

بررسی تأثیر ضد میکروبی عصاره‌های الکلی آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی به‌عنوان نگهدارنده طبیعی شیر پاستوریزه

سید محمد احمدی^{۱*}، سمیه نیک‌نیا^۱، محمد امین میری^۱، طیبه حدادی^۲

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ تیر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ مرداد ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۳۰ شهریور ۱۳۹۹

چکیده

اخیراً تحقیقات در خصوص استفاده از ترکیبات گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی سه گیاه دارویی آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعناع فلفلی کشت شده در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل بر میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زای شیر پاستوریزه شامل *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *لیستریامنو سائیتوزنز* و *شرشیاکلی* و در مرحله بعد بررسی اثر عصاره‌های اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی بر ماندگاری شیر پاستوریزه بود. نتایج نشان داد که گیاه آلوئه‌ورا بیشترین اثر ضد میکروبی و گیاهان بابونه آلمانی و نعناع فلفلی به ترتیب بعد از آن قرار داشتند ($P \geq 0/05$). به طور کلی عصاره اتانولی گیاهان مورد آزمایش دارای اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره متانولی بود ($P \geq 0/05$). غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ (درصد حجمی/حجمی) از عصاره‌های اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی، به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در شیر پاستوریزه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که تیمار شیر پاستوریزه با ۰/۳ و ۰/۱۵ درصد بابونه آلمانی و همچنین آلوئه‌ورا با غلظت ۰/۳ درصد ضمن داشتن خصوصیات حسی قابل قبول، به‌طور معنی‌داری جمعیت میکروبی پایین‌تر و زمان ماندگاری طولانی‌تری در مقایسه با نمونه شاهد داشت. بنابراین استفاده از عصاره گیاهان مذکور به‌عنوان نگهدارنده در شیر پاستوریزه با خصوصیات مفید یک غذای عملگرا پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی، شیر پاستوریزه، عصاره اتانولی، فعالیت ضد میکروبی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: smahmadi@uoz.ac.ir

مقدمه

فساد باکتریایی مهم‌ترین عامل محدودکننده عمر ماندگاری شیر پاستوریزه می‌باشد. متابولیسم و رشد میکروب‌ها به دلیل اثرات نامطلوبی که دارند، زمان نگهداری شیر را کوتاه می‌کنند (۱). پاستوریزاسیون، اغلب میکروب‌های بیماری‌زای شیر را نابود می‌کند اما تقریباً یک درصد فلور میکروبی شیر نظیر میکروب‌های ترموفیل متعلق به گونه‌های میکروکوکوس، باسیلوس، کلسترییدیوم و گاهی اوقات باکتری‌های میله‌ای گرم منفی ممکن است در دمای پاستوریزاسیون زنده بمانند و سبب فساد محصول شوند، خصوصاً زمانی که تعداد آنها در شیر خام زیاد باشد (۱، ۲).

سایکروتروف‌ها گروه بسیار مهمی از میکروب‌هایی هستند که در شیر و محصولات لبنی حضور دارند که در بین آنها گونه‌های سودوموناس به‌عنوان مهم‌ترین میکروب‌های شرکت‌کننده در فساد شیر مورد توجه می‌باشند. این باکتری‌ها می‌توانند در دمای یخچال رشد و آنزیم‌ها، سموم و سایر متابولیت‌ها را تولید نمایند. اکثر این باکتری‌ها آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک خارج سلولی تولید می‌کنند که تعدادی از این آنزیم‌ها به‌وسیله پاستوریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یا فرایند UHT^{۱۹} غیر فعال نمی‌شوند. فعالیت باقی‌مانده این آنزیم‌ها می‌تواند کیفیت ارگانولپتیک و عمر ماندگاری محصولات لبنی فرآوری شده را کاهش دهد (۱). شیر پاستوریزه همچنین ممکن است بعد از فرایند پاستوریزاسیون تحت شرایط غیر بهداشتی دچار آلودگی میکروبی شود. یکی از میکروب‌هایی که ممکن است به واسطه آلودگی ثانویه وارد شیر شود، باکتری / شرشیاکلی است که یک میکروب انتروپاتوژن با منشأ غذایی می‌باشد و

می‌تواند سبب اسهال و در شرایط حادثر منجر به مرگ شود (۲).

گزارشات متعددی درباره بیماری‌های ناشی از شیر پاستوریزه وجود دارد که از جمله آنها، بیماری لیستریوزیس می‌باشد. که سبب بیماری‌های مننژیت، انسفالیت و عفونت خونی می‌گردد. این بیماری دارای نرخ مرگ و میر بالا (۲۰ تا ۳۰ درصد) است. اگرچه پاستوریزاسیون HTST باعث حذف لیستریا منوسایتوژنز می‌شود، اما محصول ممکن است در مراحل بعد از فرایند حرارتی دچار آلودگی شود. بنابراین پاستوریزاسیون نمی‌تواند خطر حضور لیستریا منوسایتوژنز را در شیر حذف کند. شیوع بیماری لیستریوزیس در فنلاند در سال ۱۹۹۸ تا ۱۹۹۹ نشان می‌دهد که محصولات لبنی تهیه شده از شیر پاستوریزه ممکن است در مراحل بعد از تولید آلوده به لیستریا منوسایتوژنز شوند (۲، ۳).

نگرانی در خصوص بی‌خطر بودن ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی سبب شده که تقاضای مصرف‌کننده برای تولید مواد غذایی فرآوری شده به طور طبیعی افزایش یابد. از این رو اخیراً تحقیقات در مورد استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها مورد توجه قرار گرفته است (۴). گیاهان دارویی نظیر آلوئه‌ورا، نعناع فلفلی و بابونه برای هزاران سال در سرتاسر جهان برای اهداف دارویی و درمانی مختلفی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نعناع و بابونه بیشتر برای معطر کردن محصولات لبنی تخمیری استفاده می‌شوند (۵). گیاهان دارویی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی برای انسان و محیط زیست بی‌خطر بوده، لذا می‌توانند به آسانی توسط عموم استفاده گردند (۶، ۷).

با توجه به این که میکروب‌های مختلفی در

^{۱۹} Ultra high temperature

فساد مواد غذایی نظیر شیر پاستوریزه نقش دارند، بنابراین کاربرد عصاره‌های گیاهان دارویی به‌عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی علاوه بر میزان فعالیت ضد میکروبی آنها مستلزم تأثیر این عصاره‌ها بر تمامی میکروبهایی است که در فسادشان نقش دارند. میزان فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی به فاکتورهای مختلفی نظیر نوع گیاه، نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد (۸). بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکی گیاهان دارویی گشنیز و بولاغ اوتی نشان داد که اگر چه عصاره‌های مذکور در برخی غلظت‌ها هاله عدم رشد بر علیه باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا منوسایتوتنز و استافیلوکوکوس اورئوس) ایجاد کردند اما هیچ کدام از گیاهان مذکور اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های گرم منفی نداشتند (۹).

مطالعه گلشنی و داودی (۱۳۹۲) حاکی از آن بود که عصاره متانولی رزماری دارای اثر ضد میکروبی بر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد در حالی که بر باسیلوس سرئوس بی تأثیر است.

شرایط محیطی رشد نیز عامل مهم دیگری است که با تأثیر بر کمیت و کیفیت ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی بر فعالیت میکروبی آنها مؤثر است (۱۱، ۱۲). مقایسه تأثیر محل رویش گیاه گزنه بر محتوای تانن و اسید آسکوربیک نشان داد که میزان ترکیبات مذکور در مناطق مختلف به‌طور بسیار معنی‌داری متفاوت است (۱۳). همچنین مطالعات نشان داده است که به‌طور کلی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان دارویی، فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها دارند که این ممکن است به حضور ترکیبات فنولیک و پلی‌فنولیک در محلول مرتبط باشد (۱۴).

در کشور ما به دلیل آلودگی میکروبی بالای شیر، عمر ماندگاری آن حدود ۲-۳ روز است، در

حالی که در سایر کشورها عمرماندگاری شیر پاستوریزه بیشتر است و از طرفی استفاده از ترکیبات شیمیایی به‌عنوان نگهدارنده در شیر ممنوع می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق ابتدا ارزیابی آزمایشگاهی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی سه گیاه دارویی آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعنای فلفلی کشت شده در مزرعه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل بر میکروبه‌های عامل فساد و بیماری‌زای شیر پاستوریزه و در مرحله بعد بررسی تأثیرگذاری عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه به‌عنوان نگهدارنده طبیعی بر ماندگاری این محصول پرمصرف بود.

مواد و روش کار

مواد اولیه: باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، باسیلوس سرئوس (ATCC 11778)، لیستریا منوسایتوتنز (ATCC 19115)، میکروکوکوس لوتئوس (CIPA 270)، و اشرشیاکلی (ATCC 10536) بودند که کشت خالص آنها از کلکسیون میکروبی مؤسسه پژوهش‌های علمی و صنعتی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی:

گیاهان آلوئه‌ورا، بابونه آلمانی و نعنای فلفلی از مزرعه گیاهان دارویی واقع در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه گردید. برای آماده‌سازی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان فوق، ژل تازه گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) و برگ‌های گیاه بابونه آلمانی (*German chamomile*) و نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) ابتدا در سایه تحت خشک کردن اولیه قرار گرفتند و پس از آن در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک گردیدند و سپس پودر شدند. ۲۰ گرم از این پودر در ۲۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌های

متانول و اتانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. مایع رویی پس از استخراج به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید و در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای استفاده‌های بعدی عصاره خشک‌شده در آب مقطر حل گردید (۱۵، ۱۶).

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی: به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان مورد آزمایش از روش چاهک پلیت^{۲۰} استفاده گردید. از تمامی باکتری‌ها در محیط نوترینت برات سوسپانسیون میکروبی تهیه و این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس سوسپانسیون فوق در محیط نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به وسیله لوپ استریل چند کلنی از باکتری‌های رشد یافته به ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل شدند، کدورت میکروبی لوله‌ها با اضافه کردن سرم فیزیولوژی با کدورت شاهد مک فارلند ۰/۵ (معادل $10^8 \times 1/5$ کلنی در میلی‌لیتر) استاندارد شد (۱۷، ۷، ۶، ۱۸).

بعد از تهیه مایه میکروبی، یک سوآپ استریل در لوله حاوی مایه میکروبی فرو برده و در سه جهت روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت شد. سپس به وسیله قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌لیتر روی محیط کشت ایجاد گردید. محلولی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان مورد آزمایش تهیه شد. به منظور حل شدن بهتر عصاره‌ها در آب مقطر استریل از توئین ۸۰ به‌عنوان کمک حلال استفاده شد و محلول تهیه شده به وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل گردید.

۰/۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده در چاهک‌ها ریخته و پلیت‌های تلقیح شده به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره‌ها به خوبی جذب محیط شوند. نهایتاً پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. در این تحقیق همچنین کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل حاوی ۱۵ درصد توئین جهت اثبات عدم تأثیر ضد میکروبی آب و توئین ۸۰ به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۱۸، ۷، ۶، ۱۹).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC^{21})، غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاهان مذکور تهیه و فعالیت ضد میکروبی آنها به روش فوق بررسی شد. پائین‌ترین غلظتی که از رشد میکروب‌ها جلوگیری کرده بود به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (۱۸، ۱۹). کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

آماده‌سازی نمونه‌های شیر حاوی عصاره: به منظور بررسی اثر نگهدارندگی عصاره‌های اتانولی بابونه آلمانی و آلوئه‌ورا بر ماندگاری شیر پاستوریزه، در ابتدا نمونه‌های شیر تحت تیمار حرارتی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه قرار گرفتند. سپس غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ درصد حجمی/حجمی عصاره‌های فوق با استفاده از فیلتر سرنگی استریل شد (اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر) و عصاره‌های به دست آمده تحت خلأ برداشت شد. در نهایت عصاره‌های استریل شده به نمونه‌های شیر حرارت دیده اضافه گردید. همچنین یک نمونه شیر فاقد عصاره به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

^{۲۱} Minimum inhibitory concentration

^{۲۰} Agar-well diffusion

میانگین صفات کمی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت (۲۳).

نتایج

قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت

مهارکنندگی: نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۱) نشان داد که میزان فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی مورد بررسی به‌طور معنی‌داری به نوع گیاه، نوع عصاره و نوع میکروب بستگی دارد ($p > 0.05$). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت ضد میکروبی و کمترین حداقل غلظت مهارکنندگی به عصاره گیاه آلوئه‌ورا تعلق داشت.

قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی آلوئه‌ورا برای باکتری‌های لیستریامنوسایتوزنز، باسیلوس سرئوس، میکروکوکوس لوتئوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی به ترتیب ۳۴، ۳۰، ۳۰، ۲۵ و ۲۲ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. در صورتی که بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی عصاره متانولی آن به ترتیب بر باکتری باسیلوس سرئوس (۲۴ میلی‌متر) و باکتری‌های میکروکوکوس لوتئوس و سودوموناس آئروژینوزا (۲۰ میلی‌متر) بود. به عبارت دیگر ترتیب حساسیت باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بسته به نوع عصاره آلوئه‌ورا متفاوت بود به‌طوری‌که لیستریامنوسایتوزنز حساس‌ترین به عصاره اتانولی و باسیلوس سرئوس حساس‌ترین به نوع متانولی این گیاه بود.

نمونه‌های شیر حاوی عصاره (۱۰۰ میلی‌لیتر) به بطری‌های پلاستیکی استریل منتقل شد و پس از دربندی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ارزیابی حسی در زمان صفر و تغییرات میکروبی در فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بر روی نمونه‌های مذکور طبق روش‌های ذیل انجام شد (۲۰).

ارزیابی حسی: ویژگی‌های حسی نمونه‌های شیر با استفاده از یک گروه ارزیاب ۱۲ نفره آموزش‌دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که آنها به ویژگی‌های مورد بررسی یعنی آروما، رنگ، مزه و قابلیت پذیرش با استفاده از سیستم نمره‌دهی هدونیک ۵ نقطه‌ای (۵ عالی)، ۴ (خوب)، ۳ (نه خوب نه بد)، ۲ (بد) و ۱ (بسیار بد) امتیاز دادند (۲۱).

آنالیز میکروبی نمونه‌های شیر حاوی عصاره:

شمارش کلی باکتری^{۲۲} نمونه‌های شیر به‌وسیله روش پور تعیین شد. ابتدا، رقت‌های سریالی (۱-۱۰ تا ۶-۱۰) از نمونه‌های شیر آماده شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده به پلیت اضافه گردید سپس محیط کشت نوترینت آگار به پلیت‌ها اضافه و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گرمخانه‌گذاری کلنی‌ها شمارش و نتایج بر اساس لگاریتم تعداد کلنی بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۲، ۲۳).

طرح آماری: این آزمایش بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه

^{۲۲} Total plate count

از فعالیت آنزیم‌های غشای سلولی نقش ضد میکروبی دارند (۲۶).

پائین‌ترین اثر ضد میکروبی گیاهان دارویی مورد بررسی برای نعناع فلفلی اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، بر خلاف عصاره‌های دو گیاه قبلی عصاره‌های گیاه مذکور در کلیه غلظت‌های مورد استفاده بر باکتری لیستریامنوسایتوژنز بی‌اثر بودند (۰ میلی‌متر). این نتایج با نتایج Bayoub و همکاران (۲۰۱۰) متفاوت بود که برای عصاره نعناع تیمیجا^{۳۰} فعالیت ضد میکروبی عالی در برابر لیستریامنوسایتوژنز در مقایسه با بابونه گزارش کردند (۲۶ در برابر ۱۵ میلی‌متر). در مطالعه‌ای که توسط معصومیان و زندی (۱۳۹۶) انجام شد عصاره هیدروالکی نعناع بر شرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا بی‌تأثیر بود در حالی که عصاره آبی آن بر شرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب هاله عدم رشد ۱۷ و ۱۵ میلی‌متری ایجاد نمود.

همان‌طور که نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد بالاترین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی به نعناع فلفلی تعلق داشت. به عنوان مثال این شاخص برای باکتری میکروکوکوس لوتئوس ۱۰۰ و برای باسیلیوس سرئوس، شرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. ابو‌حسین تبری و همکاران اثر ضعیف نعناع را بر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی گزارش کردند (۲۵).

آنالیز میکروبی نمونه‌های شیر حاوی عصاره :

نتایج آنالیز میکروبی (جدول ۲) نشان داد که بسته به نوع و غلظت عصاره اختلاف معنی‌داری در

آنترونها^{۲۵}، آنتراکوئینون^{۲۶} و لکتین‌ها^{۲۷} (۲۵) مرتبط باشد که به شدت متأثر از نوع عصاره و همچنین محیط کشت می‌باشد. عصاره اتانولی بابونه بیشترین و کمترین اثر مهارکنندگی را به ترتیب بر باکتری باسیلیوس سرئوس (۱۸ میلی‌متر) و سودوموناس آئروژینوزا (۱۳ میلی‌متر) نشان داد در حالی که عصاره متانولی آن بیشترین اثر مهارکنندگی را بر باکتری/شرشیاکلی (۱۷ میلی‌متر) و کمترین فعالیت ضد میکروبی را بر میکروکوس لوتئوس (۸ میلی‌متر) داشت. به عبارت دیگر باسیلیوس سرئوس و شرشیاکلی حساس‌ترین و میکروکوس لوتئوس و سودوموناس آئروژینوزا مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های بابونه بودند.

نتایج اتانولی بابونه در تحقیق حاضر با نتایج معصومیان و زندی (۱۳۹۶) از نظر ترتیب فعالیت ضد میکروبی مشابهت داشت. آنها اثر هاله عدم رشد عصاره هیدروالکی بابونه را بر شرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۱۳ و ۱۰ میلی‌متر اندازه‌گیری کردند، اگرچه عصاره آبی بابونه بر سودوموناس بی‌اثر بود. گزارشاتی نیز مبنی بر بی‌اثر بودن بابونه بر شرشیاکلی منتشر شده است (۵). مکانیسم فعالیت ضد میکروبی بابونه ممکن است به ترکیب بیسابولول^{۲۸} مرتبط باشد که در غلظت پائین بر میکروب‌هایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلیوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا مؤثر است و همچنین دی‌سایکلواترها^{۲۹} که فعالیت باکتریواستاتیکی در غلظت‌های بالاتر نشان می‌دهند (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). این ترکیبات با افزایش نفوذپذیری غشای سلول باکتریایی و ممانعت

^{۲۸} Bisabolol

^{۲۹} Dicycloethers

^{۳۰} Mint timija

^{۲۵} Anthrones

^{۲۶} Anthraquinones

^{۲۷} Lectins

عصاره اتانولی آلوئه‌ورا فعالیت ضد میکروبی قوی بر باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli*، لیستریا منوسایتوزنز، میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی موجود در شیر پاستوریزه دارد. از این رو افزایش شمارش کلی نمونه‌های تیمار شده با عصاره اتانولی ۰/۱۵ درصد آلوئه‌ورا در مقایسه با نمونه کنترل در تمامی طول زمان نگهداری ممکن است مربوط به تحریک رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر حرارت دیده به‌وسیله این عصاره باشد.

شمارش کلی نمونه‌های شیر در طول نگهداری وجود دارد. به‌طوری‌که نمونه‌های شیر تیمار شده با عصاره اتانولی بابونه آلمانی به‌طور معنی‌داری دارای شمارش میکروبی پایین‌تری در مقایسه با نمونه‌های حاوی عصاره آلوئه‌ورا بودند. بجز نمونه شیر حاوی ۰/۱۵ درصد عصاره آلوئه‌ورا، بقیه تیمارهای حاوی عصاره اتانولی گیاهان مورد بررسی دارای شمارش کلی کمتری در مقایسه با نمونه شاهد بودند. به عبارت دیگر غلظت ۰/۱۵ درصد عصاره آلوئه‌ورا نه تنها قادر به کاهش شمارش کلی میکروب نبود بلکه میزان آن را در مقایسه با نمونه شاهد افزایش داد. نتایج هاله عدم رشد نشان داد (جدول ۱) که

جدول ۲- تغییرات در شمارش کلی نمونه‌های شیر حرارت دیده حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و بابونه آلمانی در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ساعت

نوع گیاه	غلظت عصاره (درصد)	زمان (ساعت)				
		صفر	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
آلوئه‌ورا	۰/۱۵	۲/۴۸ ^{Ca±۰/۱}	۵/۶۴ ^{C±۰/۲}	۶/۴۳ ^{ABa±۰/۳}	۶/۷۳ ^{Aa±۰/۴}	۶/۰۲ ^{BCa±۰/۲}
	۰/۳	۲/۵۴ ^{Ca±۰/۱}	۳/۸۵ ^{Bb±۰/۲}	۴/۷۷ ^{ABc±۰/۴}	۴/۹۱ ^{Ac±۰/۴}	۴/۴۸ ^{Ab±۰/۲}
	۰/۶	۲/۷۴ ^{C±۰/۳}	۳/۵۴ ^{Bbc±۰/۱}	۴/۴۸ ^{Ac±۰/۱}	۴/۸۹ ^{Ac±۰/۱}	۴/۴۰ ^{Ab±۰/۲}
بابونه آلمانی	۰/۱۵	۲/۵۴ ^{Ca±۰/۱}	۳/۰ ^{Bcd±۰}	۳/۵۴ ^{Ad±۰/۰۵}	۲/۹۵ ^{Bd±۰/۰۷}	۰/۹۵ ^{Dc±۰}
	۰/۳	۲/۴۸ ^{Ba±۰/۰۵}	۲/۹۵ ^{Ac±۰/۰۷}	۲/۹۵ ^{Ad±۰}	۲/۰۰ ^{Ce±۰/۳}	۰/۹۵ ^{Dc±۰}
	۰/۶	۲/۳۰ ^{Aa±۰/۱}	۲/۵۴ ^{Ad±۰/۲}	۲ ^{ABc±۰/۲}	۱/۴۸ ^{BCe±۰/۴}	۰/۹۵ ^{Cc±۰}
کنترل	٪۰	۲/۴۸ ^{Ca±۰/۴}	۳/۹۰ ^{Bb±۰/۱}	۵/۶۰ ^{Ab±۰/۲}	۶/۰۰ ^{Ab±۰/۳}	۵/۴۰ ^{Ab±۰/۱}

اعداد با حروف انگلیسی بزرگ مشابه در هر سطر و حروف انگلیسی مشابه کوچک در هر ستون اختلاف معنی‌داری با هم ندارند

با افزایش غلظت عصاره اتانولی آلوئه‌ورا کاهش معنی‌داری در شمارش میکروبی مشاهده شد به‌طوری‌که نمونه‌های شیر حاوی ۰/۳ و ۰/۶ درصد آلوئه‌ورا، دارای شمارش کلی پایین‌تری در مقایسه با نمونه شاهد بودند.

بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ترکیبات فعال عصاره اتانولی آلوئه‌ورا در غلظت پائین (۰/۱۵ درصد) رشد برخی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک را تحریک می‌کند که به افزایش در شمارش کلی نمونه‌های تیمار شده منجر

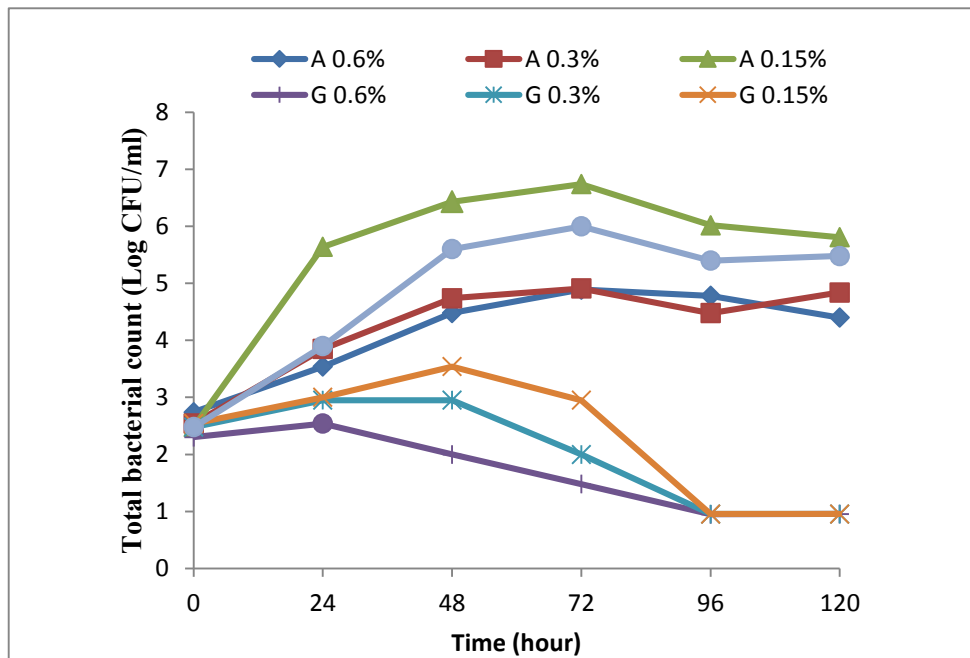
تحقیقات نشان داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبتاً به اثرات سمی ادویه‌جات و مشتقات آنها مقاومند و برخی از این ادویه‌ها اثرات تحریک‌کنندگی بر این دسته از میکروارگانیسم‌ها اعمال می‌کنند (۲۹، ۲۸، ۲۳، ۲۷).

اثر نگهداری بر تعداد باکتری‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک غنی شده با آلوئه‌ورا در ابتدا با افزایش در تعداد دو باکتری فوق‌الذکر و در ادامه با کاهش ناچیزی همراه بوده است (۱۷).

داد که اگرچه کمترین مقدار شمارش کلی (تا زمان ۷۲ ساعت) به نمونه‌های شیر حاوی ۰/۶ درصد بابونه تعلق داشت اما به‌طور کلی بر خلاف نمونه‌های شیر حاوی آلوه‌ورا اختلاف معنی‌داری در شمارش کلی بین نمونه‌های شیر حاوی غلظت‌های مختلف عصاره بابونه وجود نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که ماده مؤثره عصاره اتانولی بابونه در غلظت پائین قادر به تأثیرگذاری بر طیف وسیعی از میکروبهایی است که در شیر وجود دارد.

شده است در صورتی که با افزایش غلظت عصاره مذکور اثر ضد میکروبی آن بر میکروب‌های شیر بیشتر شده است. به‌طوری‌که نمونه‌های شیر حاوی ۰/۶ درصد عصاره آلوه‌ورا دارای کمترین شمارش میکروبی بودند.

کوسنیاتی و یانتیاتی (۲۰۰۸) گزارش کردند که یک دلیل کاهش در شمارش کلی نمونه‌های شیر حاوی ۰/۳ و ۰/۶ درصد عصاره می‌تواند به کاهش تولید باکتری‌های سایکروتروف نسبت داده شود. نتایج آنالیز میکروبی (جدول ۲) همچنین نشان



شکل ۱- تغییرات شمارش کلی نمونه‌های شیر پاستوریزه حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد و ۱۲۰ ساعت انبارداری (A, Aloe vera -G, German chamomile)

در حالی که به‌طور کلی منحنی‌های شمارش کلی تیمارهای حاوی عصاره اتانولی بابونه آلمانی از شیب کاهشی ملایمی برخوردار بودند و از زمان ۹۶ ساعت به بعد تعداد میکروب‌های آنها غیر قابل شمارش بود (شکل ۱).

نتایج مشابهی از آنالیز میکروبی نمونه‌های پنیر نرم وارا تیمار شده با عصاره کارسیا پاپایا و ترمینالیا

علاوه بر این منحنی روند تغییرات شمارش کلی و همچنین زمان تأثیرگذاری عصاره اتانولی گیاهان مورد بررسی نیز با هم متفاوت بود به‌طوری‌که منحنی‌های شمارش کلی نمونه‌های شیر حاوی عصاره آلوه‌ورا صعودی بودند و همچنین این افزایش در کلیه غلظت‌های عصاره آلوه‌ورا تا زمان ۴۸ ساعت معنی‌دار و بعد از این زمان غیر معنی‌دار بود

یافته است به طوری که نمونه‌های شیر حاوی ۰/۶ درصد از عصاره اتانولی هر دو گیاه دارای مزه تلخ، رنگ تیره و بوی نامطلوب بودند و ارزیاب‌ها آنها را با امتیاز کمتر از ۳ به عنوان نمونه‌های غیر قابل قبول معرفی نمودند. با کاهش غلظت عصاره بهبودی معنی‌داری در ویژگی‌های حسنی نمونه‌های شیر حاوی عصاره هر دو گیاه مشاهده گردید به طوری که ارزیاب‌ها، نمونه‌های حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد عصاره را از نظر ویژگی‌های حسنی مورد بررسی قابل قبول ارزیابی نمودند.

کاتاپا که تحت خلا در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بسته‌بندی شده بودند، پس از ۳ هفته انبارداری گزارش شده است (۳۱).

ارزیابی حسنی: همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد، نمونه‌های شیر حاوی عصاره‌های اتانولی گیاهان آلئوئورا و بابونه آلمانی از امتیاز حسنی کمتری در مقایسه با نمونه شاهد برخوردار بودند. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره مورد بررسی میزان رضایتمندی ارزیاب‌ها از ویژگی‌های حسنی نمونه‌های حاوی عصاره کاهش

جدول ۳- نتایج آزمون حسنی نمونه‌های شیر تیمار شده با عصاره اتانولی آلئوئورا و بابونه آلمانی در زمان صفر انبارداری

نوع گیاه	غلظت عصاره	ویژگی‌های حسنی		
		مزه	بو	رنگ
آلئوئورا	۰/۱۵	۳/۳b	۳/۶b	۳/۴b
	۰/۳	۳/۱۶b	۳/۲b	۳/۲b
	۰/۶	۳b (غ.ق.ق)	۲/۸ c (غ.ق.ق)	۲/۶c (غ.ق.ق)
بابونه آلمانی	۰/۱۵	۳/۶b	۳/۵b	۳/۴b
	۰/۳	۳/۲b	۳/۵b	۳/۴b
	۰/۶	۲/۴c (غ.ق.ق)	۲/۸c (غ.ق.ق)	۲/۳c (غ.ق.ق)
کنترل	۰	۴/۶۶a	۴/۸۳a	۴/۵a

اعداد با حروف مشابه انگلیسی برای هر ویژگی حسنی مربوط به هر یک از عصاره‌ها گیاهی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری

در پایان نتایج این تحقیق نشان داد که دو عصاره آلئوئورا و بابونه آلمانی فعالیت ضد میکروبی بر تمامی میکروبی‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل میکروبی‌هایی که عامل فساد در شیر هستند و از نظر اقتصادی و تکنولوژیکی اهمیت دارند مثل باسیلوس سرئوس، میکروکوس/لوتئوس و سودوموناس آئروژینوزا و موارد بیماری‌زا نظیر لیستریا منوسایتوژنز و اشرشیاکلی دارند.

بر اساس نتایج حاصل عصاره اتانولی بابونه آلمانی به عنوان یک ترکیب طبیعی به دست آمده از

گیاهان دارویی، پتانسیل خوبی برای استفاده به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی دارد. بر پایه ارزیابی حسنی و شمارش کلی صورت گرفته در این تحقیق تیمار شیر پاستوریزه با عصاره اتانولی بابونه آلمانی (۰/۳ و ۰/۱۵ درصد) و آلئوئورا (۰/۳ درصد) در کنار خصوصیات مفید به عنوان غذای عملگرا سبب کاهش بسیار معنی‌داری در جمعیت میکروبی، افزایش زمان ماندگاری با طعم قابل قبول در شیر پاستوریزه خواهد شد. بنابراین استفاده از عصاره‌های گیاهان مذکور به عنوان نگهدارنده در شیر پاستوریزه پیشنهاد می‌گردد.

References

- 1- **Torkar, K. G., & Teger, S. G.** The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta agriculturae Slovenica*, 2008; 92(1): 61-74.
- 2- **Valik, L., Goerner, F., & Laukova, D.** Growth dynamics of *Bacillus cereus* and shelf-life of pasteurised milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 2003-UZPI (Czech Republic).
- 3- **Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H.** Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 2004; 87: E6-E12.
- 4- **Owen, R. J., & Palombo, E. A.** Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control*, 2007; 18(5): 387-390.
- 5- **Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A & ,Soukri, A. (2010).** Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(27): 4251-4258.
- 6- **Ehsan, B., Vital, A., & Bipinraj, N.** Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Bryonopsis laciniosa* leaf, stem, fruit and seed. *African Journal of Biotechnology*, 2009; 8(15).
- 7- **Ertürk, Ö.** Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 2006; 61(3): 275-278.
- 8- **Mahesh, B., Satish, S.** Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2008; 4: 839-843.
- 9- **Farshbaf Derhami, S., Ghiami Rad, M., Mahmoudi, R., Asadi Nadari, M. R.** Comparative studies of antibacterial activity of extracts *nasturtium officinale* and *coriandrum sativum* against some of pathogenic bacteria. *Journal of Veterinary Microbiology*, 2017; 13(2): 47-55. [In Persian]
- 10- **Golshani, Z., Dawoodi, V.** In vitro study of antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* leaf extract against some pathogens. *Arak Medical University Journal*, 2013; 16(77): 82-89. [In Persian]
- 11- **Ağaoğlu, S., Dostbil, N., & Alemdar, S.** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2007; 51: 53-57.
- 12- **Ashrafpour, M., Rezaei, h., sefidgar, a., Baradaran, M., & Sharifi, H.** Survey of the Antibacterial Properties of Aqueous Ethanolic and Methanolic Extraction of *Artemisia Annu*a Around the City of Babol. *journal of ilam university of medical sciences*, 2016; 23(6): 129-141.
- 13- **Mirzaee, M., Aghdasi, M., Mianabadi, M., Khalfi, M.** Survey the amount of tannins and ascorbic acid of differnt organs of the nettle plant (*Urtica dioica* L) in Golestan province. National Conference on Medicinal Plants. Tehran, 2012; 319-323.
- 14- **Igbinosa, O., Igbinosa, E., & Aiyegoro, O.** Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *African journal of pharmacy and pharmacology*, 2009; 3(2): 058-062.
- 15- **Lawrence, R., Tripathi, P., & Jeyakumar, E.** Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from *Aloe vera*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009; 40(4): 906-915.
- 16- **Olaleye, M., & Bello-Michael, C.** Comparative antimicrobial activities of *Aloe vera* gel and leaf. *African Journal of Biotechnology*, 2005; 4(12).
- 17- **Alemdar, S., & Agaoglu, S.** Investigation of in vitro antimicrobial activity of aloe vera juice. *Journal of animal and veterinary advances*, 2009; 8(1): 99-102.
- 18- **Dildar, A., Muhammad, M., Abdul, H., Muhammad, B., & Nazia, B.** Antibacterial activity of *Ballota limbata* against potential multidrug resistant human pathogens (running head: antibacterial activity of *B. limbata* against potential Mdr pathogens). *Journal of Applied Sciences Research*(October), 2009; 1611-1614.
- 19- **Komeilizadeh, H., Hakemi vala, M., Kamalinejad, M., & Neshat ashofteh, S.** Study of Antimicrobial Effects of Organic and Aqueous Extracts of Grains of *Triticum sativum* Lam. on Gram – positive and Gram-negative Bacteria. *Journal of Medicinal Plants*, 2008; 7(28): 105-111. [In Persian]
- 20- **Adesokan, I., Abiola, O., & Ogundiya, M.** Influence of ginger on sensory properties and shelf-life of ogi, a Nigerian traditional fermented food. *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(12).
- 21- **Krumov, K., Ivanov, G., Slavchev, A., & Nenov, N.** Improving the processed cheese quality by the addition of natural spice extracts. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2010; 2(6): 335-339.
- 22- **Abid, H., Ali, J., Waqas, M., Anwar, Y., &**

Ullah, J. Microbial quality assessment study of branded and unbranded milk sold in Peshawar City, Pakistan. *Pakistan J Nut*, 2009; 8(5): 704-709.

23- Khusniati, T., & Yantyati, W. Antibacterial Effects of Aromatic Materials Produced in Indonesia on the Preservation of Skimmed and Whole Milk in Storage, 2008.

24- Takon, I. A., Ekei Victor, I., Ochegebe, O. Comparative study of the antimicrobial properties of Aloe Vera juice and gel (leaf) extracts against selected clinical isolates. *International Journal of Technical Research and Applications*, 2015; 3(6): 108-111.

25- Masoumian, M., & Zandi, M. (2017). Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*, 2017; 1(11), 9e10080. doi: 10.5812/zjrms.10080

26- Alkuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Albuhadilly, A. K., & Alwindy, S. In vitro assessment of the antibacterial activity of Matricaria chamomile alcoholic extract against pathogenic bacterial strains. *Microbiology Research Journal International*, 2015; 55-61.

27- Belewu, M., Belewu, K., & Nkwunonwo,

C. Effect of biological and chemical preservatives on the shelf life of West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*, 2005; 4(10).

28- Masibo, M., & He, Q. (2009). In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2009; 5(2): 73-80.

29- Mocanu, G. D., Botez, E., Nistor, O. V., & Andronoiu, D. G. Characterization of probiotic yoghurt obtained with medicinal plant extracts and modelling of bacteria cell growth during its production. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2011; 17: 65-71 .

30- Souza, E. L. d., Stamford, T. L. M., Lima, E. d. O., Trajano, V. N., & Barbosa Filho, J. M. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2005; 48(4): 549-558.

31- Adetunji, V. O. Comparative assessment of the effect of crude extracts of *Carica papaya* and *Terminalia cattapa*, and a bacteriocin on vacuum-packed West African soft cheese (wara). *African Journal of Microbiology Research*, 2008; 2(10): 272-276.

Survey of antibacterial activity of alcoholic extracts of *Aloe vera*, *German chamomile* and *Mentha piperita L* as natural preservative of pasteurized milk

Seyed mohammad ahmadi^{1*}, Somayeh niknia¹, Mohammad amin Miri¹, tayebeh hadadi²

1- Assistant Professor, Department of food science and Technology, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Instructor, Department of food science and Technology, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: July 10, 2020; Revise: August 15, 2020; Accept: September 20, 2020

Summary

Recently, studies have been conducted to use plant compounds as natural preservatives in foods. So, the objective of this study was first to evaluate antimicrobial activity of ethanolic and methanolic extracts of *Aloe vera*, *German chamomile* and *Mentha piperita L* cultivated in Medicinal plants farm of agricultural research institute of zabol university, against spoilage and pathogenic microorganisms associated with pasteurized milk including *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* and the next stage was to investigate the impact of ethanolic extracts of aloe vera and *German chamomile* on the shelf life of pasteurized milk. The results indicated that *Aloe vera* had the most antimicrobial activity followed by *German chamomile* and *Mentha piperita L* respectively ($P < 0.05$). In general, the ethanolic extract of studied plants was found to possess more powerful antibacterial activity than methanolic one ($P < 0.05$). Ethanolic extracts of *Aloe vera* and *German chamomile* were evaluated as natural preservatives at concentrations of 0.15, 0.3 and 0.6 (% v/v). The results revealed that the treatments of pasteurized milk with 0.3% and 0.15% of *German chamomile* and also *Aloe vera* with a concentration of 0.3% with acceptable sensory properties had a significantly lower total microbial count and longer shelf life compared to the control sample. Therefore, this study confirmed the possibility of using the extract of mentioned plants as a preservative in pasteurized milk besides its beneficial properties of a functional food.

Key words: Antibacterial activity, *Aloe vera*, *German chamomile*, Ethanolic extract, Pasteurized milk