

اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر کلایورومایسس مارکسیانوس و خواص حسی در دوغ ایرانی

سحر اقدسی^a، حامی کابوسی^{b*}، لیلا گلستان^c

^a دانشجوی کارشناسی ارشد گروه صنایع غذایی، واحد آیت اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

^b استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد آیت اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

^c استادیار گروه صنایع غذایی، واحد آیت اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱/۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۵

۱۲

چکیده

مقدمه: گیاه اوجی (*Mentha aquatica*) یکی از گونه‌های خانواده نعنائیان می‌باشد. اسانس این گیاه بر روی انواع میکروب‌ها در محیط کشت خواص ضد میکروبی موثری را نشان داده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های اوجی بر قابلیت بقای کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اسانس اوجی با روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر استخراج گردید. ترکیبات مؤثر این اسانس با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شد. خاصیت بازدارندگی اسانس اوجی بر روی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در محیط کشت مولر هیتتون آگار و با روش دیسک دیفیوژن مورد آزمایش قرار گرفت و بعد از اطمینان از خاصیت ضد میکروبی آن، اثر بازدارندگی اسانس اوجی در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ درصد بر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و طی یک دوره ۲۸ روزه انبارمانی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس اوجی در غلظت‌های بالاتر دارای بالاترین اثر بازدارندگی بر روی رشد کلایورومایسس مارکسیانوس می‌باشد. در مورد اثر توام اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی و اثر ضد میکروبی می‌توان گفت، غلظت بهینه ای که باعث ایجاد طعم مطبوع شد غلظت ۰/۱ درصد اسانس بود که این غلظت در دمای ۴ درجه باعث کاهش معناداری ($P < 0/05$) در تعداد مخمر تلقیحی نیز گردید.

نتیجه‌گیری: اسانس اوجی بسته به غلظت‌های مورد استفاده باعث کاهش در قابلیت بقای میکروارگانیسم مورد آزمایش شد.

واژه‌های کلیدی: اثر بازدارندگی، اسانس، اوجی، دوغ ایرانی، کلایورومایسس مارکسیانوس

مقدمه

استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی یکی از روش‌های رایج در کنترل میکروبی مواد غذایی محسوب می‌شود (Najafpour Navaei, 1979). با این وجود امروزه بر کاهش استفاده از این روش‌ها تاکید می‌شود، زیرا از یک سو مصرف کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می‌باشند و از سوی دیگر خاصیت سرطان‌زایی و سمی بودن برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی نیز برای انسان به اثبات رسیده است. از این رو فشار بر روی صنایع غذایی برای جایگزینی سریع نگهدارنده‌های شیمیایی و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی یکی از رویکردهای جدید در جهت ارتقای سلامت میکروبی غذاها و به دنبال آن افزایش سطح سلامت عمومی جوامع می‌باشد (Youzbashi, 1380). اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها یکی از این نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشند که اثرات ضد میکروبی آن‌ها سال‌ها است که کاملاً شناخته شده است.

یکی از این نگهدارنده‌های طبیعی اسانس نعناع است و تاکنون مطالعات بسیار گسترده‌ای در مورد اثرهای درمانی گونه‌های مختلف نعناع صورت گرفته که برخی از آن‌ها نیز در گذشته شناخته شده بوده و در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفت. در تحقیقات دو دهه اخیر اثر نعناع بر بسیاری از بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا مانند ویروس‌ها، قارچ‌ها و اثرات ضد باکتریایی آن مورد بررسی علمی قرار گرفته است (Tajkarimi et al., 2010).

خانواده نعنائیان تیره بزرگی از گیاهان گلدار است و طبق بررسی‌های جدید در این تیره ۴۰۰۰ گونه در ۲۰۰ جنس جای داده شده است که معمولاً دارای اسانس هستند. این گیاهان در اغلب نواحی کره زمین پراکندگی دارند ولی بیشترین انتشار آن‌ها در منطقه مدیترانه است و گیاهان معروفی چون نعناع، اسطوخودوس، بادرنجبویه، پونه، مریم‌گلی، آویشن، مرزه، ریحان، مرزنجوش در این خانواده قرار دارند (زرگری، ۱۳۷۶). جنس نعناع، بیش از ۳۰-۲۵ گونه است که در سراسر مناطق معتدل جهان به‌طور گسترده‌ای رشد می‌کند (Gulluce et al., 2007). یکی از این گونه‌ها، گونه *منتا آکواتیکا*^۱ از گیاهان آروماتیک با نام

اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ

محل اوجی و نام فارسی سوسنمبر و پونه آبی است که اسانس آن خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارد. اسانس گونه‌های نعناع به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی در سراسر جهان بکار برده می‌شود (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷؛ Kizil et al., 2010).

اضافه کردن اسانس‌ها به مواد غذایی هم از جهت نگهداری و هم تنوع در طعم اثر بخش بوده و مطالعات زیادی در این جهت صورت گرفته است (زرگری، ۱۳۷۶؛ Tajkarimi et al., 2010).

دوغ یک فراورده لبنی تخمیری است که حاصل از تخمیر لاکتیکی شیر می‌باشد و از اختلاط ماست با آب آشامیدنی، نمک و همچنین افزودن اسانس سبزیجات تهیه می‌شود. از خواص تغذیه‌ای دوغ می‌توان به افزایش ویتامین‌ها و متابولیت‌های مغذی، بهبود جذب کلسیم و قابلیت هضم بیشتر نسبت به شیر اولیه اشاره کرد. دوغ حاوی کلسیم و سایر مواد معدنی و ویتامین‌های موجود در ماست، پروتئین و چربی است از این رو می‌تواند تأمین کننده یک چهارم نیاز روزانه بدن به کلسیم و حاوی ویتامین‌های B2 و B6 و B12 و قوی کننده استخوان‌ها باشد. در دهه اخیر در راستای سیاست‌های تغذیه‌ای دولت مبنی بر جایگزینی دوغ بجای نوشابه‌های گازدار صنعتی، تولید صنعتی دوغ رواج یافته و تا حد زیادی با استقبال مردم روبرو شده است تا آنجا که طبق آمار منتشره کلایورومایسسس از سوی دفتر آمار و فن آوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی میزان تولید دوغ در ایران در سال‌های اخیر روند افزایشی داشته است (وٹوق و همکاران، ۱۳۸۸).

از نظر میکروبیولوژی می‌توان گفت که دوغ حاوی همان میکروارگانیسم‌هایی است که در ماست وجود دارند ولی میزان این میکروارگانیسم‌ها در دوغ کمتر است. با توجه به pH پایین دوغ (۴/۵) این فرآورده محیط مناسبی جهت رشد و فعالیت مخمرها می‌باشد و بسیاری از مخمرها در حضور غلظت بالایی از مواد حل شونده نظیر نمک می‌توانند به خوبی رشد کنند (بنیادیان و کریم، ۱۳۸۱).

مخمري مانند کلایورومایسسس مارکسیانوس^۲ می‌تواند در دوغ فعالیت نموده و علاوه بر تغییر عطر و طعم باعث

¹ *Mentha aquatica L.*

² *Kluyveromyces marxianua*

شدند.

- تهیه اسانس

نمونه برگ‌های آسیاب شده در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آیت اله آملی مورد اسانس گیری قرار گرفت. عمل اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر طرح میکوتل^۱ انجام شد. در هر دور اسانس‌گیری حدود ۱۰۰ گرم برگ خشک آسیاب شده با حدود ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (تقریباً معادل یک سوم حجم بالن) داخل بالن ژوژه مخلوط شدند تا عمل اسانس‌گیری روی آن انجام گردید. بدین صورت که ابتدا دمای هیتر را روی حدودا ۳۰۰-۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم کرده و به محض جوشیدن محتویات داخل بالن، دما را روی ۱۰۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم کرده و برای مدت ۳-۴ ساعت عمل اسانس‌گیری انجام شد. سپس اسانس تقطیر شده را درون شیشه‌های کوچک تیره جمع‌آوری کرده و تا زمان مصرف در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید.

- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه مورد مطالعه با همکاری مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله آملی شناسایی شدند. اسانس مورد نظر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق گردیدند تا نوع ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent مدل 7890A با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۱۵ میکرولیتر از نوع DB-35MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای اولیه آن ۳۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما برای مدت ۵ دقیقه، گرادیان دمایی ۷ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دمای تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در دقیقه، افزایش دما تا ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما، دمای اتافک تزریق ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان حامل با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف نگار جرمی مورد استفاده از نوع Agilent مدل 5975C با ولتاژ

تولید گاز در دوع شود. کلایورومایسس مارکسیانوس از مخمرهای متداول در فراورده‌های لبنی است و یکی از عوامل آلوده کننده و مولد فساد در برخی از مواد غذایی از جمله ماست و فراورده‌های وابسته به آن مانند نوشیدنی دوع در ایران می‌باشد (خدائیان چگنی، ۱۳۷۸).

این پژوهش با هدف بررسی اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر قابلیت بقای کلایورومایسس مارکسیانوس در دوع ایرانی انجام گردید.

مواد و روش‌ها**- تهیه سوسپانسیون میکروبی**

سویه‌های استاندارد میکروبی، کلایورومایسس مارکسیانوس (۵۱۹۳ PTCC)، از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران بصورت لیوفیلیزه تهیه شد. آمپول حاوی مخمر موردنظر با احتیاط کامل در کنار شعله تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار شکسته شد. برای فعال کردن میکروارگانیسم، محتویات سویه میکروبی را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Malt Extract Agar (biomark) که استریل شده بود، انتقال داده شد. و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از مخمر مورد نظر در محیط کشت Malt Extract broth کشت اسلنت تهیه شد و در فریزر (دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و در مواقع مورد نیاز از آن بر روی محیط کشت Malt Extract Agar تجدید کشت گردید (کریمی، ۱۳۸۷؛ روحانی، ۱۳۹۲).

- جمع‌آوری و نگهداری گیاه اوجی

گونه نعناع با نام محلی اوجی در آذر و دی ماه سال ۱۳۹۲ از مزارع و باغات شهرستان آمل واقع در استان مازندران تهیه گردید و سپس توسط کارشناسان علمی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آیت اله آملی مورد تأیید قرار گرفت. گیاهان ابتدا شسته و سپس تحت شرایط مناسب در سایه خشک گردید، بطوریکه نور مستقیم خورشید به آن نتابد و از طرفی هوای اتاق هم در جریان باشد تا دمای اتاق زیاد بالا نباشد و پس از خشک شدن، جهت تهیه اسانس، برگ‌ها با آسیاب برقی (مدل Depose-Brevete SGD Brevete، ساخت شرکت Moulinex). خرد

^۱ Miquel^۲ Flow

اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ

- روش بررسی اثر ضد میکروبی اسانس اوجی بر روی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی

برای آماده سازی تیمارهای دوغ، ماست تازه بسته بندی شده از کارخانه هراز (آمل) خریداری شد و بعد از اطمینان از عدم وجود مخمر در آن (کشت جهت وجود مخمر)، در شرایط کاملاً استرون، ماست در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری استرون شده به نسبت ۵۰ به ۵۰ با آب جوشیده سرد شده مخلوط گردید (دوغ تولید شده دارای pH=۴/۲۱ در دمای محیط بود). همچنین به تمامی ظرف های دوغ تهیه شده به میزان ۰/۵ درصد نمک در شرایط استرون اضافه شد. در ادامه از اسانس استاندارد اوجی، حجم مورد نیاز برای ایجاد غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ درصد اسانس اوجی به ظرف های دوغ تیمار اضافه گردید (روحانی، ۱۳۹۲؛ فدائی و همکاران، ۱۳۸۳؛ بی نام، ۱۳۸۹).

با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند (cfu/ml) $10^8 \times 1/5$ سوسپانسیونی از مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس تهیه نموده و سپس به همه ظرف های دوغ تیمار و شاهد (دوغ بدون اسانس)، از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید بطوریکه میزان مخمر در دوغ بیش از 3×10^6 cfu/ml بود. در ادامه همه ظرف های تیمار و شاهد در دماهای ۴ درجه سانتی گراد بمدت ۲۸ روز گرمخانه گذاری شدند (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷؛ Smith-Palmer et al., 2001).

تمام آزمون ها برای بررسی تغییر تعداد مخمر تلقیح شده در نمونه شاهد (دوغ بدون اسانس) حاوی سوسپانسیون میکروبی همانند نمونه های دوغ حاوی اسانس و سوسپانسیون میکروبی صورت گرفت.

روند تغییرات تعداد مخمر تلقیح شده در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مورد بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه، یک میلی لیتر از دوغ در شرایط استرون برداشت شد و با ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استرون مخلوط شد و در شیکر همزده شد و سپس توسط سرم فیزیولوژی تا رقت مناسب، رقیق گردید، سپس از رقت های مناسب تهیه شده به میزان ۰/۱ میلی لیتر (۱۰۰ میکرو لیتر) به سطح پلیت های حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار^۲ منتقل گردید و بصورت

یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۳۰ درجه سانتی گراد بود. شناسایی طیف ها به کمک شاخص بازدارندگی آنها با استفاده از طیف های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

- روش بررسی اثر ضد میکروبی اسانس اوجی بر مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در غلظت های مختلف به روش دیسک-دیفیوژن

فعالیت ضد میکروبی اسانس انتخاب شده توسط روش دیسک دیفیوژن بر طبق دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه کلینیکی (NCCLS 1977) تعیین شد (Stevens et al., 2011).

برای تعیین حساسیت مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس نسبت به اسانس و بررسی قطر هاله عدم رشد اسانس بر روی این مخمر، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از سویه میکروبی مورد نظر سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (cfu/ml) $10^8 \times 1/5$ تهیه شد، و از سویه مورد نظر به میزان ۰/۱ میلی لیتر توسط پیت استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار^۱ بصورت یکنواخت کشت داده شد. آنگاه دیسک های بالانک استریل با قطر ۶ میلی متر، در اسانس خالص اوجی و غلظت های مختلف تهیه شده از اسانس این گیاه (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴) غوطه ور گردید، جهت رقیق سازی اسانس نیز از حلال پروپیلن گلیکول استفاده شد.

دیسک های تهیه شده از مقادیر مختلف اسانس در کنار شعله و توسط لوپ استریل با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند. و سپس پلیت های مورد نظر به مدت ۳-۵ روز در انکوباتور تحت دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. و سپس با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد (میلی متر) در اطراف دیسک ها نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

دیسک کاغذی پروپیلن گلیکول در تمام نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت و تأثیر ضد میکروبی نداشت (Nychas et al., 2003; Kumar et al., 2011).

¹ Muller Hinton Agar

² Sabouraud Dextrose Agar

سطحی^۱ کشت داده شد، سپس محیط‌های کشت داده شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از گذشت این مدت، تعداد پرگنه‌های میکروارگانسیم شمارش شدند (بی‌نام، ۱۳۷۰) و نتایج (میانگین ۳ تکرار) بصورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی^۲ در هر میلی لیتر از نمونه گزارش شد (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷).

- ارزیابی حسی

جهت ارزیابی اثر اسانس‌ها بر صفات ارگانولپتیک نمونه‌های دوغ (شامل عطر (بو)، طعم و پذیرش کلی)، دوغ‌های حاوی اسانس اوجی همراه با یک نمونه شاهد بعد از درست کردن دوغ در شرایط یکسان با استفاده از آزمون هدونیک ۵ امتیازی (بسیار بد تا ۵ بسیار عالی) توسط ۱۰ نفر پانلیست نیمه آموزش دیده انجام گرفت.

- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، تیمارها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده با استفاده از روش‌های آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way - ANOVA) و آنالیز واریانس تک متغیره GLM Univariate در سطح احتمال (P<0/05) مورد بررسی قرار گرفته و همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال (P<0/05) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته است. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار

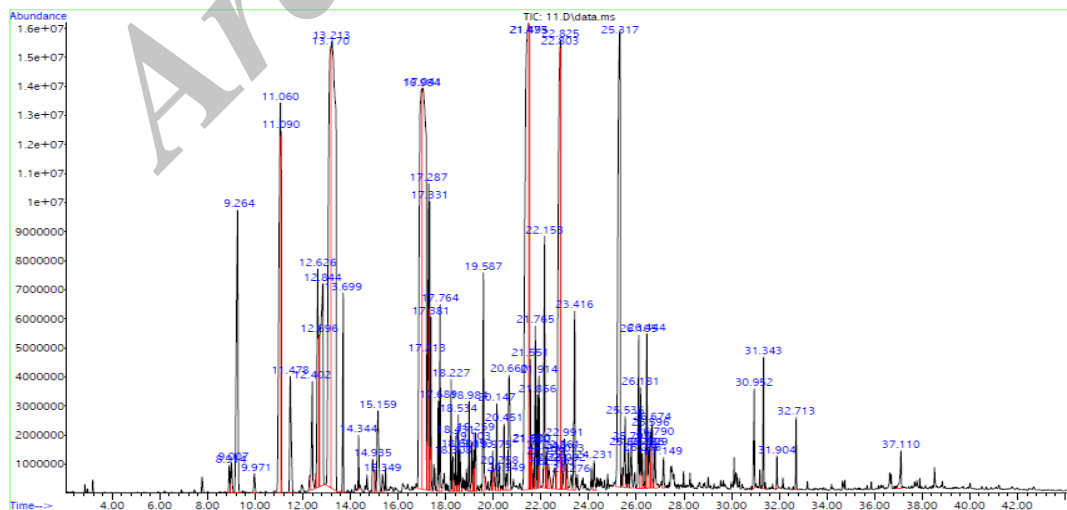
یافته‌ها

- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اوجی

جدول ۱ (بترتیب از بالا به پایین) بالاترین میزان ترکیبات شناخته شده در گیاه اوجی را بر اساس GC-MS نشان می‌دهد همانطور که مشاهده می‌شود ترکیب او ۱ و ۸- سینئول^۳ اصلی ترین ترکیب شناخته شده در گیاه اوجی می‌باشد.

- اثر ضد میکروبی اسانس گیاه اوجی بر مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در غلظت‌های مختلف به روش دیسک دیفیوژن

نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بررسی اثر تیمارهای مختلف اسانس اوجی و کنترل (پروپیلن گلیکول) بر روی مهار رشد مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در نمودار ۱ نشان می‌دهد که تیمارهای ۱/۴ تا ۱/۱۶ و همچنین ۱/۳۲، ۱/۶۴ و کنترل فاقد اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر بوده‌اند. درحالی‌که دیگر تیمارها دارای اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر و تیمار کنترل می‌باشند. لذا می‌توان گفت که تیمارهای اسانس خالص و کنترل دارای بیشترین و کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد بترتیب بوده‌اند (P<0/05).



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس گیاه اوجی به دست آمده از دستگاه GC-MS

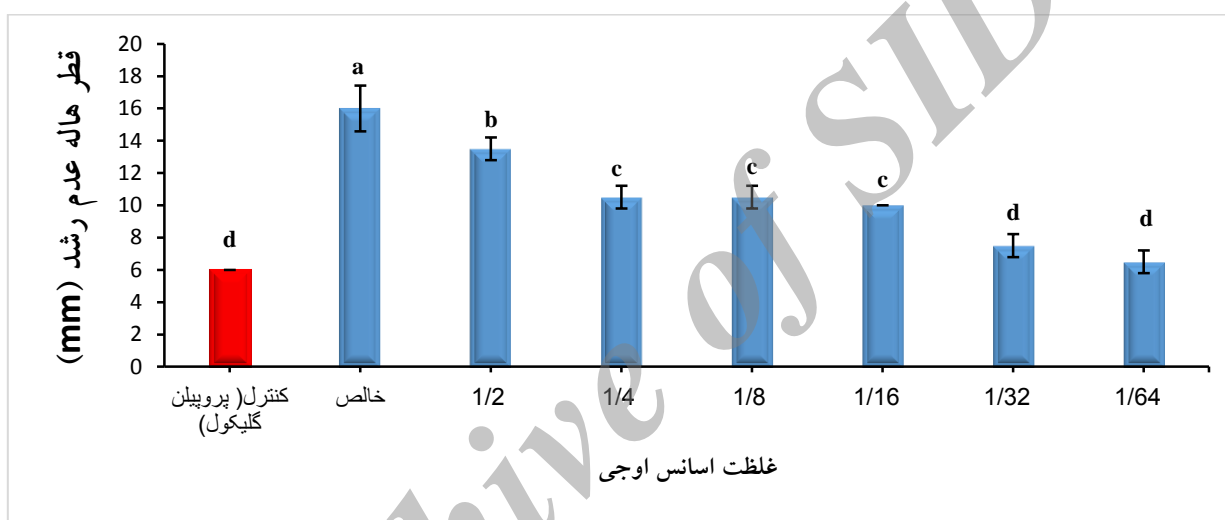
¹ Surface Plating

² Colony Forming Units (CFU)

³ 1,8-Cineole

جدول ۱- بالاترین میزان ترکیبات شیمیایی شناخته شده در اسانس گیاه اوجی

اندیس کوانتاز (KI)	درصد	ترکیبات	زمان بازداری (دقیقه)
۱۰۳۱	۱۷/۹۲۹	۱،۸-سینئول	۱۳/۱۴۵-۱۳/۲۱۵
۱۱۶۳	۱۵/۱۶۱	منتوفوران	۱۶/۹۸۶-۱۷/۰۴۰
۱۵۸۰	۱۱/۸۲۱	کاریوفیلین	۲۱/۴۷۵-۲۱/۴۹۶
۱۵۰۰	۶/۶۳۴	دی-جرماکرین	۲۲/۸۰۳-۲۲/۸۲۵
۱۵۹۰	۶/۲۵۷	وی ری دی فلورول	۲۵/۳۱۵
۱۰۲۹	۵/۷۹	دی-لیمونین	۱۲/۶۲۶-۱۲/۸۴۲
۹۸۰	۵/۲۶۲	بتا پینن	۱۱/۰۶۰-۱۱/۰۹۲
۹۳۹	۲/۷۲۴	آلفا پینن	۱۹/۲۶۶
۱۵۱۴	۲/۲۵۵	آلفا کادینول	۲۶/۱۰۴-۲۶/۴۴۴
۱۱۸۱	۱/۸۵۵	ترپین-۴-آل	۱۷/۲۸۷
۱۴۵۴	۱/۳۲۱	آلفا کاریوفیلین	۲۲/۱۵۵



نمودار ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد مخمر کلایوروما یسیس مارکسیانوس در حضور غلظت های مختلف اسانس اوجی و کنترل (پروپیلن گلیکول) به روش دیسک دیفیوژن ($P < 0/05$)

دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بوده است ($P < 0/05$).

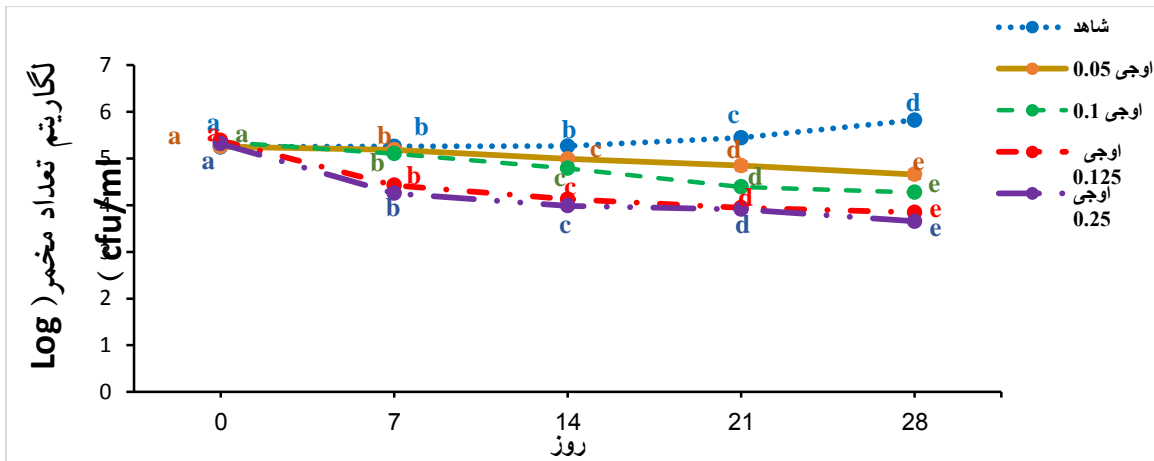
- پذیرش کلی اسانس اوجی

نتایج آنالیز واریانس حاصل از ارزیابی حسی میانگین امتیاز پذیرش کلی دوغ ایرانی حاوی تیمارهای مختلف اسانس اوجی در نمودار ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسانس امتیاز پذیرش کلی کاهش یافته است. در اسانس اوجی تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ و همچنین ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ فاقد اختلاف آماری معنی داری بوده اند. تیمار شاهد و ۰/۲۵ اسانس اوجی از بیشترین و کمترین امتیاز پذیرش کلی بترتیب برخوردار بوده‌اند ($P < 0/05$).

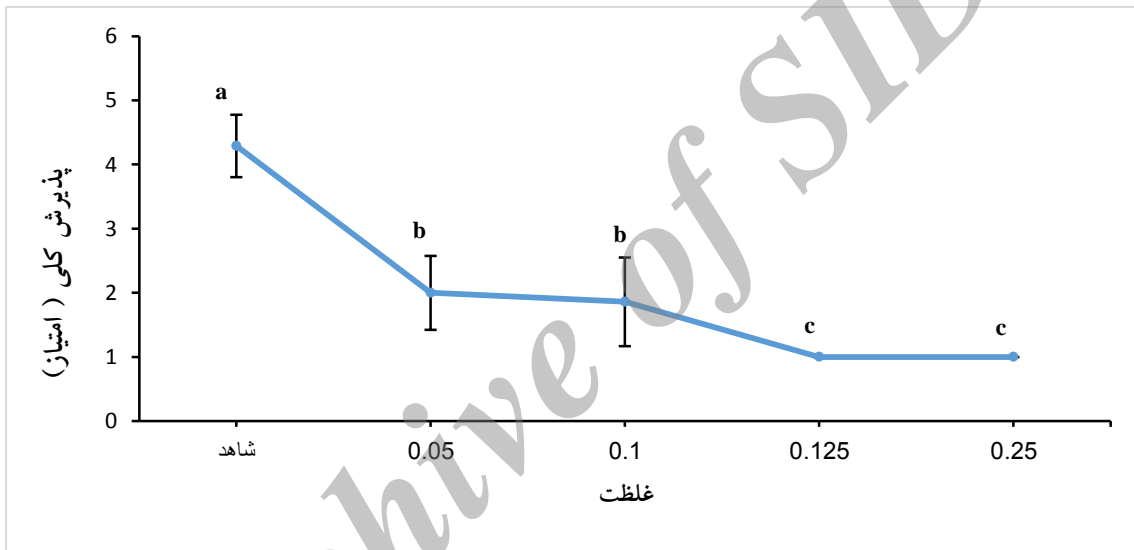
- اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس اوجی بر

روی مخمر کلایوروما یسیس مارکسیانوس در دوغ

آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بررسی اثر بازدارندگی تیمارهای مختلف اسانس اوجی و مقایسه آن با تیمار شاهد در مدت زمان ۲۸ روز بر روی رشد مخمر کلایوروما یسیس مارکسیانوس در نمودار ۲ نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد مخمر تلقیحی در تمامی تیمارها برخلاف شاهد با گذشت زمان روند کاهشی داشته است و بین روزهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشته است، در تمامی تیمارها روزهای ۰ و ۲۸ از بیشترین و کمترین میزان مخمر بترتیب برخوردار بوده اند. تیمار ۰/۲۵ درصد اسانس اوجی



نمودار ۲- مقایسه روند تغییرات میانگین لگاریتم تعداد مخمر کلابورومایسس مارکسیانوس تلقیح شده به دوغ در تیمارهای مختلف اسانس اوجی در مدت زمان ۲۸ روز ($P < 0.05$)



نمودار ۳- مقایسه میانگین امتیاز پذیرش کلی در تیمارهای مختلف دوغ حاوی اسانس اوجی ($P < 0.05$)

بحث

در حالی که در مطالعه ما این دو ترکیب (منتوفوران و ۸،۱-سینؤل) دارای نسبت تقریباً مساوی با یکدیگر بودند. ولی ترکیب شیمیایی ۸،۱-سینؤل از درصد نسبتاً بالاتری برخوردار بود. نتایج بدست آمده در بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاه اوجی علیه مخمر کلابورومایسس مارکسیانوس به روش دیسک دیفیوژن در محیط کشت نشان داد که اسانس گیاه اوجی در محیط کشت حاوی مخمر کلابورومایسس مارکسیانوس هاله شفاف ایجاد می‌نماید و دارای اثر بازدارنده رشد بر روی این مخمر می‌باشد.

نتایج بدست آمده از آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اوجی توسط دستگاه GC-MS نشان داد که اصلی‌ترین ترکیب در گیاه *منتا آکواتیکا* ۸،۱-سینؤل بود. در برخی از مقالات اشاره شده است که ترکیب شیمیایی منتوفوران اصلی‌ترین ترکیب اسانس گیاه *منتا آکواتیکا* است (Singh *et al.*, 2011) و این ترکیب یک اتر است و خاصیت ضد میکروبی دارد (Bakkali *et al.*, 2005; Tassou, 1995). و در برخی از مقالات دیگر اشاره شده که ترکیب شیمیایی ۸،۱-سینؤل اصلی‌ترین ترکیب اسانس گیاه *منتا آکواتیکا* است (Tyagi & Malik, 2011).

اثر ضد میکروبی قابل قبولی از خود نشان دادند، بنابراین امکان اینکه بتوان از آنها به عنوان یک نگهدارنده و یک طعم دهنده طبیعی در مواد غذایی استفاده کرد وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه *Tesic* و *Agboola* در سال ۲۰۰۲ همخوانی نداشته است. آنها مشاهده نمودند که کاهش تعداد باکتری‌های آغازگر در نمونه‌های پنیر حاوی ادویه‌های نعناع، لیمون میرتل^۱ و باش تومیتو^۲ در مقایسه با نمونه شاهد معنا دار نیست و این ادویه‌ها تاثیری بر کاهش تعداد باکتری نداشتند، درحالی‌که در این تحقیق اسانس‌های مورد مطالعه باعث کاهش در لگاریتم تعداد مخمر شدند. که علت این تفاوت در نوع میکروارگانیسم مورد مطالعه می‌باشد چرا که حساسیت میکروارگانیسم‌های مختلف به اسانس‌ها مشابه هم نمی‌باشد. و همچنین بسته به اینکه میکروارگانیسم در چه مرحله‌ای از رشد خود باشد، عکس العمل‌های متفاوتی نسبت به اسانس‌های مختلف از خود نشان می‌دهد.

نتایج آنالیز واریانس حاصل از ارزیابی حسی میانگین امتیاز پذیرش کلی دوغ ایرانی حاوی تیمارهای مختلف اسانس اوجی نشان داد که با افزایش غلظت اسانس امتیاز پذیرش کلی کاهش می‌یابد. تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ و همچنین ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ فاقد اختلاف آماری معنی‌داری بوده‌اند. تیمارهای شاهد و ۰/۲۵ اسانس اوجی از بیشترین و کمترین امتیاز پذیرش کلی بترتیب برخوردار بوده‌اند. در مورد اثر توام اسانس بر خواص ارگانولپتیکی و اثر ضد میکروبی می‌توان گفت، غلظت بهینه‌ای که باعث ایجاد طعم مطبوع شد نیز غلظت ۰/۱ درصد اسانس بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه اوجی بر مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در غلظت‌های مختلف به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که این اسانس در محیط کشت حاوی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس هاله شفاف در اطراف دیسک‌ها ایجاد کرد. غلظت خالص دارای بالاترین قطر هاله عدم رشد است و با کمتر شدن غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد کمتر می‌شود. در بررسی اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس اوجی بر روی رشد مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در

همانطور که مشاهده شد غلظت خالص دارای بالاترین قطر هاله عدم رشد است و با کمتر شدن غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد کمتر می‌شود. عمل ضد میکروبی اسانس تحت تأثیر فاکتورهایی مثل توانایی ترکیب شیمیایی ضد باکتریایی برای نفوذ کاملاً یکنواخت در آگار، حجم اسانس روی دیسک‌ها یا ضخامت لایه آگار می‌تواند شدیداً متغیر باشد (وئوق و همکاران، ۱۳۸۸).

در این تحقیق قطر هاله عدم رشد غلظت‌های خالص اسانس اوجی در محیط کشت حاوی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس ۱۶ بود.

در بررسی انجام شده توسط برخی محققین قطر هاله عدم رشد اسانس *منتا اسپیکاتا* و *منتا پپریتا* بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، به ترتیب ۱۶ میلی‌متر و ۱۵ میلی‌متر بوده است (Kizil et al., 2010). در تحقیق *Sokovic* و همکاران در سال ۲۰۰۹ قطر هاله عدم رشد اسانس *منتا اسپیکاتا*، *منتا پپریتا*، مرزنجوش، آویشن، ریحان و مریم گلی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* 25923، به ترتیب ۲۲، ۲۰، ۳۲، ۲۸، ۱۸ و ۱۲ میلی‌متر بوده است.

در تحقیق دیگری قطر هاله عدم رشد اسانس برگ‌های *منتا اسپیکاتا*، *منتا آرونسیس*، *منتا پپریتا* و *منتا لونگیفولیا* که در فصل تابستان و زمستان برداشت شده بر روی *اسپیژیلیوس فلاووس* ATCC 32612، به ترتیب ۲۶-۲۹، ۲۱-۲۵، ۲۰-۲۲، ۲۹-۳۰ میلی‌متر گزارش شده است و این اسانس‌ها خواص ضد میکروبی فوق العاده‌ای بر روی میکروارگانیسم مورد مطالعه داشتند (Hussain et al., 2010).

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی در این تحقیق نشان داد که اسانس اوجی فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بر روی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ دارا می‌باشد و با افزایش غلظت اسانس، لگاریتم تعداد مخمر کاهش یافت.

بنیادیان و کریم در سال ۱۳۸۱ تأثیر روغن‌های فرار گیاهان پونه، ترخان، آویشن، نعناع بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت مایع بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست آمده روغن‌های فرار گیاهان

¹ Lemon Myrtle

² Bush Tomato

اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت اله آملی - دانشکده صنایع غذایی و کشاورزی.

زرگری، ع. (۱۳۷۶). گیاهان دارویی، موسسه انتشارات دانشگاه تهران، جلد چهارم، چاپ ششم، صفحات ۱۴۵-۱.

فدائی، س.، آبرومند آذر، پ.، شریفیان، ا. و لاریجانی، ک. (۱۳۸۳). اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی و مقایسه آن با بنزوات سدیم. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال هشتم، شماره ۱، صفحات ۴۱-۳۴.

کریمی، ر. (۱۳۸۷). مطالعه اثر ضد میکروبی اسانس‌های نعناع، پونه، گلاب و تاثیر دمای نگهداری بر روی رشد *Debaryomyces hansenii* در دوغ ایرانی. رساله دکتری رشته بهداشت مواد غذایی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. دانشکده تخصصی علوم دامپزشکی.

مشتاقی، ح. و بنیادیان، م. (۱۳۸۷). اثرات ضد لیستریایی عصاره روغنی نعناع (*Mentha spicata L.*) در یک مدل غذایی. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۴، شماره ۳، ۳۳۲-۳۲۶.

و ثوق، ا. ص.، خمیری، م.، کاشانی نژاد، م. و جعفری، م. (۱۳۸۸). اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۸۵-۷۷

Agboola, S. O. & Tesic, M. R. (2002). Influence of australian native herbs on the maturation of vacuum-packed cheese. *Lebensm. -wiss. u.- Technol.*, 35, 575-582.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 585, 1-13.

Gulluce, M., Shain, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. & Ozcan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. spp. longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449-1456.

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M. & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha species*.

دوغ مشخص شد که این اسانس دارای خاصیت بازدارندگی بر روی رشد میکروارگانیسم مورد مطالعه بوده است و با افزایش غلظت اسانس اثر بازدارندگی بر روی رشد مخمر *کلاپورومایسس مارکسیانوس* افزایش یافته است. در مورد اثر توام اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی و اثر ضد میکروبی می‌توان گفت، غلظت بهینه‌ای که باعث ایجاد طعم مطبوع شد غلظت ۰/۱ درصد اسانس بود که این غلظت در دمای ۴ درجه باعث کاهش معناداری در لگاریتم تعداد مخمر تلقیحی نیز گردید.

سپاسگزاری

با تشکر از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله آملی و کلیه پرسنل و کارکنان آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی که در انجام این تحقیق از مساعدت و همراهی آنان بهره مند شدم.

منابع

بنیادیان، م. و کریم، گ. (۱۳۸۱). مطالعه تاثیر روغن‌های فرار برخی گیاهان بر باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* در محیط کشت مایع. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۷، شماره ۴، صفحات ۳۳-۳۱.

بی‌نام. (۱۳۷۰). ویژگی‌های آب آشامیدنی. استاندارد ملی ایران. شماره ۱۰۵۳.

بی‌نام. (۱۳۸۹). شیرخشک - ویژگی‌ها. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۰۱۲. تجدید نظر چهارم.

جیمز، ام. جی. (۱۳۷۲). میکروبیولوژی غذایی مدرن. مترجم: مرتضوی، ع. حداد خداپرست، م. فرهنگش، ر. ناصحی، ب. و رضائی مکرّم، ر. جلد اول، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۵۴-۲۱.

خدائیان چگنی، ف. (۱۳۷۸). میکروبیولوژی مواد غذایی. ویرایش پنجم، مؤسسه آموزش عالی پارسه، صفحات ۲۳۲-۱.

روحانی، ن. (۱۳۹۲). بررسی خواص ضد میکروبی و حسی اسانس کاکوتی کوهی و نعناع فلفلی بر مخمر *کلاپورومایسس مارکسیانوس* در دوغ ایرانی. پایان نامه کارشناسی ارشد تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه آزاد

Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 1827-1836.

Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc., E. & Yuksel, U. (2010). Mineral content, essential oils components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, 15(2), 148-153.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. & Satya, S. (2011). Insecticidal Properties of Mentha species: A review. *Industrial Crops and products*. 34, 802-817.

Najafpour Navaei, M. (1979). Medicinal and aromatic plants research. Forest and Pastures Research Institute Publications. pp. 88-102.

Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N. & Tassou, C. C. (2003). Natural antimicrobials for the minimal processing of food. Vol. 9., in: Antimicrobials from herbs and spices. Cambridge, England. CRC press Woodhead publishing Limited, LLC, pp. 170-200.

Singh, R., Shushni, M. A. M. & Belkheir, A. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 4. pp. 1-7.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470

Sokovic, M. D., Vukojevic, J., Marin, P. D., Brkic, D. D., Vajs, V. & Van Griensven, L. J. L. D. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* Species and their antifungal activities. *Molecules*, 14, 238-249.

Stevens, M. J. A., Vollenweider, S., Meile, L. & Lacroix, C. (2011). 1,3-Propanedioldehydrogenases in lactobacillus reuteri: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microbial Cell Factories*, 10, 61, 1-9.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A. & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.

Tassou, C. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4°C and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*, 7, 593-600.

Tyagi, A. M. & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22, 1707-1714.

Youzbashi, M. (1380). Study of Myrtus communis essential oil. Pharm. D. Thesis. Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science.