery for Food and Drug of the Ministry of Health of Islamic Republic of Iran [In Persian].

[8] Palmer, A. Stewart, J. Fyfel, F. 2002.The Potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Journal of Food Microbiology*, 1:463-470.

[9] S. Mortazavi, H. Azadmard-Damirchi S., R. Mahmudi, M. Sowti, R. Mahmoudi. 2015. Chemical composition and antioxidant properties of hull and core of Pistacia khinjuk stocks. *Iranian Food Science and Technology Research Journal,* 11(4): 408-419.

[10] Zargari A. 1994. Medicinal plants. Tehran university publication. P.4275.

[11] Kelen M, Tepe B. 2008. Chemical composition antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora, *Journal Bioresource Technology*, 99: 96-104.

[12] Karami M, Hossini E, Shahbi Majd N, Ebrahimzadeh M A, Alemy Sh. 2015. Salvia limbata: botanical, chemical, pharmacological and therapeutic effects. *Journal of Clininical Exchange*, 3(2): 1-14. [In Persian]

[13] Sajjadi SE. 2006. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum L.*) from Iran. Daru, 14 (3): 128 - 30.

[14] Vlase L, Benedec D, Hanganu D, Damian G, Caillag l, Sevastre B. 2014. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and phenolic profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedry S. *Molecules Journal*, 19:5940-5507.

[15] Ojagh S.M, Rezaei M. Razavi S.H, Hoseini M.H. 2012. Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria. *JFST*, 35: (9):67-76[In Persian].

[16] Modaresi M. 2011. The effect of cinnamon extracton serum proteins levels of

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

[25] Eisazadeh S, Khamiri M, Sadeghi A, Kashaninezhad M, Mirzaei H. 2017. Evaluation of Growth Inhibition of Food Spoilage Yeasts by Melissa essential oil (*Melissa officinalis*) and Mentha extract (*Mentha pulegium*). *Food Technology & Nutrition*, 14 (1):47-54[In Persian].

[26] Tsuchiya, H., etall. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin resistan Staphylococcus aureus, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 50, No. 1, P. 27-34.

[27] Lu Y, Foo Y. 2002 .Polyphenolics of Salvia -a review. *Phytochemistry*. 59: 117–140.

[28] Du G, Zhang J. 2004. The general situation and progress of the modern research of red Salvia root (*Radix Salviae miltiorrhizae*). Yiyao Daobao. 23: 435-440.

[29] Ozcakmak, S., Dervisoglu, M. &Yilmaz, A. 2012. Antifungal activity of lemon balm and Salvia essential oils on the growth of ochratoxigenic Penicillium verrucosum. *African Journal of Microbiology Research*, 6(12), 3079-3084.

[30] Rasodi I, Mirmostafa SA. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of Thymus persiscu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8): 2200-5.

[31] Noorizadeh E, Mirzapor T, Ghasemi K, Razavi M, Latifi Navid S. 2005. Antibacterial effects of mint, licorice, pennyroyal, chamomile and thyme extracts on Helicobacter pylori. *Journal of Daneshvar-Medical Research,* 11(52):67-72[In Persian].

[32] Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M. & Sacchetti, G. 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food chemistry*, 85(3), 415-421.

[33] Parveen, M., Hasan, K., Tkahashi, J., Murata, Y., Kitagawa, E., Kodama, O. & Iwahas, H. 2004. Response of Saccharomyces cerevisiae to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 46-55

[34] Uribe, S., Ramirez, J. & Pena, A. 1985. Effects of α -pinene on yeast membrane male. *J Armaghane-danesh,* 16(5):444-452 [In Persian].

[17] Zareali M, Hojjati M, Tahmozi didehban S, Jouyandeh H. 2015. Effect of echinophora (*Echinophora cinerea Boiss*) and Stachys (*Stachys lavandulifolia Vahl*) extracts on qualitative and sensory charactristics of Doogh. *Jouranal of Biosystem engineering of Iran*, 46(3):327-337[In Persian].

[18] Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F. 2014. Comparison of the Inhibitory and Antibacterial Effect of Aqueous and Ethanolic Extract of Kelussia odoratissima on Some Pathogenic Bacteria in vitro. *Journal of medical science university of Rafsanjan*, 13(9):775-784[In Persian].

[19] Mehraban, A. Edalatian Dovom, M, R. Haddad Khodaparast, M.H. Mehraban Sang Atash, M. 2017. Study of antibacterial effect of aqueous, ethanolic and droalcoholic extracts of aerial oranges of *Salvia chorassanica* against some spoilage and poisoning bacteria. *JFST*, 66(14): 215-225[In Persian].

[20] Abolhosseini, Sh ,.Golestan, L ,.Kaboosi, H. 2019. The effect of fresh and ripe *Pistacia atlantica* on Shelf life and sensory properties of Iranian dough. *JFST*, 85(15): 417-424 [In Persian].

[21] Tabatabaie yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B. & Mortazavi, S. A. 2016. Investigation Effects of Lamiaceae plants (*Thymus vulgaris* L., *Mentha spp*. and *Ziziphora tenuir* L.) Inhibitory Staphylococcus aureus and Geotrichum candidium in Razavi Khorasan Province Industrial Doogh Samples with Response Surface Method (RSM). *Iranian Journal of Sciences & Food Technology*, 51(13), 15-28 [In Persian].

[22] Khayavi bohloli R. 2017. A review of methods for assessing antimicrobial activity in the laboratory. *Journal of Laboratory & Diagnostic,* 3:43-53[In Persian].

[23] Oroojalian F, Kasra kermanshahi R. 2010. Study of phytochemical and antibacterial properties of essential Oil of Yarrow Shirazi (*Achillea eriophora DC*) by microdilution method. *Journal of Horticultural Science*, 24(1):109-115[In Persian].

[24] ISIRI. 2007. Institute of standards and Industrial Research of Iran. Milk and dairy products- Acidity & pH measurements; NO.2852.1th ed.Tehran.

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

function. *Journal of Bacteriology*, 161, 1195-1200.

[35] Amirdivani, S. and Baba, A.S. 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and invitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1458-1464.

[36] Michael, M., Phebus, R.K. &and Schmidt, K.A. 2015. Plant extract enhances the viability of Lactobacillusdelbrueckii subsp. Bulgaricus and Lactobacillus acidophilus in probiotic nonfat yogurt. *Food Science & Nutrition,* 3(1): 48-55.

[37] Ghale mosiyani, Pourahmad R, Eshaghi M.R. 2017. Effect of aqueous extracts of Basil and Savory on lactobacillus paracasei Life and physicochemical properties of probiotic yoghurt. Journal of Food Science and Technology Innovation, 11(4):55-64[In Persian].

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

Comparison of antimicrobial effects of hydroalcoholic extract of Salvia (*Salvia officinalis*), Basil (*Ocimum basilicum*) and Cinnamon on *Saccharomyces cerevisiae* in doogh

Shahsavar, H. [1], Bolandi, M. [2*], Baghaei, H. [3]

1. Graduate master food industry, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
2. Associate Professor of Food Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
3. Assistant Professor of Food Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.

(Received: 2019/02/25 Accepted:2019/05/18)

Doogh is one of the most used fermented dairy drinks in Iran, whose durability and taste in the food industry is very important. The aim of this study was to investigate the antimicrobial effect of hydroalcoholic extract of salvia (*Salvia officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*) and cinnamon on the durability of dough at ambient temperature.
Hydroalcoholic extracts of Salvia, basil and cinnamon were extracted by maceration method. The antimicrobial effects of the extract of these three plants were determined by microdilution on yeast of *Saccharomyces cerevisiae* by determining minimum microbial inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), and then pH, acidity and antimicrobial effects of them in dough at ambient temperature over four weeks Checked out.
Based on the results of this study, the minimum inhibitory concentration of these extracts was between 6.25 and 12.5 mg/ml. Among studied extracts, salvia (*Salvia officinalis*), with a concentration of 0.62 mg/ml significantly decreased the yeast population of *Saccharomyces cerevisiae* in dough during four weeks ($p<0.05$). But basil (*Ocimum basilicum*) extract has only control effect and cinnamon extract has no antimicrobial effect.
Hydroalcoholic extract of salvia (*Salvia officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*) and cinnamon can be used as an antifungal and antimicrobial agent as a natural preservative in dough and has an important role in consumer health.

Key words: Dough, Salvia extract, Cinnamon extract, Basil extract, *Saccharomyces cerevisiae*

*Corresponding Author E-Mail Address: M.Bolandi@Damghaniau.ac.ir

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