

## اثرات بهداشتی اسانس کلپوره در کنترل سالمونلا تیفی موریوم LT2 در ماست پروبیوتیک

رزاق محمودی<sup>۱\*</sup>، پیمان زارع<sup>۲</sup>، سوما نصرت پور<sup>۳</sup>، کریم مردانی<sup>۴</sup>، ابوالفضل صفری<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت 1393/03/01 تاریخ پذیرش 1393/06/20

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** این پژوهش تلاشی برای بررسی امکان تولید ماست حامل میکروارگانیسم‌های زنده و فعال پروبیوتیک به‌عنوان ماده غذایی عمل‌گرا با خصوصیات ارگانولپتیکی مطلوب و همچنین سنجش بقاء باکتری پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم در این فرآورده پروبیوتیک تحت تأثیر اسانس کلپوره و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد.

**مواد و روش کار:** در این تحقیق باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (پروبیوتیک) به میزان  $10^8$  -  $10^9$  CFU/ml، باکتری پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم LT2 به میزان  $10^2$  CFU/ml و غلظت‌های مختلف اسانس کلپوره به ماست اضافه شدند. ماست‌های تولیدشده در مدت چهار هفته نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) در طی فواصل زمانی مشخص از نظر خصوصیات ارگانولپتیکی، بقاء و نابودی سالمونلا و قابلیت ماندگاری باکتری پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفتند. حضور یا نابودی سالمونلا در طی دوره نگهداری ماست به‌وسیله کشت اختصاصی و روش مولکولی (پی سی آر) تعیین شد.

**یافته‌ها:** اسانس مذکور در دو غلظت ۶۰ و ۸۰ ppm و در تیمار توأم با پروبیوتیک از بالاترین تأثیر بر ممانعت از رشد سالمونلا برخوردار بود. بر اساس یافته‌های محیط کشت و پی سی آر در ماست پروبیوتیک و تیمارهای ماست پروبیوتیک حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کلپوره باکتری سالمونلا در طی ۲۸ روز نگهداری ماست جداسازی نشد. باین‌وجود در تیمارهای ماست کنترل و حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کلپوره طی روزهای ۱ و ۷ این باکتری جداسازی و شمارش گردید. همچنین بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت رشد سالمونلا تیفی موریوم و نیز از نظر تولید ماست با خواص طعمی مطلوب غلظت ۴۰ ppm در تیمار توأم با باکتری پروبیوتیک بود.

**نتیجه‌گیری:** استفاده توأم اسانس با پروبیوتیک می‌تواند سبب بهبود خصوصیات بهداشتی و حسی ماست گردد.

**واژه‌های کلیدی:** ماست پروبیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم، اسانس کلپوره

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره هشتم، ص ۷۷۷-۷۶۹، آبان ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، کد پستی: ۵۱۶۶۶۱۴۷۷۹، تلفن: ۰۹۱۲۷۸۶۸۵۷۱

Email: r.mahmodi@yahoo.com

### مقدمه

مواد غذایی آلوده‌شده با میکروارگانیسم‌های پاتوژن اغلب به‌عنوان منبع اولیه بسیاری از بیماری‌ها در انسان توصیف شده‌اند. بقاء و رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات غذایی موجب فساد و کاهش کیفیت آن‌ها می‌شود (۱). علی‌رغم پیشرفت‌های محسوس صورت گرفته در زمینه رعایت بهداشت در فرآیند تولید و اصلاح فناوری‌های تولید مواد غذایی، بحث امنیت غذایی به طرز فزاینده‌ای به یکی از مباحث بسیار مهم در بهداشت عمومی

تبدیل شده است. تخمین زده می‌شود ۳۰ درصد مردم در کشورهای صنعتی از بیماری‌های با منشأ غذایی رنج می‌برند (۲). بنابراین هنوز هم به روش‌های جدید برای کاهش یا حذف باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد در حد امکان ترکیب روش‌های جدید با روش‌های موجود مورد نیاز است (۳). با توجه به اثرات سوءاستفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی صنعتی به‌ویژه توان سرطان‌زایی و سمیت آن‌ها برای انسان علاقه روزافزونی به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی مشتق از منابع طبیعی و میکروبی وجود دارد (۲).

<sup>۱</sup> استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

<sup>۳</sup> دانش آموخته دکتری حرفه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

<sup>۴</sup> دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

<sup>۵</sup> کارشناس آزمایشگاه کنترل کیفی، کارخانه شیر پگاه تبریز

تیفی موریوم LT2 در ماست پروبیوتیک را طی ۲۸ روز نگهداری آن مورد بررسی قرار دهیم.

### مواد و روش کار

این مطالعه تجربی طی مراحل زیر صورت پذیرفت:  
جمع آوری گیاه: گیاه کلپوره (*Teuricum polium* L.) از استان کرمان تهیه و توسط گروه گیاهشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز از نظر صحت نام علمی تأیید شد.

تهیه اسانس و آنالیز آن: جهت آنالیز شیمیایی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی گیاه کلپوره، اسانس گیاه تهیه شد. به منظور استخراج اسانس گیاه کلپوره، بخش‌های خشک شده گیاه کاملاً آسیاب و با استفاده از یک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت روغن فرار آن به روش تقطیر توسط آب استخراج گردید. پس از آب گیری توسط سولفات سدیم خشک تا هنگام تعیین خواص ضد باکتریایی و همچنین تشخیص و تعیین ترکیب‌های تشکیل دهنده، اسانس در ظروف شیشه ای تیره و در یخچال نگهداری گردید. ابتدا نمونه آماده شده اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مناسب‌ترین برنامه ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس بدست آمد. همچنین درصد ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه گردید. سپس اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی نیز تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها بدست آمد. شناسایی ترکیبات اسانس‌ها با استفاده از شاخص بازداری و بررسی طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس‌ها و مقایسه آن‌ها با طیف‌های مرجع انجام شد. در این مطالعه دستگاه گاز کروماتوگراف از نوع Agilent 6890 با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا بصورت ۷۰ درجه سانتی‌گراد با توقف ۲ دقیقه در این دما سپس افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و شناساگر EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (۹).

آماده سازی و محاسبه میزان تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه: باکتری سالمونلا تیفی موریوم ATCC ۱۳۳۱۱ از بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز تهیه و محاسبه میزان باکتری لازم ( $10^3$  cfu/ml) جهت تلقیح در شیر با استفاده از

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با داشتن ترکیبات متنوع بیولوژیک و فیزیولوژیک، از توان بسیار بالایی جهت به کارگیری‌شان به عنوان ترکیبات دارویی جدید در زمینه بهداشت و درمان بیماری‌های انسانی و حیوانی برخوردار بوده و با داشتن ترکیبات ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و عوامل حذف کننده رادیکال آزاد به عنوان یکی از منابع ترکیبات دارویی طبیعی حائز اهمیت مطرح شده‌اند (۴). خصوصیات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی پایه و اساس بسیاری از کاربردهای آن‌ها مانند محافظت غذاهای خام و فرآوری شده، دارویی و طب سنتی را تشکیل می‌دهد (۵). گیاه جنس *Teucrium* متعلق به خانواده Lamiaceae بوده که شامل بیش از ۳۰۰ گونه و با گسترش جهانی می‌باشد. از گیاهان این جنس به عنوان گیاهان دارویی از سال‌ها قبل به عنوان مدر، ضد تب، معرق، مقوی، ضد اسپاسم و ... استفاده شده است. این گیاه در طب سنتی ایران نیز به عنوان داروی ضد اسپاسم، ضد درد و کاهنده چربی خون استفاده به کار رفته است. همچنین از این گیاه به عنوان ادویه در غذا و در برطرف کردن بیماری‌های معده و درمان زخم‌ها استفاده شده است (۶).

کاربرد پروبیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها به عنوان افزودنی‌های بیولوژیک، به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و تأثیرات مطلوب فراوان باکتری‌های پروبیوتیک در بهبود تعادل میکروفلور دستگاه گوارش، تقویت سیستم دفاعی موکوسی علیه پاتوژن‌ها، افزایش پاسخ‌های ایمنی، کاهش کلسترول خون و فعالیت ضدسرطانی و ضد میکروبی‌شان، سبب افزایش کاربرد آن‌ها در دسته‌ای از مواد غذایی موسوم به غذاهای عملگر گردیده و مقبولیت مصرف غذاهای پروبیوتیکی در سراسر جهان را افزایش داده است (۷).

سالمونلاها گسترش جهانی داشته و به طور پراکنده در آب، خاک، غذای حیوانات، گوشت، مدفوع و سبزیجات یافت می‌شوند و می‌توانند بسیاری از پستانداران، پرندگان و خزندگان را مبتلا سازند (۸). گزارشات مختلفی از آلودگی شیر و ماست‌های پاستوریزه و پاستوریزه نشده به سالمونلا تیفی موریوم در ایران و جهان وجود دارد؛ بنابراین استفاده از نگه‌دارنده های طبیعی به مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در ماست، جهت جلوگیری کاهش و نابودی باکتری‌های پاتوژن غذازاد به مانند سالمونلا می‌تواند بسیار مطلوب باشد.

با توجه به مصرف بالای محصولات لبنی به ویژه ماست در ایران و همچنین احتمال وجود آلودگی ثانویه و بقای سالمونلا تیفی موریوم در ماست، در این مطالعه بر آن شدیم اثرات بهداشتی اسانس کلپوره و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در کنترل سالمونلا

روش جذب نوری و کشت سطحی انجام شد. ابتدا کشت لیوفیلیزه باکتری مذکور دو مرتبه متوالی در محیط BHI Broth به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سپس جهت تهیه میزان تلقیح باکتری لازم ( $10^3$  cfu/ml)، مقادیر مختلفی از کشت مرحله دوم انتخاب و به کووت های حاوی ۵ میلی لیتر BHI Broth منتقل شده و با استفاده از خواندن جذب نوری کووت های مذکور (طول موج ۶۰۰ نانومتر) و شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی، کووت حاوی تعداد مناسب باکتری جهت تلقیح به نمونه های شیر مشخص شد ( $10^3$  cfu/ml). باکتری لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۴۳۵۶ تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به عنوان پروبیوتیک استفاده شد. محتویات آمپول لیوفیلیزه حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط استریل به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع MRS منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس به ارلن حاوی ۹۵ میلی لیتر از محیط کشت فوق منتقل شد و تحت شرایط ذکر شده در بالا انکوبه گردید و با استفاده از تهیه سری رقت و کشت سطحی مقدار باکتری در هر میلی لیتر مشخص گردید. با انجام محاسبات ریاضی دوز تلقیح تعیین شد و نهایتاً به هر تیمار به میزان  $10^9$  cfu/ml شیر تلقیح شد و کاملاً مخلوط گردید (۹).

تهیه ماست: برای تهیه ماست، شیر تازه و کامل گاو پس از تیمار حرارتی مورد استفاده قرار گرفت، قبل از شروع به انجام مراحل مختلف ماست زنی، دمای شیر را به ۴۲ درجه سانتی گراد رسانده و در هر یک از ظروف استریل مخصوص تهیه ماست ۵۰۰ میلی لیتر از شیر ریخته شد (تیمار شماره ۱- ماست کنترل (فاقد باکتری های پاتوژن و پروبیوتیک و اسانس گیاه کلپوره)، تیمار شماره ۲- ماست دارای پاتوژن، فاقد باکتری پروبیوتیک و اسانس، تیمار شماره ۳- ماست پروبیوتیک فاقد باکتری پاتوژن و اسانس، تیمار شماره ۴- ماست پروبیوتیک دارای پاتوژن که فاقد اسانس، سه تیمار شماره ۵، ۶ و ۷ به ترتیب دارای باکتری پاتوژن، پروبیوتیک و اسانس گیاه کلپوره در غلظت های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ ppm بودند. تیمارهای شماره ۸، ۹ و ۱۰ دارای باکتری پاتوژن و اسانس (۴۰، ۶۰ و ۸۰ ppm) در غیاب باکتری پروبیوتیک استفاده بودند). استاتر بکار رفته در این مطالعه ترموفیل شامل باکتری های استرپتوکوکوس سالیاریوس تحت گونه ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکنه ای تحت گونه بولگاریکوس به نسبت ۱:۱ (ساخت شرکت کریستین هانسن دانمارک، R 704) مورد استفاده قرار گرفت. برای هر تیمار، تولید ماست جداگانه و در ۳ تکرار انجام گرفت، در ضمن برای تمامی تیمارها از یک نوع شیر استفاده شد. برای تیمارهایی که نیاز به ماست پروبیوتیک بود، باکتری

پروبیوتیک به میزان  $10^9$  cfu/ml پس از استاتر به تیمار مورد نظر اضافه شد و برای تیمارهایی که باکتری پاتوژن نیاز بود به میزان  $10^3$  cfu/ml باکتری سالمونلا تیفی موریوم به نمونه ها اضافه شد. سپس حجم مورد نیاز از اسانس مذکور برای ایجاد غلظت های مورد نظر به شیر مایه زده شده اضافه گردید، پس از همگن سازی به مدت ۳-۶ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از رسیدن اسیدیته نمونه ها به ۰/۶ درصد (بر حسب اسید لاکتیک) تیمارها به یخچال ۴ درجه سانتی گراد منتقل و به مدت ۴ هفته جهت انجام آزمون های مورد نظر نگهداری شدند.

نمونه برداری از تیمارها و شمارش باکتری ها: برای نمونه برداری از تیمارها ابتدا نمونه ها همگن شدند و به میزان ۰/۵ گرم از هر تیمار برداشته و در شرایط کاملاً استریل با ۴/۵ سی سی آب پپتونه مخلوط کرده و سپس سری رقت ها از آن تهیه شده و از رقت های اولیه برای کشت بر روی سالمونلا شینگلا آگار (SS agar) و از رقت های بالاتر جهت کشت بر روی MRS agar (the Man, Rogosa and Sharpes agar) استفاده شد، برای این کار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت برداشته شد و با پیت پاستور بر روی محیط کشت پخش شد، محیط SS agar به مدت ۲۴ ساعت و MRS agar به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس شمارش ها انجام شد. در روز آخر نمونه برداری برای ارزیابی حضور و عدم حضور باکتری سالمونلا تیفی موریوم در تیمارها از روش PCR استفاده شد که در این روش از ژن *hilA* به عنوان ژن اختصاصی سالمونلا برای تعیین حضور آن استفاده شد.

ارزیابی PCR: از ژن *hilA* به عنوان یک ژن اختصاصی سالمونلا برای تعیین حضور سالمونلا تیفی موریوم استفاده گردید. پرایمرهای *hilA* سالمونلا پیشین و معکوس به ترتیب *hilA-F* و *hilA-R* GTCCGGTCGTAGTGGTGTCT با سایز ۴۹۷bp با CGCATACTGCGATAATCCCT با سایز ۴۹۷bp زوج باز (۱۱) می باشد. نمونه و DNA استخراجی از آن به عنوان الگوی برای تکثیر ژن در دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر قرار گرفت: مخلوط مایع پی سی آر (۲۵ میکرولیتر):

1μM each primers, 200 μM 10x PCR buffer solution, 1mM MgCl<sub>2</sub>, dATP, dGTP, dCTP and dTTP 0.25 Taq polymerase, 2.5 μl template DNA.

شرایط انجام PCR: Denaturation 30 cycles (94°C, 1 min), annealing (55°C, 1 min), extension (72°C, 2 min), 72°C 10 min at 4°C.

کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار صورت پذیرفت. ارزیابی رفتار رشد باکتری‌های مورد مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) صورت گرفت. تفاوت در بررسی‌های ارگانولپتیک مورد نظر با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و LSD انجام شد، لازم به ذکر است تمام تحلیل‌های آماری با نرم افزار SPSS17 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج معنی دار در  $P < 0.05$  مد نظر قرار گرفت.

الکتروفورز محصول پی سی آر (15 µl) با 1% agarose gel در تانک الکتروفورز افقی، مشاهده ژل با سیستم UV transilluminator (300 nm) NanoGel Doc documentation system انجام شد. ارزیابی حسی: برای ارزیابی ویژگی‌های حسی ناشی از افزودن پروبیوتیک و اسانس به ماست از تست پذیرش حسی استفاده گردید (۱۲). تحلیل آماری:

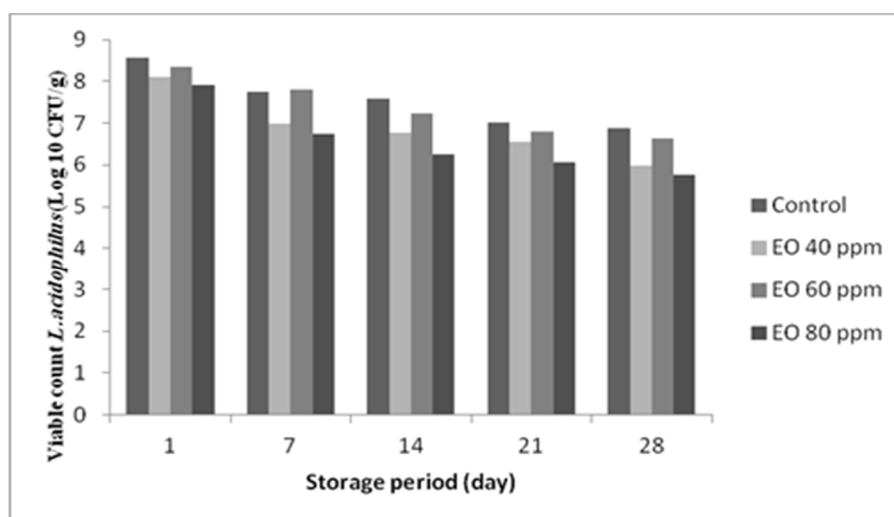
**جدول (۱): آنالیز ترکیبات عمده اسانس کلیپوره (با استفاده از GC/MS)**

| شماره ترکیب | نام ترکیب                                      | زمان بازداری (دقیقه) | درصد  |
|-------------|------------------------------------------------|----------------------|-------|
| ۱           | Verbenene                                      | ۶/۹۷                 | ۱/۲۵  |
| ۲           | Beta -Pinene                                   | ۷/۵۹                 | ۱۱/۰۲ |
| ۳           | Beta.-Myrcene                                  | ۷/۹۳                 | ۱۰/۰۵ |
| ۴           | Benzene, 1-methyl                              | ۸/۸۸                 | ۱/۶۶  |
| ۵           | Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)      | ۹/۰۱                 | ۲/۰۰  |
| ۶           | 2,3,3-Trimethyl-3-cyclopentene acetaldehyde    | ۱۱/۸۰                | ۱/۷۱  |
| ۷           | Bicyclogermacrene                              | ۱۲/۴۹                | ۸/۲۵  |
| ۸           | Benzene                                        | ۱۳/۸۷                | ۱/۴۶  |
| ۹           | Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl | ۱۴/۲۷                | ۱/۳۱  |
| ۱۰          | 1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene | ۲۰/۷۱                | ۱/۲۳  |
| ۱۱          | Germacrene D                                   | ۲۱/۴۲                | ۱/۱۵  |
| ۱۲          | Germacrene B                                   | ۲۳/۲۸                | ۱۰/۱۱ |
| ۱۳          | sesquisabinene hydrate                         | ۲۳/۴۶                | ۵/۲۶  |
| ۱۴          | Spathulenol                                    | ۲۴/۱۵                | ۵/۰۶  |
| ۱۵          | o-Menth-8-ene                                  | ۲۴/۶۳                | ۱/۲۳  |
| ۱۶          | 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,4-dimethyl   | ۲۴/۷۵                | ۱/۲۳  |
| ۱۷          | 1H-3a,7-Methanoazulene                         | ۲۵/۱۲                | ۱/۸۴  |
| ۱۸          | Naphthalene                                    | ۲۵/۸۱                | ۱/۲۱  |
| ۱۹          | Linalool                                       | ۲۵/۹۷                | ۴/۰۲  |
| ۲۰          | Cyclolongifolene oxide, dehydro                | ۲۶/۲۲                | ۱/۰۵  |
| ۲۱          | Benzenemethanol, 4-(1-methylethyl)             | ۲۶/۹۸                | ۱/۳۰  |
| مجموع       |                                                |                      | ۹۰/۴۰ |

**جدول (۲):** لگاریتم ماندگاری باکتری سالمونلا تیفی موریوم در تیمارهای مختلف ماست

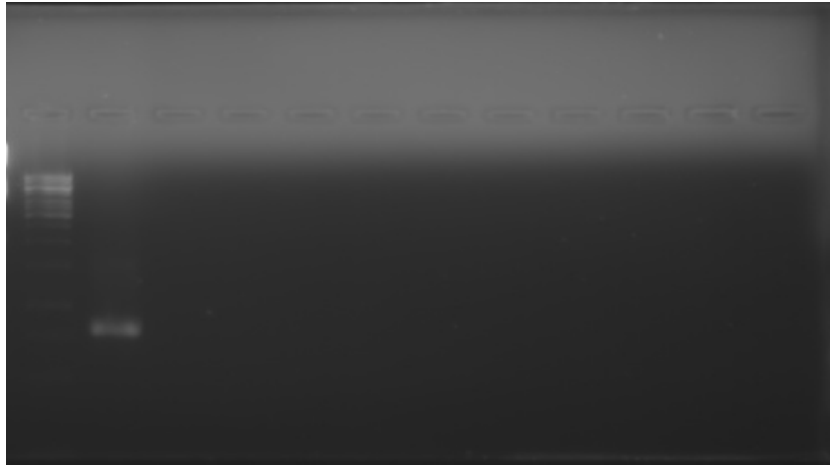
| نمونه‌های ماست |           | دوره نگهداری (روز) |
|----------------|-----------|--------------------|
| ۱              | ۲         | ۳                  |
| ۱              | ۲/۹۹±۰/۰۷ | ۳/۲۶±۰/۰۴          |
| ۲              | *         | *                  |
| ۳              | *         | *                  |
| ۴              | *         | *                  |
| ۵              | *         | *                  |
| ۶              | *         | *                  |
| ۷              | *         | ۳/۰۶±۰/۰۶          |
| ۸              | ۲/۸۱±۰/۰۳ | ۳/۷۹±۰/۰۴          |
| ۹              | ۲/۹۱±۰/۰۷ | ۳/۲۸±۰/۰۲          |

x: عدم جداسازی باکتری

**تصویر (۱):** لگاریتم ماندگاری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی دوره نگهداری ماست (۲۸ روز)**جدول (۳):** میانگین پذیرش ماست حاوی غلظت‌های مختلف اسانس و پروبیوتیک

| اسانس | پروبیوتیک | Mean±SD    |
|-------|-----------|------------|
| ۰     | -         | a۷/۹۰±۰/۳۹ |
| ۴۰    | +         | b۷/۰۰±۰/۴۱ |
| ۶۰    | +         | c۶/۰۲±۱/۴۶ |
| ۸۰    | +         | d۵/۱۴±۱/۵۱ |
| ۰     | +         | a۷/۶۵±۱/۷۶ |
| ۴۰    | -         | c۶/۵۶±۲/۳۱ |
| ۶۰    | -         | d۵/۰۶±۱/۶۳ |
| ۸۰    | -         | e۴/۲۶±۱/۰۵ |

حروف غیر مشابه در یک ستون مبین وجود اختلاف معنی دار ( $P<۰/۰۵$ ) است.



تصویر (۲): ژل الکتروفورز حاصل از PCR نمونه‌های مختلف ماست

### بحث و نتیجه‌گیری

آنالیز شیمیایی اسانس گیاه کلپوره: میزان بازده استخراج اسانس ۲/۵ درصد بر اساس وزن خشک نمونه بود. یافته‌های حاصل از آنالیز GC و GC-MS اسانس منجر به شناسایی ۲۱ ترکیب (۹۰/۴۰٪) شد. ترکیبات Spathulenol (۱۵/۰۶ درصد)، Beta-Pinene (۱۱/۰۲ درصد)، Beta-Myrcene (۱۰/۱۱ درصد)، Germacrene B (۱۰/۰۵ درصد)، Germacrene D (۸/۱۵ درصد)، bicyclogermacrene (۸/۲۵ درصد) و Linalool (۴/۰۲ درصد) با ۶۶/۶۶ درصد، عمده‌ترین ترکیبات اسانس بودند. عمده‌ترین ترکیبات موجود در عصاره حاصل از گیاه کلپوره شامل آلکالوئیدها، تری‌ترین‌ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، استرول‌ها و تانن‌ها گزارش شده است که در این میان ترکیباتی همچون فلاونوئیدها (از ترکیبات پایه و مهم گروه فنل‌ها) و تانن‌ها نقش بسیار مهمی در ویژگی‌های ضد میکروبی این گیاه ایفا نموده‌اند (۱۳). در مطالعه حاضر نیز ترکیبات فنولی بخش قابل توجهی از اسانس گیاه کلپوره را تشکیل داده که در فعالیت ضد میکروبی و حسی اغلب ترکیبات طبیعی گیاهی نقش بسیار مهم و تعیین کننده ای ایفا می‌نماید. همچنین در برخی مطالعات توان ضد میکروبی بالا و خصوصیات طعمی اسانس گیاهان جنس *Teucrium* را مرتبط با اجزاء کارواکرول آن ذکر نموده‌اند (۱۴). در مطالعه ما نیز نتایج حاصل از شناسایی و تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس نشان داد که ترکیب کارواکرول در کنار ترکیباتی همچون فنل‌ها جزء ترکیبات اصلی و پایه موجود در اسانس می‌باشند.

خصوصیات ارگانولپتیک: خصوصیات ارگانولپتیک نمونه‌های مختلف ماست بررسی و میانگین نتایج ارزیابی شده طی نگهداری ۲۸ روز در جدول ۲ ارائه شده است. تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای

( $P < 0.05$ ) در خصوصیات طعمی و حسی نمونه‌های مختلف ماست به‌ویژه تیمارهای واجد اسانس و پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. غلظت ۴۰ ppm اسانس مذکور در ماست پروبیوتیک بهترین تیمار از لحاظ خصوصیات حسی بود. قابلیت پذیرش حسی نمونه‌های ماست واجد اسانس با افزایش غلظت اسانس کاهش معنی داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). امروزه با توجه به گسترش مقبولیت مصرف محصولات لبنی با خصوصیات طعمی جدید، بنابراین با کاربرد توأم ترکیبات محافظت کننده زیستی مختلف به‌ویژه اسانس‌های گیاهی و پروبیوتیک‌ها، می‌توان از غلظت‌های پائین تری از اسانس‌ها جهت کاهش هزینه‌های اقتصادی و اثرات نامطلوب غلظت‌های بالاتر اسانس‌ها بر خصوصیات ارگانولپتیک مواد غذایی بهره جست.

ماندگاری باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس: قابلیت بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کلپوره (۴۰، ۶۰ و ۸۰ ppm) طی ۲۸ روز نگهداری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱). در مطالعه حاضر با توجه به نتایج حاصل از شمارش لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، تیمار ماست پروبیوتیک حاوی اسانس کلپوره (۶۰ ppm) بالاترین میزان ماندگاری باکتری پروبیوتیک ( $\log_{10} \text{cfu/g}$  ۶/۴۲) در انتهای دوره نگهداری ماست را داشت ( $P < 0.05$ ). کمترین میزان قابلیت ماندگاری پروبیوتیک ( $\log_{10} \text{cfu/g}$  ۵/۲۸) در نمونه ماست پروبیوتیک آلوده به سالمونلا گزارش شد (شکل ۱). در بالاترین غلظت بکار رفته اسانس در این مطالعه قابلیت ماندگاری پروبیوتیک ( $\log_{10} \text{cfu/g}$  ۵/۴۳) در ماست در مقایسه با سایر غلظت‌های آن کمتر بود ( $P < 0.05$ ). غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی می‌توانند فعالیت باکتری‌های استارتر و باکتری‌های تخمیر کننده را در محصولات لبنی تحت تأثیر قرار دهند و این امر توسط تعدادی از

محققین بررسی و تأیید شده است (۱۶،۱۵). از بین باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های لاکتیک اسید (LAB) اغلب بعنوان مقاوم‌ترین گونه‌ها نسبت به عوامل ضد میکروبی طبیعی مشتق از منابع گیاهی شناخته شده‌اند (۱۷). مطالعات صورت گرفته در خصوص افزودن اسانس‌های گیاهی به ماست و پنیر نشانگر بهبود قابلیت زیست و ماندگاری باکتری‌های استارتر و پروبیوتیک بود (۱۸،۹). نتایج حاصل از تأثیر اسانس *Ziziphora clinopodioides* روی فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بعنوان کشت استارتر ماست توسط صربی-جماب و نیازمن، تأثیر نفع‌آمیز، آویشن و سیر توسط سیمسک و همکاران (۱۵) و نیز نتایج مربوط به *Ziziphora* توسط حداد خداپرست و همکاران (۱۶)، در راستای یافته‌های بدست آمده در مطالعه ما می‌باشد.

ماندگاری باکتری سالمونلا تیفی موریوم: رشد سالمونلا تیفی موریوم طی نگهداری نمونه‌های ماست در جدول ۲ نشان داده شده است. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که اسانس کلپوره و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه سالمونلا بوده است. در برخی از مطالعات صورت گرفته در محیط کشت فعالیت ضد باکتریایی انواع عصاره‌های کلپوره گزارش شده که در ذیل به برخی از آن‌ها اشاره می‌گردد. در مطالعه انجام شده توسط اوگانزیان (۱۹۹۱) اثر ضد میکروبی عصاره گیاه کلپوره در محیط کشت مشاهده شد (۱۹). اثرات ضد میکروبی انواع عصاره‌های کلپوره (هیدروالکلی، اتانولی و متانلی) علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی توسط دارابپور و همکاران (۲۰۱۰) ارزیابی شده است، بر اساس یافته‌های این افراد عصاره هیدروالکلی این گیاه از اثرات ممانعت رشدی مناسبی علیه سالمونلا برخوردار بوده و بیشترین فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی آن علیه باسیلوس آنتراسیس گزارش شد، در مقابل بوردتلا برونشیسپتیکا حساس‌ترین میکروارگانیسم نسبت به عصاره متانلی این گیاه بوده است (۱۳). فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه کلپوره با استفاده از روش رقیق سازی سریالی توسط آکین و همکاران ارزیابی شد، این اسانس از اثر باکتریسیدی علیه استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱:۱۰۰ برخوردار بوده در حالیکه فاقد اثرات ضد میکروبی علیه سالمونلا تیفی موریوم، اشرشیاکلی بوده است.

همچنین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن نشان داده شد که غلظت‌های ۲ و ۴ میکرولیتری اسانس فاقد تأثیر بر روی اشرشیاکلی بوده و غلظت ۲ میکرولیتر نیز بر استافیلوکوکوس اورئوس بی تأثیر بوده است، اما با بکارگیری غلظت ۴ میکرولیتر در مورد استافیلوکوکوس اورئوس سبب ایجاد منطقه مهار رشد شده است، در نهایت این افراد نشان دادند که اسانس گیاه کلپوره علیه باسیلوس سرئوس از بالاترین توان ضد میکروبی برخوردار بوده و کمترین اثر ضد میکروبی علیه سالمونلا تیفی موریوم گزارش شد، همچنین اسانس از توان ضد میکروبی مناسب علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی برخوردار بوده است (۱۳،۶). یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که در تیمارهای ماست پروبیوتیک حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کلپوره و نیز ماست پروبیوتیک باکتری سالمونلا در طی ۲۸ روز نگهداری ماست جداسازی نشد (جدول ۷). با این وجود در تیمارهای ماست کنترل و حاوی غلظت‌های مختلف اسانس کلپوره طی روزهای ۱ و ۷ این باکتری جداسازی و شمارش گردید. در تیمارهای فوق با افزایش غلظت اسانس خاصیت ضد باکتریایی افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). طی روزهای ۱۴ تا انتهای دوره نگهداری ماست باکتری سالمونلا جداسازی نشد. نتیجه فوق نیز با نتایج و تصاویر به دست آمده با روش PCR تطابق داشته و تصویر مربوطه در ذیل آمده است (تصویر ۱). یافته‌های این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه کلپوره از فعالیت ضد باکتریایی مناسبی علیه سالمونلا تیفی موریوم برخوردار می‌باشد، با توجه به اهمیت سالمونلا تیفی موریوم در ایجاد عفونت و مسمومیت‌های غذایی و همچنین مقاومت دارویی قابل توجه این باکتری استفاده از ترکیبات طبیعی حاصل از بخش‌های مختلف این گیاه در کنار سایر روش‌های محافظتی می‌تواند در بهبود و ارتقاء بهداشت محصولات غذایی و به طبع آن سلامتی افراد جامعه بسیار سودمند باشد.

### تقدیر و سپاسگذاری

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه تبریز و از همکاری شرکت شیر پگاه آذربایجان شرقی تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References:

1. Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KH C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem 2007; 100:553-9.

2. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in food-a review. Int Food microbial 2004; 94: 223-53.
3. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychass r. Inhibition of *Oregano* essential and

- EDTA on *E. coli* O157:H7. *Italian J Food sci* 2001; 13: 55-65.
4. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 2008; 108: 986-95.
  5. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem* 2006; 54:1822-8.
  6. Akin M, Oguz D, Saracoglu HT. Antibacterial activity of essential oil from *Thymbra spicata* var. *spicata* L. and *Teucrium polium* (Stapf Brig.). *Int J Pharm Appl Sci* 2010; 1: 55-8.
  7. Ong L, Henriksson A, Shah NP. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int Dairy J* 2006; 16: 446-56.
  8. Jay MJ. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. An Aspen Publication 2005. pp: 323,441-6.
  9. Mahmoudi R, Tajik H, Ehsani Ali, Farshid AA, Zare P. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil on viability and cellular ultrastructure of *Lactobacillus casei* during ripening of probiotic Feta cheese. *Int J Dairy Technol* 2013; 1 (63): 77-82.
  10. Ehsani A, Mahmoudi R. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* on the organoleptic properties and on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during manufacturing, ripening and storage of Iranian white-brined cheese. *Int J Dairy Technol* 2013; 1 (63): 71-7.
  11. Xuan G, Jinru C, Larry R, Beuchat D, Robert EB. PCR detection of salmonella enterica serotype montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hlyA*. *Appl Env Microbiol* 2000; 66 (12): 5248-52.
  12. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. *Sensory evaluation techniques*. 2<sup>nd</sup> ed. florida: Crc prees, inc. bocaration; 1991. P: 123-30.
  13. Darabpour E, Motamedi H, Seyyed Nejad SM. Antimicrobial properties of *Teucrium polium* some clinical pathogens. *Asian Pacific J Tropic Medicine*, 2010; 124-7.
  14. Pauli A, Knobloch K. Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi. *Z Lebensm Unters Forsch* 1987;185(1):10-3.
  15. Simsek B, Sagdic O, Ozcelik S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage of Ayran produced with different spices. *J Food Eng* 2007; 78(2): 676-80.
  16. Hadad Khodaparast MH, Mehraban Sangatash M, Karazhyan R, Habibi MB, Beiraghi Toosi S. Effect of essential oil and extract of *Ziziphora clinopodioides* on yoghurt starter culture activity. *World Sci J* 2007; 2: 194-7.
  17. Lemay MJ, Choquette J, Delaquis PJ, Garipey C, Rodrigue N, Saucier L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *Int J Food Microbiol* 2002; 78: 217-26.
  18. EL-Nawawy MA, EL-Kenany YM, EL-Ghaffar EA. Effect of some herb plants on the use of yoghurt culture. *Annals of Agriculture Sci*. 7th Conf. Agric. Dev. Res. Fac. Agric. Ain Shams University of Cairo, Egypt. 1998; 15-7.
  19. Oganessian GB, Galstyan AM, Mantsatanyan VA, Shashakov AS, Agababjiyan PV. Phenyl propanoid glycosides of *teucrium polium*. *Chemistry of natural compounds* 1991; 27(5): 556-9.

## HYGIENIC EFFECTS OF TEUCRIUM POLIUM ESSENTIAL OIL AGAINST SALMONELLA TYPHIMORIUM LT2 IN PROBIOTIC YOGHURT

Razzagh Mahmoudi<sup>\*1</sup>, Payman Zare<sup>2</sup>, Soma Nosratpour<sup>3</sup>, Karim Mardani<sup>4</sup>, Abolfazl Safari<sup>5</sup>

Received: 22 May, 2014; Accepted: 11 Sep, 2014

### Abstract

**Background & Aims:** The aim of this study was to evaluate the probability to produce yoghurt containing live and active probiotic microorganisms as functional food with favorite sensorial properties.

**Material & Methods:** The maintenance of *Salmonella* as a pathogen agent was evaluated under the synergistic effects of simultaneous presence of *Teucrium polium* essential oil (EO) and *Lactobacillus acidophilus*. For this purpose,  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml of *L. acidophilus*,  $10^3$  CFU/ml *Salmonella* Typhimurium LT2, and different concentrations of *Teucrium polium* EO were added to yoghurt. The products were kept for 28 days in 4°C refrigerator and evaluated for changes in organoleptic properties and the maintenance of *L. acidophilus* and *S. Typhimurium* LT2. The presence of bacteria was determined by culture in selective media and PCR methods.

**Results:** *T. polium* EO had the best *Salmonella* growth inhibition at 60 ppm and 80 ppm and in synergistic combination with *L. acidophilus*. No *Salmonella* was isolated during the 28 days of preservation of probiotic yoghurt or probiotic yoghurt containing different concentrations of *T. polium* EO. However, *Salmonella* could be isolated and counted in days 1 and 7 from negative control group and the groups containing *T. polium* EO. The best organoleptic properties of essential oil concentrations were observed in groups containing *L. acidophilus*.

**Conclusion:** Using the combination of *T. polium* EO and *L. acidophilus* improved the hygienic and organoleptic quality of yoghurt.

**Keywords:** Probiotic Yoghurt, *Salmonella* Typhimurium, *Teucrium polium* essential oil

**Address:** Department of Food Hygiene & Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, P.O. Box: 5166614779, Tabriz, Iran, Tel: +98 411 6378743

**Email:** r.mahmodi@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(8): 778 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> D.V.M., Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>5</sup> BSc., Quality Control Laboratory, Pegah Milk Factory Tabriz, Tabriz, Iran