Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال یازدهم، شماره 4، زمستان 1395، صفحات 88-81**

# اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو علیه *ساکارومایسس سرویزیه*، *باسیلوس لچنی فرمیس* و *آسپرژیلوس نایجر* در شیره خرما

مهدی عزیزی شفا[1]، صباح قدیمی[2]، علی حشمتی[3,4]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
2- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
3- نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران پست الکترونیکی: a.hesmati@umsha.ac.ir
4- استادیار گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: 95/4/8 تاریخ پذیرش: 95/7/13

## چکیده

**سابقه و هدف:** شیره خرما از محصولات مغذی خرما است که تولید آن رو به افزایش است. یکی از مشکلات تولید آن فساد میکروبی است. هدف این مطالعه تعیین تأثیر عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست گردو بر *ساکارومایسس سرویزیه*، *باسیلوس لچنی فرمیس* و *آسپرژیلوس نایجر* در شیره خرما بررسی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** عصاره متانولی و اتانولی برگ و پوست گردو تهیه و اثر ضد میکروبی به روش چاهک – دیفیوژن، حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و کشندگی (MBC/MFC) با روش ماکرودیلوشن علیه *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* انجام گرفت. تأثیر عصاره‌ها بر رشد میکروب‌های مذکور در مدت چهارده روز ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** قطر هاله عدم رشد متناسب با غلظت عصاره بود. MIC (MBC) عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست ضد *ساکارومایسس سرویزیه* 15/625 (31/25) میکروگرم/میلی‌لیتر بود. مقدارMIC (MBC) عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست گردو علیه *باسیلوس لچنی‌فرمیس* به ترتیب 31/25(62/5)، 15/625 (31/25)، 15/625 (31/25) و 31/25 (62/5) میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد.MIC (MBC) عصاره اتانولی برگ، اتانولی و متانولی پوست علیه *آسپرژیلوس نایجر* 250(500) میکروگرم/میلی‌لیتر بودند. در شیره خرما، عصاره برگ و پوست بعد از 24 ساعت مانع رشد *ساکارومایسس سرویزیه* و *باسیلوس لچنی فرمیس* شد اما تا روز چهاردهم فقط قادر بود رشد آسپرژیلوس را کند نماید.

**نتیجه گیری:** عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست گردو علیه *ساکارومایسس سرویزیه*، *باسیلوس لچنی‌فرمیس* و *آسپرژیلوس نایجر* و در شیره خرما مؤثر است و می‌تواند در کنترل فساد و افزایش عمر نگهداری آن بکار رود.

**واژگان کلیدی:** برگ گردو، پوست سبز میوه گردو، شیره خرما، *ساکارومیس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر*، *باسیلوس لچنی فرمیس*

## • مقدمه

خرما از محصولات باغی سازگار با شرایط آب و هوایی منطقه خاورمیانه است که ارزش غذایی بالا و فراورده‌های غذایی متعددی دارد. خرما میوه‌ای غنی از مواد معدنی نظیر آهن، پتاسیم، منگنز، روی و حاوی ویتامین‌هایی چون C، A،B است. کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه نیز به وفور در آن یافت می‌شود(1). شیره خرما فرآورده‌ای است که به روش‌های صنعتی به کمک آب و اعمال حرارت بر مواد جامد محلول در آب میوه کاملاً رسیده از ارقام خرمای درجه 2 و 3 به دست می‌آید (2). خرما و شیره حاصل از آن یکی از اقلام اقتصادی در امر صادرات برخی از کشورهای خاورمیانه به حساب آمده و طبق گزارش‌هایFAO کشور ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان خرما در دنیا می‌باشد (3). طی سالیان اخیر تولید شیره خرما رشد روزافزودنی داشته است. با این حال یکی از بزرگترین مشکلات تولید این محصول فساد آن می-

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

باشد. براساس تحقیقات انجام گرفته مهم‌ترین عامل فساد خرما و فرآورده‌های حاصل از آن مخمرهای اسموفیل نظیر *ساکارومایسس سرویزیه*، کپک‌های مولد فساد مانند آسپرژیلوس نایجر و باکترهای *باسیلوس* به‌ویژه *باسیلوس لچنی فرمیس* (*Bacillus Licheniformis*) است (6-4). *باسیلوس لچنی فورمیس* به طور گسترده در خاک پراکنده است به دلیل رشد در بازه دمایی گسترده‌ای که دارد می‌تواند در تمام نقاط بدن مانند پوست و روده تشکیل کلنی می‌دهد. هرچند این باکتری برای انسان بیماری‌زا نیست اما افراد با نقص سیستم ایمنی (immunosuppressed) و در زمان تروما می‌تواند باعث عفونت شود (7).

استفاده از فرایند حرارتی برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های مذکور در شیره خرما به علت تغییر ویژگی‌های حسی محصول و کاهش مشتری پسندی آن دارای محدودیت می‌باشد لذا کنترل رشد این میکراورگانیسم‌ها یکی از مهم‌ترین مشکلات تولید این محصول می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها باعث ترش شدن محصول و کاهش شدید کیفیت آن می‌گردند (8).

امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی نظیر اسانس و عصاره‌های گیاهی برای کنترل رشد میکراورگانیسم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیبات به علت طبیعی بودن فاقد سمیت بوده یا سمیت آن‌ها در مقایسه با ترکیبات نگه‌دارنده سنتزی خیلی کمتر می‌باشد(9). مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف روی باکتری‌های بیماری‌زای با منشأ غذایی در محیط کشت و غذا انجام شده است (11-9).

گردو از گروه خانواده گیاهی *Juglandaceae* دارای 21 گونه می‌باشد که همگی خزان دار و دارای میوه خوراکی هستند (12)، از برگ و پوست میوه درخت گردو در طب سنتی برای اثرات دارویی گوناگون و مفیدی که دارد مثل داروی قابض و تجزیه کننده بافت‌های شاخی، ضد اسهال و ضد کرم پهن و تصفیه‌کننده مقوی، ضد قارچ و کاهش دهنده قند خون و غیره استفاده می‌کنند (13). برگ گردو دارای ترکیبات با خاصیت ضد قارچی است. پوسته سبز میوه گردو دارای ترکیب‌ها و اثراتی مشابه با برگ است. فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ و پوست سبز میوه گردو روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین قارچ‌های *میکرو سپوروم کانیس*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس*، *اپیدرمو فایتون فلوکوزوم*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* اثبات شده است (16-14). ژوگلون ترکیبی نفت وکینونی است که در برگ تازه و پوست سبز میوه گردو یافت می‌شود و مهم‌ترین ترکیب ضد میکروبی گردو می‌باشد. ژوگلون پیش ساز اکسی تترا سایکلین است (13). تاکنون اثر عصاره و اسانس برگ و پوست سبز میوه گردو روی *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* بررسی نشده است. هدف از این مطالعه تعیین تأثیر عصاره اتانولی و متانولی پوست سبز میوه و برگ گردو روی کنترل رشد میکراورگانیسم‌های مذکور در شیر خرما می‌باشد.

## • مواد و روش‌ها

**نمونه:** شیره خرما از سطح بازار بوشهر تهیه گردید. برگ و پوست سبز میوه گردو از باغات استان کردستان تهیه شد.

**مواد شیمیایی مصرفی:** محیط کشت و مواد شیمیایی مصرفی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد.

**تهیه عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو:** نمونه برگ و پوست سبز میوه جمع‌آوری شده روی یک پارچه تمیز در شرایط مناسب در سایه خشک و آسیاب شد. 200 گرم از پودرهای حاصل در یک ارلن مایر 2000 میلی‌لیتری ریخته شد و 1000 میلی‌لیتری اتانول یا متانول به آن اضافه گردید. مخلوط مذکور به مدت 24 ساعت در دمای اتاق نگهداری و هر چند ساعت یک بار هم زده شد. پس از آن توسط کاغذ صافی استریل و عصاره حاصل و پودر از هم جدا گردید. ذرات باقیمانده موجود در عصاره، با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار (2500rpm) در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه جدا شد. با استفاده از دستگاه روتاری تحت خلأ، حلال عصاره‌ها جدا گردید. عصاره به دست آمده تبدیل به پودر و در شیشه‌های تیره و دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در زمان آزمایشات، از عصاره‌ها رقت‌های 500- 31/25 میکروگرم/میلی‌لیتر در محیط کشت خاص هر میکروب تهیه گردید و پس از عبور از صافی 0/45 میکرون مورد استفاده قرار گرفتند.

***تهیه آسپرژیلوس نایجر و ساکارومایسس سرویزیه و باسیلوس لچنی فرمیس:*** در این تحقیق *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* از شیره خرما جداسازی و گونه‌های آن‌ها با روش‌های زیر تأیید شد. از کلنی‌های *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* به محیط سابرود دکستروز براث و کلنی *باسیلوس لچنی فرمیس* در محیط مولر هینتون براث اضافه شد تا سوسپانسیونی به دست آید که کدورت آن‌ها برابر با استاندارد نیم مک فارلند

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

شود و از سوسپانسیون حاصل برای تعیین MIC و MBC و تلقیح به شیره خرما استفاده شد.

**جداسازی و شناسایی *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه*:** ابتدا شیره خرما با افزودن پپتون واتر حاوی 20% تا 35% گلوکز رقیق شد. پس از آن 1 میلی‌لیتر از نمونه رقیق شده به محیط کشت سابرود دکستروز براث جهت غنی‌سازی منتقل گردید و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 تا 5 روز در گرم‌خانه‌گذاری شد. یک میلی‌لیتر از نمونه غنی‌شده به محیط کشت دی کلران رزبنگال کلرامفنیکل آگار (DRBC ) و یک میلی‌لیتر به محیط مخمر گلوکز کلرامفنیگل اگار (YGC) اضافه و به شکل کشت عمقی کشت داده شد. سپس گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌های حاصل در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 تا 7 روز صورت گرفت. در این محیط‌ها *آسپرژیلوس نایجر* کلنی سیاه رنگ با کونیدیوفور تیره و وزیکول‌های گرد دارد (17) و مخمر ساکارومایسس سروزیه فاقد اندام تولید مثل، دارای جوانه زنی دو قطبی و کلنی‌های سفید رنگ بوده که از نظر تست مقاومت به اسید استیک، اسموتولرانسی و تخمیر قند مثبت و تست اوره آز و احیای نیترات منفی می‌باشند (19، 18).

**جداسازی و شناسایی *باسیلوس لچنی فرمیس*:** یک میلی‌لیتر از شیره خرما رقیق شده در داخل پلیت سترون خالی ریخته شد و سپس 15 میلی‌لیتر محیط اورنج سرم آگار (OSA) اضافه گردید و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 تا 72 ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد کلنی‌های حاصل بعد از تأیید به‌وسیله آزمون احیا نیترات و تجزیه نشاسته به‌عنوان باکتری *باسیلوس لچنی فرمیس* شمارش شدند (20) از کلنی‌ها حاصل برای تهیه رقت نیم مک فارلند استفاده شد.

**تعیین خاصیت ضد قارچی و باکتریایی عصاره به روش انتشار چاهکی:** روی محیط کشت سابرود دکستروز آگار (برای *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه*) و OSA (برای *باسیلوس لچنی فرمیس*) 4 چاهک با قطر 5 میلی‌متر ایجاد شد. سپس از سوسپانسیون میکروبی 0/5 مک فارلند توسط سواپ روی این محیط‌ها کشت گردید. پس از آن 80 میکرولیتر از رقت‌های 500- 31/25 میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت 72 ساعت در انکوباتور 25 (برای کپک و مخمر) و 37 درجه سانتی‌گراد (برای باکتری) نگهداری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

**تعیین خاصیت ضد قارچی و باکتریایی عصاره به روش رقیق‌سازی در لوله (Macrodilution):** رقت‌های 500- 31/25 میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره در محیط سابرود دکسترو براث (برای *آسپرژیلوس نایجر* و *ساکارومایسس سرویزیه*) و مولر هینتون براث (برای *باسیلوس لچنی فرمیس*) تهیه شد. 9 میلی‌لیتر از این محیط‌ها در لوله آزمایش ریخته شد و به آن 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) هر عصاره روی میکروب‌های جدا شده به روش چشمی (فقدان کدورت) تعیین گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتریایی یا قارچی (MBC/MFC) مقدار 100 میکرولیتر از هرکدام از لوله‌هایی که رشدی در آن مشاهده نشده بود، به محیط SDAوDRBC برای کپک و مخمر یا OSA برای باکتری اضافه گردید. کم‌ترین غلظت که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان MBC منظور گردید.

**تیمار شیره خرما توسط عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو:** ابتدا شیره خرما استریل گردید (121 درجه سانتی‌گراد به مدت یک 10 دقیقه). از رقت نیم مک فارلند *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* در شیره خرما (یک میلی‌لیتر میکروب در 100 میلی‌لیتر شیره خرما) تلقیح شد. سپس عصاره‌های اتانولی و متانولی در مقادیر MBC و MFC اضافه گردید. نمونه‌های تیمار شده به حجم 20 میلی‌لیتر در شیشه‌های سترون تقسیم شد. نمونه حاوی *آسپرژیلوس یا ساکارومایسس* در دمای 25 درجه سلسیوس و نمونه حاوی *باسیلوس* در دمای 30 درجه سلسیوس قرار گرفت. هم زمان نمونه شاهد نیز همراه با این نمونه‌ها تهیه شد. در فواصل زمانی 24، 48 و 72 ساعت و 5 ، 7 و 14 روز تعداد میکروب‌های مذکور در نمونه‌ها شمارش شد.

**آنالیز آماری:** تمامی آزمایشات سه بار تکرار شدند. از نرم‌افزار SPSS 16:0 برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید. آنالیز واریانس یک طرفه برای تشخیص تفاوت آماری بین قطر هاله عدم رشد میکروب در نمونه‌های مختلف به کار رفت. از آزمون Repeated measure ANOVA برای تعیین اختلاف بین تعداد میکروب‌ها در نمونه‌های تیمار شده با عصاره اتانولی یا متانولی در روزهای مختلف استفاده گردید. $P<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

## • یافته‌ها

در جدول 1 نتایج تأثیر عصاره متانولی و اتانولی عصاره برگ و پوست سبز میوه گردو روی قطر هاله عدم رشد *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* نشان داده شده است. این نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). در تمامی غلظت مورد بررسی عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو روی *باسیلوس لچنی فرمیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* اثرگذار بودند. در حالی که کمترین تأثیر را روی *آسپرژیلوس نایجر* داشتند به طوری که در غلظت 125 میکروگرم/میلی‌لیتر فقط عصاره اتانولی پوست سبز میوه اثرگذار بود و در غلظت 62/5 و 31/25 میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو هیچ تأثیری روی رشد آسپرژیلوس نایجر مشاهده نگردید.

جدول 2 نتایج MIC و MBC/MFC عصاره متانولی و اتانولی عصاره برگ و پوست سبز میوه گردو روی *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* نشان می‌دهد. برای عصاره متانولی برگ علیه *آسپرژیلوس نایجر* در غلظت‌های مورد بررسی MIC و MBC/MFC یافت نشد.

**جدول 1.** قطر هاله عدم رشد (بر حسب میکرومتر) عصاره‌های آبی، متانولی و اتانو لی برگ و پوست گردو به روش انتشار چاهکی

| میکروارگانیسم | غلظت عصاره (میکروگرم/میلی‌لیتر) | عصاره برگ | | عصاره اپی کارپ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | اتانولی | متانولی | اتانولی | متانولی |
| *ساکارومایسس سرویزیه* | 500 | a21 | a16 | a18 | a20 |
| | 250 | b18 | b13 | b15 | b14 |
| | 125 | c14 | c11 | c11 | c9 |
| | 62/5 | d8 | d7 | d7 | d6 |
| | 31/25 | e3 | e4 | e3 | e3 |
| *باسیلوس لچنی‌فرمیس* | 500 | a18 | a22 | a21 | a22 |
| | 250 | b14 | b11 | b19 | b18 |
| | 125 | c11 | c15 | c15 | c15 |
| | 62/5 | d7 | d9 | d12 | e9 |
| | 31/25 | e4 | e5 | e8 | d7 |
| *آسپرژیلوس نایجر* | 500 | a4 | a3 | a5 | a5 |
| | 250 | b2 | b2 | b3 | b2 |
| | 125 | 0 | 0 | c1 | 0 |
| | 62/5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 31/25 | 0 | 0 | 0 | 0 |

حروف a– e نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین اعداد یک ستون می باشد ($P<0/05$ )

**جدول 2.** MIC و MBC (بر حسب میکروگرم/میلی لیتر) عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست گردو علیه *ساکارومایسس سرویزیه*، *باسیلوس لچنی فرمیس* و *آسپرژیلوس نایجر*

| میکروارگانیسم | | عصاره برگ گردو | | عصاره پوست گردو | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | اتانولی | متانولی | اتانولی | متانولی |
| *ساکارومایسس سرویزیه* | MIC | 15/625 | 15/625 | 15/625 | 15/625 |
| | MBC | 31/25 | 31/25 | 31/25 | 31/25 |
| *باسیلوس لچنی فرمیس* | MIC | 31/25 | 15/625 | 62/5 | 62/5 |
| | MBC | 62/5 | 31/25 | 125 | 125 |
| *آسپرژیلوس نایجر* | MIC | 250 | - | 250 | 250 |
| | MBC | 500 | - | 500 | 500 |

www.SID.ir

Archive of SID



**جدول 3.** نتایج تأثیر عصاره‌های متانولی و اتانولی برگ و پوست گردو روی کنترل رشد *ساکارومایسس سرویزیه* ، *باسیلوس لچنی فرمیس* و *آسپرژیلوس نایجر* در نمونه تیمار شده شیره خرما با رقت‌های مؤثر در MBC عصاره.

| میکرو ارگانیسم | زمان کنترل | نمونه کنترل | عصاره برگ | | عصاره پوست گردو | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | اتانولی | متانولی | اتانولی | متانولی |
| *ساکارومایسس سرویزیه* | 24 | $10^5\times8$ | ND | $10\times1$ | $10^2\times1$ | $10^2\times2$ |
| | 48 | $10^6\times1$ | ND | ND | ND | ND |
| *باسیلوس لچنی فرمیس* | 24 | $10^5\times6$ | $10\times8$ | $10\times5$ | $10^2\times1$ | $10^2\times1$ |
| | 48 | $10^6\times1$ | ND | ND | ND | ND |
| *آسپرژیلوس نایجر* | 24 | $10^6\times8$ | $10^5\times7$ | $10^5\times7$ | $10^5\times7$ | $10^5\times7$ |
| | 48 | $10^6\times8$ | $10^5\times9$ | $10^5\times9$ | $10^6\times2$ | $10^6\times1$ |
| | 5 روز | $11\times10^6$ | $3\times10^6$ | $2\times10^6$ | $5\times10^6$ | $4\times10^6$ |
| | 7 روز | $3\times10^7$ | $8\times10^6$ | $7\times10^6$ | $10\times10^6$ | $8\times10^6$ |
| | 14 روز | $2\times10^9$ | $6\times10^7$ | $7\times10^7$ | $11\times10^7$ | $9\times10^7$ |

ND : غیر قابل تشخیص (Not detected)

نتایج تأثیر عصاره متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو روی رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده به شیره خرما شامل *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* در جدول 3 نشان داده شده است. در مقایسه با نمونه کنترل عصاره اتانولی برگ گردو بعد از 24 ساعت مانع رشد *ساکارومایسس سرویزیه* گردید. در سایر روزها هم مخمری مشاهده نگردید، در حالی که عصاره اتانولی پوست سبز میوه بعد از 48 ساعت مانع رشد *ساکارومایسس سرویزیه* گردید. بنابراین می‌توانیم بگوییم عصاره اتانولی برگ تأثیر بیشتری نسبت به عصاره اتانولی پوست سبز میوه روی رشد ساکارومایسس سرویزیه دارد. در مورد عصاره متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو بعد از 48 ساعت روی ساکارومایسس سرویزیه اثرگذار بود به طوری که بعد 48 ساعت تعداد مخمر به صفر رسید.

مشاهدات ما در جدول 3 نشان داد که در مقایسه با نمونه کنترل بعد 48 ساعت عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو مانع رشد *باسیلوس لچنی فرمیس* گردید. در سایر روزها هم *باسیلوس* مشاهده نشد. این نتایج همچنین نشان داد که عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو در مقایسه با نمونه کنترل بعد 14 روز مانع رشد *آسپرژیلوس نایجر* نگردید.

## • بحث

خرما از محصولات مناطق با آب و هوای استوایی و نیمه استوایی می‌باشد که امروزه کاربردهای زیادی در تولید رنگ کاراملی، شیرینی‌پزی، بستنی، صنایع تخمیری جهت تولید الکل، اسید سیتریک و غیره دارد. خرما به عنوان دومین محصول باغی کشور به دلیل مزایای نسبی فراوانی که در مقایسه با دیگر محصولات کشاورزی دارد بسیار مورد توجه است (2). اکثر خرماها به جز تعداد کمی، به هنگام برداشت کاملاً خشک هستند و رطوبت آن‌ها برابر با 21 درصد می‌باشد از این لحاظ به ندرت فساد میکروبی در آن‌ها ایجاد می‌گردد. هنگامی که رطوبت خرما حدود30 تا 35درصد باشد، باکتری‌ها، کپک‌ها و مخمرها می‌توانند باعث فساد خرما شوند (21). یکی از فراورده‌های خرما، شیره خرما می‌باشد که از میوه کاملاً رسیده و ارقام مختلف خرمای نرم به روش مکانیکی و صنعتی به دست می‌آید (2). به علت ظاهر شدن عوارض نامطلوب و جانبی داروهای سنتتیک بار دیگر توجه دانشمندان و محققین به گیاه درمانی و مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی معطوف گردید. مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف روی باکتری‌های بیماری‌زای با منشأ غذایی در محیط کشت و غذا انجام شده است اثر آنتی باکتریال عصاره برگ و میوه گردو مورد توجه و بررسی محققین مختلفی قرار گرفته و اثر آنتی باکتریال عصاره‌ها به اثبات رسیده است (16)

در این مطالعه اثرات ضد میکروبی انواع عصاره‌های استخراج شده از برگ و پوست سبز میوه گردو روی *ساکارومایسس سرویزیه*، آسپرژیلوس نایجر و باسیلوس لچنی فرمیس ارزیابی گردید و مشخص شد که از میان عصاره‌های استخراج شده از برگ و پوست سبز میوه گردو عصاره اتانولی برگ گردو دارای بیشترین اثر مهاری روی *ساکارومایسس*

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

سرویزیه می‌باشد. و عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو داری کمترین اثر مهاری را روی آسپرژیلوس نایجر بودند.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار MIC و MBC عصاره‌ی متانولی برگ گردو روی *آسپرژیلوس نایجر* صفر است و عصاره‌ی اتانولی برگ گردو در رقت 250 و 500 میکروگرم/میلی‌لیتر روی *آسپرژیلوس نایجر* اثرگذار بود.

در مطالعات انجام شده توسط Ajaiyeoba و همکاران پتانسیل ضد میکروبی انواع عصاره‌های کلروفرم، هگزان، اتیل استات و متانولی گردو را روی *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس ارئوس* و *باسیلوسس سوبتیلیس* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره‌های برگ گردو روی این چهار میکروارگانیسم مؤثر است (22).

Jamehdor و همکاران دریافتند که عصار آبی برگ گردو روی رشد *سودوموناز آئروژینوزا* تأثیر داشته و MIC به دست آمده 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (23). در یک مطالعه دیگر مشخص شد عصاره اتانولی برگ گردو روی *پروپیونی باکتریوم آکنه* دارای اثر ضد میکروبی است و MIC و MIB آن 12/5 و 15 میلی‌گرم در لیتر بود (24). در تحقیق حاضر میزان MIC عصاره اتانولی و متانولی برای *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* خیلی کمتر از این مقادیر به دست آمد.

در مطالعه Salamat و همکاران اثر پوست سبز گردو در جلوگیری از رشد قارچ‌های *میکروسپوروم کانیس*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس*، *اپیدرمو فایتون فلوکوزوم*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* به روش Broth Dilution مورد بررسی قرار گرفت. عصاره متانولی پوست سبز گردو روی چهار گونه از قارچ‌های انتخاب شده اثر بازدارندگی داشته و به میزان 60% باعث توقف رشد آن‌ها شد (15).

از مهم‌ترین ترکیبات برگ گردو که خواص ضد باکتریایی آن‌ها ثابت شده می‌توان به ترکیبات فلاوونوئیدی مثل 3-کافیوییل کوینیک اسید، 5- کافیوییل کوینیک اسید، 3- پی کوماریک اسید، 4- پی کوماروییل کوینیک اسید، پی کوماریک اسید و گلیکوزیدهای کوئرستین، اشاره کرد (24). این ترکیبات با تأثیر روی غشاء، ترکیب با پروتئین‌های خارج سلولی یا تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی مانع رشد میکروارگانیسم‌ها می‌گردند (26، 25).

از آنجا که اکثر مطالعات انجام شده در این ارتباط، در محیط‌های آزمایشگاهی صورت گرفته، لذا اطلاعات اندکی در مورد اثرات آن‌ها در مواد غذایی موجود می‌باشد. برخی محققین معتقدند استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی، بخشی از اثر ضد میکروبی آن‌ها می‌کاهد. یکی از دلایل آن می‌تواند محتوای بالای چربی باشد که اثر حفاظتی بر میکروارگانیسم‌ها دارد (10)

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو اثر مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای روی سه میکروارگانیسم *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس نایجر* و *باسیلوس لچنی فرمیس* که از عوامل اصلی فساد شیر خرما هستند، دارد. بنابراین می‌توان برای افزایش زمان ماندگاری محصول از آن استفاده کرد.

## • References


1. Baliga MS, Baliga BRV, Kandathil SM, Bhat HP, Vayalil PK. A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (Phoenix dactylifera L.). Food Res Int. 2011; 44(7):1812-22.
2. Al-Hooti SN, Sidhu JS, Al-Saqer JM, Al-Othman A. Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase enzyme treatment. Food Chem. 2002; 79(2):215-20.
3. FAO. The economic importance of date production and international trade Available at: http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e07.htm. 2001.
4. Anjili S, Channya F, Chimbekujwo I. Fungi Associated with Post-harvest Spoilage of Date Palm (Phoenix dactylifera L.) in Yola, Adamawa State. Int J. 2015;14:14-22.
5. Aleid SM, Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. Date Palm Status and Perspective in Saudi Arabia. Date Palm Genetic Resources and Utilization: Springer; 2015. p. 49-95.
6. Aleid SM, Hassan BH, Almaiman SA, Al-Kahtani SH, Ismail SM. Microbial Loads and Physicochemical Characteristics of Fruits from Four Saudi Date Palm Tree Cultivars: Conformity with Applicable Date Standards. Food Nut Sci. 2014; 5:316-27.
7. Erickson R. Industrial applications of the bacilli: a review and prospectus. Microbiology American Society for Microbiology, Washington, DC. 1976:406-19.
8. Abbasifar A, Akhondzadeh Basti A, Karim G, Misaghi A, Bokaee, S, H Gandomi H, Jebeli A, Hamedi H, Sari A.A. Evaluate the effect of the essential oil on the behavior of Staphylococcus aureus in Feta cheese. J. Med. Plants. 2008; 1 (25) :105-115.
9. Taherkhani P, Noori N, Akhondzadeh Basti A, Gandomi H, Alimohammadi M. Antimicrobial Effects of Kermanian Black Cumin (Bunium persicum Boiss.)


www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

Essential Oil in Gouda Cheese Matrix. J MedPlants. 2015;2(54):76-85.

10. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Control. 2015; 54:111-9.
11. Naeini A, Naseri M, Kamalinejad M, Khoshzaban F, Rajabian T, Nami H, et al. Study on Anti_ Candida Effects of Essential Oil and Extracts of Iranian Medicinal Plants, In vitro. J Med Plants. 2011;2(38):163-72.
12. Li G, Xu M-L, Choi H-G, Lee S-H, Jahng Y-D, Lee C-S, et al. Four new diarylheptanoids from the roots of Juglans mandshurica. Chem. Pharm.l bull. 2003;51(3):262-64.
13. Kamkar J, Rezaei MB, Bagheri P, Abolfazl SS, Malihe N. Determination of juglone from leaves and fresh peels of juglans regia l. By high performance liquid chromatography. Iranian J. Med arom plants. 2004; 20(4):323-31.
14. Institute of standards and industrial research of Iran, The Iranian National Standard No.5075
15. Salamt F, Sogol K, Emami A, adimi GR. The effect of walnut green skin inhibit the growth of fungi M. canis, Trichophyton rubrum, Epidermophyton floccosum, Aspergillus niger and Candida albicans Broth Dilution Method. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Unit. 2006;16(4):201-205.
16. Santos-Filho SD, Diniz CL, Carmo FSd, Fonseca AdSd, Bernardo-Filho M. Influence of an extract of Juglans regia on the growth of Escherichia coli, on the electrophoretic profile of plasmid DNA and on the radiolabeling of blood constituents. Braz Arch Biol Technol. 2008; 51(SPE):163-68.
17. Teymori R, Ghazanfarirad N, Dehghan K, Asadzadeh J, Hajigholizadeh G, Bahmani M. A survey of bacterial and mold contamination of imported rice into West Azerbaijan Province, northwest of Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2014; 4:S833-S835.
18. Pennacchia C, Blaiotta G, Pepe O, Villani F. Isolation of Saccharomyces cerevisiae strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. J appl microbiol. 2008;105(6):1919-28.
19. Redzepovic S, Orlic S, Sikora S, Majdak A, Pretorius IS. Identification and characterization of Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces paradoxus strains isolated from Croatian vineyards. Lett Appl Microbiol. 2002;35(4):305-10
20. Motamedi H, TajBakhsh A. A report on pasteurized orange juice contamination with Bacillus licheniformis. J food microbiol. 2014; 1(1):39-42.
21. King, D.A.JR and Bolin, H.R, 1972. Preservation of moisturized dates, Annual Date Grower's Ins. 4: 3-5.
22. Ajaiyeoba E, Fadare D. Antimicrobial potential of extracts and fractions of the African walnut– Tetracarpidium conophorum. Afr J Biotechnol. 2006; 5(22).2322-25.
23. Jamehdor S, Zarabi M, Mehrnejad F, Yavar poor kordestani V. In vitro Evaluation of antibacterial efficacy of aqueous extracts of Iranian Native Plants on the Standard Strains of Pseudomonas aeruginosa (Short Communication). Iranian J Med Microbiol. 2014; 8(2):51-54.
24. Sharafati chaleshtori R, Sharafati chaleshtori F, Sharafati chaleshtori A, Rafieian M. Antibacterial Effects of Ethanolic Extract of Walnut Leaves (Juglans Regia) on Propionibacterium Acnes. J Zanjan Univ Med Sci. 2010; 18(71):42-49.
25. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (Juglans regia L.) cultivars. Food chem Toxicol. 2008; 46(6):2103-2111.
26. ereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferreira IC, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (Juglans regia L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food chem Toxicol. 2007; 45(11):2287-2295.

www.SID.ir

Archive of SID



# Influence of Ethanol and Methanol Extracts of Walnut Leaf and Green Hull on *Saccharomyces cerevisiae, Bacillus Licheniformis* and *Aspergillus niger* in Date Syrup

*Mehdi Azizi Shafa[1], Sabah Ghadimi[2], Ali Heshmati[3,4*]*

*1- MSc in Microbiology, Food and Drug Laboratory, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

*2- MSc Student of food Safety and hygiene, Department of Nutrition, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

*3- *Corresponding author: Assistant Prof, Nutrition Health Research Center, HamadanUniversity of Medical Sciences, Hamadan, Iran E-mail: a.heshmati@umsha.ac.ir*

*4-Assistant Prof, Department of Nutrition, Medical school, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

**Received 28 Jun, 2016** **Accepted 4 Oct, 2016**

**Background and Objectives:** Date syrup is a nutritious crop of date that its production has a growing trend. Microbial spoilage is one of the problems in production of data syrup. The goal of this study is to investigate the influence of ethanol and methanol extracts of walnut leaf and hull on *Saccharomyces cerevisiae, Bacillus Licheniformis and Aspergillus niger* in date syrup.

**Materials and Methods:** Methanol and ethanol extracts of walnut leaf and hull were prepared, and their antimicrobial effects on S. cerevisiae, *B. Licheniformis and A. niger* were assessed by ager-diffusion. Moreover, MIC and MBC/MFC of the extracts against the mentioned microorganisms were determined by macro-dilution. The influence of extracts on microorganism growth in date syrup was investigated during 14 days.

**Results:** The diameter of the inhibition zones was proportional to the extract concentration. MIC (MBC) of ethanol and methanol extracts of leaf and hull against **S.** cerevisiae was 15.625 (31.5) µg/ml. The MIC (MBC) obtained for the ethanol and methanol extracts of leaf and hull against *B. Licheniformis* was 31.25 (62.5), 15.625 (31.25), 15.625 (31.25) and 31.25 (62.5) µg/ml, respectively. MIC (MBC) of the ethanol extract of the leaf and the ethanol and methanol extracts of hull against *A. niger* was 250 (500) µg/ml. In date syrup, extracts of walnut leaf and hull inhibited the growth of S. and *Bacillus* after 24 h while they were only able to decrease the growth of *Aspergillus*.

**Conclusion:** Methanol and ethanol extracts of walnut leaf and hull against **S.** *cerevisiae, B. Licheniformis and A. niger* in date syrup were effective, and can be used for the spoilage control and shelf-life increasing of the product.

**Keywords:** Walnut leaf, Walnut hull, Date syrup, *Saccharomyces* cerevisiae, *Bacillus Licheniformis, Aspergillus niger*

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

www.SID.ir