www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۱، جلد ۱، شماره ۳، صفحات ۱۸۶-۱۷۵

JRIFST

بررسی و مقایسه اثر ترکیبات بازدارنده طبیعی در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های دوغ صنعتی با استفاده از روش سطح پاسخ

فریده طباطبایی یزدی[۱*]، سید علی مرتضوی[۲]، آرش کوچکی[۳]، شهناز افشاریان[۴]

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* نویسنده مسئول (tabatabai@ferdowsi.um.ac.ir, farideh_tabatabaee@yahoo.com)
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

امروزه استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله عصاره‌ها و پودرها در نگهداری مواد غذایی از رشد چشمگیری برخوردار است. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی عصاره و پودر گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی) در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های دوغ صنعتی بررسی شد. برای این منظور ۳ غلظت از هر عصاره (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) v/v ٪و از هر پودر (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) v/v ٪ تهیه گردید. مرگ و یا کاهش جمعیت باکتری مذکور در ۴۰ نمونه (در۳ تکرار) دوغ استریل حاوی سوسپانسیون مشخصی از سوش خالص *استافیلوکوکوس* در طی ۲۴ ساعت با استفاده از طرح رویه پاسخ بررسی شد. پس از بررسی و مقایسه نتایج اثرات عصاره و پودر ترکیبات بازدارنده طبیعی در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس* در نمونه‌های دوغ نتایج نشان داد که پودر گیاهان تیره نعناع به میزان بیشتری از عصاره گیاهان تیره نعناع بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* تأثیر دارد، فرمول بهینه پودرها برای کاهش یا مرگ باکتری پاتوژن با غلظت پودر آویشن (v/v) ۰/۰۹، نعناع (v/v) ۰/۰۶ و کاکوتی (v/v) ۰/۱۴ میزان تلقیح بدست آمد که در این شرایط بیشترین میزان کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* بعد از گذشت ۲۴ ساعت معادل عدد لگاریتمی ۱/۹۸ بود.

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۴/۲۷

واژه‌های کلیدی
آویشن
استافیلوکوکوس اورئوس
دوغ های صنعتی
کاکوتی
نعناع

مقدمه

شیر و فرآورده‌های آن دارای نقش بزرگی در تغذیه و سلامت انسان در تمام مراحل زندگی می‌باشند (Webb, 2007). دوغ نوعی نوشیدنی سنتی لبنی است که از ماست تهیه شده و اولین بار هندی‌ها آن‌را تحت نام لاسی تهیه نمودند. امروزه در برخی از کشورها از جمله ایران و ترکیه از این نوشیدنی استفاده می‌شود. دوغ را از مخلوط کردن ماست، آب، نمک و دیگر مواد افزودنی از جمله عصاره و پودر گیاهان طبیعی تهیه می‌کنند. این محصول نوشیدنی سالم و مفیدی است که تأمین کننده یک چهارم نیاز روزانه به کلسیم و حاوی ویتامین های B_{12}, B_6, B_2 است (Wikipedia, 2008).

Archive of SID
www.SID.ir

استافیلوکوکوس اورئوس[1] عامل اصلی مسمومیت غذایی *استافیلوکوکوس* و عفونت‌های خارج روده‌ای می‌باشد. انتروتوکسین این میکروارگانیسم مقاوم به حرارت است و در صورت وجود در ماده غذایی در اثر حرارت از بین نمی‌رود. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی به وسیله دوره کمون کوتاه، معمولاً بین ۲ تا ۴ ساعت مشخص می‌گردد. تهوع، استفراغ، دل پیچه، ضعف و نهایتاً اسهال علایم آن هستند. دوره کمون کوتاه در نتیجه خوردن سم از قبل تولید شده در مواد غذایی ایجاد می‌شود. رشد *استافیلوکوکوس* در مواد غذایی هیچ‌گونه تغییری در ظاهر، بو یا طعم ایجاد نمی‌کند بلکه توکسین آن در مواد غذایی ایجاد مسمومیت می‌نماید (Mortazavi et al., 2008).

آویشن، نعناع و کاکوتی گیاهانی متعلق به تیره نعناعیان می‌باشند. خصوصیات ضد عفونی کنندگی این گیاهان از دیرباز شناخته شده است، در حقیقت این گیاهان به علت داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فرار آروماتیک که برخی از آنها از عوامل مهم ایجاد کننده طعم در غذا به شمار می‌روند مورد توجه هستند. این ترکیبات فرار دارای خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی بوده و نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در مقابل بیماری‌های حاصل از میکروارگانیسم‌ها ایفا می‌کنند. بنابراین، این ترکیبات می‌توانند به صورت یک جزء عملگر، یک طعم دهنده و نیز به عنوان نگهدارنده در ماده غذایی عمل نمایند (Delaquis & Mazza, 1995; Han, 2000; Holley & Patel, 2005; Nychas, 1995; Tranter & et al., 1993).

هدف از انجام این پژوهش بررسی و مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره و پودر آویشن، نعناع و کاکوتی که گونه‌ای از گیاهان تیره نعناع می‌باشند در جلوگیری از رشد جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های دوغ استریل بوده است.

مواد و روش ها

مواد

عصاره‌ها و پودرهای آویشن، نعناع و کاکوتی از مجتمع و شرکت کشاورزی سبز ایران خریداری شد. دوغ از کارخانجات لبنی شهرک صنعتی مشهد تهیه گردید.

سوش میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1113) به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران بخش بیوتکنولوژی تهیه گردید.

جهت انجام آزمایشات از محیط کشت نوترینت آگار[2] و نوترینت براث[3] ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد.

جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه‌های میکروبی از محیط کشت مانیتول سالت آگار[4] (ساخت شرکت مرک آلمان) برای *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید.

روش ها

تهیه کشت تازه (در فاز لگاریتمی) از میکروارگانیسم

جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط کشت نوترینت براث و مانیتول سالت آگار مطابق دستور العمل کشت سطحی داده شد، تا میکروارگانیسم پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در هنگام تهیه سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی قرار داشته باشد.

تهیه نمونه‌های دوغ جهت تیمار با عصاره ها و پودرها

نمونه‌های دوغ تهیه شده جهت انجام آزمایشات میکروبیولوژی به آزمایشگاه انتقال یافتند. بعد از استریل کردن دوغ‌ها (دمای ۹۰-۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه) نمونه‌های استریل دوغ درون ۴۰ لوله ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس غلظت‌های مختلف عصاره (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) v/v و پودر (۰، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۵) v/v آویشن، نعناع و کاکوتی براساس نتایج بدست آمده از گزارشات و تحقیقات انجام شده (Bayoumi, 1992; Burt, 2003; Chachoyan & Oganesyan, 1996; Denyer & Hugo, 1991; Marino et al., 2001; Negueruela & Mata, 1986).

1- *Staphylococcus aureus*

2- Nutrient Agar(N.A)
3- Nutrient Broth(N.B)
4- Mannitol salt agar

Archive of SID
www.SID.ir

اضافه کردن عصاره و پودر به صورت امولسیون کردن هر یک از آنها با آب و به کمک توئین ۸۰ با استفاده از یک میکسر هموژنایزر (IKA-T25-digital ultra turax) به مدت یک دقیقه در پانزده هزار دور در دقیقه انجام شد.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند

سوسپانسیون استاندارد ۰/۵ مک فارلند با استفاده از اضافه کردن ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی لیتر کلرید باریم ۱/۱۷۵٪ به طور آهسته با هم زنی مداوم تهیه گردید.

کدورت ایجاد شده توسط این سوسپانسیون دانسیته سلولی تقریباً معادل $1/5\times10^{8}$ cfu/ml ایجاد می کند. سپس کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (SIGMA-3-30K) در طول موج ۶۲۵nm اندازه گیری شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه کشت مادر ۲-۱٪ از سوش میکروبی تحت شرایط استریل به ۵۰۰ml محیط کشت نوترینت براث جهت تهیه سوسپانسیون غلیظ میکروبی اضافه گردید، سپس محیط کشت به اینکوباتور ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. محیط کشت‌های نوترینت آگار و مانیتول سالت آگار به روش شیب دار[1]، در لوله‌های در پیچ داری که قبلاً استریل شده بودند تهیه شد و از محیط نوترینت براث (بعد از ایجاد کدورت) کشت سطحی به شکل زیکزاک بر روی آن‌ها کشت داده شد. محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اینکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس لوله‌ها با پارافین استریل، پر گردید و در یخچال نگهداری شدند.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره ها و پودرها با استفاده از طرح مرکب مرکزی در ۳ فاکتور در ۳ سطح

برای انجام آزمایش‌ها از طرح مرکب مرکزی در ۳ فاکتور در ۳ سطح استفاده گردید. از *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت استاندارد شده به روش مک فارلند ($10^{5}\times$ ۱) به ۴۰ لوله آزمایش درب دار حاوی نمونه‌های دوغ استریل و رقت‌های مشخص تهیه شده از عصاره‌ها و پودرهای گیاهی اضافه گردید (۱-۲٪) (جدول ۱).

افزودن سوسپانسیون میکروبی به رقت‌های عصاره‌ها و پودرهای گیاهی باعث رقیق شدن سوسپانسیون میکروبی و غلظت ماده ضد میکروبی خواهد شد که این موارد طی آماده سازی نمونه‌ها در نظر گرفته شد. پس از انجام این مراحل از لوله فاقد ماده ضد میکروبی (کنترل) ۰/۱cc با استفاده از یک اتوسمپلر بر روی سطح پلیت حاوی محیط آگار کشت سطحی داده شد تا پس از یک شب گرمخانه گذاری تعداد کلونی‌های رشد کرده شمارش شوند (Barnon & Fineg Old, 1990) این عملیات برای هر نمونه در سه تکرار به طور جداگانه انجام شد.

1- Slant

www.SID.ir

جدول ۱- مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل در سطوح مختلف

متغیر های مستقل	علائم	مقادیر کد شده واقعی		
		+۱	۰	-۱
غلظت عصاره و پودر آویشن	A	۰	۰/۰۷۵	۰/۱۵
غلظت عصاره و پودر نعناع	B	۰	۰/۰۷۵	۰/۱۵
غلظت عصاره و پودر کاکوتی	C	۰	۰/۰۷۵	۰/۱۵

طراحی آزمایشات

در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی جهت طراحی آزمایشات استفاده شد. هدف این تحقیق بهینه سازی اثرات عصاره‌ها و پودرهای طبیعی جهت کاهش جمعیت باکتری پاتوژن در نمونه‌های دوغ می‌باشد. سه پارامتر مورد بررسی شامل غلظت مختلف عصاره و پودر آویشن، نعناع و کاکوتی می‌باشند. لذا جهت بهینه‌سازی اثر عصاره‌ها و پودرهای طبیعی سه پارامتر مذکور با توجه به روش استفاده شده برای طراحی آزمایشات به عنوان متغیرهای مورد نظر و با سه سطح در مقادیر کد شده (۱+، ۰ و ۱-) و مقادیر واقعی، مطابق جدول ۱ در نظر گرفته شد.

با استفاده از روش CCD و با کمک نرم افزار Design Expert (Version 6.0.2) و سطوح غلظت در نظر گرفته شده برای هر یک از متغیرها، آزمایشات طراحی و چیدمان آنها مطابق جدول ۲ انجام شد. جدول ۲ آرایش روش CCD[1] را با ۶ تکرار در نقطه مرکزی نشان می‌دهد. میانگین درصد مقادیر بدست آمده از سه مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته می‌شود. در روش RSM[2] برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و همزمان فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد.

$$Y= \beta_0+ \beta_1x_1+ \beta_2x_2+ \beta_3x_{3+} \beta_1\beta_1x_1^2+ \beta_2\beta_2x_2^2+ \beta_3\beta_3x_3^2 + \beta_1\beta_2x_1\, x_2+ \beta_1\, \beta_3\, x_1x_3+ \beta_2\beta_3x_2x_3$$

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، $\beta_3\beta_2\beta_1$ ضرایب اثرات خطی، $\beta_3\beta_3$,$\beta_2\beta_2$,$\beta_1\beta_1$ ضرایب اثرات مربعات و $\beta_2\beta_3$,$\beta_1\beta_3$,$\beta_1\beta_2$ ضرایب اثرات متقابل هستند و جهت برازش و محاسبه ضرایب معادله لازم است که داده‌های تجربی بدست آمده با استفاده از رگرسیون و آنالیز واریانس (ANOVA) تحلیل شود. بدین منظور رگرسیون و تحلیل واریانس با استفاده از نرم افزار Design Exper (Version 6.0.2) انجام گرفت.

با توجه به شرایط تعیین شده، ۴۰ فرمولاسیون نهایی نمونه‌های دوغ با ترکیبات بازدارنده تهیه شد. به کمک ضرایب رگرسیون اثر سطوح مختلف آویشن، نعناع و کاکوتی بر روی متغیر های وابسته محاسبه شد.

1- Central Composite Design

2- Response Surface Method

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- چیدمان روشCCD برای سه متغیر مستقل

شماره آزمایش	آویشن (%v/v)	نعناع (%v/v)	کاکوتی (%v/v)	نتایج بدست آمده نمونه‌های حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ساعت(Log/ml)	نتایج بدست آمده نمونه‌های حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت (Log/ml)
۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۵/۳۱۶	۵/۱۰۹
۲	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۳/۲۶۳	۳/۲۸۲
۳	۰/۰۰	۰/۱۵	۰/۰۰	۳/۶۹۰	۳/۵۱۸
۴	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۰	۲/۸۷۸	۲/۴۵۵
۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۵	۳/۹۱۸	۲/۳۷۹
۶	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۱۵	۳/۷۱۰	۲/۰۰
۷	۰/۰۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۳/۷۹۲	۲/۶۳۰
۸	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۳/۷۷۸	۳/۳۰۳
۹	۰/۰۰	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۷۳۰	۲/۲۳۳
۱۰	۰/۱۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۲۷۰	۲/۱۰۰
۱۱	۰/۰۷۵	۰/۰۰	۰/۰۷۵	۳/۸۷۷	۲/۹۹۸
۱۲	۰/۰۷۵	۰/۱۵	۰/۰۷۵	۳/۶۶۸	۲/۳۱۸
۱۳	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۰	۳/۵۳۵	۲/۶۳۹
۱۴	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۱۵	۳/۶۶۲	۲/۱۰۰
۱۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۶۲۰	۲/۲۰۰
۱۶	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۶۴۹	۲/۲۱۰
۱۷	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۴۸۰	۲/۰۷۰
۱۸	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۴۱۰	۲/۱۰۰
۱۹	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۶۹۰	۲/۲۵۹
۲۰	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵	۳/۵۲۰	۲/۱۰۰

نتایج و بحث

تحلیل آزمایشات و مدل سازی پارامتر های موثر بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس*

مطابق آنچه در قسمت مواد و روش‌ها، همچنین قسمت طراحی آزمایشات گفته شد، آزمایشات طبق جدول طراحی شده روش CCD، با در نظر گرفتن سه متغیر عصاره‌ها و پودرهای آویشن، نعناع و کاکوتی برابر با ۴۰ آزمایش همراه با ۶ تکرار در نقطه مرکزی، برای کاهش خطا انجام گردید. جدول آزمایشات طراحی شده با توجه به متغیرهای فرض شده و نتایج بدست آمده برای کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* Log/ml مطابق جدول (۲) آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده به دنبال ارائه مدلی مناسب براساس مدل اولیه (معادله ۱) برای کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* با توجه به سه متغیر فرض شده آویشن، نعناع و کاکوتی می‌باشیم. مدل اولیه به صورت Full quadratic در نظر گرفته شد، به عبارت دیگر فرض اولیه و پیشنهادی، مؤکد بر مؤثر بودن تمامی ترم‌ها (متغیرها با توان اول، دوم و اثر متقابل متغیرها) و در نظر گرفتن آنها در مدل بود. ولی در عمل برخی از ترم‌های در نظر گرفته شده در مدل اضافی بود و باید حذف شوند لذا احتیاج به یک تحلیل آماری جهت مشخص نمودن ترم‌های مؤثر از غیر مؤثر وجود داشت. این تحلیل با استفاده از آزمون فرض و پارامتر p-value انجام می‌شود. محاسبات مربوطه توسط نرم افزار Design Expert 6.0.2 انجام شد و پس از حذف ترم‌های غیر مؤثر به جدول تحلیل آماری ۳ می‌رسیم.

www.SID.ir

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ برای تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه هـای دوغ حاوی عصاره و پودر (A: آویشن، B: نعناع و C:کاکوتی)

Source	DF	Extracts 24h		Powders 24h	
		SS	P-Value	SS	P-Value
Model	۹	۳/۶۷	۰/۰۰۰۱	۹/۵۶	۰/۰۰۰۱
Linear					
A	۱	۱/۲۶	۰/۰۰۰۱	۰/۳۰	۰/۰۰۱۶
B	۱	۰/۵۲	۰/۰۰۱۵	۰/۶۵	۰/۰۰۰۱
C	۱	۰/۰۰۱۹	۰/۷۹۶۶	۱/۲۹	۰/۰۰۰۱
Quadratic					
A^2	۱	۰/۰۰۳۹	۰/۷۱۳۳	۰/۰۰۴	۰/۶۲۹
B^2	۱	۰/۱۵	۰/۰۴۱۴	۰/۷۷	۰/۰۰۰۱
C^2	۱	۰/۰۰۴۵	۰/۶۹۲۸	۰/۱۶	۰/۰۱۰۴
Interaction					
AB	۱	۰/۲۶	۰/۰۱۲۲	۰/۹۹	۰/۰۰۰۱
AC	۱	۰/۸۷	۰/۰۰۰۲	۰/۶۰	۰/۰۰۰۱
BC	۱	۰/۴۸	۰/۰۰۲۰	۳/۰۹	۰/۰۰۰۱
Residual	۱۰	۰/۲۸		۰/۱۶	
Lack of fit	۵	۰/۲۲	۰/۰۸۹۱	۰/۱۳	۰/۰۶۰۹
Pure error	۵	۰/۰۵۹		۰/۰۲۹	
Total	۱۹	۳/۹۵		۹/۷۳	

در جدول ۳، DF[1]: به معنای درجه آزادی، SS[2]: به معنـای مجمـوع مربعـات و P-Valve مقـادیر عـددی تعیین کننده در پذیرش یا رد فرض آماری مورد نظـر می‌باشند. مهم ترین قسمت در جدول تحلیـل آمـاری در بخش آنالیز واریانس، پارامتری به نام آزمون ضـعف برازش[3] می‌باشد. ایـن پـارامتر نشـان دهنـده مناسـب بودن یا نامناسب بودن مدل می‌باشد. مقدار P پـارامتر ضعف برازش بـرای کـاهش جمعیـت بـاکتری پـاتوژن مذکور در نمونه‌های دوغ حاوی عصاره و پودر در زمان ۲۴ ساعت به ترتیـب برابـر P =۰/۰۸۹۱، P=۰/۰۶۰۹ بدست آمد، که بیـانگر ایـن اسـت کـه آزمـون ضـعف برازش مربوط به مـدل بـرازش یافتـه (چنـد جملـه‌ای درجه دوم) بر پاسـخ معنـی دار نبـود. بنـابراین، مـدل توانسته به خوبی بر داده‌های مورد بررسی برازش شود.

نتایج آنالیز آمـاری در جـدول ۳ نشـان داده شـده است. همانطور که مشاهده می‌گـردد، عبـارت‌هـایی از مدل که در آزمون عصاره بعد از ۲۴ سـاعت معنـی دار بودنـد شـامل عبـارت خطـی آویشـن (p<۰/۰۰۰۱) و نعناع (p<۰/۰۱)، عبارت درجه دوم نعناع (p<۰/۰۵) و عبارات برهم کنش آویشن، نعناع (p<۰/۰۵) و آویشن، کـاکوتی (p<۰/۰۰۱) و نعنـاع، کـاکوتی (p<۰/۰۱) می‌باشند و از آنجایی که عبارت خطی کاکوتی و روابط درجه دوم آویشن، کـاکوتی معنـی دار نبـوده از مـدل حذف شدند. همچنـین براسـاس SS بیشـترین تـأثیر مربوط به عصاره آویشن می‌باشد.

همچنین عبارت‌هایی از مدل که در آزمون پودر بعد از ۲۴ ساعت معنی دار بودند شامل عبارات خطی آویشن (p<۰/۰۱)، نعناع و کاکوتی (p<۰/۰۰۰۱) و روابط درجه دوم نعناع (p<۰/۰۰۰۱) و کاکوتی (p<۰/۰۵) و تمامی عبارات بر هم کنش می‌باشند (p<۰/۰۰۰۱). از آنجایی که عبارت درجه دوم آویشن معنی دار نبوده از مدل حذف شد. در بین متغیرها، اثر همزمان نعناع، کاکوتی به علت داشتن مقدار بالاتر SS، اثر بیشتری روی مدل داشتند.

1- DF: Degrees of Freedom
2- SS: Sum of Square
3- Lack of fit

www.SID.ir

برای اینکه مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است که R^2 adjusted دارای بالاترین مقدار باشد؛ ضریب تبیین (R^2) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه‌ی تناسب برازش می‌باشد. بنابراین هر چه مقدار R^2 به یک نزدیک تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرات مستقل بیشتر می‌باشد. Beatriz و همکاران (۲۰۰۵) چنین عنوان کردند که برای یک مدل با برازش خوب، مقدار R^2 بایستی حداقل ۰/۸ باشد. همچنین ضریب تغییرات (CV) نیز بیانگر خطاها در انجام آزمایشات است و هر چه این عدد پایین تر باشد دقت آزمایش را نشان می‌دهد.

جدول ۴- پارامترهای آماری بدست آمده برای کاهش جمعیت استافیلوکوکوس

پارامترهای آماری	Extracts 24h	Powders 24h
R^2	۰/۹۲۹۹	۰/۹۸۳۳
Adj-R^2	۰/۸۶۶۸	۰/۹۶۸۳
CV	۳/۹۰	۴/۹۹

با به کارگیری روش آماری سطح پاسخ، معادله‌های زیر نشان دهنده‌ی ارتباط مقادیر ضرایب واقعی حاصل از آزمایشات با متغیرهای آزمایش آورده شده است:

$$Y(2) = +5.11224-10.51490X_1-14.94254X_2+41.73241x_2^2+31.90283X_1X_2+58.69924X_1X_3+43.36794X_2X_3$$

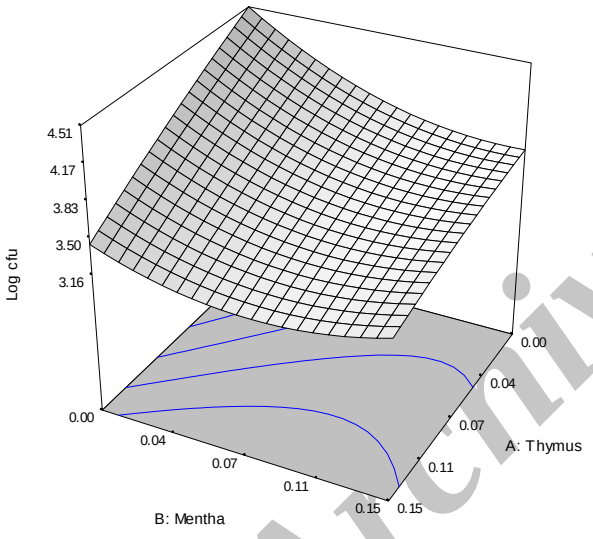
معادله (۲) نشان دهنده ارتباط مقادیر ضریب واقعی حاصل از آزمایش بعد از گذشت ۲۴ ساعت در نمونه‌های حاوی عصاره است.

$$Y(3)= +4.98830-11.66669X_1-30.50602\ X_2-23.15609X_3+94.23741X_2^2+42.93059X_3^2+62.57406X_1X_2+48.56372X_1X_3+110.48961X_2X_3$$

معادله ۳ نشان دهنده ارتباط مقادیر ضریب واقعی حاصل از آزمایش بعد از گذشت ۲۴ ساعت در نمونه‌های حاوی پودر می‌باشد.

نمودارهای سه بعدی[1]

این نمودارها میزان کاهش جمعیت استافیلوکوکوس را در برابر متغیرها به صورت سه بعدی نشان می‌دهد. این اشکال فضایی با استفاده از نقاط آزمایش شده و همچنین درون یابی سایر نقاط با استفاده از مدل محاسباتی صورت می‌گیرد. در شکل‌های ۴ و ۱ نمودار سه بعدی اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع، شکل ۵ و ۲ اثر همزمان آویشن- کاکوتی و شکل ۶ و ۳ اثر همزمان نعناع- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه‌های دوغ حاوی عصاره و پودر نشان داده شده است.

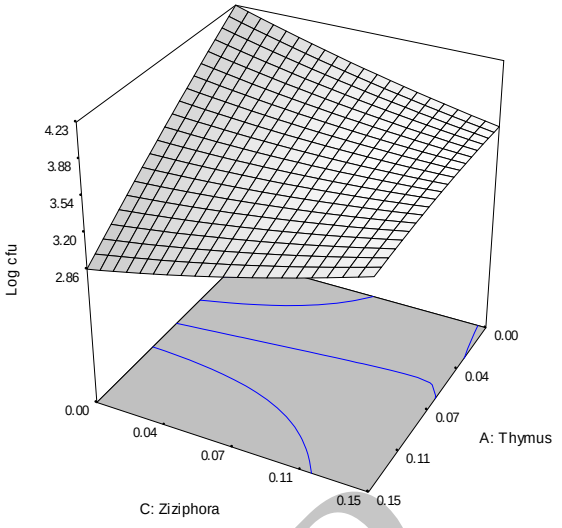


شکل ۱- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت

بر این اساس در شکل ۱ قابل ملاحظه است که با افزایش غلظت عصاره آویشن، در تمامی غلظت های عصاره نعناع جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صورت خطی کاهش یافت.

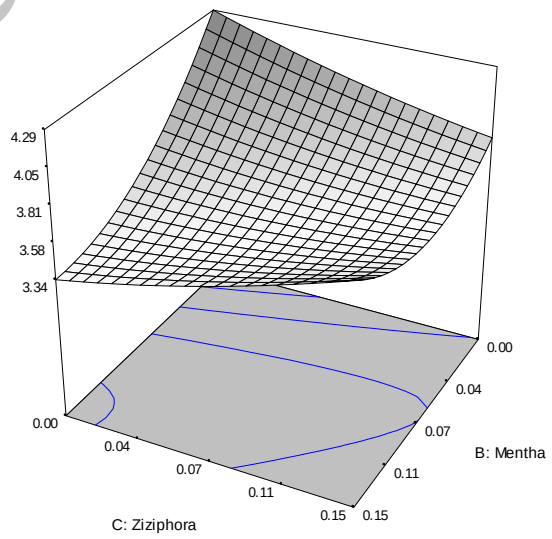
1- 3D- Surface

Archive of SID
www.SID.ir



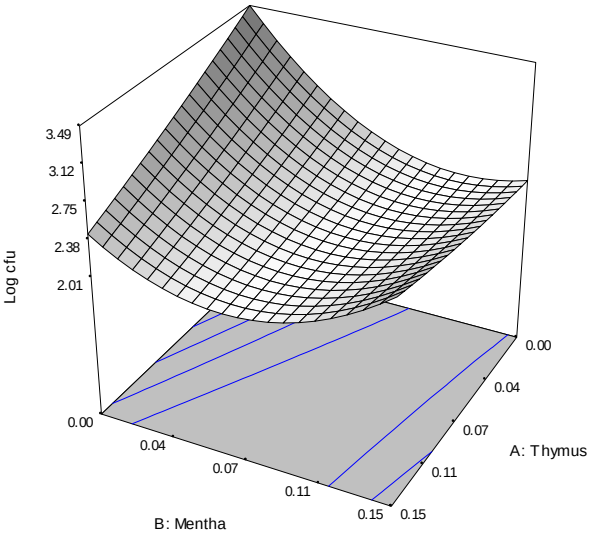
شکل ۲- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت

در شکل ۲ قابل ملاحظه است که با افزایش غلظت عصاره آویشن، در تمامی غلظت های عصاره کاکوتی جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صورت خطی کاهش یافت. با توجه به معنی داری اثر خطی آویشن ($p<۰/۰۰۰۱$) می توان روند کاهش خطی را در شکل مشاهده کرد.



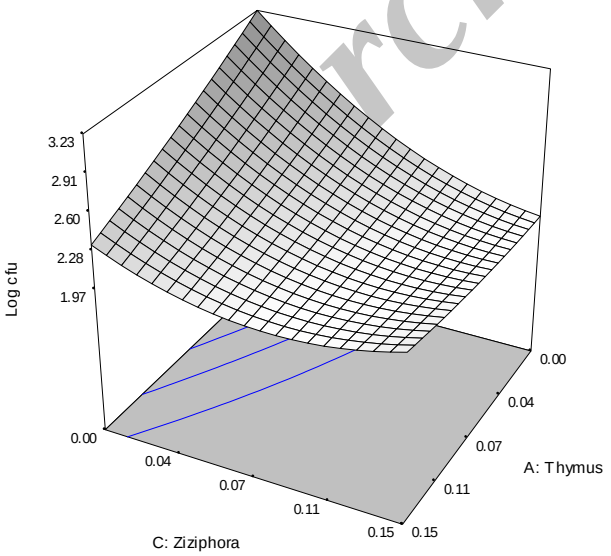
شکل ۳- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر نعناع- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت

از میان شرایطی که بر روی کاهش استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی عصاره بعد از ۲۴ ساعت موثر بود، مشخص شد که کاهش استافیلوکوکوس اورئوس، از عصاره آویشن، نعناع تأثیر می‌پذیرد. جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت عصاره آویشن نسبت معکوس داشت، یعنی با افزایش غلظت جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس کاهش یافت.



شکل ۴- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- نعناع بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت

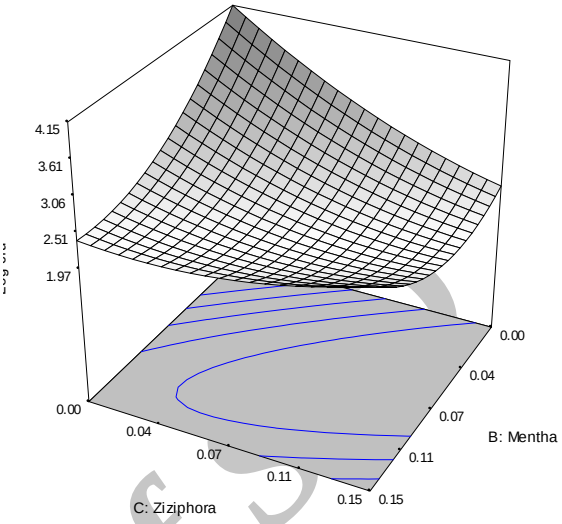
همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت پودر نعناع، در غلظت ۰ پودر آویشن، جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس به صورت نمایی کاهش یافت. با توجه به معنی دار بودن اثر نمایی نعناع ($p<۰/۰۰۰۱$) می‌توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد.



شکل ۵- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر آویشن- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت

www.SID.ir

در شکل ۵ قابل ملاحظه است که با افزایش پودر آویشن، در تمامی غلظت‌های پودر کاکوتی جمعیت استافیلوکوکوس به صورت خطی کاهش یافت. با توجه به معنی داری اثر خطی آویشن ($p<۰/۰۱$) می توان روند کاهش خطی را در شکل مشاهده کرد.



شکل ۶- نمایش نمودار سه بعدی؛ اثر همزمان دو متغیر نعناع- کاکوتی بر تغییرات جمعیت استافیلوکوکوس در نمونه های دوغ حاوی پودر بعد از گذشت ۲۴ ساعت

با توجه به شکل در پی افزودن پودر کاکوتی در غلظت‌های پایین پودر نعناع جمعیت *استافیلوکوکوس* به صورت نمایی پایین می‌رود. با توجه به معنی‌داری اثر نمایی کاکوتی می‌توان روند کاهش نمایی را در شکل مشاهده کرد ($p<۰/۰۰۰۱$).

از میان شرایطی که بر روی کاهش استافیلوکوکوس در نمونه‌های دوغ حاوی پودر بعد از ۲۴ ساعت مؤثر بود، مشخص شد که کاهش *استافیلوکوکوس*، از پودرهای آویشن، نعناع و کاکوتی تأثیر می‌پذیرد، به طوری که پودر کاکوتی به میزان بیشتری از پودر نعناع بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس* تأثیر داشت و پودر آویشن نسبت به دو فاکتور دیگر تأثیر کمتری بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس داشت. جمعیت استافیلوکوکوس با غلظت پودر کاکوتی نسبت معکوس داشت.

آخوند زاده و همکاران (۲۰۰۷) اثرات متقابل آویشن، PH و دما بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* را مورد بررسی قرار دادند. از مقادیر متفاوت آویشن (۰، ۰/۰۱۸، ۰/۰۳و ۰/۰۶ درصد)، PH (۷/۳ و ۶) و دمای متفاوت نگهداری (۱۵،۲۵ و ۳۵) استفاده شد. نتایج مشاهده شده در این مطالعه، اثرات معنی داری از ترکیب اسانس روغنی، PH و دما بر عدم رشد *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد.

فاضلی و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت ضد میکروبی سماق ایرانی و آویشن شیرازی بر بعضی از باکتری‌های عامل فساد غذایی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد هر دو ادویه معروف ایرانی که به طور سنتی به عنوان عامل قابض و طعم دهنده تند به کار می‌رود اثرات بازدارندگی بر باکتری عامل فساد غذایی نشان می‌دهند و می‌توانند به عنوان افزودنی طبیعی غذایی مورد توجه قرار گیرند.

برومند و همکاران (۱۳۸۷) بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی O157:H7*، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین و *سالمونلا تیفی موریوم* مقاوم‌ترین باکتری به هر دو اسانس بودند.

Simsek و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تعداد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتو باسیلوس بولگاریکوس* در نمونه‌های دوغ محلی ترکیه تولید شده با ادویه های نعناع، آویشن و سیر و نمونه شاهد در طول زمان نگهداری به صورت معنی داری کاهش یافت ولی اثر ادویه‌های مذکور روی تعداد باکتری‌های آغازگر در مقایسه با نمونه شاهد معنی دار نبود.

نتیجه گیری

پس از بررسی نتایج اثر عصاره‌ها و پودرهای طبیعی در نمونه‌های دوغ مشخص شد که پودر گیاهان تیره نعناع در غلظت‌های به کار رفته در این آزمایش به میزان بیشتری از عصاره گیاهان تیره نعناع بر کاهش جمعیت *استافیلوکوکس* تأثیر داشت، فرمول بهینه پودرها برای کاهش یا مرگ باکتری پاتوژن با غلظت پودر آویشن (v/v) ۰/۰۹، نعناع (v/v) ۰/۰۶ و کاکوتی (v/v) ۰/۱۴ میزان تلقیح بدست آمده است که

Archive of SID
www.SID.ir

در ایـن شـرایط بیشـترین میـزان کـاهش جمعیـت *استافیلوکوکوس* بعـد از گذشـت ۲۴ سـاعت Log/ml ۱/۹۸ می‌باشـد. اثـر خـوب بـاکتری کشـی پودرهـا را مـی‌تـوان بـه ترکیبـات تیمـول و کـارواکرول مربـوط دانست، این ترکیبات در طبیعت بـه صـورت فنولیـک هستند مطالعات بر روی مکانیسم فنولیک بیان کننده این مطلب می‌باشد کـه ایـن ترکیبـات بـر روی غشـاء سـلولی تـأثیر مـی‌گذارنـد و نفـوذ پـذیری را مختـل می‌کنند، سپس منجر به اختلال فعالیت غشاء سـلولی در پذیرش انتقال الکترونی، برداشت مواد مغذی، سنتز اسید نوکلئیک و ATPase می‌شوند. این نتیجه مشـابه نتایج محققین دیگـر مـی‌باشـد (Denyer & Hugo, 1991; Simonetti, 1991; Negueruela & Mata, 1986).

منابع

۱- آخوندزاده بستی، ا.، میثاقی، ع.، موسوی، م. ح.، زهرایی صالحی، ت. و کریم، گ. (۱۳۸۶). اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ تجارتی، فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۲۲، ص ۹۸-۹۱.

۲- برومند، ع.، حامدی، م.، امام جمعه، ز.، رضوی، ه. و گلمکانی، ت. (۱۳۸۷). بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذرهای شوید و گشنیز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی *O157:H7*، سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از آزمایش حساسیت رقت در محیط مایع، فصلنامه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد۴ شماره ۱، ص۶۹-۵۹.

3- Bayoumi, S.1992. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of youghurt. Chemie – Microbiologie- Technology- der-LebenSmittel. 14 (1/2): 21-26.

4- Barnon, E.J. & Fineg Old, S.M. 1990. Method for testing antimicrobial effectiveness. in: diagnostic microbiology, 8th ed. The Mosby Company. pp, 172-184.

5- Beatriz, H. Benrnal, S. Calle, J., Elcy, Q., Pinzon, R. & Velasa/quez, P. 2005. Inulin from tubers of Dahlia imperialis Roetz Revista Colombiana de Ciencias Quimico Farmaceuticas 34 (2): 122-125.

6- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potentiona applications in foods, a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

7- Chachoyan, A. A. & Oganesyan, G. B. 1996. Antitumor activity of some spices of the family lamiaceae. Rastitelnye Resursy, 32 (4):59-64.

8- Delaquis, P.J. and Mazza, G. (1995). Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. J. Food Technology, 49(11):73-84

9- Denyer, S.P., & Hugo, W. B. 1991. Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In S.P. Denyer & W.B. Hugo, Mechanisms of action of chemical biocides; their study and exploitation (pp. 171-188). The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication.

10- Fazeli, M. R., Armin, G.h., Ahmadian Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H. & Samadi, N. 2007. Antimicrobial activites of Iranian sumac and avishane Shirazi against some food born bacteria. Food Control, 18: 646-649.

11-Han, G.H. 2000. Antimicrobial food packaging .Journal of Food Technology, 54 (3): 56-65.

12- Holley, R. A. & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbilogy, 22: 273-292.

13- Marino, M., Barsani, C. & Comi, G. 2001. Impedence measurments of study the antimicrobial activity of essential oil from lamiaceae and compositae. International Journal of Food Microbiology, 67:187-195.

14- Mortazavi, A., Zirgani, L. & Tabatabaie yazdi, F. 2009. Applied food microbiology practical and laboratory. Ferdowsi Univercity of Mashhad Publication. 218-227.

15- Negueruela, A. V. & Mata, R.M. 1986. The volatile oil of ziziphora hispanica. Flavour and Fragnance Journal, 1 (3): 111-113.

16- Nychas, G.J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In G. W. Gould, New methods of food preservation (pp. 58-89). London: Blackie Academic Professional.

Archive of SID
www.SID.ir

17- Simonetti, G. 1991. The acDonald encyclopedia of herbs and spices. Macdonald and Co. (Pub). Ltd. London, pp.255.
18- Simsek, B., Sagdic, O., & Ozcelik, S. 2007. Survival of e*scherichia coli* O157:H7 during the storage of ayran produced with different spices. Journal of Food Engineering, 79 (2): 679-680.
19-Tranter, H. S., Tassou, C.C. & Nychas, G.J. 1993. The effect of the olive phenolic compounds, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by Staphylococcus aureus. Journal of Applied Bacterialogy, 74: 253-260.
20- Webb H. By products from milk. The A VI pub Co. 1970: pp: 34-6.
21- Wikipedia, Ayran, http:// en. Wikipedia. Org/ wiki/ Ayran (retrieved on 8012, 2008).

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation and comparison of effects of natural composition inhibitory *Staphylococcus aureus* in industrial Doogh samples with response surface method (RSM)

F. Tabatabaie yazdi[1]*, A. Mortazavi[2], A. koochaki[3], S. Afsharian[4]

1- Associate professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
* Corresponding author (tabatabai@ferdowsi.um.ac.ir, farideh_tabatabaee@yahoo.com)
2- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
3- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
4- BSc. of Food Science, Microbiology laboratory, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

In recent years, the uses of natural antimicrobial compounds, including extracts and herbal powders as preservative compound of the food are increasingly popular. The aim of the study was to evaluate antimicrobial effect of extract and powder of *lamiaceae* plants (*thymus vulgaris L.*, Mentha spp. and Ziziphora tenuir L.) over prevention of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*) growth by examining industrial Doogh samples. For this purpose, three extracts contained (0, 0.075, 0.15 v/v) and powder contained (0, 0.075, 0.15 v/v) were prepared. Bacterial population decrease or survival in doogh samples were examined according to *Staphylococcus* pure strains in a 24 hours time within separate rounds by measuring the kinetics of bactericidal effects, using response surface design. Analysis Results in the inhibition effects of natural antibiotic agent in the Doogh samples revealed that: the powder of Lamiaceae family have greater effects on decreasing population of *Staphylococcus* than extracts. The best amounts of powder for decreasing pathogenic bacterial population were as flowing, Thymus 0.09 (v/v), Mentha 0.06 (v/v), and Ziziphora 0.14(v/v). In these circumstances greatest reduction of *Staphylococcus* population in 24 h is 1.98 Log/ml.

Keywords: Industrial doogh; Natural inhibitor compounds; Mentha spp.; *Staphylococcus aureus*;. *Thymus vulgaris* L.; *Ziziphora tenuir* L.

Archive of SID

www.SID.ir